

Aus dem  
Institut für Tierpathologie des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

und dem  
Berlin-Brandenburger Centrum für Regenerative Therapien (BCRT) -  
Charité Universitätsmedizin Berlin

**Neuartige Mobilisierungsstrategien für die myokardiale  
Regeneration nach akutem Herzinfarkt**

**Inaugural-Dissertation**  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin  
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Annalena Krost**  
Tierärztin aus Wiesbaden

Berlin 2015  
Journal-Nr.: 3750

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Achim Gruber  
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Dietlind Zohlnhöfer-Momm  
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Gehlen

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

mice, animal models, myocardial infarction, fibrosis, stem cells, mobilization,  
angiogenesis, ventricular remodeling (MeSH)

Tag der Promotion: 20.11.2015

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-672-2

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2015**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D 188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2015

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

[verlag@menschundbuch.de](mailto:verlag@menschundbuch.de) – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

*Meiner Familie und meinen Freunden in Liebe gewidmet*

„Im Herzen eines Menschen ruht der Anfang und das Ende aller Dinge.“

(Lew Nikolajewitsch Graf Tolstoi)



# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	IX-XIII
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Literaturübersicht .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Myokardinfarkt.....</b>	<b>3</b>
2.1.1 Epidemiologie .....	3
2.1.2 Pathophysiologie.....	4
2.1.3 Remodeling .....	6
2.1.4 Therapieverfahren.....	6
<b>2.2 Stammzelltherapie nach Myokardinfarkt .....</b>	<b>7</b>
2.2.1 Stammzellen .....	7
2.2.2 Hämatopoetische Stammzellen .....	8
2.2.2.1 Die endogene Mobilisierung der hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen .....	9
2.2.3 Endotheliale Progenitorzellen .....	10
2.2.3.1 Aufgaben der endothelialen Progenitorzellen .....	11
2.2.3.2 Mobilisierung und Homing endothelialer Progenitorzellen .....	13
2.2.4 Stammzellmobilisierung als Therapieoption für die kardiale Regeneration .....	15
2.2.5. Wirkstoffe zur Stammzellmobilisierung .....	15
2.2.5.1 G-CSF .....	15
2.2.5.1.1 Klinische Studien mit G-CSF.....	18
2.2.5.2 AMD3100 .....	21
2.2.5.3 VEGF .....	23
<b>3 Zentrale Fragestellung, die der Arbeit zugrunde liegt .....</b>	<b>28</b>
<b>4 Material und Methoden .....</b>	<b>30</b>
<b>4.1 Versuchstiere .....</b>	<b>30</b>
4.1.1 Tierhaltung .....	30
<b>4.2 Materialien.....</b>	<b>31</b>
4.2.1 Wirkstoffe .....	31
4.2.2 Pharmaka.....	31
4.2.3 Operationszubehör .....	31

4.2.4	FACS-Antikörper .....	32
4.2.5	Immunfluoreszenz-Antikörper.....	33
4.2.6	Chemikalien und Lösungen.....	33
4.2.7	Zusammensetzung verwendeter Pufferlösungen .....	34
4.2.8	TTC-Färbung .....	35
4.2.9	Verbrauchsmaterialien.....	35
4.2.10	Geräte.....	35
4.2.11	Software .....	36
<b>4.3</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>37</b>
4.3.1	Versuchsaufbau .....	37
4.3.1.1	Versuchsgruppen und Versuchsplanung.....	38
4.3.2	Detaillierte Beschreibung des Myokardinfarktmodells .....	40
4.3.2.1	Vorbereitung, Anästhesie und Analgesie .....	40
4.3.2.2	Myokardinfarktmodell.....	41
4.3.3	Blutentnahme.....	42
4.3.4	Prinzip der Durchflusszytometrie .....	42
4.3.4.1	Probenaufbereitung für die FACS-Analyse.....	44
4.3.5	Hämodynamik .....	46
4.3.5.1	Das Druck-Volumen-Diagramm .....	46
4.3.5.2	Prinzip des Leitfähigkeits-Katheters .....	47
4.3.5.3	Parallele Leitfähigkeit.....	47
4.3.5.4	Operationsmethode .....	48
4.3.5.5	Aufzeichnung der Messwerte .....	48
4.3.5.6	Gemessene Parameter.....	49
4.3.5.7	Werte der systolischen linksventrikulären Funktion .....	50
4.3.5.8	Werte der diastolischen linksventrikulären Funktion.....	51
4.3.6	Euthanasie und Organentnahme .....	51
4.3.7	Histologische Methoden.....	52
4.3.7.1	Herstellung von Paraffinschnitten.....	52
4.3.7.2	Histologische Färbungen zur Identifizierung des Infarktgebietes.....	52
4.3.7.2.1	Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung .....	53
4.3.7.2.2	Masson-Trichrom-Färbung.....	54
4.3.7.3	Bestimmung der Gefäßdicke mithilfe der Immunfluoreszenzfärbung.....	55
4.3.7.3.1	Lokalisierung der CD31 <sup>+</sup> -Kapillaren im Herzmuskelgewebe .....	55
4.3.7.3.2	Histologische Auswertung und Erstellung der Fotos.....	56
4.3.8	Bestimmung der Infarktgröße .....	57
4.3.9	Statistische Auswertung.....	58

<b>5</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>59</b>
<b>5.1</b>	<b>FACS-Analyse.....</b>	<b>59</b>
5.1.1	Mobilisierung von hämatopoetischen und endothelialen Vorläuferzellen .....	59
5.1.1.1	Mobilisierung von Flk-1 <sup>+</sup> /Sca-1 <sup>+</sup> -Zellen .....	59
5.1.1.2	Mobilisierung von c-Kit <sup>+</sup> /Sca-1 <sup>+</sup> -Zellen .....	61
<b>5.2</b>	<b>Histologische Untersuchung der Herzen.....</b>	<b>62</b>
5.2.1	Identifizierung von CD31 <sup>+</sup> -Kapillaren im kardialen Gewebe mittels Immunfluoreszenzfärbung.....	62
5.2.1.1	Neovaskularisation in der „Borderzone“ und im angrenzenden vitalen Gewebe .....	63
5.2.1.2	Ausbildung von abnormen vaskulären Strukturen.....	67
5.2.1.3	Morphometrische Analyse der Gefäße .....	68
<b>5.3</b>	<b>Infarktgrößenbestimmung.....</b>	<b>71</b>
5.3.1	Makroskopische Infarktgrößenmessung anhand der TTC-Färbung .....	71
5.3.2	Bestimmung der linksventrikulären Fibrose .....	73
<b>5.4</b>	<b>Überlebenszeitanalyse.....</b>	<b>74</b>
<b>5.5</b>	<b>Körper- und Herzgewichte.....</b>	<b>78</b>
<b>5.6</b>	<b>Herzbeutelentzündungen .....</b>	<b>78</b>
<b>5.7</b>	<b>Hämodynamik.....</b>	<b>79</b>
5.7.1	Systolische und diastolische Parameter .....	80
5.7.1.1	Ejektionsfraktion.....	83
5.7.1.2	Schlagarbeit .....	85
5.7.1.3	Linksventrikuläre Druckerhöhungsgeschwindigkeit.....	88
5.7.1.4	Linksventrikuläre Druckabfallgeschwindigkeit.....	88
5.7.1.5	Endsystolisches und enddiastolisches Volumen .....	90
<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>92</b>
<b>6.1</b>	<b>VEGF/AMD3100 führt zu einer verstärkten Mobilisierung von EPC in das periphere Blut.....</b>	<b>94</b>
<b>6.2</b>	<b>VEGF/AMD3100 verbessert die Neovaskularisation im infarzierten Myokard und in der angrenzenden „Borderzone“ .....</b>	<b>98</b>
<b>6.3</b>	<b>VEGF/AMD3100 fördert die kardiale Regeneration nach Myokardinfarkt und verbessert die Pumpfunktion .....</b>	<b>102</b>

6.4 Die Applikation von VEGF/AMD3100 führt zu einer geringeren Infarktgröße .....	103
6.5 VEGF/AMD3100-Behandlung senkt die Mortalität nach akutem Myokardinfarkt.....	103
6.6 Die G-CSF- und G-CSF/AMD3100-Behandlung führen zu einer erhöhten Inzidenz von Perikarditiden .....	105
6.7 Limitationen der Arbeit.....	106
7 Zusammenfassung.....	108
8 Summary .....	110
9 Tabellenverzeichnis .....	112
10 Abbildungsverzeichnis .....	113
11 Literaturverzeichnis .....	115
12 Publikationsverzeichnis.....	131
13 Danksagung.....	132
14 Selbstständigkeitserklärung .....	133

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	<b>Abbildung</b>
ACE	Angiotensin konvertierendes Enzym (engl. <i>Angiotensin Converting Enzyme</i> )
AK	<b>Antikörper</b>
Akt	<b>Aktiviert</b> e Proteinkinase B, Serin/Threonin Kinase
ALCOS	<i>Acute Low Cardiac Output Syndrome</i>
AMD3100	Plerixafor, JM3100, octahydrochloride hydrate
AMI	<b>akuter Myokardinfarkt</b>
Ang	<b>Angiopoetin</b>
APC	<b>Allophycocyanin</b>
BM	Knochenmark (engl. <i>Bone Marrow</i> )
bpm	Schläge pro Minute (engl. <i>beats per minute</i> )
CD	Differenzierungsmarker an Zelloberflächen (engl. <i>Cluster of Differentiation</i> )
CHD	koronare Herzkrankheit (engl. <i>Coronary Heart Disease</i> )
CHF	kongestive Herzinsuffizienz (engl. <i>Congestive Heart Failure</i> )
c-Kit	SCF-Rezeptor, CD117
CO	Herzzeitvolumen (engl. <i>Cardiac Output</i> )
CXCL12	CXC-Motiv-Chemokin 12, SDF-1 $\alpha$
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
d	Tag (engl. <i>day</i> )
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dP/dt <sub>max</sub>	linksventrikuläre Druckerhöhungsgeschwindigkeit
dP/dt <sub>min</sub>	linksventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit
DPPIV	<b>Dipeptidylpeptidase 4</b> , CD26
EDV	<b>enddiastolisches Volumen</b>
EF	Ejektionsfraktion, Auswurffraktion (engl. <i>Ejection Fraction</i> )
engl.	<b>englisch</b> , aus dem Englischen
eNOS	<b>endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase</b>
EPC	endotheliale Progenitorzellen (engl. <i>Endothelial Progenitor Cell</i> )
EPO	<b>Erythropoetin</b>
ES	<b>embryonale Stammzelle</b>
ESV	<b>endsystolisches Volumen</b>
et al.	und andere (lateinisch <i>et alii</i> , Maskulinum; <i>et aliae</i> , Femininum; <i>et alia</i> , Neutrum)

EtOH	<b>E</b> thanol
FACS	Durchflusszytometrie (engl. <i><b>F</b>luorescence-<b>A</b>ctivated <b>C</b>ell <b>S</b>orting</i> )
FBS	fetales Kälberserum (engl. <i><b>F</b>etal <b>B</b>ovine <b>S</b>erum</i> )
FSC	Vorwärtsstreulicht (engl. <i><b>F</b>orward <b>S</b>catter</i> )
FELASA	<i><b>F</b>ederation of <b>E</b>uropean <b>L</b>aboratory <b>A</b>nimal <b>S</b>cience <b>A</b>ssociation</i>
FGF	Fibroblastenwachstumsfaktor (engl. <i><b>F</b>ibroblast <b>G</b>rowth <b>F</b>actor</i> )
FIRSTLINE-AMI	<i><b>F</b>ront-<b>I</b>ntegrated <b>R</b>evascularization and <b>S</b>tem cell liberation <b>I</b>n <b>E</b>volving <b>A</b>cute <b>M</b>yocardial <b>I</b>nfarction by <b>g</b>ranulocyte colony-stimulating factor trial (Ince, Petzsch et al. 2005; Ince, Petzsch et al. 2005)</i>
FITC	<b>F</b> luoresceinisothiocyant
Flk-1	fetale Leberkinase, KDR, VEGF Rezeptor-2 (engl. <i><b>F</b>etal-<b>l</b>iver-<b>k</b>inase-1</i> )
Flt-1	VEGF Rezeptor-1 (engl. <i><b>F</b>MS-like tyrosin <b>K</b>inase-1</i> )
G-CSF	<i><b>G</b>ranulocyte-<b>C</b>olony <b>S</b>timulating <b>F</b>actor</i>
G-CSFR	<i><b>G</b>ranulocyte-<b>C</b>olony <b>S</b>timulating <b>F</b>actor <b>R</b>eceptor</i>
GM-CSF	<i><b>G</b>ranulocyte <b>M</b>acrophage-<b>C</b>olony <b>S</b>timulating <b>F</b>actor</i>
h	Stunde (engl. <i><b>h</b>our</i> )
HE-Färbung	<b>H</b> ämatoxylin/ <b>E</b> osin-Färbung
HF	<b>H</b> erzfrequenz
HIF	<b>H</b> ypoxie-induzierter <b>F</b> aktor (engl. <i><b>H</b>ypoxia <b>I</b>nducible <b>F</b>actor</i> )
HMG	<b>3-H</b> ydroxy- <b>3-M</b> ethylglutaryl
HPF	Hauptgesichtsfeld (engl. <i><b>H</b>igh <b>P</b>ower <b>F</b>ield</i> )
HSC	hämatopoetische Stammzellen (engl. <i><b>H</b>aematopoietic <b>S</b>tem <b>C</b>ells</i> )
HSPC	hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen (engl. <i><b>H</b>aematopoietic <b>S</b>tem and <b>P</b>rogenitor <b>C</b>ells</i> )
HZV	<b>H</b> erzeitvolumen
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	<b>d</b> estilliertes Wasser
i.c.	intracoronar, intrakoronar
ICAM-1	interzelluläres Adhäsionsmolekül (engl. <i><b>I</b>ntercellular <b>A</b>dhesion <b>M</b>olecule</i> )
IF	<b>I</b> mmunfluoreszenz
IL	<b>I</b> nterleukin
Iso	<b>I</b> sotyp

kDA	<b>Kilodalton</b>
KDR	VEGF-Rezeptor 2 (engl. <b>Kinase insert Domain Receptor</b> )
KHK	<b>koronare Herzkrankheit</b>
KM	<b>Knochenmark</b>
LAD	linke deszendierende Koronararterie (engl. <b>Left Anterior Descending coronary artery</b> )
LaGeSo	<b>Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin</b>
LFA-1	<b>Leukocyte Function-associated Antigen-1</b>
Lin	<b>Linien-Marker</b>
LV	linker <b>Ventrikel</b>
LVP	linksventrikulärer Druck (engl. <b>Left Ventricular Pressure</b> )
LVEDP	linksventrikulärer enddiastolischer Druck (engl. <b>Left Ventricular End Diastolic Pressure</b> )
M.	Muskel (lateinisch <b>Musculus</b> )
MAGIC Cell	<b>Myocardial regeneration and Angiogenesis in myocardial infarction with G-CSF and Intra-Coronary stem Cell infusion</b> (Kang, Kim et al. 2004)
MAP	mittlerer arterieller Blutdruck (engl. <b>Mean Arterial Pressure</b> )
MAPK	<b>Mitogen-Aktivierte Protein Kinase</b>
min	Minute (engl. <b>minute</b> )
mKitL	<b>membranständiger Kit-Ligand</b>
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MMP-9	<b>Matrixmetallopeptidase-9</b>
MNC	mononukleäre Zellen (engl. <b>Mononuclear Cells</b> )
MRT	<b>Magnetresonanztomographie</b>
MSC	mesenchymale Stammzellen (engl. <b>Mesenchymal Stem Cells</b> )
n	Anzahl Untersuchungseinheiten
NSTEMI	Nicht-ST-Hebungsinfarkt (engl. <b>Non-ST-segment Elevation Myocardial Infarction</b> )
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (engl. <b>Phosphate Buffered Saline</b> )
PCI	perkutane Koronararterien Intervention (engl. <b>Percutaneous Coronary Intervention</b> )
PDGF	<b>Platelet-Derived Growth Factor</b>
PECAM-1	<b>Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1</b>
PE	<b>Phycoerythrin</b>
PFA	<b>Paraformaldehyd</b>

PI3K	<b>Phosphatidylinositol-3-Kinase</b>
RAAS	<b>Renin-Angiotensin-Aldosteron-System</b>
REPAIR-AMI	<b>Reinfusion of Enriched Progenitor cells And Infarct Remodeling in Acute Myocardial Infarction</b> (Schachinger, Erbs et al. 2006)
REVIVAL-2	<b>Regenerate Vital Myocardium by Vigorous Activation of Bone Marrow Stem Cells-2</b> (Zohlnhöfer, Ott et al. 2006)
rhVEGF	rekombinantes humanes VEGF
RT	<b>Raumtemperatur</b>
RV	rechter <b>Ventrikel</b>
s	Sekunde (engl. <b>second</b> )
s.c.	<b>subcutan</b> , subkutan
Sca-1	Stammzellantigen (engl. <b>Stem cell antigen-1</b> )
SCF	Stammzellfaktor (engl. <b>Stem Cell Factor</b> )
SDF-1 $\alpha$	CXCL12 (engl. <b>Stromal cell-Derived Factor-1<math>\alpha</math></b> )
SEM	Standardabweichung der Mittelwerte (engl. <b>Standard Error of the Mean</b> )
sKitL	<b>soluble Kit Ligand</b> , SCF
SP	“ <b>Side Population</b> “-Zellen
SPF	spezifiziert <b>pathogenfrei</b>
SPECT	Einzel-Photon-Emissions-Computertomographie (engl. <b>Single-Photon Emission Computed Tomography</b> )
SSC	Seitwärtsstreulicht (engl. <b>Sideward Scatter</b> )
STEMI	ST-Hebungsinfarkt (engl. <b>ST-Elevation Myocardial Infarction</b> )
STEMMI	<b>Stem cells in Myocardial Infarction clinical trial</b> (Ripa, Jorgensen et al. 2006)
SV	<b>Schlagvolumen</b>
SW	Schlagarbeit (engl. <b>Stroke Work</b> )
syn.	<b>synonym</b>
Tab.	<b>Tabelle</b>
Tie-2	Rezeptortyrosinkinase (engl. <b>Tyrosine kinase receptor-2</b> )
™	Warenzeichen (engl. <b>Trademark</b> )
TTC	2-, 3-, 5-Triphenyltetrazoliumchloride
ü.N.	<b>über Nacht</b>
VCAM-1	<b>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</b>
VE-Cadherin	<b>Vascular Endothelial-Cadherin</b> , CD144
VEGF	<b>Vascular Endothelial Growth Factor</b>
VEGFR	<b>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</b>

VIVA	<i>Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis</i> (Henry, Annex et al. 2003)
vWF	von-Willebrand-Faktor
WHO	Weltgesundheitsorganisation (engl. <i>World Health Organization</i> )



# 1 EINLEITUNG

Ein akuter Herzinfarkt resultiert aufgrund irreversibler myokardialer Schäden häufig in einer kongestiven Herzinsuffizienz (engl. *congestive heart failure*, CHF). Obwohl in den letzten Jahren große Fortschritte im Bereich der revaskularisierenden Therapien erfolgten und somit die Mortalität nach akutem Myokardinfarkt (AMI) gesenkt werden konnte, stellt die CHF nach Ischämie weltweit eine der Haupttodesursachen dar (Cowie, Mosterd et al. 1997; Hellermann, Goraya et al. 2003; Dickstein, Cohen-Solal et al. 2008; Busk, Maeng et al. 2009; Roger, Go et al. 2012). Bis zum heutigen Tag wurde noch keine ausreichende Therapie etabliert, die eine vollständige Regeneration des geschädigten Gewebes gewährleistet.

Vieles deutet darauf hin, dass Stammzellen das Potenzial besitzen, die natürliche Heilung von kardialen Gewebe zu fördern (Mathur and Martin 2004). Physiologischerweise erfolgt als Antwort auf die Inflammation und Ischämie nach einem AMI eine Mobilisation von hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen (engl. *haematopoietic stem- and progenitor cells*, HSPC) aus dem Knochenmark (KM) in das periphere Blut. Nachfolgend tragen rekrutierte endotheliale Progenitorzellen (engl. *endothelial progenitor cells*, EPC) zur Neovaskularisation des infarzierten Gewebes bei, welche sich förderlich auf die kardiale Regeneration auswirkt, wie in mehreren Studien demonstriert wurde (Sirker, Astroulakis et al. 2009; Yoon, Koyanagi et al. 2010). Jedoch sind diese intrinsischen Mechanismen nicht ausreichend, um eine vollständige Reparatur des geschädigten Myokards zu bewirken.

Aus diesem Grund stellt die Gewährleistung einer effektiven Mobilisation von endogenen HSPC und EPC durch die Applikation von Zytokinen oder Wachstumsfaktoren eine mögliche Therapieoption dar, um die kardiale Regeneration nach stattgehabtem Myokardinfarkt zu verbessern (Kovacic, Muller et al. 2005). Verschiedene Wirkstoffe wie G-CSF (engl. *granulocyte-colony stimulating factor*) und VEGF (engl. *vascular endothelial growth factor*) stehen für die medikamentös induzierte Mobilisation von Stammzellen zur Verfügung. Der Einsatz von G-CSF ist bei hämatologischen Erkrankungen und gesunden Knochenmarksspendern ein lang etabliertes Verfahren. Auch im Bereich der ischämischen Herzkrankheiten wurde in mehreren Studien die Wirksamkeit von G-CSF im Hinblick auf die myokardiale Regeneration untersucht (Zohlhöfer, Dibra et al. 2008). Ein weiteres Medikament, welches effektiv Stammzellen aus dem KM mobilisiert, ist der CXCR4-Antagonist AMD3100. Über die reversible Blockierung der SDF-1 $\alpha$ /CXCR4-Achse (engl. *stromal cell-derived factor-1 $\alpha$ /CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4*) werden Stammzellen aus dem Knochenmark in das periphere Blut freigesetzt. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass die kombinierte Therapie mit G-CSF und AMD3100 effektiver Stammzellen

aus dem KM mobilisiert als die alleinige Applikation von G-CSF (Broxmeyer, Orschell et al. 2005; Flomenberg, Devine et al. 2005; Liles, Rodger et al. 2005; Larochelle, Krouse et al. 2006; Calandra, McCarty et al. 2008). Darüber hinaus konnte in einer experimentellen Studie anhand des murinen Hinterlauf-Ischämie-Modells gezeigt werden, dass die kombinierte Anwendung zu einer vermehrten Mobilisation von EPC führt, welche in einer gesteigerten Neovaskularisation resultiert (Capoccia, Shepherd et al. 2006; Shepherd, Capoccia et al. 2006). Auch die kombinierte Therapie mit VEGF und AMD3100 führt zu einer erhöhten Mobilisation von EPC, wie in einer experimentellen Studie gezeigt wurde (Pitchford, Furze et al. 2009).

Auf Grundlage dieser Forschungsergebnisse war das Ziel dieser Arbeit, die Etablierung eines neuartigen Behandlungsprotokolls, welches zu einer effektiven Mobilisation von EPC führt und nachfolgend über die gesteigerte Neovaskularisation des ischämischen Myokards in einer verbesserten kardialen Regeneration resultiert. Hierzu wurden die Wirkstoffe G-CSF, VEGF und AMD3100 sowie die Wirkstoffkombinationen G-CSF/AMD3100 und VEGF/AMD3100 hinsichtlich ihrer Mobilisationskapazität und förderlichen Effekte auf die kardiale Regeneration nach induziertem Myokardinfarkt im Mausmodell untersucht. In der FACS-Analyse (engl. *fluorescence-activated cell sorting*) des peripheren Blutes wurden mithilfe von fluoreszenz-markierten Antikörpern (AK) HSPC und EPC identifiziert. 28 Tage nach dem ischämischen Ereignis erfolgte die hämodynamische Untersuchung mittels Leitfähigkeits-Katheter, um die kardiale Funktion der verschiedenen Wirkstoffgruppen nach AMI zu beurteilen. Weiterführende Untersuchungen nach Euthanasie und Organentnahme implizierten die Bestimmung der Kapillardichte im infarzierten Myokard und angrenzenden gesunden Gewebe mittels Immunfluoreszenzfärbung sowie die quantitative Infarktgrößemessung. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit betonen die Wichtigkeit der EPC im Hinblick auf die myokardiale Gefäßneubildung nach AMI und der daraus resultierenden förderlichen Effekte auf die kardiale Funktion.

## **2 LITERATURÜBERSICHT**

### **2.1 Myokardinfarkt**

#### **2.1.1 Epidemiologie**

Herz-Kreislauf-Erkrankungen zählen nach wie vor zu den häufigsten Todesursachen der westlichen Industrienationen. Laut dem statistischen Bundesamt verstarben in Deutschland im Jahr 2010 insgesamt 352 689 Menschen (41,1 %) an den Folgen einer Krankheit des Kreislaufsystems, davon waren 92 % älter als 65 Jahre. An einem Myokardinfarkt starben insgesamt 59 107 Menschen, wovon 55,8 % Männer und 44,2 % Frauen betroffen waren (Statistisches Bundesamt 2010; Statistisches Bundesamt 2011). Laut der *World Health Organization* (WHO) starben im Jahr 2008 weltweit 7,25 Millionen Menschen an einer ischämischen Herzerkrankung (World Health Organization 2011). Zwar konnte die Akutmortalität nach Myokardinfarkt durch koronare Reperfusion mittels perkutaner Koronararterienintervention (engl. *percutaneous coronary intervention*, PCI) und dem Einsatz von Thrombozytenaggregationshemmern in den letzten Jahren deutlich gesenkt werden, die Prävalenz an einer postischämischen Herzinsuffizienz zu erkranken, ist jedoch gestiegen (Roger, Go et al. 2012). Nach einem Herzinfarkt entwickelt ungefähr ein Drittel der Patienten eine Herzinsuffizienz (Hellermann, Goraya et al. 2003; Velagaleti, Pencina et al. 2008). Der Myokardinfarkt ist somit einer der häufigsten Gründe für die Ausbildung einer CHF (Krum 2005; Urbanek, Torella et al. 2005). Darüberhinaus nehmen Herz-Kreislauf-Erkrankungen auch in finanzieller Hinsicht eine bedeutende Stellung ein. Gemäß den Erhebungen des statistischen Bundesamtes (Gesundheitsberichterstattung des Bundes), betragen die Kosten für Krankheiten des Kreislauf-Systems im Jahr 2008 für Deutschland 36.973 Millionen Euro (Statistisches Bundesamt 2010). Herzerkrankungen stellen somit sowohl medizinisch als auch volkswirtschaftlich ein großes Problem dar. Aufgrund des demografischen Wandels und der immer älter werdenden Bevölkerung, werden Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems in den nächsten Jahren weiterhin an Bedeutung gewinnen und die Prävalenz wird ansteigen (Lowel and Meisinger 2006; Dickstein, Cohen-Solal et al. 2008). Aus diesem Grund ist die Forschung über neue pharmakologische Therapieansätze zur Verbesserung der kardialen Regeneration nach AMI eine der wichtigsten Aufgaben im Bereich des Gesundheitswesens.

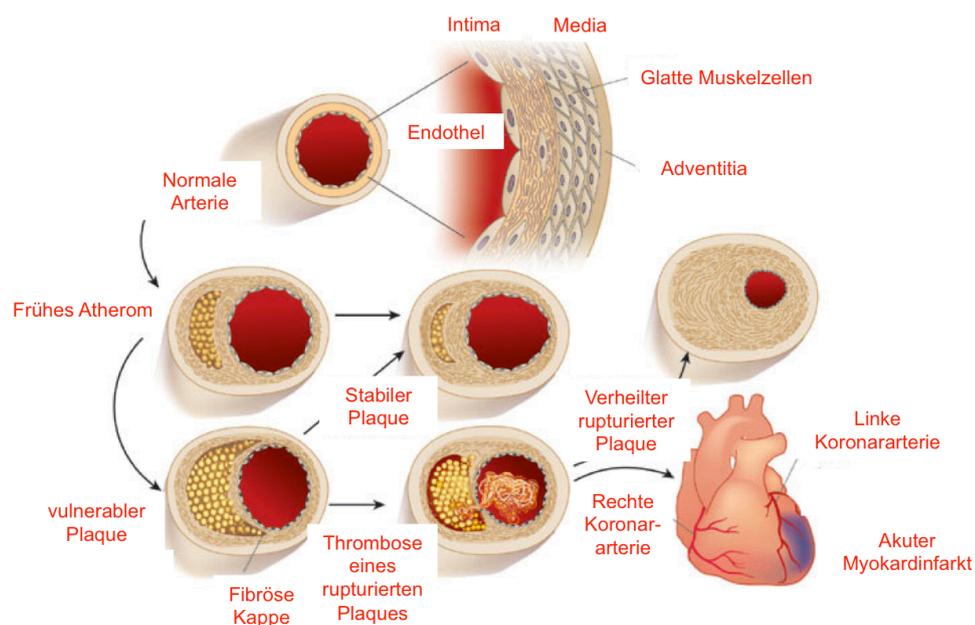
### 2.1.2 Pathophysiologie

Ein Myokardinfarkt entsteht meist als Folge einer koronaren Herzkrankheit (KHK). Die pathogenetische Ursache für die Ausbildung einer KHK ist die Manifestation der Atherosklerose an den Herzkranzgefäßen, welche konsekutiv zu einer Abnahme der koronararteriellen Perfusion führt. Somit besteht ein Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und -bedarf. Nachfolgend kann es zur Ausprägung unterschiedlicher klinischen Erscheinungsformen kommen, die von der stabilen *Angina pectoris* (Brustschmerz) bis hin zum akuten Koronarsyndrom mit instabiler *Angina pectoris* oder akutem Myokardinfarkt reichen.

Der häufigste Auslöser des transmuralen Infarkts ist die Bildung eines okkludierenden intravasalen Thrombus in einem Koronargefäß. Durch eine fibröse Plaque kommt es zur Stenosierung des Gefäßes, im weiteren Verlauf führt die Ruptur einer instabilen Plaque zur Thrombosierung des betroffenen Gefäßabschnittes, welche mit einer Infarzierung des Stromgebietes einhergeht und in einem Myokardinfarkt mit ischämisch bedingter Myokardnekrose resultiert.

Die Atherosklerose ist ein multifaktorieller, progressiver Prozess. Der Ausgangspunkt für die Ausbildung atherosklerotischer Prozesse ist eine lokale Funktionsstörung des Endothels (Ross 1986). Als Ursache für die Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion gelten folgende kardiale Risikofaktoren: Hypercholesterinämie, Rauchen, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, genetische Prädisposition, Adipositas, erhöhter Lipoprotein-Serumspiegel >300 mg/dl, Hyperhomocysteinämie, Hyperfibrinogenämie (Ross 1999; Lip, Gibbs et al. 2000). Die initiale Endothelschädigung führt zu einer Veränderung der Adhäsions- und Permeabilitätseigenschaften für Plasmabestandteile und zur lokalen Produktion von Zytokinen, Wachstumsfaktoren, vasoaktiven Substanzen und Entzündungszellinfiltration. Durch Stimuli von Wachstumsfaktoren wandern glatte Muskelzellen unter die Intima ein. Des Weiteren wandeln sich Makrophagen in Schaumzellen (*foam-cells*) um und speichern oxidiertes LDL-Cholesterin (Stary 2000; Libby, Ridker et al. 2002). Folglich lagern sich Leukozyten und Thrombozyten durch die veränderten Adhäsionseigenschaften an der Endothelzelloberfläche an. Der fortschreitende Entzündungsprozess führt zu einer Proliferation des subintimalen Raums, was makroskopisch als weißliche Fettablagerung (*fatty streaks*) sichtbar ist. Diese frühen atherosklerotischen Prozesse sind bereits im Kindesalter nachweisbar (Renz-Polster, Krautzig et al. 2004). Nachfolgend führen die Zytokine und Wachstumsfaktoren durch die Synthese chemotaktischer Faktoren zu einer weiteren Zelleinwanderung mit Proliferation der glatten Muskelzellen und Synthese extrazellulärer Matrixproteine (Ross 1999), die eine fibröse Matrix aus Kollagen und Proteoglykanen ausbilden. Durch weitere Fettakkumulation, Proliferation von glatten

Gefäßmuskelzellen und dem endothelialen, bindegewebigen Umbau mit progressiven Verkalkungen entsteht aus den „*fatty streaks*“ eine fibrös-fettige Intermediärläsion, welche zu einer zunehmenden Stenosierung des Gefäßlumens führen kann. Zusätzlich führt die fortschreitende endotheliale Dysfunktion zu einer verminderten Freisetzung von dem durch Ischämie induzierten vasodilatatorischen Mediator Stickstoffmonoxid (NO) und es überwiegen die vasokonstriktorisch wirkenden Mediatoren Endothelin, Thromboxan und Angiotensin II. Aus den fortgeschrittenen Läsionen oder Atheromen entwickeln sich häufig „komplizierte Läsionen“, die durch Nekrosen, Erosionen, Ulzerationen oder thrombotische Ablagerungen gekennzeichnet sind. Bei Ruptur einer instabilen, atheromatösen Plaque kommt es zum Übertritt von thrombogenem Plaqueinhalt in das Gefäßlumen und konsekutiv zur Bildung eines Plättchenthrombus und somit zu einer Thrombosierung der Koronararterie (siehe Abb. 1). In der Folge entstehen akute Koronarsyndrome wie die instabile *Angina pectoris*, der akute transluminale (STEMI) oder nicht transluminale (NSTEMI) Myokardinfarkt.



**Abbildung 1: Entstehung der Atherosklerose**

In der frühen Atherogenese begünstigt die endotheliale Dysfunktion die Infiltration von Leukozyten. Durch die Proliferation glatter Muskelzellen und die Aktivierung von Thrombozyten entsteht aus dem frühen Atherom eine atherosklerotische Plaque. Im weiteren Verlauf führt dies zu einer zunehmenden Stenosierung des Gefäßlumens. Die Thrombose eines rupturierten Plaques kann aufgrund der Myokardischämie in einem akuten Myokardinfarkt resultieren (Libby, Ridker et al. 2002, Nachdruck genehmigt)

### 2.1.3 Remodeling

Durch die ischämisch bedingte Myokardnekrose kommt es nach einem AMI zu verschiedenen molekularen und zellulären kompensatorischen Umbauprozessen, die als *Remodeling* bezeichnet werden und einen entscheidenden Faktor für das Ausbilden einer kongestiven Herzinsuffizienz darstellen (Jackson, Gibbs et al. 2000). Das *Remodeling* ist eine Reaktion des Herzens auf die gesteigerte hämodynamische Belastung und/oder Schädigung des Herzens und geht meist mit einer erhöhten neurohumoralen Aktivität einher. Mittels Aktivierung des RAAS (Renin-Angiotensin-Aldosteron-System) und des Sympathikus dient es kurzzeitig der Aufrechterhaltung der kardialen Funktion. In der akuten Infarktphase kommt es aufgrund der Ischämie zu einer Nekrose und Apoptose der Myozyten. Die anschließenden bindegewebigen Umbauprozesse im nekrotischen Bereich und im angrenzenden nicht-infarzierten Myokard resultieren in einer Vergrößerung des Infarktgebietes. Die progressive Expansion des initialen Infarktgebietes, die Dilatation der linken Herzkammer und die regionale Wandausdünnung führen dazu, dass es aufgrund der erhöhten systolischen und diastolischen Wandspannung kompensatorisch zu einer regionalen Hypertrophie des nicht infarzierten Gewebes kommt. Dies führt im weiteren Verlauf jedoch zu einer systolischen Funktionsstörung, einem erhöhten Füllungsdruck im linken Ventrikel (LV) und einer verminderten Ejektionsfraktion (EF). Folglich führt dies zu einer weiteren Dilatation und gleichzeitig zu einem Anstieg des myokardialen Sauerstoffverbrauchs, was letztendlich in einer dekompenzierten kongestiven Herzinsuffizienz mündet (Gaudron, Eilles et al. 1993). Als schwerwiegende Komplikation nach einem AMI kann es jedoch auch infolge der Infarktexpansion, Dilatation und vermehrten Wanddünnung zu einem Aneurysma oder zu einer Myokardruptur kommen (Pfeffer and Braunwald 1990). Auch der plötzliche Herztod infolge von ventrikulären und supraventrikulären Rhythmusstörungen ist beschrieben (Gaudron, Eilles et al. 1993; Gaudron, Kugler et al. 2001; Alasady, Abhayaratna et al. 2011; Turner and Porter 2013).

### 2.1.4 Therapieverfahren

Einer der bedeutendsten Therapieansätze zur Senkung der kardialen Morbidität und Mortalität ist das Fortschreiten der Herzinsuffizienz zu verhindern. Aus diesem Grund stellt die Reduktion oder die Verlangsamung der pathologischen Umbauprozesse eines der wichtigsten Therapieziele dar (Cohn, Ferrari et al. 2000). Die schnellstmögliche Wiederherstellung der Myokardperfusion mittels pharmakotherapeutischer Maßnahmen (Gerinnungs- und Thrombozytenaggregationshemmung mit Heparin, ASS oder Clopidogrel), respektive katheterbasierter PCI mit nachfolgender Ballon- oder Stent-Implantation ist essenziell, um die Infarktgröße möglichst gering zu halten (Van de Werf, Bax et al. 2008).

Eine Rückbildung der bereits vorhandenen Myokardnekrose und Apoptose der Myozyten ist jedoch nicht möglich (Olivetti, Abbi et al. 1997).

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Therapie mit ACE-Inhibitoren, Spironolacton und  $\beta$ -Blockern zu einer signifikanten Reduzierung (Investigators 1991; Packer, Bristow et al. 1996) der kardialen Mortalität führt und das pathologische *Remodeling* vermindert werden kann. Dennoch ist eine Wiederherstellung physiologischer und voll funktionsfähiger Kardiomyozyten und Blutgefäße mit der medikamentösen Therapie nicht möglich. Im Endstadium einer chronischen Herzinsuffizienz besteht häufig nur noch die Möglichkeit der Herztransplantation. Aufgrund der bestehenden Organknappheit ist die Transplantation jedoch nur wenigen Menschen zugänglich (Krakauer, Lin et al. 2005).

In Anbetracht dieser Tatsache ist die Entwicklung alternativer Behandlungsmethoden unabdingbar. Einen vielversprechenden Ansatz bietet die Stammzelltherapie, da erste klinische und tierexperimentelle Studien protektive und regenerative Effekte von Stammzellen oder Vorläuferzellen auf geschädigtes Myokardgewebe zeigten (Orlic, Hill et al. 2002) und mithilfe einer gesteigerten Induktion der Neoangiogenese eine tatsächliche Regeneration des geschädigten Myokards bewirkt werden kann (Kawamoto, Gwon et al. 2001; Schuster, Kocher et al. 2004).

## **2.2 Stammzelltherapie nach Myokardinfarkt**

### **2.2.1 Stammzellen**

Als Stammzellen bezeichnet man unreife Zellen, deren Entwicklung noch nicht festgelegt ist. Sie besitzen die Fähigkeit sich unbegrenzt selbst zu erneuern und weiter zu differenzieren (Mathur and Martin 2004; Dimmeler and Zeiher 2005). Im Allgemeinen erfolgt die Einteilung in embryonale (ES) und adulte Stammzellen. Die Verwendung von ES ist in der Forschung und Medizin ethisch umstritten, da zu ihrer Gewinnung sogenannte destruktive Embryonenforschung, also die Tötung des Embryos, erforderlich ist. Zudem konnte nach Transplantationsversuchen mit ES eine erhöhte Inzidenz von Teratokarzinomen beobachtet werden (Erdo, Buhrle et al. 2003). Des Weiteren kann es nach Transplantation von ES zu einer Abstoßungsreaktion kommen, da es sich um nicht autologe Zellen handelt.

