

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

**Einfluss von Parathormon auf  
Stammzellmobilisation und kardiales Remodelling  
nach akutem Myokardinfarkt im Mausmodell**

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

vorgelegt von

**Bruno Huber**

aus  
München

2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Wolfgang-Michael Franz
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. B. F. Becker Priv. Doz. Dr. med. V. Klauss
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. Marc Michael Zaruba
Dekan:	Prof. Dr. med. Dietrich Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	25.10.2007

*Meinen Eltern*

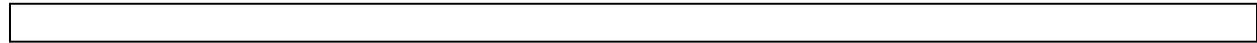
# Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG</b> .....	8
<b>1.1. Myokardinfarkt</b> .....	8
1.1.1. Epidemiologie .....	8
1.1.2. Pathophysiologie .....	8
<b>1.2. Stammzelltherapie nach Myokardinfarkt</b> .....	10
1.2.1. Übersicht .....	10
1.2.2. Embryonale Stammzellen .....	11
1.2.3. Adulte Stammzellen .....	12
1.2.3.1. Klinische Studien mit Stammzellen aus dem Knochenmark .....	14
1.2.3.2. Stammzellmobilisation.....	16
1.2.3.3. Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF).....	17
1.2.3.4. Klinische Studien mit G-CSF nach Myokardinfarkt.....	19
1.2.3.5. Mechanismen der Stammzell-basierten Myokardregeneration.....	21
<b>1.3. Parathormon (PTH)</b> .....	22
1.3.1. Biosynthese und Metabolismus .....	23
1.3.2. Physiologische Wirkung von PTH .....	24
1.3.3. PTH-Rezeptor.....	25
1.3.4. Regulation der Stammzellnischen im Knochenmark durch PTH .....	26
1.3.5. Kardiovaskuläre Wirkungen von PTH .....	27
1.3.6. Parathormone-related Peptide (PTHrP) .....	28
1.3.7. Klinischer Einsatz von PTH (1-34).....	29
<b>1.4. Fragestellung der Arbeit</b> .....	29
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b> .....	31
<b>2.1. Material</b> .....	31
2.1.1. Allgemeine Chemikalien und Lösungsmittel .....	31
2.1.2. Antikörper .....	31
2.1.3. Färbungen .....	32



2.1.4. Pharmaka .....	32
2.1.5. Operationszubehör .....	33
2.1.6. Versuchstiere .....	33
2.1.7. Geräte .....	33
2.1.7.1. Labor .....	33
2.1.7.2. Hämodynamik .....	34
2.1.7.3. Histologie .....	34
2.1.8. Hard- und Software .....	34
<b>2.2. Methoden .....</b>	<b>35</b>
2.2.1. Haltung der Tiere .....	35
2.2.2. Versuchsaufbau .....	35
2.2.3. Mausmodell .....	37
2.2.3.1. Infarktinduzierung .....	37
2.2.3.2. Gabe von Parathormon (PTH) und Bromodeoxyuridin (BrdU).....	39
2.2.3.3. Hämodynamische Messungen.....	40
2.2.3.3.1. Grundprinzip der Conductance-Methode.....	40
2.2.3.3.2. Parallele Conductance .....	41
2.2.3.3.3. Vena-cava-Okklusion.....	43
2.2.3.3.4. Ablauf der Messung .....	44
2.2.3.3.5. Aufzeichnung und Messparameter.....	45
2.2.4. Histologie .....	46
2.2.4.1. Bestimmung der Morphologie .....	47
2.2.4.1.1. Infarktgröße .....	47
2.2.4.1.2. Wanddicke im Infarktgebiet.....	48
2.2.4.1.3 Granulationsgewebe .....	49
2.2.4.2. Immunhistochemie .....	49
2.2.4.2.1. BrdU-Färbung .....	50
2.2.4.2.2. Ki67-Färbung .....	50
2.2.4.2.3. Anti-CD31 (CD31).....	50
2.2.5. Durchflusszytometrie (FACS, Fluorescence Activated Cell Sorting) .....	50
2.2.6. Statistische Analyse .....	51

<b>3. ERGEBNISSE</b> .....	53
<b>3.1. Mobilisierung von Knochenmarkstammzellen durch PTH- Gabe</b> .....	53
<b>3.2. Überleben an Tag 30</b> .....	58
<b>3.3. Hämodynamik</b> .....	59
3.3.1. Übersicht der Herzfunktion .....	59
3.3.2. Auswirkung von PTH (1-34) auf die Hämodynamik scheinoperierter Tiere .....	59
3.3.3. Linksventrikulärer Druck .....	61
3.3.4. Herzfrequenz .....	62
3.3.5. Herzzeitvolumen .....	63
3.3.6. Ejektionsfraktion .....	64
3.3.7. Arterielle Nachlast.....	65
<b>3.4. Histologie</b> .....	66
3.4.1. Infarktgrößen.....	66
3.4.2. Wanddicken.....	67
3.4.2.1. Linksventrikuläre Vorderwand .....	67
3.4.2.2. Septumdicke .....	70
3.4.3. Granulationsgewebe .....	70
3.4.4. Zellzahl.....	71
<b>3.5. Immunhistochemie</b> .....	72
3.5.1. Brdu <sup>+</sup> /Ki67 <sup>+</sup> Zellen.....	72
3.5.2. CD31 <sup>+</sup> Kapillaren in der Infarkt-Borderzone .....	74
3.5.3. VEGF-Expression in der Infarkt-Borderzone .....	75
3.5.4. IGF-1-Rezeptor-Expression in der Infarkt-Borderzone .....	76
<b>4. DISKUSSION</b> .....	78
<b>4.1. PTH (1-34) mobilisiert Knochenmarkstammzellen ins periphere Blut</b> .....	79
<b>4.2. PTH (1-34)-Behandlung nach akutem Myokardinfarkt senkt die Mortalität     und verbessert die Herzfunktion</b> .....	81
<b>4.3. PTH (1-34) führt über VEGF/IGF-1 zur verstärkten Neoangiogenese     nach akutem Myokardinfarkt</b> .....	83



<b>4.4. Limitationen der Arbeit</b> .....	86
<b>4.5. Parathormon als Therapieoption nach Myokardinfarkt?- Ein Ausblick</b> .....	87
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	88
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	90
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	111
<b>DANKSAGUNGEN</b> .....	112
<b>LEBENS LAUF</b> .....	113

# **1. Einleitung**

## **1.1. Myokardinfarkt**

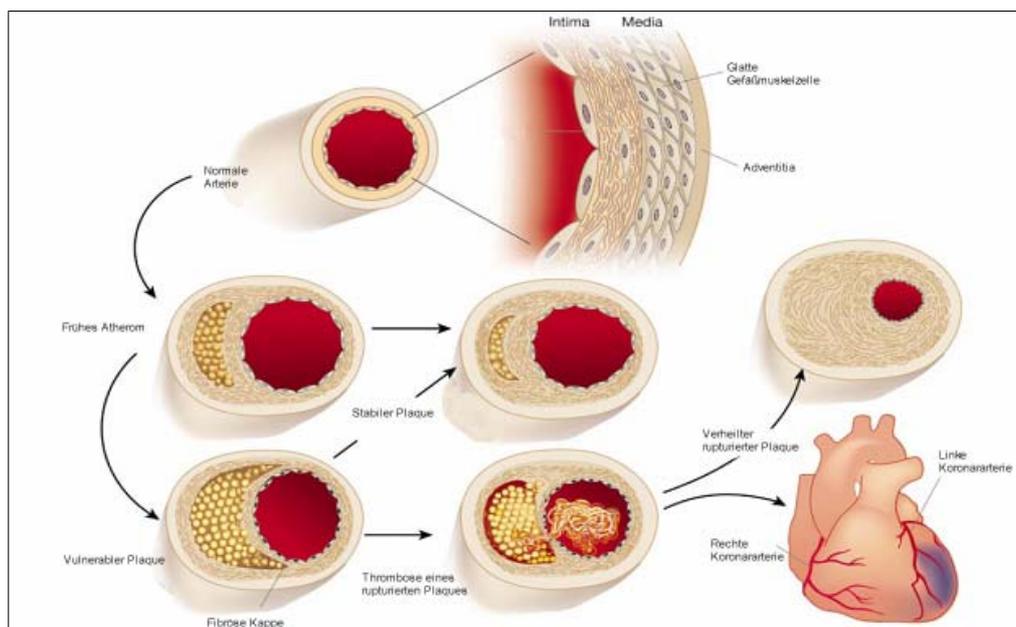
### **1.1.1. Epidemiologie**

Wie das Statistische Bundesamt zum Weltherztag am 24. September 2006 mitteilte, starben im Jahr 2005 in Deutschland insgesamt 434.540 Personen an den Folgen von Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Darunter erlagen alleine 61.056 Menschen (6,4% der verstorbenen Frauen und 8,5% der verstorbenen Männer) einem Herzinfarkt (1). In Europa stellt er damit gegenwärtig die häufigste Todesursache dar (2, 3). Die Letalität des akuten Infarkts innerhalb der ersten vier Wochen beträgt über 40% (4). Rund ein Sechstel der gesamten Ausgaben im deutschen Gesundheitswesen wurden im Jahr 2004 für die Behandlung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen aufgewendet (35,3 Mrd. € von insgesamt 225 Mrd. €) (5), ungefähr 20% davon allein für ischämische Herzerkrankungen. Die Gruppe der ischämischen Herzerkrankungen mit dem akuten Myokardinfarkt als Mitauslöser ist demzufolge sowohl ein bedeutendes medizinisches als auch ein großes volkswirtschaftliches Problem, das mit der steigenden Lebenserwartung der Menschen in den Industrienationen weiter an Gewicht zunehmen wird.

### **1.1.2. Pathophysiologie**

Der Myokardinfarkt ist eine ischämisch bedingte Myokardnekrose, der zumeist eine koronare Herzerkrankung zugrunde liegt (6, 7). Begünstigt durch Risikofaktoren wie Rauchen, arterieller Hypertonus, Diabetes mellitus oder Hypercholesterinämie kommt es in einem schleichenden Prozess über Jahrzehnte zu einer endothelialen Dysfunktion und nachfolgend zum Einstrom von Lipoproteinen in die Intima (8). Insbesondere das Low-Density-Lipoproteine (LDL) wird bei Aufnahme in die Gefäßwand oxidiert, was zu inflammatorischen Veränderungen der Intima sowie zur Einwanderung von Monozyten und T-Lymphozyten führt (9). Bereits im Kindesalter treten in der Intima als frühe atherosklerotische Gefäßläsion (Typ I nach Stary) Lipidablagerungen in den Makrophagen auf, welche man auch als Schaumzellen (foam-cells) bezeichnet (10, 11). An den Proliferationen im subintimalen Raum

des Gefäßes, die makroskopisch als weißliche Fettablagerungen („fatty streaks“) imponieren, beteiligen sich zunehmend auch glatte Muskelzellen. Diese nehmen ebenfalls Lipide auf (Typ II) (12), bis die extrazelluläre Matrix dominiert (Typ III) (13, 14). Die beschriebenen Läsionen vom Typ I–III sind vollständig reversibel und führen nicht zu relevanten Stenosen des Gefäßlumens. Im weiteren Verlauf werden die glatten Muskelzellen durch das extrazelluläre Lipid zunehmend verdrängt (Typ IV). Als Antwort synthetisieren die glatten Muskelzellen der Intima Kollagen, wodurch es zu einer Fibrosierung der Plaques kommt (Typ V). Diese Veränderungen (Typ IV+V) können lange klinisch unauffällig verlaufen und zu einer langsamen Reduktion des Gefäßlumens führen. Häufig entwickeln sich aber auch so genannte „komplizierte Läsionen“, die durch Nekrosen, Erosionen, Ulzerationen oder thrombotische Ablagerungen charakterisiert sind (Typ VI). Kommt es zum Einriss einer solchen „komplizierten Läsion“ (so genannte Plaqueruptur), kann es schnell zu einer lebensbedrohlichen Situation kommen (siehe Abbildung 1). Aufgrund zahlreicher Obduktionsstudien und der in den ersten Stunden nach einem Infarkt ereignis durchgeführten Koronarangiographien konnte der akute thrombotische Koronararterienverschluß als die entscheidende Ursache des akuten transmuralen Myokardinfarkts identifiziert werden (15, 16). Dabei kommt es durch die Ruptur eines atheromatösen Plaques zur Induktion eines Plättchenthrombus, der die nachfolgende Koronararterie verschließt (8).



**Abbildung 1**

Schematische Darstellung des stadienhaften Ablaufs der Koronarsklerose; Abb. modifiziert nach (11)

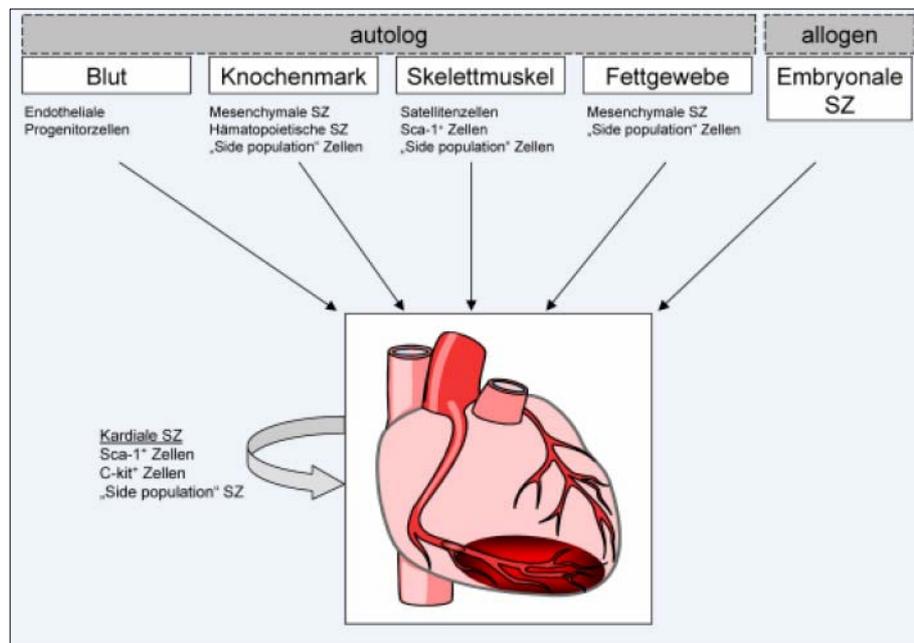
Obwohl heutzutage in vielen Kliniken die schnelle Wiedereröffnung des verschlossenen Herzkranzgefäßes mittels PTCA (Perkutane transluminale koronare Angioplastie) oder Lyse-Therapie durchgeführt wird, kommt es bei einer Vielzahl von Patienten im Anschluss zu einer ischämischen Kardiomyopathie und dadurch gehäuft zum plötzlichen Herztod (17). Therapie der Wahl bei terminaler Herzinsuffizienz ist die Herztransplantation, die aber aufgrund der geringen Anzahl von Spenderherzen limitiert ist (18, 19). Daher hat die Forschung an alternativen Therapieverfahren in den letzten Jahren deutlich zugenommen.

Ein möglicher Ansatz ist die Zelltherapie mit Stammzellen zur biologischen Regeneration des Herzmuskels. Obwohl in einigen Arbeiten das mitotische Potenzial von Kardiomyozyten gezeigt werden konnte (20-24), ist deren Proliferationsfähigkeit nicht ausreichend, um einen massiven Zelluntergang zu bewältigen. So kommt es nach Myokardinfarkt zu einer Defektheilung mit pathologischem „Remodelling“ und Ersatz des Herzmuskelgewebes durch Narbengewebe. Diese Prozesse führen häufig zu linksventrikulärer Dilatation und Herzinsuffizienz (25). Ist das Ziel der bewährten Therapeutika wie ACE-Hemmer oder  $\beta$ -Blocker bisher eine Verminderung des pathologischen „Remodellings“, könnte der Einsatz von Stammzellen zu einer tatsächlichen Regeneration von geschädigtem Myokard führen.

## **1.2. Stammzelltherapie nach Myokardinfarkt**

### **1.2.1. Übersicht**

In den letzten Jahren wurden embryonale Stammzellen (26-38) und verschiedene Subtypen adulter Stammzellen wie Skelettmyoblasten (39-41) und Stammzellen aus dem Knochenmark sowie dem peripheren Blut (42-54) in zahlreichen präklinischen Studien bezüglich ihrer Eignung als Spenderzellen zur myokardialen Regeneration untersucht (Abbildung 2).



**Abbildung 2**

Potenzielle Quellen zur Stammzellgewinnung für die kardiale Regeneration; Abb. modifiziert nach (55); SZ: Stammzelle

## 1.2.2. Embryonale Stammzellen

Unter embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) versteht man pluripotente Zelllinien, die aus der inneren Zellmasse der Blastozyste gewonnen werden und sich in Zellen aller drei Keimblätter differenzieren können. Sie besitzen eine ausgeprägte Fähigkeit zur ständigen Selbsterneuerung und Proliferation *in vitro*. ES-Zellen stellen deshalb eine potentielle Quelle für die Generierung von Kardiomyzyten unterschiedlicher Entwicklungsstadien bis hin zu spontan kontrahierenden Herzmuskelzellen dar (56, 57). In Tiermodellen konnte die erfolgreiche Transplantation embryonaler Stammzellen in infarziertes Myokard mit nachfolgender Verbesserung der kardialen Pumpleistung gezeigt werden (28, 29, 32, 33, 35, 36, 38).

Eine Therapie mit ES-Zellen zur Regeneration von geschädigtem Gewebe ist aber aus verschiedenen Gründen umstritten und ein klinischer Einsatz in den nächsten Jahren sehr fragwürdig:

- In den EU- Ländern sind reproduktives und therapeutisches (ausgenommen Großbritannien) Klonen verboten. Gleiches gilt für die Herstellung embryonaler Stammzelllinien (ausgenommen Großbritannien, Holland und Schweden). Das deutsche Stammzellgesetz (StZG) vom 28.06.2002 ist im internationalen Vergleich sehr restriktiv und erlaubt nur in Einzelfällen den Import bereits vorhandener humaner ES-Zellen.
- Beim Einsatz undifferenzierter embryonaler Stammzellen kam es zur Bildung von Teratomen und Teratokarzinomen (58, 59).
- Kardiomyozyten, die aus murinen ES-Zellen gezüchtet wurden, zeigten in Versuchen arrhythmogenes Potential (60).
- Beim Einsatz embryonaler Stammzellen und aus ihnen differenzierten Zellen käme es wie bei Organtransplantationen zur Abstoßung, die eine immunsuppressive Therapie notwendig machen würde (61).

### **1.2.3. Adulte Stammzellen**

Als wichtigste Quelle für somatische (adulte) Stammzellen gilt das Knochenmark, das verschiedene Subtypen von Progenitorzellen wie die hämatopoetischen Stammzellen (HSCs), die sog. „Side Population“ (62), mesenchymale Stammzellen (MSCs) (63) und multipotente adulte Progenitorzellen (MAPCs), eine Subpopulation der mesenchymalen Stammzellen (64) enthält. Ebenso gelten endotheliale Progenitorzellen (EPCs), die aus dem peripheren Blut stammen, sowie aus Nabelschnurblut gewonnene Stammzellen (USSCs) (65) als sehr aussichtsreich für die Zelltherapie nach akutem Myokardinfarkt. Zusammen mit skelettalen Myofibroblasten (66, 67) und ortsständigen kardialen Stammzellen (CSCs) (21) bilden sie die

Zelltypen, die für die Therapie ischämischer Herzkrankheiten in Frage kommen (siehe Tabelle 1).

Zelltyp	Quelle	Charakteristika	Literatur
<b>Hämatopoetische Stammzellen (HSCs)</b>	Knochenmark	CD34 <sup>+</sup> , CD 45 <sup>+</sup> , CD133 <sup>+</sup> , c-kit <sup>+</sup> , sca-1 <sup>+</sup> , Lin <sup>-</sup>	(55)
<b>Side Population (SP)</b>	Knochenmark	Ausschleusen des Farbstoffes Hoechst 33342 über den Transportkanal ABCG2	(49)
<b>Mesenchymale Stammzellen (MSCs)</b>	Knochenmark	Auf Fibronectin adhärente, nicht hämatopoetische Stromazellen des Knochenmarks CD44 <sup>+</sup> , CD90 <sup>+</sup> , CD105 <sup>+</sup> , Stro-1 <sup>+</sup> , CD34 <sup>-</sup> , CD45 <sup>-</sup> , CD133 <sup>-</sup>	(63)
<b>Multipotente adulte Progenitorzellen (MAPCs)</b>	Knochenmark	Subtyp der MSCs Differenzierung zu Zelltypen aller drei embryonalen Keimblätter CD45 <sup>-</sup> , Glykophorin A <sup>-</sup>	(64)
<b>Umbilikale somatische Stammzellen (USSCs)</b>	Nabelschnurblut	Subtyp der MSCs, Differenzierung zu Zelltypen aller drei embryonalen Keimblätter CD 44 <sup>+</sup> ; CD90 <sup>+</sup> ; CD105 <sup>+</sup> , CD34 <sup>-</sup> ; CD45 <sup>-</sup> , c-kit <sup>-</sup>	(65)
<b>Endotheliale Progenitorzellen (EPCs)</b>	Peripheres Blut	Isolation aus mononukleären Zellen <i>ex vivo</i> -Kultivierung CD31 <sup>+</sup> ; CD34 <sup>+</sup> ; CD133 <sup>+</sup> , CD105 <sup>+</sup> ; KDR <sup>+</sup> , Tie-2 <sup>+</sup> , CD45 <sup>-</sup>	(51, 54)
<b>Residente kardiale Stammzellen (CSCs; „Cardiospheres“)</b>	Ortsständige Stammzellen	Isolation aus Myokardbiopsat <i>ex vivo</i> -Kultivierung negativ für hämatopoetische Marker hohe Telomerase-Aktivität aus adulten Herzen: c-kit <sup>+/-</sup> , Sca-1-ähnliche Epitope <sup>+</sup> , MDR1 <sup>+</sup> , KDR1 <sup>+</sup> aus neonatalen Herzen: Isl-1 <sup>+</sup>	(21, 22, 68-73)
<b>SkelettmYOblasten</b>	Ortsständige Stammzellen	Isolation aus Skelettmuskelbiopsat <i>ex vivo</i> -Kultivierung, CD56 <sup>+</sup>	(74)

**Tabelle 1**

Übersicht der Subpopulationen humaner adulter Stammzellen für die Zelltherapie ischämischer Herzerkrankungen (75)

### **1.2.3.1. Klinische Studien mit Stammzellen aus dem Knochenmark**

Die momentan am häufigsten verwendete Quelle für klinische Zelltherapiestudien ist das Knochenmark (76-79). Hierfür wird durch Aspiration unfraktioniertes Knochenmark gewonnen, das die heterogenen Subtypen der mononukleären Zellen wie hämatopoetische Stammzellen, „Side Population“-Zellen, mesenchymale Zellen und multipotente adulte Progenitorzellen (Tab. 1) enthält. Nach Isolation der Zellen werden diese ohne *ex vivo*-Expansion injiziert. Alternativ finden endotheliale Progenitorzellen Anwendung, die aus dem peripheren Blut gewonnen und mittels *ex vivo*-Kultivierung in „Endothel-spezifischem“ Medium selektiert werden (80), bevor sie ins Herz (intrakoronar) injiziert werden. In Tabelle 2 sind die bisherigen klinischen Studien zur Stammzelltherapie bei akutem Myokardinfarkt zusammengefasst.

In allen Arbeiten war die intrakoronare Infusion von unfraktioniertem Knochenmark oder zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen mit keinerlei zusätzlichen Komplikationen assoziiert. Die Frühdaten nach vier bis sechs Wochen sind in allen bisher veröffentlichten Studien bei akutem Myokardinfarkt ähnlich – unabhängig vom transplantierten Zelltyp und der Zellzahl: So sieht man einen Anstieg der linksventrikulären Ejektionsfraktion zwischen 7 und 9%, ein vermindertes enddiastolisches linksventrikuläres Volumen und eine verbesserte Perfusion im Infarktareal (76, 77, 81-83).

Bezüglich der Langzeiteffekte weisen neue Daten der TOPCARE-AMI-Studie magnetresonanztomographisch auch nach 12-24 Monaten die verbesserte linksventrikuläre Pumpfunktion ohne reaktive Hypertrophie nach (84, 85). Die wenigen bisher durchgeführten prospektiv randomisiert konzipierten Studien mit größeren Patientenkollektiven liefern widersprüchliche Daten. So zeigen jüngste Daten von Janssens et al. zwar eine kleinere Infarktnarbe, aber keine verbesserte Pumpfunktion in der Behandlungsgruppe (86). Dies deckt sich mit Ergebnissen der skandinavischen ASTAMI-Studie, die nach sechs Monaten ebenfalls keine signifikanten funktionellen Effekte nachweisen konnte (82). Im Gegensatz dazu zeigen erste ventrikulographische Daten der in Deutschland derzeit laufenden multizentrischen REPAIR-AMI-Studie nach vier Monaten eine Verbesserung der globalen Kontraktilität in der mit unfraktioniertem Knochenmark behandelten Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe (83).

Die BOOST-Studie, die bisher einzige randomisierte Studie mit Langzeitergebnissen, führte zwar zu einem Anstieg der globalen linksventrikulären Funktion sechs Monate nach Transplantation, nicht jedoch in der 18-Monats-Kontrolle (79).

Studie	Zelltyp	Zellzahl (x10 <sup>6</sup> )	Patienten	Effekte
<b>Strauer et al.</b> (76)	BMC vs. Ko.	28	20 vs. 20 Ko.	Regionale Kontraktilität (LVA) ↑ Endsystolisches Volumen (LVA) ↓ Perfusion (Szintigraphie) ↑
<b>TOPCARE-AMI</b> (77, 84, 85, 87, 88)	BMC bzw. EPCs	213 (BMC) bzw. 16 (EPCs)	30 (BMC) bzw. 29 (EPCs)	BMC: Globale Kontraktilität (LVA/MRT) ↑ Vitalität (PET, MRT) ↑ Endsystolisches Volumen (LVA) ↓ Koronare Flussreserve (i.c. Doppler) ↑
<b>BOOST (79)</b>	BMC vs. random. Ko.	2460	30 vs. 30 Ko.	Globale Kontraktilität (MRT) ↑
<b>Fernandez-Aviles (81)</b>	BMC	78	20	Globale Kontraktilität (MRT) ↑ Endsystolisches Volumen (MRT) ↓
<b>Janssens et al.</b> (86)	BMC	304	33 vs. 34 Ko.	Globale Kontraktilität (MRT) → Infarktgröße (MRT) ↓
<b>ASTAMI (82, 89);</b>	BMC vs. random. Ko.	87	50 vs. 50 Ko.	Globale Kontraktilität (MRT, SPECT, Echo) → Endsystolisches Volumen (MRT, Echo) → Enddiastolisches Volumen (MRT, Echo) →
<b>Repair-AMI</b> (83, 90)	BMC vs. random. Ko.	236	101 vs. 103 Ko.	Globale Kontraktilität (LVA) ↑

**Tabelle 2**

*Intrakoronare Stammzelltherapie bei akutem Myokardinfarkt; BMC: unfraktioniertes Knochenmark; EPCs: endotheliale Progenitorzellen; LVA: linksventrikuläre Angiographie; MRT: Magnetresonanztomographie; SPECT: Einzel-Photon-Emissions-Computertomographie; Ko.: Kontrolle*

### 1.2.3.2. Stammzellmobilisation

Eine weitere Möglichkeit, Stammzellen zur Regeneration des Myokards bereitzustellen, bietet die Mobilisation endogener, zirkulierender Stammzellen (75), (91). Diese Technik besitzt den Vorteil, dass auf die Transplantation exogener Zellen verzichtet werden kann und zusätzlich direkte Effekte der Wachstumsfaktoren unabhängig von der Stammzellmobilisation bestehen. Probleme hinsichtlich des Immunsystems wie auch ethischer Aspekte bestehen somit nicht. Vermittelt wird die Stammzellmobilisation durch hämatopoetische Wachstumsfaktoren wie G-CSF (Granulocyte-colony stimulating factor), GM-CSF (Granulocyte macrophage-colony stimulating factor) und weitere Faktoren. In Tabelle 3 sind verschiedenen Stoffe und Faktoren mit Stammzell-mobilisierenden Eigenschaften zusammengefasst.

Klasse	Beispiel	Effekte
<b>Wachstumsfaktoren (47, 53, 92-94)</b>	G-CSF; GM-CSF; IL-3; VEGF; SCF; EPO	Aktivierung + Expansion von Granulozyten ↑; MMP-9 ↑;
<b>Chemokine (95-97)</b>	CXCL2; CXCL8; SDF-1; IL-8	Direkte Aktivierung von Granulozyten ↑
<b>Hormone (98)</b>	Östrogen	Endotheliales NO ↑
<b>Medikamente (99)</b>	Statine	PI3K/Akt ↑
<b>Toxine (100)</b>	Pertussis Toxin	CXCR4/SDF-1 ↓
<b>Stress (101)</b>	Intensive Bewegung	Endotheliales NO ↑
<b>Immunsuppression (100)</b>	Cyclophosphamid; 5-FU	Expansion von Granulozyten ↑

**Tabelle 3**

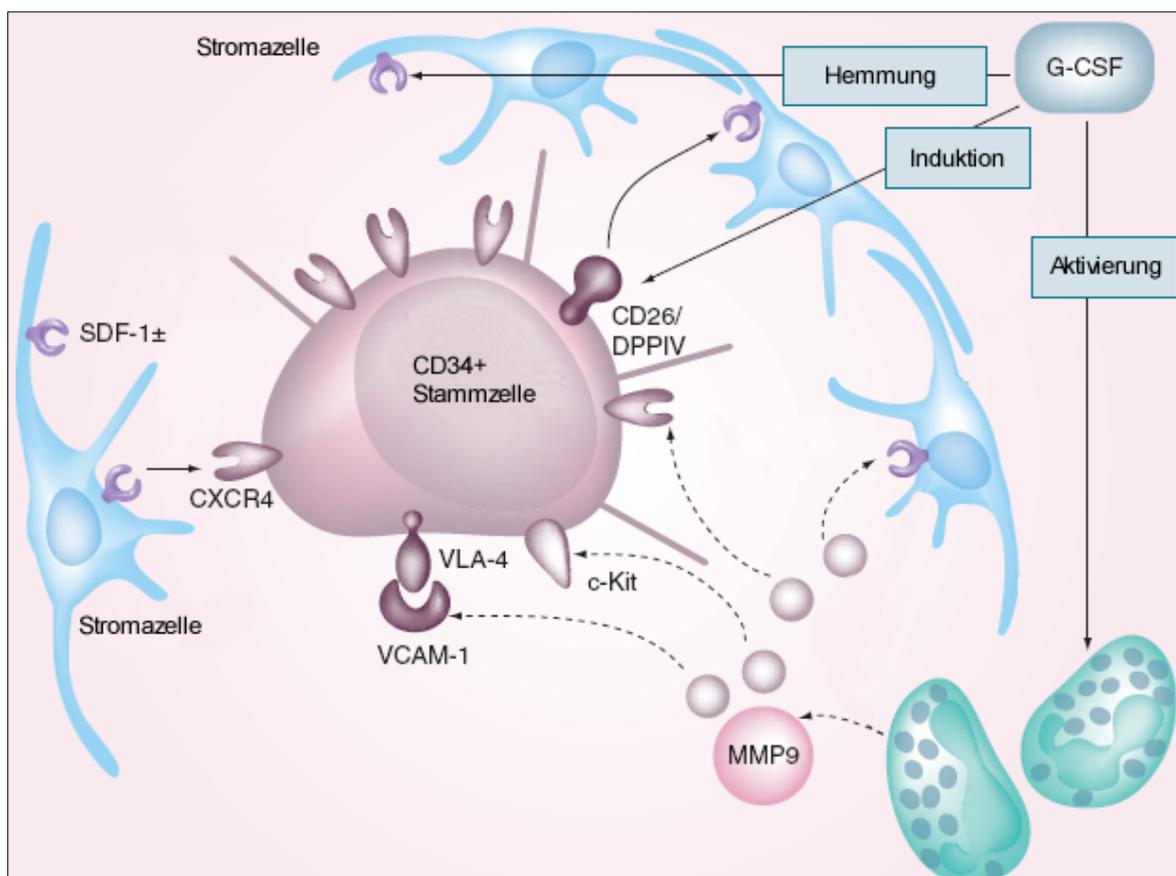
*Übersicht der verschiedenen Klassen von Stammzell-mobilisierenden Substanzen*

Die aktuell am häufigsten klinisch eingesetzte Substanz zur Stammzellmobilisation aus dem Knochenmark ist G-CSF. Es wird seit Jahren v.a. bei immunsupprimierten Patienten nach Knochenmarktransplantation verwendet (102, 103).

### 1.2.3.3. Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF)

G-CSF ist ein Glykoprotein und wird von hämatopoetischen Zellen wie Makrophagen, Monozyten und Lymphozyten, aber auch von Fibroblasten, Astrozyten und stromalen Knochenmarkzellen gebildet (104). Die Ausschüttung von G-CSF wird sowohl durch physiologischen, als auch pathologischen Stress wie dem akuten Myokardinfarkt gesteigert (105, 106). Vermittelt werden die Effekte über den G-CSF-Rezeptor, der an der Oberfläche verschiedener Zellen, wie z. B. hämatopoetischer Zellen, Endothelzellen, neuronaler Zellen, aktivierter T-Lymphozyten und auch Kardiomyozyten (107-109) exprimiert wird. G-CSF interagiert an verschiedenen Stellen mit Rezeptoren und Liganden und führt so zur Mobilisation von Stammzellen (siehe Abbildung 3). Das Chemokin SDF-1 (Stromal Cell Derived Factor-1; CXCL12), das von Stromazellen im Knochenmark produziert wird, und der SDF-1-Rezeptor CXCR4 spielen eine wichtige Rolle für Überleben, Adhäsion und Freisetzung hämatopoetischer Stammzellen im Knochenmark (110). Studien an SDF-1 und CXCR4-Knockout-Mäusen haben gezeigt, dass sowohl SDF-1 als auch sein Rezeptor CXCR4 für die Wanderung von HSCs von der fetalen Leber ins Knochenmark notwendig sind (111). Erhöhung des SDF-1-Spiegels im Blut durch Gabe von CXCL12 führt zu einer signifikanten Mobilisation von HSCs ins periphere Blut. Verschiedene Arbeiten haben gezeigt, dass eine Unterbrechung der SDF-1/CXCR4-Achse einer der Hauptmechanismen der Stammzellmobilisation durch G-CSF ist (96, 97). So stellten Petit et al. nach G-CSF-Behandlung einen deutlichen Abfall des SDF-1-Protein-Spiegels im Knochenmark fest. Dabei korrelierte das Ausmaß der verringerten SDF-1-Protein-Expression gut mit der Menge an mobilisierten Stammzellen (112). Auch die Serin-Protease CD26 (Dipeptidylpeptidase IV; DPP-IV), die extrazellulär membrangebunden auf bestimmten hämatopoetischen Stammzellen exprimiert wird, kann durch proteolytische Spaltung SDF-1 inaktivieren. Die Behandlung mit G-CSF führte *in vitro* zu einer gesteigerten Expression von CD26 und hatte dadurch ein vermindertes Ansprechen von CD34<sup>+</sup> Stammzellen auf CXCL12 zur Folge (113, 114). Daher scheint eine gleichzeitige Behandlung mit G-CSF und einem CD26-Inhibitor zur Verbesserung des „Homings“ sinnvoll zu sein (115).