Adulte Stammzellen sind teilungsfähige Zellen, die in bislang 20 Organen (u.a. Knochenmark, Blut, Gehirn, Nabelschnur) nachgewiesen wurden und dort lebenslänglich verweilen. Sie sind zur pluripotenten Differenzierung in unterschiedliche Zellen befähigt. Durch asymmetrische Teilung generieren Stammzellen Progenitorzellen, welche bereits Linien-determiniert sind und die Fähigkeit zur Selbstreplikation verloren haben. Sie tragen mittels Differenzierung in reife, terminale Zellen zur Blut- und Organerneuerung bei. Adulte

Stammzellen werden in hämatopoetische (HSC), mesenchymale (MSC), sogenannte "side population"(SP)-Zellen und gewebeständige Stammzellen unterteilt.

### 2.2.2 Hämatopoetische Stammzellen

Humane hämatopoetische Stammzellen sind durch die Expression des Oberflächenantigens CD34 charakterisiert. Auch Endothelzellen exprimieren CD34, weshalb zur weiteren Charakterisierung der Pan-Leukozytenmarker CD45 hinzugezogen wird. Ein großer Teil der CD34<sup>+</sup>-Zellen exprimiert zusätzlich das Oberflächenantigen CD38. Fehlt dieses, so handelt es sich um frühe, undeterminierte Stammzellen. Diese Zellen exprimieren außerdem CD133<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup> und CD117<sup>lo</sup>. CD117<sup>lo</sup> bedeutet, dass der Stammzellefaktor (engl. *stem cell factor*, SCF) Rezeptor c-Kit auf den primitiven Stammzellen nur schwach exprimiert wird. Des Weiteren exprimieren die undeterminierten, primitiven Zellen keine Linienmarker (Lin<sup>-</sup>). Linienmarker sind Antigene, die für bestimmte Zelllinien charakteristisch sind. Als Beispiel sind die humanen Linienmarker CD3 bei T-Lymphozyten oder CD19 bei B-Lymphozyten zu nennen. Die murinen HSC sind durch die Expression von Sca-1 (engl. *stem cell antigen-1*) charakterisiert. Sca-1 ist im humanen System nicht vorhanden. Sca-1 ist jedoch nicht nur auf Stammzellen lokalisiert, sondern auch auf T-Zellen, deshalb müssen alle Zellen ausgeschlossen werden, die bereits eine Liniendeterminierung aufweisen (Lin<sup>+</sup>). Darüber hinaus exprimieren die murinen Stammzellen c-Kit (im humanen System als CD117 beschrieben). Somit werden die murinen HSC als Sca-1<sup>+</sup>/c-Kit<sup>+</sup>/Lin<sup>-</sup> (SKL) Population beschrieben. Ein geringer Prozentsatz (ca. 0,1-0,5 %) der Lin<sup>-</sup>-Zellen (Ziegler, Valtieri et al. 1999) exprimiert den VEGFR-2 (engl. *vascular endothelial growth factor receptor-2*; human: KDR = engl. *kinase insert domain receptor*; murin: Flk-1 = engl. *fetal liver kinase-1*). Außerdem ist KDR auf EPC und reifen Endothelzellen lokalisiert (Dimmeler and Zeiher 2005).

HSC sind zuständig für die Regeneration aller Zellen des Blut- und Immunsystems (Lagasse, Shizuru et al. 2001). Im Zuge der autologen und allogenen Knochenmarkstransplantation sind seit vielen Jahren verschieden Verfahren zur Gewinnung und Nutzung der HSC etabliert (Zander and N. 2002). Durch hämatopoetische Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel G-CSF, kann die Anzahl der zirkulierenden Stammzellen im peripheren Blut erhöht werden (Takahashi, Kalka et al. 1999; Orlic, Kajstura et al. 2001; Levesque, Hendy et al. 2003).

### 2.2.2.1 Die endogene Mobilisierung der hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen

Nach bestimmten Stresssituationen, wie zum Beispiel einer Ischämie nach einem akuten Myokardinfarkt, erfolgt aufgrund der Gewebeschädigung, Minderdurchblutung und Inflammation eine verstärkte Mobilisierung und Migration von Stammzellen. Neben der Infiltration durch neutrophile Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten steigt auch die Anzahl der zirkulierenden HSC, MSC und EPC (Jackson, Majka et al. 2001; Urbich and Dimmeler 2004; Massa, Rosti et al. 2005; Wollert and Drexler 2005). Die Regulation der Stammzellmobilisierung, Chemotaxis und Migration erfolgt vor allem durch die Interaktion des Chemokins SDF-1 $\alpha$  und dessen spezifischem Rezeptor CXCR4 (Askari and Penn 2003). SDF-1 $\alpha$ , welches auch als CXCL12 (CXC-Motiv-Chemokin 12) bezeichnet wird, ist ein Mitglied der Chemokinfamilie und wirkt chemotaktisch auf humane CD34<sup>+</sup>-Zellen (Aiuti, Webb et al. 1997; Ceradini, Kulkarni et al. 2004). Es wird in hoher Anzahl von Knochenmarksendothelien, Osteoblasten, Fibroblasten und Parenchymzellen von Herz, Gehirn, Niere, Lunge, Milz und Leber sezerniert. Des Weiteren produzieren Stromazellen im Knochenmark SDF-1 $\alpha$ . HSC sind über den SDF-1 $\alpha$ -Rezeptor CXCR4 an die Stromazellen im Knochenmark gekoppelt und verweilen in der Stammzellnische, um bei gesteigertem Bedarf in ausreichender Anzahl zur Verfügung zu stehen (Levesque, Hendy et al. 2003). CXCR4 ist ein G-Protein gekoppelter 7-Transmembrandomänen-Rezeptor. Die Bindung von SDF-1 $\alpha$  und CXCR4 erfolgt über den extrazellulären N-terminus des Rezeptors. Der Rezeptor ist aufgrund seiner Funktion als Korezeptor beim Eintritt des lymphotropen HI-Virus einer der besterforshtesten Chemokinrezeptoren. Bei der Stammzellmobilisierung wird die Bindung zwischen den Stroma- und den Stammzellen gelöst. Nachfolgend wird die Konzentration von SDF-1 $\alpha$  im Knochenmark erhöht, was zu einer Freisetzung des proteolytischen Enzyms Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9) führt. MMP-9 wird im Knochenmark von Stromazellen (z.B. Osteoblasten) und HSC, wie Makrophagen, Monozyten und neutrophilen Granulozyten produziert und führt zu einer Inaktivierung von SDF-1 $\alpha$ , indem sie am N-Terminus einige Aminosäuren abschneidet (Dimmeler and Zeiher 2005). Somit kann das Chemokin nicht mehr an seinen Rezeptor binden und die Stammzellen werden in das periphere Blut mobilisiert. Bei einem AMI erfolgt eine vermehrte Freisetzung von SDF-1 $\alpha$  aus dem infarzierten Bereich, unter anderem auch aus Thrombozyten (Ma, Ge et al. 2005; Wojakowski and Tendera 2005; Massberg, Konrad et al. 2006). Konsekutiv werden die CXCR4-positiven Zellen chemotaktisch von dem SDF-1 $\alpha$ -Gradienten gesteuert und migrieren zum Ort der Ischämie (Askari and Penn 2003; Yamaguchi, Kusano et al. 2003).

Ein zweites wichtiges Liganden-Rezeptor-Paar ist c-Kit/SCF. Im unmobilisierten Zustand binden Stammzellen über ihren c-Kit-Rezeptor (CD117) an den membranständigen Kit-

Liganden (mKitL). Durch G-CSF, SDF-1 $\alpha$  und IL-8 (Interleukin-8) erfolgt die Ausschüttung von MMP-9, welches den membranständigen Kit-Liganden proteolytisch in die lösliche Form sKitL (engl. *soluble kit ligand*, syn. *SCF*) umwandelt. Somit können die Stammzellen über die c-Kit/sKitL Bindung das Knochenmark verlassen. Die Mobilisierung von Stammzellen kann auch durch die proteolytische Spaltung des c-Kit-Rezeptors selbst stattfinden. Nach der Mobilisierung mit G-CSF erfolgt eine Freisetzung von Proteinase wie z.B. neutrophile Elastase, Cathepsin G, Proteinase 3 und MMP-9, welche nachfolgend zu einer Spaltung des c-Kit-Rezeptors führen (Heissig, Hattori et al. 2002; Lapidot and Petit 2002).

Eine weitere Achse ist die Interaktion verschiedener Adhäsionsmoleküle mit ihren Rezeptoren. LFA-1 (engl. *leukocyte function-associated antigen-1*) und VLA-4 (engl. *very late antigen-4*) haben die Aufgabe, über die Bindung an ihre Rezeptoren ICAM-1 (engl. *intercellular adhesion molecule-1*) und VCAM-1 (engl. *vascular cell adhesion molecule-1*), die Stammzellen im KM zurück zu halten. Die Blockierung der Interaktion zwischen LFA-1/ICAM-1 und VLA-4/VCAM-1 resultiert in einer Mobilisation von Stamm- und Progenitorzellen (Levesque, Takamatsu et al. 2001). Nach der Mobilisierung mit G-CSF liegt aufgrund der proteolytischen Spaltung durch die Enzyme neutrophile Elastase und Cathepsin G eine reduzierte Expression der Adhäsionsmoleküle vor (Stein, Zohlnhöfer et al. 2010).

### **2.2.3 Endotheliale Progenitorzellen (EPC)**

Neueste Studien richten ihre Aufmerksamkeit in den letzten Jahren vermehrt auf endotheliale Progenitorzellen. EPC stammen teilweise von HSC ab und werden bei Bedarf aus dem Knochenmark mobilisiert. Nach der Mobilisation können die EPC zu Endothelzellen differenzieren (Asahara, Murohara et al. 1997) und tragen nachfolgend zur Neovaskularisation und Regeneration von ischämischen Gewebe bei (Shintani, Murohara et al. 2001). Eine Isolierung kann aus dem Knochenmark oder dem peripheren Blut erfolgen. Es wird angenommen, dass im Knochenmark ein gemeinsamer Vorläufer für hämatopoetische und endotheliale Zellen, der Hämangioblast, existiert (Shi, Rafii et al. 1998). Hämangioblasten können je nach Kulturbedingungen *in vitro* zu HSC oder EPC differenzieren (Pelosi, Valtieri et al. 2002; Ribatti, Vacca et al. 2002).

Die Charakterisierung der EPC erfolgt über die Expression von CD34, CD133 und VEGFR-2. Des Weiteren exprimieren kultivierte EPC laut verschiedener Literaturangaben (Kalka, Masuda et al. 2000; Dimmeler, Aicher et al. 2001) die Endothelzellmarker CD146, CD31, vWF (von Willebrand-Faktor), VE(engl. *vascular endothelial*)-Cadherin und eNOS (endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase). EPC können von reifen Endothelzellen durch die Expression von CD133 differenziert werden, da CD133 hauptsächlich auf unreifen EPC

nachweisbar ist. Reife Endothelzellen exprimieren hingegen vermehrt CD31 (Asahara, Murohara et al. 1997; Peichev, Naiyer et al. 2000; Asahara and Kawamoto 2004). Die Differenzierung von EPC in Gefäßendothelzellen wurde in mehreren Studien sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen (Isner, Kalka et al. 2001; Assmus, Schachinger et al. 2002; Kawamoto, Tkebuchava et al. 2003). Die ausgereiften Endothelzellen tragen nachfolgend zur Vaskulogenese und zur Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase bei (Khakoo and Finkel 2005).

### **2.2.3.1 Aufgaben der endothelialen Progenitorzellen**

#### **Vaskulogenese**

Vaskulogenese bezeichnet die Bildung von Blutgefäßen während der Embryonalentwicklung und ist die *de novo* Entstehung eines frühen Gefäßplexus, aus dem sich die ersten primitiven Blutgefäße entwickeln. Wie in Abb. 2 dargestellt, beginnt sie mit der Differenzierung von Angioblasten und hämatopoetischen Zellen aus dem Mesoderm (Tallquist, Soriano et al. 1999), welche sich zu zellulären Aggregaten und Blutinseln formieren und somit das primäre Gefäßsystem im Embryo und der Plazenta bilden (Plendl 2000). Hieraus differenzieren sich primitive Endothelzellen, die durch Fusion von intraendothelialen Vakuolen Gefäßlumina bilden (Folkman and Shing 1992), wodurch ein vaskuläres Netzwerk entsteht, welches sich letztlich zu einem komplexen Gefäßsystem entwickelt (Risau 1997). Die Familie der Fibroblastenwachstumsfaktoren (engl. *fibroblast growth factors*, FGF) und der endotheliale Wachstumsfaktor VEGF spielen bei der mesodermalen Differenzierung des Hämangioblasten eine wesentliche Rolle.

Die postnatale Vaskulogenese hingegen bezeichnet die *de novo* Entstehung von Gefäßplexen bei adulten Organismen. Mithilfe des VEGFR-2 wird die Angioblastendifferenzierung initialisiert. Maßgeblich für das Überleben der Angioblasten ist dabei die Konzentration der VEGF-Liganden. Wachstumsfaktoren, Zytokine und Hormone werden als Antwort auf die periphere oder myokardiale Gewebsischämie synthetisiert und führen zur Proliferation, Differenzierung und Mobilisation der EPC aus dem Knochenmark in das periphere Blut. Nachfolgend rekrutieren die Zellen zum Ort der Ischämie und tragen mithilfe der Neovaskularisation zur Regeneration des geschädigten Gewebes bei (Isner and Asahara 1999).

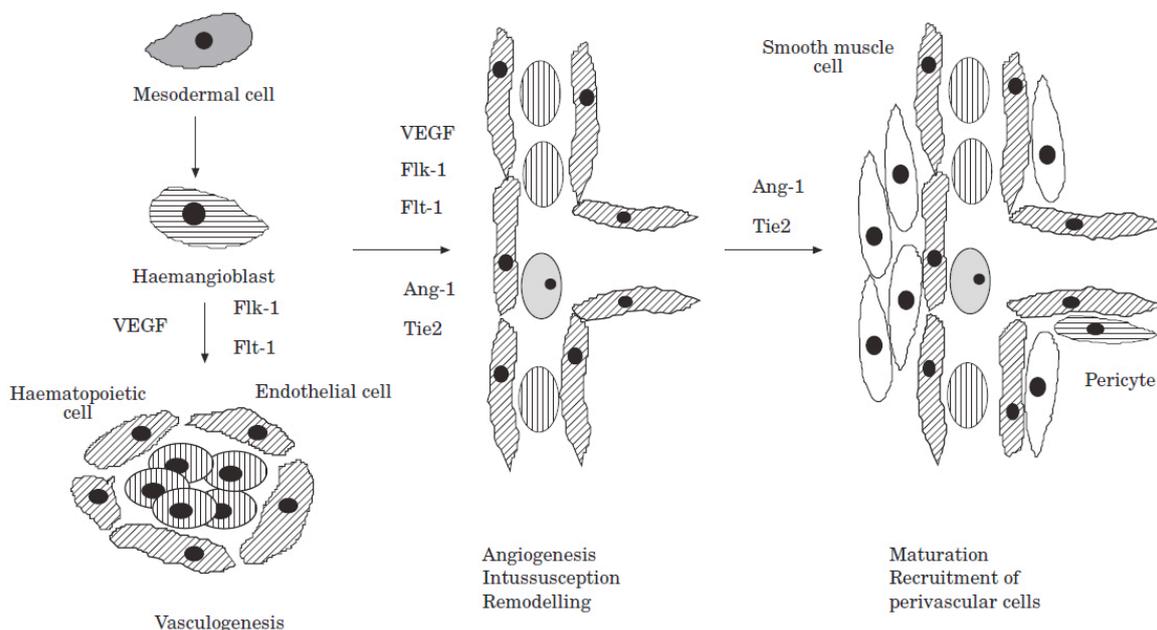
#### **Angiogenese**

Die Angiogenese hingegen ist das Wachstum von Blutgefäßen ausgehend von bereits bestehenden Blutgefäßstrukturen durch Rekrutierung, Integration und Proliferation endothelialer Progenitorzellen (Risau 1997; Carmeliet 2000). Dies führt zu einem Aus-

sprossen neuer Kapillaren (*"sprouting angiogenesis"*) oder der Teilung von präexistenten Kapillaren (*"non-sprouting angiogenesis"*). Initial spielen v.a. die durch Stickstoffmonoxid induzierte Vasodilatation und die durch VEGF vermittelte gesteigerte Gefäßpermeabilität eine Rolle, welche zu einer Extravasation von Plasmaproteinen führt (Kalka, Asahara et al. 2000). Die endotheliale Rezeptortyrosinkinase Tie-2 (engl. *tyrosine kinase receptor-2*) und die Interaktion mit den Liganden der Angiopoetin-Familie nehmen bei der Angiogenese eine Schlüsselrolle ein (Puri, Rossant et al. 1995), da die Stabilität des bestehenden Gefäßsystems sowie die Neubildung und die Umbauprozesse von der Aktivierung durch die Liganden Angiopoetin-1 und -2 (Ang-1 und Ang-2) abhängig sind.

### Arteriogenese

Arteriogenese basiert auf der Bildung von Kollateralarterien durch vaskuläres *Remodeling* von bereits existierenden Arteriolen. Scherkräfte führen zur Induktion von PDGF- $\beta$  (engl. *platelet derived growth factor-beta*) und aktivieren perivaskuläre mesenchymale Zellen, Perizyten und glatte Muskelzellen, sich an das proliferierende Endothel anzulagern und somit die Blutgefäße zu stabilisieren (Gaengel, Genove et al. 2009).



### Abbildung 2: Vaskulogenese und Angiogenese

Die Abbildung zeigt die Wege der Gefäßneubildung unter dem Einfluss von verschiedenen Wachstumsfaktoren und Zytokinen. Die Vaskulogenese beginnt mit der Differenzierung eines Hämangioblasten aus dem Mesoderm. Unter dem Einfluss von VEGF (engl. *vascular endothelial growth factor*) bilden sich aus den Blutinseln primitive Endothelzellen und hieraus schließlich die ersten Gefäßplexen. Die Angiogenese beschreibt das Wachstum von

Blutgefäßen ausgehend von bereits bestehenden Blutgefäßstrukturen. Unter dem vasodilatatorischen und gefäßpermeabilitätssteigernden Einfluss von Stickstoffmonoxid und VEGF kommt es zu einer Aussprossung neuer Gefäße. Ein weiteres wichtiges Liganden-Rezeptor-Paar für die Angiogenese sind Tie-2 (engl. *tyrosine kinase receptor-2*) und Angiopoetin-1 und -2 (Ang-1 und -2; Breier 2000, Nachdruck genehmigt).

### **2.2.3.2 Mobilisierung und Homing endothelialer Progenitorzellen**

Physiologischerweise beträgt der prozentuale Anteil der EPC an den mononukleären Zellen im peripheren Blut nur 0,1 % (Peichev, Naiyer et al. 2000; Vasa, Fichtlscherer et al. 2001; Vasa, Fichtlscherer et al. 2001). Menschen, die aufgrund ihrer genetischen Prädisposition ein erhöhtes Risiko für die Ausbildung vaskuloproliferativer Erkrankungen haben, weisen eine verringerte Anzahl zirkulierender, endothelialer Progenitorzellen im peripheren Blut auf. Die Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren, wie Hypertonie, Rauchen und Adipositas, korreliert negativ mit der Anzahl und Funktion der EPC (Heeschen, Lehmann et al. 2004). Vor allem Patienten, die sich in einer diabetischen Stoffwechsellage befinden, weisen eine reduzierte Proliferations-, Migrations-, und Adhäsionsfähigkeit von EPC auf (Vasa, Fichtlscherer et al. 2001). Physisches Training hingegen resultiert in einem Anstieg von EPC im peripheren Blut (Adams, Lenk et al. 2004; Laufs, Werner et al. 2004). Die Behandlung mit HMG-CoA-Reduktasehemmern (3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoenzymA), den sogenannten Statinen, die therapeutisch zur Senkung des Cholesterinspiegels bei Patienten mit stabiler KHK eingesetzt werden, führen ebenfalls zu einer vermehrten Mobilisation der EPC (Walter, Rittig et al. 2002), was in einem Anstieg der zirkulierenden, endothelialen Vorläuferzellen im peripheren Blut resultiert (Dimmeler, Aicher et al. 2001; Vasa, Fichtlscherer et al. 2001). Auch die Behandlung mit Statinen nach erfolgter PCI führt zu einer gesteigerten Anzahl von EPC im peripheren Blut, wobei eine Verbesserung der kardialen Funktion nicht beobachtet werden konnte (Leone, Rutella et al. 2008).

Vergangene Studien zeigten, dass ferner ein erhöhter Östrogenspiegel die Anzahl der zirkulierenden EPC erhöht (Iwakura, Shastry et al. 2006). Des Weiteren führen hypoxische Stimuli zu einer vermehrten Erythropoetin(EPO)-Synthese im renalen Interstitium, was nachfolgend in einer gesteigerten Differenzierung der Erythrozyten resultiert. Daneben führt das Hormon auch zu einer verstärkten Mobilisation und verbesserten Proliferation von EPC (Heeschen, Aicher et al. 2003). Der molekulare Mechanismus, welcher der verstärkten Mobilisierung der EPC zugrunde liegt, ist der PI3K/Akt-Signalweg (Phosphatidylinositol-3-Kinase/aktivierte Proteinkinase B). Durch VEGF, Statine, Östrogene, EPO und physisches Training erfolgt eine Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges, was zu einer vermehrten Differenzierung der EPC führt (Dimmeler, Aicher et al. 2001). Darüber hinaus fördern

Wachstumsfaktoren wie G-CSF und GM-CSF (engl. *granulocyte macrophage-colony stimulating factor*) die Mobilisation von EPC (Powell, Paul et al. 2005), welche im Zuge von Entzündungsprozessen sezerniert werden. Die myokardiale Ischämie nach AMI führt zu einer endogenen Mobilisation von EPC aus dem Knochenmark in das periphere Blut bei Nagetieren und Menschen (siehe Abschnitt 2.2.2.1). Unter transkriptioneller Kontrolle von HIF-1 $\alpha$  (Hypoxie-induzierter Faktor 1, engl. *hypoxia-inducible factor 1*) werden Zytokine wie SDF-1 $\alpha$  und VEGF produziert und in das infarzierte Myokard sekretiert (Lee, Wolf et al. 2000; Ceradini, Kulkarni et al. 2004; De Falco, Porcelli et al. 2004). Wie in Abschnitt 2.2.5.3 dargestellt, erfolgt die Mobilisierung von EPC aus dem Knochenmark durch VEGF über die Hochregulation und Freisetzung von MMP-9, welche zu einer proteolytischen Spaltung des c-Kit-Rezeptors führt (Takahashi, Kalka et al. 1999; Kalka, Asahara et al. 2000; Gill, Dias et al. 2001; Heissig, Hattori et al. 2002; Lapidot and Petit 2002). Des Weiteren wirkt VEGF stimulierend auf die Migration, Proliferation und Differenzierung der EPC, was nachfolgend in einer gesteigerten Anzahl an EPC im peripheren Blut resultiert (Asahara, Takahashi et al. 1999). In mobilisierten EPC führt VEGF über den VEGFR-2 mittels Aktivierung des MAPK/Akt-Signalweges (mitogenaktivierte Proteinkinase/aktivierte Proteinkinase B) zu einem chemotaktischen Prozess (Asahara, Takahashi et al. 1999; Takahashi, Kalka et al. 1999), der die EPC entlang eines angiogenetischen Gradienten zum ischämischen Bezirk wandern lässt (Heissig, Hattori et al. 2002; Aicher, Heeschen et al. 2003; Aicher, Zeiher et al. 2005). Danach erfolgen die Adhäsion und transendotheliale Migration in das infarzierte Gewebe (Heissig, Hattori et al. 2002; Aicher, Heeschen et al. 2003). Dort differenzieren sich diese Zellen zu ausgereiften Endothelzellen und fördern direkt die Vaskularisation (Asahara, Masuda et al. 1999; Takahashi, Kalka et al. 1999; Gill, Dias et al. 2001; Adams, Lenk et al. 2004; Massa, Rosti et al. 2005; Banerjee, Brilakis et al. 2006). Zudem lösen EPC parakrine Effekte an benachbarten Endothelzellen aus und sekretieren angiogenetische Faktoren, wie VEGF, FGF-2 und Angiopoetin (Rehman, Li et al. 2003).

Shintani et al. beobachteten einen Peak der mobilisierten CD34<sup>+</sup>-Zellen an Tag sieben nach stattgehabtem AMI. Die endogene Plasmakonzentration von VEGF wies zu diesem Zeitpunkt ebenfalls den höchsten Wert auf, sodass eine positive Korrelation zwischen der Anzahl der mobilisierten Zellen und dem Zytokin vermutet wurde (Hattori, Dias et al. 2001; Shintani, Murohara et al. 2001; Massa, Rosti et al. 2005). Auch ein akutes Gefäßtrauma, welches zum Beispiel nach einer Bypass-Operation oder einer akuten Verbrennung vorliegt, induziert eine gesteigerte Mobilisation von EPC (Gill, Dias et al. 2001).

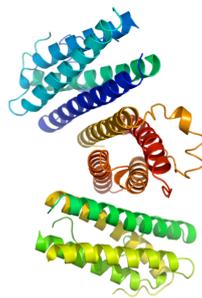
## 2.2.4 Stammzellmobilisierung als Therapieoption für die kardiale Regeneration

Wie im oberen Abschnitt dargestellt, führt ein AMI zu einer erhöhten spontanen Mobilisation von HSC und EPC aus dem Knochenmark zum Ort der Verletzung (Kawamoto, Gwon et al. 2001; Shintani, Murohara et al. 2001). In Anbetracht dieser Tatsache stellt die Mobilisierung endogener, pluripotenter CD34<sup>+</sup>-Stammzellen durch Zytokine eine attraktive, nicht invasive Therapieoption dar, um die kardiale Regeneration nach stattgehabtem Myokardinfarkt zu verbessern (Kovacic, Muller et al. 2005). Diese Technik besitzt den Vorteil, dass auf die Transplantation exogener Zellen verzichtet werden kann und Risiken eines operativen Eingriffs nicht bestehen. Probleme hinsichtlich des Immunsystems, wie auch ethische Aspekte liegen nicht vor. Eine verstärkte Mobilisation der Stammzellen aus dem Knochenmark wird durch die Applikation verschiedener Wachstumsfaktoren, wie G-CSF, GM-CSF oder VEGF induziert, wobei G-CSF das am häufigsten eingesetzte Zytokin im klinischen Alltag darstellt. Es wird seit Jahren in der Transplantationsmedizin v.a. bei immunsupprimierten oder onkologischen Patienten nach autologer Knochenmarktransplantation verwendet (Zhang, Adachi et al. 2006).

## 2.2.5 Wirkstoffe zur Stammzellmobilisierung

### 2.2.5.1 G-CSF

G-CSF ist ein 19,6 kDa (Kilodalton) großes Glykoprotein bestehend aus 174 Aminosäuren, welches hauptsächlich von hämatopoetischen Zellen wie Monozyten/Makrophagen und Lymphozyten, aber auch von Fibroblasten, Endothelzellen, Astrozyten und stromalen Knochenmarkszellen produziert wird.



**Abbildung 3: G-CSF**

Bändermodell des humanen G-CSF Proteins (Hill, Osslund et al. 1993)

Copyright (1993) National Academy of Sciences, U.S.A., (Nachdruck genehmigt)

Die Ausschüttung von G-CSF erfolgt durch physiologischen oder pathologischen Stress, wie z.B. nach einem AMI (Wojakowski, Tendera et al. 2004; Leone, Rutella et al. 2005). G-CSF fördert die Entzündungsprozesse, indem es die Granulopoese stimuliert und somit die Anzahl der zirkulierenden Leukozyten erhöht (Morimoto, Sakata et al. 1990; Wengner, Pitchford et al. 2008). G-CSF reguliert die Produktion von Neutrophilen im KM und stimuliert deren Proliferation, Reifung und Differenzierung (Ripa 2012).

Das Zytokin bindet an seinen spezifischen Zelloberflächenrezeptor, den G-CSF-Rezeptor (G-CSFR, CD114), welcher vier assoziierte zytoplasmatische Tyrosinkinase besitzt. Die Expression des Rezeptors erfolgt hauptsächlich auf Neutrophilen und deren myeloiden Vorläuferzellen (Avalos 1996), aber er ist auch auf der Oberfläche verschiedener anderer Zellen, wie Endothelzellen, neuronale Zellen, aktivierte T-Lymphozyten, Thrombozyten und Kardiomyozyten lokalisiert (Anderlini, Przepiorka et al. 1996; Harada, Qin et al. 2005; Roberts 2005). Die Bindung mit dem Liganden führt zur Aktivierung mehrerer intrazellulärer Signalwege (Avalos 1996), was nachfolgend in der Mobilisierung von Stamm- und Progenitorzellen aus dem Knochenmark resultiert. Neben Neutrophilen mobilisiert G-CSF auch Zellen, die keinen G-CSFR ausbilden, wie Erythrozyten, Megakaryozyten, Lymphozyten und EPC. Verschiedene Arbeiten haben gezeigt, dass eine Unterbrechung der SDF-1 $\alpha$ /CXCR4-Achse einer der Hauptmechanismen der Stammzellmobilisation durch G-CSF darstellt (Levesque, Hendy et al. 2003; Semerad, Christopher et al. 2005). Die Bindung zwischen SDF-1 $\alpha$  und seinem Rezeptor CXCR4 kann über verschiedene Möglichkeiten aufgehoben werden. Zunächst erfolgt eine Ausschüttung von Proteasen durch G-CSFR-tragende neutrophile Granulozyten. Unter anderem werden neutrophile Elastase, Cathepsin-G und MMP-9 sezerniert, welche zu einer proteolytischen Spaltung der SDF-1 $\alpha$ /CXCR4-Bindungsstelle führen (Levesque, Hendy et al. 2003). Die Spaltung des Rezeptors CXCR4 am Epitop 6H8 führt zu dessen Inaktivierung und resultiert in einer Aufhebung der Ankopplung von HSC und EPC im KM (Honold, Lehmann et al. 2006). Die durch neutrophile Granulozyten sezernierte MMP-9 führt, wie in Abschnitt 2.2.2.1 beschrieben, über die proteolytische Spaltung und Umwandlung des membranständigen Kit-Liganden in die lösliche Form sKitL zu einer Mobilisierung von Stammzellen (Heissig, Hattori et al. 2002).

Ein weiterer Mechanismus ist die direkte Beeinflussung der SDF-1 $\alpha$ - und CXCR4-Konzentration im Knochenmark. Nach wiederholten Injektionen mit G-CSF folgt dem repetitiven Anstieg der SDF-1 $\alpha$ -Konzentration ein durch die Proteasen bedingter pulsartiger Abfall. Auch Petit et al. stellten nach G-CSF-Behandlung eine deutliche Reduktion des SDF-1 $\alpha$ -Protein-Spiegels im Knochenmark fest. Dabei korrelierte das Ausmaß der verringerten SDF-1 $\alpha$ -Protein-Expression mit der Menge an mobilisierten Stammzellen (Petit, Szyper-Kravitz et al. 2002). Eine verringerte SDF-1 $\alpha$ -Expression ist auch durch die G-CSF-bedingte,

reduzierte Anzahl an Osteoblasten im KM verursacht (Semerad, Christopher et al. 2005). Des Weiteren führt die G-CSF-Administration zu einer signifikanten Herunterregulation der CXCR4-mRNA-Expression (Kim, De La Luz Sierra et al. 2006; Stein, Zohlnhöfer et al. 2010). Auch die membrangebundene Serin-Protease CD26 (Dipeptidylpeptidase IV; DPPIV), welche von hämatopoetischen Stammzellen exprimiert wird, inaktiviert SDF-1 $\alpha$  durch proteolytische Spaltung am N-Terminus. Die Applikation von G-CSF führt *in vitro* zu einer gesteigerten Expression von CD26. Wie wichtig die Serin-Protease für die Mobilisierung von Stammzellen ist, zeigt eine Studie von Christopherson et al., in der bei CD26-Knockout-Mäusen eine reduzierte Mobilisierung von Stammzellen festgestellt wurde (Christopherson, Cooper et al. 2003; Christopherson, Cooper et al. 2003).

G-CSF wird kommerziell produziert, ist seit vielen Jahren für den klinischen Einsatz zugelassen und besitzt nachweislich ein sicheres Profil (Kovacic, Muller et al. 2007). Als Arzneistoff wird G-CSF rekombinant entweder aus Säugetierzellen (Lenograstim) oder aus *Escherichia coli* (Filgrastim) hergestellt. Die Aminosäuresequenzen von Filgrastim und Lenograstim sind identisch. Das in unserer Studie verwendete Filgrastim ist unter dem Handelsnamen NEUPOGEN<sup>®</sup> der Firma Amgen bekannt und in Deutschland erhältlich. Die Konzentration des Wirkstoffes in NEUPOGEN beträgt 30 Millionen Einheiten (300  $\mu$ g) pro Milliliter. G-CSF wird üblicherweise subkutan appliziert. Die minimale wirksame Dosis beträgt 3,5  $\mu$ g/kg KG pro Tag. Beschriebene Nebenwirkungen treten selten auf und äußern sich in grippeähnlichen Symptomen, wie Myalgien, Arthralgien, Kopfschmerzen und Müdigkeit (Anderlini, Przepiorka et al. 1996). Auch Splenomegalien können auftreten, wobei eine konsekutive Milzruptur nur in sehr seltenen Fällen beobachtet wird (Kovacic, Muller et al. 2007).

Die ersten experimentellen Studien bezüglich der Wirkung von G-CSF nach einem akuten Myokardinfarkt wurden erstmals im Jahre 2001 am Mausmodell durchgeführt (Orlic, Kajstura et al. 2001). Die veröffentlichten Ergebnisse zeigten bei den mit G-CSF behandelten Tieren eine um 40 % geringere Infarktgröße, eine signifikante Verbesserung der Auswurfraction und eine um 68 % niedrigere Mortalität im Vergleich zu der mit Kochsalzlösung behandelten Kontrollgruppe. Nachfolgend wurde in vielen experimentellen Studien an verschiedenen Tiermodellen (Minatoguchi, Takemura et al. 2004; Ohtsuka, Takano et al. 2004; Harada, Qin et al. 2005; Deindl, Zaruba et al. 2006; Kuhlmann, Kirchhof et al. 2006) als auch in klinischen Studien (Kang, Kim et al. 2004; Ince, Petzsch et al. 2005; Ince, Petzsch et al. 2005; Valgimigli, Rigolin et al. 2005; Engelmann, Theiss et al. 2006; Kang, Lee et al. 2006; Ripa, Jorgensen et al. 2006; Zohlnhöfer, Ott et al. 2006) die Wirksamkeit von G-CSF nach AMI untersucht.

### 2.2.5.1.1 Klinische Studien mit G-CSF

In der ersten nicht randomisierten und nicht placebokontrollierten klinischen Studie von Kuethe et al. wurde gezeigt, dass der Einsatz von G-CSF nach AMI durchführbar und sicher ist (Kuethe, Figulla et al. 2005). Auch in anderen klinischen Studien wurden keine schwerwiegenden Nebenwirkungen oder Komplikationen beobachtet (Ince, Petzsch et al. 2005; Ince, Petzsch et al. 2005; Valgimigli, Rigolin et al. 2005; Engelmann, Theiss et al. 2006; Ripa, Jorgensen et al. 2006; Zohlnhöfer, Ott et al. 2006). In der ersten Studie von Kang et al. hingegen wurden erste, ernstzunehmende Komplikationen nach der G-CSF Administration beobachtet. Das vermehrte Auftreten von In-Stent-Restenosen führte zu einem zwischenzeitlichen Abbruch der MAGIC-cell-Studie (Kang, Kim et al. 2004).

Hinsichtlich der Effektivität der G-CSF-Therapie nach AMI und deren Auswirkung auf die myokardiale Regeneration liegen ebenfalls kontroverse Studienergebnisse vor. So konnte in den Arbeiten von Kuethe et al., Valgimigli et al. und in der FIRSTLINE-AMI-Studie gezeigt werden, dass die G-CSF-induzierte Mobilisation von Stammzellen zu einer linksventrikulären Funktionsverbesserung führt und im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Verbesserung der Auswurffraktion vorliegt (Ince, Petzsch et al. 2005; Ince, Petzsch et al. 2005; Kuethe, Figulla et al. 2005; Valgimigli, Rigolin et al. 2005).

In den folgenden Arbeiten (REVIVAL-2, G-CSF-STEMI und STEMMI), die eine erhöhte Patientenzahl und ein besseres Studiendesign aufwiesen (doppelverblindet, placebo-kontrolliert), konnte der positive Effekt von G-CSF nach AMI jedoch nicht reproduziert werden. Weder bezüglich der globalen Kontraktilität noch hinsichtlich der Infarktgröße konnten im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikante Ergebnisse beobachtet werden (Engelmann, Theiss et al. 2006; Ripa, Jorgensen et al. 2006; Zohlnhöfer, Ott et al. 2006).

In der größten bislang veröffentlichten randomisierten Studie, die REVIVAL-2 Studie, an der 114 Patienten teilnahmen, wurden auch keine signifikanten Verbesserungen hinsichtlich der Infarktgröße oder Auswurffraktion beobachtet. Nach sechs Monaten wurde magnetresonanztomographisch lediglich eine geringgradig verbesserte Ejektionsfraktion (G-CSF:  $+0,5 \text{ \%} \pm 3,8$  vs. Kontrolle:  $+2,0 \text{ \%} \pm 4,9$ ) und kleinere Infarktgrößen (G-CSF:  $-6,2 \text{ \%} \pm 9,1$  vs. Kontrolle:  $-4,9 \text{ \%} \pm 8,4$ ) in beiden Gruppen gemessen (Zohlnhöfer, Ott et al. 2006). Eine signifikante Verbesserung der EF im Vergleich zu Studienbeginn konnte jedoch nur in der Placebogruppe festgestellt werden. Eine erhöhte Restenoserate oder andere schwerwiegende unerwünschte kardiale Ereignisse, die in früheren Studien auftraten (Kang, Kim et al. 2004; Hill, Syed et al. 2005), konnten nicht beobachtet werden.

Ein Erklärungsansatz für die Diskrepanz der Daten ist möglicherweise die Wahl des Zeitpunktes der G-CSF Administration nach erfolgter PCI. So könnte ein fehlendes *Homing* der Stammzellen zum ischämischen Bezirk aufgrund des ungünstigen Milieus im infarzierten

Bereich einen erdenklichen Grund darstellen, warum nach erfolgter G-CSF Applikation und der Mobilisation von Stammzellen keine Verbesserung der kardialen Funktion beobachtet werden konnte (Zohlnhöfer, Kastrati et al. 2007; Zohlnhöfer, Dibra et al. 2008), da ein effektives *Homing* und das Anwachsen der mobilisierten Zellen essenziell für die stammzellbasierte Regeneration nach AMI sind (Dimmeler, Zeiher et al. 2005).

Im Tiermodell wurde gezeigt, dass die positiven Effekte auf das *Remodeling* und die Kardiomyozyten nach verzögerter G-CSF Applikation vermindert waren (Harada, Qin et al. 2005). In der FIRSLINE-AMI Studie wurde G-CSF 90 Minuten nach erfolgter PCI appliziert, was nachfolgend in einer Verbesserung der kardialen Funktion resultierte (Ince, Petzsch et al. 2005; Ince, Petzsch et al. 2005). Im Gegensatz dazu wurde in der G-CSF-STEMI-Studie und in der STEMMI-Studie die Applikation von G-CSF erst 31 h bzw. 30 h nach erfolgter PCI durchgeführt, was folglich zu keiner signifikanten Verbesserung der Auswurfraction im Vergleich zu der Kontrollgruppe führte.

In Anlehnung an die Ergebnisse der REPAIR-AMI Studie (Schachinger, Erbs et al. 2006), wurde der Zeitpunkt der G-CSF Applikation in der REVIVAL-2-Studie erst fünf Tage nach erfolgter PCI gewählt. In der doppelverblindeten, placebokontrollierten, multizentrischen Studie von Schachinger et al. wurde beobachtet, dass eine intrakoronare Infusion von KM-Stammzellen innerhalb der ersten vier Tage nach erfolgter PCI nur mit marginalen Effekten hinsichtlich der Verbesserung der kardialen Funktion und Kontraktilität assoziiert ist. Demgegenüber konnte bei den Patienten, die die intrakoronare Stammzellapplikation zu einem späteren Zeitpunkt erhielten, eine signifikante Verbesserung der linksventrikulären Ejektionsfraction beobachtet werden (Schachinger, Erbs et al. 2006). Trotz der publizierten Ergebnisse von Schachinger et al. konnte in der REVIVAL-2 Studie keine signifikante Verbesserung hinsichtlich der kardialen Funktion beobachtet werden (Zohlnhöfer, Ott et al. 2006; Zohlnhöfer, Kastrati et al. 2007). Bezüglich der Auswirkung der G-CSF mobilisierten Stammzellen auf die myokardiale Regeneration wurde 2008 eine Metaanalyse veröffentlicht, in die 445 Patienten von zehn randomisierten, placebokontrollierten Studien eingeschlossen wurden. Die Ergebnisse demonstrieren, dass die Anwendung von G-CSF zwar sicher und durchführbar ist, auf kumulativer Basis jedoch keine Verbesserung der linksventrikulären Funktion nach AMI zu beobachten ist (Zohlnhöfer, Dibra et al. 2008).

Molekularbiologische Analysen der mobilisierten HSC durch G-CSF ergaben, dass eine verminderte Expression von wichtigen Adhäsionsrezeptoren, wie VLA-4, LFA-1, CXCR4, vorliegt und somit die Stammzellen nicht zum Herzen rekrutiert werden konnten. Dies könnte den Misserfolg der G-CSF-Therapie nach AMI erklären (Stein, Zohlnhöfer et al. 2010).

Die wichtigsten klinischen Studien sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Klinische Studien mit G-CSF nach akutem Myokardinfarkt

Studie	n	Kontrolle	Placebo	G-CSF Dosierung und Zeitpunkt der Applikation	Ergebnisse
<b>MAGIC-cell trial</b> (Kang, Kim et al. 2004)	28	Ja	Ja	-10 µg/kg KG für 4 d auch intrakoronare (i.c.) Applikation -vor PCI	Globale Kontraktilität (SPECT) ↑ (nur in i.c. Gruppe)
<b>Kueth et al.</b> (Kueth, Figulla et al. 2005)	14	Nein	Nein	-10 µg/kg KG für 7 d -48 h nach PCI	Globale Kontraktilität (SPECT) ↑
<b>Valgimigli et al.</b> (Valgimigli, Rigolin et al. 2005)	14	Ja	Nein	-5 µg/kg KG für 4 d -24 h nach PCI	Globale Kontraktilität (SPECT) ↑
<b>FIRSTLINE-AMI</b> (Ince, Petzsch et al. 2005; Ince, Petzsch et al. 2005)	50	Nein	Ja	-10 µg/kg KG für 6 d -90 min nach PCI	Globale Kontraktilität (ECHO) ↑
<b>REVIVAL-2</b> (Zohlnhöfer, Ott et al. 2006)	114	Ja	Ja	-10 µg/kg KG für 6 d -5 d nach PCI	Globale Kontraktilität (MRT) in beiden Gruppen ↑ (2,8 % vs. 2,8 %) Infarktgröße (MRT) in beiden Gruppen ↓
<b>G-CSF-STEMI</b> (Engelmann, Theiss et al. 2006)	44	Ja	Ja	-10 µg/kg KG für 5 d -31 h nach PCI	Globale Kontraktilität (MRT) in beiden Gruppen ↑ (6 % vs. 5 %) Infarktgröße (MRT) in beiden Gruppen ↓ Perfusion ↑ (G-CSF)

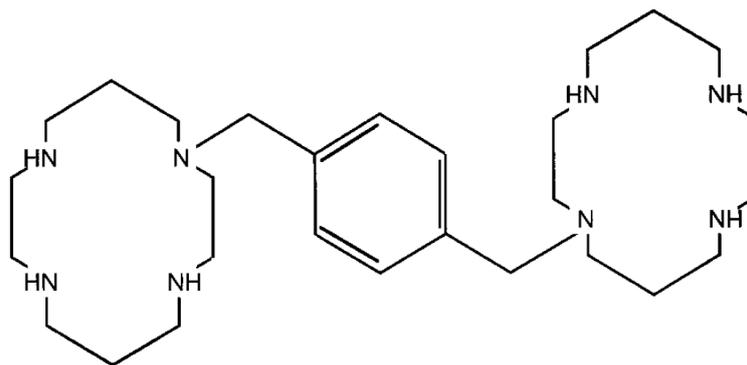
Tabelle 1 (fortgeführt): Klinische Studien mit G-CSF nach akutem Myokardinfarkt

Studie	n	Kontrolle	Placebo	G-CSF Dosierung und Zeitpunkt der Applikation	Ergebnisse
<b>STEMMI</b> (Ripa, Jorgensen et al. 2006)	78	Ja	Ja	-10 µg/kg KG für 5 d -30 h nach PCI	Regionale Herzfunktion (MRT) in beiden Gruppen ↑ (+17 % vs. +17 %) EF in beiden Gruppen ↑ (8 % vs. 8 %)

(G-CSF: engl. *granulocyte-colony stimulating factor*; i.c.: intracoronar; PCI: engl. *percutaneous coronary intervention*, perkutane Koronarintervention; MRT: Magnetresonanztomographie; SPECT: engl. *single-photon emission computed tomography*, Einzel-Photon-Emissions-Computertomographie; ECHO: Echokardiographie; EF: engl. *ejection fraction*, Ejektionsfraktion, Auswurffraktion)

### 2.2.5.2 AMD3100

Ein weiterer Wirkstoff, der zu einer Mobilisierung von Stammzellen aus dem Knochenmark führt, ist der selektive CXCR4-Antagonist AMD3100 oder Plerixafor aus der Gruppe der Bicyklame. Plerixafor ist eine stark basische chemische Verbindung mit acht protonierbaren Stickstoffatomen. Die Zyklamgruppen sind in der Lage, stabile Komplexe mit zweiwertigen Metallionen, insbesondere Zink, Kupfer und Nickel, sowie ferner auch mit Kobalt und Rhodium zu bilden.



**Abbildung 4: Chemische Struktur von AMD3100**

Chemische Formel:  $C_{28}H_{54}N_8$  (Labrosse, Brelot et al. 1998, Nachdruck genehmigt)

AMD3100 wurde von der Firma AnorMED Inc. ursprünglich als Medikament zur Behandlung der HIV-Infektion eingesetzt (De Clercq 2005; De Clercq 2010). Der CXCR4-Rezeptor fungiert als Co-Rezeptor für den lymphotropen HI-Virus (Lusso 2006). AMD3100 führt zu

einer Inhibition der Virusreplikation, indem er den Eintritt und die Membranfusion des HI-Virus blockiert (Donzella, Schols et al. 1998; Hendrix, Collier et al. 2004; Lusso 2006).

Wie in Abschnitt 2.2.2.1 dargestellt ist die SDF-1 $\alpha$ /CXCR4-Interaktion essenziell für die Retention der HSC im KM (Levesque, Hendy et al. 2003). Die reversible Blockierung der SDF-1 $\alpha$ /CXCR4-Achse durch den hochpotenten CXCR4-Rezeptorantagonisten AMD3100 führt innerhalb von 1 h zu einer schnellen und effektiven Mobilisierung von CD34<sup>+</sup>-Zellen aus dem KM in das periphere Blut, indem er die rezeptorvermittelte Signaltransduktion und Internalisierung selektiv inhibiert (Liles, Broxmeyer et al. 2003; Devine, Flomenberg et al. 2004; Broxmeyer, Orschell et al. 2005; Liles, Rodger et al. 2005; Fruehauf, Seeger et al. 2006). Aufgrund der schnellen und effektiven Mobilisation von Stammzellen wird AMD3100 zur Behandlung des multiplen Myeloms und Non-Hodgkins-Lymphoms eingesetzt (Devine, Flomenberg et al. 2004; Calandra, McCarty et al. 2008). In mehreren klinischen und experimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass die kombinierte Therapie mit G-CSF und AMD3100 effektiver Stammzellen aus dem KM mobilisiert als die Applikation von G-CSF alleine (Broxmeyer, Orschell et al. 2005; Flomenberg, Devine et al. 2005; Liles, Rodger et al. 2005; Larochelle, Krouse et al. 2006; Calandra, McCarty et al. 2008). Insbesondere kann dieser synergistische Effekt beobachtet werden, wenn über vier bis fünf Tage eine Vorbehandlung mit G-CSF erfolgt und anschließend AMD3100 einmalig appliziert wird (Broxmeyer, Orschell et al. 2005; Pitchford, Furze et al. 2009). Ein weiterer Vorteil von AMD3100 ist die schnelle Mobilisierung der HSC aus dem KM in das periphere Blut. Bei gesunden Mäusen führt die Applikation von AMD3100 nach 1–3 h zu einer Mobilisierung der Stammzellen, was der Halbwertszeit von AMD3100 von 2–3 h entspricht (Jujo, Hamada et al. 2010). Demgegenüber wird bei der Applikation von G-CSF die größte Anzahl an mobilisierten Zellen am vierten oder fünften Behandlungstag beobachtet (Broxmeyer, Orschell et al. 2005). Die kombinierte Anwendung hat zudem den Vorteil, dass vermehrt EPC aus dem KM mobilisiert werden, was nachfolgend in einer gesteigerten Neovaskularisation resultiert. In experimentellen Studien konnte dieser Effekt anhand des Hinterlauf-Ischämie-Modells dargestellt werden (Capoccia, Shepherd et al. 2006; Shepherd, Capoccia et al. 2006). In einer experimentellen Studie von Jujo et al. wurde gezeigt, dass die einmalige Injektion von AMD3100 1 h nach induziertem Myokardinfarkt zu einer effektiven Mobilisierung von EPC führt (Jujo, Hamada et al. 2010). Die Anwendung von AMD3100 gilt als sicher und durchführbar. In klinischen Studien werden nur milde Nebenwirkungen beobachtet, wie eine lokale Reizung oder Parästhesien an der Injektionsstelle, gastrointestinale Störungen sowie Arthropathien (Liles, Broxmeyer et al. 2003; Calandra, McCarty et al. 2008). Des Weiteren werden Blutbildveränderungen mit einem Anstieg der Leukozytenzahl und einer Verringerung der Thrombozytenzahl beobachtet.

### 2.2.5.3 VEGF

Einer der wichtigsten proangiogenetischen Wachstumsfaktoren ist VEGF. Die VEGF-Familie umfasst insgesamt sieben Mitglieder: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, PlGF (engl. *placental growth factor*), sowie das virale VEGF-E und das im Schlangengift vorhandenen VEGF-F (Ferrara, Gerber et al. 2003).

VEGF-A wirkt stimulierend auf das Gefäßwachstum und wird aufgrund seiner großen Bedeutung im unteren Abschnitt näher erläutert. VEGF-B ist in vielen Geweben lokalisiert, unter anderem im Pankreas, in der Skelettmuskulatur und im Herzen, für dessen Entwicklung es essenziell ist (Olofsson, Pajusola et al. 1996; Hoeben, Landuyt et al. 2004). VEGF-C und VEGF-D sind als parakrine Faktoren wichtig für die Lymphangiogenese (Kukk, Lymboussaki et al. 1996). VEGF-C stimuliert wie VEGF-A die Migration und Proliferation von Endothelzellen. Im Gegensatz zu VEGF-A wirkt es sowohl auf vaskuläre als auch auf lymphatische Endothelzellen stimulierend. VEGF-C wird vor allem im Herzen, in der Schilddrüse, im Dünndarm, in der Plazenta und in den Eierstöcken exprimiert. Die VEGF-D Expression erfolgt in der Lunge, im Herzen, in der Skelettmuskulatur sowie im Kolon und Dünndarm (Hoeben, Landuyt et al. 2004). PlGF ist hauptsächlich in der Plazenta lokalisiert, wobei es auch in geringeren Konzentrationen in der Skelettmuskulatur, Schilddrüse und Lunge vorhanden ist (Maglione, Guerriero et al. 1991).

VEGF-A, nachfolgend nur als VEGF bezeichnet, ist der wichtigste Wachstumsfaktor im Hinblick auf das Gefäßwachstum (siehe Abschnitt 2.2.3.1) und gilt als potentester Stimulus für die Induktion der Angiogenese (Carmeliet 2000; Ferrara, Gerber et al. 2003; Ferrara 2004). VEGF ist ein 34-42 kDa schweres Glykoprotein und besteht aus einem antiparallelen Homodimer, das intermolekular durch Disulfidbrücken verbunden ist. Das humane VEGF-Gen besteht aus acht Exons, die durch alternatives Spleißen der mRNA sechs Isoformen (Tischer, Mitchell et al. 1991; Park, Keller et al. 1993) mit einer Aminosäureanzahl von 121, 145, 165, 183, 189 und 206 kodieren (VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>183</sub>, VEGF<sub>189</sub>, VEGF<sub>206</sub>). VEGF<sub>165</sub> stellt die wichtigste Isoform dar und ist die biologisch aktivste Form (Ferrara 2004). Es bindet Heparin und Proteoglykane von Zelloberflächen und liegt wie das nicht heparinbindende VEGF<sub>121</sub> in löslicher Form vor, während die anderen Isoformen an die extrazelluläre Matrix der Zelloberfläche gebunden sind (Houck, Ferrara et al. 1991).

VEGF wird vor allem durch Hypoxie und einen verminderten Sauerstoffpartialdruck induziert. Weitere Faktoren für die vermehrte Ausschüttung von VEGF sind Hypoglykämie, Entzündungen, Wundheilungsprozesse und Tumorerkrankungen (Neufeld, Cohen et al. 1999). Der durch Hypoxie induzierbare Transkriptionsfaktor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) reguliert die Expression von VEGF bei verschiedenen O<sub>2</sub>-Gewebekonzentrationen (Stein, Neeman et al. 1995). HIF-1 ist ein Heterodimer, der aus einer HIF-1 $\alpha$  und HIF-1 $\beta$ -Untereinheit besteht

(Wang, Jiang et al. 1995; Hoeben, Landuyt et al. 2004). HIF-1 $\beta$  wird kontinuierlich exprimiert und ist stabil, währenddessen HIF-1 $\alpha$  unter normoxischen Bedingungen hydrolysiert wird und nur unter hypoxischen Konditionen stabil ist. Mit sinkender O<sub>2</sub>-Konzentration steigt die Expression von HIF-1 $\alpha$  exponentiell an. Der verminderte Sauerstoffpartialdruck führt dazu, dass beide Untereinheiten den funktionsfähigen Transkriptionsfaktor bilden, der über die Bindung an die Enhancer-Sequenz des VEGF-A Gens die Transkription induziert (Iyer, Kotch et al. 1998). So erfolgt z.B. bei einem Myokardinfarkt aufgrund der Ischämie eine vermehrte Hochregulation von HIF-1 $\alpha$ , was nachfolgend in einer verstärkten VEGF-Transkription resultiert (Takahashi, Kalka et al. 1999; Gill, Dias et al. 2001; Shintani, Murohara et al. 2001). Es entsteht ein Gradient, an dem entlang EPC in das ischämisch geschädigte Gewebe migrieren. Die EPC werden in das residente Kapillarnetz inkorporiert, wo sie proliferieren und angiogenetische Wachstumsfaktoren abgeben, was zur Angiogenese durch Aussprossen neuer Kapillaren beiträgt (Asahara, Takahashi et al. 1999).

### **Funktionen von VEGF**

VEGF stimuliert die Migration, Proliferation und Differenzierung von Endothelzellen im Rahmen der Vaskulogenese und Angiogenese (Carmeliet 2000). Wie wichtig VEGF für die embryonale Vaskulogenese ist, zeigt eine Veröffentlichung von Ferrera et al., in der die Ausschaltung eines VEGF-Allels aufgrund der verminderten Gefäßaussprossung und fehlerhaften Herzgefäßentwicklung zur embryonalen Letalität führt (Ferrara 1996). VEGF unterstützt mittels antiapoptotischer Signalwege das Überleben der Endothelzellen und fördert die Formation neuer Blutgefäße (Gerber, McMurtry et al. 1998; Ferrara, Gerber et al. 2003). Der Wachstumsfaktor führt zu einer morphologischen Veränderung des Endothelzellverbandes, wie der Fenestrierung von Endothelzellen, welche in einer erhöhten Gefäßpermeabilität für Plasmaproteine resultiert (Neufeld, Cohen et al. 1999). Des Weiteren wird die endotheliale Funktion über die Produktion des vasodilatatorisch wirkenden Stickstoffmonoxids reguliert, welches durch die eNOS produziert wird und die Neovaskularisation stimuliert (Kroll and Waltenberger 1999). Eine weitere angiogenetische Eigenschaft von VEGF besteht in seiner chemotaktischen Wirkung auf EPC, zirkulierende Monozyten und Leukozyten durch die Induktion von Zelladhäsionsmolekülen. Es wurde weiterhin gezeigt, dass VEGF die Anzahl der im Blut zirkulierenden Stamm- und Progenitorzellen erhöht (Asahara, Takahashi et al. 1999; Hattori, Dias et al. 2001).

**VEGF-Rezeptoren**

Die VEGF-Wirkung wird durch drei VEGF-Rezeptortypen (VEGFR-1, syn. Flt-1; VEGFR-2, syn. KDR oder Flk-1; VEGFR-3) und einen Co-Rezeptor (Neuropilin) vermittelt, wobei der VEGFR-2 den proangiogenetischen, mitogenen und antiapoptotischen Rezeptortyp darstellt (Neufeld, Cohen et al. 1999). VEGFR-1 und VEGFR-2 werden hauptsächlich auf Endothelzellen exprimiert und befinden sich vor allem in Blutgefäßen. Sie regulieren die Angiogenese und Vaskulogenese.

**VEGFR-1**

Die Bindung an VEGFR-1 bzw. Flt-1 führt zu einer verstärkten vaskulären Permeabilität, zu einer Migration von Monozyten, zu einer Förderung der Hämatopoese sowie zu einer Rekrutierung von Stamm- und Progenitorzellen aus dem KM (Wang and Keiser 1998; Olsson, Dimberg et al. 2006). Die Hemmung von Flt-1 blockiert somit das Wachstum und die Differenzierung von Stammzellen. PlGF als selektiver Flt-1 Agonist fördert hingegen die Mobilisierung von Stamm- und Progenitorzellen aus dem KM (Hattori, Heissig et al. 2002; Roy, Bhardwaj et al. 2006). Die Expression des Flt-1 Rezeptors, aber nicht die des Flk-1 Rezeptors, wird von VEGF mithilfe eines HIF-1-abhängigen Mechanismus durch Hypoxie gesteigert, da das Flt-1 Gen einen Hypoxie-induzierbaren Enhancer in der Promotorregion besitzt (Gerber, Condorelli et al. 1997).

**VEGFR-2**

Für die mitogenen, angiogenen und permeabilitätssteigernden Effekte von VEGF ist der VEGFR-2 verantwortlich (Ferrara, Gerber et al. 2003; Olsson, Dimberg et al. 2006). Er wird von vielen Zellen, wie Endothelzellen, zirkulierenden endothelialen Vorläuferzellen, hämatopoetischen Stammzellen, neuronalen Zellen und Osteoblasten exprimiert. Die Bindung an den VEGFR-2 führt zu einer erhöhten Proliferation, Migration und Differenzierung von EPC. Außerdem werden antiapoptotische Effekte über die Aktivierung des PI3/Akt-Signalweges vermittelt (Gerber, McMurtrey et al. 1998). Der auch als KDR oder Flk-1 bekannte Rezeptor nimmt somit eine Schlüsselrolle in der Vaskulogenese und Angiogenese während der embryonalen Entwicklung ein (siehe Abschnitt 2.2.3.1). In einer experimentellen Studie wurde nachgewiesen, dass Mäuse, denen Flk-1 fehlt, nicht lebensfähig sind. Die Embryonen versterben an den Tagen 8,5 bis 9,5 *post coitum* aufgrund eines Defekts in der Entwicklung der hämatopoetischen und endothelialen Zellen (Shalaby, Rossant et al. 1995).

**VEGFR-3**

VEGFR-3, an den VEGF-C und VEGF-D binden, ist vorzugsweise im lymphatischen System lokalisiert. Er reguliert die Vaskulogenese und Lymphangiogenese (Ferrara, Gerber et al. 2003; Olsson, Dimberg et al. 2006).

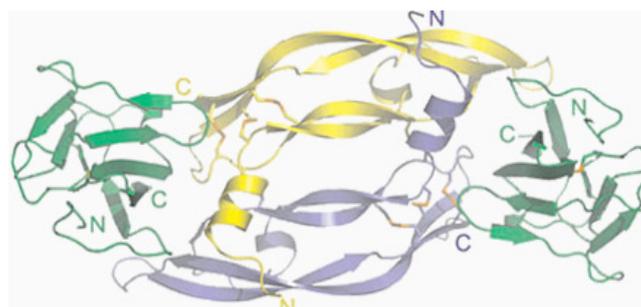
Die verschiedenen Mitglieder der VEGF-Familie und ihre Bindungspartner sind nachfolgend tabellarisch dargestellt (siehe Tab. 2).

Tabelle 2: Die Mitglieder der VEGF-Familie und die Bindung an ihre Rezeptoren

VEGF	Rezeptoren	Funktion
VEGF-A	VEGFR-1, VEGFR-2, NRP-1	Angiogenese
VEGF-B	VEGFR-2	Angiogenese
VEGF-C	VEGFR-2, VEGFR-3	Lymphangiogenese
VEGF-D	VEGFR-2, VEGFR-3	Lymphangiogenese
VEGF-E	VEGFR-2	Angiogenese
PlGF	VEGFR-1, NRP-1	Angiogenese, Inflammation

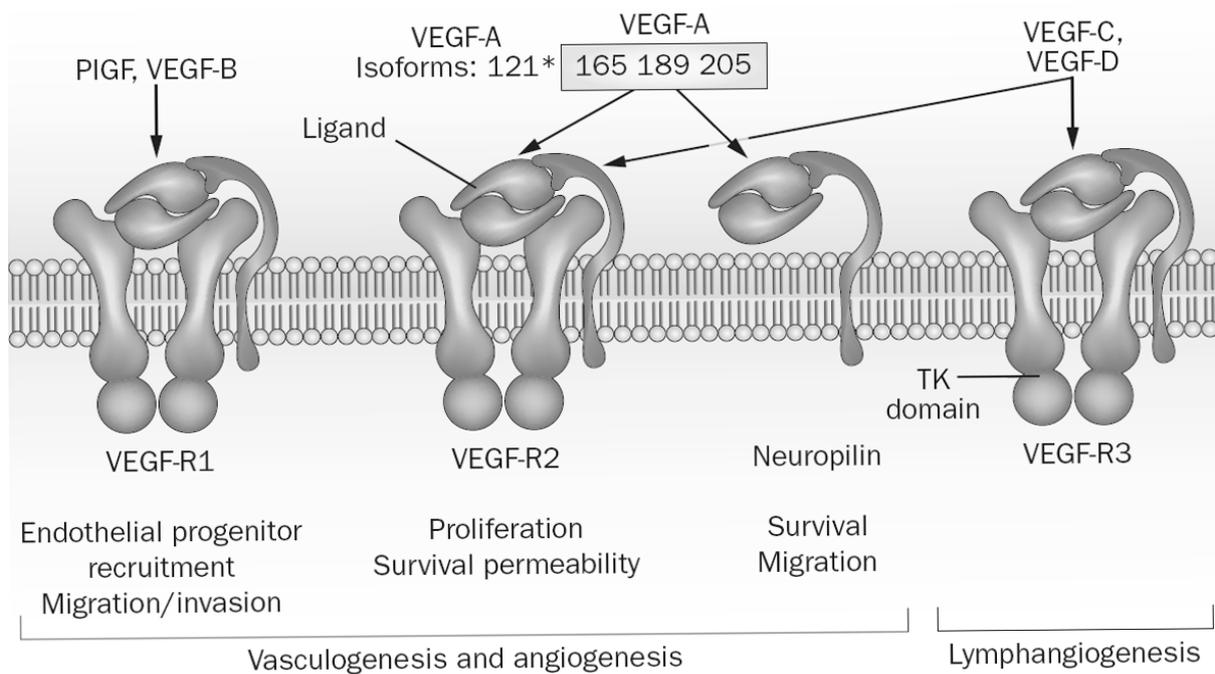
(VEGF: engl. *vascular endothelial growth factor*; VEGFR: VEGF-Rezeptor; NRP: Neuropilin; PlGF: engl. *placental growth factor*)

Die Rezeptortyrosinkinasen verfügen über sechs (VEGFR-3) bzw. sieben (VEGFR-1 und -2) extrazelluläre immunglobulinähnliche Domänen, an die die Wachstumsfaktoren binden. Die Ligandenbindung löst nachfolgend eine Dimerisierung der Rezeptoren aus, was zu einer Autophosphorylierung der Tyrosinreste führt und somit zu einer Aktivierung der Rezeptoren und Signalweiterleitung zum Kern (Ferrara 1999; Ferrara, Gerber et al. 2003; siehe Abb.5 und 6). Die Neuropiline (NRP) -1 und -2 fungieren als Co-Rezeptoren für VEGF (Zachary 2001).



**Abbildung 5: VEGF/VEGFR-1 Komplex**

Die Abbildung zeigt den dimerisierten VEGF/VEGF-Rezeptor-1 Komplex. Das antiparallele Homodimer von VEGF (blau und gelb) ist mit dem VEGFR-1 (grün) verbunden. Die Bindung führt zu einer Autophosphorylierung der Tyrosinreste und zu einer Signalweiterleitung (Ferrara 2004, Nachdruck genehmigt).



**Abbildung 6: VEGF-Rezeptoren**

VEGF vermittelt über die Bindung an die verschiedenen Rezeptoren (VEGFR-1, -2 und -3) unterschiedliche Effekte. So führt die Bindung an den VEGFR-1 zu einer Rekrutierung von endothelialen Progenitorzellen und zu einer gesteigerten Migration der Endothelzellen. Die Bindung an VEGFR-2 führt zu einer verstärkten Proliferation und über die Aktivierung von antiapoptotischen Signalwegen wird das Überleben der Endothelzellen verbessert. Die Bindung an VEGFR-3 resultiert in einer gesteigerten Lymphangiogenese (Grothey and Galanis 2009, Nachdruck genehmigt).

### **3 ZENTRALE FRAGESTELLUNG, DIE DER ARBEIT ZUGRUNDE LIEGT**

Bis zum heutigen Tag wurde noch keine ausreichende Therapie etabliert, die die kardiale Regeneration nach AMI verbessert. Aus diesem Grund werden neue pharmakologische Therapieoptionen dringend benötigt.

Ein möglicher Ansatzpunkt zur Förderung der kardialen Regeneration ist die Stammzellmobilisation mithilfe verschiedener Zytokine und Wachstumsfaktoren.

G-CSF galt lange Zeit als ein vielversprechendes Zytokin, die kardiale Funktion nach AMI durch die Mobilisierung von Stamm- und Progenitorzellen zu verbessern. In klinischen Studien nach AMI führte es jedoch zu keiner signifikanten Reduktion der Infarktgröße oder Verbesserung der Auswurfraction (Zohnhöfer, Ott et al. 2006; Abdel-Latif, Bolli et al. 2008; Zohnhöfer, Dibra et al. 2008). In einer Studie wurden sogar vermehrte Restenoseraten nach erfolgter PCI beobachtet (Kang, Kim et al. 2004), was eventuell auf die vermehrte Rekrutierung von Leukozyten zurückzuführen ist. Aus diesem Grund wäre die Anwendung eines weniger proinflammatorischen Zytokins zur Mobilisierung von Stamm- und Progenitorzellen bei Patienten mit KHK zu präferieren (Aicher, Zeiher et al. 2005). Auch die insuffiziente Mobilisierung von EPC könnte ein Erklärungsansatz für das Ausbleiben des Therapieerfolges darstellen, da eine effektive Neoangiogenese durch die Rekrutierung von EPC in das ischämische Myokard essenziell für die kardiale Regeneration ist. Aus diesem Grund richten neuere Studien ihre Aufmerksamkeit auf die Mobilisation von EPC. In einer Studie von Pitchford et al. wurden die Wirkstoffe G-CSF und VEGF mit und ohne Kombination mit dem CXCR4-Antagonisten AMD3100 hinsichtlich der Mobilisation verschiedener Stammzellpopulationen untersucht. VEGF im Kombination mit AMD3100 führte bei gesunden, nicht ischämischen Mäusen zu einer effektiven Mobilisierung von EPC (Pitchford, Furze et al. 2009).

Im Hinblick auf die oben genannten Forschungsergebnisse sollen in der vorliegenden Arbeit folgende Wirkstoffe und Wirkstoffkombinationen bezüglich ihrer Mobilisationskapazität von verschiedenen Stamm- und Progenitorzellen im Vergleich zu der mit Kochsalzlösung behandelten Kontrollgruppe nach induziertem Myokardinfarkt im Mausmodell untersucht werden: G-CSF, G-CSF/AMD3100, VEGF, VEGF/AMD3100, AMD3100.

Folgende Fragen standen dabei im Vordergrund:

- Führt ein Wirkstoff oder eine Wirkstoffkombination zu einer effektiven Mobilisation von EPC?
- Führt eine mehrtägige Behandlung der verschiedenen Wirkstoffe zu einer verbesserten Neovaskularisation des Infarktgebietes?
- Kann 28 Tage nach erfolgter LAD-Ligation durch die Applikation der Wirkstoffe eine positive Auswirkung auf die Hämodynamik, insbesondere die kardiale Pumpfunktion beobachtet werden?
- Führt einer der Wirkstoffe zu einer verminderten Infarktgröße und wirkt sich positiv auf das *Remodeling* aus?
- Führt ein Behandlungsregime zu einer verbesserten Überlebensrate?

## **4 MATERIAL UND METHODEN**

### **4.1 Versuchstiere**

Der Antrag auf Genehmigung eines Tierversuchsvorhabens nach § 8 Abs. 1 des Tierchutzgesetzes wurde von dem Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin (LaGeSo) genehmigt (Genehmigungsnummer: G0031/09).

Für das Tiermodell wurden sechs bis acht Wochen alte, männliche Mäuse des Stammes FVB/N verwendet. Die Tiere wurden bei der Firma Charles River GmbH (Sulzfeld, Deutschland) gezüchtet und hatten zum Zeitpunkt der Operation ein Gewicht von ca. 20–25 g.

#### **4.1.1 Tierhaltung**

Die Haltung der Mäuse erfolgte in den Tierställen des Campus Benjamin Franklin. Das Betreten der Ställe war nur mit entsprechender Schutzkleidung und personenlimitierter Zutrittskontrolle gestattet. Die Betreuung der Tiere fand durch speziell ausgebildete Versuchstierpfleger statt. Die Raumtemperatur mit  $22\text{ °C} \pm 2$  und einer relativen Luftfeuchtigkeit von  $45\% \pm 5$  wurde konstant eingehalten. Die Belichtung erfolgte in einem 12-Stunden-Hell-Dunkel-Rhythmus. Es wurden jeweils vier Tiere in einem Makrolonkäfig III auf staubfreiem Weichholzgranulat der Firma ssniff gehalten. Häuser als Rückzugsmöglichkeit, Weichholzspielzeug sowie diverse Nestbaumaterialien wie Wattepadts und Zellstofftücher, dienten als *“environmental enrichment”*. Das Futter der Firma ssniff (Inhalts- und Zusatzstoffe: Rohprotein 22,00 %, Rohfett 4,50 %, Rohfaser 3,90 %, Rohasche 6,70 %, Calcium 1,00 %, Phosphor 0,70 %, Natrium 0,24 %, Vitamine und Spurenelemente) sowie Wasser standen den Mäusen *ad libitum* zur Verfügung. Alle Materialien wurden vor Gebrauch autoklaviert. Durch regelmäßiges Hygienemonitoring sowie serologische, parasitologische und mikrobiologische Qualitätskontrollen wurde die Keimfreiheit der Tiere garantiert. Das Hygienemanagement und die Haltung unter spezifiziert pathogenfreien (SPF) Bedingungen entsprachen den Anforderungen der *Federation of European Laboratory Animal Science Association* (FELASA).

## 4.2 Materialien

### 4.2.1 Wirkstoffe

Wirkstoff	Synonym/ Handelsname	Dosierung pro kg KG	Bezugsquelle
AMD3100	Plerixafor, Octahydrochlorid	5 mg	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
G-CSF	Neupogen <sup>®</sup> , Filgrastim	250 µg	Amgen GmbH, München
VEGF	rekombinantes murines VEGF	100 µg	Peprtech GmbH, Hamburg

### 4.2.2 Pharmaka

Wirkstoff	Handelsname	Dosierung pro kg KG	Bezugsquelle
Atipamezol	Antisedan <sup>®</sup>	2,5 mg	Pfizer Pharma GmbH, Karlsruhe
Buprenorphin	Temgesic <sup>®</sup>	0,1 mg	ESSEX PHARMA, München
Fentanyl	Fentanyl-Janssen <sup>®</sup>	0,05 mg	Janssen-Cilag GmbH, Neuss
Flumazenil	Anexate <sup>®</sup>	0,5 mg	Hoffmann-La Roche AG, Grenzach- Whylen
Isofluran	Forene <sup>®</sup>	1–2 % <i>per inhalationem</i>	Abbott, Billingstadt, Schweden
Medetomidin	Dormitor <sup>®</sup>	0,5 mg	Pfizer Pharma GmbH, Karlsruhe
Midazolam	Dormicum <sup>®</sup>	5,0 mg	Hoffmann-La Roche AG, Grenzach- Whylen
Pentobarbital	Narkoren <sup>®</sup>	300 mg	Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland

### 4.2.3 Operationszubehör

Operationszubehör	Bezugsquelle
Aqua ad injectabilia	B. Braun Melsungen AG
Augensalbe (Bepanthen®)	Bayer AG, Leverkusen
Chirurgisches Operationsbesteck	FST Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Chirurgisches Nahtmaterial (7-0 Prolene®, 6-0 Mersilene®, 6-0 Vicryl®)	Ethicon, Norderstedt
Enthaarungscreme (Veet®)	Reckitt Benckiser, Mannheim
Hautdesinfektionsmittel (Softasept®N)	B. Braun Melsungen AG
Micro-Tip®-Druck/Volumen-Katheter (1.4F)	Millar® Instruments, ADInstruments GmbH, Spechbach
Natrium-Chlorid-Lösung 0,9%ig	B. Braun Melsungen AG
Saugtupfer (Ethikeil®)	Ethicon, Norderstedt
Venenverweilkatheter (Vasofix® Braunüle®, 22 Gauge)	B. Braun Melsungen AG

### 4.2.4 FACS-Antikörper

Antikörper	Isotype	Verdünnung	Bezugsquelle, #Artikelnummer
CD16/CD32 LEAF™	Ratte IgG2a	1:100	BioLegend GmbH, Fell, #101310
iso-APC	Ratte IgG2a	1:100	BioLegend GmbH, Fell, #400511
iso-PE	Ratte IgG2a	1:100	BioLegend GmbH, Fell, #400507

<b>Flk1/VEGFR2 Alexa Fluor® 647</b>	Ratte IgG2a	1:100	BioLegend GmbH, Fell, #121910
<b>Sca-1 PE</b>	Ratte IgG2a	1:200	BD Biosciences, Heidelberg, #12- 5981-83
<b>c-Kit APC anti Maus</b>	Ratte IgG2a	1:100	BioLegend GmbH, Fell, #105812
<b>PE anti Maus CD202b (Tie-2)</b>	Ratte IgG1	1:100	BioLegend GmbH, Fell, #124007

#### 4.2.5 Immunfluoreszenz-Antikörper

<b>Primärantikörper</b>	<b>Isotype</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Bezugsquelle, #Artikelnummer</b>
<b>CD 31/PECAM-1 Kaninchen polyklonal</b>	Kaninchenserum	1:100	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, #sc-1506-R

<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Isotype</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Bezugsquelle, #Artikelnummer</b>
<b>Anti Kaninchen Alexa Fluor 488® Ziege polyklonal</b>	Ziegenserum	1:100	Invitrogen GmbH, Darmstadt , #A11008

#### 4.2.6 Chemikalien und Lösungen

<b>Chemikalien und Lösungen</b>	<b>Bezugsquelle, #Artikelnummer</b>
<b>Anilinblau</b>	Chroma, Waldeck GmbH & Co. KG, Münster, #1B-501
<b>BSA (Bovine Serum Albumin)</b>	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
<b>Dako REAL™ Antibody Diluent</b>	Dako, Glostrup, Dänemark
<b>DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)</b>	Dako, Glostrup, Dänemark
<b>Dulbecco´s PBS</b>	PAA Laboratories GmbH, Pasching Österreich

<b>Eosin-Färbelösung</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
<b>Essigsäure 100 %</b>	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, #1.00063.1011
<b>EtOH 96 %</b>	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
<b>FCS (Fetal Calf Serum)</b>	Biochrom AG, Berlin
<b>Ficoll (Biocoll Seperating Solution)</b>	Biochrom AG, Berlin
<b>Formalin 37 %</b>	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
<b>Harris Hämatoxylin</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
<b>HCl (2 mol/l)</b>	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, #1.09063.100
<b>Milchpulver</b>	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
<b>Molybdänphosphorsäure 1 %</b>	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, #44401
<b>Natriumazid (NaN<sub>3</sub>)</b>	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
<b>Natriumchlorid (NaCl)</b>	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
<b>Natronlauge (NaOH, 1 mol/l)</b>	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, #K021.1
<b>Ziegenserum (Normal Goat Serum)</b>	BIOZOL, Eching
<b>Rattenserum (Normal Rat Serum)</b>	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
<b>Paraformaldehyd</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
<b>Paraplast regular</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
<b>Säurefuchsin</b>	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, #T128.1
<b>tri-Natriumcitrat-Dihydrat</b>	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, #1.06448.1000
<b>TRIS Ultra Qualität</b>	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
<b>TTC (2, 3, 5-Triphenyltetrazoliumchloride)</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
<b>Wasserstoffperoxid</b>	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
<b>Weigerts Eisenhämatoxylin</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
<b>Xylidin-Ponceau</b>	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, # 5938.2
<b>Xylol (Xylene)</b>	J.T. Baker, Phillipsburg, N. J., USA