In vielen Arbeiten wurde auch der Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9), die zur Gruppe der Zink-abhängigen Endoproteasen gehört, eine große Bedeutung bei der Zytokin-induzierten Stammzellmobilisation zugesprochen (116-119). Dies wurde vor allem von Heissig et al. gestützt, die an MMP-9-Knockout-Mäusen zeigten, dass dort die Stammzellmobilisation mittels Wachstumsfaktoren wie G-CSF deutlich eingeschränkt war. Als potenzieller Mechanismus gilt die nachgewiesene Spaltung des an der Oberfläche von Stromazellen im Knochenmark liegende SCF (Stem cell factor; Kit- Ligand) durch MMP-9 (120).



**Abbildung 3**

Schematische Darstellung verschiedener Angriffspunkte von G-CSF bei der Stammzellmobilisation; Abb. modifiziert nach (121); DPPIV: Dipeptidylpeptidase IV; G-CSF: Granulocyte colony-stimulating factor; MMP: Matrix metalloproteinase; SDF: Stromal-cell derived factor; VCAM: Vascular cell adhesion molecule; VLA: Very late antigen

Im Jahr 2001 wurde erstmals von der Gruppe Anversa die Wirkung von G-CSF nach akutem Myokardinfarkt im Mausmodell untersucht. Die Ergebnisse zeigten bei den mit G-CSF behandelten Tieren eine um 68% niedrigere Mortalität verglichen mit Kochsalz (Saline) behandelten Kontrolltieren. Dies war mit einer geringeren Infarktgröße (-40%) und einer signifikant höheren Auswurffraktion assoziiert (47). Die Ergebnisse waren der Beginn vieler Arbeiten, die sowohl experimentell in verschiedenen Tiermodellen (122-129) als auch in klinischen Studien (130-138) die Wirksamkeit von G-CSF untersuchten.

### **1.2.3.4. Klinische Studien mit G-CSF bei Myokardinfarkt**

In der ersten nicht Placebo-kontrollierten Arbeit von Kueth et al. (132) zeigte sich eine verbesserte myokardiale Kontraktilität nach G-CSF-Behandlung, ohne dass schwerwiegende Nebenwirkungen auftraten (zusammengefasst in Tabelle 4). Auch verschiedene andere Arbeiten bestätigten den sicheren Einsatz von G-CSF (132-137). Dagegen wurden in der MAGIC-cell-Studie vermehrt In-Stent-Restenosen nach G-CSF-Behandlung festgestellt, was zum zwischenzeitlichen Abbruch der Studie führte (131).

Die 7-tägige G-CSF-Behandlung nach akutem Infarkt führte in der Kueth-Studie zu einem signifikanten Anstieg der Auswurffraktion im Vergleich zur Kontrolle. Diese Daten wurden auch durch die Arbeiten von Valgimigli (133) und der Firstline-AMI-Studie (134, 135) gestützt, welche eine signifikante Verbesserung der globalen Pumpfunktion nach G-CSF-Gabe zeigten. Im Gegensatz dazu konnten die neueren Arbeiten mit verbessertem Studiendesign (doppelverblindet, Placebo-kontrolliert) und größeren Patientenzahlen keinen positiven Effekt von G-CSF bei akutem Herzinfarkt nachweisen. So stieg in der skandinavischen STEMMI-Studie (136) die Auswurffraktion in beiden Gruppen an (G-CSF: +8,5% vs. Kontrolle: +8%). Auch hinsichtlich der Infarktgröße bestand kein Unterschied zwischen den Gruppen. In der G-CSF-STEMI-Studie konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied in der Herzfunktion oder der Infarktgröße zwischen den Gruppen festgestellt werden. Die größte bislang veröffentlichte Arbeit, die REVIVAL-2-Studie (138) konnte an 114 Patienten ebenfalls keinen positiven G-CSF-Effekt nachweisen. Nach 6 Monaten wurden magnetresonanztomographisch eine gering verbesserte Ejektionsfraktion (G-CSF: +0,5±3,8%

vs. Kontrolle:  $+2,0 \pm 4,9\%$ ) und kleinere Infarktgrößen (G-CSF:  $-6,2 \pm 9,1\%$  vs. Kontrolle:  $-4,9 \pm 8,4\%$ ) in beiden Gruppen gemessen.

Studie	n	Kont rolle	Place bo	Dosis	G-CSF- Gabe (nach PCI)	Effekte
<b>MAGIC cell trial (130)</b>	28	Ja	Ja	10 µg/kg KG für 4d auch introkoronare Gabe (i.c.)	Vor PCI	Globale Kontraktilität (SPECT) ↑ (nur in i.c. Gruppe)
<b>Kuethé (132)</b>	14	Nein	Nein	10 µg/kg KG für 7d	2d	Globale Kontraktilität (SPECT) ↑
<b>Valgimigli (133)</b>	14	Ja	Nein	5 µg/kg KG für 4d	24 h	Globale Kontraktilität (SPECT) ↑
<b>Firstline-AMI (134, 135)</b>	50	Nein	Ja	10 µg/kg KG für 6d	90 min	Globale Kontraktilität (LVA, ECHO)↑
<b>REVIVAL-2 (138)</b>	114	Ja	Ja	10 µg/kg KG für 6d	5d	Globale Kontraktilität (MRT) in beiden Gruppen ↑ (2,8% vs 2,8%) Infarktgröße (MRT)↓ (in beiden Gr.)
<b>STEMMI (136)</b>	78	Ja	Ja	10 µg/kg KG für 5d	30h	Regionale Herzfunktion (MRT) in beiden Gruppen ↑ (+17% vs +17%) EF in beiden Gruppen ↑ (8% vs 8%)
<b>GCSF- STEMI (137)</b>	44	Ja	Ja	10 µg/kg KG für 5d	31h	Globale Kontraktilität (MRT) in beiden Gruppen ↑ (6% vs 5%) Infarktgröße (MRT)↓ (in beiden Gr.) Perfusion ↑ (G-CSF)

**Tabelle 4**

*Klinische Studien mit G-CSF nach akutem Myokardinfarkt; G-CSF: Granulocyte-colony-stimulating factor; PCI: perkutane Koronarintervention; i.c.: intrakoronar; MRT: Magnetresonanztomographie; SPECT: Einzel-Photon-Emissions-Computertomographie; Ko.: Kontrolle*

Ein Erklärungsansatz für die widersprüchlichen Daten ist möglicherweise der Zeitpunkt der ersten G-CSF-Gabe nach Intervention. Harada et al. zeigten im Tiermodell, dass die positiven Effekte auf die Kardiomyozyten und das „Remodelling“ über den Jak/Stat-Signalweg nach verzögerter G-CSF-Gabe vermindert waren (125). Diese Theorie wurde durch die klinischen Arbeiten gestützt. So wurde in der Firstline-AMI-Studie 90 Minuten nach perkutaner Koronarintervention (PCI) die erste G-CSF-Dosis appliziert, was zu einer Steigerung der globalen Kontraktilität führte (134, 135). Im Gegensatz dazu waren die „verspäteten“ G-CSF-

Gaben in der STEMMI-Studie (30 h nach PCI) (136), der G-CSF-STEMI Studie (31 h nach Intervention) (137) bzw. der REVIVAL-2-Studie (fünf Tage nach PCI) (138) nicht mit einer Verbesserung der Pumpfunktion im Vergleich zu den Kontrollpatienten assoziiert.

### **1.2.3.5. Mechanismen der Stammzell-basierten Myokardregeneration**

Trotz zahlreicher präklinischer und klinischer Studien gibt es immer noch keine endgültige Erklärung, wie transplantierte oder mobilisierte Stammzellen die Herzfunktion nach vorhergehender Schädigung verbessern. Orlic et al. zeigten im Jahr 2001, dass sich Knochenmarkstammzellen 9 Tage nach Transplantation im Mäuseherz zu Kardiomyozyten differenzierten und dadurch zu einer verbesserten Herzfunktion führten (46). Diese Transdifferenzierung von Stammzellen zu Kardiomyozyten wurde in den letzten Jahren heftig diskutiert (139-144) und man geht heute von Zellfusion als Mechanismus aus (145).

In neueren Arbeiten werden parakrine Effekte, die über Zytokine bzw. Wachstumsfaktoren vermittelt werden, als mögliche Mechanismen in Betracht gezogen. So führte ein Modell am Affen nach Transplantation von CD34<sup>+</sup> Zellen aus dem Knochenmark in die Infarkt-Borderzone zu gesteigertem regionalen Blutfluss im Myokard. Dies war mit einer erhöhten Konzentration von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) assoziiert (146). Auch andere vaskuläre Wachstumsfaktoren wie Fibroblast Growth Factor (FGF), Insulin like Growth Factor-1 (IGF-1) und SDF-1 waren erhöht und sollen Anteil am verbesserten Überleben von Zellen haben, die an das Infarktgebiet angrenzen (147, 148). Kürzlich konnten Fazel et al. nach Myokardinfarkt vermehrt c-kit<sup>+</sup> Zellen im Herzen nachweisen. Diese Zellen wurden mittels transgener Mäuse zurückverfolgt, wobei das Knochenmark als Ursprung ermittelt wurde. Die c-kit<sup>+</sup> Zellen sorgten in der Grenzzone um den Infarkt (so genannte Borderzone) für ein „Angiogenese-freundliches“ Milieu. Vermittelt wurde dieser Effekt durch VEGF. Eine Mutation im c-kit-Rezeptor, der auf Knochenmarkstammzellen exprimiert wird, führte zu verminderter Wanderung der c-kit<sup>+</sup> Zellen zum Herz, einer reduzierten Angiogenese und war mit einer erhöhten Mortalität assoziiert (149).

Neben der Stammzellmobilisation durch Wachstumsfaktoren ist auch deren Wanderung ins geschädigte Gewebe (so genanntes „Homing“) ein Schlüsselmechanismus bei der Myokardregeneration. Abbott et al. zeigten, dass der Chemokin-Rezeptor CXCR4 und dessen Ligand SDF-1 nach Myokardinfarkt vermehrt im ischämischen Areal nachweisbar sind und eine wichtige Rolle im Homing-Prozess spielen. Auch das endotheliale Adhäsionsmolekül Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) wurde dort vermehrt gefunden (150). ICAM-1 scheint aber auch an der G-CSF vermittelten Angiogenese beteiligt zu sein. Deindl et al. wiesen im Mausmodell nach LAD-Ligation und 5-tägiger G-CSF-Applikation in den Arteriolen der Infarkt-Borderzone vermehrt ICAM-1 nach (128). Beobachtetes Wachstum von Kollateralgefäßen nach G-CSF-Gabe führte zu einer signifikanten Verbesserung der Pumpfunktion und einer deutlich kleineren Infarktnarbe (127).

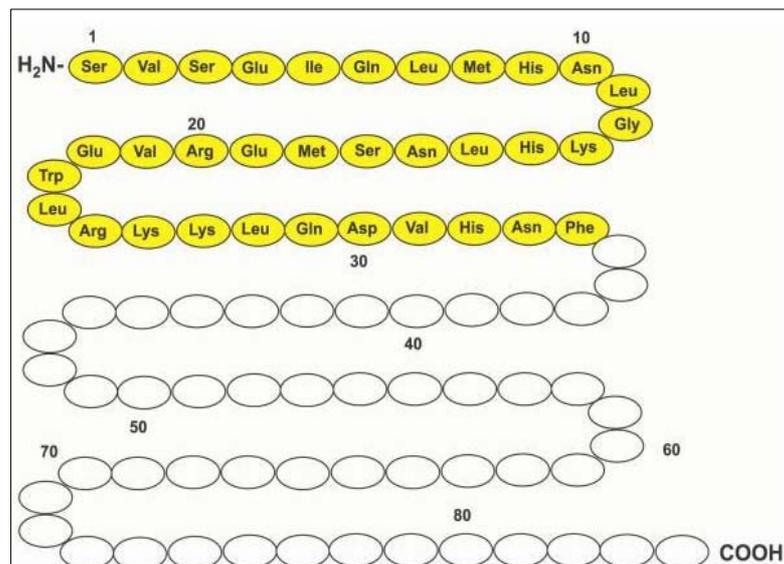
### **1.3. Parathormon (PTH)**

Wie bereits beschrieben stellt die Stammzellmobilisation eine elegante Alternative zur direkten Transplantation von Stammzellen dar. Die Mobilisation besitzt den Vorteil, dass auf eine Immunsuppression verzichtet werden kann und ethische Aspekte dabei keine Rolle spielen. Daher ist die Wissenschaft neben der Analyse der bekannten Substanzen intensiv mit der Forschung an neuen Substanzen beschäftigt.

Ein bisher noch nicht zur Therapie nach Myokardinfarkt eingesetzter Kandidat könnte Parathormon (PTH) sein. Das Peptidhormon PTH hat neben seiner Hauptaufgabe als Regulator des Plasma-Kalzium-Spiegels im Körper, die es über den PTH-Rezeptor an Knochen und Nieren ausübt, auch Effekte auf die Stammzellnische im Knochenmark sowie auf Zellen des kardiovaskulären Systems. PTH wird bereits seit einigen Jahren klinisch bei Patienten mit schwerer Osteoporose eingesetzt. Im Folgenden sollen das PTH sowie sein strukturverwandtes Peptid „Parathormone-related Peptide“ (PTHrP) eingehender dargestellt werden.

### 1.3.1. Biosynthese und Metabolismus

Parathormon (PTH) ist ein 84 Aminosäuren (AS) langes Polypeptid, das fast ausschließlich in den Hauptzellen der Nebenschilddrüse synthetisiert und sezerniert wird (151). PTH wird als 115 AS-langes Prä-Pro-Parathormon (Prä-Pro-PTH) synthetisiert (152). Die Prä-Pro-Sequenz wird von einem RNA-Protein-Komplex erkannt und von einem Rezeptor am Endoplasmatischen Retikulum (ER) gebunden. Daraufhin wird Prä-Pro-PTH über einen Kanal ins Innere des ER geschleust. An der Innenseite der ER-Membran befindet sich eine Signal-Peptidase. Diese spaltet die Prä-Sequenz, bestehend aus 25 AS, ab und lässt ein 90 AS-langes Pro-PTH übrig. Vom ER wird das Pro-Hormon zum Golgi-Apparat transportiert, in welchem die Pro-Sequenz aus 6 AS abgespalten wird (153). Das aus 84 AS bestehende intakte PTH (1-84) wird anschließend gespeichert und bei Bedarf sezerniert (siehe Abbildung 4). Zur Aktivierung der verschiedenen PTH-Rezeptoren (siehe unter 1.3.2.) ist jedoch das 34 AS-lange N-terminale Fragment (PTH (1-34)) ausreichend (151). So konnten *in vivo* keine Unterschiede zwischen humanem PTH (1-84) und PTH (1-34) hinsichtlich der Wirkungen auf den Knochenstoffwechsel und auf molekularer Ebene festgestellt werden (154). Pro-PTH besitzt eine kurze Halbwertszeit (HWZ) von 15 Minuten und wird nicht sezerniert. Erst das intakte PTH (1-84) wird als Antwort auf einen Abfall des extrazellulären Kalziums in den Blutkreislauf eingeschleust. Dort hat es eine Plasma-HWZ von wenigen Minuten (155). Das zirkulierende Hormon wird zum größten Teil in den Kupfferschen Sternzellen und Hepatozyten der Leber (60-70%) und den Tubuluszellen der Niere (20-30%), zu einem geringen Anteil in anderen Organen abgebaut. Die Spaltung erfolgt meistens zwischen den AS 33 und 43, es wurden aber auch Fragmente mit N-terminalen Resten aus 24 und 28 AS beobachtet (156), (157). Die entstandenen PTH-Fragmente gelangen wieder in den Blutkreislauf, wo sie an den PTH-Rezeptoren tragenden Zielzellen aktiv werden. Die resultierenden biologisch aktiven N-terminalen Fragmente sind, ebenso wie das intakte PTH (1-84), nur in geringem Maße im Blut nachweisbar. Das C-terminale Fragment (53-84) hingegen kann aufgrund einer längeren HWZ für mehrere Stunden im Blut nachgewiesen werden (156).



**Abbildung 4**

Schematische Darstellung von humanem PTH(1-84), gelb PTH (1-34); Abb. modifiziert nach (158)

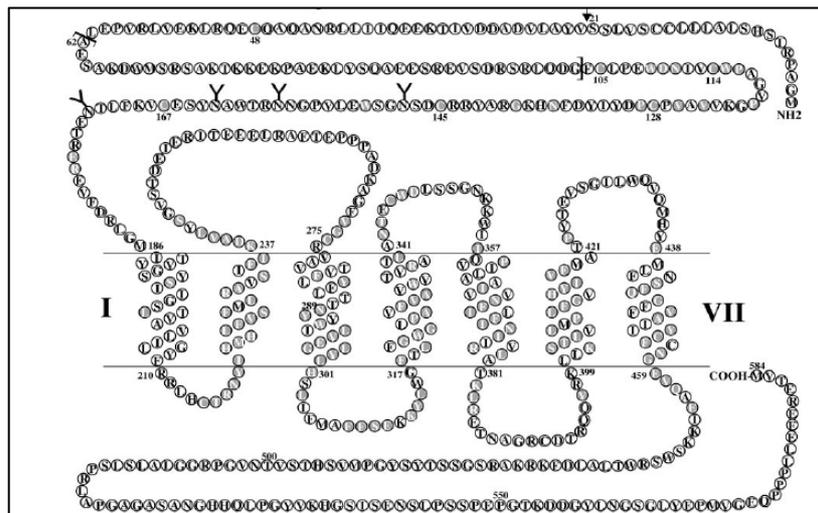
### 1.3.2. Physiologische Wirkung von PTH

Die Hauptaufgabe von PTH im Organismus ist die Aufrechterhaltung des physiologischen Plasma-Kalzium-Spiegels. Dieser ist lebensnotwendig für Muskelkontraktionen, als „second messenger“ in hormonsensitiven Zellen und in der Übermittlung neuraler Signale. PTH reguliert die Kalziumhomöostase im Blut, indem Kalzium aus Knochen mobilisiert wird, eine Steigerung der Kalzium-Absorption im Darm stattfindet und die renale Rückresorption von Kalzium in den distalen Tubuli der Niere verstärkt wird. Die Phosphat-Reabsorption im proximalen Tubulusabschnitt wird jedoch gehemmt. Die Wirkung an Knochen und Niere wird direkt über die PTH-Rezeptoren vermittelt (siehe 1.3.3.), die Absorption von Kalzium im Darm dagegen wird indirekt über 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> gesteigert. In der Niere kommt es durch eine vermehrte Aktivität der 1  $\alpha$ -Hydroxylase, die durch PTH angeregt wird, zu einer gesteigerten Synthese von 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (151). Im Knochen induziert PTH eine schnelle Freisetzung von Kalzium aus der Matrix, ist aber auch für längerfristige Veränderungen im Kalzium-Metabolismus verantwortlich. Durch direkten Einfluss von PTH auf die Osteoblasten kommt es zu Veränderungen in der Synthese und Aktivität mehrerer Proteine (159).

Die Ausschüttung von PTH wird durch einen negativen „Feedback-Mechanismus“ des extrazellulären Kalziums reguliert. Sinkt dieses ab, kommt es durch die Aktivierung des Calcium-Sensing-Rezeptors zu einer vermehrten Ausschüttung von PTH aus der Parathyreoidea (160). Eine längerfristige Kalzium-Homöostase hingegen wird durch eine vermehrte Transkription des PTH-Gens bewirkt, welche durch einen erniedrigten Serumkalzium-Spiegel ausgelöst wird (161).

### **1.3.3. PTH-Rezeptor**

Bisher konnten drei verschiedene PTH-Rezeptoren (PTH1R, PTH2R, PTH3R) identifiziert werden, wobei noch weitere unbedeutendere Rezeptoren, die auf PTH reagieren, existieren (162). Die Hauptrolle spielt dabei der PTH1R, da er an Knochen und den Nieren exprimiert wird und so die „klassischen“ Wirkungen des PTH an den jeweiligen Zielzellen übermittelt (151). Der PTH1-Rezeptor ist ein klassischer G-Protein-gekoppelter Rezeptor und besteht aus sieben Transmembrandomänen, die wichtig für die Ligandenbindung und Signalübertragung sind (siehe Abbildung 5). Bindet PTH an den Rezeptor, wird entweder die Adenylatcyclase oder die Phospholipase C aktiviert (163), wobei an klassischen Zielzellen (Osteoblasten, Osteoklasten, Nierenzellen) eine Aktivierung sowohl über die Adenylatcyclase als auch über die Phospholipase C läuft. Im Gegensatz dazu wird auf „nichtklassischen“ Zellen (glatte Muskelzellen) meist nur die Phospholipase C aktiviert (151). Der PTH2R wird auf humanen Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten exprimiert und ist bei Patienten mit einem Hyperparathyreoidismus (HPT) als Folge des erhöhten Plasma-PTH-Spiegels herunterreguliert (164).



**Abbildung 5**

*Schematische Darstellung des humanen PTH-Rezeptors; Abb. modifiziert nach (165)*

### 1.3.4. Regulation der Stammzellnische im Knochenmark durch PTH

Die speziellen anatomischen Räume innerhalb des Knochenmarks, die eine entscheidende Rolle für das Überleben und die Differenzierung von Stammzellen spielen (so genannte „Nischen“) waren bereits Gegenstand zahlreicher Arbeiten (166-170). Eine große Bedeutung innerhalb dieser „Knochenmarknischen“ scheinen die Osteoblasten zu haben (168). Sie produzieren Wachstumsfaktoren und werden durch PTH bzw. PTHrP über den PTH/PTHrP-Rezeptor aktiviert (169). In einem transgenen Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die Überexprimierung des PTH/PTHrP-Rezeptors mit einer erhöhten Anzahl von  $c\text{-kit}^+$ ,  $sca\text{-1}^+$ ,  $lin^-$  Stammzellen im Knochenmark einherging (169, 170). Assoziiert waren diese Effekte mit einer signifikanten Erhöhung von Janus Kinase (Jag1/Jagged1). Dies stützt die These weiterer Arbeiten, wonach Jagged1 und sein Ligand Notch1 eine wichtige Rolle in der PTH-vermittelten Expansion von Knochenmarkstammzellen spielen und auch für die anabolen Effekte von PTH im Knochen verantwortlich sind (171-174). Zusammen mit der Interaktion von N-Cadherin mit  $\beta$ -Cathenin, die beide auf Osteoblasten und Knochenmarkstammzellen exprimiert werden (168), führt der Jagged1/Notch1-Signalweg zur beschriebenen Mobilisation von Knochenmarkstammzellen.

### **1.3.5. Kardiovaskuläre Wirkungen von PTH**

Am Menschen existieren bereits zahlreiche Arbeiten, die den Einfluß von PTH auf das Herz-Kreislauf-System untersucht haben. Vor allem Patienten mit einem primären Hyperparathyreoidismus (HPT), einer Überfunktion der Nebenschilddrüse mit pathologisch erhöhten PTH-Spiegeln, zeigten dabei vielfältige kardiovaskuläre Veränderungen. Ein primärer HPT kann eine Hypertonie auslösen bzw. verstärken (175). Echokardiographische Studien beschrieben eine linksventrikuläre Hypertrophie mit diastolischer Dysfunktion bei bis zu 80% der Patienten mit primärem HPT (176). Dies führt zusammen mit gehäuft auftretenden Arrhythmien zu einer deutlich erhöhten Mortalität (177-180). Davon zu unterscheiden ist die intermittierende Gabe von PTH. In einem Infarktmodell an Hunden wurde 30 Minuten nach LAD-Ligation PTH (1-34) intravenös verabreicht. Dies führte zu einer verbesserten Herzfunktion und verminderte die Ausbildung eines kardiogenen Schocks im Vergleich zu unbehandelten Tieren (181). Die Gruppe von Schlüter et al. untersuchte im Jahr 2003 in einem Schweine-Modell den Effekt einer intrakoronaren PTH-Gabe auf gesunde Herzen sowie durch Ischämie/Reperfusion geschädigte Herzen mit einer daraus resultierenden postischämischen kontraktile Dysfunktion („myocardial stunning“). PTH führte in beiden Versuchsgruppen zu einem erhöhten myokardialen Blutfluss durch eine Abnahme des Koronararterien-Widerstands (182). An der Ratte hatte diese Steigerung des myokardialen Blutflusses nach PTH-Gabe eine verbesserte Kontraktilität zur Folge (183). Über PTH-Rezeptoren auf Zellen des kardiovaskulären Systems kommt es zu einer Aktivierung der Adenylatcyclase, die zur Relaxation der glatten Gefäßmuskelzellen führt (184, 185). Diese Vasodilatation wird über die ersten beiden AS des PTH vermittelt (163).

Dass PTH und sein Rezeptor (PTH1R) auch eine essentielle Rolle bei der Entwicklung des kardiovaskulären Systems spielen, zeigt die Arbeit von Qian et al.: PTH1R-Knockout-Mäuse verstarben dort bereits vor der Geburt an plötzlich aufgetretenen Herzmuskelnekrosen (186).

In der folgenden Tabelle soll zusammenfassend ein Überblick über die Wirkungen von PTH auf das kardiovaskuläre System gegeben werden:

Biologische Wirkung	Domäne	Zielorgan	Literatur
Erhöhung der Ca <sup>++</sup> -Konzentration	1-34	Adulte Kardiomyozyten	(187)
Steigerung der Proteinsynthese	1-34	Adulte Kardiomyozyten	(188)
Steigerung der Aktivität der Kreatinkinase	1-34	Adulte Kardiomyozyten	(188)
Steigerung des myokardialen Blutflusses	1-34	Ischämisches Ratten/ Schweinemyokard	(182)
Verminderung der Ausbildung von kardiogenen Schocks	1-34	Infarziertes Hundemyokard	(189)
Vasodilatation	1-34	Gefäßwand der Aorta	(185)
Einfluss auf die Entwicklung des kardiovaskulären Systems	1-84	Herzen von PTH1R-Knockout-Mäusen	(186)

**Table 5**

*Wirkungen von PTH auf das kardiovaskuläre System; Tab. modifiziert nach (185)*

### 1.3.6. Parathormone-related Peptide (PTHrP)

Das „Parathormone-related Peptide“ (PTHrP) ist ein Peptidhormon, welches in Tumorzellen vermehrt gebildet und in den Blutkreislauf abgegeben wird (190). Es stimuliert über einen endokrinen Signalweg den Knochenabbau und die renale Kalziumreabsorption. PTHrP wird jedoch nicht nur von Tumorzellen, sondern auch von vielen nicht-malignen Zellen wie z.B. den glatten Muskelzellen des Uterus, des Magen-Darm-Traktes und des kardiovaskulären Systems gebildet (163). Eine Sequenz- und Konformationshomologie zwischen den ersten 34 AS von PTH und PTHrP erklärt ihre Fähigkeit, mit gleicher Affinität an den PTH/PTHrP Rezeptor zu binden (siehe 1.3.4.). Dies erklärt, warum PTHrP viele Effekte des PTH wie z.B. den Knochenabbau und die Erhöhung der Kalziumkonzentration im Blut nachahmt. PTHrP gilt im normalen Blutkreislauf als kaum nachweisbar, wird aber auf parakrinen bzw. autokrinen Wegen während des fetalen und adulten Lebens in einer Vielzahl von normalen Zellen und Geweben gebildet, z.B. in Zellen des Epithels, Mesenchyms, endokriner Drüsen und des ZNS, in welchen - so wird angenommen- PTHrP eine wichtige Rolle in der Zellphysiologie über diesen parakrinen/autokrinen Weg spielt.

### **1.3.7. Klinischer Einsatz von PTH (1-34)**

Seit Ende 2003 ist das humane PTH (1-34) als Teriparatid in Deutschland zur Therapie schwerer Osteoporosen zugelassen. Grundlage war vor allem die klinische Studie von Neer et al. im Jahr 2001 (191). In dieser randomisierten, doppelverblindeten, placebo-kontrollierten Multicenter-Studie an 1637 Frauen mit schwerer postmenopausaler Osteoporose führte die tägliche Gabe von 20 µg bzw. 40 µg PTH (1-34) über 21 Monate zu einer signifikanten Abnahme von Wirbelkörperfrakturen und einer Zunahme der Knochendichte. Weitere Studien in den folgenden Jahren bestätigten diese Daten und zeigten auch an männlichen Osteoporose-Patienten vergleichbare Ergebnisse (192-195). Die Behandlung mit PTH (1-34) war gut verträglich und leichte Nebenwirkungen wie Übelkeit oder Gliederschmerzen traten selten auf (191).

### **1.4. Fragestellung der Arbeit**

In den letzten Jahren hat die Wissenschaft intensiv an der Erforschung neuer Strategien zur Therapie ischämischer Herzmuskelerkrankungen gearbeitet. Ein neuer vielversprechender Kandidat könnte PTH (1-34) sein, das bereits seit Jahren erfolgreich zur Therapie schwerer Osteoporose eingesetzt wird. PTH steigerte im Tiermodell den myokardialen Blutfluss (185) und führte nach chirurgisch induziertem Myokardinfarkt an Hunden zur verminderten Ausbildung eines kardiogenen Schocks (181). Neuere Daten zeigten, dass PTH (1-34) die Stammzellnische im KM reguliert.

So kam es nach PTH-Gabe im Mausmodell zu einer Zunahme verschiedener Knochenmarkstammzellen und zu einer niedrigeren Mortalität nach Knochenmarktransplantation (169).

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, den Einfluss des PTH-Fragments (1-34), das alle biologischen Funktionen des Parathormons ausübt, auf die Stammzellmobilisation und das kardiale „Remodelling“ nach akutem Myokardinfarkt im Mausmodell zu untersuchen. Dafür erwies sich die Maus als ideales Versuchstier, da das Infarktmodell der LAD-Ligation gut untersucht und allgemein anerkannt ist (196).

Dabei standen folgende Fragen im Vordergrund:

- Führt eine mehrtägige PTH-Gabe zu einer Mobilisation von Knochenmarkstammzellen ins periphere Blut?
- Wirkt sich eine mehrtägige PTH-Behandlung nach akutem Myokardinfarkt positiv auf die Mortalität und die Hämodynamik der Mäuse im Vergleich zu unbehandelten Tieren aus?
- Hat PTH einen Einfluss auf kardiale Umbauprozesse (Remodelling) nach akutem Myokardinfarkt?

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Allgemeine Chemikalien und Lösungsmittel

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

Aqua ad injectabilia	B Braun, Melsungen
BSA (Albumin from bovine serum)	Sigma, St. Louis, USA
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Roth, Karlsruhe
Ethanol 95 %	Roth, Karlsruhe
Formalin (Formaldehyd 4%)	Roth, Karlsruhe
Hämalaun	Sigma, St. Louis, USA
Histopaque	Sigma, St. Louis, USA
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt
Isotone Natrium- Chlorid- Lösung	Delta select, Pfullingen
Kaiser's Gelatine	Merck, Darmstadt
PBS (Phosphate Buffered Saline)	Gibca, Auckland, Schottland
TRIS (hydroxymethyl)-aminomethan	Roth, Karlsruhe

#### 2.1.2. Antikörper

Avidin-Biotinylated enzymeComplex-Goat IgG	Vector, Burlingame, USA
BrdU (mouse monoclonal anti-BrdU)	BD Pharmingen, Heidelberg
CD31 (PE, anti-mouse)	BD Pharmingen, Heidelberg
CD34 (FITC, anti-mouse)	BD Pharmingen, Heidelberg
CD34 (rat anti- mouse)	Linaris, Wertheim

CD45 (PerCP, anti-mouse)	BD Pharmingen, Heidelberg
CD45 (rat anti- mouse)	BD Pharmingen, Heidelberg
C-kit (PE, anti-mouse)	BD Pharmingen, Heidelberg
FITC (Rat IgG2a k, isotyp control)	BD Pharmingen, Heidelberg
ICAM1 (goat anti-mouse)	R & D, Wiesbaden
Iso A (PE IgG2a k)	BD Pharmingen, Heidelberg
Iso B (PE IgG2B k)	BD Pharmingen, Heidelberg
Ki67 (goat anti-mouse)	Santa Cruz, Heidelberg
PerCP (Rat igG2b k, isotyp control)	BD Pharmingen, Heidelberg
Sca-1 (PE, anti-mouse)	BD Pharmingen, Heidelberg

### 2.1.3. Färbungen

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

### 2.1.4. Pharmaka

Bromodeoxyuridin (BrdU Solution®)	BD Pharmingen, Heidelberg
Cefuroxim-Na (Cefuroxim® 250 mg)	Curasan, Kleinostheim
Dexpanthenol (Bepanthen® Augensalbe)	Roche, Grenzach-Wyhlen
Heparin-Na® 25000 iE	B Braun, Melsungen
Ketaminhydrochlorid (Ketamin-Inresa®5%)	Inresa, Freiburg
Parathormon (pth 1-34 rat)	Bachem, Bubendorf, Schweiz
Thiopental-Na (Trapanal® 0,5 g)	ALTANA, Konstanz
Xylazinhydrochlorid (Rompun® 2%)	Bayer, Leverkusen

### 2.1.5. Operationszubehör

Braunol®- Lösung	B Braun, Melsungen
Dreieckige Saugtupfer unsteril (SUGI®)	Kettenbach Medical, Eschenburg
Chirurgisches Nahtmaterial (Ethibond excel®, Prolene®)	Ethicon, Norderstedt
Chirurgisches Operationsbesteck	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
Haushaltsfäden cotton	Gütermann, Gutach
Leukoplast hospital®	BSN medical, Hamburg
Microlance 3 ®-Einmal-Injektions-Kanülen der Größen 0,9 mm x 40 mm und 0,3 mm x 13 mm	Becton Dickinson, Heidelberg
Saugtupfer steril (Raucotupf®)	Lohmann & Rauscher, Rengsdorf
Schutzhandschuhe unsteril (sempercare®)	Semperit, Wien, Österreich
Spritzen zu 1 ml (BD plastipak®)	Becton Dickinson, Heidelberg
Tupfer steril (Pagasling®)	Hartmann, Heidelberg
Zellstoff- Ecken (Zelletten®)	Lohmann & Rauscher, Rengsdorf

### 2.1.6. Versuchstiere

Alle Versuche wurden an 8 bis 12 Wochen alten männlichen Wildttyp-Mäusen des Stammes C57/BL6 mit einem Körpergewicht von 20 bis 25 g durchgeführt (Charles River, Sulzfeld).