#### 4.2.7 Zusammensetzung verwendeter Pufferlösungen

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
<b>Citrat-Puffer</b>	2,941 g tri-Natriumcitrat-Dihydrat in 800 ml H <sub>2</sub> O lösen auf pH 6 einstellen ad 1000 ml H <sub>2</sub> O

<b>FACS-Puffer</b>	2,5 ml BSA 0,05 ml Natriumazid ad 500 ml Dulbecco's PBS
<b>TRIS-Puffer</b>	60,5 g TRIS Ultra Qualität in 700 ml H <sub>2</sub> O lösen auf pH 7,6 einstellen ad 1000 ml H <sub>2</sub> O darin 90 g NaCl lösen

#### 4.2.8 TTC-Färbung

TTC-Färbelösung	Menge
<b>2, 3, 5-Triphenyltetrazoliumchlorid Pulver</b>	1 g
<b>PBS</b>	100 ml auf pH 7,4 einstellen

#### 4.2.9 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
<b>1 ml Spritzen BD Plastipak™</b>	BD Biosciences, Heidelberg
<b>15 ml BD Falcon™</b>	BD Biosciences, Heidelberg
<b>50 ml BD Falcon™</b>	BD Biosciences, Heidelberg
<b>96-well-Rundbodenplatte</b>	BD Biosciences, Heidelberg
<b>Biopsie-Einbettkassetten</b>	Sanowa Laborprodukte GmbH, Leimen
<b>Deckgläser (24x50 mm)</b>	R. Langenbrinck, Emmendingen
<b>Eindeckmedium (Eukitt)</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
<b>Einmal-Skalpelle</b>	Feather, Osaka, Japan
<b>Eppendorfgefäß</b>	Eppendorf, Wesseling- Berzdorf
<b>FACS-Röhrchen (12x75 mm) BD Falcon™</b>	BD Biosciences, Heidelberg
<b>Fluorescent Mounting Medium</b>	Dako, Glostrup, Dänemark
<b>Kapillarröhrchen (Microvette®)</b>	Sarstedt, Nümbrecht
<b>Pasteurpipetten</b>	VWR International GmbH, Darmstadt
<b>Pipettenspitzen</b>	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
<b>SuperFrost®Plus Objektträger</b>	R. Langenbrinck, Emmendingen

#### 4.2.10 Geräte

Geräte	Bezugsquelle
Beatmungsgerät (Mini Vent Type 845)	Hugo Sachs, March-Hugstetten
FACS Canto II	BD Biosciences, Heidelberg
Kälteplatte TES 99	MEDITE Medizintechnik
Mikroskop Leica DFC340 FX	Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar
Mikroskop Olympus SZ 40	Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster
Operationsmikroskop Leica M125	Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar
Pipette 2-20 µl	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Pipette 20-200 µl	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Pipette 100-1000 µl	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
8-Kanalpipette 20-200 µl	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Rotationsmikrotom Microm HM 355	Microm GmbH, Walldorf
Rotilabo <sup>®</sup> -Mini-Zentrifuge	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Scanner (Snapscan Touch)	Agfa, Köln
Temperatursonde	FHC, Bowdoin, ME, USA
Wärmematte	FHC, Bowdoin, ME, USA
Wasserbad (Microm SB 80)	Microm GmbH, Walldorf
Zentrifuge (Varifuge 3.OR)	Heraeus Sepatech, Osterode
Zentrifuge (Multifuge 1S-R)	Heraeus Sepatech, Osterode

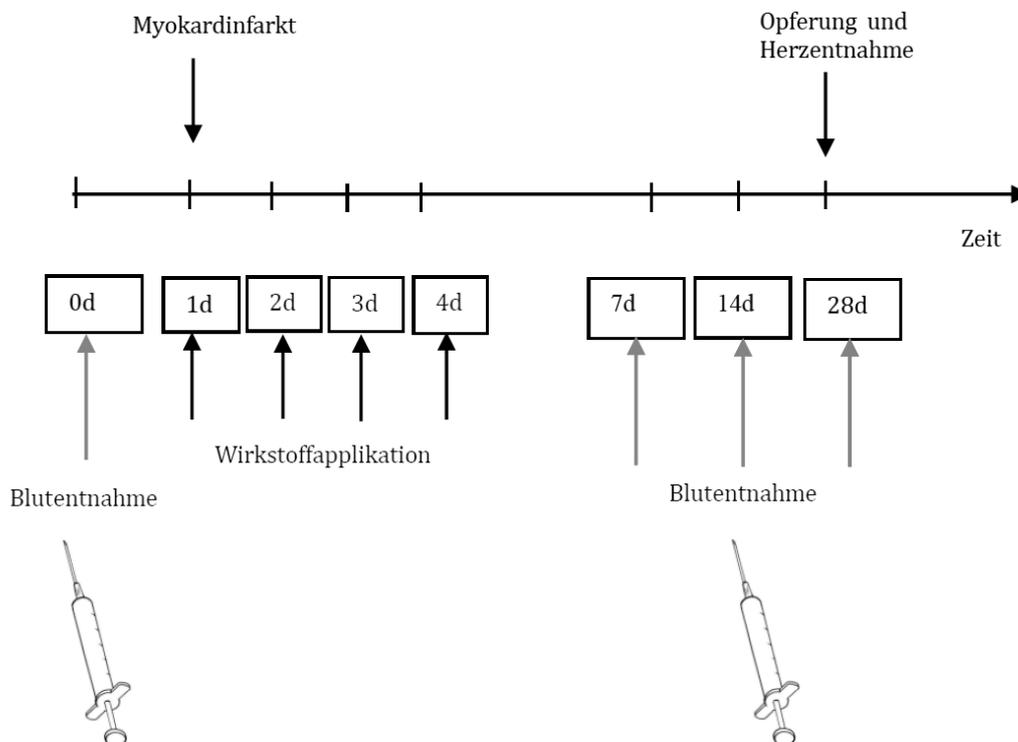
#### 4.2.11 Software

Programm	Bezugsquelle
FACSDiva <sup>™</sup>	BD Biosciences, Heidelberg
FlowJo	Flow cytometry Analysis Software, TreeStar Ashland OR USA
GraphPad PRISM Version 5.0	GraphPad Software
ImageJ Version 1.44o	National Institutes of Health, USA
Leica Application Suite V3.4.0	Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar
PVAN Software, LabChart <sup>®</sup> 7.2	AD Instruments, Spechbach
EndNote X4 und X7	Thomson Reuters, New York, USA

## 4.3 Methoden

### 4.3.1 Versuchsaufbau

Die Gesamtdauer des Versuches betrug 28 Tage. Die Mäuse wurden anhand der Applikation von unterschiedlichen Wirkstoffen in sechs verschiedene Behandlungsgruppen randomisiert (siehe Tab. 3). Einen Tag vor der OP (Tag 0) wurde den Mäusen Blut aus der Schwanzvene entnommen. Die Blutproben wurden durchflusszytometrisch untersucht. An Tag 1 erfolgte die Myokardinfarktinduktion mit Ligatur des *Ramus interventricularis anterior* der linken deszendierenden Koronararterie (LAD, engl. *left anterior descending artery*). Die subkutane Wirkstoffapplikation begann eine Stunde nach OP und erfolgte nach den Behandlungsschemata, die in Abb. 7 und Tab. 3 dargestellt sind. Nach 7, 14 und 28 Tagen wurden erneut Blutproben entnommen, um diese in einer anschließenden durchflusszytometrischen Untersuchung zu analysieren. Die Untersuchung der linksventrikulären Funktion erfolgte mittels Herzkatheter an Tag 28. Nach der Euthanasie der Mäuse und Entnahme der Herzen erfolgte anhand der CD31<sup>+</sup>-Immunfluoreszenzfärbung die Bestimmung der Kapillardichte im kardialen Gewebe. Mithilfe der Masson-Trichrom-Färbung wurde das Ausmaß der linksventrikulären Fibrose bestimmt. Die Infarktgröße wurde anhand TTC-Färbung (2-, 3-, 5-Triphenyltetrazoliumchloride) ermittelt. Die Zuordnung der entnommenen Herzen und der histologischen Präparate zu den unterschiedlichen Wirkstoffgruppen erfolgte erst nach deren Auswertung.



### **Abbildung 7: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus**

Die Versuchsdauer betrug 28 Tage. Die Mäuse wurden in sechs verschiedene Versuchsgruppen randomisiert. An Tag 1 erfolgte die Myokardinfarktinduktion. Anschließend begann die Applikation der unterschiedlichen Wirkstoffe. An den Tagen 0, 7, 14 und 28 wurden Blutproben für die FACS-Analyse entnommen. Nach der Euthanasie der Tiere wurden die Herzen für die weiterführenden Untersuchungen entnommen.

#### **4.3.1.1 Versuchsgruppen und Versuchsplanung**

Insgesamt wurden 177 Mäuse in sechs Behandlungsgruppen randomisiert, sodass eine Gesamtzahl von n=30 Mäusen pro Wirkstoffgruppe zur Verfügung stand. Da jedoch laut verschiedener Literaturangaben von einer Mortalitätsrate von bis zu 50 % nach stattgehabtem Myokardinfarkt ausgegangen werden muss (Ad and Oron 2001; Orlic, Kajstura et al. 2001; Beltrami, Barlucchi et al. 2003; Leor, Rozen et al. 2006; van den Borne, van de Schans et al. 2009), reduzierte sich die zu erwartende Gesamtzahl auf n=15 Tier pro Wirkstoffgruppe. Für die Blutentnahme und die anschließende FACS-Analyse standen n=5–16 Mäuse pro Behandlungsgruppe zur Verfügung. Für die Messung der linksventrikulären Funktion mittels Herzkatheter wurde eine Gesamtzahl von n=5–16 Tiere/Wirkstoffgruppe vorgesehen. Zur Kontrolle der hämodynamischen Parameter wurde eine Sham-Gruppe mit n=7 Mäusen eingerichtet. Für die weiterführende Infarktgrößenbestimmung und histologischen Untersuchungen wurden nach der Euthanasie der Mäuse und anschließenden Organentnahme nur Herzen eingeschlossen, die eine ausreichende Infarktgröße von über 10 % des linken Ventrikels aufwiesen. Da die Herzen für die Messung der Infarktgröße mittels TTC-Färbung bei -20 °C gefroren werden mussten und anschließend nicht für die weiterführende histologische Untersuchung verwendet werden konnten, ergab sich für die quantitative Infarktgrößenmessung eine zu erwartende Gesamtzahl von n=4–7 Mäusen pro Wirkstoffgruppe. Die histologischen Untersuchungen umfassten zum einen die Bestimmung der linksventrikulären Fibrose mithilfe der Masson-Trichrom-Färbung sowie die Immunfluoreszenzfärbung mit CD31 zur Bestimmung der Gefäßdichte und Neovaskularisation im Infarktbereich. Für die histologischen Untersuchungen wurden n=4–8 Tiere pro Behandlungsgruppe festgesetzt. Die vorgesehene Tieranzahl und Gruppengröße war zur statistischen Absicherung notwendig. Da das Versuchsziel nicht durch alternative Methoden (*in vitro*, Zellkultur) erreicht werden konnte und die Interpretation der Ergebnisse auf den Reaktionsabläufen im Gesamtorganismus basierte, war dieser Tierversuch unerlässlich. Der Eingriff am Tier, gekennzeichnet durch die Wirkstoffapplikation, die Blutentnahme und den Myokardinfarkt, stellten eine mäßige Gesamtbelastung für das Tier dar. Dabei wurde im Schutzinteresse des Tieres und zur

Verminderung des Belastungsausmaßes das Versuchsvorhaben auf das unerlässliche Maß beschränkt (Art des Experimentes, Anzahl der Tiere, optimale Datenanalyse, Maximierung der Informationsmenge pro Tier). Vor allem durch den Einsatz eines individuellen Bewertungssystems bezüglich des Ausmaßes der postoperativ auftretenden Schmerzen, einer adäquaten Anästhesie und Analgesie und der Definition von Abbruchkriterien (Sepsis, lokale Infektion, Arteriitis, Thrombophlebitis, Dyspnoe, Apnoe, Automutilation, hochgradige Blutungen, Anämie, vermindertes Allgemeinbefinden, Apathie, Dehydratation, autoimmune Reaktion, Abstoßungsreaktionen, anhaltende Appetitlosigkeit und gleichzeitiger Gewichtsverlust von mehr als 20 %) wurde versucht Schmerzen, Leiden und Belastung der Versuchstiere so gering wie möglich zu halten. Nach erfolgter Ligatur der LAD wurden die Tiere mit den verschiedenen Wirkstoffen und Wirkstoffkombinationen behandelt (siehe Tab. 3). Die Applikation begann eine Stunde nach der erfolgten Operation (Tag 1) und endete an Tag 4. Die placebobehandelte Kontrollgruppe (Gruppe 1) erhielt statt der Wirkstoffe subkutane Injektionen mit phosphatgepufferter Salzlösung, PBS (engl. *phosphate buffered saline*). Die Gruppen 2 und 3 erhielten an drei aufeinanderfolgenden Tagen (Tag 1-3) G-CSF. Die Gruppen 4 und 5 erhielten stattdessen von Tag 1-3 VEGF. Bei den Gruppen 3 und 5 erfolgte an Tag 4 eine zusätzliche Applikation von AMD3100. Der Gruppe 6 wurde von Tag 1-3 PBS appliziert und an Tag 4 AMD3100 injiziert. Alle Wirkstoffe wurden subkutan gespritzt. Die Dosierungen sind im Abschnitt 4.2.1 dargestellt.

Tabelle 3: Versuchsgruppen und Behandlungsschemata

Gruppennummer	Gruppenname	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	<b>Placebo</b>	PBS	PBS	PBS	-
2	<b>G-CSF</b>	G-CSF	G-CSF	G-CSF	-
3	<b>G-CSF/AMD3100</b>	G-CSF	G-CSF	G-CSF	AMD3100
4	<b>VEGF</b>	VEGF	VEGF	VEGF	-
5	<b>VEGF/AMD3100</b>	VEGF	VEGF	VEGF	AMD3100
6	<b>AMD3100</b>	PBS	PBS	PBS	AMD3100

(PBS: engl. *phosphate buffered saline*, phosphatgepufferte Salzlösung; G-CSF: engl. *granulocyte-colony stimulating factor*; VEGF: engl. *vascular endothelial growth factor*)

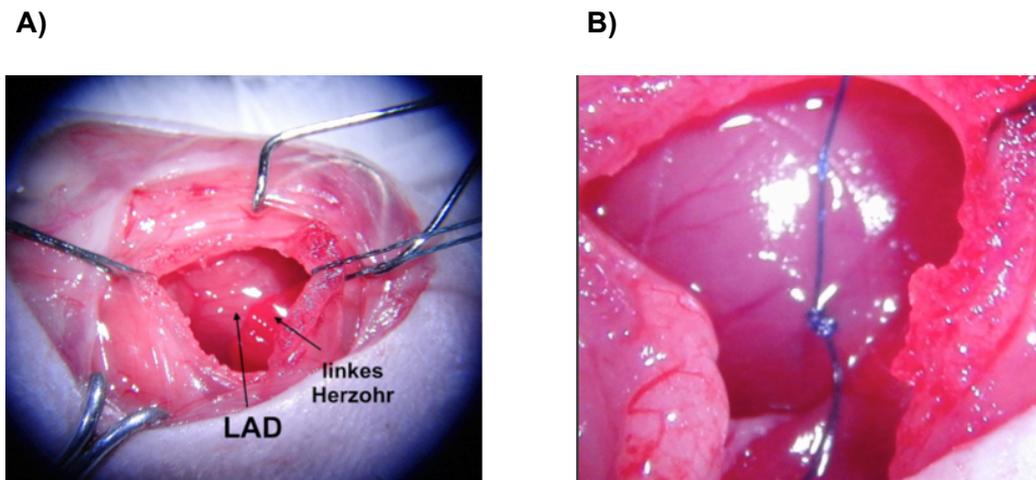
### 4.3.2 Detaillierte Beschreibung des Myokardinfarktmodells

#### 4.3.2.1 Vorbereitung, Anästhesie und Analgesie

Die Anästhesie der Maus erfolgte durch eine intraperitoneale Injektion mit einer Kombination aus Midazolam (5,0 mg/kg KG, Dormicum<sup>®</sup>, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Whylen), Medetomidin (0,5 mg/kg KG, Dormitor<sup>®</sup>, Pfizer Pharma GmbH, Karlsruhe) und Fentanyl (0,05 mg/kg KG, Fentanyl-Janssen<sup>®</sup>, Janssen-Cilag GmbH, Neuss). Die Injektionsnarkose wurde in einer Dosierung von 0,1 ml/30 g verabreicht, weshalb eine exakte Gewichtsbestimmung der Mäuse vor der OP von großer Bedeutung war, damit eine ausreichende Narkosetiefe gewährleistet werden konnte. Nach Verlust des Zwischenzehenreflexes wurde die Maus in Rückenlage mithilfe von Klebestreifen fixiert und anschließend intubiert. Als Tubus diente ein 22 Gauge großer Venenverweilkatheter (ohne Stahlmandrin) mit einem Durchmesser von 0,9 mm und einer Länge von 25 mm (Vasofix<sup>®</sup> Braunüle<sup>®</sup>, B. Braun Melsungen AG). Zur besseren Darstellung der Trachea wurde eine Kaltlichtquelle auf den ventralen Halsbereich gerichtet und der Kopf wurde nach dorsocranial überstreckt. Nach Einführen des Tubus in die Trachea wurde dieser über das Y-Stück mit dem Beatmungsgerät (Mini Vent Type 845, Hugo Sachs, March-Hugstetten) verbunden. Die Maus wurde mit einer Atemfrequenz von 200 pro Minute sowie einem Tidalvolumen von 200  $\mu$ l maschinell beatmet. Die Isoflurankonzentration betrug 1–2 % und der Sauerstofffluss wurde auf 0,3–0,4 l/min eingestellt. Um die Cornea vor dem Austrocknen zu schützen wurde Augensalbe (Bepanthen<sup>®</sup> Augen- und Nasensalbe, Bayer AG, Leverkusen) aufgetragen. Rektal wurde eine Temperatursonde eingeführt. Die Temperatur des Tieres wurde mithilfe einer an die Temperatursonde gekoppelten Wärmematte (*temperature control*, FHC, Bowdoin, ME, USA) konstant auf 37 °C  $\pm$  0,5 gehalten. Für den paramedianen Hautschnitt musste sowohl der Bereich von der ersten Rippe bis zum Sternum, als auch die linke Thoraxwand durch Enthaarungscreme (Veet<sup>®</sup> Haarentfernungs-Creme Sensitiv, Reckitt Benckiser, Mannheim) vollständig von dem Fell befreit und mit einem Hautdesinfektionsmittel (Softasept<sup>®</sup>N, B. Braun Melsungen AG) ausreichend desinfiziert werden. Zur Analgesie wurde 30 Minuten vor Ende der Operation Buprenorphin (0,1 mg/kg KG s.c. Temgesic<sup>®</sup>, ESSEX PHARMA, München) appliziert. Die Schmerztherapie wurde an den sieben folgenden Tagen alle acht Stunden wiederholt. Die Thorakotomie und anschließende Ligatur der LAD wurde unter einem Operationsmikroskop (Leica M125, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar) mit einer 12-fachen Vergrößerung vorgenommen.

#### 4.3.2.2 Myokardinfarktmodell

Der Hautschnitt erfolgte in Rückenlage. Die Haut wurde paramedian ausgehend von der ersten Rippe bis zum Xyphoid inzidiert. Nachfolgend wurde die Kutis vorsichtig von der Subkutis stumpf freipräpariert und die Maus wurde auf die rechte, gestreckte Körperseite umgelagert, da für die Thorakotomie ein lateraler Zugang benötigt wurde. Die rechte Vordergliedmaße wurde nach cranial gestreckt und mit Klebestreifen fixiert. Die linke Vordergliedmaße wurde dicht am Körper mittels Klebestreifen befestigt. Die Hintergliedmaßen wurden überkreuz nach hinten gestreckt. Nach Durchtrennung des *Musculus cutaneus trunci* wurde der *Musculus serratus ventralis* entlang seines Faserverlaufes geteilt und mittels kleiner Klammern nach dorsal, beziehungsweise ventral gespreizt, um eine bessere Sicht auf die Intercostalräume (ICR) zu haben. Die *Musculi intercostales externi* und *interni* wurden zusammen mit der Pleura zwischen dem dritten und vierten ICR eröffnet. Dabei auftretende kapilläre Blutungen wurden durch Kompression mit Saugtupfern (Ethikeil<sup>®</sup>, Ethicon, Norderstedt) gestillt. Die Rippen wurden mithilfe von polyfilamenten, nicht resorbierbarem Nahtmaterial (6-0 Mersilene<sup>®</sup>, Ethicon, Norderstedt) nach cranial, respektive caudal gespreizt. Das nun freiliegende Perikard wurde, unter Schonung der Lunge, vom Herzen abgehoben und fenestriert. Die *Arteria coronaria sinistra* wurde 1 mm apikal des linken Herzohres mit monofilamentem Nahtmaterial (7-0 Prolene<sup>®</sup>, Ethicon, Norderstedt) umstochen und ligiert (siehe Abb. 8). Der richtige und ausreichend feste Sitz der Ligatur zeigte sich durch eine deutliche Blassfärbung des Gewebes distal der Ligatur, durch eine Arrhythmie und/oder Vorhofschwellung. Anschließend wurde der Thorax mit den 6-0 polyfilamenten Fäden durch Einzelnähte verschlossen. Mithilfe eines Katheters, der in den Thorax eingeführt wurde, konnte die noch darin befindliche Luft abgesaugt werden. Dazu war der Katheter über einen Dreivegehahn mit einer 1 ml-Spritze verbunden. Mit dem Festziehen des letzten Heftes und Entfernen des Katheters wurde ein ausreichender Unterdruck wiederhergestellt. Die Brustmuskulatur wurde mit 0,9 % NaCl (Natriumchlorid; B Braun Melsungen AG) befeuchtet und in die physiologische Lage zurück positioniert. Die Haut wurde fortlaufend mit 6-0 Vicryl<sup>®</sup> (Ethicon, Norderstedt) zugenäht, dabei wurde die Isoflurankonzentration langsam ausgeleitet, die Sauerstoffzufuhr blieb bestehen. Die Maus wurde in Bauchlage gebracht und erhielt zur Antagonisierung der Injektionsnarkose eine Kombination aus Atipamezol (2,5 mg/kg KG s.c., Antisedan<sup>®</sup>, Pfizer Pharma GmbH, Karlsruhe) und Flumazenil (0,5 mg/kg KG s.c., Anexate<sup>®</sup> 0,5, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Whylen). Nach Einsetzen der Spontanatmung wurde die Maus extubiert. Um eine Hypothermie zu vermeiden, wurden die Tiere nach der OP für ca. 4 h unter eine Rotlichtlampe gesetzt. Bei der Sham-Gruppe erfolgt die gleiche Operationsmethode, jedoch wurde auf eine Ligatur der LAD verzichtet.



**Abbildung 8: Durchführung des Herzinfarktmodells**

**A)** Blick auf den linken Ventrikel, das linke Herzohr und die LAD nach erfolgter Thorakotomie

**B)** Die Ligatur der LAD erfolgte ca. 1 mm kaudal des linken Herzohres mit einem monofilamenten 7-0 Faden.

#### 4.3.3 Blutentnahme

An den Tagen 0, 7, 14 und 28 wurde den Mäusen Blut aus der Schwanzvene entnommen. Hierzu wurden die Tiere mit Isofluran anästhesiert. Die Blutentnahme erfolgte an der *V. coccygea*. Mithilfe eines Kapillarröhrchen (Microvette<sup>®</sup>, CB 300PH, Heparin/Fluorid, Sarstedt, Nümbrecht) wurden ca. 150 µl Blut entnommen.

#### 4.3.4 Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie oder FACS-Analyse ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung und Klassifizierung von Zellen anhand ihrer Oberflächenmoleküle und intrazellulären Proteine. Zum Nachweis von Antigenen auf der Zelloberfläche werden diese mit spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörpern angefärbt.

Für die durchflusszytometrische Untersuchung werden gefärbte Einzelzellen in einem Flüssigkeitsstrahl fokussiert und an einem Laserstrahl vorbeigeleitet. Die Zellsuspension wird unter Druckluft von dem Durchflusszytometer angesaugt und von der Trägerflüssigkeit erfasst, welche eine laminare Strömung (Hüllstrom) erzeugt. Beim Eintritt in die querschnittsverengte Messkammer werden die Zellen so stark beschleunigt, dass sie einzeln und hintereinander aufgereiht den Analysepunkt erreichen, was als hydrodynamische Fokussierung bezeichnet wird. Nachdem die einzelnen Zellen von dem Laserstrahl angeregt wurden, senden sie Lichtteilchen (Photonen) aus und streuen so das Licht. Die Lichtstreuung kann mithilfe von Photodetektoren nachgewiesen werden. Die

Elektronen der verwendeten fluoreszierenden Farbstoffe werden durch den Laserstrahl angeregt. Hierdurch werden die Fluorochrome auf ein höheres Energieniveau angehoben und fallen anschließend unter Emission von Photonen auf ihr Ursprungsniveau zurück. Dabei ist die emittierte Photonenkonzentration der Fluoreszenzfarbstoffe proportional zur Zahl der auf der Zelloberfläche gebundenen markierten Antikörper und somit auch zur Anzahl der Oberflächenmoleküle. Die Analyse von mehreren Fluoreszenzfarbstoffen ist gleichzeitig möglich, weil sie sich durch eine gemeinsame Wellenlänge anregen lassen, aber unterschiedliche und charakteristische Emissionsspektren zeigen (siehe Tab. 4).

Tabelle 4: Fluorochrome und ihre Adsorptions- und Emissionsmaxima

Fluorochrome	Exzitation (nm)	Adsorptionsmaxima (nm)	Emissionsmaxima (nm)
APC Alexa Fluor®647	600-640	650	660
FITC	488	495	520
PE	488	564	575

(APC: Allophycocyanin; FITC: Fluoresceiniosothiocyant; PE: Phycoerythrin)

Ferner können durch die Art der Lichtstreuung und Beugung Aussagen über die Größe und Granularität der Zelle getroffen werden.

Das in die Vorwärtsrichtung gestreute Licht, (die Lichtstreuung erfolgt entlang der Achse des Laserstrahls) bezeichnet man als *“forward scatter”* (FSC). Dieser Parameter dient in erster Linie als Maß für die Größe der Zellen. Das im rechten Winkel zum einfallenden Laserstrahl gestreute Licht korreliert mit der intrazellulären Granularität und wird als *“sideward scatter”* (SSC) bezeichnet.

Somit können anhand der FSC- und SSC-Werte verschiedene Zellpopulationen, wie Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten identifiziert werden.

Für die durchflusszytometrische Analyse wurde ein BD FACS-Canto II verwendet, das mit einem Rechner zur Datenakquisition und Datenanalyse verbunden war. Das Analysegerät verfügte über drei Laser mit denen insgesamt acht Fluorochrome detektiert werden konnten. In Tab. 5 sind die Laser, die für die Detektion der verwendeten fluoreszierenden Farbstoffe nötig waren, aufgeführt.

Tabelle 5: Verwendete Laser zur Detektion der Fluorochrome

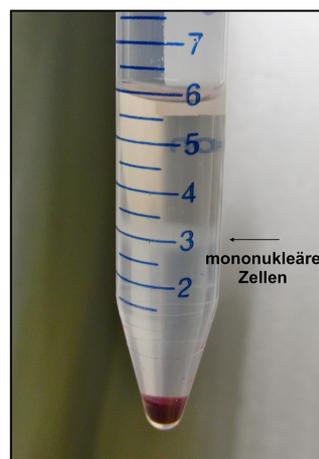
Laser	Exzitation (nm)	Detektorname	Fluorochrome
Blue	488	B585	PE
Red	633	R660	APC, Alexa647

(PE: Phycoerythrin; APC: Allophycocyanin)

Die Auswertung erfolgte mit den Softwareprogrammen FACSDiva™ und FlowJo. Die Daten wurden als eindimensionale Histogramme oder als zweidimensionale Punktbilder (engl. *Dot-Plots*) dargestellt und analysiert.

#### 4.3.4.1 Probenaufbereitung für die FACS-Analyse

Da für die FACS-Analyse vor allem die mononukleären Zellen (engl. *mononuclear cells*, MNC) von Interesse sind, mussten diese zunächst mittels Ficoll, einem ungeladenen Sucrose-Polymer und nachfolgender Dichtegradientenzentrifugation isoliert werden. Diese Methode basiert auf der Grundlage, dass die Dichte der Ficolllösung höher ist (> 1,077 g/ml) als die Dichte von Monozyten und Lymphozyten, aber niedriger als die von Erythrozyten und Granulozyten. Folglich passieren Erythrozytenaggregate und tote Zellen die Ficollschicht und sammeln sich im unteren Bereich des Falcons an. Granulozyten hingegen dringen in die Ficollphase, währenddessen sich mononukleäre Zellen, wie Lymphozyten und Monozyten, in der Interphase anreichern (siehe Abb. 9).



**Abbildung 9: Isolation von mononukleären Zellen**

Mithilfe der Dichtegradientenzentrifugation erfolgte die Isolierung der Monozyten. In der Interphase waren die mononukleären Zellen als weißer Ring erkennbar. Der Überstand wurde verworfen und die monozytäre Fraktion isoliert, um die Zellen für die anschließende FACS (engl. *fluorescence-activated cell sorting*)-Färbung zu präparieren.

Jeweils vier Blutproben wurden in 3 ml 10 %iger FBS (engl. *fetal bovine serum*)/PBS-Lösung suspendiert. Für die nachfolgende Gradientenzentrifugation wurden jeweilig 3 ml Ficoll in Falcons pipettiert. Die verdünnten Blutproben wurden unter Vermeidung einer Durchmischung auf die Ficolllösung aufgetragen. Anschließend wurden die Proben für 20 min bei 1200 x g und 22 °C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation stellte sich die mononukleäre Fraktion als weißer Ring in der Mitte des Falcons dar. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen wurden in 5 ml PBS gelöst. Anschließend wurden die Proben auf 14 ml mit PBS aufgefüllt und bei 300 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 500 µl PBS resuspendiert und die Zellen wurden nach dem Auffüllen auf 14 ml mit PBS erneut zentrifugiert (200 x g, 10 min, 4 °C). Für die anschließenden FACS-Färbungen wurden die Proben nach der zweiten Waschung in je 300 µl FACS-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in eine 96-Well-Rundbodenplatte überführt. Nach der Zentrifugation wurde das Pellet mit 50 µl *Blocking*-Lösung pro Well versetzt. Der Fc-Block erfolgte mit anti-CD16/32 mAb (1:100) und 5 % Rattenserum für mindestens 15 min auf Eis. Der Block verhinderte unspezifische Bindungen der Immunglobuline an die Fc-Rezeptoren. Danach wurden die Rundbodenplatten auf 200 µl mit FACS-Puffer aufgefüllt und erneut bei 300 x g und 4°C für 2 min zentrifugiert. Nach Abschütten des Überstandes wurden die Zellpellets mit den unten aufgeführten fluoreszenzmarkierten AK versetzt:

Blutprobe 1: iso-APC / iso-PE

Blutprobe 2: Flk-1/VEGFR2 Alexa Fluor®647 / Sca-1 PE

Blutprobe 3: c-Kit-APC / Sca-1 PE

Blutprobe 4: c-Kit-APC / Tie-2 PE

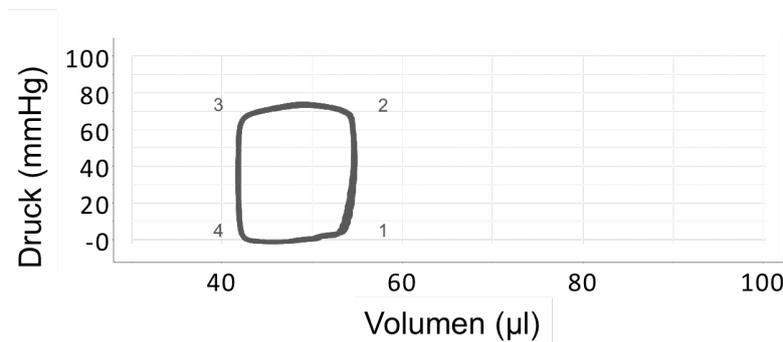
Die Inkubation erfolgte bei 4 °C und Dunkelheit für mindestens 30 min in einem Volumen von 50 µl mit 1–5 µg/ml des jeweiligen antigenspezifischen Antikörpers. Danach wurden die Rundbodenplatten erneut mit FACS Puffer auf 250 µl aufgefüllt und zentrifugiert. Anschließend erfolgte ein dreimaliges Waschen der Zellen mit FACS Puffer. Nach der dritten Zentrifugation wurde das Pellet in 250 µl FACS-Puffer gelöst und in die FACS-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden anschließend mit dem BD FACS-Canto II analysiert und mit den Programmen FACSDiva™ und FlowJo ausgewertet.

### 4.3.5 Hämodynamik

Durch die Entwicklung der Leitfähigkeits-Katheter-Methode ist es möglich die systolische und diastolische linksventrikuläre Funktion genau zu beurteilen. Diese Methode gestattet die gleichzeitige Aufzeichnung der Druck- und Volumenmesswerte im linken Ventrikel (Baan, van der Velde et al. 1984). Die graphische Darstellung des Herzzyklus in einem Druck-Volumen-Diagramm gilt als Goldstandard zur Messung der Hämodynamik bei Menschen und großen Tieren (Burkhoff, van der Velde et al. 1985). Die Etablierung eines Konduktanz-Katheters für Kleintiere erleichtert die hämodynamische Untersuchung bei Ratten und Mäusen (Feldman, Mao et al. 2000).

#### 4.3.5.1 Das Druck-Volumen-Diagramm

Die Darstellung der Druck-Volumen-Beziehung während eines Herzzyklus erfolgt anhand eines Druck-Volumen-Diagrammes, indem man den linksventrikulären Druck gegen das Volumen im linken Ventrikel aufträgt (siehe Abb. 10). Somit erhält man ein Diagramm mit dem Aussehen einer Schleife (engl. *loop*), in dem die einzelnen Aktionsphasen des Herzens gut darstellbar sind. In der Anspannungsphase, zu Beginn der Kammersystole, kontrahiert sich das Herz isovolumetrisch, das heißt, dass der Druck im linken Ventrikel soweit ansteigt bis der Druck in der Aorta erreicht ist (diastolischer Aortendruck). Das Volumen ändert sich in dieser Phase des Herzzyklus jedoch noch nicht, da alle Klappen geschlossen sind. In der nachfolgenden Austreibungsphase überschreitet der Druck im linken Ventrikel den diastolischen Aortendruck, woraufhin sich die Aortenklappe öffnet. Da sich der Herzmuskel trotz abfallenden Volumens weiter kontrahiert, kommt es zu einem Druckanstieg. Der Druck steigt bis zu einem Maximalwert an und fällt gegen Ende der Systole wieder ab. Unter Ruhebedingungen wirft der linke Ventrikel nur die Hälfte des Schlagvolumens (SV) in die Aorta aus. Den Anteil des Schlagvolumens am enddiastolischen Füllungsdruck bezeichnet man als Auswurffraktion (engl. *ejection fraction*, EF). Der Schluss der Aortenklappe markiert das Ende der Systole. In der anschließenden isovolumetrischen Entspannungsphase zu Beginn der Diastole fällt der Druck im linken Ventrikel aufgrund der Relaxation des Herzmuskels isovolumetrisch ab und die Aortenklappe schließt sich. Da auch die Mitralklappe noch geschlossen ist, ändert sich das Volumen nicht. In der Füllungsphase fällt der Druck im linken Ventrikel auf nahezu null ab und unterschreitet den Druck im linken Vorhof. Nachfolgend führt dies zu einer Öffnung der Atrioventrikularklappe. Der linke Ventrikel füllt sich entsprechend der Ruhedehnungskurve.



**Abbildung 10: Repräsentative Darstellung eines Druck-Volumen-Diagrammes**

Die Druck-Volumen-Beziehung ist als *loop* dargestellt. 1-2 = isovolumetrische Anspannungsphase, 2-3 = Austreibungsphase, 3-4 = isovolumetrische Entspannungsphase, 4-1 = Füllungsphase

#### 4.3.5.2 Prinzip des Leitfähigkeits-Katheters

Das Grundprinzip der Konduktanz-Methode ist die Messung der Leitfähigkeit des Blutes im linken Ventrikel und die anschließende Konvertierung des Wertes in ein entsprechendes Volumensignal sowie die gleichzeitige Erfassung des Druckes mittels eines Drucksensors. Zur Messung der Leitfähigkeit sind an dem Katheter insgesamt vier Platinum-Elektroden angebracht. Somit lassen sich synchron zur Ventrikelaktion Druck-Volumen-Schleifen darstellen (siehe Abb. 10). Bei der retrograden Einführung des Katheters von der rechten *Arteria carotis communis* über die Aortenklappe in den linken Ventrikel, muss auf den richtigen Sitz der Elektroden geachtet werden. Die distale Elektrode liegt im Bereich der Herzspitze und die proximale Elektrode kurz unterhalb der Aortenklappe. Der tetrapolare Katheter generiert zwischen diesen beiden Elektroden ein intraventrikuläres elektrisches Feld, wodurch, basierend auf dem Ohm'schen Gesetz, die Leitfähigkeit des Blutes gemessen werden kann.

#### 4.3.5.3 Parallele Leitfähigkeit

Bei der Analyse der Werte ist zu beachten, dass die Elektroden zwar jede Änderung der Leitfähigkeit registrieren, jedoch nicht zwischen den unterschiedlichen Strukturen differenzieren. Somit ist in der Gesamtleitfähigkeit auch die Leitfähigkeit der Strukturen impliziert, die die linke Herzkammer umgeben (Lunge, Blut im rechten Ventrikel). Um das exakte intraventrikuläre Volumen zu bestimmen, muss die parallele Leitfähigkeit bestimmt werden und von der Gesamtleitfähigkeit subtrahiert werden (Steendijk, Staal et al. 2001).

Zur Korrektur des Faktors stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung (Baan, van der Velde et al. 1984; Steendijk, Staal et al. 2001). Die häufigste Methode ist die Injektion von hypertoner Kochsalzlösung, die auch bei dem vorliegenden Versuch angewendet wurde.

Die linke *Vena jugularis externa* wurde punktiert und katheterisiert, um 10 µl einer 15 %igen Natriumchloridlösung zu applizieren. Dadurch kam es zwar zu einer Änderung der Leitfähigkeit des Blutes, auf die parallele Leitfähigkeit hatte die Applikation jedoch keine Auswirkung. Die Änderung der Leitfähigkeit wurde im Druck-Volumen-Diagramm für mehrere Herzzyklen aufgezeichnet. Die parallele Leitfähigkeit konnte anschließend ermittelt werden und von der Gesamtleitfähigkeit subtrahiert werden.

#### **4.3.5.4 Operationsmethode**

Die Tiere wurden initial mit einer 3 %igen Isofluraninhalation narkotisiert. Zur Intubation wurde die Maus in Rückenlage fixiert und der Hals überstreckt. Danach wurde unter visueller Kontrolle ein Plastiktubus in die Trachea geschoben und das Tier kontrolliert mit 200 Atemzügen pro Minute bei einem Tidalvolumen von 200 µl und einer Zufuhr von 1,5 % Isofluran bei einem Sauerstofffluss von 0,8 l/min mithilfe eines Beatmungsgerätes ventiliert. Der Erfolg der Intubation wurde durch visuelle Kontrolle der Thoraxbewegung kontrolliert. Anschließend wurde im Bereich der Halseingeweide ein Hautschnitt in Längsrichtung von kranial nach kaudal durchgeführt und sowohl die Halsmuskulatur als auch die Speicheldrüsen stumpf durchtrennt, wobei ein Blutverlust konsequent vermieden wurde. Eventuelle Blutungen wurden koaguliert. Die rechte *Arteria carotis communis* wurde dargestellt. Proximal und distal wurden mithilfe eines Fadens Blutsperren angelegt. Die Inzision der *Arteria carotis communis* erfolgte mit einer Mikroschere. Anschließend konnte mittels eines Gefäßdilators und einer Pinzette der Mikro-Tip Druck-Volumen-Katheter in das Gefäß eingebracht und danach retrograd über die Aortenklappe in den linken Ventrikel eingeführt werden. Die korrekte Platzierung wurde durch ständige Kontrolle der Druck-Volumen-Schleife gewährleistet.

#### **4.3.5.5 Aufzeichnung der Messwerte**

Zur Datenerfassung und -aufzeichnung wurde der Katheter über die Hardware MPVS Ultra System mit dem Power Lab System 8/30 verbunden. Dieses Daten-Akquisitionssystem wurde an einen Computer angeschlossen. Die Datenanalyse und Auswertung erfolgten mit der PVAN Software über das Computerprogramm LabChart® 7.2.

#### 4.3.5.6 Gemessene Parameter

Folgende Parameter konnten mithilfe der oben angegebenen Software kalkuliert werden:

Tabelle 6: Parameter zur Beurteilung der systolischen linksventrikulären Funktion

<b>Systolische Parameter</b>	<b>Abkürzung / Formel</b>	<b>Einheit</b>
Herzfrequenz (Schläge pro Minute)	HF	bpm
maximaler linksventrikulärer Druck	$LVP_{\max}$	mmHg
linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit	$dP/dt_{\max}$	mmHg/s
Schlagvolumen ( <i>stroke volume</i> )	$SV = EDV - ESV$	$\mu l$
endsystolisches Volumen	ESV	$\mu l$
Ejektionsfraktion ( <i>ejection fraction</i> )	$EF = (EDV - ESV) / EDV \times 100$	%
Herzzeitvolumen ( <i>cardiac output</i> )	$HZV (CO) = HF \times SV$	$\mu l / \text{min}$
Schlagarbeit ( <i>stroke work</i> )	$SW = MAP \times SV$	mmHg x $\mu l$

Tabelle 7: Parameter zur Beurteilung der diastolischen linksventrikulären Funktion

<b>Diastolische Parameter</b>	<b>Abkürzung / Formel</b>	<b>Einheit</b>
linksventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit	$dP/dt_{\min}$	mmHg/s
linksventrikulärer enddiastolischer Druck	LVEDP	mmHg
enddiastolisches Volumen	EDV	$\mu l$
Zeitkonstante des linksventrikulären Druckabfalls	Tau	ms

#### **4.3.5.7 Werte der systolischen linksventrikulären Funktion**

##### **Maximaler linksventrikulärer Druck ( $LVP_{max}$ in mmHg)**

Der maximale linksventrikuläre Druck ist der höchst gemessene Druck im linken Ventrikel.

##### **Linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit ( $dP/dt_{max}$ in mmHg/s)**

Die linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit ist ein Maß für die Kontraktilität des linken Ventrikels. Der Parameter wird mathematisch aus der ersten Ableitung der linksventrikulären Druckkurve errechnet und stellt die Geschwindigkeit der Veränderung des Druckes im linken Ventrikel dar.

##### **Schlagvolumen (SV in $\mu$ l)**

Das Schlagvolumen entspricht dem Volumen, welches pro Herzschlag durch die Aortenklappe in die Peripherie ausgeworfen wird und ist die Differenz zwischen dem enddiastolischen Volumen und dem endsystolischen Volumen.

##### **Endsystolisches Volumen (ESV in $\mu$ l)**

Das endsystolische Volumen ist das minimale Volumen, das nach Auswurf des Blutes in dem linken Ventrikel verbleibt.

##### **Ejektionsfraktion (EF in %)**

Die Ejektionsfraktion ist ein sehr wichtiger klinischer Parameter zur Beurteilung der linksventrikulären Pumpfunktion. Die Ejektionsfraktion ist der prozentuale Anteil des Schlagvolumens an dem enddiastolischen Volumen. Die EF ist von der Vor- und Nachlast und somit vom Volumen abhängig.

##### **Herzzeitvolumen (HZV in $\mu$ l/min)**

Das Herzzeitvolumen ist das Volumen, welches in einer bestimmten Zeit (Minute) über die Aorta in den Blutkreislauf gepumpt wird und ist somit ein Maß für die Pumpfunktion des Herzens. Die Berechnung erfolgt, indem man das Schlagvolumen mit der Herzfrequenz multipliziert.

##### **Schlagarbeit (SW in mmHg x $\mu$ l)**

Die Herzarbeit ist das Produkt aus Druck und Volumen, das heißt, sie entspricht der Fläche der Druck-Volumen-Schleife. Die Schlagarbeit kann durch die Multiplikation des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP) mit dem Schlagvolumen ermittelt werden.

#### **4.3.5.8 Werte der diastolischen linksventrikulären Funktion.**

##### **Linksventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit ( $dP/dt_{\min}$ in mmHg/s)**

Die minimale Druckabfallsgeschwindigkeit ist ein Parameter der frühen diastolischen Relaxation. Er wird analog zur maximalen Druckanstiegsgeschwindigkeit aus der ersten Ableitung der linksventrikulären Druckkurve errechnet und daher in mmHg/s angegeben.

##### **Linksventrikulärer enddiastolischer Druck (LVEDP in mmHg)**

Der linksventrikuläre enddiastolische Druck ist einer der wichtigsten Parameter zur Beurteilung der diastolischen Funktion. LVEDP ist definiert als Druck, der am Ende der Diastole kurz vor Beginn der systolischen Kontraktion im linken Ventrikel gemessen wird.

##### **Enddiastolisches Volumen (EDV in $\mu$ l)**

Das enddiastolische Volumen ist das Volumen, das nach Ende der Diastole im linken Ventrikel vorhanden ist.

##### **Tau (in ms)**

Tau ist wie  $dP/dt_{\min}$  ein Parameter der Relaxation der frühen Diastole und bezeichnet den Zeitraum vom Punkt der minimalen Druckabfallsgeschwindigkeit bis kurz vor Ende der Relaxation, wenn der Druck noch 10 % des maximalen LVP beträgt.

#### **4.3.6 Euthanasie und Organentnahme**

Nach der finalen Hämodynamikmessung wurden die mit Isofluran ausreichend anästhesierten Tiere durch eine intraperitoneale Injektion mit Pentobarbital euthanasiert. Die Dosierung betrug 300 mg/kg. Nach Feststellung des Todes wurden die Mäuse thorakotomiert und die Herzen freipräpariert. Ein ausreichendes Spülen in PBS auf Eis gewährleistete die Blutarmut der Herzen. Die großen Gefäßstämme wurden von der Herzbasis abgetrennt und das verbleibende Perikard wurde vorsichtig von dem darunter liegenden Epikard gelöst. Anschließend wurden die Herzen gewogen und ausgemessen. Die Herzen wurden in zwei verschiedene Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe diente der weiterführenden histologischen Untersuchung. Die zweite Gruppe wurde für die Infarktgrößenbestimmung mittels TTC-Färbung verwendet (siehe Abschnitt 4.3.1.1).

### **4.3.7 Histologische Methoden**

#### **4.3.7.1 Herstellung von Paraffinschnitten**

Die Herzen wurden für 24 h in 4 %iger Formalin/PBS Lösung fixiert. Anschließend wurden die Herzen mit einem Skalpell horizontal geteilt, sodass für die weiterführenden Untersuchungen Herzspitze und Herzbasis zur Verfügung standen. Diese wurden zur weiteren Verarbeitung in Biopsie-Einbettkassetten überführt. Das Gewebe wurde in einer aufsteigenden Alkoholreihe stufenweise für ca. 5 h entwässert (70 % EtOH, 90 % EtOH, 96 % EtOH, Isopropanol). Durch die anschließende zweistündige Behandlung mit Xylol wurde der Alkohol vollständig verdrängt. Die Vorparaffinierung erfolgte in Paraplast bei 65 °C im Trockenschrank für 12 h.

Am nächsten Tag wurden die Herzen in einen Block mit flüssigem Paraffin gegossen und anschließend zur schnelleren Aushärtung des Paraffins auf einer Kälteplatte gekühlt. Die Herzbasis, bzw. Herzspitze wurde am Boden des Blockes positioniert. Am Rotationsmikrotom wurden sequentielle Schnitte ausgehend von der Ligatur in Richtung Basis bzw. Apex erstellt. Die Paraffin-Schnittpräparate hatten eine Dicke von 3 µm. Pro Herzhälfte wurden insgesamt 21 Paraffinschnitte angefertigt, welche auf silanisierten Objektträgern im Wasserbad aufgezogen wurden.

#### **4.3.7.2 Histologische Färbungen zur Identifizierung des Infarktgebietes**

Zur Übersichtsdarstellung und Orientierung für die weiterführende Immunfluoreszenzfärbung wurden vier Paraffinschnitte pro Herz mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt.

Für die Bestimmung der linksventrikulären Fibrose wurden sechs Objektträger pro Herz mit Masson-Trichrom angefärbt. Um verschiedene Ebenen des Herzens darzustellen, wurde zwischen den Paraffin-Schnittpräparaten ein Abstand von 24 µm gewählt (siehe Tab. 8).

Anhand der histologischen Färbungen konnten das Infarktgebiet erkannt und die „Borderzone“ identifiziert werden (siehe Abb. 11). Die „Borderzone“ wird dabei als Gewebeareal definiert, das direkt an das zentrale Gebiet der maximalen Ischämie angrenzt, in dem die Myozyten jedoch noch intakt sind (Olivetti, Ricci et al. 1986).

Für die anschließende Immunfluoreszenzfärbung mit CD31 wurden insgesamt acht Objektträger pro Herz angefertigt, die einen Abstand von 9 bzw. 12 µm aufwiesen, um verschiedene Ebenen des Herzens darzustellen. In Tabelle 8 sind die nummerierten histologischen Schnitte von Apex bzw. Basis und die geplanten histologischen Färbungen aufgeführt.

Tabelle 8: Histologische Schnittpräparate von Apex respektive Basis und schematische Darstellung der geplanten histologischen Färbungen; die Größenangaben bezeichnen die Schnittdicke (3  $\mu\text{m}$ ) bzw. die Abstände zwischen den gewählten histologischen Schnitten.

Histologische Schnitte	Histologische Färbungen	
1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	} 3 $\mu\text{m}$
2	CD31	
3	Masson-Trichrom-Färbung	↑ 9 $\mu\text{m}$
4	nicht verwendet	
5	nicht verwendet	
6	CD31	↑ 12 $\mu\text{m}$
7	nicht verwendet	
8	nicht verwendet	
9	nicht verwendet	
10	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	↑ 24 $\mu\text{m}$
11	CD31	
12	Masson-Trichrom-Färbung	
13	nicht verwendet	
14	nicht verwendet	
15	nicht verwendet	
16	CD31	
17	nicht verwendet	
18	nicht verwendet	
19	nicht verwendet	
20	nicht verwendet	
21	Masson-Trichrom-Färbung	

#### 4.3.7.2.1 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung

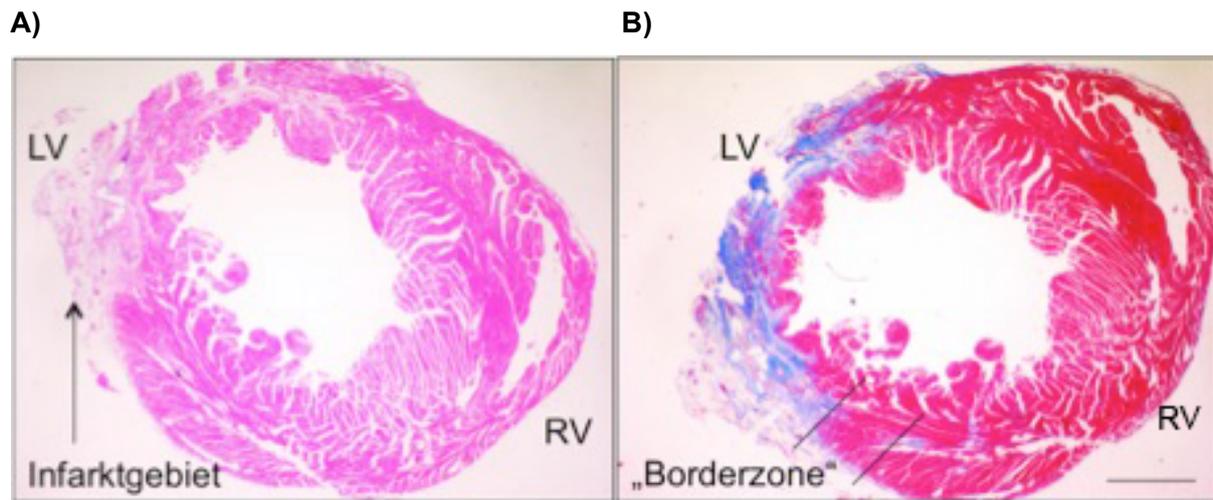
Die Schnitte wurden zur Entparaffinierung über Nacht in den Trockenschrank bei 65 °C gestellt. Zum Herauslösen des Paraffins aus dem Gewebe wurden die Schnitte für 2 mal 5 Minuten in Xylol behandelt. Anschließend erfolgte die Rehydrierung der Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe (96 %, 90 %, 70 % EtOH) für je 5 min um die Anlagerung des wasserlöslichen Farbstoffes zu ermöglichen. Nach dem Spülen in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  wurden die Objektträger für 3 min in der Kernfärbelösung Harris Hämatoxylin inkubiert. Hämatoxylin dient der Zellkernfärbung, da es aufgrund seiner positiven Ladung an DNA bindet. Das Spülen in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  und das anschließende viermalige Eintauchen in HCl-Alkohol (1 ml

Salzsäure auf 100 ml 70 % EtOH) führten zu einer Differenzierung der Kernfärbung. Das nachfolgende Spülen in fließendem Leitungswasser bewirkte eine pH-Wert-Erhöhung und ermöglichte dadurch das sogenannte Bläuen und Stabilisieren der Kernfärbung. Die Objektträger wurden danach für 30–60 s in die saure Eosin-Färbelösung gestellt, was zu einer Rotfärbung der azidophilen Strukturen des Zytoplasmas führte. Nach der anschließenden Dehydrierung in der aufsteigenden Alkoholreihe und dem Eintauchen in Xylol, wurden die Objektträger mit einem Eindeckmedium beschichtet und mit Deckgläsern eingedeckt. Die HE-Färbung diente dabei zur Übersichtsdarstellung des Herzens und zur Identifizierung der anatomischen Strukturen (siehe Abb. 11).

#### **4.3.7.2.2 Masson-Trichrom-Färbung**

Das Entparaffinieren und Rehydrieren in der aufsteigenden Alkoholreihe erfolgte wie in 4.3.7.2.1 beschrieben. Danach wurden die Schnitte in Weigerts Eisenhämatoxylin gefärbt und nach 3 min in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> gespült. Zur Differenzierung der Kernfärbung wurden die Schnitte für 5 min mit 1 %iger Essigsäure behandelt. Nach dem Spülen in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> wurden die Objektträger für 5 min in Masson-Lösung gefärbt und anschließend gewaschen. Die 1 %ige Molybdänphosphorsäure-Färbelösung wurde nach 5 min abgossen. Anschließend wurde Anilinblau mit einer Pipette aufgetragen und nach 2 min mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> abgespült. Als letzter Schritt wurden die Objektträger für 4 min in 1 %iger Essigsäure inkubiert. Nach der Behandlung mit 96 % EtOH und Xylol wurden die Schnitte mit Eukitt eingedeckelt.

Die Masson-Trichrom-Färbung wird zur Darstellung von kollagenem Bindegewebe bzw. Narbengewebe verwendet. Dieses färbt sich intensiv blau an und lässt sich somit gut von dem umliegenden gesunden, rot angefärbten Muskelgewebe abgrenzen. Das Zytoplasma wird rosa angefärbt (siehe Abb. 11). Für die Messung der prozentualen linksventrikulären Fibrose wurden n=4–8 Tiere pro Behandlungsgruppe vorgesehen. Pro Herz wurden sechs histologische Schnitte mit Masson-Trichrom gefärbt (siehe Tab. 8) und in vierfacher Vergrößerung fotografiert. Um verschiedene Ebenen des Herzens darzustellen, wurde zwischen den histologischen Schnitten ein Abstand von 24 µm gewählt. Mithilfe des Computerprogramms ImageJ erfolgte die Vermessung des fibrotischen, blau angefärbten Narbengewebes und des vitalen, rot angefärbten linksventrikulären Myokards. Aus den beiden ermittelten Werten konnte die prozentuale linksventrikuläre Myokardfibrose angegeben werden. Der Mittelwert der sechs verschiedenen Herzschnitte pro Tier wurde errechnet. Anschließend wurden die Mittelwerte der vier bis acht Tiere pro Behandlungsgruppe kalkuliert, sodass die prozentuale linksventrikuläre Fibrose pro Wirkstoffgruppe ermittelt werden konnte.



**Abbildung 11: HE- und Masson-Trichrom-Färbung**

Repräsentative Darstellung eines HE- und Masson-Trichrom-gefärbten Herzschnittes 28 Tage nach induziertem Myokardinfarkt in vierfacher Vergrößerung. **A)** Das Infarktgebiet im linken Ventrikel in der HE-Färbung war durch das Vorhandensein von aufgelockertem Granulationsgewebe erkennbar. **B)** In der Masson-Trichrom-Färbung konnte man den infarzierten und fibrosierten Bereich anhand der intensiven Blaufärbung erkennen. Die „Borderzone“ ist direkt angrenzend an das Gebiet der maximalen Ischämie. LV = Linker Ventrikel; RV= Rechter Ventrikel; Maßstab  $\cong$  1 mm.

#### 4.3.7.3 Bestimmung der Gefäßdichte mithilfe der Immunfluoreszenzfärbung

Bei der angewandten indirekten Immunfluoreszenztechnik wurde zunächst ein primärer, spezifischer Primärantikörper für 1 h auf die Objektträger aufgetragen, der an das gesuchte Zielprotein bindet. Anschließend wählte man einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Sekundärantikörper, welcher an den Primärantikörper bindet. Mittels eines Fluoreszenzmikroskops konnten die fluoreszierenden Strukturen nachgewiesen werden.

##### 4.3.7.3.1 Lokalisierung der CD31<sup>+</sup>-Kapillaren im Herzmuskelgewebe

CD31 oder PECAM-1 (engl. *platelet endothelial cell adhesion molecule-1*), ein 130 kDA großes Membranprotein wird in großer Dichte auf Endothelzellen exprimiert. Es ist vor allem für Zell-Zell-Interaktionen verantwortlich (Newman 1997). Zur spezifischen Endothel-darstellung hat sich die Färbung mit dem CD31-Antikörper bewährt (Ismail, Poppa et al. 2003). Die Bestimmung der Gefäßdichte im infarzierten und angrenzenden gesunden Herzmuskelgewebe erfolgte über die Auszählung der CD31-positiven Kapillaren.

Die Schnitte wurden ü.N. bei 65 °C getrocknet und am folgenden Tag durch zweimaliges Eintauchen in Xylol und anschließender Behandlung in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert. Danach erfolgte die Hitzedemaskierung der Antigenepitope. Durch das

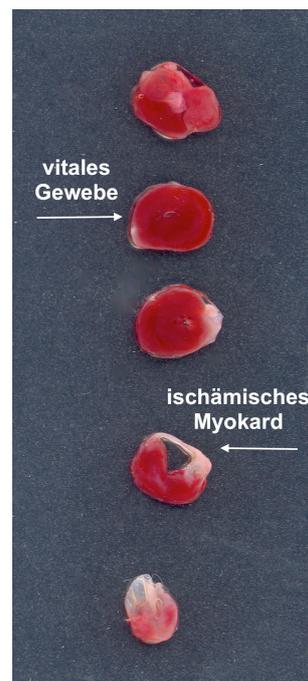
Kochen in Citratpuffer (pH 6,0) für 30 min wurden die durch Formalinfixierung verursachten Aldehydvernetzungen aufgehoben. Nach dem Abkühlen wurden die Objektträger dreimalig in TRIS-Puffer gewaschen und anschließend zum Blocken der endogenen Peroxidase mit 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt. Nach der Waschung in TRIS-Puffer erfolgte das Blocken der Schnitte in 5 % Milchpulver und 10 % Ziegenserum, um unspezifische Bindungen des Primärantikörpers zu verhindern. Nach erneutem Waschen in TRIS-Puffer wurden die Schnitte mit dem ersten Antikörper CD31 in einer Dunkelkammer bei RT inkubiert. Nach 1 h erfolgte die Waschung der Schnitte und anschließend das lichtgeschützte Auftragen des Sekundärantikörpers (Anti Kaninchen Alexa Fluor<sup>®</sup>488 Ziegenserum polyklonal). Bei einer Exzitation von  $\lambda=495$  nm und einer Emission von  $\lambda=519$  nm leuchteten die gesuchten Strukturen grün. Nach einer Inkubationszeit von 60 min wurden die Objektträger gewaschen und mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) für 15 s bei Dunkelheit gefärbt. Die Verbindung lagert sich bevorzugt an AT-reiche Regionen der DNA an und dient somit der Zellkernfärbung. DAPI kann bei einem Absorptionsmaximum von  $\lambda=340$  nm und einem Emissionsmaximum von  $\lambda=488$  nm in einem Fluoreszenzmikroskop als blau leuchtendes Farbsignal nachgewiesen werden. Nach der letzten Waschung in TRIS-Puffer wurden die Objektträger mit *Fluorescent Mounting Medium* beschichtet und eingedeckelt. Die Aufbewahrung der Schnitte erfolgte bei 4 °C in Dunkelheit.

### **4.3.7.3.2 Histologische Auswertung und Erstellung der Fotos**

Die Aufnahmen für die Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung erfolgten mit dem Mikroskop Leica DFC340 FX in 10-facher Vergrößerung. Wie in Tabelle 7 dargestellt, wurden insgesamt acht histologische Schnitte pro Herz für die Bestimmung der Kapillardichte analysiert. Um verschiedene Ebenen des Herzens darzustellen, wurde zwischen den Paraffinschnitten ein Abstand von 9 resp. 12  $\mu\text{m}$  gewählt. Für die Immunfluoreszenzfärbung standen  $n=4-8$  Tiere pro Wirkstoffgruppe zur Verfügung. Zur Darstellung des infarzierten Bereiches, der „Borderzone“ und des gesunden Herzmuskelgewebes wurden pro Herzschnitt 10–15 Blickfelder mit dem Programm Leica Application Suite V3.4.0 aufgenommen und für die Auswertung verwendet. Hierzu wurden in der „Borderzone“, im Infarktbereich und im angrenzenden vitalen Gewebe je drei *High Power Fields* (HPF) mit einer Größe von 0,04  $\text{mm}^2$  gesetzt und die CD31 positiven Kapillaren wurden ausgezählt. Somit konnte die Kapillardichte/0,04  $\text{mm}^2$  angegeben werden. Des Weiteren erfolgte bei den Kontrolltieren sowie bei den Tieren, die mit VEGF alleine, AMD3100 alleine und der Kombination der beiden Wirkstoffe behandelt wurden, die Bestimmung des durchschnittlichen Gefäßdurchmessers. Hierzu wurden mittels ImageJ die Gefäße im Infarktbereich, in der „Borderzone“ und im angrenzenden gesunden Gewebe ausgemessen und die Gefäßgröße pro  $\text{mm}^2$  bestimmt.

#### 4.3.8 Bestimmung der Infarktgröße

Die Herzen wurden kurz nach der Entnahme mit PBS gewaschen und von eventuellen Blutresten oder Koagula gesäubert. Dann erfolgte das Einfrieren der Herzen bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  für mindestens 3 h. Anschließend wurden die Herzen mittels eines Skalpells auf der Kälteplatte horizontal in 1 mm breite Scheiben geschnitten. Danach erfolgte die Inkubation der Herzscheiben in TTC (2-, 3-, 5-Triphenyltetrazoliumchloride) bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 3–5 min. Anschließend wurden die gefärbten Herzen mit 4 %igem Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Das Tetrazoliumsalz reagierte bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  mit der Dehydrogenase in den Zellen und führte zu einer Rotfärbung des gesunden Gewebes. Da das infarzierte, nekrotische Gewebe keine Dehydrogenase besitzt, verblieb es blass, wohingegen das vitale Gewebe deutlich rot angefärbt wurde. Nach der Inkubation und Fixierung wurden die 1 mm dicken Herzscheiben vorder- und rückseitig eingescannt. Die quantitative Auswertung der Infarktgröße erfolgte mit dem Programm ImageJ. Hierzu wurde sowohl das blasse, infarzierte Gewebe als auch das vitale, rot angefärbte Herzmuskelgewebe ausgemessen und der prozentuale Anteil der Infarktgröße wurde ermittelt.



**Abbildung 12: Repräsentative Darstellung eines TTC-gefärbten Herzens**

In der TTC-Färbung wurde das vitale Gewebe rot angefärbt, das infarzierte Gewebe verblieb aufgrund der fehlenden Dehydrogenase blass. Somit konnte die prozentuale Infarktgröße bestimmt werden.

### 4.3.9 Statistische Auswertung

Die statistische Evaluation erfolgte unter Verwendung der Software GraphPad PRISM Version 5.0 und Microsoft Excel 2011. Die Prüfung auf die Gauß'sche Normalverteilung der ermittelten Werte erfolgte mit dem Programm GraphPad PRISM Version 5.0. Nach Testung der Normalverteilung mittels des D'Agostino-Pearson-Omnibus-Tests wurde im Falle der Normalverteilung der t-Test nach Student verwendet. Da es sich bei allen Daten um normalverteilte Werte handelte, konnte im Anschluss der zweiseitige, ungepaarte *Student's t-Test* mit dem Programm Microsoft Excel durchgeführt werden. Wenn eine Irrtumswahrscheinlichkeit ( $p$ ) von  $*p < 0,05$  vorlag, wurde der geprüfte Wert als signifikant bewertet. Bei dem Vorliegen einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $**p < 0,01$  wurden die Mittelwertunterschiede als hochsignifikant beurteilt.  $p$ -Werte größer 0,05 wurden folglich als nicht signifikantes Ergebnis (n.s.;  $^{\dagger}p < 0,1$ ) gewertet.

Für jeden einzelnen Parameter wurden pro Gruppe und Faktor der arithmetische Mittelwert und Standardfehler (SEM) berechnet. Der Standardfehler wurde hinter den Mittelwerten angegeben.

Die Überlebenszeitanalyse und die Darstellung in der Kaplan-Meier-Kurve erfolgten mit dem Programm GraphPad PRISM Version 5.0.

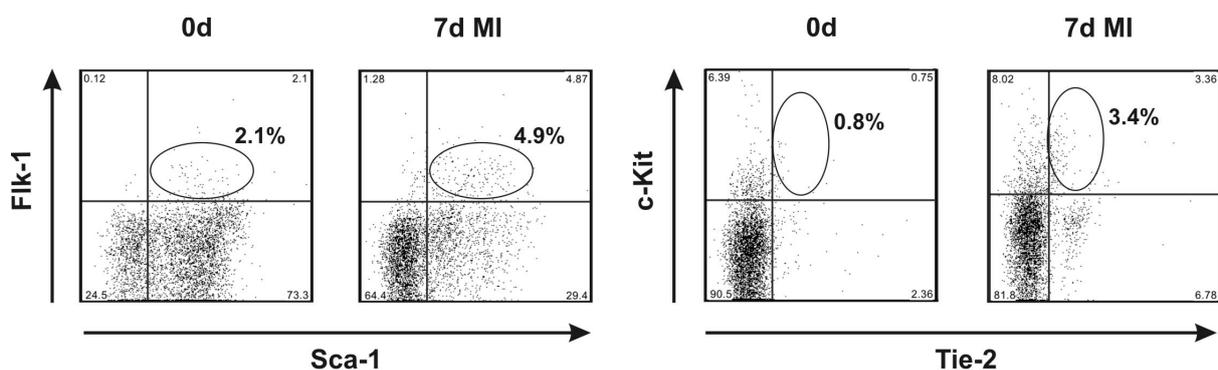
## 5 ERGEBNISSE

### 5.1 FACS-Analyse

#### 5.1.1 Mobilisierung von hämatopoetischen und endothelialen Vorläuferzellen

Die Mobilisierung von knochenmarksständigen HSC und EPC in das periphere Blut wurde vor der Myokardinfarktinduktion an Tag 0 und nach der OP an den Tagen 7, 14 und 28 mittels FACS-Analyse ermittelt. Mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut wurden hinsichtlich der Expression von Flk-1, Sca-1, c-Kit und Tie-2 untersucht, welche als generell akzeptierte Zelloberflächenmarker für die Identifizierung von HSC und EPC gelten (Asahara, Masuda et al. 1999; Takahashi, Kalka et al. 1999).

Die Mobilisierung der HSC und EPC in das periphere Blut erreichte sieben Tage nach erfolgter Operation die höchsten Werte. Zwei Wochen nach der induzierten Ischämie wurden wieder die Ausgangswerte erreicht.



**Abbildung 13: FACS-Analyse der mobilisierten EPC**

In der FACS-Analyse erfolgt die optische Darstellung der digitalen Messimpulse durch zweiachsige Punktdiagramme (*Dot-Plots*). Die mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut wurden an Tag 0 vor der Operation und an den Tagen 7, 14, 28 nach erfolgter Myokardinfarkt(MI)-Induktion mittels Durchflusszytometrie untersucht. Sieben Tage nach der chirurgischen Intervention konnte eine vermehrte Anzahl von Flk-1<sup>+</sup>/Sca-1<sup>+</sup> und c-Kit<sup>+</sup>/Tie-2<sup>+</sup>-EPC identifiziert werden.

#### 5.1.1.1 Mobilisierung von Flk-1<sup>+</sup>/Sca-1<sup>+</sup>-Zellen

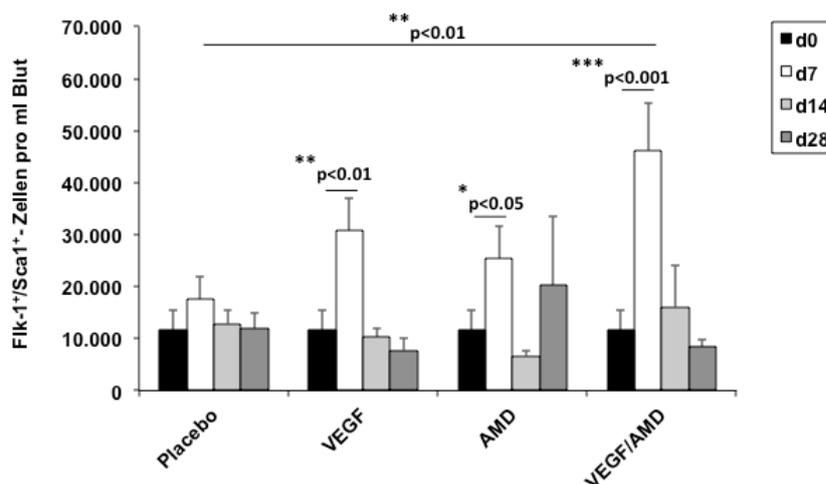
Die Applikation von VEGF führte zu einem moderaten Anstieg der mobilisierten Flk-1<sup>+</sup>/Sca-1<sup>+</sup>-positiven EPC. An Tag 7 wurden die meisten Zellen im peripheren Blut nachgewiesen (\*\*p<0,01 im Vergleich zu Tag 0).

Auch die einmalige Applikation des CXCR4-Antagonisten AMD3100 förderte die Mobilisierung der EPC in das periphere Blut (\* $p < 0,05$  im Vergleich zu Tag 0; siehe Abb. 14).

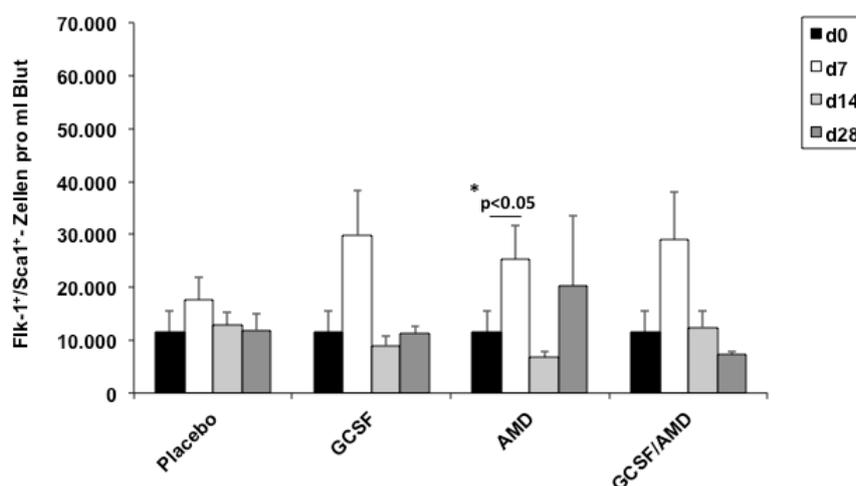
Die Vorbehandlung mit VEGF an den Tagen 1, 2 und 3 und die anschließende Applikation von AMD3100 an Tag 4 führten an Tag 7 zu einem hochsignifikanten Anstieg der Flk-1<sup>+</sup>/Sca1<sup>+</sup>-positiven Zellen im Vergleich zu Tag 0 (\*\* $p < 0,001$ ) und im Vergleich zu den mit Kochsalzlösung behandelten Kontrolltieren (\*\* $p < 0,01$ ; siehe Abb. 14 A). Dies zeigt, dass VEGF in Kombination mit AMD3100 synergistisch zu einer vermehrten Mobilisierung der Flk-1<sup>+</sup>/Sca1<sup>+</sup>-Zellen in das periphere Blut führt.

Im Gegensatz dazu führte die Behandlung mit G-CSF alleine oder die Kombination von G-CSF und AMD3100 zu keinem signifikanten Anstieg der Flk-1<sup>+</sup>/Sca1<sup>+</sup>-Zellen im peripheren Blut (siehe Abb. 14 B).

A)



B)



**Abbildung 14: FACS-Analyse der Flk-1<sup>+</sup>/Sca1<sup>+</sup>-gefärbten mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut**

**A)** Die Mobilisation von EPC erreichte an Tag 7 die höchsten Werte (\*\*p<0,01 VEGF Tag 7 vs. Tag 0; \*p<0,05 AMD3100 Tag 7 vs. Tag 0; \*\*\*p<0,001 VEGF/AMD3100 Tag 7 vs. Tag 0).

Die kombinierte Wirkstoffapplikation von VEGF und AMD3100 führte zu einem hochsignifikanten Anstieg der mobilisierten EPC im Vergleich zu den Kontrolltieren (\*\*p< 0,01).

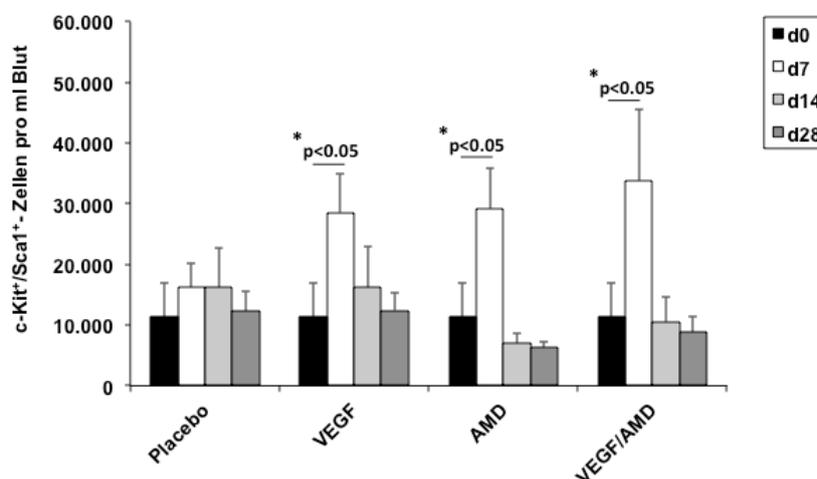
**B)** Bei den Mäusen, die mit G-CSF und G-CSF/AMD3100 behandelt wurden, ließ sich zwar eine ähnliche Tendenz beobachten, eine Signifikanz zwischen den mit den Wirkstoffen behandelten Tieren und den Kontrolltieren war jedoch nicht zu beobachten. Die aufgeführten Werte repräsentieren Mittelwerte ± SEM. Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test;

Kontrollgruppe n(d7/d14/d28)=14/17/12, G-CSF n(d7/d14/d28)=18/15/12, G-CSF/AMD n(d7/d14/d28)=16/17/14, VEGF n(d7/d14/d28)=12/10/7, VEGF/AMD n(d7/d14/d28)=14/9/7, AMD n(d7/d14/d28)=16/14/9.

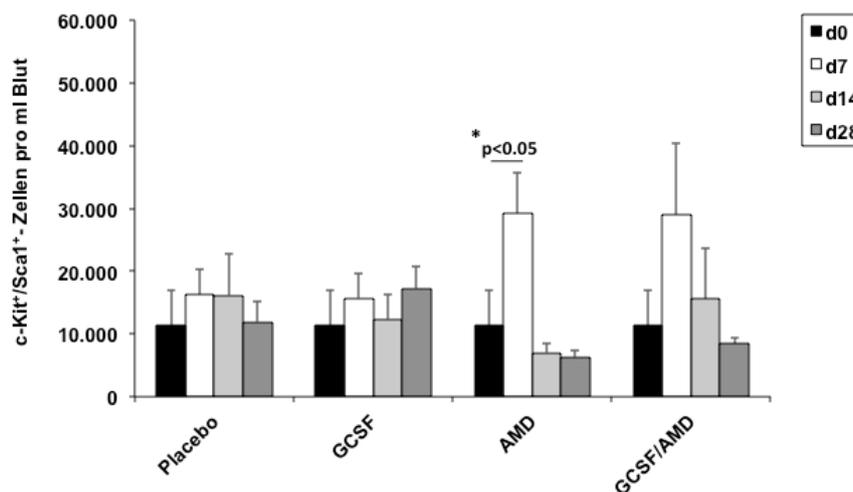
**5.1.1.2 Mobilisierung von c-Kit<sup>+</sup>/Sca-1<sup>+</sup>-Zellen**

Einen ähnlichen Trend kann bezüglich der c-Kit<sup>+</sup>/Sca-1<sup>+</sup>-positiven mobilisierten Zellen in das periphere Blut beobachtet werden (siehe Abb. 15). Auch hier ist die Anzahl der mobilisierten c-Kit<sup>+</sup>/Sca-1<sup>+</sup>-Zellen an Tag 7 am höchsten, wobei sich bei den Mäusen die mit VEGF, AMD3100 oder der Kombination dieser beiden Wirkstoffe behandelt wurden, ein signifikanter Anstieg der Zellen im Vergleich zu Tag 0 beobachten lässt (\*p<0,05 Tag 7 vs. Tag 0; siehe Abb. 15 A). Bei den Tieren, die mit G-CSF resp. G-CSF und AMD3100 behandelt wurden, kann jedoch keine Signifikanz festgestellt werden (siehe Abb. 15 B). Auch hinsichtlich der Unterschiede zwischen den Wirkstoffgruppen und der Kontrollgruppe wurden keine statistisch signifikanten Werte erreicht (siehe Abb. 15).