### 2.1.7. Geräte

#### 2.1.7.1. Labor

FACS (Analysegerät) Coulter Epics XL-MCL®	Beckman Coulter, Fullerton, USA
Kühlschrank/Gefrierschrank Premium®	Liebherr, Biberach
Rundschüttler Certomat K	Certomat K Braun, Melsungen

Wasserbad W12	Medingen, Freital
Zentrifugen BR 4	Jouan, Unterhachingen
Mikro 20®	Hettich, Bäch, Schweiz

### **2.1.7.2. Hämodynamik**

Millar Tip-Katheter (1.4 French)	Millar Instruments, Houston, USA
Millar Aria Pressure-Volume-Konductance System	Millar Instruments, Houston, USA
OP- Mikroskop Stemi® 2000	Carl Zeiss, Jena
Mouse-Ventilator Minivent® 845	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
Kaltlichtlampe/Quelle KL 1500	Opto, Gräfelfing
Wärmeplatte mit Rektalkatheter TKM-0902	FMI, Seeheim
Waage Scout pro 400	Ohaus, Giessen

### **2.1.7.3. Histologie**

Mikroskop Axiovert 200	Carl Zeiss, Jena
Mikroskop-Photokamera Axio Cam HRc	Carl Zeiss, Jena

### **2.1.8. Hard- und Software**

Adobe Photoshop 7.0	Adobe, San Jose, USA
Axio Vision V4.3	Carl Zeiss, Jena
Dell Desktop PC Optiplex GX 260	Dell, Round Rock, USA
HSE Isoheart	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
MPCU2PV.exe	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
PVAN 2.9.	Millar Instruments, Houston, USA

## **2.2. Methoden**

Für die vorliegende Arbeit wurden Tierexperimente an der Maus entsprechend den Vorschriften der Tierschutzverordnung durchgeführt. Die durchgeführten Arbeiten wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt (AZ: 209.1/211-2531-117/02).

### **2.2.1. Haltung der Tiere**

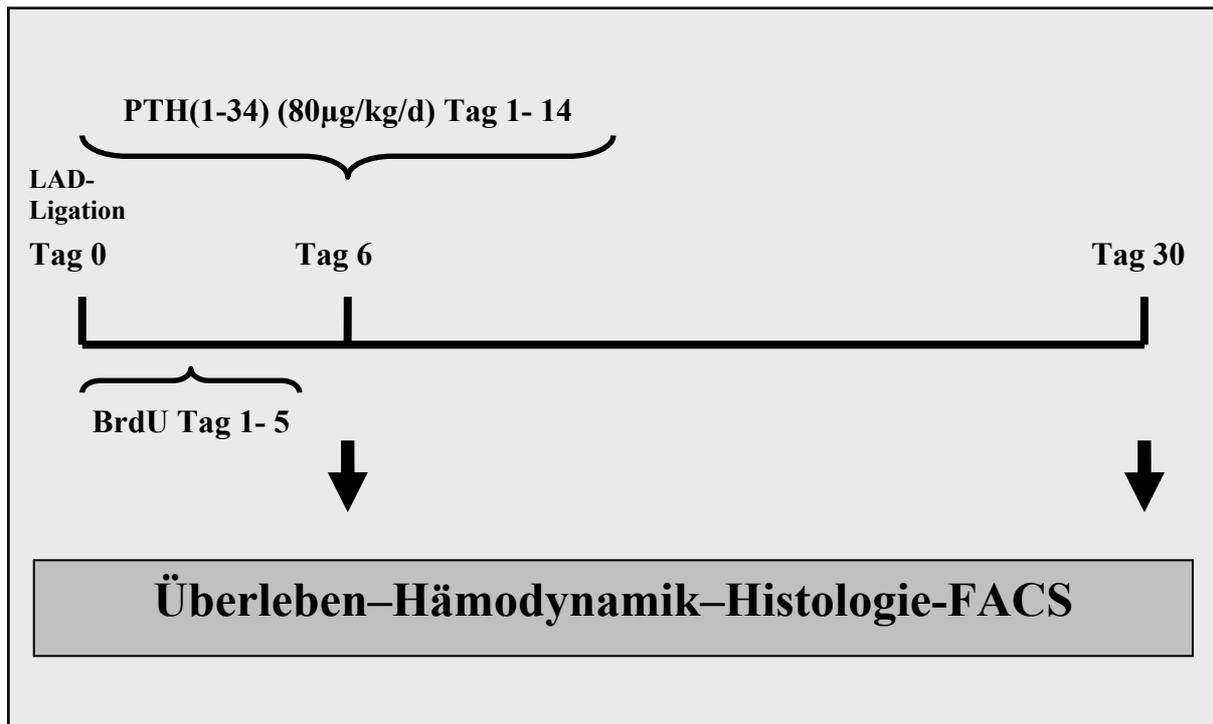
Alle Versuche wurden an 8 bis 12 Wochen alten männlichen Wildtyp-Mäusen des Stammes C57/BL6 mit einem Körpergewicht von 20 bis 25 g durchgeführt (Charles River, Sulzfeld). Die Tiere wurden bei einem 12-stündigen Tag- und Nachtrhythmus in Einzelkäfigen mit Standardfutter und Wasser ad libitum gehalten. Die Raumtemperatur betrug konstant 24°C, die Luftfeuchtigkeit 50%.

### **2.2.2. Versuchsaufbau**

Den Tieren wurde an Tag 0 durch LAD-Ligation ein Herzinfarkt gesetzt. Anschließend erfolgte je nach Gruppe (siehe Tabelle 5 und Abbildung 6) eine Behandlung mit Parathormon (Gruppe 4) oder mit Saline (Gruppe 3) für 6 Tage, bzw. für 14 Tage (PTH: Gruppe 6, Saline: Gruppe 5).

Die Tiere der Gruppen 1 und 2 wurden scheinoperiert (siehe 2.2.3.1) und bekamen ebenfalls PTH- (Gruppe 2) oder Salineinjektionen (Gruppe 1). Alle Tiere wurden zusätzlich an Tag 1-5 mit BrdU behandelt. Die Tiere der Gruppen 3 und 4 wurden an Tag 6 einer Hämodynamik-Messung unterzogen und anschließend zur histologischen Auswertung der Herzen getötet. An den Versuchstieren der Gruppen 5 und 6 wurden die gleichen Untersuchungen an Tag 30 nach LAD-Ligation durchgeführt.

Zur Überprüfung von operativen Einflüssen wurden so genannte Sham-Operationen durchgeführt (siehe unter 2.2.3.1.).



**Abbildung 6**

*Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus*

Gruppen Nr.	Name der Gruppe	Infarkt	PTH (1-34)	Hämodynamik /Histologie Tag 6	Hämodynamik /Histologie Tag 30
1	Sham	nein	nein	ja	ja
2	Sham+PTH	nein	ja	ja	ja
3	MI+Saline d6	ja	nein	ja	nein
4	MI+PTH d6	ja	ja	ja	nein
5	MI+Saline d30	ja	nein	nein	ja
6	MI+PTH d30	Ja	ja	nein	ja

**Tabelle 6**

*Übersicht der verschiedenen Versuchsgruppen*

## **2.2.3. Mausmodell**

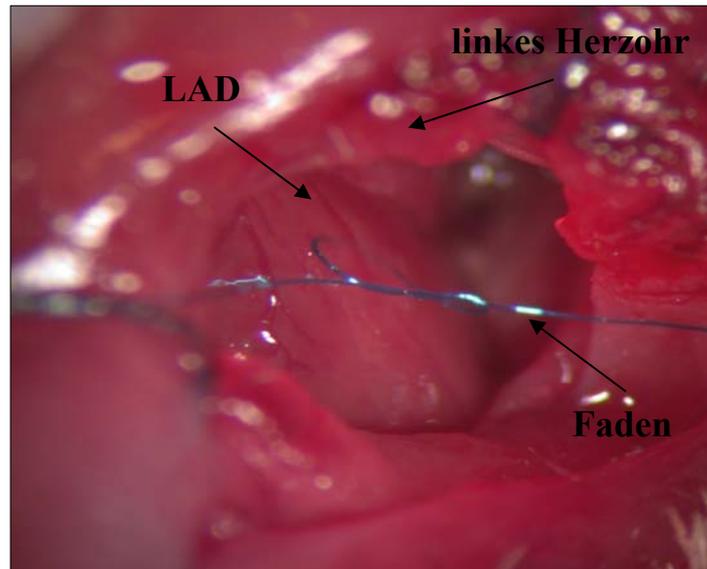
### **2.2.3.1. Infarktinduzierung**

Nach Entnahme des Versuchstieres aus dem Käfig wurde die Narkose eingeleitet. Diese bestand aus einer intraperitonealen Kombinationsinjektion aus 100 mg/kg Körpergewicht (KG) Ketaminhydrochlorid und 5 mg/kg KG Xylazinhydrochlorid. Die Phase der chirurgischen Toleranz trat nach ungefähr 5 Minuten ein und hielt ungefähr eine Stunde. Bei längerer Versuchsdauer wurde jeweils nach Bedarf nachdosiert (Kombinationsinjektion).

Nach Wirkungseintritt der Narkose wurde die Maus mit dem Rücken auf eine selbstregulierende Wärmeplatte gelegt und die Extremitäten der Maus mit Klebestreifen auf der Wärmeplatte befestigt. Der Oberkiefer wurde mit einem um die Platte gespannten Gummiband fixiert. Zur Kontrolle der Körpertemperatur wurde ein Rektalkatheter in den Anus der Maus eingeführt. Mit einem Rückkopplungssystem wurde dafür gesorgt, dass die Körpertemperatur der Maus relativ konstant bei 37,5°C gehalten wurde.

Anschließend erfolgte über eine ca. 2 cm lange longitudinale mediane Hautinzision an der Halsvorderseite die stumpfe Freipräparation der Trachea. Danach wurde der Unterkiefer angehoben und die Trachea unter Sicht mit einer stumpfen Metallkanüle (19 Gauge) intubiert. Das kraniale Ende der Kanüle wurde über einen Gummischlauch mit einem volumengesteuertem Beatmungsgerät verbunden und die Maus initial mit einem Volumen von ungefähr 200 µl mit einer Frequenz von 200 Zügen pro Minute beatmet. Die Haut über der Trachea wurde im Anschluss mittels U-Naht verschlossen (5-0 Ethibond). Anschließend wurden die Haare der linken Thoraxseite entlang der geplanten Schnittführung mit einer Schere gekürzt. Daraufhin wurde die über dem Thorax liegende Haut im Bereich des sichtbaren Herzschlages parallel zu den Rippen mit einer Hautschere eröffnet und auch die darunter liegende Muskelschicht (Mm. Pectorales major und minor) durchtrennt. Im Anschluss wurde der zweite Interkostalraum links aufgesucht (zwischen zweiter und dritter Rippe) und die Zwischenrippenmuskulatur vorsichtig mit einer Mikroschere durchtrennt. Um einen freien Zugang zu ermöglichen, wurden die zweite und dritte Rippe jeweils mit einer 5-0 Ethibond-Nadel-Faden-Kombination umstochen und auseinandergezogen. Die Fadenenden

wurden mit Klebestreifen ebenfalls auf der Wärmeplatte fixiert. Nun wurde unter dem Mikroskop das Perikard entfernt, um am freiliegenden Herzen die LAD (Left Anterior Descendens) aufzusuchen. Nach genauer Orientierung wurde die LAD ungefähr 2 mm unterhalb des linken Herzohres mit einer 8-0 Prolene-Nadel-Faden-Kombination umstochen (siehe Abbildung 7).

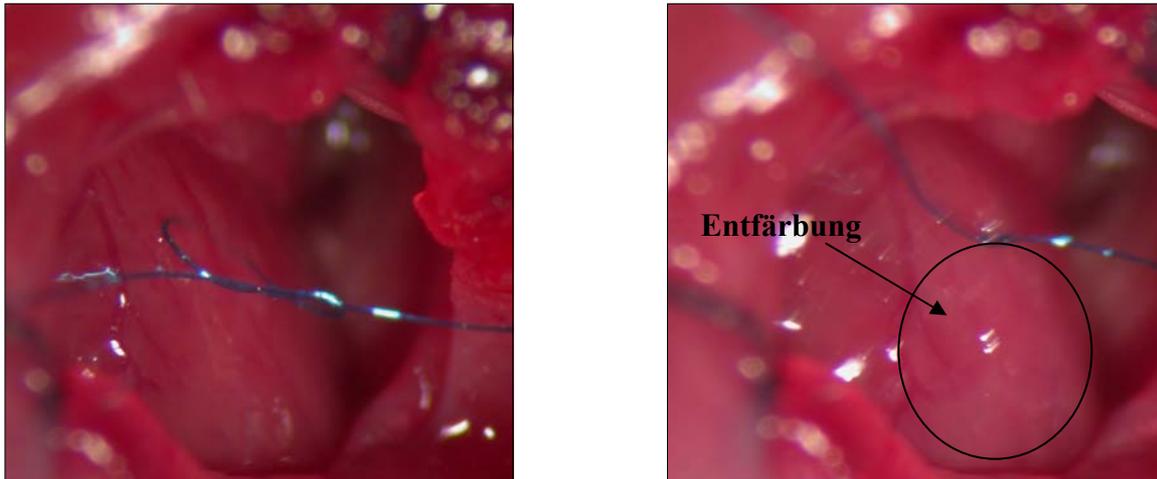


**Abbildung 7**

*Fotografie einer Maus mit eröffnetem Thorax*

Nach sorgfältiger Lagekontrolle des Fadens wurde die LAD durch mehrmaliges Verknoten des Fadens ligiert. Die korrekte LAD-Ligation wurde dabei durch eine deutliche Entfärbung des Myokards des linken Ventrikels überprüft (siehe Abbildung 8). Im Anschluss wurden die Aufspreizfäden des Thorax entfernt. Die Thoraxmuskulatur wurde adaptiert und mittels zwei bis drei Stichen in durchgehender Naht mit 5-0 Ethibond-Faden vernäht. Die Haut wurde ebenfalls mittels durchgehender Naht (5-0 Ethibond) verschlossen. Die Maus wurde sobald als möglich extubiert und in eine mit Zellstoff ausgelegte Box gelegt. Die Gesamtdauer der Operation betrug ungefähr eine Stunde. Zum Ausschluss operativer Einflüsse wurden nur Tiere in die statistischen Analysen einbezogen, welche die Operation mindestens 24 Stunden überlebten.

Zur Kontrolle wurden außerdem so genannte „Sham-Operationen“ durchgeführt. Scheinoperierte Tiere (Sham) wurden der gleichen chirurgischen Prozedur unterzogen, ohne dass jedoch die LAD ligiert wurde. Dies sollte alle mit einer Operation verbundenen Veränderungen nachahmen, ohne dass jedoch ein Herzinfarkt ausgelöst wurde.



**Abbildung 8**

*links: Fotografie einer Maus mit eröffnetem Thorax vor Ligation der LAD*

*rechts: Gleiche Aufnahme nach LAD- Ligation*

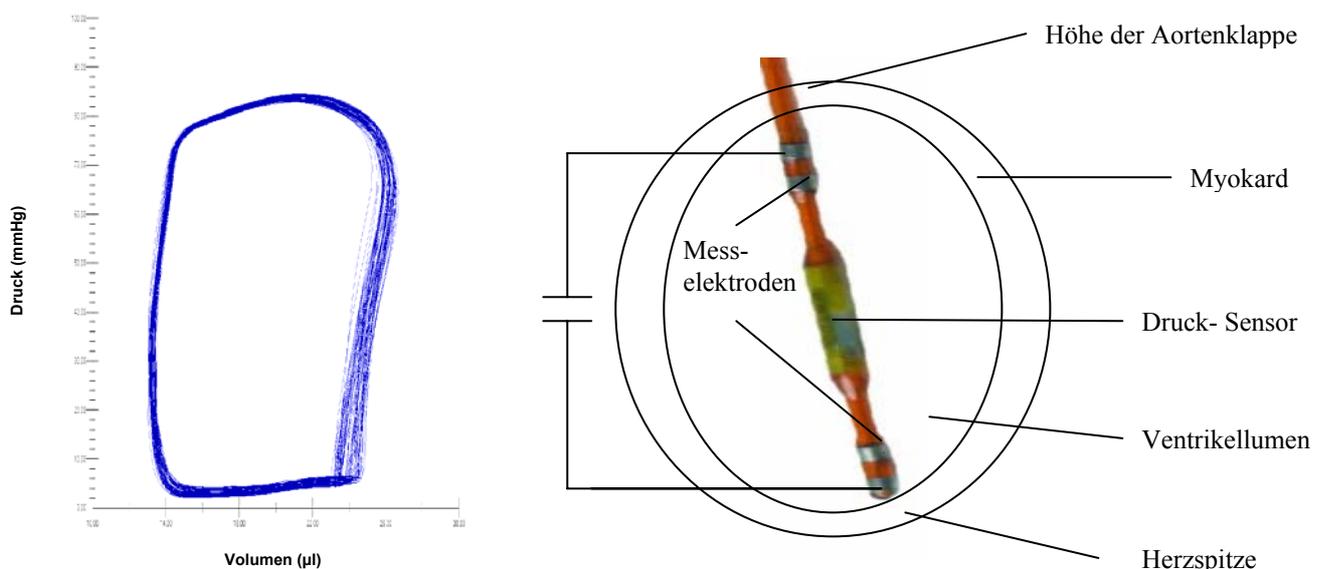
### **2.2.3.2. Gabe von PTH (1-34) und Bromodeoxyuridin (BrdU)**

Den Tieren der PTH-Gruppe wurden jeweils 12-24 Stunden nach Infarkt 80 µg/kg KG PTH (1-34) intraperitoneal gespritzt. Es folgten je eine tägliche PTH-Gabe (ebenfalls 80 µg/kg KG) für weitere 5 Tage (Gruppe 4) bzw. 13 Tage (Gruppe 6). Die Kontroll-Tiere bekamen anstelle von PTH eine Salineinjektion. Diese bestand aus 50 µl isotoner Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %). Je nach Gruppe wurde diese einmal täglich für 6 Tage (Gruppe 3) bzw. 14 Tage (Gruppe 5) intraperitoneal appliziert. Desweiteren wurde allen Tieren an Tag 1 bis 5 je eine Dosis BrdU (50 µg/Kg KG) intraperitoneal verabreicht.

### 2.2.3.3. Hämodynamische Messungen

#### 2.2.3.3.1. Grundprinzip der Conductance Methode

Baan et al. stellten in den achtziger Jahren erstmalig die Conductance-Methode vor (197), (198). Diese basiert auf der Bestimmung der sich im Herzzyklus ändernden elektrischen Leitfähigkeit des Blutes und dient zur gleichzeitigen Ableitung von linksventrikulärem Volumen und linksventrikulärem Druck mittels eines Conductance-Katheters mit integriertem Druck-Sensor (Millar Tip-Katheter 1.4 French). Damit lassen sich simultan zur Ventrikelaktion Druck-Volumen-Schleifen, so genannte Frank-Starling-Kurven (siehe Abbildung 9) darstellen. Der über die rechte Arteria carotis und Aorta in den linken Ventrikel eingeführte Conductance-Katheter wird so eingebracht, dass die distale Elektrode in der Herzspitze und die proximale Elektrode direkt unterhalb der Aortenklappe zum Liegen kommt (siehe Abbildung 9). Zwischen den beiden äußeren Elektroden wird durch Wechselstrom ein elektrisches Feld mit der Leitfähigkeit (Conductance)  $G(t)$  erzeugt. Eine Änderung des intraluminalen Blutvolumens  $V(t)$ , hat eine Änderung der Leitfähigkeit  $G(t)$  zur Folge, welche von den zwei inneren Elektroden registriert wird.



**Abbildung 9**

*links: Druck-Volumen-Schleife einer gesunden Maus*

*rechts: Schematischer Längsschnitt durch einen Herzventrikel mit dem Endstück des Conductance-Katheters*

Durch die Elektroden wird jedoch nicht nur die Leitfähigkeit des Blutes gemessen, sondern auch die des umliegenden Gewebes, was später rechnerisch korrigiert werden muss (siehe 2.2.3.3.2.). Mit folgender Gleichung wird aus der Leitfähigkeit das linksventrikuläre Volumen  $V(t)$  berechnet:

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

$V(t)$ : zeitabhängiges ventrikuläres Volumen

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

$L$ : Elektrodendistanz

$ob$ : spezifische Leitfähigkeit des Blutes

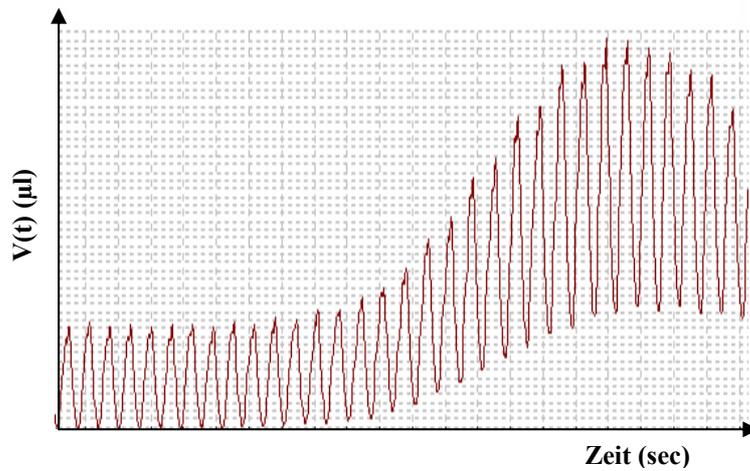
$G(t)$ : Gesamtleitfähigkeit

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

### 2.2.3.3.2. Parallele Conductance

Die Messelektroden registrieren nur Leitfähigkeits-Veränderungen, ohne dabei die Beschaffenheit der unterschiedlichen Strukturen zu berücksichtigen. Daher beinhaltet die durch den Conductance-Katheter gemessene Gesamtleitfähigkeit  $G(t)$  und das daraus errechnete Volumen nicht nur die Leitfähigkeit des Blutes, sondern auch die Leitfähigkeit des umliegenden Gewebes, welche parallele Conductance  $G(p)$  genannt wird. Aus diesem Grund muss die Leitfähigkeit des umliegenden Gewebes  $G(p)$  bestimmt und das daraus resultierende Volumen  $V(p)$  vom Gesamtvolumen  $V(t)$  abgezogen werden. Dabei kam im vorliegenden Versuch die Methode der Injektion hypersaliner (4,5 %) Kochsalzlösung zum Einsatz.

Es wurde am Ende jeder Messung über einen Jugularis-Katheter (ausführliche Erklärung siehe unter 2.2.3.3.4) eine definierte Menge (10  $\mu$ l) 4,5 %-iger NaCl-Lösung injiziert. Zur gleichen Zeit wurden die sich dadurch verändernden Ventrikelvolumina im Verlauf mehrerer Herzaktionen aufgezeichnet (siehe Abbildung 10).



**Abbildung 10**

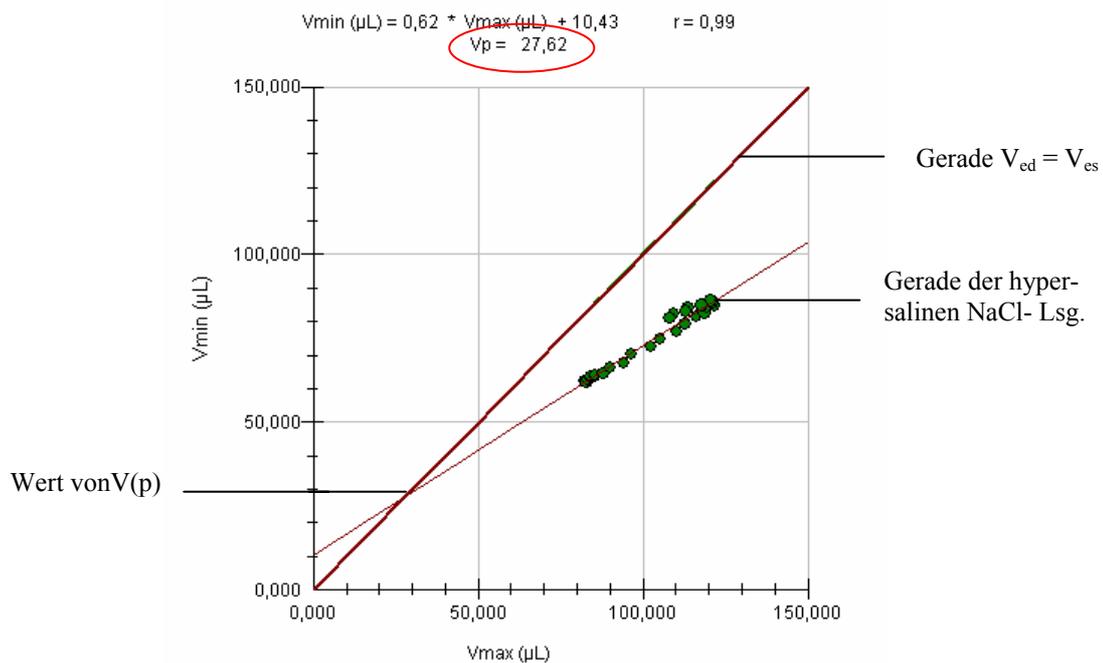
*Änderung von  $V(t)$  nach Injektion von  $10 \mu\text{l}$  NaCl (4,5%)*

Ziel der Injektion ist es idealerweise, die Leitfähigkeit des Blutes zu ändern ohne dabei Druck oder Volumen im Ventrikel zu beeinflussen. Das Volumen des umliegenden Gewebes  $V(p)$  kann nun berechnet werden durch den Schnitt zweier Geraden (siehe Abbildung 11). Die erste Gerade wird gebildet aus den Werten der hypersalinen Injektion, die zweite Gerade ist die Abbildung der Gleichung:

$$\text{Enddiastolisches Volumen}(V_{\text{ed}}) = \text{Endsystolisches Volumen}(V_{\text{es}})$$

Diese Linie stellt den Zustand einer leeren Herzkammer dar, da dort  $V_{\text{ed}} = V_{\text{es}}$  ist.

Nun kann man vom Schnittpunkt dieser zwei Geraden an der y-Achse den Wert des zusätzlich gemessenen Volumens  $V(p)$  ablesen.

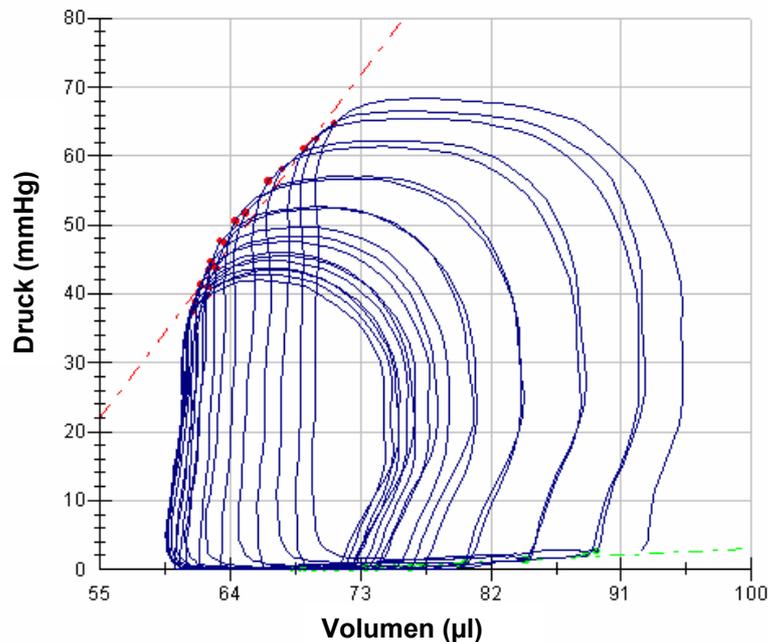


**Abbildung 11**

Berechnung von  $V(p)$  mittels Geradenschnitt

### 2.2.3.3.3. Vena-cava-Okklusion

Um eine Kontraktilitätserhöhung unabhängig von der Vorlast des Herzens zu messen, setzten wir die Technik der „Vena-cava-Okklusion“ ein. Hierzu wurde die Vena cava inferior der Tiere mittels Pinzette unterhalb des rechten Herzens kurzzeitig okkludiert (siehe 2.2.3.3.4) und dadurch die Vorlast des Herzens reduziert. Mit abnehmender diastolischer Füllung werden die Druck-Volumen- Schleifen kleiner und schieben sich nach links. Legt man nun eine Linie durch die endsystolischen Punkte, ergibt sich idealerweise eine Gerade, welche die endsystolische Druck-Volumen-Beziehung (ESPVR) darstellt. Die Steigung dieser Geraden wird als endsystolische Elastanz ( $E_{es}$ ) bezeichnet, welche ein weitgehend lastunabhängiges Maß für die Kontraktilität ist (siehe Abbildung 12). Im Zustand erhöhter Kontraktilität verschieben sich die endsystolischen Punkte nach links oben, wodurch die Gerade steiler wird.



**Abbildung 12**

*Druck-Volumen-Schleifen während Vena-cava Okklusion (gesunde Maus); die Steigung der Geraden entspricht der endsystolischen Elastanz*

#### **2.2.3.3.4. Ablauf der Messung**

Je nach Versuchsprotokoll (siehe 2.2.2.) wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten die Herzfunktion bestimmt. Hierfür wurden die Tiere mit Trapanal intraperitoneal (100mg/kg KG) narkotisiert. Die Mäuse wurden, wie bereits unter 3.2.1. beschrieben, auf einer Wärmeplatte fixiert und beatmet. Rechts von der freiliegenden Trachea wurde unter dem Operationsmikroskop mit zwei stumpfen Pinzetten vorsichtig die rechte Arteria carotis interna (ACI) freipräpariert. Dabei war besonders auf den rechten Nervus Vagus zu achten, der sehr nahe an der ACI entlang läuft und keinesfalls verletzt werden durfte, um hämodynamische Veränderungen zu vermeiden. Zur besseren Darstellung der ACI wurde unter dem kranialen Ende des freiliegenden Gefäßes ein Faden (Cotton) durchgezogen und verknötet. So vergrößerte sich durch den Rückstau des Blutes der Gefäßdurchmesser. Anschließend wurde die ACI durch Zug und Fixierung des Fadens auf der Wärmeplatte gespannt. Ein zweiter Faden wurde unter dem kaudalen Gefäßende durchgezogen, um mögliche Blutungen schnell stoppen zu können. Um die Stabilität beim Einführen des Katheters zu verbessern, wurde ein

Metallspanner unter der ACI eingelegt. Während der gesamten Prozedur wurde die ACI ständig mit NaCl beträufelt, so konnten Gefäßläsionen durch Austrocknen vermindert werden. Danach wurde die ACI mittels einer Kanüle punktiert und der Katheter vorsichtig mit einer Pinzette in das Gefäß eingeführt. Unter ständiger Kontrolle der Druckkurve am Monitor wurde der Katheter durch die ACI und die Aorta ascendens in den linken Ventrikel vorgeschoben. Im linken Ventrikel wurde versucht, durch kleinere Lageveränderungen des Katheters die bestmögliche Darstellung der Kurven zu erreichen. Nach Stabilisierung der Hämodynamik wurden die Grundwerte (Basalwerte) der Herzleistung aufgezeichnet. Zur späteren Bestimmung des Realvolumens musste jeweils am Ende der Messung noch eine Salineinjektion vorgenommen werden (siehe 2.2.3.3.2.). Zu diesem Zweck wurde die linke Vena jugularis interna freipräpariert und ein Katheter in ihr platziert. Durch diesen Katheter wurde ein kleiner Bolus (10µl) hypersaliner Kochsalzlösung (4,5% NaCl) injiziert. Diese Prozedur wurde mehrmals wiederholt und aufgezeichnet.

Für die Vena-cava-Okklusion (siehe 2.2.3.3.3.) wurde der Maus vorsichtig der Bauch mittels einer Schere eröffnet. Unter Sicht wurde die Leber zur Seite mobilisiert, um die Vena cava inferior exponieren zu können. Nun wurde mit der Pinzette für wenige Sekunden die Vena cava inferior abgeklemmt (okkludiert) und anschließend wiedereröffnet. Dieser Vorgang wurde ebenfalls mehrmals durchgeführt und aufgezeichnet.

### **2.2.3.3.5. Aufzeichnung und Messparameter**

Der Conductance-Katheter (Millar Tip-Katheter 1.4 French) war über eine Druckleitung mit einem Druckaufnehmer (Millar ARIA) verbunden. Dessen Signale wurden über einen Zwei-Kanal-Brückenverstärker (HSE) in die Computermessapparatur (Dell) eingespeist. Die Signale wurden kontinuierlich mittels des Programms HSE Isoheart aufgezeichnet und mithilfe der Software Millar PVAN 2.9 ausgewertet. Dabei waren folgende Parameter von Bedeutung:

- Herzfrequenz (HF) in 1/min
- Maximaler Blutdruck (LVP) in mmHg

- Minimaler Blutdruck (MinP) in mmHg
- Endsystolisches Volumen (ESV) in  $\mu\text{l}$
- Enddiastolisches Volumen (EDV) in  $\mu\text{l}$
- Schlagvolumen (SV) =  $\text{EDV} - \text{ESV}$  in  $\mu\text{l}$
- Ejektionsfraktion (EF) =  $(\text{EDV} - \text{ESV}) / \text{EDV} \times 100$  in %
- Herzzeitvolumen (HZV; cardiac output) =  $\text{HF} \times \text{SV}$  in  $\mu\text{l}/\text{min}$
- Maximale Druckerhöhungsgeschwindigkeit ( $dP/dt_{\text{max}}$ ) in mmHg/sec
- Tau weiss in msec
- Arterielle Nachlast ( $E_a$ ) =  $\text{Endsystolischer Druck (P}_{\text{es}}) / \text{SV}$  in mmHg/ml

### 2.2.4. Histologie

Histologie und Immunhistochemie der Herzen wurden in Kooperation mit dem Institut für Pathologie der LMU München durchgeführt.

Nach Abschluss der hämodynamischen Messungen und Entfernung der Katheter wurden die Tiere durch Überinjektion mit dem Narkotikum (Trapanal) getötet. Danach wurde der Thorax eröffnet und das Herz nach Durchtrennen der Hauptstämme entnommen. Um die Herzkammern von Blutresten zu befreien, wurde das Herz retrograd über die Aorta mit Formalin (4%) durchgespült und anschließend für 24 Stunden in einer 4%-igen Formalin-Lösung fixiert. Am folgenden Tag wurde das Herz in 70%-igen Alkohol gelegt und durch

eine Entwässerungsmaschine geschickt. Abschließend erfolgte die Einbettung des Herzens in Paraffin. Für die histologischen Bestimmungen wurde das Herz mit einem Paraffin-Schneidegerät in 4 µm dicke Scheiben geschnitten und auf Adhäsions-Objektträgern platziert.