**A)**



B)



**Abbildung 15: FACS-Analyse der c-Kit<sup>+</sup>/Sca1<sup>+</sup>-gefärbten mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut**

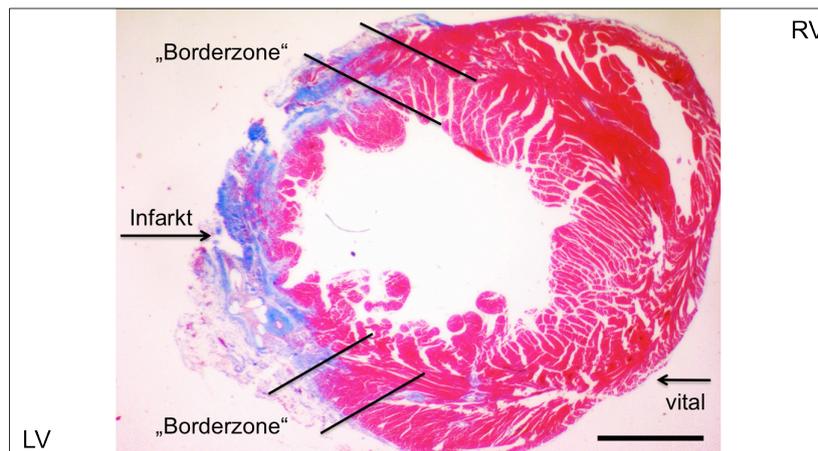
**A)** Die Mobilisation der c-Kit<sup>+</sup>/Sca1<sup>+</sup>-positiven hämatopoetischen Progenitorzellen erreichte sowohl bei den Tieren die mit VEGF resp. AMD3100 alleine behandelt wurden, als auch bei den Mäusen, die die kombinierte Anwendung dieser beiden Wirkstoffe erhielten, an Tag 7 die höchsten Werte (\*p<0,05 Tag 7 vs. Tag 0). Eine Signifikanz zwischen den Wirkstoffgruppen und der Kontrollgruppe konnte jedoch nicht festgestellt werden. **B)** Bei den mit G-CSF und G-CSF/AMD3100 behandelten Mäusen wurden keine signifikanten Werte erreicht. Die aufgeführten Werte repräsentieren Mittelwerte ± SEM. Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test; Kontrollgruppe n(d7/d14/d28)=13/14/11, G-CSF n(d7/d14/d28)=16/15/12, G-CSF/AMD n(d7/d14/d28)=15/16/14, VEGF n(d7/d14/d28)=11/9/7, VEGF/AMD n(d7/d14/d28)=13/8/6, AMD n(d7/d14/d28)=15/11/9.

## 5.2 Histologische Untersuchung der Herzen

### 5.2.1 Identifizierung von CD31<sup>+</sup>-Kapillaren im kardialen Gewebe mittels Immunfluoreszenzfärbung

Zirkulierende Sca-1<sup>+</sup>/Flk-1<sup>+</sup>-EPC sind dafür bekannt, dass sie im ischämischen Herzgewebe zur Bildung von neuen Gefäßen und somit zur Neovaskularisation beitragen (Asahara and Kawamoto 2004; Jujo, Hamada et al. 2010). Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit die Kapillardichte mithilfe des Endothelzellmarkers CD31/PECAM untersucht und die Kapazität der Neovaskularisation der verschiedenen Wirkstoffgruppen 28 Tage nach induziertem AMI ermittelt (siehe Abschnitt 4.3.7.3). Für die Auswertung wurden insgesamt

acht Objektträger pro Herz angefertigt. Es wurden jeweils Abstände von 9 bzw. 12  $\mu\text{m}$  zwischen den einzelnen Paraffinschnitten gewählt (siehe Abschnitt 4.3.7.2, Tab. 8), um verschiedene Ebenen des Herzens darzustellen. Zur besseren Veranschaulichung sind in der Abb. 16 anhand der Masson-Trichrom-Färbung der Infarktbereich, die „Borderzone“ und das angrenzende gesunde Gewebe dargestellt. In diese drei verschiedenen Bereiche wurden in den CD31/PECAM gefärbten Schnitten jeweils drei HPF mit einer Größe von 0,04  $\text{mm}^2$  gesetzt und die Kapillardichte bestimmt (siehe Abschnitt 4.3.7.3.2).



**Abbildung 16: Masson-Trichrom-Färbung**

Repräsentative Darstellung eines Masson-Trichrom-gefärbten Herzschnittes 28 Tage nach induziertem Myokardinfarkt in vierfacher Vergrößerung; der Infarktbereich ist anhand der intensiven Blaufärbung zu erkennen. Die „Borderzone“ befindet sich direkt angrenzend an das Gebiet der maximalen Ischämie; der vitale Bereich ist rot eingefärbt. LV = Linker Ventrikel; RV= Rechter Ventrikel; Maßstab Balken  $\cong$  1 mm.

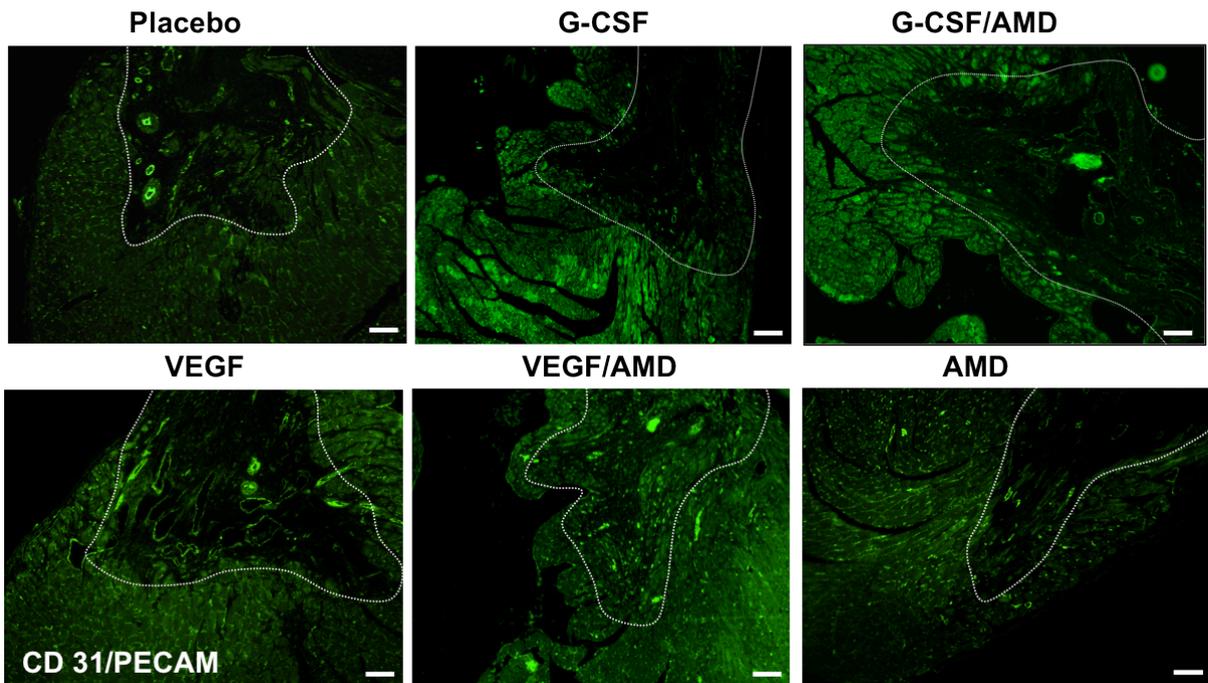
### 5.2.1.1 Neovaskularisation in der „Borderzone“ und im angrenzenden vitalen Gewebe

In der Abbildung 17 A) sind repräsentative Schnitte der CD31/PECAM gefärbten Herzen der verschiedenen Wirkstoffgruppen aufgeführt. Die „Borderzone“ ist zur besseren Orientierung eingezeichnet.

Anhand der graphischen Darstellung wird deutlich, dass die alleinige Gabe von VEGF ( $8,4 \pm 1,6$  Zellen/ $0,04 \text{ mm}^2$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe zu keinem signifikanten Anstieg der Kapillardichte in der „Borderzone“ führte. Die kombinierte Anwendung von VEGF und AMD3100 hingegen resultierte in einem signifikanten Anstieg der Kapillardichte in der „Borderzone“ ( $12,55 \pm 1,8$  Zellen/ $0,04 \text{ mm}^2$ ;  $*p < 0,05$ ) verglichen mit der Kontrollgruppe ( $7,26 \pm 0,6$  Zellen/ $0,04 \text{ mm}^2$ ). Die Behandlung mit G-CSF ( $6,38 \pm 0,4$  Zellen/ $0,04 \text{ mm}^2$ ), AMD3100 ( $6,1 \pm 2,4$  Zellen/ $0,04 \text{ mm}^2$ ) bzw. G-CSF/AMD3100 ( $6,33 \pm 0,3$  Zellen/ $0,04 \text{ mm}^2$ )

fürte demgegenüber zu keiner erhöhten Kapillardichte in der „Borderzone“ (siehe Abb. 17 B). Im angrenzenden gesunden Myokard wurde bei den mit VEGF behandelten Mäusen eine höhere Anzahl an Kapillaren ( $72,8 \pm 4,7$  Zellen/ $0,04 \text{ mm}^2$ ) im Vergleich zu der Kontrollgruppe ( $63 \pm 7,2$  Zellen/ $0,04 \text{ mm}^2$ ) festgestellt, wobei keine signifikanten Werte erreicht wurden (siehe Abb. 17 C).

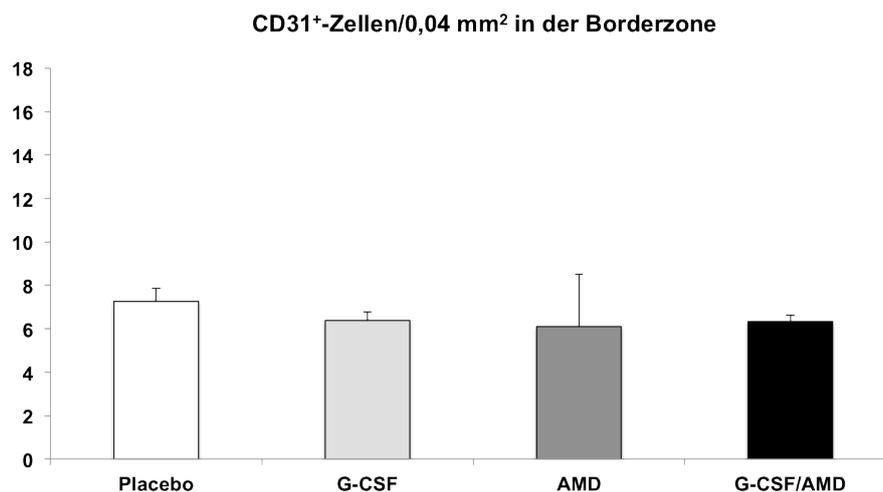
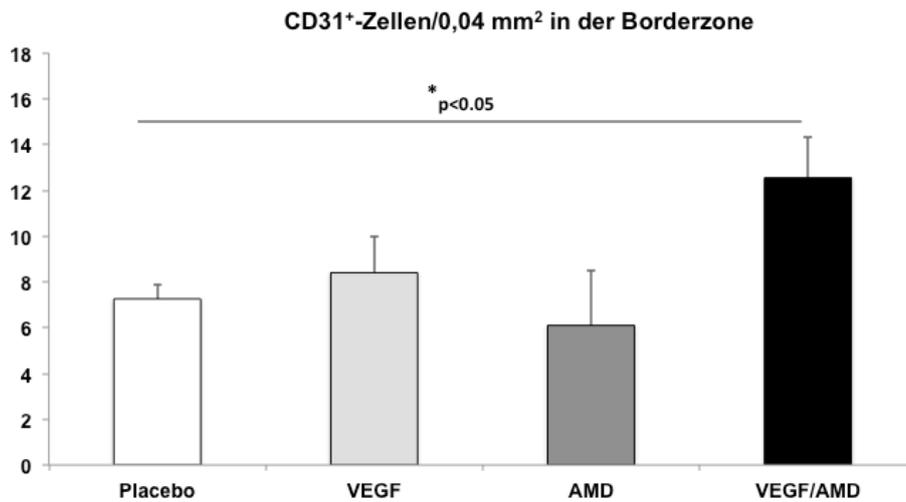
A)



**Abbildung 17: CD31/PECAM Immunfluoreszenzfärbung zur Bestimmung der Kapillardichte in der „Borderzone“ und im nicht infarzierten Bereich**

28 Tage nach der Infarktinduktion und der Behandlung mit den verschiedenen Wirkstoffen (Placebo, G-CSF, G-CSF/AMD3100, VEGF, VEGF/AMD3100 und AMD3100) wurden die Mäuse euthanasiert und die Herzen für die Immunfluoreszenzfärbung mit CD31/PECAM zur Bestimmung der Kapillardichte in der „Borderzone“ und im angrenzenden gesunden Gewebe entnommen. **A)** Repräsentative histologische Schnitte der verschiedenen Wirkstoffgruppen Placebo, G-CSF, G-CSF/AMD3100, VEGF, VEGF/AMD3100 und AMD3100 in zehnfacher Vergrößerung. Die äußere Begrenzung der „Borderzone“ ist zur besseren Orientierung eingezeichnet. Die Kapillardichte wurde durch die Auszählung der CD31/PECAM-positiven Gefäße/ $0,04 \text{ mm}^2$  bestimmt; Maßstabballen  $\cong 100 \mu\text{m}$ .

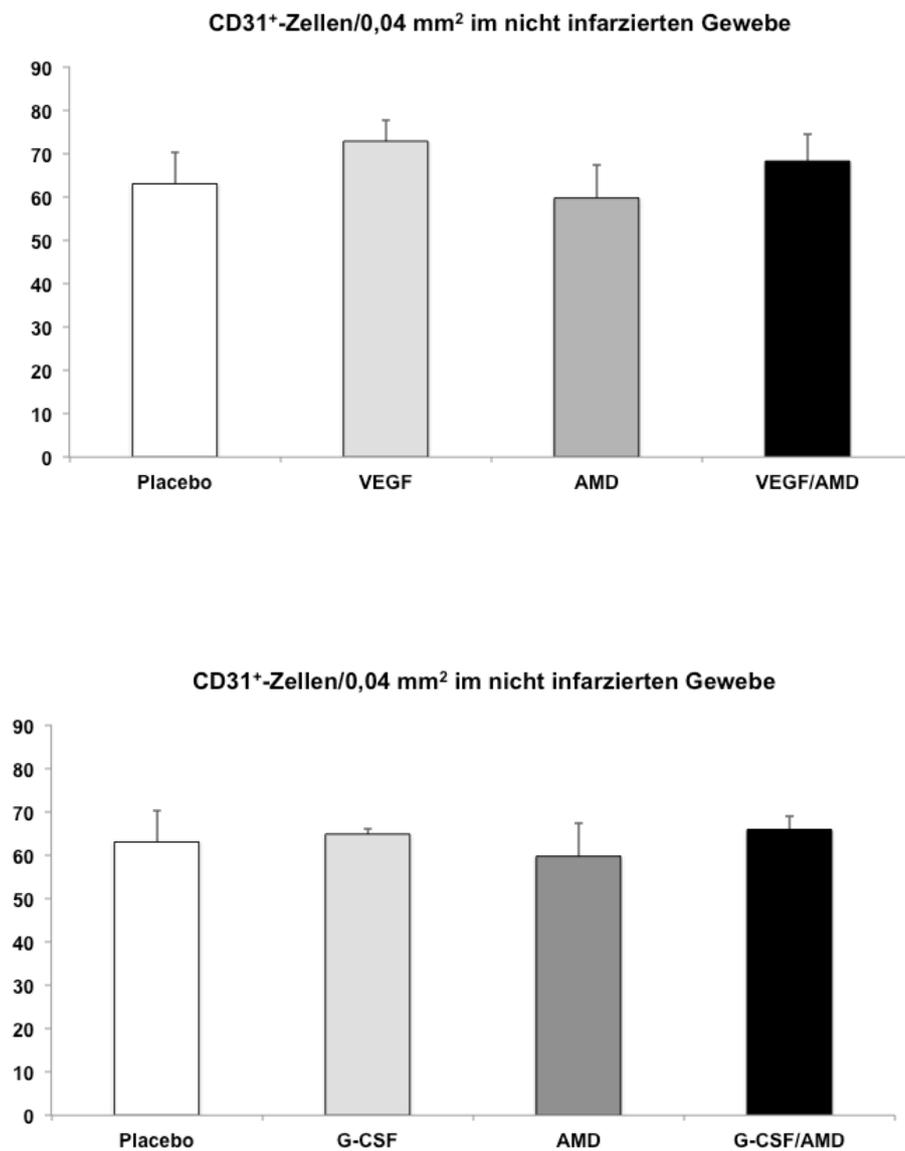
B)



**Abbildung 17 (fortgeführt): CD31/PECAM Immunfluoreszenzfärbung zur Bestimmung der Kapillardichte in der „Borderzone“ und im nicht infarzierten Bereich**

**B)** Die mit VEGF/AMD3100 behandelten Mäuse zeigten eine signifikant höhere Kapillardichte in der „Borderzone“, verglichen mit der Kontrollgruppe (\*p<0,05). Die aufgeführten Werte repräsentieren Mittelwerte ± SEM (n=4–8 Herzen/Wirkstoffgruppe). Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test.

C)

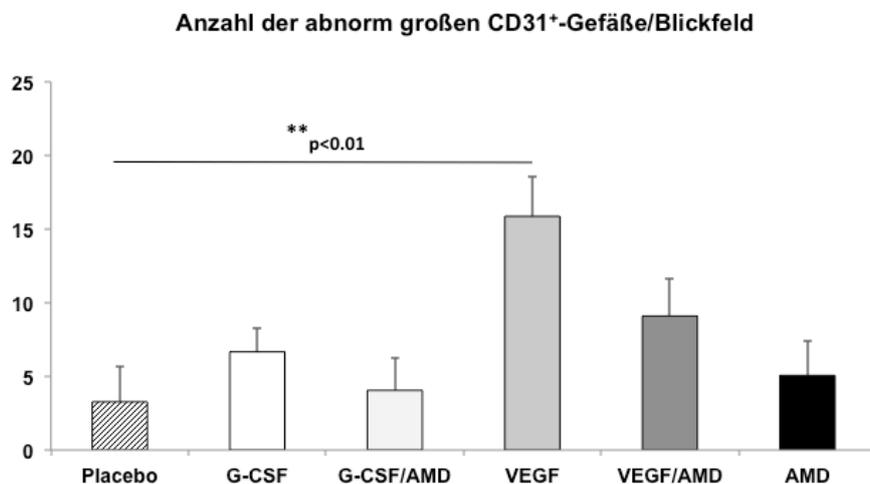


**Abbildung 17 (fortgeführt): CD31/PECAM Immunfluoreszenzfärbung zur Bestimmung der Kapillardichte in der „Borderzone“ und im nicht infarzierten Bereich**

C) Die Applikation von VEGF führte zu einer erhöhten Kapillardichte im nicht infarzierten Gewebe, wobei keine statistisch signifikanten Werte erreicht wurden. Die aufgeführten Werte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=4-8 Herzen/Wirkstoffgruppe). Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test.

### 5.2.1.2 Ausbildung von abnormen vaskulären Strukturen

Beim Auszählen der CD31-positiven Gefäße in der „Borderzone“ und im angrenzenden gesunden Gewebe wurden zum Teil auch abnorm große vaskuläre Strukturen beobachtet, die über einen größeren Gefäßdurchmesser als 0,1 mm verfügten (siehe Abb. 18). Aus diesem Grund wurde bei den verschiedenen Wirkstoffgruppen in einer weiteren Untersuchung die Quantität der abnorm großen Gefäße erfasst. Hierzu wurden die CD31/PECAM-gefärbten Schnitte mit einem Mikroskop in zehnfacher Vergrößerung fotografiert und die Anzahl der Gefäße, die über einen größeren Durchmesser als 0,1 mm verfügten, pro Blickfeld ermittelt. Die mit VEGF-behandelten Mäuse wiesen eine hochsignifikant höhere Anzahl an abnorm großen Gefäße auf ( $15,88 \pm 2,7$  abnorm große Gefäße/Blickfeld;  $**p < 0,01$  im Vergleich zu den placebobehandelten Kontrolltieren mit  $3,27 \pm 2,4$  abnorm großen Gefäßen pro Blickfeld). Interessanterweise wurde bei der kombinierten Anwendung von VEGF und AMD31000 ( $9,1 \pm 2,6$  abnorm große Gefäße/Blickfeld) keine signifikant größere Anzahl von abnorm großen Gefäßen beobachtet. Auch die Tiere, die mit AMD3100 ( $5,1 \pm 2,3$  abnorm große Gefäße/Blickfeld), G-CSF ( $6,67 \pm 1,6$  abnorm große Gefäße/Blickfeld) sowie G-CSF/AMD3100 ( $4,06 \pm 1,8$  abnorm große Gefäße/Blickfeld) behandelt wurden, bildeten keine erhöhte Anzahl an abnorm großen Gefäßen aus (siehe Abb. 18).



**Abbildung 18: Anzahl der abnorm großen Gefäße pro Blickfeld**

Die graphische Abbildung zeigt die quantitative Auswertung der CD31<sup>+</sup>-Gefäße, die über einen größeren Gefäßdurchmesser als 0,1 mm verfügten. Die Gefäße wurden pro Blickfeld in zehnfacher Vergrößerung ausgezählt. Die VEGF-Gruppe wies eine hochsignifikante höhere Anzahl an abnorm großen vaskulären Strukturen auf ( $**p < 0,01$ ). Die aufgeführten Werte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=4–8 Herzen/Gruppe). Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test.

### 5.2.1.3 Morphometrische Analyse der Gefäße

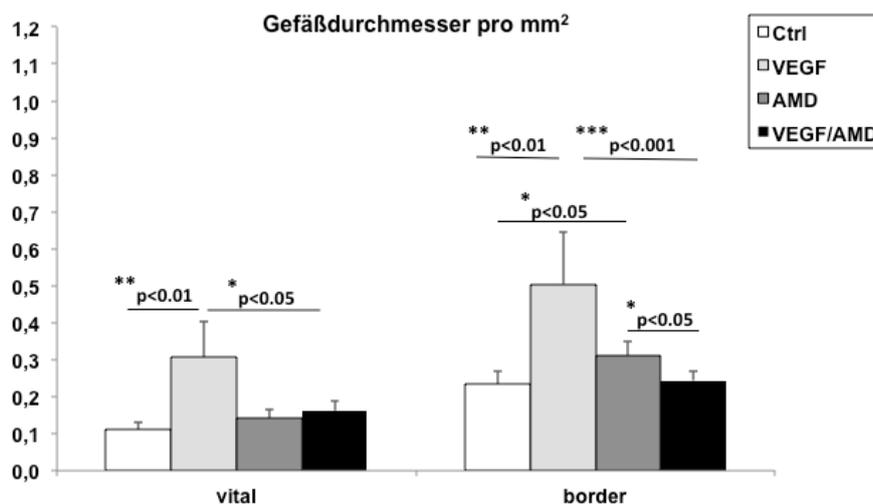
Wie in Abbildung 18 dargestellt, führte die alleinige Behandlung mit VEGF zu einer ausgeprägten Entwicklung von abnorm großen vaskulären Strukturen (Gefäßdurchmesser größer als 0,1 mm). Die Administration von G-CSF und die kombinierte Anwendung von G-CSF und AMD3100 schienen hingegen keinen Einfluss auf den Gefäßdurchmesser zu haben. Aus diesem Grund wurden bei den Mäusen die mit VEGF, VEGF/AMD3100 und AMD3100 behandelt wurden, die Gefäßdurchmesser im nicht infarzierten Gewebe und in der „Borderzone“ genau vermessen und pro mm<sup>2</sup> angegeben.

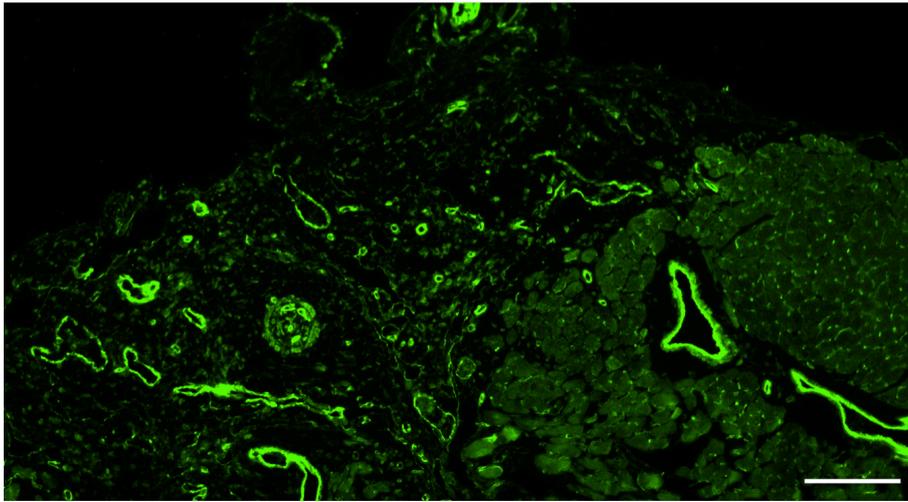
Die alleinige Behandlung mit VEGF führte sowohl im vitalen Gewebe (0,31±0,09 mm Gefäßdurchmesser/mm<sup>2</sup>; \*\*p<0,01) als auch in der „Borderzone“ (0,50±0,14 mm Gefäßdurchmesser/mm<sup>2</sup>; \*\*p<0,01) zur Ausbildung von signifikant größeren Gefäßen im Vergleich zu der Kontrollgruppe (nicht infarzierte Region 0,11±0,02 mm Gefäßdurchmesser/mm<sup>2</sup>; „Borderzone“ 0,23±0,04 mm Gefäßdurchmesser/mm<sup>2</sup>; siehe Abb. 19).

Die alleinige Behandlung mit AMD3100 resultierte nur in der „Borderzone“ in einer Vergrößerung des Gefäßdurchmessers (0,31±0,04 mm Gefäßdurchmesser/mm<sup>2</sup>; \*p<0,05).

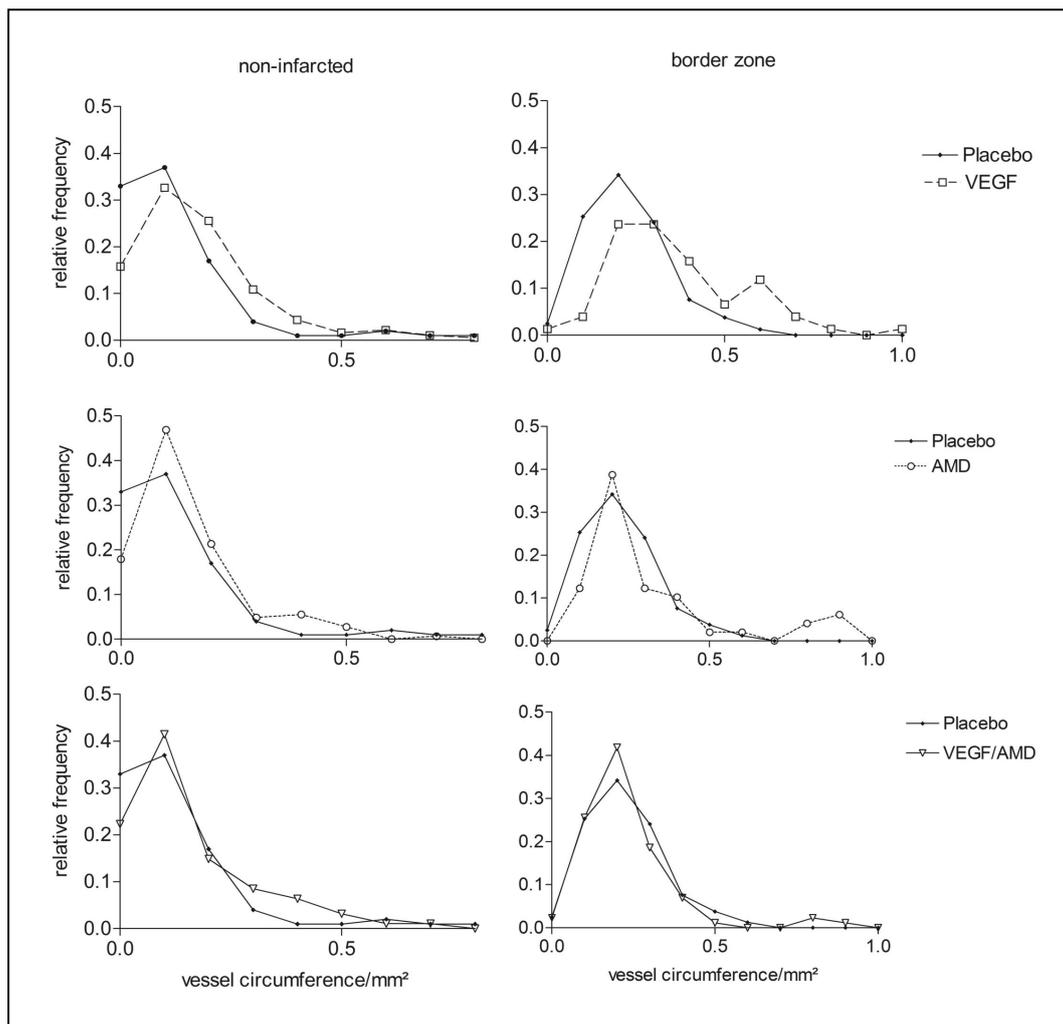
Wie in Abbildung 19 und 20 dargestellt, führte die kombinierte Anwendung von VEGF und AMD3100 zu keiner signifikanten Vergrößerung des Gefäßdurchmessers im Vergleich zu der Kontrollgruppe (0,24±0,02 mm Gefäßdurchmesser/mm<sup>2</sup> in der „Borderzone“).

A)



**B)****Abbildung 19: Morphometrische Analyse der Gefäße**

28 Tage nach induziertem Myokardinfarkt erfolgte die Messung der Gefäßdurchmesser in der „Borderzone“ und im angrenzenden vitalen Gewebe bei den Placebo-, VEGF-, VEGF/AMD3100- und AMD3100-behandelten Tieren. **A)** In der graphischen Abbildung wird deutlich, dass die mit VEGF behandelten Mäuse sowohl in der „Borderzone“ als auch im vitalen Gewebe im Vergleich zu der Placebogruppe über hochsignifikant größere Gefäßdurchmesser verfügten (\*\* $p < 0,01$ ). Die kombinierte Anwendung von VEGF und AMD3100 hingegen führte zu keiner vermehrten Ausbildung von abnorm großen vaskulären Strukturen. Die aufgeführten Werte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n=4-6$  Herzen/Gruppe). Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test. **B)** Repräsentative Darstellung eines CD31/PECAM-gefärbten Herzschnittes in zehnfacher Vergrößerung einer VEGF-behandelten Maus; Maßstab balken  $\triangleq 100 \mu\text{m}$ .



**Abbildung 20: Relative Häufigkeit des mittleren Gefäßdurchmessers/mm<sup>2</sup> in der nicht infarzierten Region und in der „Borderzone“**

Anhand der graphischen Darstellung wird deutlich, dass die alleinige Behandlung mit VEGF im nicht infarzierten Gewebe und in der „Borderzone“ zu einer Verschiebung der Gefäßgröße hin zu größeren vaskulären Strukturen führte. Auch die Behandlung mit AMD3100 resultierte in der „Borderzone“ in größeren Gefäßdurchmessern. Bei der kombinierten Anwendung von VEGF und AMD3100 wurden demgegenüber keine Veränderungen des mittleren Gefäßdurchmessers beobachtet. Die aufgeführten Werte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=4–6 Herzen pro Gruppe).

Bei Betrachtung der aufgeführten Ergebnisse lässt sich resümieren, dass die kombinierte Behandlung mit VEGF und AMD3100 zu einer vermehrten Neovaskularisation führte, ohne dabei abnorme Gefäße in der „Borderzone“ auszubilden.

### 5.3 Infarktgrößenbestimmung

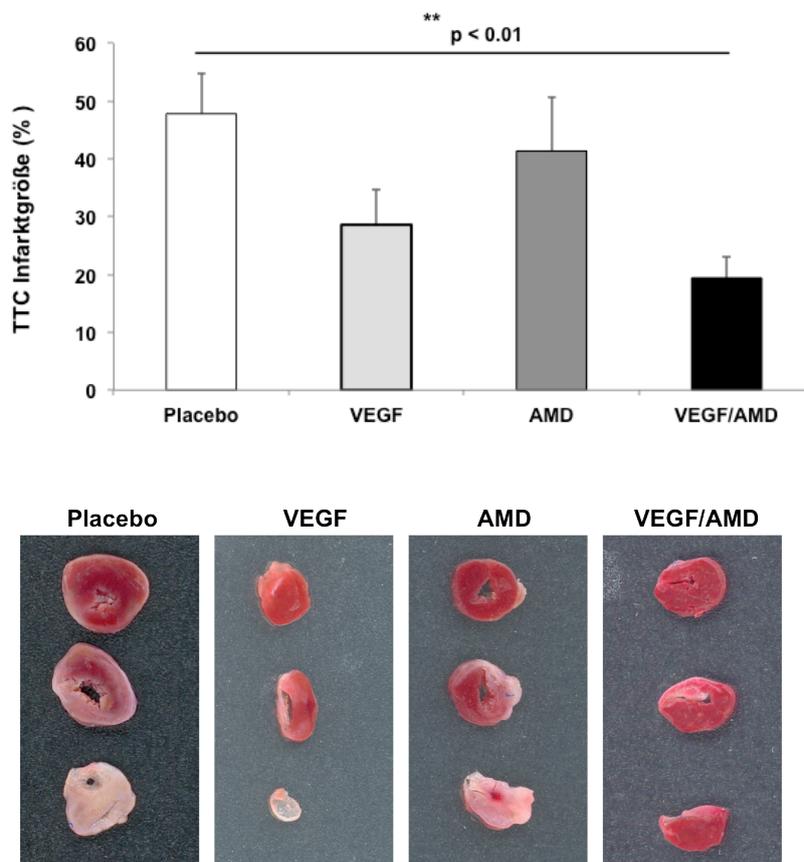
#### 5.3.1 Makroskopische Infarktgrößenmessung mittels TTC-Färbung

Die funktionelle Bedeutung der vermehrten Neovaskularisation und der Mobilisation von endothelialen Progenitorzellen wird bei Betrachtung der Infarktgrößen deutlich.

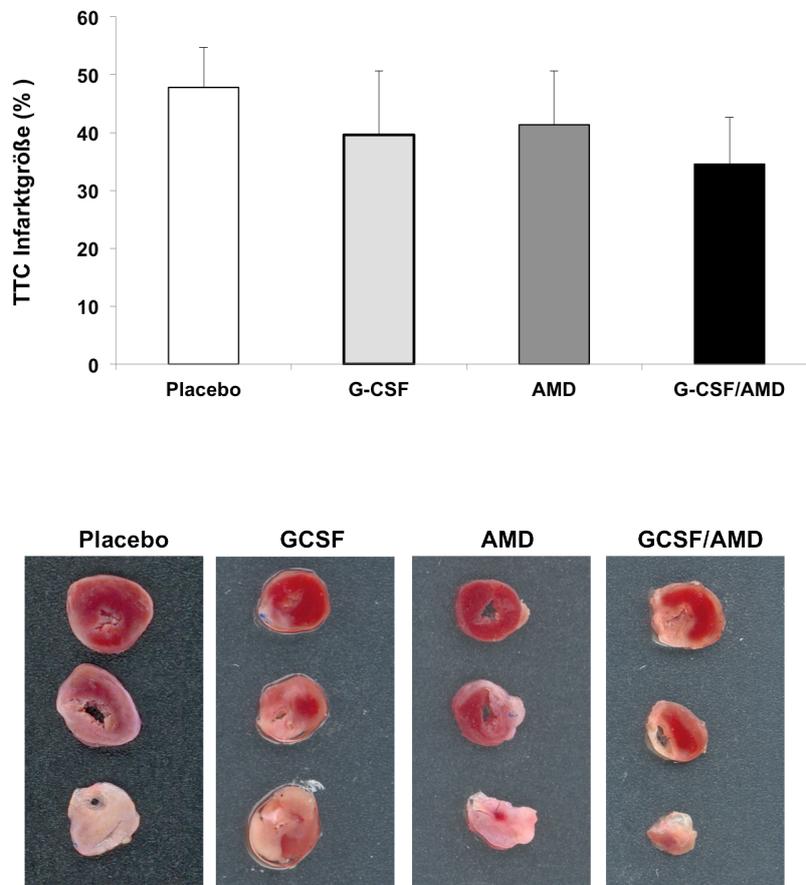
Zur Bestimmung des Ausmaßes der infarzierten Fläche wurden die Herzen 28 Tage nach stattgehabtem AMI mit TTC gefärbt und unter der in Kapitel 4.3.8 angegebenen Methode ausgewertet.

Die kombinierte Therapie mit VEGF und AMD3100 führte zu einer hochsignifikanten Verringerung der Infarktgröße (19,4 %±3,7; \*\*p<0,01), verglichen mit der Kontrollgruppe (47,8 %±7,0; siehe Abb. 21 A). Auch die nur mit VEGF behandelten Mäuse zeigten einen kleineren Infarktbereich (28,6 %±6,1) als die Kontrollgruppe, ohne dabei jedoch einen statistisch signifikanten Wert zu erreichen. Bei der Gabe von AMD3100 verblieben große infarzierte Bereiche (41,3 %±9,3). Auch die Behandlung mit G-CSF (39,58 %±11,1) resp. G-CSF/AMD3100 (34,53 %±8,0) hatte keinen positiven Effekt auf die Infarktgröße (siehe Abb. 21 B).

A)



**B)**



**Abbildung 21:TTC-Färbung**

Die Infarktgrößenbestimmung erfolgte mittels TTC-Färbung der Herzquerschnitte 28 Tage nach induziertem Myokardinfarkt. Das vitale Gewebe wurde rot angefärbt und das Infarktgebiet verblieb aufgrund der fehlenden Dehydrogenase blass. **A)** Die Behandlung mit VEGF/AMD3100 führte zu einer hochsignifikanten Verringerung der Infarktgröße (\*\* $p < 0,01$ ).

**B)** Die Behandlung von G-CSF resp. G-CSF/AMD3100 hingegen hatte keinen positiven Einfluss auf die Infarktgröße. In der Abbildung sind repräsentative Bilder der TTC-gefärbten Herzen der verschiedenen Wirkstoffgruppen und der Kontrollgruppe dargestellt. Die aufgeführten Werte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n=4-7$  Herzen/Gruppe). Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test.

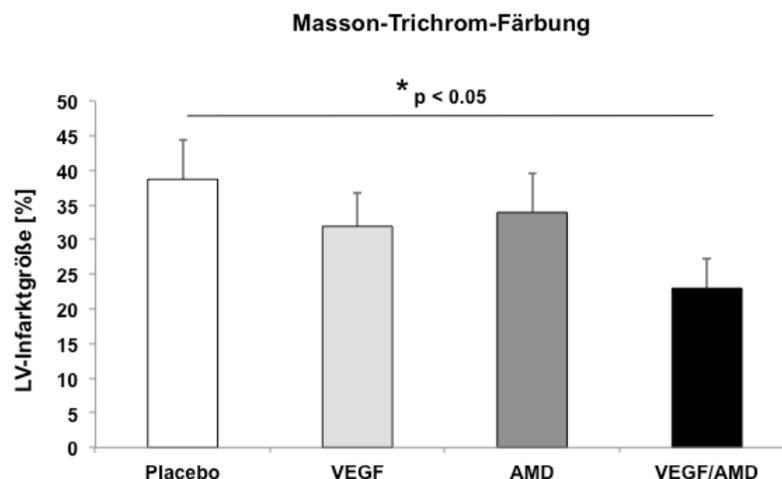
### 5.3.2 Bestimmung der linksventrikulären Fibrose

Zur Darstellung des kollagenen Bindegewebes bzw. Narbengewebes wurden sechs Querschnitte pro Herz mit Masson-Trichrom gefärbt und nachfolgend mit dem Computerprogramm ImageJ ausgewertet (siehe Abschnitt 4.3.7.2.2). Das kollagene, fibrotische Narbengewebe, welches sich blau darstellt, wurde in Relation zu dem linken Ventrikel vermessen und der prozentuale Anteil der linksventrikulären Fibrose wurde berechnet (siehe Abb. 22).

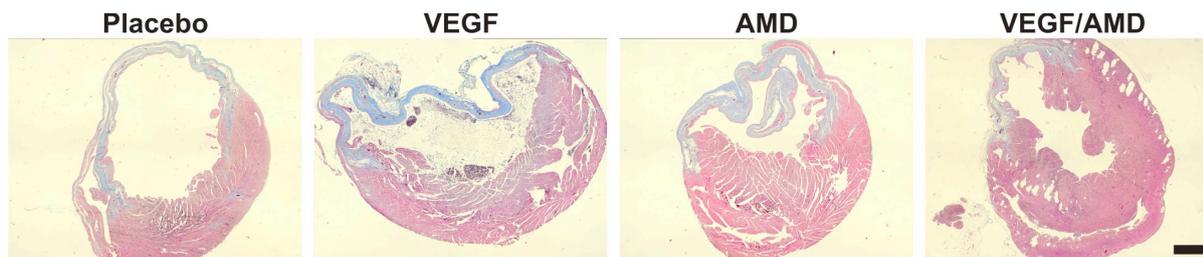
Da in der TTC-Färbung die mit VEGF/AMD3100 behandelten Mäuse die geringste Infarktgröße aufwiesen, wurde zur Bestätigung der Infarktgrößenbestimmung bei den Mäusen die VEGF, VEGF/AMD3100 und AMD3100 erhielten, die linksventrikuläre prozentuale Fibrose bestimmt und im Vergleich zu der placebobehandelten Kontrollgruppe graphisch dargestellt. In der Abbildung 22 A) sind die prozentualen Werte der linksventrikulären Fibrose aufgeführt.

Die Ausbildung des Narbengewebes war bei der placebobehandelten Kontrollgruppe am höchsten (38,71 %±5,62). Auch die Tiere, die mit VEGF (31,93 %±4,74) oder AMD3100 (33,93 %±5,55) behandelt wurden, wiesen ein großes Infarktgebiet auf. Die mit VEGF/AMD3100 behandelten Mäuse verfügten mit einem Wert von 22,99 %±4,74 über eine signifikant kleinere Infarktgröße als die Kontrollgruppe (\*p<0,05). Auch in den repräsentativen Masson-Trichrom-gefärbten histologischen Schnitten sind die Unterschiede in Bezug auf die linksventrikuläre Fibrose deutlich erkennbar (siehe Abb. 22 B).

A)



**B)**



**Abbildung 22: Prozentuale linksventrikuläre Infarktgröße**

**A)** In der graphischen Abbildung sind die prozentualen Werte der linksventrikulären Fibrose anhand der Masson-Trichrom-Färbung dargestellt. Die mit VEGF/AMD3100 behandelten Tiere verfügten über eine signifikant verringerte Infarktgröße im Vergleich zu der Kontrollgruppe (\* $p < 0,05$ ). **B)** Repräsentative Masson-Trichrom-gefärbte histologische Schnitte in vierfacher Vergrößerung der Wirkstoffgruppen Placebo, VEGF, AMD3100, VEGF/AMD3100; das kollagene Bindegewebe wurde blau angefärbt und in Relation zum linksventrikulären gesunden Myokard vermessen. Die aufgeführten Werte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n=5-8$  Herzen/Gruppe;  $n=6$  Querschnitte/Herz). Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test; Maßstab  $\cong 1$  mm.

## 5.4 Überlebenszeitanalyse

In dem vorliegenden Versuch wurden insgesamt 177 FVB/N-Mäuse operiert (40 Placebo, 37 G-CSF, 32 G-CSF/AMD, 21 VEGF, 23 VEGF/AMD, 24 AMD), von denen 91 überlebten, woraus sich eine prozentuale Gesamtüberlebensrate von 51,41 % ergibt.

Die Mortalitäten in den einzelnen Wirkstoffgruppen variierten erheblich, sodass sich in den einzelnen Wirkstoffgruppen eine unterschiedliche Gesamtüberlebendanzahl an operierten Tieren ergab, um eine ausreichende Tieranzahl für die spätere Auswertung zu generieren (siehe Tab. 9 und Abb. 23). Bezüglich der Gesamtüberlebensrate konnten keine statistisch signifikanten Werte beobachtet werden. Anhand der tabellarischen Darstellung wird deutlich, dass die prozentuale Überlebensrate der Tiere, die mit AMD3100 behandelt wurden, mit 62,5 % (24 Mäuse wurden operiert/15 Mäuse überlebten) am größten ist. Auch die Behandlung mit VEGF in Kombination mit AMD3100 führte zu einer hohen Überlebensrate mit 56,52 % (13/23) im Vergleich zu der Kontrollgruppe mit 50,00 % (20/40). Unter den Mäusen, die starben, waren diejenigen, die mit dem Zytokin G-CSF behandelt wurden, am häufigsten vertreten. Die Überlebensrate wies mit 40,54 % (15/37) einen sehr geringen Wert auf (siehe Abb. 23). Die Überlebenszeitanalyse an Tag 28 wurde mittels der Kaplan-Meier-Kurve dargestellt (siehe Abb. 23 und 24). Anhand der Kurve können die Todeszeitpunkte

festgestellt werden. Die Mortalität war bei allen Gruppen zwischen Tag 1 und 7 am höchsten. In der kritischsten Phase zwischen Tag 1 und 3 nach erfolgter Operation starben die meisten Mäuse an einem akuten Herzversagen. Aber auch an Tag 7 konnten Todesfälle beobachtet werden. In der anschließenden Obduktion wurde festgestellt, dass die Todesursachen an Tag 7 zum größten Teil bedingt durch Aneurysmen bzw. Rupturen des linken Ventrikels mit konsekutivem Hämothorax waren.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die endogene und medikamentell induzierte Mobilisierung von endothelialen Progenitorzellen an den Tagen 4 bis 7 nach vorausgegangenem Herzinfarkt am höchsten ist. Dieser Peak der mobilisierten Zellen wurde auch in anderen Studien beobachtet (Shintani, Murohara et al. 2001; Leone, Rutella et al. 2005; Jujo, Hamada et al. 2010). Aus diesem Grund können etwaige günstige Wirkungen durch das angewandte Mobilisierungsschema hinsichtlich der förderlichen Effekte auf die kardiale Regeneration erst fünf Tage nach AMI erwartet werden. In Anbetracht dieser Tatsache wurden 71 Mäuse, die die ersten vier Tage nach induziertem Myokardinfarkt überlebten, in einer modifizierten Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse erfasst (siehe Abb. 24).

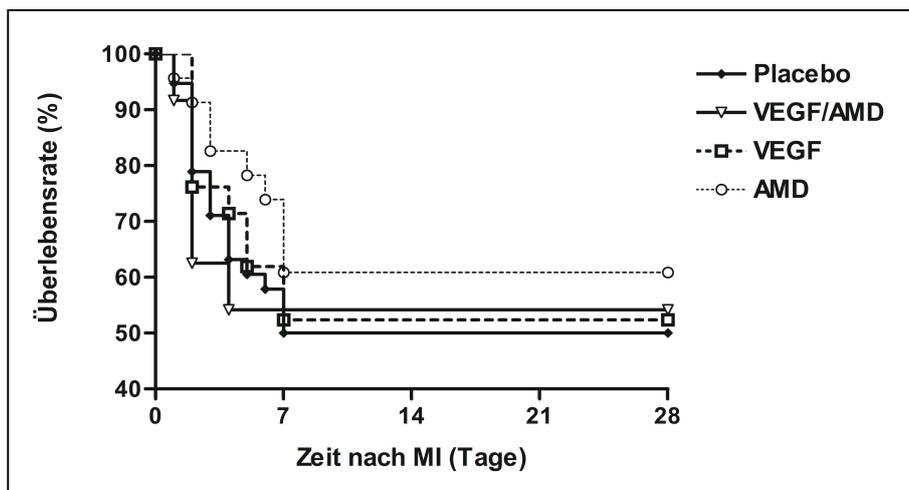
Die kombinierte Therapie mit VEGF und AMD3100 hatte einen förderlichen Effekt im Hinblick auf die Überlebenszeit, verglichen mit der Kontrollgruppe (p=0,084). Demgegenüber hatte die Therapie mit VEGF, AMD3100, G-CSF sowie G-CSF/AMD3100 keine positive Auswirkung auf die Überlebenszeit (siehe Abb. 24).

Tabelle 9: Überlebensrate in % der verschiedenen Wirkstoffgruppen

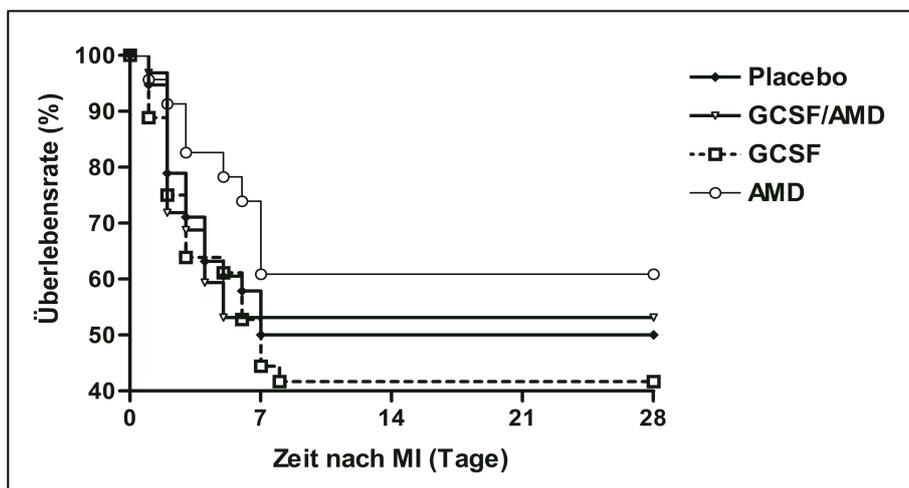
<b>Wirkstoffgruppe</b>	<b>Anzahl der operierten Tiere</b>	<b>Anzahl der Tiere, die überlebten</b>	<b>Überlebensrate in %</b>	<b>Signifikanz im Vergleich zu Placebo</b>
Placebo	40	20	50	-
G-CSF	37	15	40,54	n.s.
G-CSF/AMD3100	32	17	53,12	n.s.
VEGF	21	11	52,38	n.s.
VEGF/AMD3100	23	13	56,52	n.s.
AMD3100	24	15	62,5	n.s.
	<b>n =177</b>	<b>n =91</b>	<b>51,41</b>	

(G-CSF: engl. *granulocyte-colony stimulating factor*; VEGF: engl. *vascular endothelial growth factor*; n.s.: nicht signifikant)

A)



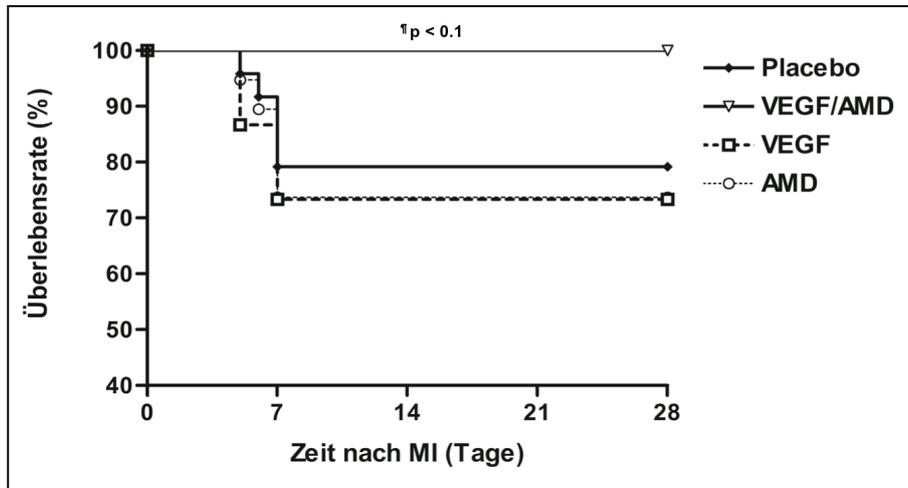
B)



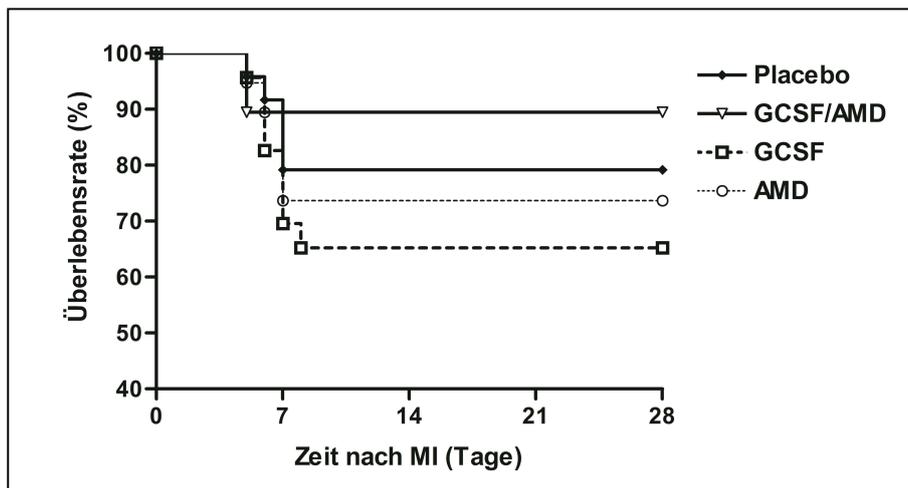
**Abbildung 23: Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse**

**A)** Prozentuale Überlebensrate der Wirkstoffgruppen Placebo, VEGF/AMD3100, VEGF, AMD3100; auf der Abszisse ist die Zeit nach induziertem Myokardinfarkt (MI) aufgetragen und auf der Ordinate die Überlebensrate der Tiere in Prozent. Aus der Abbildung wird ersichtlich, dass die mit AMD3100 behandelten Tiere mit einem Wert von 62,5 % eine sehr hohe Überlebensrate hatten. Auch die Tiere die mit VEGF/AMD3100 behandelt wurden, wiesen mit 56,2 % eine niedrige Mortalität auf. **B)** Überlebensrate in % der Wirkstoffgruppen Placebo, G-CSF/AMD3100, G-CSF, AMD3100; die mit G-CSF behandelten Mäuse starben am häufigsten und wiesen eine hohe Mortalitätsrate auf. Anhand der Kurve können auch die Todeszeitpunkte festgestellt werden. Zwischen Tag 1 und Tag 7 nach induziertem Myokardinfarkt starben die meisten Mäuse.

A)



B)



**Abbildung 24: Modifizierte Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse**

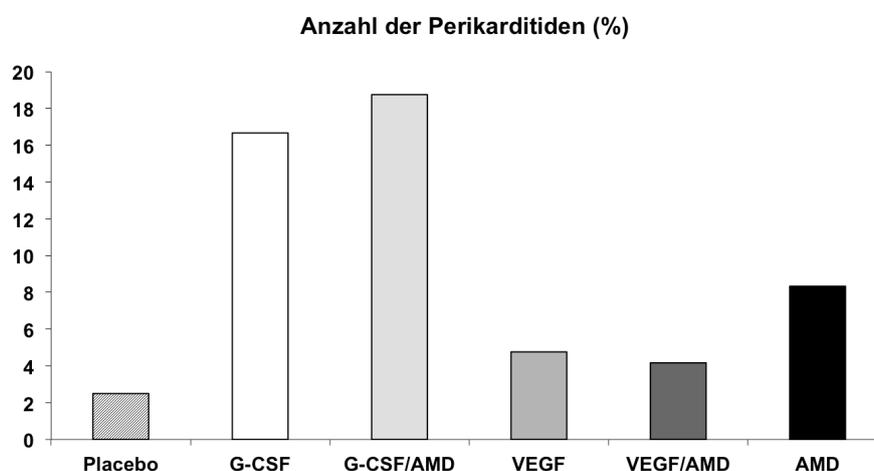
**A)** Modifizierte Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse der Wirkstoffgruppen Placebo, VEGF/AMD3100, VEGF und AMD3100; auf der Abszisse ist die Zeit nach induziertem Myokardinfarkt (MI) eingetragen und auf der Ordinate die Überlebensrate der Tiere in Prozent. In der modifizierten Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse wurden nur Tiere eingeschlossen, welche die ersten vier Tage nach induziertem Herzinfarkt überlebten. Die mit VEGF/AMD3100 behandelten Mäuse zeigten im Vergleich zu der Kontrollgruppe eine erhöhte Überlebensrate ( $p=0,084$  VEGF/AMD vs. Placebo). **B)** Modifizierte Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse der Wirkstoffgruppen Placebo, G-CSF/AMD3100, G-CSF und AMD3100; die Tiere, die mit G-CSF alleine behandelt wurden, wiesen eine sehr hohe Mortalität auf. Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test.

## 5.5 Körper- und Herzgewichte

Das Körpergewicht der Mäuse wurde an Tag 28 bestimmt, jedoch konnten zwischen den verschiedenen Wirkstoffgruppen und der Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden. Die Mäuse hatten im Mittel ein Körpergewicht von  $28,42 \text{ g} \pm 0,28$ . Das relative Herzgewicht der Tiere wurde unmittelbar nach der Entnahme bestimmt. Dabei wird das Herzgewicht bezogen auf das Körpergewicht in Kilogramm errechnet (Herzgewicht/Körpergewicht in  $\text{kg} \times 100$ ). Auch hier waren keine signifikanten Unterschiede der einzelnen Wirkstoffgruppen zu erkennen. Im Mittel wiesen die Mäuse ein relatives Herzgewicht von  $0,51 \% \pm 0,11$  auf. Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test.

## 5.6 Herzbeutelentzündungen

Eine *Pericarditis epistenocardica* ist in der Humanmedizin eine akut auftretende Komplikation nach stattgehabtem Myokardinfarkt und ist durch nekrotische Gewebeveränderungen im Bereich des Epikards bedingt (Oddone, Tommasini et al. 1977). Das „Dressler-Syndrom“ (Postmyokardinfarkt-Syndrom) hingegen tritt erst nach Wochen bzw. Monaten bei 3 % der Patienten nach Herzinfarkt auf und ist verursacht durch eine späte immunologische Reaktion (Tatibouet, Olivier et al. 1979). Auch in der vorliegenden Arbeit wurden fibrinöse Perikarditiden mit adhäsiven Verklebungen bei den Mäusen der verschiedenen Wirkstoffgruppen 28 Tage nach induziertem Myokardinfarkt beobachtet. In der Abbildung 25 wird jedoch deutlich, dass vor allem die mit G-CSF (16,66 %) und G-CSF/AMD3100 (18,75 %) behandelten Tiere zu einer purulenten bis fibrinösen Perikarditis neigten. Die Behandlung mit AMD3100 resultierte in einer mäßigen Entzündungsreaktion mit einem Wert von 8,33 %. Demgegenüber zeigten die mit VEGF (4,76 %) oder VEGF/AMD31000 (4,16 %) behandelten Tiere keine erhöhte Ausprägung von Perikarditiden.

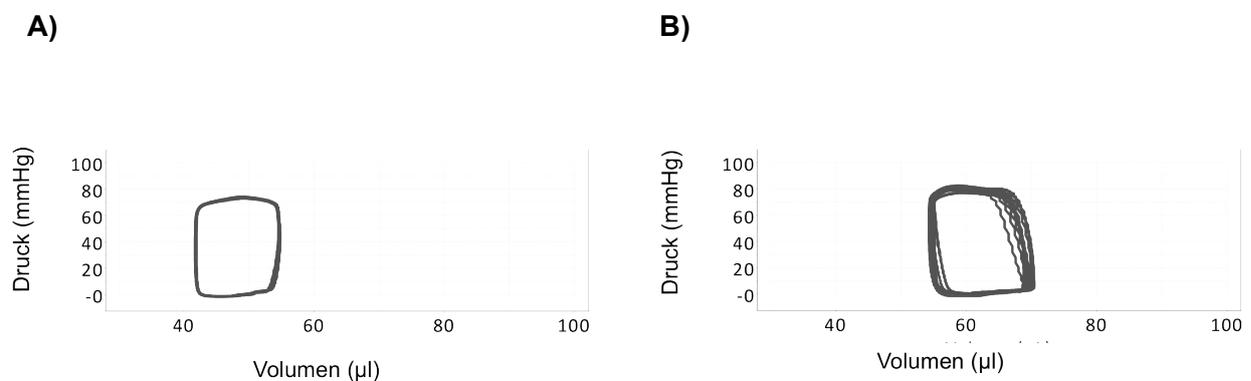


**Abbildung 25: Perikarditiden in %**

Die Abbildung zeigt die prozentuale Häufigkeit des Auftretens von Herzbeutelentzündungen bei den verschiedenen Wirkstoffgruppen. Die Tiere, die mit G-CSF/AMD3100 (18,75 %) und G-CSF (16,66 %) behandelt wurden, zeigten eine deutlich höhere Neigung zur Ausbildung von adhäsiven Herzbeutelentzündungen im Vergleich zu der Kontrollgruppe (2,5 %). Dagegen zeigten die mit VEGF (4,76 %) und VEGF/AMD3100 (4,16 %) behandelten Tiere keine Ausprägung einer überschießenden Entzündungsreaktion.

**5.7 Hämodynamik**

Mittels der finalen Katheteruntersuchung können wichtige Aussagen über die Hämodynamik getroffen werden. Die Untersuchung der linksventrikulären Pumpfunktion fand 28 Tage nach induziertem Myokardinfarkt statt. Anhand der Druck-Volumen-Darstellung (siehe Abb. 26) wird deutlich, dass die Ligatur der LAD zu einer Reduktion der kardialen Funktion führte. Die Sham-operierten Mäuse zeigten eine physiologische Druck-Volumen-Kurve, wohingegen die operierten Kontrolltiere aufgrund der Volumenüberladung und der verminderten Kontraktilität eine Rechtsverschiebung der Kurve aufwiesen.



**Abbildung 26: Druck-Volumen-Diagramm**

Repräsentative Darstellung der linksventrikulären Druck-Volumen-Beziehung einer Sham-operierten Maus und einer Kontrollmaus 28 Tage nach induziertem Myokardinfarkt; **A)** physiologische Druck-Volumen-Beziehung einer Sham-operierten Maus. **B)** Die charakteristische Rechtsverschiebung der Kurve bei der placebobehandelten Kontrollmaus ist durch die Volumenüberladung und die verminderte Kontraktilität nach Myokardinfarkt bedingt.

### 5.7.1 Systolische und diastolische Parameter

Nachfolgend sind die wichtigsten Parameter der verschiedenen Wirkstoffgruppen und der Sham-operierten Gruppe zur Beurteilung der systolischen und diastolischen Herzfunktion tabellarisch dargestellt (siehe Tab. 10). Zur besseren Veranschaulichung wurden die Werte der mit VEGF, AMD3100 und VEGF/AMD3100 behandelten Tiere, sowie die Parameter der G-CSF, AMD3100 und G-CSF/AMD3100 Gruppe getrennt aufgeführt und die Messwerte wurden jeweils mit denen der Kontrollgruppe und der Sham-Gruppe verglichen.

Tabelle 10: Tabellarische Darstellung der gemessenen systolischen und diastolischen Parameter zur Beurteilung der Herzfunktion 28 Tage nach induziertem Myokardinfarkt; **A)** Werte der Versuchsgruppen Sham, Placebo, VEGF, VEGF/AMD3100; **B)** Werte der Versuchsgruppen Sham, Placebo, G-CSF, AMD3100, G-CSF/AMD3100; die aufgeführten Werte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SEM (Sham n=7; Placebo n=16; VEGF n=6; AMD3100 n=10; VEGF/AMD n=12; G-CSF n=5; G-CSF/AMD n=9). Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test (\*\*p<0,01 vs. Placebo; \*p<0,05 vs. Placebo; <sup>¶</sup>p<0,1 vs. Placebo).

**A)**

Parameter	Sham n=7	Placebo n=16	VEGF n=6	AMD3100 n=10	VEGF/AMD n=12
HR (bpm)	475,4 $\pm$ 38,7	469 $\pm$ 13	502 $\pm$ 31,2	498,1 $\pm$ 21,1	473,2 $\pm$ 18,3
EF (%)	64,7 $\pm$ 5,2	23,8 $\pm$ 2	26,6 $\pm$ 3,1	30,1 $\pm$ 2,9 <sup>¶</sup>	39 $\pm$ 7,4*
SW (mmHg/ $\mu$ l)	772,4 $\pm$ 56,9	310,8 $\pm$ 27,6	407,7 $\pm$ 73,6	435,9 $\pm$ 77,1	484,9 $\pm$ 73,1 <sup>¶</sup>
dP/dt <sub>max</sub> (mmHg/s)	6912,4 $\pm$ 862,1	4931,9 $\pm$ 248,8	5341,6 $\pm$ 928,9	5421,5 $\pm$ 383,1	5923,7 $\pm$ 343,15 <sup>¶</sup>
dP/dt <sub>min</sub> (mmHg/s)	-6177,3 $\pm$ 974	-4007,3 $\pm$ 209,6	-4490,4 $\pm$ 796,2	-4602,5 $\pm$ 335,6	-4731,3 $\pm$ 291,3
SV ( $\mu$ l)	12,2 $\pm$ 0,8	7,1 $\pm$ 0,5	7,9 $\pm$ 1	8,26 $\pm$ 1,1	8,32 $\pm$ 1,1
CO ( $\mu$ l/min)	5704,6 $\pm$ 372,7	3231 $\pm$ 219,7	4057,7 $\pm$ 665,4	4105,8 $\pm$ 553,7	4016,7 $\pm$ 632,6
ESV ( $\mu$ l)	8,42 $\pm$ 1,3	25,96 $\pm$ 1,7	23,73 $\pm$ 2,6	23,1 $\pm$ 2,8	17,8 $\pm$ 3,3**
EDV ( $\mu$ l)	19,6 $\pm$ 1,2	31,2 $\pm$ 2,2	29,75 $\pm$ 3,1	28,8 $\pm$ 3,4	24,6 $\pm$ 3**

Tabelle 10 (fortgeführt): Tabellarische Darstellung der gemessenen systolischen und diastolischen Parameter zur Beurteilung der Herzfunktion 28 Tage nach induziertem Myokardinfarkt, (#hohe Letalität in dieser Wirkstoffgruppe, siehe Abschnitt 5.4, Tab. 9)

**B)**

Parameter	Sham n=7	Placebo n=16	G-CSF n=5 <sup>#</sup>	AMD3100 n=10	G-CSF/AMD n=9
HR (bpm)	475,4±38,7	469±13	492,6±48,7	498±21	465±13,6
EF (%)	64,7±5,2	23,8±2	34,8±7,7	30,1±2,9 <sup>¶</sup>	32,9±4,8
SW (mmHg/μl)	772,4±56,9	310,8±27,6	354,7±60,6	435,9±77,1	413±50
dP/dt <sub>max</sub> (mmHg/s)	6912,4±862,1	4931,9±248,8	6272,7±631,4	5421,5±383,1	5540±321
dP/dt <sub>min</sub> (mmHg/s)	-6177,3±974	-4007,3±209,6	-4807,3±388,4	-4602,5±335,6	-4701±297
SV (μl)	12,2±0,8	7,1±0,5	6,5±1	8,26±1,1	7,5±0,9
CO (μl/min)	5704,6±372,7	3231±219,7	3346±711,5	4105,8±553,7	3542±514
ESV (μl)	8,42±1,3	25,96±1,7	16,1±3,3*	23,1±2,8	19,2±2,9
EDV (μl)	19,6±1,2	31,7±1,6	21,6±3,8*	28,8±3,4	25,3±3,1

(VEGF, engl. *vascular endothelial growth factor*; G-CSF: engl. *granulocyte-colony stimulating factor*; HR, engl. *heart rate* = Herzfrequenz; EF, engl. *ejection fraction* = Ejektionsfraktion, Auswurfraction; SW, engl. *stroke work* = Schlagarbeit; dP/dt<sub>max</sub>, maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit; dP/dt<sub>min</sub>, minimale linksventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit; SV, Schlagvolumen; CO, engl. *cardiac output* = Herzleistung; ESV, endsystolisches Volumen; EDV, enddiastolisches Volumen)

Bezüglich der Herzfrequenz konnte zwischen den verschiedenen Wirkstoffgruppen im Vergleich zu der Kontrollgruppe und zu der Sham-Gruppe kein signifikanter Unterschied dargestellt werden.

Die Beeinträchtigung der Herzfunktion nach erfolgter LAD-Ligation wird beim Betrachten der Auswurfraction deutlich. Die Sham-operierten Tiere verfügten über einen physiologischen Wert von 64,7 %±5,2, wohingegen der Wert bei der placebobehandelten Kontrollgruppe auf

23,8 %±2 (\*\*p<0,001 Sham vs. Placebo) abfiel. Beim Vergleich der Wirkstoffgruppen mit der placebobehandelten Kontrollgruppe wird deutlich, dass die alleinige Behandlung von VEGF respektive G-CSF zu keiner signifikanten Verbesserung der kardialen Funktion führte. Die Behandlung mit AMD3100 hingegen hatte eine positive Auswirkung auf die LV-Funktion und führte zu einer Verbesserung der EF um 50 %. Mit einer EF von 30,1 % ± 2,9 wiesen die AMD3100-behandelten Tiere jedoch lediglich einen Trend auf, statistisch signifikante Werte konnten bei dieser Wirkstoffgruppe nicht beobachtet werden (<sup>†</sup>p<0,1 AMD3100 vs. Placebo). Die kombinierte Anwendung von VEGF und AMD3100 führte demgegenüber zu einer signifikanten Verbesserung der kardialen Funktion. Es wurde eine 70 %-Verbesserung der EF im Vergleich zu der placebobehandelten Kontrollgruppe festgestellt (\*p<0,05). Mit einem Wert von 39 %±7,4 wiesen die VEGF/AMD3100-behandelten Mäuse somit die beste Auswurffraktion im Vergleich zu den anderen Wirkstoffgruppen auf.

Die Schlagarbeit war bei den Tieren, die eine kombinierte Therapie mit VEGF und AMD3100 erhielten (484,9 mmHg×μl±73,1) höher als bei den Mäusen der anderen Wirkstoffgruppen, wobei im Vergleich zu den placebobehandelten Kontrollmäusen lediglich ein Trend zu erkennen war (<sup>†</sup>p<0,1 VEGF/AMD3100 vs. Placebo).

Die maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit ( $dP/dt_{max}$ ) war bei den Gruppen, die mit G-CSF (6273 mmHg/s±631), AMD3100 (6126,89 mmHg/s±336) und VEGF/AMD3100 (5923,7 mmHg/s±343,19) behandelt wurden, am höchsten, was für eine gute Kontraktilität spricht. Verglichen mit der placebobehandelten Kontrollgruppe (5053 mmHg/s±344) konnte ein Trend lediglich bei der VEGF/AMD3100-Gruppe (<sup>†</sup>p<0,1) festgestellt werden.

Bezüglich der minimalen linksventrikulären Druckabfallsgeschwindigkeit ( $dP/dt_{min}$ ) wurden die höchsten Werte bei der VEGF/AMD3100-Gruppe (-4731,3 mmHg/s±291,3) und der G-CSF-Gruppe (-4807,3 mmHg/s±388,4) beobachtet. Die Tiere verfügten demnach über eine gute Relaxationskapazität in der frühen Diastole verglichen mit der Kontrollgruppe (-4007,3 mmHg/s±209,6). Ein Trend oder eine Signifikanz konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Das Schlagvolumen dient zur Beurteilung der Effektivität der Pumpleistung und war bei den Gruppen, die mit VEGF/AMD3100 behandelt wurden, am höchsten (8,32 μl±1,1). Eine Signifikanz konnte nicht beobachtet werden.

Das Herzzeitvolumen, welches auch als *cardiac output* (CO) bezeichnet wird, beschreibt, wie viel Volumen pro Zeiteinheit (Minute) aus dem Ventrikel in die Peripherie befördert

werden kann und ist somit ein Effektivitätsparameter zur Beurteilung der Herzarbeit. Hier wiesen die mit AMD3100 behandelten Mäuse die höchsten Werte auf ( $4105,8 \mu\text{l}/\text{min} \pm 553,7$ ). Eine Signifikanz konnte nicht gezeigt werden.

Das endsystolische Volumen ist das Volumen, das nach Auswurf des Blutes im linken Ventrikel verbleibt. Es ist abhängig von der Auswurfleistung und Kontraktilität des linken Ventrikels. Eine Vergrößerung des ESV spricht somit für eine Verschlechterung der Herzarbeit. Hier wiesen die Mäuse, die mit VEGF/AMD3100 behandelt wurden, einen sehr geringen Wert auf ( $17,8 \mu\text{l} \pm 3,3$ ), was für eine sehr gute Herzarbeit 28 Tage nach induziertem Myokardinfarkt spricht. Im Vergleich zu der placebobehandelten Kontrollgruppe ( $25,96 \mu\text{l} \pm 1,7$ ) wiesen die VEGF/AMD3100-Mäuse einen hochsignifikanten geringeren Wert auf (\*\* $p < 0,01$ ). Die G-CSF-behandelten Mäuse hatten mit einem Wert von  $16,1 \mu\text{l} \pm 3,3$  ein signifikant niedrigeres endsystolisches Volumen als die Kontrollgruppe (\* $p < 0,05$ ). Auch die Tiere, die G-CSF in Kombination mit AMD3100 erhielten, zeigten mit einem Wert von  $19,2 \mu\text{l} \pm 2,9$  ein signifikant geringeres ESV als die Kontrollgruppe (\* $p < 0,05$ ).

Ein weiterer wichtiger diastolischer Parameter ist das enddiastolische Volumen, da es dilatationsbedingt nach Myokardinfarkt zu größeren Restvolumina im linken Ventrikel kommt. Die Kontrollgruppe wies mit einem Wert von  $31,7 \mu\text{l} \pm 1,6$  den höchsten Wert auf, was für eine schlechte Herzfunktion spricht. Im Vergleich dazu hatten die Tiere, die mit VEGF/AMD3100 behandelt wurden, ein hochsignifikant geringeres EDV ( $24,6 \mu\text{l} \pm 3$ ) und somit 28 Tage nach induziertem Myokardinfarkt eine sehr gute Herzfunktion (\*\* $p < 0,01$ ). Auch die mit G-CSF alleine behandelten Mäuse ( $21,6 \mu\text{l} \pm 3,8$ ) verfügten über ein signifikant geringeres EDV als die placebobehandelte Kontrollgruppe (\* $p < 0,05$ ).

Zur besseren Veranschaulichung werden einzelne wichtige Parameter im folgenden Abschnitt graphisch dargestellt.

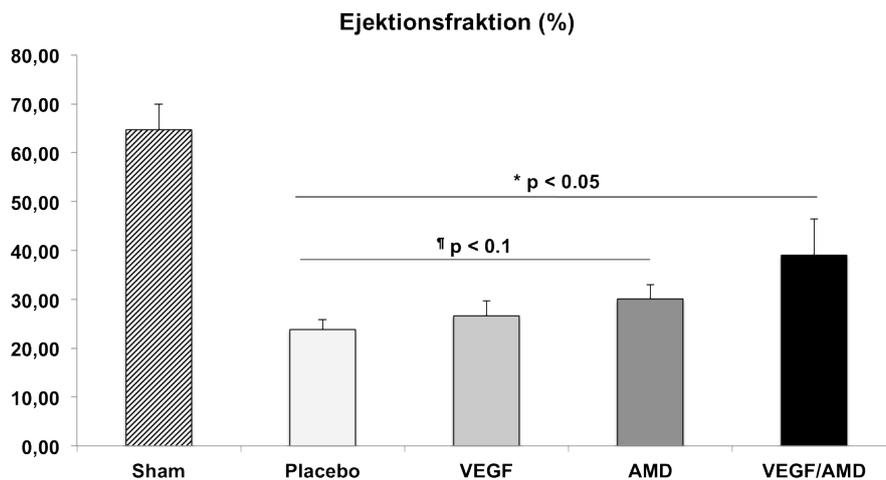
#### **5.7.1.1 Ejektionsfraktion**

Als EF bezeichnet man den Prozentsatz des Blutvolumens, das vom linken Ventrikel während der Systole ausgeworfen wird. Normalerweise liegt die Ejektionsfraktion zwischen 60 und 70 %. Bei einer Herzaktion wird der Ventrikel unter physiologischen Bedingungen nicht vollständig entleert, sondern 30-40 % des Blutvolumens verbleiben in der linken Herzkammer. Eine reduzierte Ejektionsfraktion gilt neben anderen klinischen und labordiagnostischen Parametern als Indikator für eine schlechte Prognose bei Herzinsuffizienz (Dickstein, Cohen-Solal et al. 2008). Die EF stellt somit einen der wichtigsten Parameter zur Beurteilung der Herzfunktion dar (Morita, Kormos et al. 2000).

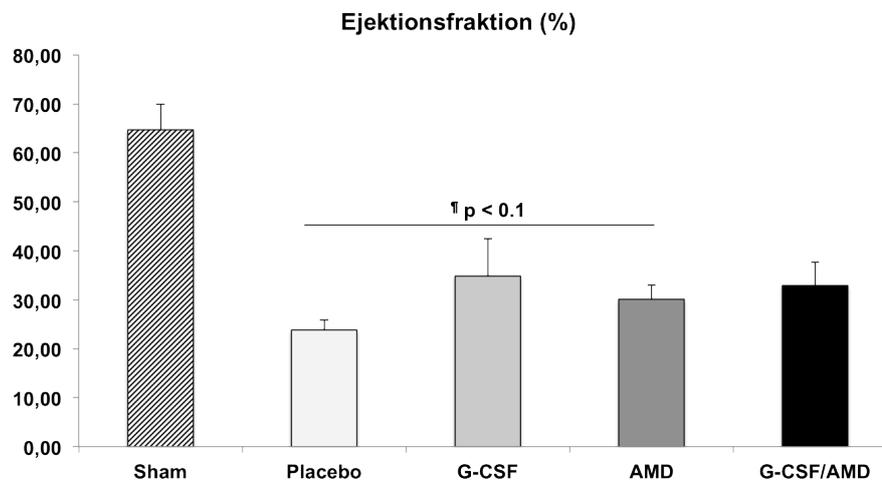
In der Abbildung 27 sind die Werte der verschiedenen Wirkstoffgruppen im Vergleich zu den Sham-operierten Mäusen graphisch dargestellt.