### **2.2.4.1. Bestimmung der Morphologie**

Für die Bestimmung der Infarktgrößen und der Architektur des linken Ventrikels (Septumdicke bzw. Wanddicke im Infarktgebiet) wurden vier mit Masson-Trichrom gefärbte Herzschnitte pro Tier ausgewertet.

#### **2.2.4.1.1. Infarktgröße**

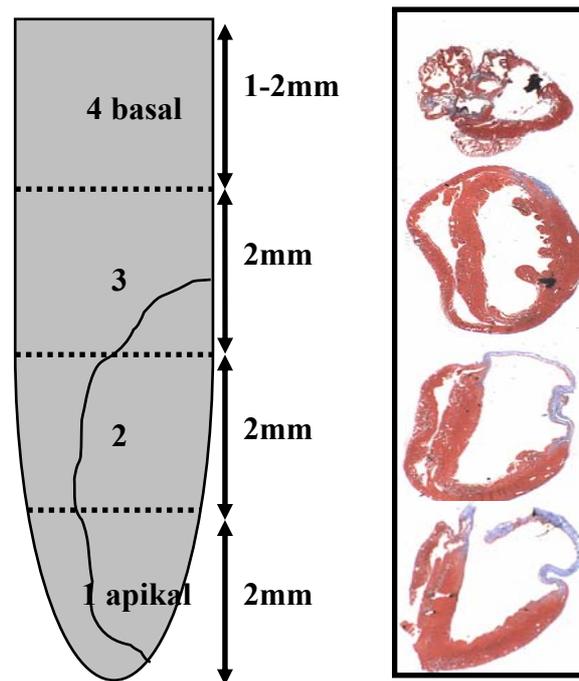
Die Infarktgröße wurde planimetrisch bestimmt (siehe Abbildung 13). Pro Versuchstier wurden unter dem Mikroskop jeweils vier Herzschnitte von der Herzspitze bis zur Herzbasis (jeweils 2 mm Abstand) ausgewertet. Dabei wurde für jeden Schnitt der Quotient aus infarzierter Fläche (AI) und der Gesamtfläche der Wand des linken Ventrikels (LV) bestimmt.

$$\frac{AI}{LV} = \frac{\text{Infarzierte Fläche (Area of infarction) in mm}^2}{\text{Gesamtfläche der Wand des linken Ventrikels (inklusive Septum) in mm}^2}$$

Dieser Wert (AI/LV) entsprach dem prozentualen Infarktanteil. Um auch die Längsausdehnung des Infarktes zu berücksichtigen, wurde anschließend noch der Quotient aus Längsausdehnung der Infarktfläche und der Gesamtlänge des linken Ventrikels berechnet.

$$\text{Längsausdehnung (Infarktfläche)} = \frac{\text{Längsausdehnung des Infarktareals in mm}}{\text{Gesamtlänge linker Ventrikel in mm}}$$

Dieser Wert wurde mit dem Mittelwert der vier prozentualen Infarktanteile multipliziert. Daraus ergab sich die Infarktgröße in Prozent (bezogen auf den gesamten linken Ventrikel).



**Abbildung 13**

*Schematische Darstellung der Infarktgrößenbestimmung anhand von 4 histologischen Schnitten von der Herzspitze zur Basis*

#### **2.2.4.1.2. Wanddicke im Infarktgebiet**

Die Auswertung der Wanddicken und des Granulationsgewebes wurde mithilfe der Software Axiovision (Vergrößerung 15-fach) durchgeführt. Die Wanddicken wurden jeweils in dem Schnitt gemessen, der auf Höhe der Papillarmuskeln lag. Dazu wurden im Infarktgebiet die Grenzen des infarzierten Areals festgelegt. Anschließend wurde der Mittelpunkt des linken Ventrikels mit den 2 Infarktgrenzen verbunden („Grenzradien“). Der Winkel zwischen den Grenzradien wurde bestimmt und durch 5 geteilt, so dass zwischen den Radien 5 winkelgleiche Segmente entstanden. Nun wurde in den 5 Segmenten jeweils die Stelle mit der dünnsten Wanddicke aufgesucht und die Dicke in Anlotung auf die Wand bestimmt. Der Mittelwert der fünf Distanzen wurde als Wanddicke im Infarktgebiet (in mm) angegeben.

Zur Hypertrophiebestimmung wurde auch die Dicke des interventrikulären Septums nach der gleichen Methode bestimmt.

### 2.2.4.1.3. Granulationsgewebe

Ebenfalls auf Papillarmuskelebene wurde erneut die infarzierte Fläche bestimmt. Anschließend erfolgte die Erfassung der nekrotischen Areale mittels der Software Axiovision. Das Granulationsgewebe angegeben in Prozent der gesamten Infarktfläche konnte durch Subtraktion ermittelt werden:

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

### 2.2.4.2. Immunhistochemie

Zur immunhistochemischen Färbung der Schnitte wurde die Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex-Methode (ABC) eingesetzt.

Zunächst wurden die Schnitte wie unter 2.2.4. beschrieben präpariert und eingebettet. Anschließend wurden sie in Xylol entparaffiniert (3×5 Minuten) und in einer absteigenden Alkoholreihe (100%→96%→70%) für jeweils 10 Minuten rehydriert. Nun folgte die Inaktivierung der endogenen Peroxidase mittels 7,5%-igem Wasserstoffperoxid (10 Minuten). Nach Spülung in Aqua dest. (10 Minuten) und TRIS (2×5 Minuten) wurden die Schnitte bei Raumtemperatur für 60 Minuten mit den Primärantikörpern (siehe 2.1.2.) inkubiert. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die gebundenen Primärantikörper für die Lichtmikroskopie mit Hilfe eines sekundären Antikörpers (siehe 2.1.2.) visualisiert. Dabei wurde ein biotinylierter, gegen die Spezies des Erstantikörpers gerichteter Zweitantikörper eingesetzt, der an einen Komplex aus Avidin und biotinylierter Peroxidase (ABC) gebunden ist. Durch die Reaktion der Peroxidase mit Aminoethylcarbazol in der Färbelösung entsteht die spezifische Farbreaktion. Zur Beendigung der Färbung wurden die Objektträger mit Aqua dest. gewaschen. Die Kernfärbung erfolgte mit Mayers Hämatoxylin. Abschließend wurden die Schnitte mit Kaisers Glyceringelatine eingedeckt.

#### **2.2.4.2.1. BrdU-Färbung**

2-Bromo-5-desoxyuridin (BrdU), ein Analogon des Thymidin, wird während der S-Phase des Zellzyklus in die zelluläre DNA integriert und kann mit Antikörpern immunhistochemisch im Zellkern nachgewiesen werden. Da BrdU eine kurze Bioverfügbarkeit hat, kann retrospektiv die Aussage gemacht werden, dass sich eine Zelle, die BrdU enthält, zu dem Zeitpunkt als BrdU exogen appliziert wurde, geteilt haben muss (199).

#### **2.2.4.2.2. Ki67-Färbung**

Ki67 ist ein monoklonaler Antikörper, der erstmals von Gerdes et al. 1983 vorgestellt wurde. Damit war zum ersten Mal ein Antikörper verfügbar, der ein nukleäres Antigen markierte, das nur in proliferierenden Zellen zu finden war. Eine Reaktion mit ruhenden Zellen konnte nicht festgestellt werden (200).

#### **2.2.4.2.3. Anti-CD31 (CD31)**

Bei CD31 (PECAM-1, platelet endothelial cell adhesion molecule 1) handelt es sich um ein Adhäsionsmolekül, das vor allem in den interzellulären Verbindungen von Endothelzellen in hoher Konzentration vorkommt. PECAM 1 wird schwächer exprimiert von Thrombozyten, Monozyten, Neutrophilen Granulozyten und einigen speziellen T-Zell-Populationen. Es kommt nicht auf Fibroblasten, Epithelien, Muskelzellen oder anderen Nicht-Gefäßzellen vor (201). Die Färbung von Gefäßen mit Antikörpern gegen CD31 ist eine gängige Methode, um Angiogenese in unterschiedlichen Geweben und Tumoren zu beurteilen (202, 203).

#### **2.2.5. Durchflusszytometrie (FACS, Fluorescence Activated Cell Sorting)**

Mit der Durchflusszytometrie mittels eines „fluorescence activated cell sorters“ (FACS) lassen sich Zellen anhand ihrer Oberflächenproteine durch monoklonale, an einen Fluoreszenzfarbstoff gebundene Antikörper klassifizieren. Die Zellen in der Suspension werden aus den Probenröhrchen gesaugt und mit hoher Geschwindigkeit durch eine Stahlkapillare geführt. Mit der Trägerflüssigkeit wird ein laminarer Hüllstrom erzeugt. Beim

Eintreten in die Messkammer werden die Zellen so stark beschleunigt, dass sie einzeln hintereinander aufgereiht den Analysepunkt erreichen (hydrodynamische Fokussierung). Am Analysepunkt werden die Zellen von einem Argonlaserstrahl der Wellenlänge 488 nm erfasst und über die Lichtstreuung können mit Photodetektoren Größe, Granularität und verschiedene Fluoreszenzen gemessen werden. Das in die Vorwärtsrichtung gestreute Licht bezeichnet man als „forward light scatter“. Dieser Parameter dient in erster Linie als Maß für die Größe der Zellen. Das im rechten Winkel zum einfallenden Lichtstrahl gestreute Licht hängt hauptsächlich von der intrazellulären Granularität ab und wird als „sideward scatter“ bezeichnet. Man kann anhand dieser beiden Messungen auf die Identität und Vitalität einzelner Zellpopulationen schließen. Desweiteren werden die verwendeten fluoreszierenden Farbstoffe (FITC (Fluorescein-Isothiocyanat); PE (Phycoerythin); PerCP (Peridinin Chlorophyll-A-Protein)) durch den Lichtstrahl angeregt und emittieren kurzwelligere Lichtspektren, die von anderen Detektoren gemessen werden. Die Stärke der Lichtemission der Fluoreszenzfarbstoffe ist proportional zur Zahl der auf der Zelloberfläche gebundenen markierten Antikörper und somit auch zur Anzahl der Oberflächenmoleküle. Die Auftrennung der verschiedenen Fluoreszenzintensitäten durch die Lichtfilter gelingt nicht vollständig, da sich die Spektren der verwendeten Farbstoffe teilweise überlappen. Mit Hilfe von Isotypen, unspezifisch bindender Antikörper der jeweiligen Farbe, kann die Signalverstärkung der einzelnen Kanäle so justiert werden, dass sich Zellen mit entsprechenden Oberflächenmerkmalen qualitativ und quantitativ unterscheiden und vergleichen lassen. Die Analyse der Zellen wurde mit einem Zytometer der Firma Beckman Coulter (Coulter Epics XL) und der dazugehörigen Software durchgeführt.

Zur Analyse wurde den Mäusen jeweils nach 6 Tagen 1 ml peripheres Blut aus der Arteria carotis entnommen. Das Knochenmark wurde aus Tibia und Femur gewonnen. Nach Auftrennung der mononukleären Zellen wurden diese bei 4°C im Dunkeln für jeweils 40 Minuten mit den unter 2.1.2. aufgeführten Antikörpern inkubiert.

### **2.2.6. Statistische Analyse**

Die Ergebnisse wurden als Einzelwerte oder in ihrer Gesamtheit als Mittelwert± Standardfehler des Mittelwertes (MW±SEM) dargestellt. Signifikante Unterschiede wurden

entsprechend den Anforderungen mit dem ungepaarten Student's t-Test bzw. ANOVA-Analyse, gefolgt vom Bonferroni Test ermittelt. Ein  $p$ -Wert  $< 0,05$  wurde als statistisch signifikant angenommen und in den Abbildungen entsprechend gekennzeichnet.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1. Mobilisierung von Knochenmarkstammzellen durch PTH-Gabe**

Bevor das gewonnene Mäuseblut mittels Durchflusszytometrie analysiert wurde, fertigten wir ein Differentialblutbild an (siehe 2.2.5). Dabei verglichen wir die PTH-behandelten Tiere (PTH6d, PTH30d; jeweils n=6) sowohl mit unbehandelten Tieren (nur Salinegabe; Kontrolle n=6) als auch mit G-CSF-behandelten Tieren (G-CSF6d; n=6). Die Daten sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Sowohl die 6-tägige (1,41-fache Steigerung) als auch die 14-tägige PTH-Behandlung (1,78-fache Steigerung) führte zu einer signifikanten Erhöhung der Leukozyten im Mäuseblut im Vergleich zu den Kontrolltieren. Ähnlich war das Ergebnis bei den Lymphozyten. PTH steigerte nach 6 Tagen (1,46-fach) und nach 14 Tagen (1,77-fach) signifikant deren Zahl im peripheren Blut. Im Gegensatz dazu waren neutrophile Granulozyten und Thrombozyten erst nach 14-tägiger PTH-Behandlung signifikant erhöht im Vergleich zu den Kontrollen. Kein Unterschied zeigte sich bei Erythrozyten, Hämoglobin, Hämatokrit und den Monozyten.

Die Behandlung mit G-CSF führte zu signifikant höheren Werten von Leukozyten, Lymphozyten und Monozyten im Vergleich zur PTH-Behandlung. Deutlich niedriger war die Anzahl der neutrophilen Granulozyten nach G-CSF-Gabe verglichen mit den PTH-Tieren.

Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Untersuchung der mononukleären Zellen im peripheren Blut (Abbildungen 14 und 15) und im Knochenmark der Mäuse. Zuerst wurde der Einfluss von PTH (1-34) auf die Mobilisierung verschiedener Populationen von Knochenmarkstammzellen in das periphere Blut untersucht. Als Kontrolle dienten Saline-behandelte Mäuse. Die PTH-Gabe erfolgte sowohl für 6 Tage mit anschließender Messung (PTH6d), als auch für 14 Tage (PTH14d).

## Ergebnisse

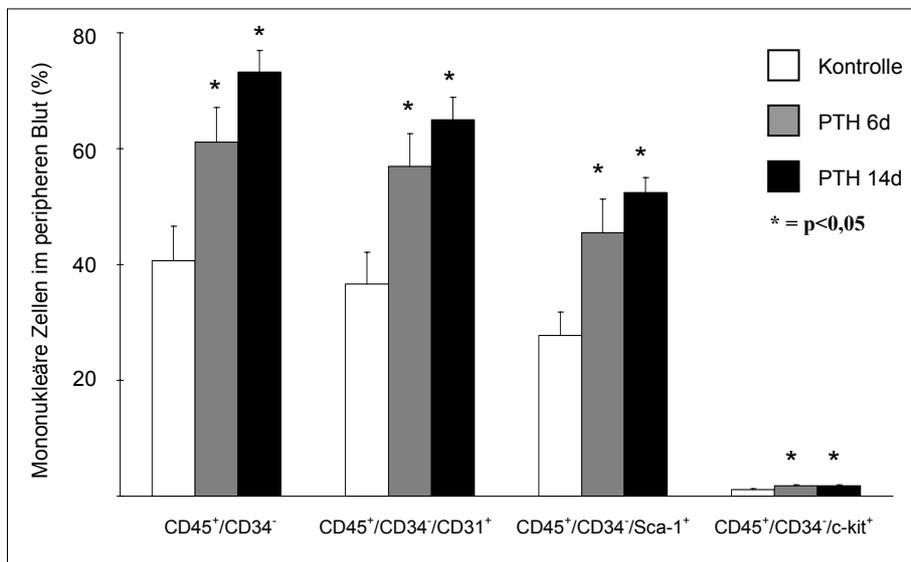
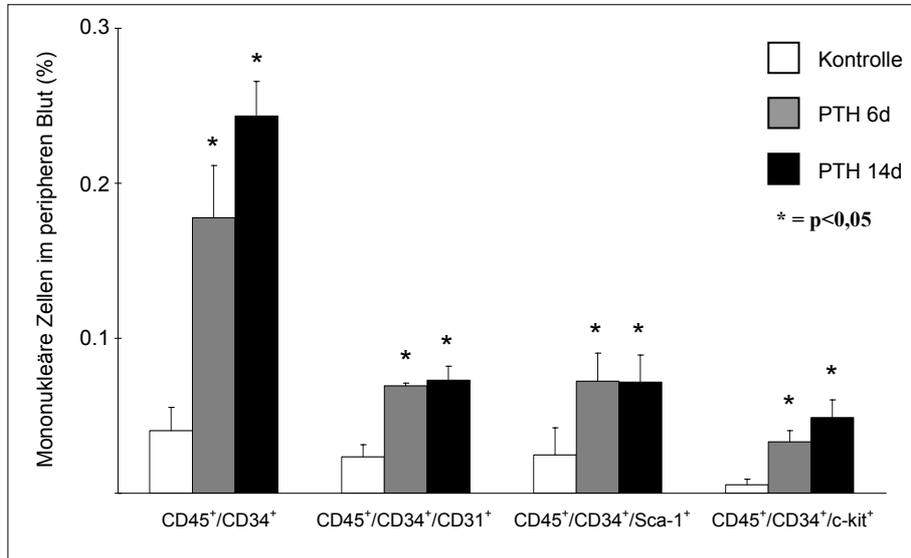
Parameter	Kontrolle	PTH6d	PTH14d	G-CSF6d
	(n=6)	(n=6)	(n=6)	(n=6)
Leukozyten (10 <sup>3</sup> /μl)	3,67±0,38	5,16±0,27 *	6,52±0,54 *	16,13±1,91 ***
Erythrozyten (10 <sup>6</sup> /μl)	9,7±0,3	9,2±0,1	9,2±0,2	8,9±0,1
Hämoglobin (g/dl)	14,5±0,4	13,7±0,2	14,0±0,3	13,5±0,1
Hämatokrit (%)	48,4±1,5	44,9±0,5	45,1±0,8	44,2±0,4
Thrombozyten (10 <sup>3</sup> /μl)	347,2±12,5	360,7±8,9	466,4±43,9 *, **	438,4±124,8
Lymphozyten (10 <sup>3</sup> /μl)	3,23±0,34	4,70±0,25 *	5,73±0,47 *	15,17±1,81 ***
Neutrophile Granulozyten (10 <sup>3</sup> /μl)	0,41±0,06	0,43±0,05	3,67±0,38 *	0,05±0,02
Monozyten (10 <sup>3</sup> /μl)	0,02±0,02	0,03±0,01	0,09±0,04	0,91±0,38 ***

**Tabelle 7**

Übersicht des Blutbilds der Mäuse mit Saline-Behandlung (Kontrolle; n=6), nach 6-tägiger PTH-Injektion (PTH6d; n=6) nach 14-tägiger PTH-Gabe (PTH14d; n=6) und nach 6-tägiger G-CSF-Behandlung (G-CSF6d; n=6); \* p<0.05, verglichen zur Kontrolle; \*\* p<0.05, verglichen zu PTH d6; \*\*\*p<0.05 verglichen zu PTHd6 und PTHd14.

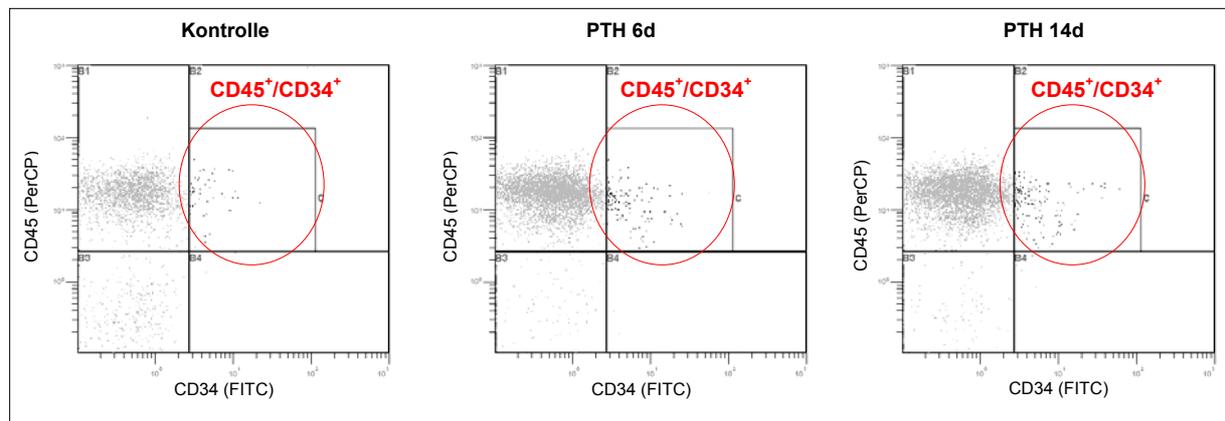
Dabei konnte sowohl nach 6-tägiger als auch nach 14-tägiger PTH-Behandlung (siehe Abbildung 15) ein signifikanter Anstieg der verschiedenen Suptypen CD45<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> Zellen im peripheren Blut gefunden werden (CD45<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> (Tag 6: 2,94-fach zur Kontrolle; Tag 14: 3,01-fach), CD45<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>/Sca-1<sup>+</sup> (Tag 6: 2,94-fach; Tag 14: 2,93-fach), CD45<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>/c-kit<sup>+</sup> (Tag 6: 6,09-fach; Tag 14: 9,04-fach)). Auch die verschiedenen Subtypen CD45<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup> Zellen waren nach 6- bzw. 14-tägiger PTH-Gabe signifikant erhöht im peripheren Mäuseblut (CD45<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup>/CD31<sup>+</sup> (Tag 6: 1,56-fach zur Kontrolle; Tag 14: 1,78-fach), CD45<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup>/Sca-1<sup>+</sup> (Tag 6: 1,64-fach; Tag 14: 1,88-fach), CD45<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup>/c-kit<sup>+</sup> (Tag 6: 1,63-fach; Tag 14: 1,64-fach)).

Der Unterschied zwischen der 6-tägigen und der 14-tägigen PTH-Behandlung war jeweils statistisch nicht signifikant.



**Abbildung 14**

Anteil der CD45<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> Zellen (oberes Diagramm) und der CD45<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup> Zellen (unteres Diagramm) im peripheren Mäuseblut ohne PTH-Behandlung (Kontrolle; n=6), nach 6-tägiger PTH-Injektion (PTH6d; n=6) und nach 14-tägiger PTH-Gabe (PTH14d; n=6).



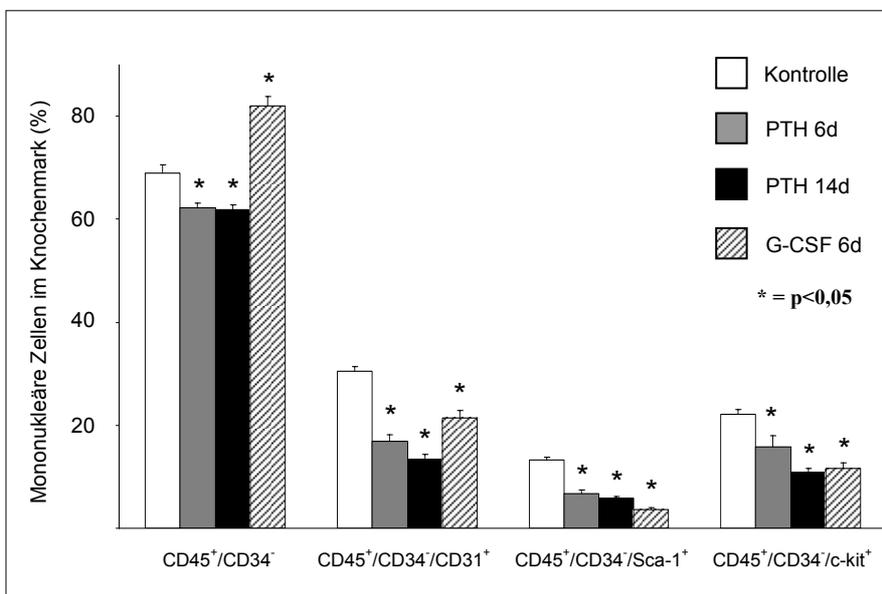
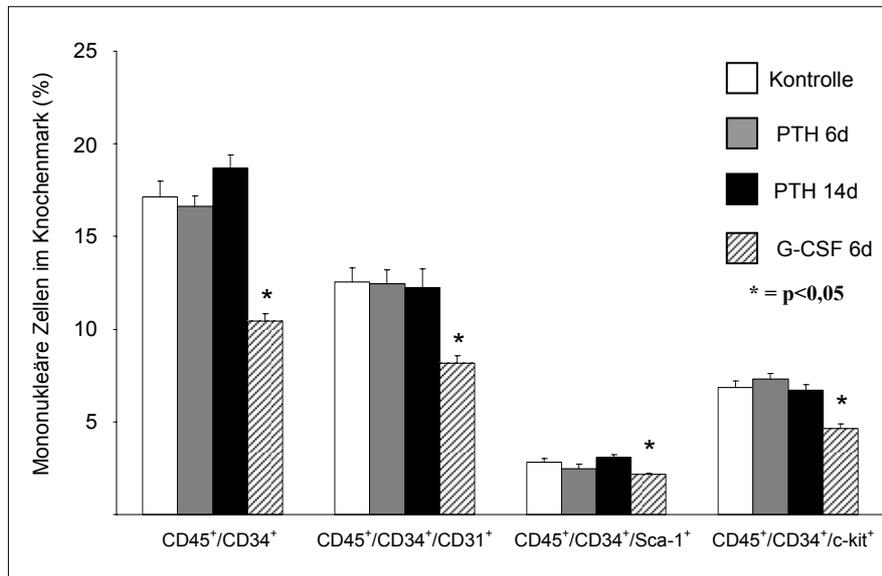
**Abbildung 15**

*Repräsentative Beispiele der FACS Analyse (CD45<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> Zellen) im peripheren Mäuseblut von Kontroll- und PTH6d/14d Tieren*

Nach der Untersuchung der Stammzellfreisetzung ins periphere Blut erfolgte die durchflusszytometrische Bestimmung der Anzahl mononukleärer Zellen im Knochenmark (Abbildung 16). Wir verglichen die drei Gruppen (Kontrolle, PTH 6d, PTH 14d) mit einer Gruppe G-CSF- behandelter Tiere (G-CSF 6d).

Im Knochenmark zeigten sich keine signifikanten Veränderungen in den Subtypen der CD45<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> Zellen nach 6-tägiger bzw. 14-tägiger PTH-Stimulation im Vergleich zu den Kontrollen. Anders verhielt es sich mit den verschiedenen Subpopulationen der CD45<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup> Zellen. Diese waren nach 6 und 14 Tagen signifikant erniedrigt im Knochenmark (CD45<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup>/CD31<sup>+</sup> (Tag 6: -44,7%; Tag 14: -56,1%), CD45<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup>/Sca-1<sup>+</sup> (Tag 6: -49,7%; Tag 14: -56,7%), CD45<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup>/c-kit<sup>+</sup> (Tag 6: -28,6%; Tag 14: -50,9%)).

Im Gegensatz zur PTH-Behandlung führte die 6-tägige G-CSF-Stimulation zu einer signifikanten Erniedrigung aller Subtypen von CD45<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> Zellen (CD45<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> (-34,9%), CD45<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>/Sca-1<sup>+</sup> (-23,1%), CD45<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>/c-kit<sup>+</sup> (-32,6%)) und aller CD45<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup> Zellen im Knochenmark (CD45<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup>/CD31<sup>+</sup> (-29,9%), CD45<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup>/Sca-1<sup>+</sup> (-72,5%), CD45<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup>/c-kit<sup>+</sup> (-47,6%)).



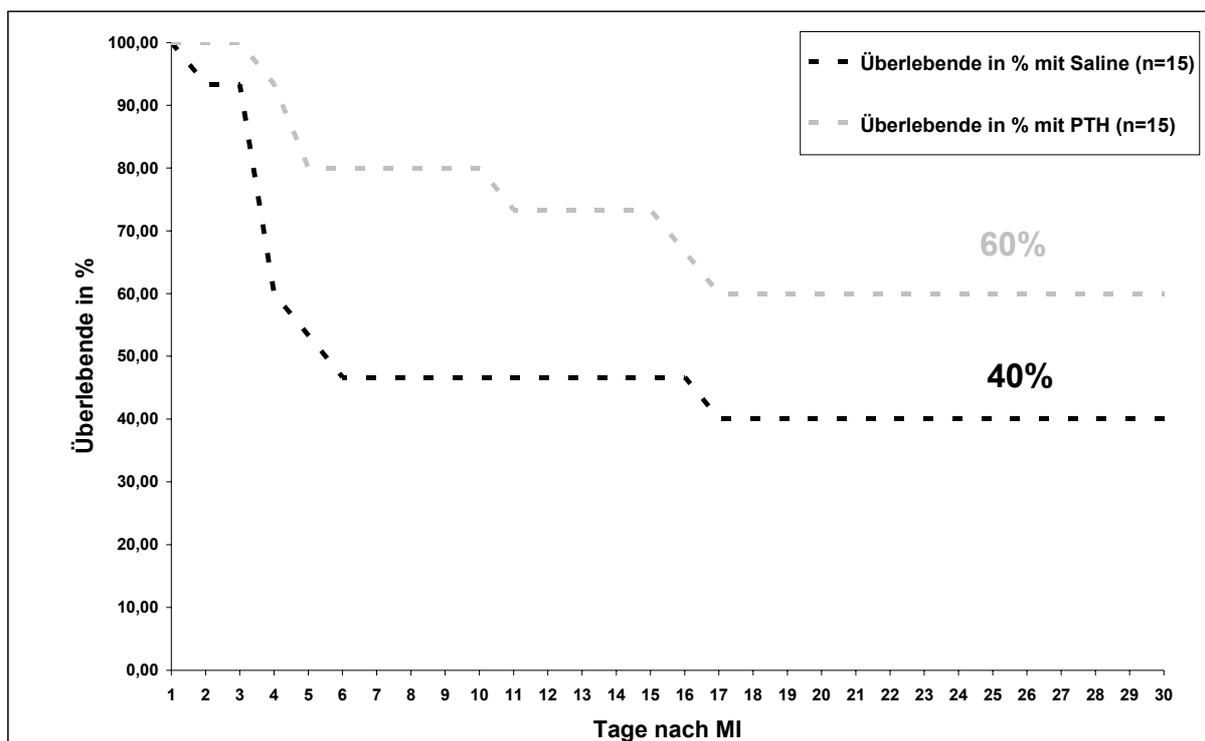
**Abbildung 16**

Anteil der CD45<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> Zellen (oberes Diagramm) und der CD45<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup> Zellen (unteres Diagramm) im Knochenmark ohne PTH-Behandlung (Kontrolle; n=6), nach 6-tägiger PTH-Injektion (PTH6d; n=6), nach 14-tägiger PTH-Gabe (PTH14d; n=6) und nach 6-tägiger G-CSF-Behandlung (G-CSF6d; n=6).

### 3.2. Überleben an Tag 30

In einem zweiten Versuch wurde der Einfluss einer 14-tägigen PTH-Gabe nach Myokardinfarkt auf das Überleben der Tiere im Vergleich zu unbehandelten Tieren (nur Salineinjektionen) untersucht.

In Abbildung 17 ist das kumulative Überleben der PTH-behandelten Tiere (MI+PTH; n=15) im Vergleich zu den unbehandelten Tieren (MI+Saline; n=15) 30 Tage nach Myokardinfarkt dargestellt. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Überlebenskurve der PTH-behandelten Tiere (60% Überlebende nach 30 Tagen; n=9/15) im Vergleich zur Saline-behandelten Kontrollgruppe (40% Überlebende; n=6/15). In beiden Gruppen war die Mortalität zwischen Tag 0 und Tag 5 am höchsten (20% MI+PTH; 53,3% MI+Saline).



**Abbildung 17**

Überlebenskurve der PTH- und Saline-behandelten Tiere nach 30 Tagen

### **3.3. Hämodynamik**

#### **3.3.1 Übersicht der Herzfunktion**

In Tabelle 8 sind hämodynamische Parameter der 6 Behandlungsgruppen (Sham; Sham+PTH; MI+Salined6; MI+PTHd6; MI+Salined30; MI+PTHd30) zusammengefasst. Beim Vergleich der scheinbehandelten Tiere (Sham, Sham+PTH) war der linksventrikuläre Druck bei den PTH-behandelten Tieren signifikant erniedrigt (Sham  $90,1 \pm 3,7$  mmHg; Sham+PTH  $80,3 \pm 2,2$  mmHg). Bei den infarzierten Mäusen zeigten sich 6 Tage nach Myokardinfarkt (MI+Salined6, MI+PTHd6) signifikante Unterschiede bei den Kontraktilitätsparametern EF (MI+Salined6  $14,5 \pm 1,3\%$ ; MI+PTHd6  $30,5 \pm 6,1\%$ ), HZV (MI+Salined6  $3588 \pm 579$   $\mu\text{l}/\text{min}$ ; MI+PTHd6  $5537 \pm 477$   $\mu\text{l}/\text{min}$ ) und dP/dt max (MI+Salined6  $3392 \pm 358$  mmHg/sec ; MI+PTHd6  $4742 \pm 394$  mmHg/sec), sowie den Relaxationsparametern Tau weiss (MI+Salined6  $7,8 \pm 0,3$  msec; MI+PTHd6  $6,8 \pm 0,3$  msec) und dP/dt min (MI+Salined6  $-3577 \pm 351$  mmHg/sec; MI+PTHd6  $-4838 \pm 372$  mmHg/sec). 30 Tage nach Infarkt war das HZV der PTH-behandelten Tiere signifikant höher im Vergleich zu den Saline-behandelten Tieren (MI+Salined30  $2689 \pm 329$   $\mu\text{l}/\text{min}$ ; MI+PTHd30  $3810 \pm 205$   $\mu\text{l}/\text{min}$ ). Einzelne Parameter werden im Folgenden ausführlich dargestellt.

#### **3.3.2. Auswirkung von PTH (1-34) auf die Hämodynamik scheinoperierter Tiere**

Um evtl. Einflüsse des benutzten PTH (1-34) auf die Hämodynamik unabhängig von einem Infarkt zu untersuchen, wurde eine Gruppe (Sham+PTH, n=9 ) von scheinoperierten Tieren 14 Tage lang mit PTH behandelt und mit den scheinoperierten Tieren (Sham, n=11) verglichen, die lediglich eine 14-tägige Salinebehandlung bekamen. Es zeigte sich, dass die Sham-Tiere (ohne PTH) einen signifikant höheren linksventrikulären Druck (Sham  $90,1 \pm 3,7$  mmHg; Sham+PTH  $80,3 \pm 2,2$  mmHg) aufwiesen als die mit PTH-behandelten Sham-Tiere. Nicht signifikant waren die Unterschiede in der Herzfrequenz (Sham  $460,6 \pm 4,6$  Schläge/min; Sham+PTH  $434,4 \pm 17,4$  Schläge/min), der Auswurfraction (Sham  $61,8 \pm 2,8\%$ ; Sham+PTH  $59,6 \pm 2,6\%$ ) und der arteriellen Nachlast, wobei diese nach PTH-Gabe erniedrigt war im

## Ergebnisse

Vergleich zur Saline-Behandlung (Sham  $5,82 \pm 0,81$  mmHg/ $\mu$ l; Sham+PTH  $5,06 \pm 0,45$  mmHg/ $\mu$ l).

Parameter	Sham (n=11)	Sham+ PTH (n=9)	MI+Saline, d6 (n=6)	MI+PTH, d6 (n=6)	MI+Saline, d30 (n=6)	MI+PTH, d30 (n=5)
HF (bpm)	460 $\pm$ 4,6	434 $\pm$ 17	434 $\pm$ 12	479 $\pm$ 35	427 $\pm$ 8	415 $\pm$ 31
LVP (mmHg)	90,1 $\pm$ 3,7	80,3 $\pm$ 2,1†	62,6 $\pm$ 4,0	71,6 $\pm$ 3,0	67,3 $\pm$ 4,3	68,1 $\pm$ 3,3
EDV ( $\mu$ l)	23,7 $\pm$ 2,6	27,8 $\pm$ 2,9	56,4 $\pm$ 7,3	43,9 $\pm$ 7,5	41,3 $\pm$ 3,3	35,5 $\pm$ 7,1
EF (%)	61,7 $\pm$ 2,8	59,6 $\pm$ 2,5	14,5 $\pm$ 1,3	30,5 $\pm$ 6,1#	14,5 $\pm$ 0,9	32,1 $\pm$ 7,3
HZV ( $\mu$ l/min)	8286 $\pm$ 1253	6442 $\pm$ 627	3588 $\pm$ 579	5537 $\pm$ 477#	2689 $\pm$ 329	3810 $\pm$ 205*
dP/dt max (mmHg/sec)	5928 $\pm$ 427	5135 $\pm$ 252	3392 $\pm$ 358	4742 $\pm$ 394#	3053 $\pm$ 220	3488 $\pm$ 287
SW (mmHg x $\mu$ l)	1138 $\pm$ 208	968 $\pm$ 98	349.7 $\pm$ 60	569 $\pm$ 62#	258 $\pm$ 27	408 $\pm$ 60
Tau weiss (msec)	8,7 $\pm$ 0,6	6,7 $\pm$ 0,3	7,8 $\pm$ 0,3	6,8 $\pm$ 0,3#	9,9 $\pm$ 0,4*	8,5 $\pm$ 0,5
dP/dt min (mmHg/sec)	-6096 $\pm$ 371	-5684 $\pm$ 303	-3577 $\pm$ 351	-4838 $\pm$ 372#	-3112 $\pm$ 275	-3871 $\pm$ 468
Art. Nachlast (mmHg/ $\mu$ l)	5,8 $\pm$ 0,8	5,1 $\pm$ 0,5	8,2 $\pm$ 1,1	6,0 $\pm$ 0,6	11,5 $\pm$ 1,6	7,2 $\pm$ 0,6*

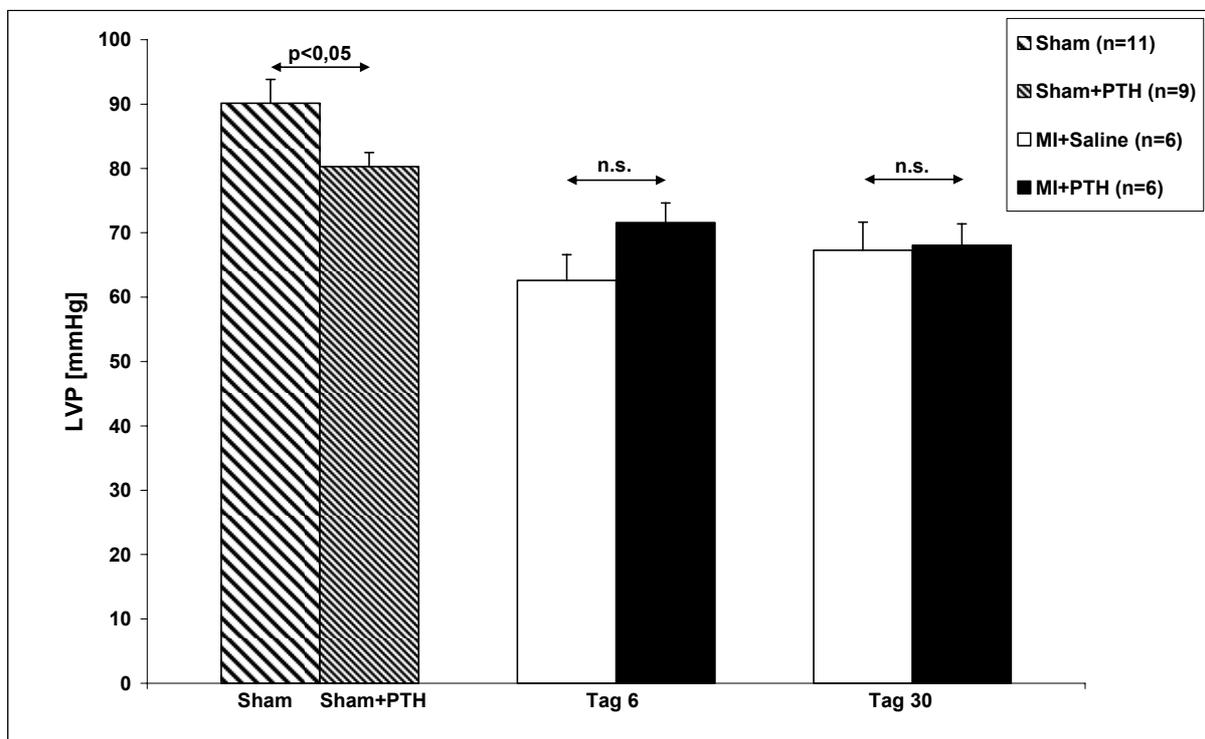
**Tabelle 8**

Übersicht wichtiger hämodynamischer Parameter in den Gruppen Sham, MI+Salined6, MI+PTHd6, MI+Salined30 und MI+PTHd30 (angegeben in Mittelwert  $\pm$  SEM); † =  $p < 0,05$  Sham vs. Sham+PTH, # =  $p < 0,05$  MI+Salined6 vs. MI+PTHd6, \* =  $p < 0,05$  MI+Salined30 vs. MI+PTHd30

### 3.3.3. Linksventrikulärer Druck

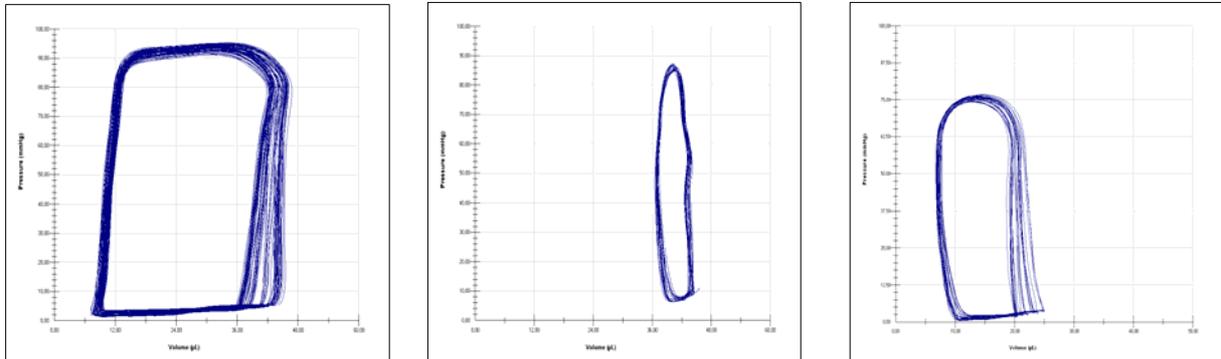
Im Folgenden werden die Gruppen der infarzierten Tiere (MI+Salined6; MI+PTHd6; MI+Salined30 und MI+PTHd30) jeweils mit den Gruppen der scheinbehandelten Tiere (Sham/Sham+PTH) dargestellt.

Die infarzierten Tiere (PTH und Saline) wiesen zu beiden Zeitpunkten (Tag 6 und Tag 30) einen signifikant reduzierten linksventrikulären Druck (LVP) gegenüber den scheinoperierten Tieren (Sham  $90,1 \pm 3,7$  mmHg; Sham+PTH  $80,3 \pm 2,2$  mmHg) auf. Beim direkten Vergleich der beiden Infarktgruppen zeigte sich an Tag 6 ein erniedrigter LVP in der Saline-Gruppe ( $62,6 \pm 4,0$  mmHg) im Vergleich zur Gruppe der PTH-behandelten Tiere ( $71,6 \pm 3,0$  mmHg), welcher aber statistisch nicht signifikant war (Abbildungen 18 und 19). An Tag 30 nach Myokardinfarkt war der LVP beider Gruppen annähernd gleich (MI+Saline  $67,3 \pm 4,4$  mmHg; MI+PTH  $68,1 \pm 3,3$  mmHg; nicht signifikant).



**Abbildung 18**

Vergleich der linksventrikulären Drücke (durchschnittliche Maxima) in den Gruppen Sham, Sham+PTH, MI+Salined6, MI+PTHd6, MI+Salined30 und MI+PTHd30

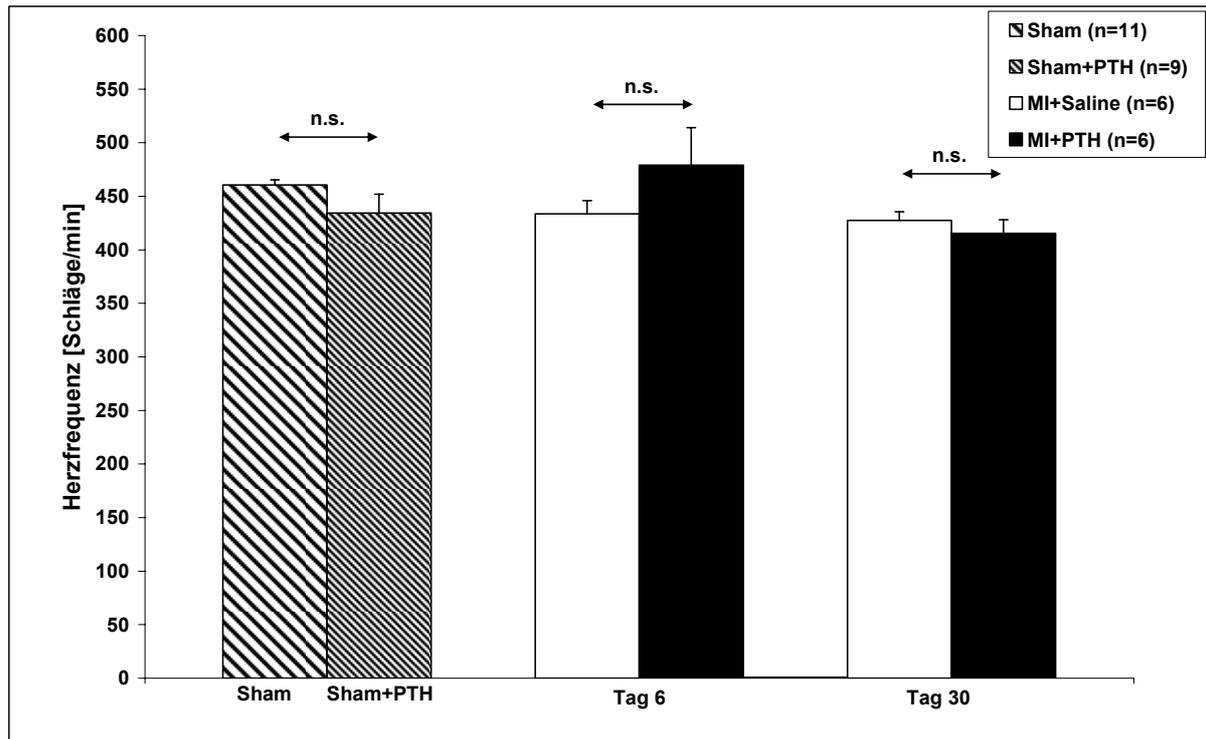


**Abbildung 19**

Repräsentative Druck-Volumen-Schleifen der Gruppen Sham (links), MI+Saline30 (mitte) und MI+PTHd30 (rechts)

### 3.3.4. Herzfrequenz

Die Herzfrequenz (HF) der unbehandelten Tiere lag bei  $460 \pm 4,6$  Schläge/min (Sham) bzw.  $434,4 \pm 17,4$  Schläge/min (Sham+PTH) und war im Vergleich zu den infarzierten Mäusen nicht signifikant unterschiedlich. Auch zwischen den infarzierten Tieren mit PTH- und mit Saline-Behandlung bestanden sowohl an Tag 6 (MI+PTH  $479 \pm 35$  Schläge/min; MI+Saline  $434 \pm 12$  Schläge/min) als auch an Tag 30 (MI+PTH  $415 \pm 31$  Schläge/min; MI+Saline  $427 \pm 8$  Schläge/min) keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 20).



**Abbildung 20**

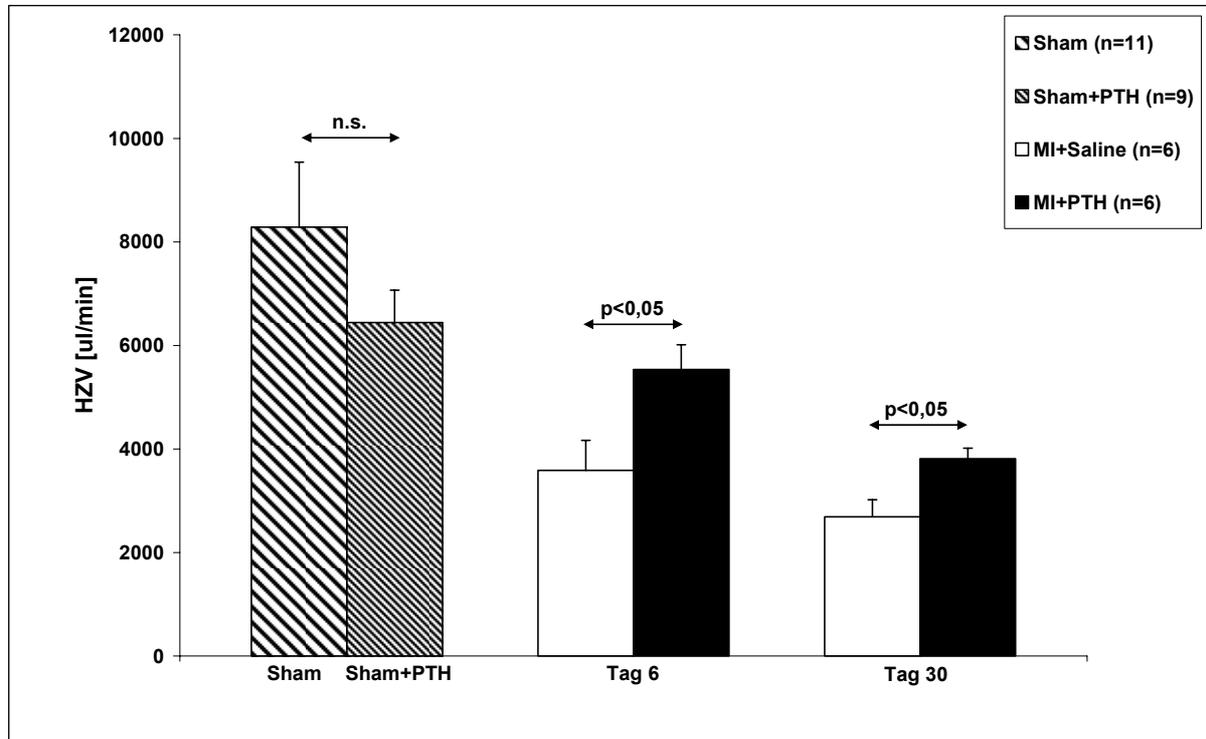
Vergleich der Herzfrequenz in den Gruppen Sham, Sham+PTH, MI+Salined6, MI+PTHd6, MI+Salined30 und MI+PTHd30

### 3.3.5. Herzzeitvolumen

Als Kontraktilitäts- Parameter werden das Herzzeitvolumen (HZV; Cardiac output) und die Ejektionsfraktion (EF) dargestellt (siehe 2.2.3.3.5).

Das HZV der scheinoperierten Mäuse lag im Mittel bei  $8286 \pm 1253 \mu\text{l}/\text{min}$  (Sham) bzw.  $6442 \pm 627 \mu\text{l}/\text{min}$  (Sham+PTH). An Tag 6 nach Myokardinfarkt hatten die unbehandelten Infarktmäuse (MI+Salined6) ein signifikant niedrigeres HZV ( $3588 \pm 579 \mu\text{l}/\text{min}$ ) als die Sham-Tiere. Auch im Vergleich zu den PTH-behandelten Mäusen (MI+PTHd6) bestand nach 6 Tagen ein signifikanter Unterschied im HZV (MI+PTH  $5537 \pm 477 \mu\text{l}/\text{min}$ , nicht signifikant zur Sham-Gruppe). Das HZV der infarzierten Tiere an Tag 30 (Abbildung 21) war in beiden Gruppen (MI+Salined30; MI+PTHd30) signifikant erniedrigt zur Gruppe der scheinbehandelten Tiere. Im direkten Vergleich hatten die PTH-Tiere an Tag 30 ein

signifikant höheres HZV (MI+PTH  $3810 \pm 205 \mu\text{l}/\text{min}$ ) als die unbehandelten Infarkttiere (MI+Saline  $2689 \pm 329 \mu\text{l}/\text{min}$ ).



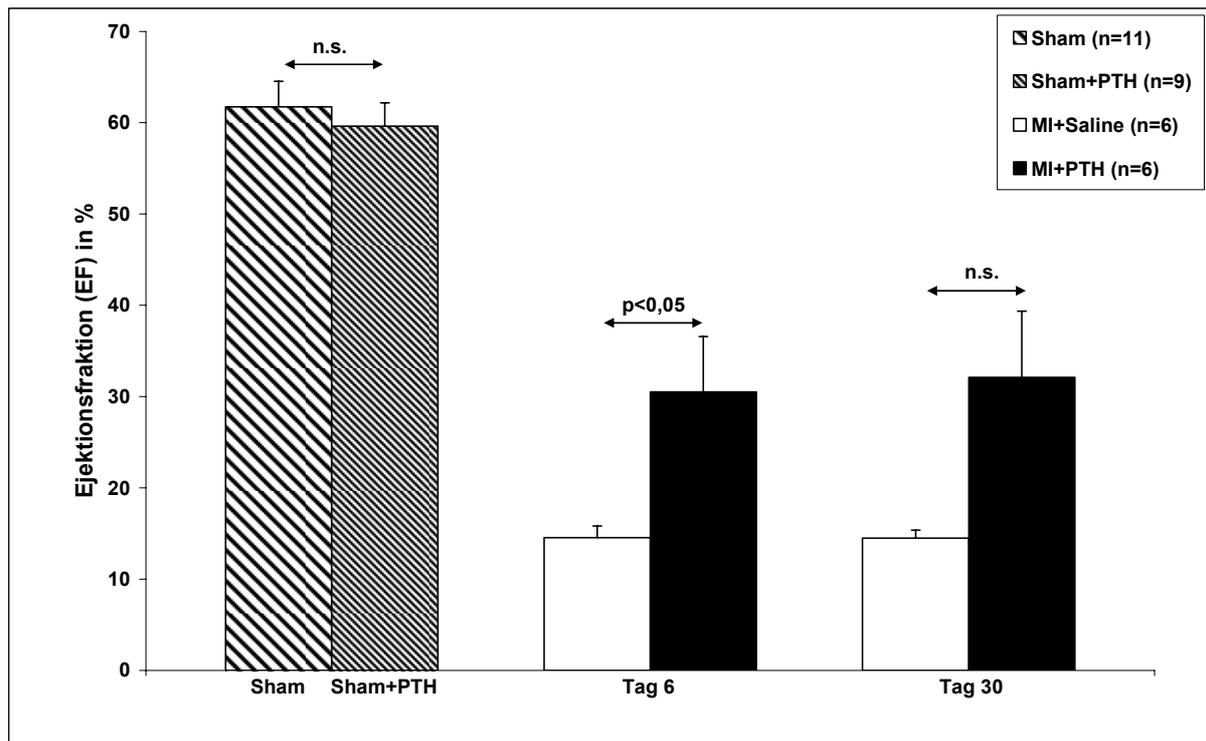
**Abbildung 21**

Vergleich des HZV in den Gruppen Sham, Sham+PTH, MI+Saline6/d30, MI+PTHd6/d30

### 3.3.6. Ejektionsfraktion

An Tag 6 nach Infarkt war die Auswurfraction (EF) in der Gruppe der PTH-behandelten Tiere  $30,5 \pm 6,1\%$  und somit signifikant höher als in der Saline-Gruppe ( $14,5 \pm 1,3\%$ ). Dieser Unterschied zwischen den Gruppen konnte in ähnlicher Form auch an Tag 30 post MI gemessen werden (MI+Saline30  $14,5 \pm 0,9\%$ ; MI+PTHd30  $32,1 \pm 7,3\%$ ), es bestand aber zu diesem Zeitpunkt keine Signifikanz mehr (Abbildung 22).

Die EF der scheinbehandelten Tiere (Sham  $61,7 \pm 2,8\%$ ; Sham+PTH  $59,6 \pm 2,6\%$ ) war zu beiden Zeitpunkten signifikant höher als die EF der PTH-behandelten und der Saline-behandelten Infarkttiere.



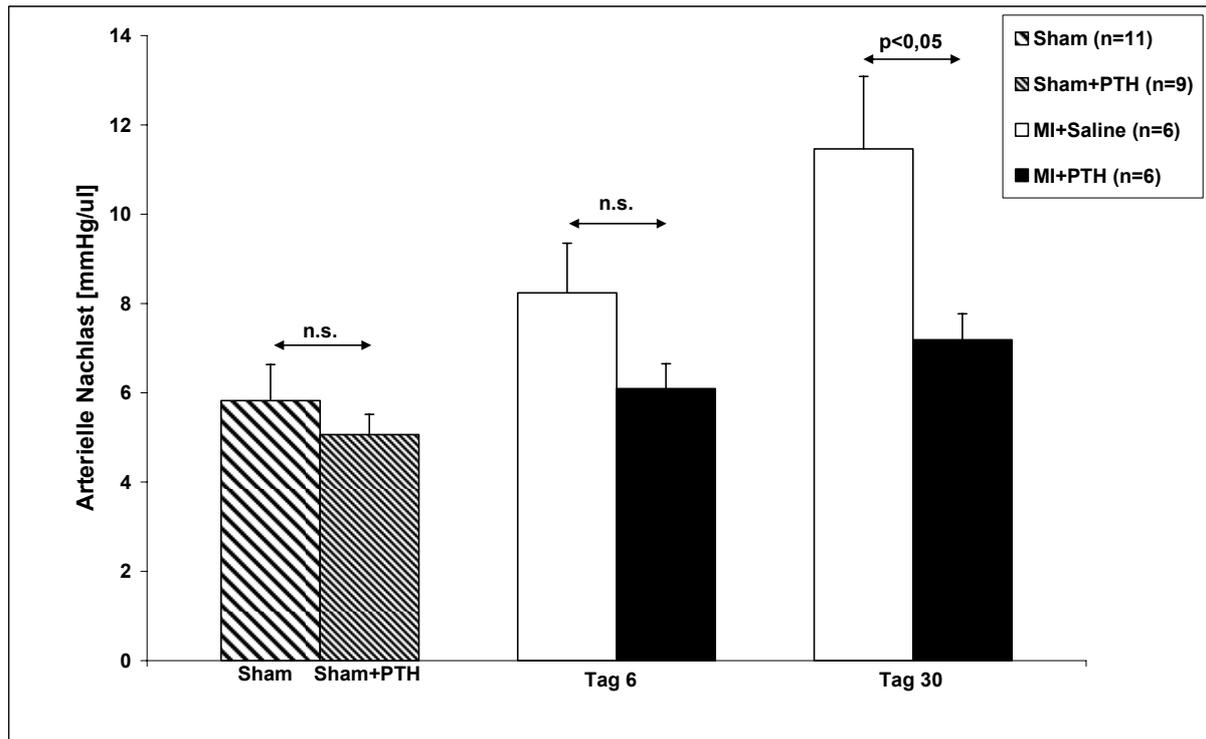
**Abbildung 22**

Vergleich der Ejektionsfraktion in den Gruppen Sham, Sham+PTH, MI+Salined6, MI+PTHd6, MI+Salined30 und MI+PTHd30

### 3.3.7. Arterielle Nachlast

Zur Überprüfung der Wirkung von PTH auf den Gefäßwiderstand infarzierter Tiere, wurde auch die arterielle Nachlast ( $E_a$ ) bestimmt (siehe 2.2.3.3.5.).

Wie aus Abbildung 23 ersichtlich, zeigte sich an Tag 6 nach Infarkt eine niedrigere  $E_a$  in der Gruppe der PTH-behandelten Tiere im Vergleich zu den unbehandelten Mäusen (MI+PTH  $6,0 \pm 0,6$  mmHg/ $\mu$ l; MI+Saline  $8,2 \pm 1,1$  mmHg/ $\mu$ l; nicht signifikant). Diese Unterschiede waren 30 Tage nach Infarkt noch deutlicher ausgeprägt und signifikant zwischen beiden Gruppen (MI+PTH  $7,2 \pm 0,6$  mmHg/ $\mu$ l; MI+Saline  $11,5 \pm 1,6$  mmHg/ $\mu$ l).



**Abbildung 23**

Vergleich der arteriellen Nachlast in den Gruppen Sham, Sham+PTH, MI+Saline6, MI+PTH6, MI+Saline30 und MI+PTH30

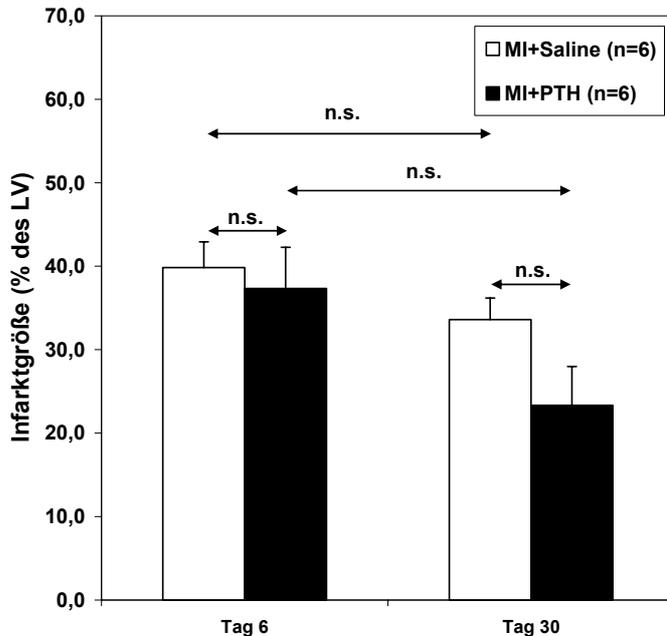
## 3.4. Histologie

### 3.4.1. Infarktgrößen

Nach der Entnahme der Herzen wurde anhand von vier Schnitten die Infarktgröße des linken Ventrikels planimetrisch bestimmt (siehe 2.2.4.1.1.).

Nach 6 Tagen konnte in der Gruppe der PTH-Tiere eine Infarktfläche von durchschnittlich  $37,3 \pm 4,9\%$  des linken Ventrikels gemessen werden. Diese war um 2,6% (nicht signifikant) gegenüber der Infarktfläche der Saline-behandelten Tiere nach Entnahme reduziert ( $39,8 \pm 2,1\%$ ). Diese Tendenz konnte am Tag 30 nach Myokardinfarkt noch deutlicher beobachtet werden (siehe auch Abbildung 24). Die Infarktgröße bei den Saline-Tieren lag nun im Mittel bei  $33,6 \pm 2,6\%$ , war aber nicht signifikant höher als bei den PTH-Tieren

(23,3±4,6%). Der Unterschied zwischen den Infarktgrößen an Tag 6 und Tag 30 post MI war weder bei den PTH-behandelten noch bei den Saline-behandelten Tieren signifikant.



**Abbildung 24**

*Infarktgrößen der PTH-behandelten und Saline-behandelten Tiere an Tag 6 und Tag 30*

### 3.4.2. Wanddicken

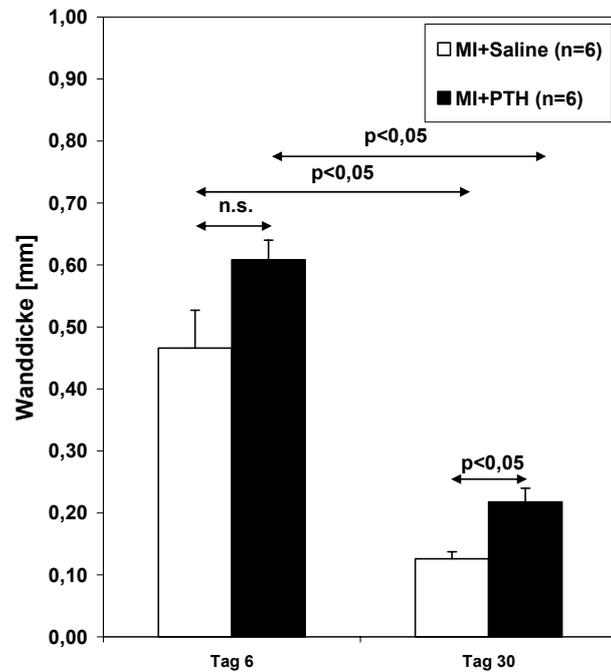
#### 3.4.2.1. Linksventrikuläre Vorderwand

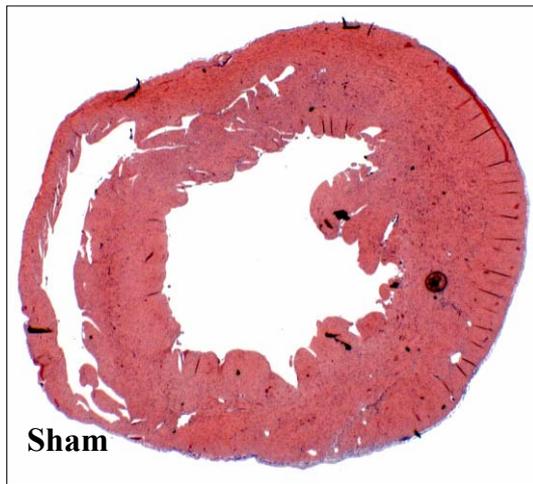
Zur Wanddicken-Bestimmung wurden analog der Infarktgrößen-Messung Masson-Trichrom-gefärbte Herzschnitte mit einer 15-fachen Vergrößerung benutzt (siehe 2.2.4.1.2.).

Die Dicke der linksventrikulären Vorderwand betrug nach 6 Tagen post MI in der Gruppe mit Saline-Injektionen im Mittel 0,47±0,06 mm und war um 0,14 mm dünner als die LV-Vorderwand der PTH-behandelten Mäuse (0,61±0,03 mm; nicht signifikant). 30 Tage nach Myokardinfarkt zeigte sich allgemein eine deutliche Abnahme der Wanddicke in beiden Gruppen (siehe Abbildung 25). Die Messung der Vorderwand in der MI+PTH-Gruppe ergab dabei einen Wert von 0,22±0,02 mm und war signifikant höher als die Vorderwand-Dicke der Infarkttiere mit folgender Salinegabe (0,13±0,01 mm). Die Abnahme der Wanddicke

zwischen Tag 6 und Tag 30 war sowohl in der PTH-Gruppe als auch in der Saline-behandelten Kontrollgruppe signifikant.

**Abbildung 25**  
*Dicke der linksventrikulären  
Vorderwand der PTH-behandelten  
und Saline-behandelten Tiere an  
Tag 6 und Tag 30*





**Abbildung 26**

*Histologische Beispielschnitte verschiedener Gruppen mit Masson-Trichrom-Färbung, Vergrößerung 15-fach:*

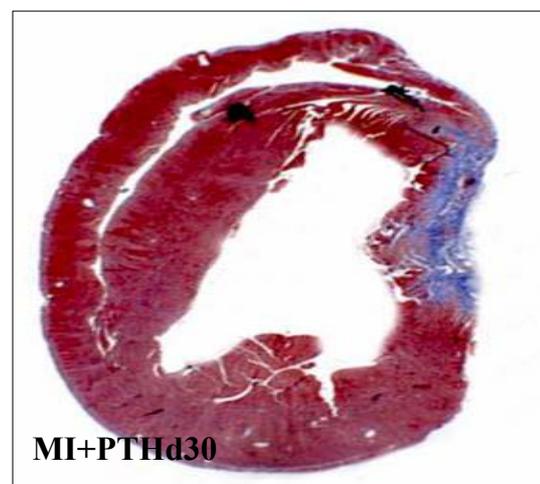
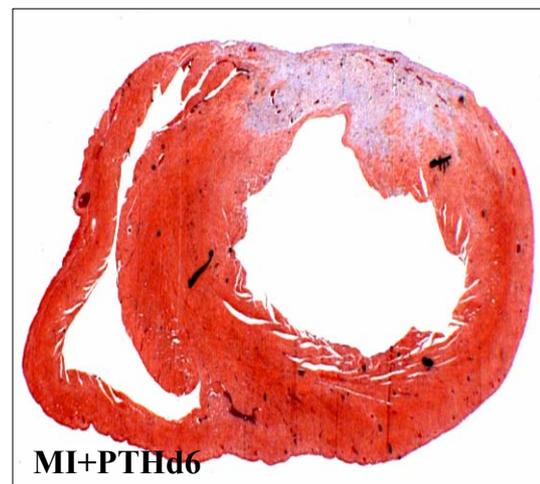
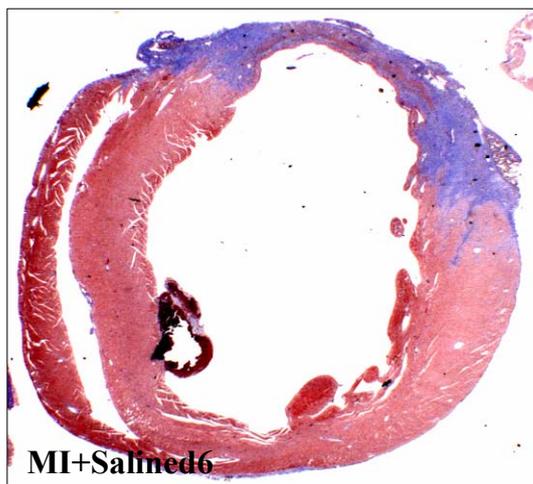
*oben links: Sham-Tier*

*mitte links: MI+Salined6*

*mitte rechts: MI+PTHd6*

*unten links: MI+Salined30*

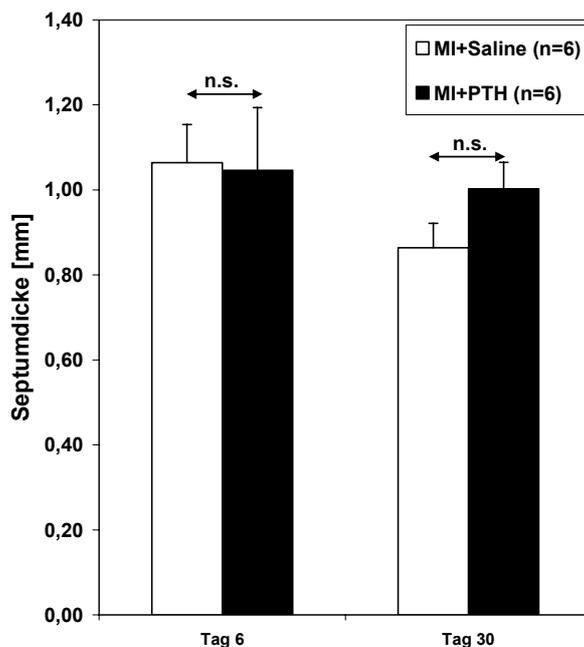
*unten rechts: MI+PTHd30*



### 3.4.2.2. Septumdicke

Zur Analyse, ob PTH (1-34) zu einer Hypertrophie des Herzmuskels führt, wurde in beiden Infarkt-Gruppen (MI+Saline; MI+PTH) die Septumdicke bestimmt (siehe 2.2.4.1.2).

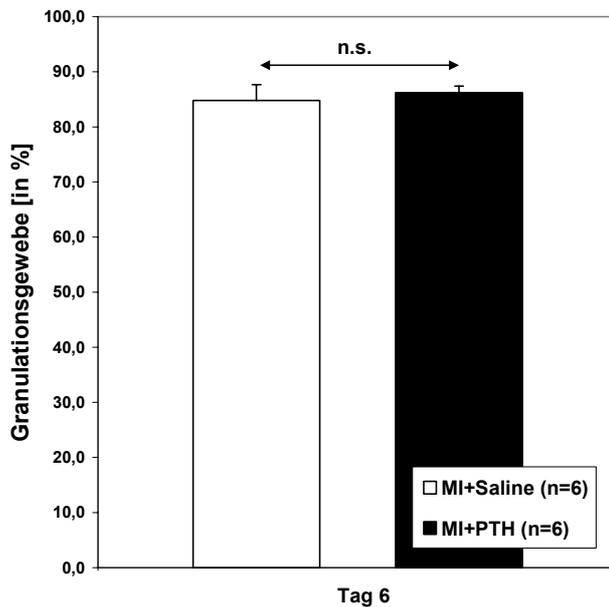
Wie in Abbildung 27 dargestellt, konnte weder an Tag 6 (MI+Saline  $1,06 \pm 0,09$  mm; MI+PTH  $1,05 \pm 0,15$  mm) noch an Tag 30 (MI+Saline  $0,86 \pm 0,06$  mm; MI+PTH  $1,00 \pm 0,06$  mm) ein signifikanter Unterschied in der Dicke des interventrikulären Septums festgestellt werden, wobei an Tag 30 eine Dickendifferenz zwischen PTH-behandelten und Saline-behandelten Tieren von 0,14 mm bestand.



*Abbildung 27*  
Septumdicke der  
Infarktgruppen  
(Saline/PTH) an Tag 6 und  
Tag 30

### 3.4.3. Granulationsgewebe

Wie unter 2.2.4.1.3. beschrieben wurde in den zwei Infarktgruppen (PTH/Saline) an Tag 6 post MI das Granulationsgewebe in % der gesamten Infarktfläche bestimmt (Abbildung 28). Es bestand nur ein geringer (nicht signifikanter) Unterschied von 1,4% zwischen den PTH-Tieren ( $86,2 \pm 1,2\%$ ) und den Saline-behandelten Kontrolltieren ( $84,8 \pm 1,2\%$ ).

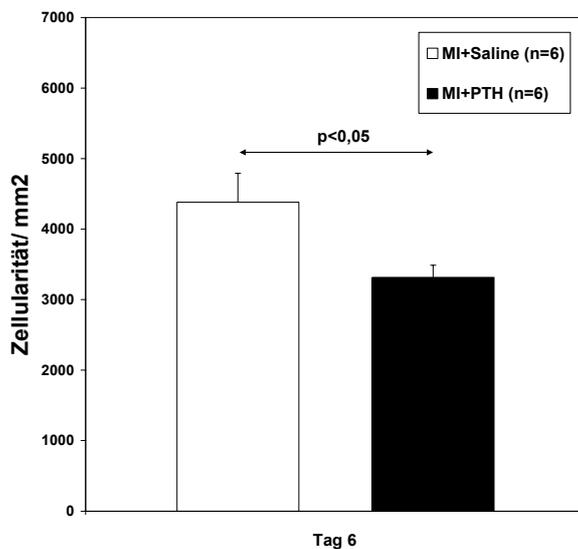


**Abbildung 28**

Granulationsgewebe in % der gesamten Infarktfläche von PTH- und Saline-behandelten Tieren an Tag 6

### 3.4.4. Zellzahl

Ebenso wurde im Infarktareal an Tag 6 nach MI die Zellzahl pro mm<sup>2</sup> bestimmt (Abbildung 29). Die Zellularität der PTH-behandelten Tiere lag im Mittel bei 3316±171 Zellen/mm<sup>2</sup> und lag signifikant unter der Zellularität der Saline-Mäuse im Infarktareal (4383±409 Zellen/mm<sup>2</sup>).



**Abbildung 29**

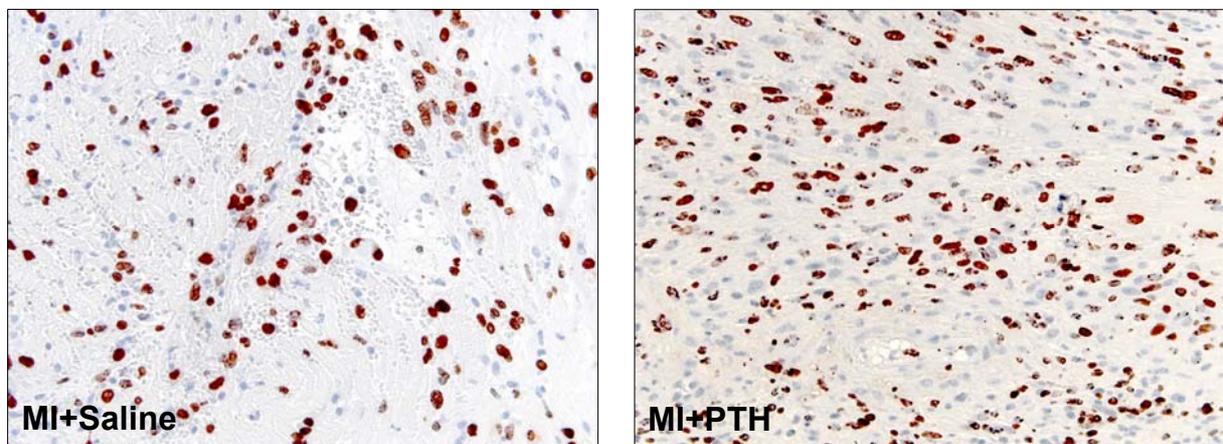
Vergleich der Zellzahl pro mm<sup>2</sup> der PTH- und Saline-behandelten Tiere an Tag 6

### 3.5. Immunhistochemie

#### 3.5.1. BrdU<sup>+</sup>/Ki67<sup>+</sup> Zellen

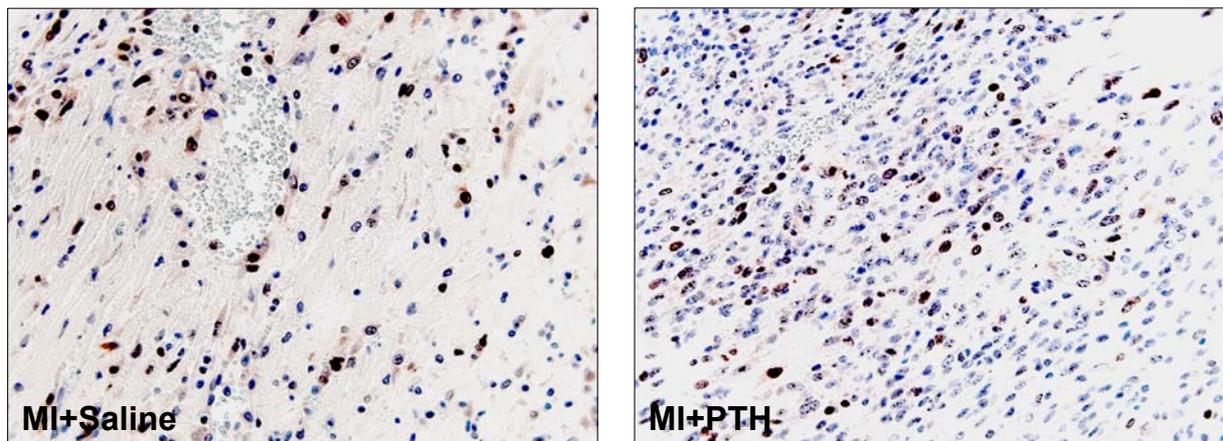
Zur Darstellung proliferierender Zellen im Infarktgebiet kamen die BrdU-Färbung und der Antikörper Ki67 zum Einsatz (siehe 2.2.4.2.).

In der Auswertung der BrdU-Färbung konnten sowohl in der Saline-Gruppe (64,87±6,8%) als auch in der PTH-Gruppe (72,16±2,4%) große Anteile BrdU<sup>+</sup> Zellen im Infarktareal gefunden werden (Abbildungen 30, 31 und 32). Auch in der Auswertung der Schnitte mit dem Antikörper Ki67 zeigte sich ein hoher prozentualer Anteil Ki67<sup>+</sup> Zellen im Infarktareal. In der Gruppe der Saline-behandelten Mäuse waren im Mittel 52,5±10,43% aller Zellen im Infarktgebiet Ki67<sup>+</sup>. Bei den behandelten Tieren (PTH) waren tendenziell weniger Zellen (34,8±4,83%) im Infarktbereich Ki67<sup>+</sup>.



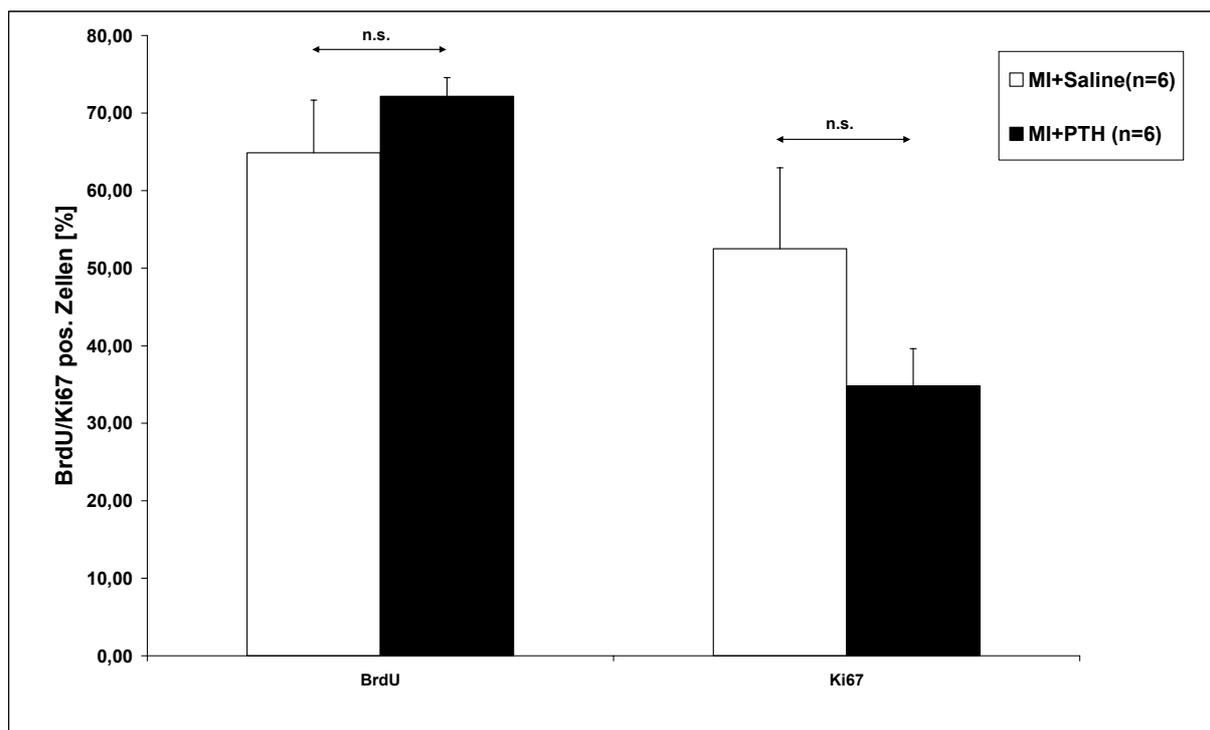
**Abbildung 30**

*BrdU-Färbung infarzierter Tiere (6 Tage post MI) mit Salinebehandlung (links) und PTH- Behandlung (rechts); Vergrößerung 400-fach*



**Abbildung 31**

*Ki67-Färbung infarzierter Tiere (6 Tage post MI) mit Salinebehandlung (links) und PTH-Behandlung (rechts); Vergrößerung 400-fach*



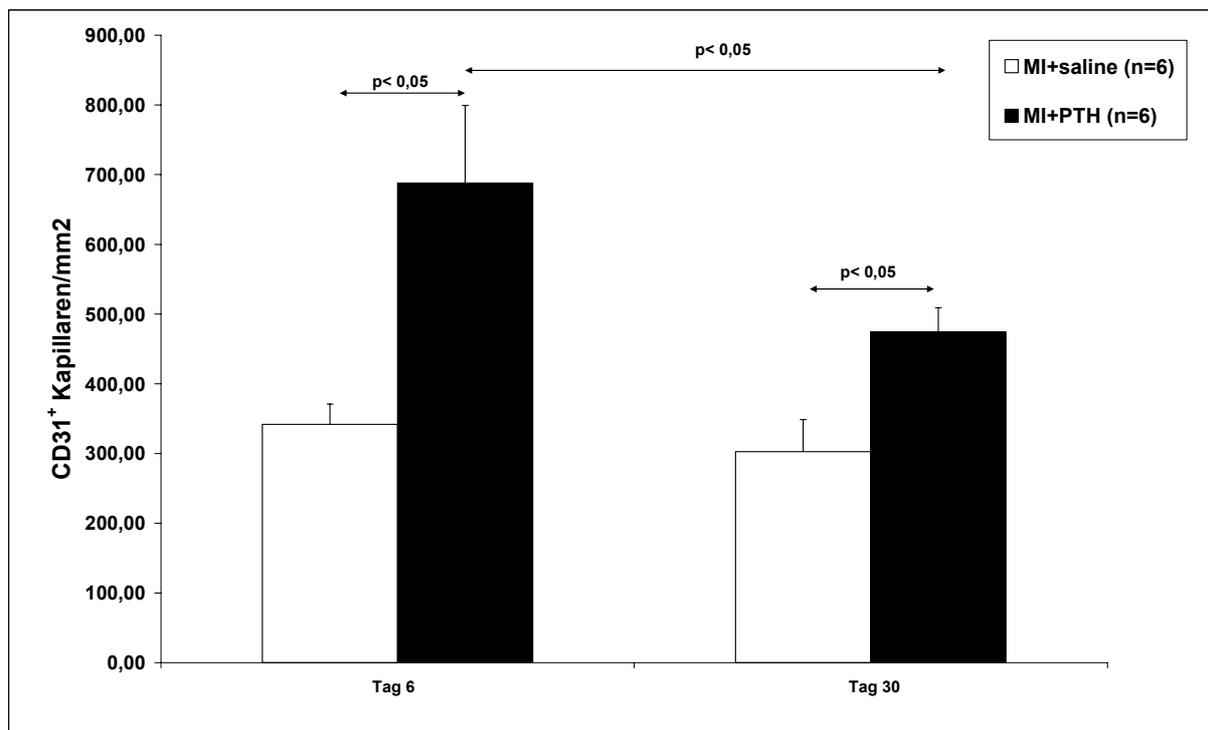
**Abbildung 32**

*Vergleich der BrdU<sup>+</sup>/Ki67<sup>+</sup> Zellen in % aller Zellen im Infarktgebiet der PTH-behandelten und Saline-behandelten Tiere an Tag 6*

### 3.5.2. CD31<sup>+</sup> Kapillaren in der Infarkt-Borderzone

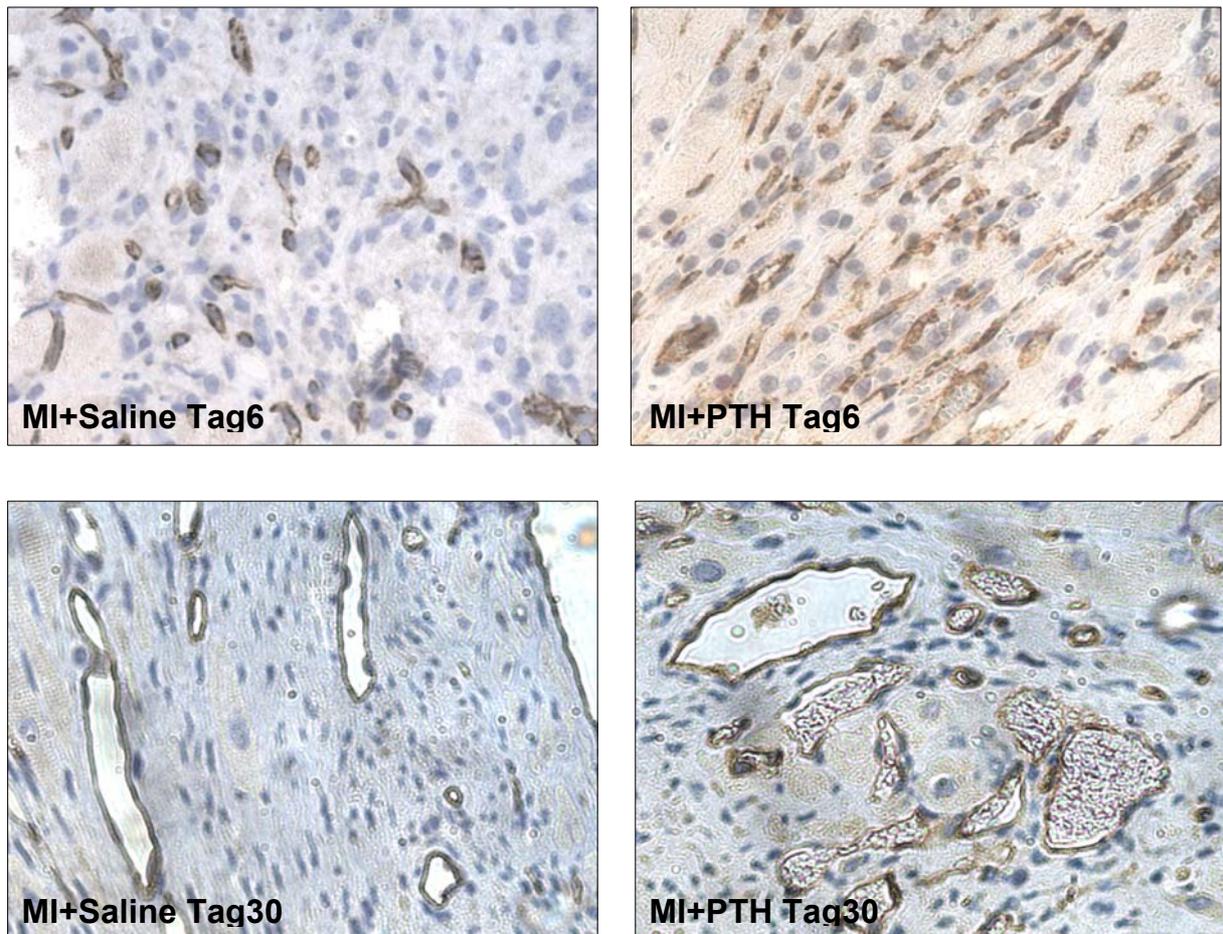
Wie unter 2.2.4.2.3. beschrieben, ist CD31 ein Adhäsionsmolekül, welches von allen Endothelzellen stark exprimiert wird und geeignet ist, Angiogenese zu beurteilen.

Bei der Auswertung der immunhistochemischen Schnitte 6 Tage nach Myokardinfarkt waren im Bereich der Borderzone (Grenzgebiet um den Infarkt) in der Kontrollgruppe mit Salinebehandlung im Mittel  $341,8 \pm 29,2$  Kapillaren/mm<sup>2</sup> CD31<sup>+</sup>. Verglichen mit den PTH-behandelten Tieren von Tag 6 waren dies signifikant weniger CD31<sup>+</sup> Kapillaren (MI+PTHd6,  $688 \pm 111$  Kapillaren/mm<sup>2</sup> CD31<sup>+</sup>). 30 Tage post MI nahm die Anzahl der CD31<sup>+</sup> Kapillaren in der Infarktgruppe mit PTH um 31% (signifikant) auf  $447,7 \pm 34,6$  Kapillaren/mm<sup>2</sup> ab (Abbildungen 33, 34 und 35). Dies waren weiterhin signifikant mehr CD31<sup>+</sup> Kapillaren im Vergleich zu den Saline-behandelten Kontrolltieren von Tag 30 (MI+Salined30:  $302,9 \pm 45,9$  Kapillaren/mm<sup>2</sup>). Verglichen mit Tag 6 bedeutete dies in der Saline-Gruppe eine Abnahme von nur 11% (im Gegensatz zu 31% in der PTH-Gruppe).



**Abbildung 33**

Vergleich der CD 31<sup>+</sup> Kapillaren pro mm<sup>2</sup> der PTH- und Saline-behandelten Tiere an Tag 6 und Tag 30



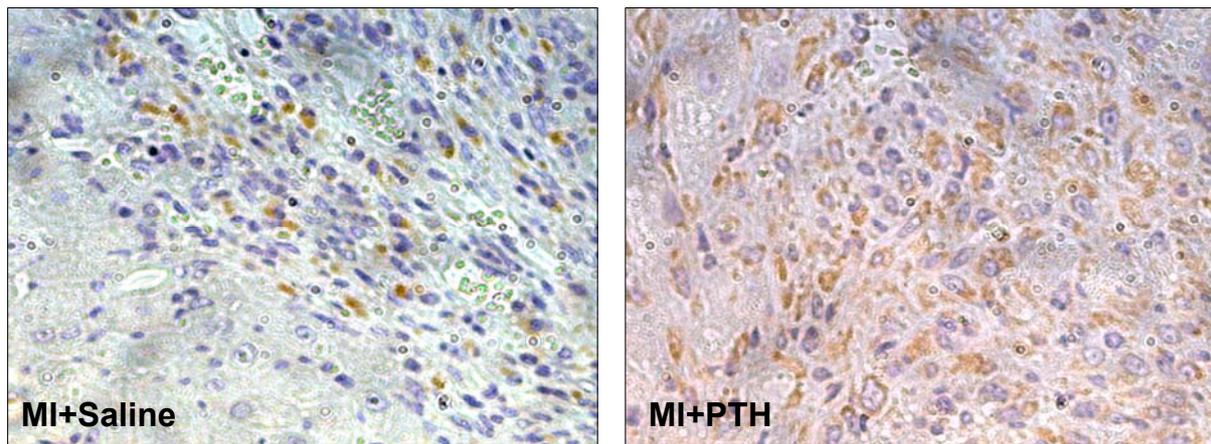
**Abbildung 34**

*CD31-Färbung infarzierter Tiere (6 und 30 Tage post MI) mit Salinebehandlung (links) und PTH-Behandlung (rechts); Vergrößerung 400-fach*

### **3.5.3. VEGF-Expression in der Infarkt-Borderzone**

Zur Untersuchung möglicher Mechanismen bestimmten wir die Expression von VEGF sowie des IGF-1-Rezeptors mittels Immunhistochemie in der Infarkt-Borderzone.

Wie aus Abbildung 37 ersichtlich, war 6 Tage nach chirurgisch induziertem Myokardinfarkt die Expression von VEGF in der Borderzone nach Behandlung mit PTH (1-34) im Vergleich zu den Kontrolltieren mit Salinebehandlung deutlich gesteigert.

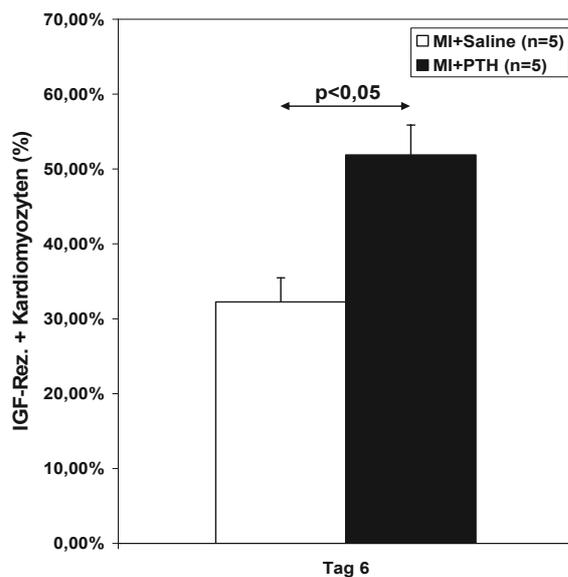


**Abbildung 35**

*VEGF-Färbung infarzierter Tiere (6 Tage post MI) mit Salinebehandlung (links) und PTH-Behandlung (rechts); Vergrößerung 400-fach*

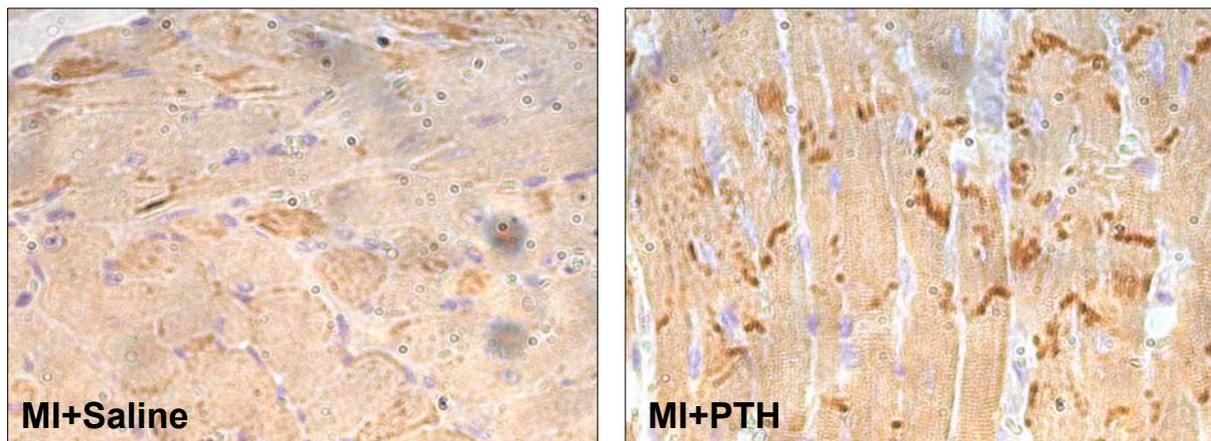
### 3.5.4. IGF-1-Rezeptor Expression in der Infarkt-Borderzone

Bei der Auswertung der immunhistochemischen Schnitte 6 Tage nach Myokardinfarkt waren im Bereich der Borderzone in der Kontrollgruppe mit Salinebehandlung im Mittel 32% aller Kardiomyozyten IGF-1-Rezeptor<sup>+</sup> (siehe Abbildungen 36 und 37). Im Vergleich dazu waren in der Gruppe der PTH-behandelten Tiere im Mittel 62% (signifikant mehr) Kardiomyozyten IGF-1-Rezeptor<sup>+</sup>.



**Abbildung 36**

*Vergleich der IGF-1-Rezeptor<sup>+</sup> Kardiomyozyten von PTH- und Saline-behandelten Tieren an Tag 6*



**Abbildung 37**

*Vergleich der IGF-1-Rezeptor-Expression infarzierter Tiere (MI+Saline und MI+PTH) 6 Tage post MI mit histologischen Beispielschnitten; Vergrößerung 400-fach*

## 4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit der Applikation von PTH (1-34) nach akutem Myokardinfarkt und dessen Einfluss auf Stammzellmobilisation, Überleben, Herzfunktion und kardialen Remodelling im Mausmodell. Die wesentlichen Ergebnisse waren:

- Die Gabe von PTH (1-34) führte zur Mobilisation verschiedener Populationen von Knochenmarkstammzellen ins periphere Blut. Dabei kam es im Gegensatz zu G-CSF nicht zum Abfall der CD45<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> Zellen im Knochenmark.
- Nach akutem Myokardinfarkt führte die Gabe von PTH (1-34) zu einer signifikanten Abnahme der Mortalität (-20%) im Vergleich zu den Kontrolltieren.
- Sowohl 6 Tage als auch 30 Tage nach LAD-Ligation war in der Gruppe der PTH-behandelten Tiere eine signifikant verbesserte kardiale Pumpfunktion messbar. Diese war in den histologischen Präparaten assoziiert mit geringeren Infarktgrößen und einer verminderten Abnahme der linksventrikulären Vorderwand im Vergleich zu den Kontrolltieren.
- Die PTH-Gabe führte sowohl 6 Tage als auch 30 Tage nach Myokardinfarkt zu einer signifikanten Zunahme von CD31<sup>+</sup> Kapillaren in der Grenzzone um den Infarkt (Borderzone).
- Diese Neoangiogenese war 6 Tage nach Infarkt bei den PTH-behandelten Tieren assoziiert mit einer erhöhten Expression von VEGF sowie des IGF-1-Rezeptors in der Borderzone.

#### **4.1. PTH (1-34) mobilisiert Knochenmarkstammzellen ins periphere Blut**

Calvi et al. zeigten im Jahr 2003, dass eine Beziehung zwischen PTH und dem hämatopoetischen System besteht. Bei Wildtyp-Mäusen konnten dort nach PTH-Behandlung erhöhte Spiegel von hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark gemessen werden. Darüberhinaus zeigten Mäuse, die im Rahmen einer Knochenmarktransplantation subletal bestrahlt wurden, nach PTH-Gabe einen deutlichen Überlebensvorteil (169). Im Rahmen dieser Arbeit untersuchten wir daher, ob die Gabe von PTH (1-34) zu einer Freisetzung von Knochenmarkstammzellen ins periphere Blut führt.

Wir konnten nach PTH-Behandlung einen signifikanten Anstieg von Knochenmarkstammzellen im peripheren Blut feststellen. Die Charakterisierung dieser Zellen nach 6-tägiger PTH-Gabe mittels Durchflusszytometrie ergab, dass sowohl die Subpopulationen  $CD45^+/CD34^+$  als auch  $CD45^+/CD34^-$  Zellen im peripheren Blut der Mäuse erhöht waren. Diese Daten sind vergleichbar mit der Studie unserer Arbeitsgruppe, in der Mäuse für 5 Tage mit G-CSF (100  $\mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{d}$ ) behandelt wurden. Dort war ebenfalls eine Erhöhung verschiedener Subpopulationen  $CD45^+/CD34^+$  und  $CD45^+/CD34^-$  Zellen aus dem Knochenmark im peripheren Blut der Mäuse nachweisbar (204).

Als möglicher Mechanismus gilt die Beeinflussung von Wachstumsfaktoren durch PTH. So führt PTH an den Osteoblasten zu einer vermehrten Produktion von G-CSF und unterstützt dadurch die Hämatopoese (205). Außer G-CSF existieren noch weitere Faktoren über die PTH Einfluß auf die Stammzellmobilisation und das Homing von Zellen nimmt (116, 206).

Die Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) hat eine große Bedeutung bei der Zytokin-induzierten Stammzellmobilisation (116-119). So wurde an MMP-9-Knockout-Mäusen gezeigt, dass dort die Stammzellmobilisation mittels Wachstumsfaktoren wie G-CSF deutlich eingeschränkt war (120). Übereinstimmend damit waren die Spiegel von MMP-9 in Wildtyp-Mäusen nach G-CSF-Gabe signifikant erhöht. Auch exogen zugeführtes PTH (1-34) führte an der Ratte zu einer gesteigerten Expression von MMP-9 (207) und könnte so für die nachgewiesene Mobilisation verschiedener Populationen von Knochenmarkstammzellen ins periphere Blut sorgen.

Einen weiteren Erklärungsansatz für die durchflusszytometrisch gezeigte Stammzellmobilisation nach PTH-Applikation bietet die kürzlich veröffentlichte Arbeit von Jung et al. (206). Dort wurden Wildtyp- Mäuse drei Wochen mit PTH (1-34) behandelt (40 µg/kg KG/d). Anschließend wurden signifikant erhöhte mRNA-Spiegel von SDF-1 im Knochenmark gemessen. Der Chemokin-Rezeptor CXCR4 und sein Ligand SDF-1 spielen eine wichtige Rolle bei der Freisetzung und dem Homing von Stammzellen in geschädigtes Gewebe. So führt Hypoxie zur vermehrten Expression von SDF-1 im ischämischen Gewebe (150). Über einen Gradienten sind Stammzellen und weitere Zellen, die den Rezeptor CXCR4 tragen (Monozyten, Makrophagen), in der Lage, in das geschädigte Gebiet zu wandern (208). Besonders ausgeprägt waren diese Effekte nach herzspezifischer Überexpression von SDF-1 in einem Ratten-Infarktmodell. Die Behandlung mit G-CSF acht Wochen nach MI führte dort zu einer deutlich vermehrten Einwanderung von Stammzellen ins Herz (209). Auch PTH nimmt über die CXCR4/SDF-1-Achse Einfluss auf die Mobilisation und das Homing von Knochenmarkstammzellen (206).

Bei der Untersuchung des Knochenmarks zeigte sich in unserer Arbeit sowohl nach PTH-Behandlung als auch nach G-CSF-Behandlung ein Abfall der CD45<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup> Zellen. Auffällig war, dass die Subpopulationen der CD45<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> Zellen im Knochenmark nach G-CSF-Gabe signifikant erniedrigt waren, nach PTH-Behandlung aber konstant blieben. Dieser Effekt könnte auf einer Notch1/Jagged1 vermittelten Proliferation ortsständiger Knochenmarkstammzellen beruhen. Calvi et al. konnten nachweisen, dass die PTH-Gabe zu einer gesteigerten Expression von Jagged1 in osteogenen Stromazellen führt (168). Zusätzlich kommt es zu einer Interaktion von N-Cadherin mit β-Cathenin (210, 211), was zu einem verbesserten Überleben und einer gesteigerten Erneuerung von CD34<sup>+</sup> Stammzellen im Knochenmark führt (169). Diese Wirkungen auf die Stammzellnische im Knochenmark machen PTH zu einer interessanten Substanz für Stammzell-modulierende Effekte.

## **4.2. PTH (1-34)-Behandlung nach akutem Myokardinfarkt senkt die Mortalität und verbessert die Herzfunktion**

Dass die Gabe von stammzellmobilisierenden Zytokinen wie G-CSF eine wirksame Therapie nach akutem Myokardinfarkt darstellt, wurde im Jahr 2001 erstmals von der Gruppe um Anversa gezeigt (47). Die behandelten Tiere hatten dort eine um 68% niedrigere Mortalität als die Kontrolltiere. Dies war assoziiert mit einer geringeren Infarktgröße (-40%) und einer signifikant höheren Auswurffraktion. Wir konnten bereits zeigen, dass PTH (1-34) analog zum G-CSF zur Freisetzung von Knochenmarkstammzellen ins periphere Blut führt, daher untersuchten wir in einem zweiten Schritt den Einfluss der PTH-Behandlung nach akutem Myokardinfarkt im Mausmodell.

Beim Menschen kommt es im Rahmen von Erkrankungen mit pathologisch erhöhten Parathormon-Spiegeln (primärer HPT) zu kardiovaskulären Veränderungen. So entwickeln bis zu 80% der Patienten eine linksventrikuläre Hypertrophie mit diastolischer Dysfunktion (176). Zusammen mit gehäuft auftretenden Arrhythmien war dies mit einer deutlich erhöhten Mortalität (177-180) assoziiert. Wir konnten in unseren Experimenten zeigen, dass eine 14-tägige intermittierende Behandlung mit PTH an gesunden Tieren zu keiner der beschriebenen Veränderungen führt. Ausser einem niedrigeren linksventrikulären Druck im Vergleich zu den unbehandelten Mäusen, der über eine Aktivierung der Adenylatcyclase vermittelt wird und so zur Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur führt (184, 185), konnten wir keinerlei Veränderungen am kardiovaskulären System nach PTH-Behandlung feststellen. Zu diesem Ergebnis kamen auch die klinischen Studien, die die Wirksamkeit von PTH (1-34) bei Patienten mit schweren Osteoporosen untersuchten. In keiner dieser Arbeiten waren nach intermittierender PTH-Behandlung kardiovaskuläre Veränderungen feststellbar (191, 194). Nachdem wir anhand gesunder Tiere die Sicherheit einer kurzfristigen PTH-Behandlung nachweisen konnten, untersuchten wir den Einfluss von PTH auf infarzierte Tiere.

Dabei zeigte sich, dass 30 Tage nach LAD-Ligation in der Kontrollgruppe mit Salinebehandlung 40% aller operierten Tiere, in der PTH-Gruppe noch 60% aller operierten Tiere am Leben waren. Noch ausgeprägter waren die Unterschiede 6 Tage nach Infarkt. In der PTH-Gruppe lebten zu diesem Zeitpunkt noch 80% aller Tiere bei nur 46% überlebenden

Tieren in der Saline-Gruppe (Kontrolle). Analog zu den Mortalitätsdaten zeigten sich auch bei der Messung der hämodynamischen Parameter deutliche Unterschiede zwischen den PTH-behandelten Mäusen und den Kontrolltieren. Das Herzzeitvolumen (HZV) und die Ejektionsfraktion (EF) waren sowohl 6 als auch 30 Tage nach Infarkt in der PTH-Gruppe signifikant höher im Vergleich zu den Saline-Tieren. Dies war auf histologischer Ebene assoziiert mit einer geringeren Infarktgröße und einer verminderten Ausdünnung der linksventrikulären Vorderwand. Bezüglich der Mortalität kamen Deindl et al. zu ähnlichen Ergebnissen. Nach 5-tägiger G-CSF-Behandlung überlebten 30 Tage post MI 68,8% aller Tiere bei 46,6% überlebenden Tieren in der Kontrollgruppe (128). Beim Vergleich der hämodynamischen Daten war auffällig, dass die Gabe von G-CSF erst nach 30 Tagen zu einer signifikanten Verbesserung der Pumpfunktion führte (128), während wir in der PTH-Gruppe bereits nach 6 Tagen eine deutlich gesteigerte Pumpleistung messen konnten. Als Erklärung hierfür könnte der Einfluß von PTH(1-34) auf das arterielle Gefäßbett dienen (185). In unserer Arbeit führte die PTH-Behandlung sowohl nach 6 Tagen als auch nach 30 Tagen zu einer signifikant erniedrigten arteriellen Nachlast. In zahlreichen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass PTH und sein strukturverwandetes Peptid PTHrP sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die arterielle Nachlast senken (183, 212). Vermittelt wird diese Vasodilatation über den PTH1R, der auf glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert wird (213). Durch Bindung von PTH an seinen Rezeptor kommt es zu einem verminderten Kalziumeinstrom in die Zelle, was eine Vasodilatation zur Folge hat (185). In diesem Zusammenhang führte PTH im Schweinemodell an Herzen mit einer postischämischen kontraktile Dysfunktion („myocardial stunning“) zu einem erhöhten myokardialen Blutfluss durch eine Abnahme des Koronararterien-Widerstands (182). In einem Infarktmodell an Hunden wurde 30 Minuten nach LAD-Ligation PTH (1-34) intravenös verabreicht. Dies führte zu einer verbesserten Herzfunktion und verminderte so die Ausbildung eines kardiogenen Schocks im Vergleich zu unbehandelten Tieren (181). An Ratten mit einer Ligation der mittleren Zerebralarterie waren nach PTHrP-Gabe um bis zu 47% kleinere zerebrale Infarktareale messbar (214). Der therapeutische Effekt von PTH könnte dabei ähnlich einer neuen Wirkstoffklasse sein. Die Kalzium-Sensitizer mit ihrem Wirkstoff Levosimendan stärken die Kontraktilität des Herzens, ohne dass mehr Sauerstoff verbraucht wird. Dabei kommt es wie bei PTH (1-34) zu einer Senkung des Gefäßwiderstands und dadurch zu einer Steigerung des myokardialen Blutflusses durch eine Abnahme des Koronararterien-Widerstands (215). So bessert

Levosimendan die hämodynamische Situation bei einer dekompensierten Herzinsuffizienz und senkt die Sterblichkeit. Dies zeigen die Ergebnisse der "Levosimendan Infusion versus Dobutamine (LIDO)"-Studie (216). Dieser gezeigte Einfluss von PTH (1-34) auf das arterielle Gefäßbett (185) könnte ein Erklärungsansatz für die verminderte Mortalität und die verbesserte Herzfunktion sein. Vor allem die frühe Verbesserung der Pumpfunktion nach 6 Tagen deutet auf einen Schutz von PTH vor akutem Herzversagen hin (181). Trotzdem bleibt die Frage offen, über welche Mechanismen PTH (1-34) zur längerfristigen Verbesserung der Herzfunktion und der histologisch gezeigten verminderten Infarktgröße und der verminderten Ausdünnung der linksventrikulären Vorderwand führt. Bei der Untersuchung proliferierender Zellen im Infarktareal mittels der BrdU- bzw. der Ki67-Färbung konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Saline-behandelten und den PTH-behandelten Tieren gefunden werden. Dass die Anzahl proliferierender Zellen in der BrdU-Färbung zum Teil deutlich über der Anzahl in der Ki67-Färbung lag, hatte dabei methodische Gründe. Da BrdU den Tieren für 5 Tage verabreicht wurde (siehe 2.2.3.2.), zeigten die histologischen Schnitte 6 Tage nach Infarkt die proliferierenden Zellen mehrerer Zeitpunkte (kumulativ), während in der Ki67-Färbung nur die proliferierenden Zellen zum Zeitpunkt der Entnahme dargestellt wurden. Zusätzlich wird BrdU auch in die Zell-DNA während DNA-Reparatur-Vorgängen eingebaut (217), was nach akutem Myokardinfarkt zu falsch positiven Ergebnissen führen könnte. In einem weiteren Schritt untersuchten wir, ob PTH analog zu anderen stammzellmobilisierenden Substanzen wie G-CSF (128) Einfluß auf die Gefäßneubildung nach akutem Myokardinfarkt hat.

### **4.3. PTH (1-34) führt über VEGF/IGF-1 zur verstärkten Neoangiogenese nach akutem Myokardinfarkt**

In den letzten Jahren wurden verschiedene Mechanismen beschrieben, die für die partielle Regeneration des geschädigten Herzmuskels nach Stammzellgabe verantwortlich sind. Glaubte man anfangs an eine Transdifferenzierung von Knochenmarkstammzellen zu Herzmuskelzellen (46, 139-144), sprechen neuere Arbeiten eher von parakrinen Effekten, die über Zytokine bzw. Wachstumsfaktoren vermittelt werden, als Mechanismus der myokardialen Regeneration. Die Transplantation von CD34<sup>+</sup> Zellen aus dem Knochenmark in die Infarkt-Borderzone führte in einer Arbeit am Affen zu einem gesteigerten regionalen

Blutfluss im Myokard. Dies war mit einer erhöhten Konzentration von VEGF assoziiert (146). Auch andere vaskuläre Wachstumsfaktoren wie FGF, IGF-1 und SDF-1 waren erhöht und sollen Anteil an der gesteigerten Angiogenese und dadurch am verbesserten Überleben von Zellen haben, die an das Infarktgebiet angrenzen (147, 148). Jüngst konnten in einem transgenen Mausmodell nach Myokardinfarkt c-kit<sup>+</sup> Zellen aus dem Knochenmark im Herzen nachgewiesen werden. Diese Zellen sorgten über VEGF zu einer Zunahme der Angiogenese in der Grenzzone um den Infarkt (149). Bereits seit Jahren ist bekannt, dass der Hauptstimulus der Angiogenese Hypoxie ist. Sauerstoffmangel führt bei vielen Zelltypen zur gesteigerten Expression von angiogen wirksamen Signalmolekülen (218). Unter den bekannten vaskulären Wachstumsfaktoren gilt VEGF bezüglich seiner angiogenetischen Effektivität und Wirkungsweise als einer der Hauptvertreter (93).

Da wir in dieser Arbeit nachweisen konnten, dass PTH zur Freisetzung von CD34<sup>+</sup>, CD31<sup>+</sup>, c-kit<sup>+</sup> und Sca-1<sup>+</sup> Knochenmarkstammzellen ins periphere Blut führt, untersuchten wir auch das Gefäßwachstum im Infarktgebiet mittels der CD31-Färbung (202, 203). Im Bereich der Borderzone war bereits 6 Tage nach Myokardinfarkt infolge der PTH-Behandlung eine signifikant höhere Anzahl von CD31<sup>+</sup> Kapillaren nachweisbar. Diesen Effekt von PTH auf die Angiogenese konnte man auch 30 Tage nach Infarkt noch finden. Zu diesem Zeitpunkt nahm die Anzahl der CD31<sup>+</sup> Kapillaren zwar in beiden Gruppen ab, war aber nach PTH-Behandlung immer noch fast 40 % höher als bei den Saline-behandelten Kontrolltieren. Verursacht wurde die Abnahme der CD31<sup>+</sup> Kapillaren nach 30 Tagen vermutlich durch Verschmelzung mehrerer kleinerer Kapillaren zu größeren Gefäßen (218). Da bereits gezeigt wurde, dass der Wachstumsfaktor VEGF zu Aussackungen des Gefäßsystems führen kann (219, 220), müsste in weiteren Arbeiten überprüft werden, ob die gezeigten Gefäßformationen 30 Tage nach Infarkt (Abbildung 36) hämodynamisch relevant sind.

Über welche Mechanismen PTH (1-34) die Angiogenese induziert, ist aktuell wenig bekannt. Carter et al. fanden *in vitro* heraus, dass menschliches Nebenschilddrüsengewebe durch parakrine VEGF-Aktivität Angiogenese induziert (221). Auch PTH (1-34) selbst ist in der Lage, den Wachstumsfaktor VEGF zu stimulieren. *In vitro* steigerte Parathormon die VEGF Expression in menschlichen Osteoblasten-ähnlichen Zellen (222). Das Struktur analogon PTHrP gilt ebenfalls als potenter Angiogenese-Faktor. In einer Arbeit an Ratten steigerte es

die Angiogenese in malignen Hypophysentumoren durch Endothelzell-vermittelte Kapillarisierung (223). Analog zu diesen Arbeiten konnten wir nach PTH-Behandlung eine erhöhte Expression von VEGF sowie des IGF-1-Rezeptors in der Borderzone nachweisen. Dies passt zu den Daten von Green et al., die eine erhöhte Expression von IGF-1 und IGF-1-Rezeptor im Knochen nach PTH-Gabe messen konnten (224). Die Bindung von IGF-1 an seinen Rezeptor an der Zelloberfläche führt über eine Erhöhung der Tyrosin-Kinase-Aktivität zur Phosphorylierung der Insulin-Rezeptor-Substrate. Über eine Interaktion dieser Substrate mit der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase vermittelt IGF-1 seine funktionellen Effekte wie eine verstärkte Gefäßneubildung, eine verbesserte Herzmuskelkontraktilität sowie eine verminderte Apoptose (224). Während IGF-1-Knockout-Mäuse nach chirurgisch induziertem Myokardinfarkt ein beeinträchtigt Remodelling zeigten (225), führte eine Überexpression von IGF-1 nach akutem Myokardinfarkt zu einem vermindertem Absterben von Kardiomyozyten. Dies hatte eine abgeschwächte Ventrikeldilatation sowie eine verminderte Myokardhypertrophie zur Folge (226). He et al. beschrieben kürzlich eine verstärkte Expression von VEGF in kultivierten Kardiomyozyten nach IGF-1-Gabe (227). Die IGF-1-abhängige VEGF-Expression ist dabei vom Hypoxie-induzierbaren-Faktor-1 (HIF-1) abhängig (228).

In den letzten Jahren wurden auch im adulten Herzen ortsständige Stammzellen gefunden (21, 22). Diese kardialen Stammzellen (CSCs) tragen ebenfalls den IGF-1-Rezeptor und sind Sca-1<sup>+</sup> bzw. c-kit<sup>+</sup> (73, 229). Im Hundemodell führte die intramyokardiale Gabe von IGF-1 zu einer vermehrten Proliferation und einem gesteigerten Überleben der CSCs (230). Die Aktivierung der CSCs hatte die Ausbildung neuer Koronargefäße zur Folge und verbesserte die myokardiale Funktion (231). Da die PTH-Behandlung nach akutem Myokardinfarkt in unserer Arbeit eine Expressionserhöhung des IGF-1-Rezeptors in der Borderzone bewirkte, scheint auch eine Beteiligung von PTH an der „kardialen Stammzellnische“ möglich. Über eine Aktivierung der CSCs könnte es zu den gezeigten Veränderungen im kardialen Remodelling gekommen sein (21).

Es muss das Ziel weiterer Arbeiten sein zu klären, über welche Mechanismen PTH zu einer Verringerung der Mortalität, einer Verbesserung der Herzfunktion und einem abgeschwächten kardialen Remodelling führt. Die Beeinflussung des Koronararterienwiderstands mit einem

gesteigerten myokardialen Blutfluss scheint vor allem in der Frühphase nach akutem Infarkt von Bedeutung zu sein und deutet auf einen Schutz von PTH vor akutem Herzversagen hin (181, 182). Für die längerfristige Regeneration der Herzfunktion und die Veränderungen im Remodelling nach akutem Myokardinfarkt scheint die VEGF/IGF-1-vermittelte Neoangiogenese verantwortlich zu sein. Entweder führt PTH direkt über eine vermehrte Expression von angiogenen Wachstumsfaktoren wie VEGF oder IGF-1 (222) zur gezeigten Neoangiogenese, oder PTH nimmt indirekt über die Freisetzung von Knochenmarkstammzellen ins periphere Blut Einfluss auf die Gefäßneubildung. Zur Klärung dieser Frage wäre u.a. der Einsatz von Mäusen mit markiertem Knochenmark denkbar. Auch die Aktivierung der ortsständigen kardialen Stammzellen (21) durch PTH wäre möglich und müsste in diesem Zusammenhang noch eingehender untersucht werden.

#### **4.4. Limitationen der Arbeit**

In dieser Arbeit wurde ein Mausmodell verwendet. Die zugrunde liegenden pathophysiologischen Abläufe bei einem Myokardinfarkt sind mit denen beim Menschen vergleichbar. Das verwendete Mausmodell der LAD-Ligation zur Induktion eines Herzinfarktes ist in der kardiologischen Forschung gut etabliert (196). Es bietet gegenüber den Modellen an Hunden (232, 233) und Schweinen (234, 235) den Vorteil, dass die Versuche einen geringeren operativen und personellen Aufwand benötigen und keine großen Räumlichkeiten erforderlich sind. Gleichwohl ist die Untersuchung eines einzelnen Stoffes wie Parathormon in einem lebendigen Organismus mit Tausenden von Botenstoffen und Stoffwechselwegen nicht nur äußerst kompliziert, sondern auch schwer zu interpretieren.

Alle Tiere dieser Arbeit waren innerhalb kurzer Zeit mindestens einem, die meisten sogar zwei Ereignissen ausgesetzt, einer Operation und einem Herzinfarkt. Eine Verfälschung der Ergebnisse durch eine präoperative, klinisch nicht erfassbare Infektion kann hier ebenso wenig ausgeschlossen werden, wie eine im Laufe der Experimente erworbene Infektion. Auch kann der Einfluss von Vorerkrankungen und Risikofaktoren wie Diabetes mellitus oder Adipositas auf das Ergebnis der PTH-Behandlung im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Beim Menschen kommt es häufig als Folge einer KHK zum akuten Myokardinfarkt mit seinen gefürchteten Komplikationen (17). Im Gegensatz dazu hat die KHK bei den

Versuchstieren kaum Bedeutung (196) und deren Auswirkung auf die gezeigten Experimente bleibt unklar. Zur Standardtherapie nach akutem Myokardinfarkt gehört beim Menschen die schnelle Wiedereröffnung des verschlossenen Herzkranzgefäßes mittels PTCA (236) oder Lyse-Therapie (237). Auch deren Einfluß lässt sich in einem Mausmodell nur ungenügend simulieren und könnte somit zu abweichenden Ergebnissen führen.

Ebenso kann anhand dieses Mausmodells nicht geklärt werden, ob die Gabe von Medikamenten wie Thrombozytenaggregationshemmer (238) oder  $\beta$ -Blocker (239), die beim Menschen nach akutem Myokardinfarkt standardmäßig eingesetzt werden, die Versuchsergebnisse beeinflussen würde.

### **4.5. Parathormon als Therapieoption nach Myokardinfarkt?- Ein Ausblick**

Die Diskussion unserer ermittelten Ergebnisse deutet auf ein vielversprechendes Wirkpotential von PTH (1-34) nach akutem Myokardinfarkt hin. Es zeigt dabei nicht nur direkte Effekte auf das kardiovaskuläre System, indem es den myokardialen Blutfluss steigert, sondern ist auch in der Lage, direkt oder indirekt über die Mobilisation von Knochenmarkstammzellen die Herzfunktion zu verbessern. Die vermehrte Angiogenese wird dabei über Wachstumsfaktoren wie VEGF und IGF-1 vermittelt und könnte so zu kleineren Infarktgrößen und einer geringeren Abnahme der Wanddicke im Infarktgebiet führen.

PTH (1-34) ist seit 2003 in Deutschland zugelassen und wird als Teriparatid zur Therapie bei Patienten mit schwerer Osteoporose eingesetzt. Die in diesem Zusammenhang durchgeführten klinischen Studien konnten analog zu unseren Ergebnissen nach intermittierender PTH-Behandlung keine negativen kardiovaskulären Veränderungen feststellen (191, 194). In unserer Arbeit behandelten wir die Mäuse mit einer täglichen PTH-Dosis von 80  $\mu\text{g}/\text{kg KG}$  (169). Daher müsste in einem nächsten Schritt geklärt werden, ob PTH (1-34) in der zur Osteoporosebehandlung üblichen Dosierung von 20-40  $\mu\text{g}/\text{d}$  beim Menschen oder in konsekutiv höheren Dosierungen ebenfalls zur Freisetzung verschiedener Populationen von Knochenmarkstammzellen ins periphere Blut führt (Phase I Studie).

## 5. Zusammenfassung

Die koronare Herzkrankheit (KHK) stellt momentan die häufigste Krankheits- und Todesursache in Europa dar. Häufig kommt es als Folge einer KHK zum akuten Myokardinfarkt mit den gefürchteten Folgen, wie kardiogenem Schock und plötzlichem Herztod. Während sich die etablierten konservativen Therapiestrategien bislang auf eine Verminderung des pathologischen Remodellings beschränken, gewinnt die Forschung an alternativen Therapiemöglichkeiten zur längerfristigen Regeneration des geschädigten Myokards zunehmend an Bedeutung. Ein neuer bisher noch nicht zur Therapie des Herzinfarkts eingesetzter Kandidat könnte das Parathormon (PTH) sein. Dessen Fragment PTH (1-34) befindet sich bereits seit Jahren im klinischen Einsatz zur Bekämpfung schwerer Osteoporosen. Im Tiermodell verbesserte PTH durch Steigerung des myokardialen Blutflusses die Herzfunktion und verhinderte dadurch die Ausbildung eines kardiogenen Schocks. Kürzlich konnte darüber hinaus im Mausmodell gezeigt werden, dass PTH die Stammzellnische im Knochenmark reguliert. So führte die PTH-Gabe zu einem Anstieg verschiedener Stammzellpopulationen im Knochenmark und verminderte bei bestrahlten Mäusen nach Knochenmarktransplantation signifikant deren Mortalität.

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von PTH (1-34) auf die Mobilisation von Knochenmarkstammzellen ins periphere Blut sowie mögliche Effekte auf Pumpfunktion und Remodelling nach akutem Myokardinfarkt im Mausmodell zu untersuchen.

Die Behandlung mit PTH (1-34) führte zu einer Mobilisation verschiedener Stammzellpopulationen aus dem Knochenmark ins periphere Blut. Dabei kam es nach PTH-Gabe im Gegensatz zu Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) nicht zum Abfall von CD45<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> Stammzellen im Knochenmark. Nach chirurgisch induziertem Myokardinfarkt führte die Gabe von PTH zu einer signifikanten Abnahme der Mortalität im Vergleich zu den Kontrolltieren. Dies war bei den PTH-Tieren assoziiert mit einer signifikanten Verbesserung der globalen Herzfunktion. So waren das Herzzeitvolumen und die Auswurfraction nach PTH-Gabe deutlich gesteigert.

Wir konnten anhand einer erniedrigten arteriellen Nachlast in den hämodynamischen Untersuchungen zeigen, dass PTH am arteriellen Gefäßbett zu einer Vasodilatation führt. Über diesen bekannten Einfluss von PTH auf den arteriellen Gefäßwiderstand kommt es zu einem gesteigerten myokardialen Blutfluss. Dadurch verbessert PTH in der Akutphase nach akutem Myokardinfarkt die Herzfunktion und schützt vor einem akuten Herzversagen. Auf histologischer Ebene fanden sich nach PTH-Behandlung kleinere Infarktgrößen und eine verminderte Abnahme der linksventrikulären Vorderwand im Vergleich zu den Kontrolltieren. Diese Veränderungen im Remodelling nach PTH-Behandlung waren durch eine Zunahme von CD31<sup>+</sup> Kapillaren in der Grenzzone um den Infarkt (Borderzone) erklärbar. Die Gefäßneubildungen waren assoziiert mit einer gesteigerten Expression von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) sowie des Insulin like Growth Factor-1 (IGF-1)-Rezeptors in der Borderzone. PTH bewirkt somit entweder direkt oder indirekt über die Mobilisation von Knochenmarkstammzellen eine vermehrte Sekretion von vaskulären Wachstumsfaktoren wie VEGF und IGF-1. So kommt es nach akutem Myokardinfarkt im Mausmodell zu einem abgeschwächten „Remodelling“ mit konsekutiver Verbesserung der myokardialen Pumpfunktion. Neben weiterer Untersuchungen bezüglich der Mechanismen, über die PTH zu den gezeigten Veränderungen im kardialen Remodelling führt, müsste in einem nächsten Schritt geklärt werden, ob PTH (1-34) beim Menschen in der zur Osteoporosebehandlung üblichen Tagesdosis von 20-40 µg oder in konsekutiv höheren Dosierungen zur Freisetzung verschiedener Populationen von Knochenmarkstammzellen ins periphere Blut führt (Phase I Studie).

## 6. Literaturverzeichnis

1. Bundesamt S. Statistisches Bundesamt. Pressemitteilung vom 21. September 2006: Todesursache Herzinfarkt. 2006.
2. Tunstall-Pedoe H, Kuulasmaa K, Amouyel P, Arveiler D, Rajakangas AM, Pajak A. Myocardial infarction and coronary deaths in the World Health Organization MONICA Project. Registration procedures, event rates, and case-fatality rates in 38 populations from 21 countries in four continents. *Circulation* 1994;90(1):583-612.
3. Bundes Gd. Gesundheitsbericht für Deutschland 1998: Akuter Myokardinfarkt. [www.gbe-bund.de](http://www.gbe-bund.de). 1998.
4. Lowel H, Meisinger C, Heier M, Hormann A. The Population-Based Acute Myocardial Infarction (AMI) Registry of the MONICA/KORA Study Region of Augsburg. *Gesundheitswesen* 2005;67(Suppl 1):31-7.
5. Bundesamt S. Johann Halen: Pressekonferenz "Krankheitskosten in Deutschland im Jahr 2004". 2006.
6. Riede N, Schäfer H-E. *Allgemeine und spezielle Pathologie*. 1995.
7. Myocardial infarction redefined--a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. *Eur Heart J* 2000;21(18):1502-13.
8. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2). *N Engl J Med* 1992;326(5):310-8.
9. Weintraub WS, Harrison DG. C-reactive protein, inflammation and atherosclerosis: do we really understand it yet? *Eur Heart J* 2000;21(12):958-60.
10. Strydom HC. Lipid and macrophage accumulations in arteries of children and the development of atherosclerosis. *Am J Clin Nutr* 2000;72(5 Suppl):1297S-306S.
11. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002;420(6917):868-74.
12. Strydom HC. Evolution and progression of atherosclerotic lesions in coronary arteries of children and young adults. *Arteriosclerosis* 1989;9(1 Suppl):I19-32.
13. Strydom HC. The sequence of cell and matrix changes in atherosclerotic lesions of coronary arteries in the first forty years of life. *Eur Heart J* 1990;11 Suppl E:3-19.

14. Sary HC, Chandler AB, Glagov S, et al. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb* 1994;14(5):840-56.
15. Chandler AB, Chapman I, Erhardt LR, et al. Coronary thrombosis in myocardial infarction. Report of a workshop on the role of coronary thrombosis in the pathogenesis of acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1974;34(7):823-33.
16. DeWood MA, Spores J, Hensley GR, et al. Coronary arteriographic findings in acute transmural myocardial infarction. *Circulation* 1983;68(2 Pt 2):I39-49.
17. Kelm M, Strauer BE. [Interventional therapy of the acute cardiac infarct]. *Internist (Berl)* 2001;42(5):686-98.
18. Persijn G, Cohen B. Eurotransplant mInternational Foundation: Annual Report 1999. In. Leiden; 2000:37.
19. Krakauer H, Lin MJ, Bailey RC. Projected survival benefit as criterion for listing and organ allocation in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2005;24(6):680-9.
20. Anversa P, Nadal-Ginard B. Myocyte renewal and ventricular remodelling. *Nature* 2002;415(6868):240-3.
21. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003;114(6):763-76.
22. Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, et al. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(21):12313-8. Epub 2003 Oct 6.
23. Leri A, Kajstura J, Anversa P. Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration. *Physiol Rev* 2005;85(4):1373-416.
24. Urbanek K, Torella D, Sheikh F, et al. Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(24):8692-7 Epub 2005 Jun 2.
25. Braunwald E, Pfeffer MA. Ventricular enlargement and remodeling following acute myocardial infarction: mechanisms and management. *Am J Cardiol* 1991;68(14):1D-6D.

26. Klug MG, Soonpaa MH, Koh GY, Field LJ. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J Clin Invest* 1996;98(1):216-24.
27. Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, et al. Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature* 2000;408(6808):92-6.
28. Min JY, Yang Y, Converso KL, et al. Transplantation of embryonic stem cells improves cardiac function in postinfarcted rats. *J Appl Physiol* 2002;92(1):288-96.
29. Min JY, Yang Y, Sullivan MF, et al. Long-term improvement of cardiac function in rats after infarction by transplantation of embryonic stem cells. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003;125(2):361-9.
30. Yang Y, Min JY, Rana JS, et al. VEGF enhances functional improvement of postinfarcted hearts by transplantation of ESC-differentiated cells. *J Appl Physiol* 2002;93(3):1140-51.
31. Behfar A, Zingman LV, Hodgson DM, et al. Stem cell differentiation requires a paracrine pathway in the heart. *Faseb J* 2002;16(12):1558-66.
32. Hodgson DM, Behfar A, Zingman LV, et al. Stable benefit of embryonic stem cell therapy in myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;287(2):H471-9.
33. Himes N, Min JY, Lee R, et al. In vivo MRI of embryonic stem cells in a mouse model of myocardial infarction. *Magn Reson Med* 2004;52(5):1214-9.
34. Swijnenburg RJ, Tanaka M, Vogel H, et al. Embryonic stem cell immunogenicity increases upon differentiation after transplantation into ischemic myocardium. *Circulation* 2005;112(9 Suppl):I166-72.
35. Menard C, Hagege AA, Agbulut O, et al. Transplantation of cardiac-committed mouse embryonic stem cells to infarcted sheep myocardium: a preclinical study. *Lancet* 2005;366(9490):1005-12.
36. Kehat I, Khimovich L, Caspi O, et al. Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2004;22(10):1282-9. Epub 2004 Sep 26.

37. Xue T, Cho HC, Akar FG, et al. Functional integration of electrically active cardiac derivatives from genetically engineered human embryonic stem cells with quiescent recipient ventricular cardiomyocytes: insights into the development of cell-based pacemakers. *Circulation* 2005;111(1):11-20. Epub 2004 Dec 20.
38. Laflamme MA, Gold J, Xu C, et al. Formation of human myocardium in the rat heart from human embryonic stem cells. *Am J Pathol* 2005;167(3):663-71.
39. Kessler PD, Byrne BJ. Myoblast cell grafting into heart muscle: cellular biology and potential applications. *Annu Rev Physiol* 1999;61:219-42.
40. Marelli D, Desrosiers C, el-Alfy M, Kao RL, Chiu RC. Cell transplantation for myocardial repair: an experimental approach. *Cell Transplant* 1992;1(6):383-90.
41. Taylor DA, Atkins BZ, Hungspreugs P, et al. Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat Med* 1998;4(8):929-33.
42. Wang JS, Shum-Tim D, Galipeau J, Chedrawy E, Eliopoulos N, Chiu RC. Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty: feasibility and potential clinical advantages. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000;120(5):999-1005.
43. Wang JS, Shum-Tim D, Chedrawy E, Chiu RC. The coronary delivery of marrow stromal cells for myocardial regeneration: pathophysiologic and therapeutic implications. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001;122(4):699-705.
44. Tomita S, Li RK, Weisel RD, et al. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation* 1999;100(19 Suppl):II247-56.
45. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice. *Ann N Y Acad Sci* 2001;938:221-9; discussion 9-30.
46. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001;410(6829):701-5.
47. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;14:14.
48. Goodell MA, Jackson KA, Majka SM, et al. Stem cell plasticity in muscle and bone marrow. *Ann N Y Acad Sci* 2001;938:208-18; discussion 18-20.
49. Jackson KA, Majka SM, Wang H, et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 2001;107(11):1395-402.

50. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* 2001;7(4):430-6.
51. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997;275(5302):964-7.
52. Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 2002;105(1):93-8.
53. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, et al. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 1999;5(4):434-8.
54. Shi Q, Rafii S, Wu MH, et al. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* 1998;92(2):362-7.
55. Dimmeler S, Zeiher AM, Schneider MD. Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair. *J Clin Invest* 2005;115(3):572-83.
56. Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, et al. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest* 2001;108(3):407-14.
57. Nir SG, David R, Zaruba M, Franz WM, Itskovitz-Eldor J. Human embryonic stem cells for cardiovascular repair. *Cardiovasc Res* 2003;58(2):313-23.
58. Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol* 2000;18(4):399-404.
59. Wakitani S, Takaoka K, Hattori T, et al. Embryonic stem cells injected into the mouse knee joint form teratomas and subsequently destroy the joint. *Rheumatology (Oxford)* 2003;Jan;42(1):162-5.
60. Zhang YM, Hartzell C, Narlow M, Dudley SC, Jr. Stem cell-derived cardiomyocytes demonstrate arrhythmic potential. *Circulation* 2002;106(10):1294-9.
61. Drukker M, Katchman H, Katz G, et al. Human embryonic stem cells and their differentiated derivatives are less susceptible to immune rejection than adult cells. *Stem Cells* 2006;24(2):221-9.

62. Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med* 1996;183(4):1797-806.
63. Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res* 2004;95(1):9-20.
64. Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol* 2002;30(8):896-904.
65. Kogler G, Sensken S, Airey JA, et al. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med* 2004;200(2):123-35.
66. Murry CE, Wiseman RW, Schwartz SM, Hauschka SD. Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis. *J Clin Invest* 1996;98(11):2512-23.
67. Hutcheson KA, Atkins BZ, Hueman MT, Hopkins MB, Glower DD, Taylor DA. Comparison of benefits on myocardial performance of cellular cardiomyoplasty with skeletal myoblasts and fibroblasts. *Cell Transplant* 2000;9(3):359-68.
68. Messina E, De Angelis L, Frati G, et al. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res* 2004;95(9):911-21 Epub 2004 Oct 7.
69. Tateishi K, Takahashi T, Oh H. Single Cardiac Stem Cells from Adult Mammalian Heart Are Pluripotent and Can Regenerate Ischemic Myocardium. *American Heart Association; Scientific Sessions 2005:Abstract 331*.
70. Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, et al. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(21):12313-8 Epub 2003 Oct 6.
71. Laugwitz KL, Moretti A, Lam J, et al. Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature* 2005;433(7026):647-53.
72. Goumans MJ, de Boer TP, Doevendans P. Human Cardiac Progenitor Cells are Able to Differentiate into Cardiomyocytes in Vitro. *American Heart Association; Scientific Sessions 2005:Abstract 337*.
73. van Vliet P, Sluijter JP, Doevendans PA, Goumans MJ. Isolation and expansion of resident cardiac progenitor cells. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2007;5(1):33-43.
74. Menasche P. Skeletal myoblast for cell therapy. *Coron Artery Dis* 2005;16(2):105-10.

75. Engelmann MG, Franz WM. Stem cell therapy after myocardial infarction: ready for clinical application? *Curr Opin Mol Ther* 2006;8(5):396-414.
76. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 2002;106(15):1913-8.
77. Assmus B, Honold J, Schachinger V, et al. Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006;355(12):1222-32.
78. Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, et al. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation* 2003;107(18):2294-302. Epub 003 Apr 21.
79. Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 2004;364(9429):141-8.
80. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 1999;85(3):221-8.
81. Fernandez-Aviles F, San Roman JA, Garcia-Frade J, et al. Experimental and clinical regenerative capability of human bone marrow cells after myocardial infarction. *Circ Res* 2004;95(7):742-8. Epub 2004 Sep 9.
82. Lunde K, Solheim S, Aakhus S, et al. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006;355(12):1199-209.
83. Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, et al. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006;355(12):1210-21.
84. Schachinger V, Assmus B, Britten MB, et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial. *J Am Coll Cardiol* 2004;44(8):1690-9.
85. Britten M, Assmus B, Zeiher M. Preserved Functional Improvement and Evidence for Reverse Left Ventricular Remodelling 2 Years after Intracoronary Progenitor Cell Therapy in Patients with Acute Myocardial Infarction. American Heart Association; Scientific Sessions 2005:Abstract 2985.

86. Janssens S, Dubois C, Bogaert J, et al. Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 2006;367(9505):113-21.
87. Assmus B, Schachinger V, Teupe C, et al. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* 2002;106(24):3009-17.
88. Britten MB, Abolmaali ND, Assmus B, et al. Infarct remodeling after intracoronary progenitor cell treatment in patients with acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): mechanistic insights from serial contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Circulation* 2003;108(18):2212-8. Epub 003 Oct 13.
89. Lunde K, Solheim S, Aakhus S, Arnesen H, Abdelnoor M, Forfang K. Autologous stem cell transplantation in acute myocardial infarction: The ASTAMI randomized controlled trial. Intracoronary transplantation of autologous mononuclear bone marrow cells, study design and safety aspects. *Scand Cardiovasc J* 2005;39(3):150-8.
90. Schächinger V. REPAIR-AMI: Reinfusion of Enriched Progenitor Cells and Infarct Remodelling in Acute Myocardial Infarction. *Medscape* 2005.
91. Wollert KC, Drexler H. Clinical applications of stem cells for the heart. *Circ Res* 2005;96(2):151-63.
92. Asahara T, Takahashi T, Masuda H, et al. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Embo J* 1999;18(14):3964-72.
93. Vandervelde S, van Luyn MJ, Tio RA, Harmsen MC. Signaling factors in stem cell-mediated repair of infarcted myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 2005;39(2):363-76.
94. Heeschen C, Aicher A, Lehmann R, et al. Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood* 2003;102(4):1340-6.
95. Hattori K, Heissig B, Tashiro K, et al. Plasma elevation of stromal cell-derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood* 2001;97(11):3354-60.
96. Levesque JP, Hendy J, Takamatsu Y, Simmons PJ, Bendall LJ. Disruption of the CXCR4/CXCL12 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by G-CSF or cyclophosphamide. *J Clin Invest* 2003;111(2):187-96.

97. Semerad CL, Christopher MJ, Liu F, et al. G-CSF potently inhibits osteoblast activity and CXCL12 mRNA expression in the bone marrow. *Blood* 2005;106(9):3020-7.
98. Iwakura A, Luedemann C, Shastry S, et al. Estrogen-mediated, endothelial nitric oxide synthase-dependent mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells contributes to reendothelialization after arterial injury. *Circulation* 2003;108(25):3115-21.
99. Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, et al. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. *J Clin Invest* 2001;108(3):391-7.
100. Winkler IG, Levesque JP. Mechanisms of hematopoietic stem cell mobilization: when innate immunity assails the cells that make blood and bone. *Exp Hematol* 2006;34(8):996-1009.
101. Laufs U, Werner N, Link A, et al. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation* 2004;109(2):220-6.
102. Zhang Y, Adachi Y, Suzuki Y, et al. Synergistic effects of granulocyte-colony stimulating factor and macrophage-colony stimulating factor on recovery of donor hematopoietic cells in allogeneic bone marrow transplantation. *Oncol Rep* 2006;16(2):367-71.
103. Ostronoff M, Ostronoff F, Souto Maior P, et al. Pilot study of allogeneic G-CSF-stimulated bone marrow transplantation: harvest, engraftment, and graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006;12(7):729-33.
104. Basu S, Dunn A, Ward A. G-CSF: function and modes of action (Review). *Int J Mol Med* 2002;10(1):3-10.
105. Wojakowski W, Tendera M, Michalowska A, et al. Mobilization of CD34/CXCR4+, CD34/CD117+, c-met+ stem cells, and mononuclear cells expressing early cardiac, muscle, and endothelial markers into peripheral blood in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2004;110(20):3213-20.
106. Kawakami M, Tsutsumi H, Kumakawa T, et al. Levels of serum granulocyte colony-stimulating factor in patients with infections. *Blood* 1990;76(10):1962-4.
107. Nagata S, Fukunaga R. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Prog Growth Factor Res* 1991;3(2):131-41.

108. Hermans MH, van de Geijn GJ, Antonissen C, et al. Signaling mechanisms coupled to tyrosines in the granulocyte colony-stimulating factor receptor orchestrate G-CSF-induced expansion of myeloid progenitor cells. *Blood* 2003;101(7):2584-90.
109. Roberts AW. G-CSF: a key regulator of neutrophil production, but that's not all! *Growth Factors* 2005;23(1):33-41.
110. Pelus LM, Horowitz D, Cooper SC, King AG. Peripheral blood stem cell mobilization. A role for CXC chemokines. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002;43(3):257-75.
111. Kawabata K, Ujikawa M, Egawa T, et al. A cell-autonomous requirement for CXCR4 in long-term lymphoid and myeloid reconstitution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(10):5663-7.
112. Petit I, Szyper-Kravitz M, Nagler A, et al. G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat Immunol* 2002;3(7):687-94.
113. Christopherson KW, 2nd, Cooper S, Broxmeyer HE. Cell surface peptidase CD26/DPPIV mediates G-CSF mobilization of mouse progenitor cells. *Blood* 2003;101(12):4680-6.
114. Christopherson KW, Cooper S, Hangoc G, Broxmeyer HE. CD26 is essential for normal G-CSF-induced progenitor cell mobilization as determined by CD26<sup>-/-</sup> mice. *Exp Hematol* 2003;31(11):1126-34.
115. Christopherson KW, 2nd, Uralil SE, Porecha NK, Zabriskie RC, Kidd SM, Ramin SM. G-CSF- and GM-CSF-induced upregulation of CD26 peptidase downregulates the functional chemotactic response of CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> human cord blood hematopoietic cells. *Exp Hematol* 2006;34(8):1060-8.
116. Pruijt JF, Fibbe WE, Laterveer L, et al. Prevention of interleukin-8-induced mobilization of hematopoietic progenitor cells in rhesus monkeys by inhibitory antibodies against the metalloproteinase gelatinase B (MMP-9). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(19):10863-8.
117. Fibbe WE, Pruijt JF, van Kooyk Y, Figdor CG, Opdenakker G, Willemze R. The role of metalloproteinases and adhesion molecules in interleukin-8-induced stem-cell mobilization. *Semin Hematol* 2000;37(1 Suppl 2):19-24.

118. Robinson SN, Pisarev VM, Chavez JM, Singh RK, Talmadge JE. Use of matrix metalloproteinase (MMP)-9 knockout mice demonstrates that MMP-9 activity is not absolutely required for G-CSF or Flt-3 ligand-induced hematopoietic progenitor cell mobilization or engraftment. *Stem Cells* 2003;21(4):417-27.
119. Pelus LM, Bian H, King AG, Fukuda S. Neutrophil-derived MMP-9 mediates synergistic mobilization of hematopoietic stem and progenitor cells by the combination of G-CSF and the chemokines GRObeta/CXCL2 and GRObetaT/CXCL2delta4. *Blood* 2004;103(1):110-9.
120. Heissig B, Hattori K, Dias S, et al. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell* 2002;109(5):625-37.
121. Fruehauf S, Seeger T. New strategies for mobilization of hematopoietic stem cells. *Future Oncol* 2005;1(3):375-83.
122. Kong D, Melo LG, Gneccchi M, et al. Cytokine-induced mobilization of circulating endothelial progenitor cells enhances repair of injured arteries. *Circulation* 2004;110(14):2039-46.
123. Iwanaga K, Takano H, Ohtsuka M, et al. Effects of G-CSF on cardiac remodeling after acute myocardial infarction in swine. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;325(4):1353-9.
124. Ohtsuka M, Takano H, Zou Y, et al. Cytokine therapy prevents left ventricular remodeling and dysfunction after myocardial infarction through neovascularization. *Faseb J* 2004;18(7):851-3.
125. Harada M, Qin Y, Takano H, et al. G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes. *Nat Med* 2005;11(3):305-11.
126. Minatoguchi S, Takemura G, Chen XH, et al. Acceleration of the healing process and myocardial regeneration may be important as a mechanism of improvement of cardiac function and remodeling by postinfarction granulocyte colony-stimulating factor treatment. *Circulation* 2004;109(21):2572-80.
127. Kuhlmann MT, Kirchhof P, Klocke R, et al. G-CSF/SCF reduces inducible arrhythmias in the infarcted heart potentially via increased connexin43 expression and arteriogenesis. *J Exp Med* 2006;203(1):87-97.

128. Deindl E, Zaruba MM, Brunner S, et al. G-CSF administration after myocardial infarction in mice attenuates late ischemic cardiomyopathy by enhanced arteriogenesis. *Faseb J* 2006;20(7):956-8.
129. Kolossov E, Bostani T, Roell W, et al. Engraftment of engineered ES cell-derived cardiomyocytes but not BM cells restores contractile function to the infarcted myocardium. *J Exp Med* 2006;203(10):2315-27.
130. Kang HJ, Kim HS, Zhang SY, et al. Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial. *Lancet* 2004;363(9411):751-6.
131. Kang HJ, Lee HY, Na SH, et al. Differential effect of intracoronary infusion of mobilized peripheral blood stem cells by granulocyte colony-stimulating factor on left ventricular function and remodeling in patients with acute myocardial infarction versus old myocardial infarction: the MAGIC Cell-3-DES randomized, controlled trial. *Circulation* 2006;114(1 Suppl):I145-51.
132. Kuethe F, Figulla HR, Herzau M, et al. Treatment with granulocyte colony-stimulating factor for mobilization of bone marrow cells in patients with acute myocardial infarction. *Am Heart J* 2005;150(1):115.
133. Valgimigli M, Rigolin GM, Cittanti C, et al. Use of granulocyte-colony stimulating factor during acute myocardial infarction to enhance bone marrow stem cell mobilization in humans: clinical and angiographic safety profile. *Eur Heart J* 2005;26(18):1838-45.
134. Ince H, Petzsch M, Kleine HD, et al. Prevention of left ventricular remodeling with granulocyte colony-stimulating factor after acute myocardial infarction: final 1-year results of the Front-Integrated Revascularization and Stem Cell Liberation in Evolving Acute Myocardial Infarction by Granulocyte Colony-Stimulating Factor (FIRSTLINE-AMI) Trial. *Circulation* 2005;112(9 Suppl):I73-80.
135. Ince H, Petzsch M, Kleine HD, et al. Preservation from left ventricular remodeling by front-integrated revascularization and stem cell liberation in evolving acute myocardial infarction by use of granulocyte-colony-stimulating factor (FIRSTLINE-AMI). *Circulation* 2005;112(20):3097-106.

136. Ripa RS, Jorgensen E, Wang Y, et al. Stem cell mobilization induced by subcutaneous granulocyte-colony stimulating factor to improve cardiac regeneration after acute ST-elevation myocardial infarction: result of the double-blind, randomized, placebo-controlled stem cells in myocardial infarction (STEMMI) trial. *Circulation* 2006;113(16):1983-92.
137. Engelmann MG, Theiss HD, Hennig-Theiss C, 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. *J Am Coll Cardiol* 2006;48(8):1712-21.
138. Zohnhofer D, Ott I, Mehilli J, et al. Stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor in patients with acute myocardial infarction: a randomized controlled trial. *Jama* 2006;295(9):1003-10.
139. Yeh ET, Zhang S, Wu HD, Korbling M, Willerson JT, Estrov Z. Transdifferentiation of human peripheral blood CD34+-enriched cell population into cardiomyocytes, endothelial cells, and smooth muscle cells in vivo. *Circulation* 2003;108(17):2070-3.
140. Kawada H, Fujita J, Kinjo K, et al. Nonhematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. *Blood* 2004;104(12):3581-7.
141. Kajstura J, Rota M, Whang B, et al. Bone marrow cells differentiate in cardiac cell lineages after infarction independently of cell fusion. *Circ Res* 2005;96(1):127-37.
142. Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 2004;428(6983):664-8 Epub 2004 Mar 21.
143. Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL, Robbins RC. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* 2004;428(6983):668-73 Epub 2004 Mar 21.
144. Chien KR. Stem cells: lost in translation. *Nature* 2004;428(6983):607-8.
145. Laflamme MA, Murry CE. Regenerating the heart. *Nat Biotechnol* 2005;23(7):845-56.
146. Yoshioka T, Ageyama N, Shibata H, et al. Repair of infarcted myocardium mediated by transplanted bone marrow-derived CD34+ stem cells in a nonhuman primate model. *Stem Cells* 2005;23(3):355-64.

147. Tang YL, Zhao Q, Qin X, et al. Paracrine action enhances the effects of autologous mesenchymal stem cell transplantation on vascular regeneration in rat model of myocardial infarction. *Ann Thorac Surg* 2005;80(1):229-36; discussion 36-7.
148. Gnechi M, He H, Liang OD, et al. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat Med* 2005;11(4):367-8.
149. Fazel S, Cimini M, Chen L, et al. Cardioprotective c-kit<sup>+</sup> cells are from the bone marrow and regulate the myocardial balance of angiogenic cytokines. *J Clin Invest* 2006;116(7):1865-77.
150. Abbott JD, Huang Y, Liu D, Hickey R, Krause DS, Giordano FJ. Stromal cell-derived factor-1alpha plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury. *Circulation* 2004;110(21):3300-5.
151. Mannstadt M, Juppner H, Gardella TJ. Receptors for PTH and PTHrP: their biological importance and functional properties. *Am J Physiol* 1999;277(5 Pt 2):F665-75.
152. Habener JF, Rosenblatt M, Kemper B, Kronenberg HM, Rich A, Potts JT, Jr. Pre-proparathyroid hormone; amino acid sequence, chemical synthesis, and some biological studies of the precursor region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978;75(6):2616-20.
153. Chu LL, MacGregor RR, Liu PI, Hamilton JW, Cohn DV. Biosynthesis of parathyroid hormone and parathyroid hormone by human parathyroid glands. *J Clin Invest* 1973;52(12):3089-94.
154. Stanislaus D, Devanarayan V, Hock JM. In vivo comparison of activated protein-1 gene activation in response to human parathyroid hormone (hPTH)(1-34) and hPTH(1-84) in the distal femur metaphyses of young mice. *Bone* 2000;27(6):819-26.
155. Bringhurst FR, Stern AM, Yotts M, Mizrahi N, Segre GV, Potts JT, Jr. Peripheral metabolism of PTH: fate of biologically active amino terminus in vivo. *Am J Physiol* 1988;255(6 Pt 1):E886-93.
156. Habener JF, Rosenblatt M, Potts JT, Jr. Parathyroid hormone: biochemical aspects of biosynthesis, secretion, action, and metabolism. *Physiol Rev* 1984;64(3):985-1053.
157. MacGregor RR, Jilka RL, Hamilton JW. Formation and secretion of fragments of parathormone. Identification of cleavage sites. *J Biol Chem* 1986;261(4):1929-34.

158. Dobning H. Parathormon schematisch. *Journal für Mineralstoffwechsel* 2004;11 (Sonderheft):4-11.
159. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(7):3597-602.
160. Brown EM, Gamba G, Riccardi D, et al. Cloning and characterization of an extracellular Ca(2+)-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* 1993;366(6455):575-80.
161. Naveh-Many T, Friedlaender MM, Mayer H, Silver J. Calcium regulates parathyroid hormone messenger ribonucleic acid (mRNA), but not calcitonin mRNA in vivo in the rat. Dominant role of 1,25-dihydroxyvitamin D. *Endocrinology* 1989;125(1):275-80.
162. Murray TM, Rao LG, Divieti P, Bringham FR. Parathyroid hormone secretion and action: evidence for discrete receptors for the carboxyl-terminal region and related biological actions of carboxyl-terminal ligands. *Endocr Rev* 2005;26(1):78-113.
163. Schluter KD. PTH and PTHrP: Similar Structures but Different Functions. *News Physiol Sci* 1999;14:243-9.
164. Seeliger S, Hausberg M, Eue I, Usdin T, Rahn KH, Kosch M. The parathyroid hormone-2 receptor is expressed on human leukocytes and down-regulated in hyperparathyroidism. *Clin Nephrol* 2003;59(6):429-35.
165. Vilardaga JP, Lin I, Nissenson RA. Analysis of parathyroid hormone (PTH)/secretin receptor chimeras differentiates the role of functional domains in the pth/ pth-related peptide (PTHrP) receptor on hormone binding and receptor activation. *Mol Endocrinol* 2001;15(7):1186-99.
166. Taichman RS, Emerson SG. The role of osteoblasts in the hematopoietic microenvironment. *Stem Cells* 1998;16(1):7-15.
167. Kiger AA, Jones DL, Schulz C, Rogers MB, Fuller MT. Stem cell self-renewal specified by JAK-STAT activation in response to a support cell cue. *Science* 2001;294(5551):2542-5.
168. Zhang J, Niu C, Ye L, et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 2003;425(6960):836-41.
169. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 2003;425(6960):841-6.

170. Calvi LM. Osteoblastic activation in the hematopoietic stem cell niche. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1068:477-88.
171. Zhu J, Emerson SG. A new bone to pick: osteoblasts and the haematopoietic stem-cell niche. *Bioessays* 2004;26(6):595-9.
172. Mancini SJ, Mantei N, Dumortier A, Suter U, MacDonald HR, Radtke F. Jagged1-dependent Notch signaling is dispensable for hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Blood* 2005;105(6):2340-2.
173. Suzuki T, Chiba S. Notch signaling in hematopoietic stem cells. *Int J Hematol* 2005;82(4):285-94.
174. Weber JM, Forsythe SR, Christianson CA, et al. Parathyroid hormone stimulates expression of the Notch ligand Jagged1 in osteoblastic cells. *Bone* 2006;39(3):485-93.
175. Lafferty FW. Primary hyperparathyroidism. Changing clinical spectrum, prevalence of hypertension, and discriminant analysis of laboratory tests. *Arch Intern Med* 1981;141(13):1761-6.
176. Stefanelli T, Abela C, Frank H, et al. Cardiac abnormalities in patients with primary hyperparathyroidism: implications for follow-up. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82(1):106-12.
177. Heath H, 3rd, Hodgson SF, Kennedy MA. Primary hyperparathyroidism. Incidence, morbidity, and potential economic impact in a community. *N Engl J Med* 1980;302(4):189-93.
178. Hedback G, Tisell LE, Bengtsson BA, Hedman I, Oden A. Premature death in patients operated on for primary hyperparathyroidism. *World J Surg* 1990;14(6):829-35; discussion 36.
179. Wermers RA, Khosla S, Atkinson EJ, et al. Survival after the diagnosis of hyperparathyroidism: a population-based study. *Am J Med* 1998;104(2):115-22.
180. Nilsson IL, Aberg J, Rastad J, Lind L. Left ventricular systolic and diastolic function and exercise testing in primary hyperparathyroidism-effects of parathyroidectomy. *Surgery* 2000;128(6):895-902.
181. Feola M, Gonzales H, Canizaro PC. Vasoactive parathyroid hormone in the treatment of acute ischemic left ventricular failure and the prevention of cardiogenic shock. *Circ Shock* 1985;17(2):163-77.

182. Jansen J, Gres P, Umschlag C, et al. Parathyroid hormone-related peptide improves contractile function of stunned myocardium in rats and pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;284(1):H49-55.
183. Roca-Cusachs A, DiPette DJ, Nickols GA. Regional and systemic hemodynamic effects of parathyroid hormone-related protein: preservation of cardiac function and coronary and renal flow with reduced blood pressure. *J Pharmacol Exp Ther* 1991;256(1):110-8.
184. Pang PK, Yang M, Oguro C, Phillips JG, Yee JA. Hypotensive actions of parathyroid hormone preparations in vertebrates. *Gen Comp Endocrinol* 1980;41(1):135-8.
185. Schluter KD, Piper HM. Cardiovascular actions of parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. *Cardiovasc Res* 1998;37(1):34-41.
186. Qian J, Colbert MC, Witte D, et al. Midgestational lethality in mice lacking the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor is associated with abrupt cardiomyocyte death. *Endocrinology* 2003;144(3):1053-61.
187. Smogorzewski M, Zayed M, Zhang YB, Roe J, Massry SG. Parathyroid hormone increases cytosolic calcium concentration in adult rat cardiac myocytes. *Am J Physiol* 1993;264(6 Pt 2):H1998-2006.
188. Schluter KD, Piper HM. Trophic effects of catecholamines and parathyroid hormone on adult ventricular cardiomyocytes. *Am J Physiol* 1992;263(6 Pt 2):H1739-46.
189. Feola M, Crass MF, 3rd. Parathyroid hormone reduces acute ischemic injury of the myocardium. *Surg Gynecol Obstet* 1986;163(6):523-30.
190. Burtis WJ, Wu T, Bunch C, et al. Identification of a novel 17,000-dalton parathyroid hormone-like adenylate cyclase-stimulating protein from a tumor associated with humoral hypercalcemia of malignancy. *J Biol Chem* 1987;262(15):7151-6.
191. Neer RM, Arnaud CD, Zanchetta JR, et al. Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med* 2001;344(19):1434-41.
192. Cosman F, Nieves J, Woelfert L, et al. Parathyroid hormone added to established hormone therapy: effects on vertebral fracture and maintenance of bone mass after parathyroid hormone withdrawal. *J Bone Miner Res* 2001;16(5):925-31.

193. Black DM, Greenspan SL, Ensrud KE, et al. The effects of parathyroid hormone and alendronate alone or in combination in postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* 2003;349(13):1207-15.
194. Hodsman AB, Bauer DC, Dempster DW, et al. Parathyroid hormone and teriparatide for the treatment of osteoporosis: a review of the evidence and suggested guidelines for its use. *Endocr Rev* 2005;26(5):688-703.
195. Finkelstein JS, Leder BZ, Burnett SA, et al. Effects of teriparatide, alendronate, or both on bone turnover in osteoporotic men. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91(8):2882-7.
196. Michael LH, Entman ML, Hartley CJ, et al. Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model. *Am J Physiol* 1995;269(6 Pt 2):H2147-54.
197. Baan J, Jong TT, Kerkhof PL, et al. Continuous stroke volume and cardiac output from intra-ventricular dimensions obtained with impedance catheter. *Cardiovasc Res* 1981;15(6):328-34.
198. Baan J, van der Velde ET, de Bruin HG, et al. Continuous measurement of left ventricular volume in animals and humans by conductance catheter. *Circulation* 1984;70(5):812-23.
199. Nowakowski RS, Lewin SB, Miller MW. Bromodeoxyuridine immunohistochemical determination of the lengths of the cell cycle and the DNA-synthetic phase for an anatomically defined population. *J Neurocytol* 1989;18(3):311-8.
200. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2000;182(3):311-22.
201. Newman PJ. The biology of PECAM-1. *J Clin Invest* 1997;99(1):3-8.
202. Parums DV, Cordell JL, Micklem K, Heryet AR, Gatter KC, Mason DY. JC70: a new monoclonal antibody that detects vascular endothelium associated antigen on routinely processed tissue sections. *J Clin Pathol* 1990;43(9):752-7.
203. Ismail JA, Poppa V, Kemper LE, et al. Immunohistologic labeling of murine endothelium. *Cardiovasc Pathol* 2003;12(2):82-90.
204. Deindl E, Zaruba MM, Brunner S, et al. G-CSF administration after myocardial infarction (MI) in mice attenuates late ischemic cardiomyopathy by enhanced arteriogenesis. *Faseb J* 2006;in press.
205. Taichman RS, Emerson SG. Human osteoblasts support hematopoiesis through the production of granulocyte colony-stimulating factor. *J Exp Med* 1994;179(5):1677-82.

206. Jung Y, Wang J, Schneider A, et al. Regulation of SDF-1 (CXCL12) production by osteoblasts; a possible mechanism for stem cell homing. *Bone* 2006;38(4):497-508.
207. McClelland P, Onyia JE, Miles RR, et al. Intermittent administration of parathyroid hormone (1-34) stimulates matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) expression in rat long bone. *J Cell Biochem* 1998;70(3):391-401.
208. Schioppa T, Uranchimeg B, Sacconi A, et al. Regulation of the chemokine receptor CXCR4 by hypoxia. *J Exp Med* 2003;198(9):1391-402.
209. Askari AT, Unzek S, Popovic ZB, et al. Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet* 2003;362(9385):697-703.
210. Marie PJ. Role of N-cadherin in bone formation. *J Cell Physiol* 2002;190(3):297-305.
211. Reya T, Duncan AW, Ailles L, et al. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 2003;423(6938):409-14.
212. Philbrick WM, Wysolmerski JJ, Galbraith S, et al. Defining the roles of parathyroid hormone-related protein in normal physiology. *Physiol Rev* 1996;76(1):127-73.
213. Urena P, Kong XF, Abou-Samra AB, et al. Parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor messenger ribonucleic acids are widely distributed in rat tissues. *Endocrinology* 1993;133(2):617-23.
214. Funk JL, Migliati E, Chen G, et al. Parathyroid hormone-related protein induction in focal stroke: a neuroprotective vascular peptide. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003;284(4):R1021-30.
215. Lilleberg J, Nieminen MS, Akkila J, et al. Effects of a new calcium sensitizer, levosimendan, on haemodynamics, coronary blood flow and myocardial substrate utilization early after coronary artery bypass grafting. *Eur Heart J* 1998;19(4):660-8.
216. Follath F, Cleland JG, Just H, et al. Efficacy and safety of intravenous levosimendan compared with dobutamine in severe low-output heart failure (the LIDO study): a randomised double-blind trial. *Lancet* 2002;360(9328):196-202.
217. Muskhelishvili L, Latendresse JR, Kodell RL, Henderson EB. Evaluation of cell proliferation in rat tissues with BrdU, PCNA, Ki-67(MIB-5) immunohistochemistry and in situ hybridization for histone mRNA. *J Histochem Cytochem* 2003;51(12):1681-8.

218. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000;6(4):389-95.
219. Carmeliet P. VEGF gene therapy: stimulating angiogenesis or angioma-genesis? *Nat Med* 2000;6(10):1102-3.
220. Lee RJ, Springer ML, Blanco-Bose WE, Shaw R, Ursell PC, Blau HM. VEGF gene delivery to myocardium: deleterious effects of unregulated expression. *Circulation* 2000;102(8):898-901.
221. Carter WB, Uy K, Ward MD, Hoying JB. Parathyroid-induced angiogenesis is VEGF-dependent. *Surgery* 2000;128(3):458-64.
222. Wang DS, Yamazaki K, Nohtomi K, et al. Increase of vascular endothelial growth factor mRNA expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in human osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res* 1996;11(4):472-9.
223. Akino K, Ohtsuru A, Kanda K, et al. Parathyroid hormone-related peptide is a potent tumor angiogenic factor. *Endocrinology* 2000;141(11):4313-6.
224. Green J, Goldberg R, Maor G. PTH ameliorates acidosis-induced adverse effects in skeletal growth centers: the PTH-IGF-I axis. *Kidney Int* 2003;63(2):487-500.
225. Palmen M, Daemen MJ, Bronsaer R, et al. Cardiac remodeling after myocardial infarction is impaired in IGF-1 deficient mice. *Cardiovasc Res* 2001;50(3):516-24.
226. Li Q, Li B, Wang X, et al. Overexpression of insulin-like growth factor-1 in mice protects from myocyte death after infarction, attenuating ventricular dilation, wall stress, and cardiac hypertrophy. *J Clin Invest* 1997;100(8):1991-9.
227. He Z, Opland DM, Way KJ, et al. Regulation of vascular endothelial growth factor expression and vascularization in the myocardium by insulin receptor and PI3K/Akt pathways in insulin resistance and ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26(4):787-93.
228. Slomiany MG, Rosenzweig SA. Hypoxia-inducible factor-1-dependent and -independent regulation of insulin-like growth factor-1-stimulated vascular endothelial growth factor secretion. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;318(2):666-75.
229. Rubart M, Field LJ. Cardiac regeneration: repopulating the heart. *Annu Rev Physiol* 2006;68:29-49.

230. Urbanek K, Rota M, Cascapera S, et al. Cardiac stem cells possess growth factor-receptor systems that after activation regenerate the infarcted myocardium, improving ventricular function and long-term survival. *Circ Res* 2005;97(7):663-73.
231. Linke A, Muller P, Nurzynska D, et al. Stem cells in the dog heart are self-renewing, clonogenic, and multipotent and regenerate infarcted myocardium, improving cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(25):8966-71.
232. Bartels LA, Clifton GD, Szabo TS. Influence of myocardial ischemia and reperfusion on beta-adrenoceptor subtype expression. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998;31(4):484-7.
233. Almsherqi ZA, McLachlan CS, Slocinska MB, et al. Reduced cardiac output is associated with decreased mitochondrial efficiency in the non-ischemic ventricular wall of the acute myocardial-infarcted dog. *Cell Res* 2006;16(3):297-305.
234. Kluge A, Zimmermann R, Munkel B, et al. Insulin-like growth factor I is involved in inflammation linked angiogenic processes after microembolisation in porcine heart. *Cardiovasc Res* 1995;29(3):407-15.
235. Wang W, Yang ZJ, Ma DC, et al. Induction of collateral artery growth and improvement of post-infarct heart function by hepatocyte growth factor gene transfer. *Acta Pharmacol Sin* 2006;27(5):555-60.
236. Andersen HR, Nielsen TT, Rasmussen K, et al. A comparison of coronary angioplasty with fibrinolytic therapy in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2003;349(8):733-42.
237. Bonnefoy E, Lapostolle F, Leizorovicz A, et al. Primary angioplasty versus prehospital fibrinolysis in acute myocardial infarction: a randomised study. *Lancet* 2002;360(9336):825-9.
238. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *Bmj* 2002;324(7329):71-86.
239. Wienbergen H, Gitt AK, Senges J. [Actual clinical practice of guideline-recommended therapy of acute ST elevation myocardial infarction]. *Herz* 2005;30(8):700-3.

## Abkürzungsverzeichnis

ACI	Arteria carotis interna
AS	Aminosäure
BMC	unfraktioniertes Knochenmark
BrdU	Bromodeoxyuridin
CSC	ortsständige kardiale Stammzelle
EF	Ejektionsfraktion
EPC	endotheliale Progenitorzelle
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESPVR	endsystolische Druck-Volumen-Beziehung
ES-Zelle	Embryonale Stammzelle
FACS	fluorescence activated cell sorting
FGF	Fibroblast Growth Factor
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
G-CSF	Granulocyte-colony stimulating factor
GM-CSF	Granulocyte macrophage-colony stimulating factor
HIF-1	Hypoxie induzierbarer Faktor 1
HZV	Herzzeitvolumen
HPT	Hyperparathyreoidismus
HSC	Hämatopoetische Stammzelle
HWZ	Halbwertszeit
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IGF-1	Insulin like Growth Factor 1
KG	Körpergewicht
KHK	Koronare Herzkrankheit
LAD	Left Anterior Descendens
LDL	Low-Density-Lipoproteine
LVA	Linksventrikuläre Angiographie
LVP	Linksventrikulärer Druck
MAPC	Multipotente adulte Progenitorzelle
MI	Myokardinfarkt
MMP-9	Matrix-Metalloproteinase-9
MRT	Magnetresonanztomographie
MSC	Mesenchymale Stammzelle
PCI	Perkutane Koronarintervention
PE	Phycoerythin
PECAM-1	Platelet endothelial cell adhesion molecule 1
PerCP	Peridinin Chlorophyll-A-Protein
PTCA	Perkutane transluminale coronare Angioplastie
PTH	Parathormon
PTHrP	Parathormone-related Peptide
SCF	Stem cell factor
SDF-1	Stromal Cell Derived Factor 1
SPECT	Einzel-Photon-Emissions-Computertomographie
USSC	Umbilikale somatische Stammzelle
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

## Danksagungen

Die vorliegende Arbeit wurde in der Medizinischen Klinik I des Klinikums Großhadern (Direktor: Prof. Dr. med. G. Steinbeck) in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. W. M. Franz durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. med. W. M. Franz danke ich für die Aufnahme in sein Team, die Überlassung des Themas der vorliegenden Arbeit und für das in mich gesetzte Vertrauen. Ihm verdanke ich die wesentlichen Grundlagen wissenschaftlichen Denken und Handelns, die ich in seiner Arbeitsgruppe erlernen durfte. Seine Begeisterungsfähigkeit und sein persönliches Engagement verhalfen stets zu neuer Motivation und Freude am experimentellen Arbeiten. Für seine fortwährende Unterstützung danke ich ihm sehr herzlich.

Herrn Dr. med. Marc Michael Zaruba verdanke ich die gute Zusammenarbeit und Betreuung in der Arbeitsgruppe. Durch seinen persönlichen Einsatz bei der praktischen Durchführung der Versuche und durch seine fachlichen Ratschläge hat er wesentlich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Bei Frau PD Dr. Elisabeth Deindl bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit, die zahlreichen Ideen und die hilfreichen Anregungen. Herrn Prof. Dr. med. J. Müller-Höcker danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der histologischen Arbeiten, sowie Frau Saskia Bangert für die labortechnischen Arbeiten.

Bei Herrn Dr. med. Stefan Brunner und Herrn Dr. med. Michael Gröbner möchte ich mich für die fachlichen Ratschläge und die Hilfe bei der Korrektur der Arbeit bedanken.

Für die stets konstruktive und außergewöhnlich kollegiale Zusammenarbeit bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe.

Nicht zuletzt danke ich ganz besonders meinen Eltern, Geschwistern und meiner Freundin Annett Walker für die fortwährende Unterstützung während der Zeit des Studiums und der Durchführung der Promotion.

# Lebenslauf

## Persönliche Angaben

Name: Bruno Huber  
Geburtstag und -ort: 28.12.1978 in München

## Schulische Ausbildung

1989-1998 Wittelsbacher-Gymnasium, München  
06/1998 Abitur

## Ersatzdienst

08/1998-09/1999 Arbeiter- Samariter-Bund-München, Bereich Rettungsdienst

## Berufsausbildung

09/1999-05/2000 Besuch der Berufsfachschule für Rettungsassistenten in Dietmannsried  
seit 03/2004 Erlaubnis zum Führen der Berufsbezeichnung „Rettungsassistent“

## Universitäre Ausbildung

10/2000- 9/2002 Vorklinik an der LMU München  
09/2002 Ärztliche Vorprüfung  
09/2003 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
09/2005 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
12/2006 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Gesamtnote 1,8)

## Publikationen

Deindl E, Zaruba MM, Brunner S, **Huber B**, Mehl U, Assmann G, Hofer IE, Mueller- Hoecker J and Franz WM (2006). „G-CSF administration after myocardial infarction in mice attenuates late ischemic cardiomyopathy by enhanced arteriogenesis.“ FASEB J. 2006 May;20(7):956-8.