Die Ejektionsfraktion der Sham-operierten Mäuse betrug  $64,7 \pm 5,2$  und sank bei den Kontrollmäusen auf  $23,8 \pm 2,9$  ab (\*\* $p < 0,001$ ; siehe Tab. 10). Die EF der Mäuse, die mit VEGF/AMD3100 behandelt wurden, war mit einem Wert von  $39 \pm 7,4$  signifikant höher, als die der Kontrollmäuse (\* $p < 0,05$ ). Auch die Tiere, die mit AMD3100 behandelt wurden, wiesen mit einem Wert von  $30,1 \pm 2,9$  eine gute EF auf, wobei im Vergleich zu der Placebogruppe lediglich ein Trend und keine Signifikanz beobachtet werden konnte ( $\dagger p < 0,1$ ). Die G-CSF behandelten Tiere und die Tiere, die eine kombinierte Therapie mit G-CSF und AMD31000 erhielten, wiesen mit einer EF von  $34,82 \pm 7,7$  und  $32,90 \pm 4,8$  keine signifikanten Werte im Unterschied zu den placebobehandelten Kontrolltieren auf. Bezüglich der verschiedenen Wirkstoffgruppen hatte die VEGF-Gruppe die schlechteste linksventrikuläre Pumpfunktion mit einer EF von nur  $26,6 \pm 3,1$ .

A)



**B)**

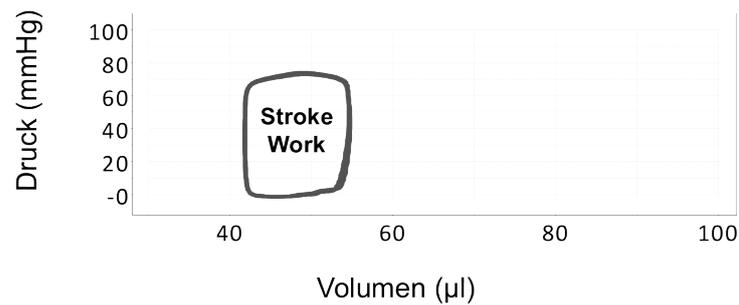


**Abbildung 27: Ejektionsfraktion in %**

Die Abbildung zeigt die Ejektionsfraktion (EF) in % der verschiedenen Behandlungsgruppen im Vergleich zu den Sham-operierten Tieren 28 Tage nach der induzierten myokardialen Ischämie. **A)** Die Applikation von VEGF alleine führte zu keiner Verbesserung der kardialen Funktion. Die Administration von AMD3100 hingegen führte zu einem moderaten Anstieg der EF ( $\uparrow p < 0,1$ ). Die Tiere, die eine kombinierte Anwendung von VEGF und AMD3100 erhielten, verfügten im Vergleich zu der placebobehandelten Kontrollgruppe über eine signifikant höhere EF ( $*p < 0,05$  vs. VEGF/AMD3100). **B)** Bei den Tieren, die mit G-CSF behandelt wurden oder die Kombination von G-CSF und AMD3100 erhielten, konnten bezüglich der Verbesserung der kardialen Funktion im Vergleich mit der Kontrollgruppe keine Signifikanzen festgestellt werden. Die aufgeführten Werte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SEM (Sham n=7; Placebo n=16; VEGF n=6; AMD3100 n=10; VEGF/AMD n=12; G-CSF n=5; G-CSF/AMD n=9). Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test.

### 5.7.1.2 Schlagarbeit

Die Schlagarbeit ist das Produkt aus Druck und Volumen. Am besten lässt sich dies anhand des Druck-Volumen-Diagramms veranschaulichen (siehe Abb. 28), da die SW die Fläche innerhalb der Druck-Volumen-Schleife repräsentiert. Die Schlagarbeit kann durch die Multiplikation des mittleren arteriellen Blutdrucks mit dem Schlagvolumen ermittelt werden. Sie ist ein wichtiger Parameter zur Beurteilung der systolischen Herzfunktion.

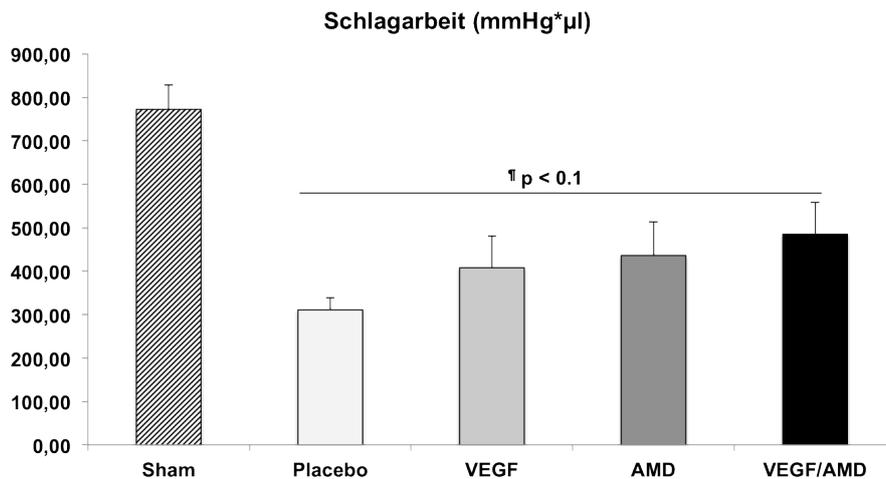


**Abbildung 28: Schlagarbeit**

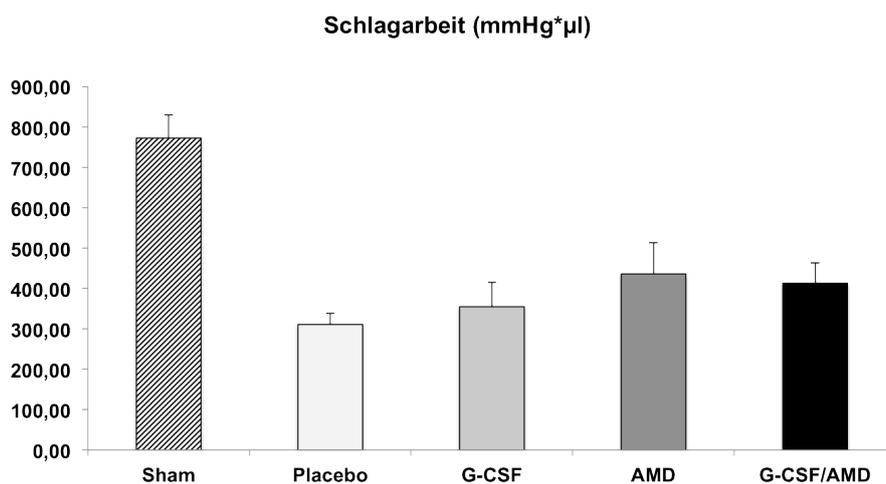
Die Schlagarbeit ist definiert als die Kraft, die der Ventrikel aufbringen muss, um das Schlagvolumen in die Aorta zu pumpen und entspricht der Fläche innerhalb der Druck-Volumen-Kurve.

In Abbildung 29 ist die SW der verschiedenen Wirkstoffgruppen im Vergleich zu den Sham-operierten Tieren dargestellt. Die Sham-Gruppe wies mit einem Wert von  $772,4 \text{ mmHg} \times \mu\text{l} \pm 56,92$  einen hochsignifikant (\*\* $p < 0,01$ ) höheren Wert auf als die Kontrollgruppe ( $310,8 \text{ mmHg} \times \mu\text{l} \pm 27,6$ ). Die SW war bei den VEGF/AMD3100-behandelten Mäusen ( $484,93 \text{ mmHg} \times \mu\text{l} \pm 73,1$ ) im Vergleich zu der Kontrollgruppe und den anderen Wirkstoffgruppen am höchsten, wobei keine statistisch signifikanten Werte beobachtet werden konnten, sondern lediglich ein Trend gezeigt werden konnte ( $^{\dagger}p < 0,1$ ). Auch die Tiere, die mit AMD3100 alleine behandelt wurden, verfügten mit einem Wert von  $435,9 \text{ mmHg} \times \mu\text{l} \pm 77,1$  über eine gute Schlagarbeit 28 Tage nach der induzierten Ischämie. Auch hier wurde keine Signifikanz festgestellt. Über die schlechteste Schlagarbeit mit einem Wert von  $354,7 \text{ mmHg} \times \mu\text{l} \pm 60,6$  verfügte die Gruppe, die mit G-CSF alleine behandelt wurde.

A)



B)



**Abbildung 29: Schlagarbeit in %**

Die graphische Darstellung zeigt die Schlagarbeit der verschiedenen Behandlungsgruppen im Vergleich zu der Sham-operierten Gruppe 28 Tage nach induziertem Myokardinfarkt. **A)**

Die mit VEGF/AMD3100 behandelten Mäuse wiesen im Vergleich zu der placebobehandelten Kontrollgruppe und den anderen Wirkstoffgruppen die größte Schlagarbeit auf, wobei keine Signifikanz beobachtet werden konnte. **B)** Die mit G-CSF

behandelten Mäuse verfügten über die schlechteste Schlagarbeit im Vergleich zu den anderen Wirkstoffgruppen. Die aufgeführten Werte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SEM (Sham n=7; Placebo n=16; VEGF n=6; AMD3100 n=10; VEGF/AMD n=12; G-CSF n=5; G-CSF/AMD n=9). Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des t-Tests.

### 5.7.1.3 Linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit

Die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit gibt Auskunft über die Kontraktilität des linken Ventrikels und ist ein weiterer wichtiger Parameter zur Beurteilung der systolischen Herzfunktion. In der Abbildung 30 sind die Werte der verschiedenen Wirkstoffgruppen und der Sham-operierten Mäuse vergleichend dargestellt. Die Werte der Sham-Gruppe lagen mit 6912,4 mmHg/s $\pm$ 862,1 im Referenzbereich und fielen bei den mit Kochsalzlösung behandelten Kontrolltieren auf einen Wert von 4931,9 mmHg/s $\pm$ 248,8 ab (\*p<0,05). Bezüglich der verschiedenen Wirkstoffgruppen wiesen die Mäuse, die mit G-CSF (6272,7 mmHg/s $\pm$ 631,4), AMD3100 (5421,5 mmHg/s $\pm$ 383,1) und VEGF/AMD3100 (5923,7 mmHg/s $\pm$ 343,15) behandelt wurden, die höchsten Werte auf, was für eine gute Kontraktilität spricht. Verglichen mit der placebobehandelten Kontrollgruppe konnte lediglich bei der VEGF/AMD3100-Gruppe ein Trend zu einer verbesserten Druckanstiegsgeschwindigkeit festgestellt werden.

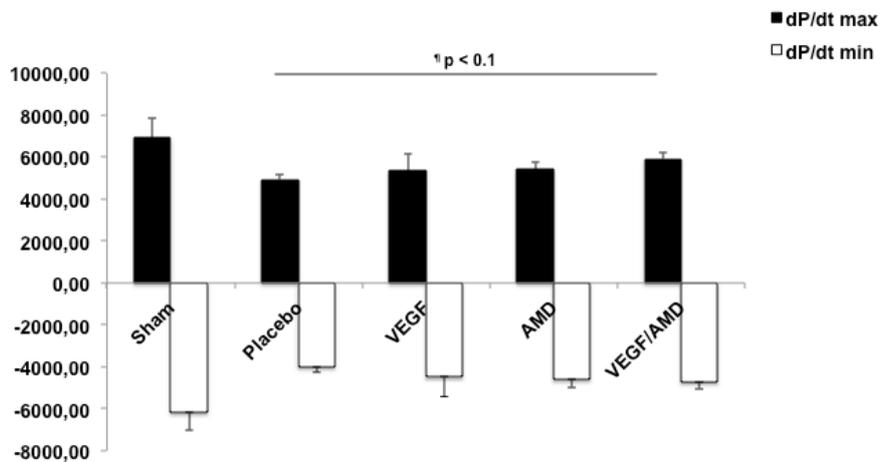
### 5.7.1.4 Linksventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit

Die linksventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit ist ein Parameter der frühen Diastole, in der der Ventrikel aktiv relaxiert. Er dient somit zur Beurteilung der diastolischen Herzfunktion.

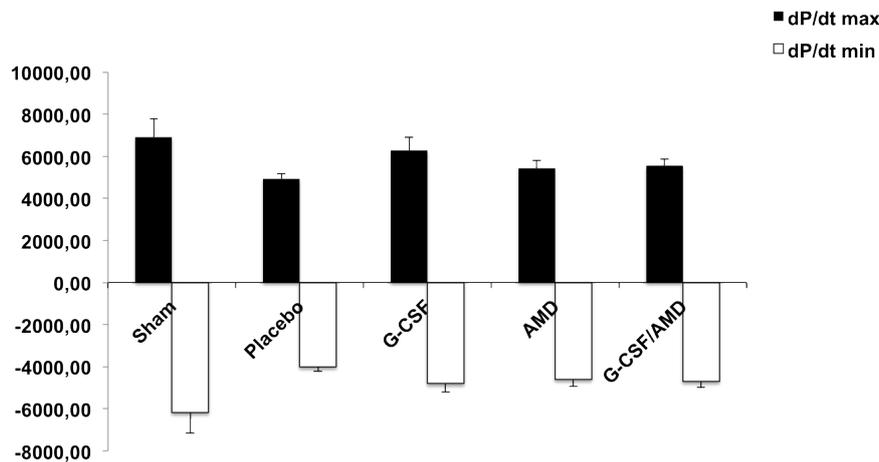
Die Sham-operierten Mäuse wiesen mit einem Wert von -6177,3 mmHg/s $\pm$ 974 einen hochsignifikant niedrigeren Wert auf (\*\*p<0,01) als die Tiere der mit Kochsalzlösung behandelten Kontrollgruppe (-4007,3 mmHg/s $\pm$ 209,6).

Die niedrigsten Werte wurden bei der VEGF/AMD3100-Gruppe (-4731,3 mmHg/s $\pm$ 291,3) und der G-CSF-Gruppe (-4807,3 mmHg/s $\pm$ 388,4) beobachtet. Diese Tiere verfügten demnach über eine gute Relaxationskapazität in der frühen Diastole verglichen mit der Kontrollgruppe. Ein Trend oder eine Signifikanz konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (siehe Abb. 30).

A)



B)



**Abbildung 30: Linksventrikuläre Druckanstiegs- und Druckabfallsgeschwindigkeiten**

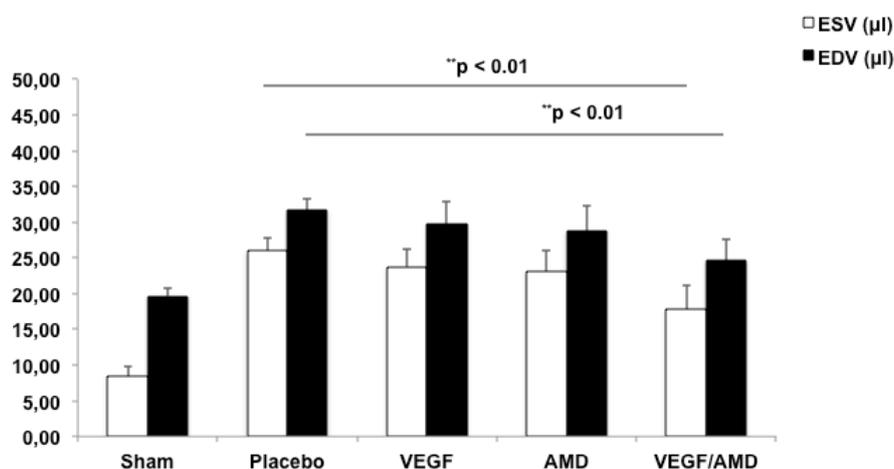
Die graphische Darstellung zeigt den Vergleich der verschiedenen Behandlungsgruppen mit der Sham-operierten Gruppe 28 Tage nach erfolgter LAD-Ligatur. **A)** Die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit ( $dP/dt_{max}$ ) war bei der VEGF/AMD3100-Gruppe am höchsten, was für eine gute Kontraktilität spricht. Es konnte jedoch lediglich ein Trend im Vergleich zu der Placebogruppe festgestellt werden. Auch bezüglich der linksventrikulären Druckabfallsgeschwindigkeit ( $dP/dt_{min}$ ) konnte keine Signifikanz beobachtet werden. **B)** Die G-CSF-Gruppe verfügte mit einem Wert von  $6272,7 \text{ mmHg/s} \pm 631,4$  über eine gute Kontraktilität, eine Signifikanz konnte nicht beobachtet werden. Die aufgeführten Werte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SEM (Sham  $n=7$ ; Placebo  $n=16$ ; VEGF  $n=6$ ; AMD3100  $n=10$ ; VEGF/AMD  $n=12$ ; G-CSF  $n=5$ ; G-CSF/AMD  $n=9$ ). Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test.

### 5.7.1.5 Endsystolisches und enddiastolisches Volumen

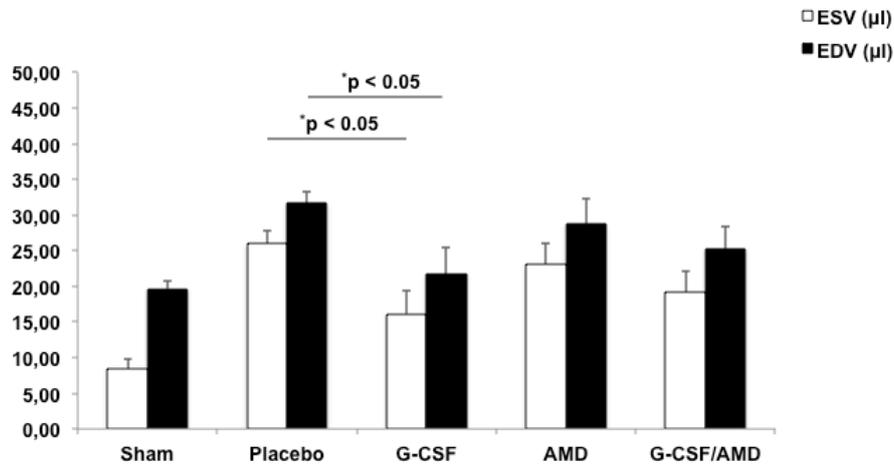
Das ESV ist ein wichtiger Parameter zur Beurteilung der systolischen Herzfunktion. Wie im Abschnitt 4.3.5 beschrieben ist es das Blutvolumen, welches sich am Ende der Systole nach maximaler Entleerung in den Herzkammern befindet. Es ist somit abhängig von der Auswurfleistung und Kontraktilität des linken Ventrikels. Ein großes endsystolisches Volumen spricht demzufolge für eine schlechte kardiale Funktion. Die mit VEGF/AMD3100 behandelten Mäuse hatten mit einem Wert von  $17,8 \mu\text{l} \pm 3,3$  im Vergleich zu der Placebogruppe ( $25,96 \mu\text{l} \pm 1,7$ ) ein hochsignifikant geringeres ESV (\*\* $p < 0,01$ ) und wiesen demzufolge eine gute systolische kardiale Funktion nach induziertem Herzinfarkt auf (siehe Abb. 31 A). Auch die Tiere, die mit G-CSF alleine behandelt wurden, hatten mit einem Wert von  $16,1 \mu\text{l} \pm 3,3$  ein signifikant niedrigeres endsystolisches Volumen als die Kontrollgruppe (\* $p < 0,05$ ; siehe Abb. 31 B).

Das EDV dient zur Beurteilung der diastolischen Funktion. Es beschreibt das Blutvolumen, welches am Ende der Diastole nach maximaler Füllung im Ventrikel verbleibt. Aufgrund der verminderten Kontraktilität und reduzierten Auswurfleistung nach stattgehabtem Myokardinfarkt verbleiben konsekutiv höhere Restvolumina im linken Ventrikel. Die Placebogruppe hatte mit einem Wert von  $31,7 \mu\text{l} \pm 1,6$  das höchste enddiastolische Volumen und verfügte demzufolge über eine schlechte diastolische kardiale Funktion. Demgegenüber hatten die mit VEGF/AMD3100 behandelten Mäuse mit einem Wert von  $24,6 \mu\text{l} \pm 3$  eine gute diastolische Herzleistung. Verglichen mit der Placebogruppe wiesen die Mäuse, die eine kombinierte Therapie mit VEGF und AMD3100 erhielten, einen hochsignifikant geringeres enddiastolisches Volumen auf (\*\* $p < 0,01$ ; siehe Abb. 31 A). Auch die Mäuse, die mit G-CSF alleine behandelt wurden ( $21,6 \mu\text{l} \pm 3,8$ ), hatten ein signifikant geringeres EDV als die Kontrollgruppe (\* $p < 0,05$ ; siehe Abb. 31 B).

A)



B)



**Abbildung 31: Endsystolisches und Enddiastolisches Volumen**

In der graphischen Darstellung sind die endsystolischen und enddiastolischen Volumina der verschiedenen Wirkstoffgruppen im Vergleich zu der Sham-Gruppe aufgeführt.

**A)** VEGF/AMD3100 verfügte über ein hochsignifikant geringeres endsystolisches und enddiastolisches Volumen als die Placebogruppe (\*\* $p < 0,01$ ). **B)** Die Behandlung mit G-CSF alleine führte ebenfalls zu signifikant geringeren Volumina in der Systole und Diastole im Vergleich zu der Placebogruppe (\* $p < 0,05$ ). Die aufgeführten Werte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SEM (Sham  $n=7$ ; Placebo  $n=16$ ; VEGF  $n=6$ ; AMD3100  $n=10$ ; VEGF/AMD  $n=12$ ; G-CSF  $n=5$ ; G-CSF/AMD  $n=9$ ). Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test.

Zusammenfassend lässt sich bei Betrachtung aller aufgeführten systolischen und diastolischen hämodynamischen Parameter sagen, dass die kombinierte Anwendung von VEGF und AMD3100 potenziell förderliche Effekte auf die kardiale Funktion hatte.

Vor allem die Auswurfraction, als wichtigster kardialer Parameter zur Beurteilung der Herzfunktion, war bei den Mäusen die VEGF/AMD3100 erhielten, signifikant höher.

## **6 DISKUSSION**

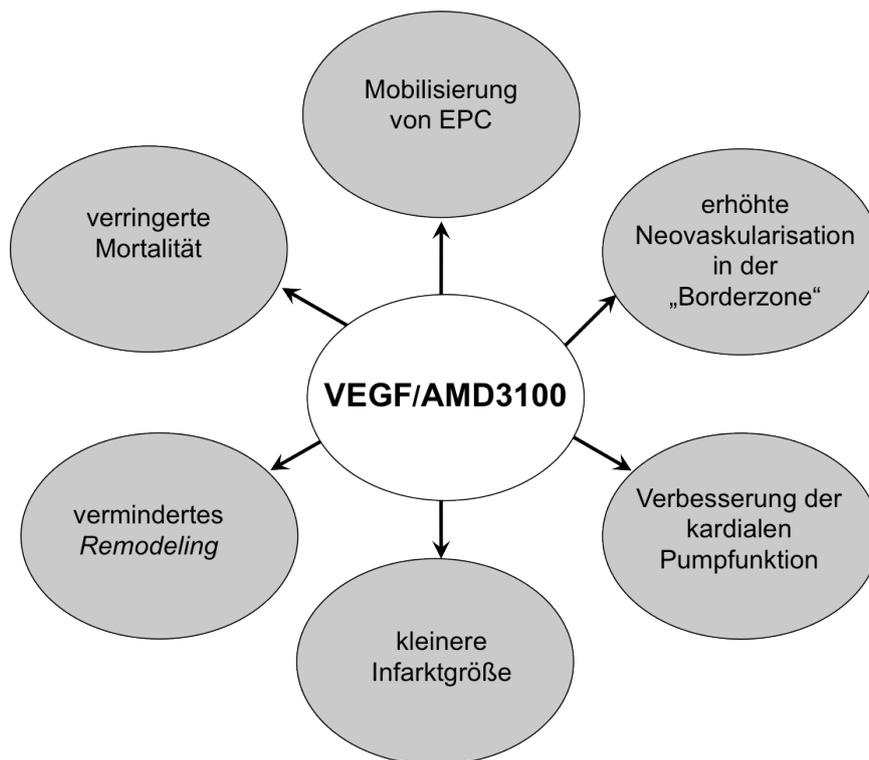
Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurde noch keine Erfolg versprechende Therapie entwickelt, um die ventrikuläre Regeneration nach AMI zu fördern. Aus diesem Grund werden neue pharmakologische Behandlungsmöglichkeiten zur Verbesserung der kardialen Heilung dringend benötigt.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Applikation von verschiedenen Wirkstoffen und Wirkstoffkombinationen (G-SCF, G-CSF/AMD300, VEGF, VEGF/AMD3100, AMD3100) nach akutem Herzinfarkt im Mausmodell. Die daraus resultierende Stammzellmobilisation und deren Einfluss auf Neovaskularisation im Infarktgebiet, kardiale Funktion, *Remodeling*, Infarktgröße sowie das Überleben der Mäuse wurden nachfolgend untersucht.

Die wichtigsten Ergebnisse werden hier noch einmal zusammenfassend dargestellt:

- VEGF/AMD3100 führt zu einer signifikant höheren Mobilisierung von endothelialen Progenitorzellen aus dem KM in das periphere Blut.
- In der „Borderzone“ führt VEGF/AMD3100 zu einem signifikanten Anstieg der CD31<sup>+</sup>-Kapillaren.
- Die Applikation von VEGF alleine führt in der „Borderzone“ und im angrenzenden vitalen Bereich zu einer vermehrten Ausbildung von abnormen, disorganisierten Blutgefäßen. Bei der Wirkstoffkombination VEGF/AMD3100 hingegen ist keine erhöhte Anzahl von abnorm großen Gefäßen zu beobachten.
- Die Wirkstoffkombination VEGF/AMD3100 führt zu einer verbesserten kardialen Funktion. Die Ejektionsfraktion 28 Tage nach erfolgter Ligatur der LAD ist in der mit VEGF/AMD3100 behandelten Gruppe mit einem Wert von 39 %±7,4 signifikant höher als die der Kontrolltiere.
- Die verbesserte kardiale Pumpfunktion der VEGF/AMD3100 behandelten Tiere sowie die erhöhte Anzahl an CD31<sup>+</sup>-Zellen sind assoziiert mit einer signifikant verringerten Infarktgröße im Vergleich zu der mit Kochsalzlösung behandelten Kontrollgruppe.
- Die Applikation von VEGF/AMD3100 führt zu einer erhöhten Überlebensrate.
- Bei den G-CSF- und G-CSF/AMD3100-behandelten Tieren wurde eine erhöhte Inzidenz für das Auftreten von Perikarditiden festgestellt.

Die Ergebnisse suggerieren, dass die positiven Effekte auf die Mobilisation von knochenmarksständigen EPC zurückzuführen sind, die in der infarzierten „Borderzone“ eine vermehrte Neovaskularisation induzieren. Die damit assoziierte Verbesserung der kardialen Pumpfunktion und Verkleinerung der Infarktgröße resultieren in einer erhöhten Überlebensrate.



**Abbildung 32: VEGF/AMD3100**

Die Abbildung zeigt die potenziell förderlichen Effekte der Wirkstoffkombination VEGF und AMD3100 auf die Herzregeneration nach vorausgegangenem Myokardinfarkt.

In vielen experimentellen Studien des kardialen Verletzungsmodells konnte gezeigt werden, dass die Mobilisation oder die Transplantation von Stammzellen die Fähigkeit besitzt, die kardiale Regeneration zu fördern, das ungünstige *Remodeling* zu verhindern und somit die Herzfunktion zu verbessern. Die Transplantation von knochenmarksständigen HSPC nach stattgehabtem AMI in das ischämische Myokard resultiert jedoch nur in einer kurzzeitigen Verbesserung der kardialen Funktion, wobei Langzeiteffekte ausbleiben (Assmus, Schachinger et al. 2002; Schachinger, Assmus et al. 2004; Wollert, Meyer et al. 2004; Wollert and Drexler 2005; Assmus, Honold et al. 2006; Schachinger, Erbs et al. 2006; Wollert 2008; Wollert and Drexler 2010). Das Ausbleiben der langfristigen Erfolge auf die

kardiale Funktion könnte an dem Fehlen der ausreichenden Vaskularisation im ischämischen Bezirk liegen, welches das Überleben und das Wachstum der transplantierten Stammzellen fördert. Ein weiterer Aspekt, der die Sicherheit der Transplantation von Stammzellen anzweifeln lässt, ist ein potenziell proarrhythmischer Effekt (Macia and Boyden 2009). In einer Studie von Menasche et al. wird nach der Transplantation von Skelettmuskulatur eine erhöhte Rate von Kammerflimmern und ventrikulären Tachykardien beschrieben (Menasche, Hagege et al. 2003).

Aufgrund der widersprüchlichen Ergebnisse hinsichtlich der Transplantation von HSPC konzentrierten wir uns in der vorliegenden Arbeit auf die Mobilisation von knochenmarksständigen Stammzellen in das periphere Blut.

Die Sicherheit und Effizienz der Stammzellmobilisation wurden in verschiedenen Studien dargestellt (Liles, Broxmeyer et al. 2003; Devine, Flomenberg et al. 2004; Liles, Rodger et al. 2005). Die Applikation verschiedener Wirkstoffe zur Stammzellmobilisierung bietet zudem potenzielle Vorteile. Sie ist einfach durchführbar und es handelt sich vor allem um eine nicht invasive Methode im Vergleich zu der Transplantation von HSPC. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Mobilisierung, das *Homing* und die Differenzierung von Stammzellen zu einer vermehrten Angiogenese und Verbesserung der LV-Funktion führen (Orlic, Kajstura et al. 2001). Des Weiteren sind direkte Effekte auf die Prävention des *Remodelings* beschrieben (Ohtsuka, Takano et al. 2004). Parakrine Mechanismen haben zudem positive Auswirkungen auf das Überleben der Kardiomyozyten und endothelialen Zellen (Harada, Qin et al. 2005).

### **6.1 VEGF/AMD3100 führt zu einer verstärkten Mobilisierung von EPC in das periphere Blut**

Ein akuter Myokardinfarkt führt physiologischerweise zu einer endogenen Mobilisierung von EPC aus dem Knochenmark in das periphere Blut bei Nagetieren und Menschen (Asahara, Masuda et al. 1999; Shintani, Murohara et al. 2001; Wojakowski, Tendera et al. 2004; Leone, Rutella et al. 2005; Massa, Rosti et al. 2005).

Wie in Abschnitt 2.2.2.1 und 2.2.3.2 dargestellt, erfolgt unter transkriptioneller Kontrolle von HIF-1 $\alpha$  die Synthese von SDF-1 $\alpha$  und VEGF sowie deren Ausschüttung in das hypoxische Gewebe (Ceradini, Kulkarni et al. 2004; De Falco, Porcelli et al. 2004). Nachfolgend induziert VEGF im KM eine Hochregulation von MMP-9. Die anschließende Umwandlung des membrangebundenen c-Kit- in den löslichen c-Kit-Liganden durch das Enzym führt zu einer Mobilisierung der EPC.

G-CSF führt wie in Abschnitt 2.2.5.1 gezeigt, mithilfe von proteolytischen Enzymen, wie neutrophile Elastase, Cathepsin-G und MMP-9 zu einer Spaltung der SDF-1 $\alpha$ /CXCR4-Bindungsstelle (Levesque, Hendy et al. 2003), was in einer Mobilisation von HSC aus dem KM in das periphere Blut resultiert (Honold, Lehmann et al. 2006).

Die Applikation von AMD3100 hingegen führt zu einer reversiblen Blockierung der Interaktion zwischen dem CXCR4 Rezeptor und seinem Liganden SDF-1 $\alpha$  (siehe Abschnitt 2.2.5.3). Nachfolgend werden die HSC und EPC aus dem KM freigelassen und zirkulieren im peripheren Blut (Devine, Flomenberg et al. 2004; Hendrix, Collier et al. 2004; Broxmeyer, Orschell et al. 2005). Die erhöhte SDF-1 $\alpha$  Konzentration im ischämischen Gewebe trägt folglich zu der Rekrutierung der EPC und HSC zum Myokard bei (Yamaguchi, Kusano et al. 2003; De Falco, Porcelli et al. 2004).

Shintani et al. stellten fest, dass die Anzahl der mobilisierten CD34<sup>+</sup>-Zellen an Tag sieben nach erfolgtem Herzinfarkt am höchsten ist. Des Weiteren konnte in dieser Studie eine Korrelation zwischen VEGF und der Anzahl der mobilisierten CD 34<sup>+</sup>-MNC festgestellt werden, da der Plasmaspiegel von VEGF an Tag 7 am höchsten war (Shintani, Murohara et al. 2001).

Vorausgegangene Studien zeigten ebenfalls, dass die myokardiale Expression von VEGF nach AMI erhöht ist (Lee, Wolf et al. 2000; Hattori, Dias et al. 2001; Shintani, Murohara et al. 2001; Massa, Rosti et al. 2005).

Auch die Arbeitsgruppe um Leone et al. stellte ähnliche Konzentrationen der mobilisierten Stammzellen in der Akutphase nach stattgehabtem Herzinfarkt fest (Leone, Rutella et al. 2005).

Übereinstimmend mit den Ergebnissen der oben genannten Studien, konnte auch in der vorliegenden Arbeit ein Peak der mobilisierten Knochenmarksstammzellen sieben Tage nach erfolgter LAD-Ligatur festgestellt werden. Die durchflusszytometrische Untersuchung des peripheren Blutes an den Tagen 0, 7, 14 und 28 zeigte, dass die mobilisierten Flk-1<sup>+</sup>/Sca-1<sup>+</sup> und c-Kit<sup>+</sup>/Sca-1<sup>+</sup>-Zellen sowohl bei den Mäusen, die mit den verschiedenen Wirkstoffen behandelt wurden, als auch bei der Kontrollgruppe an Tag 7 steil anstiegen, nachfolgend langsam abfielen und an Tag 28 wieder die Ausgangswerte erreichten (siehe Abb. 14 und 15).

Bemerkenswert war der hochsignifikante Anstieg der mobilisierten Flk-1<sup>+</sup>/Sca-1<sup>+</sup>-Zellen der VEGF/AMD3100 behandelten Mäuse an Tag 7 im Vergleich zu Tag 0 als auch im Vergleich zu den Kontrolltieren. Die kombinierte Therapie führte demnach synergistisch zu einer vermehrten Mobilisation von EPC. Auch vorausgegangene Studien zeigten, dass die Co-

Administration von VEGF und AMD3100 zu einer erhöhten Rekrutierung der EPC führt (Pitchford, Furze et al. 2009). Somit sind die Beobachtungen von Pitchford et al. übereinstimmend mit den Resultaten dieser Arbeit. Des Weiteren wurde in dieser Studie herausgefunden, dass die Applikation von VEGF zu einer verminderten Anzahl der zirkulierenden HSC führt. Darüberhinaus supprimiert VEGF die Mobilisierung von Neutrophilen und die Mäuse weisen eine reduzierte Anzahl der neutrophilen Granulozyten im KM auf. Die Autoren vermuten, dass dies im Zusammenhang mit der CXCR4/SDF-1 $\alpha$  Achse steht (Pitchford, Furze et al. 2009).

G-CSF führt über die Ausschüttung von proteolytischen Enzymen zu einer Durchbrechung der CXCR4/SDF-1 $\alpha$  Achse und nachfolgend werden signifikant geringere Konzentrationen von SDF-1 $\alpha$  und CXCR4 auf den HSC festgestellt. Neutrophile werden ebenfalls über die CXCR4/SDF-1 $\alpha$  Achse im KM zurückgehalten. Bei der Durchbrechung der Achse oder Antagonisierung des CXCR4-Rezeptors werden neben HSC auch neutrophile Granulozyten mobilisiert (Levesque, Hendy et al. 2003; Martin, Burdon et al. 2003; Wengner, Pitchford et al. 2008).

VEGF hingegen hat keinen Einfluss auf die Konzentrationen von SDF-1 $\alpha$  und CXCR4, weshalb die Autoren vermuten, dass VEGF nicht die SDF-1 $\alpha$ /CXCR4-Achse durchbricht. Des Weiteren suggerieren die Autoren, dass VEGF über die Bindung an die verschiedenen Rezeptoren unterschiedliche Effekte vermittelt. VEGFR-1 wird von CD34<sup>+</sup>/Lin<sup>-</sup>/Sca1<sup>+</sup>/c-Kit<sup>+</sup>-Knochenmarkszellen, hämatopoetischen Vorläuferzellen, Monozyten, Makrophagen und inflammatorische Zellen exprimiert (Barleon, Sozzani et al. 1996). Mittels Aktivierung des VEGFR-1 induziert VEGF eine Proliferation der HSC und den Eintritt in den Zellzyklus (S/G<sub>2</sub>/M Phase). Dies ist mit einer Blockierung der Migration und Mobilisation der HSC assoziiert (Hattori, Dias et al. 2001).

Aus diesem Grund führt die alleinige Behandlung mit VEGF nicht zu einer effektiven Mobilisation von HSC (Pitchford, Furze et al. 2009).

Wie in Abschnitt 2.2.5.4 dargestellt stimuliert VEGF die Migration und das Überleben der EPC über die Bindung an den VEGFR-2. Nachfolgend führt dies zu einer Mobilisation der EPC. Auch vorrausgegangene Studien suggerierten, dass der Effekt auf die endotheliale Zellmigration, das Überleben und die Proliferation der EPC hauptsächlich durch den VEGFR-2 vermittelt wird (Ferrara 2001). Übereinstimmend mit diesen Vermutungen, führt die Blockierung des VEGFR-2 in einer Studie von Hattori et al. zu einer reduzierten Mobilisation der EPC (Hattori, Dias et al. 2001).

Gemäß den Ergebnissen von Pitchford et al. (Pitchford, Furze et al. 2009), konnte auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die kombinierte Behandlung mit VEGF und AMD3100 im Vergleich zu den mit Kochsalzlösung behandelten Kontrolltieren zu einer

signifikanten Erhöhung der Flk-1<sup>+</sup>/Sca-1<sup>+</sup>-Zellen im peripheren Blut führt. Bezüglich der Mobilisation der c-Kit<sup>+</sup>/Sca-1<sup>+</sup>-Zellen kann im Vergleich zu der Kontrollgruppe jedoch keine Signifikanz festgestellt werden (siehe Abb. 14 und 15).

Die einmalige Verabreichung von AMD3100 bei gesunden, nicht ischämischen Mäusen resultiert in einer schnellen Mobilisation der HSC und EPC. Die höchsten Zellzahlen im peripheren Blut werden nach 1–3 h beobachtet. Dieser Peak der mobilisierten Zellen entspricht der beobachteten Plasmahalbwertszeit des CXCR4-Antagonisten, welche 2–3 h beträgt (Pitchford, Furze et al. 2009; Jujo, Hamada et al. 2010). Dies bedeutet, dass die direkten Effekte des Wirkstoffes nur am Tag der Administration zu beobachten wären.

Jujo et al. stellten nach der einmaligen Applikation von AMD3100 nach induziertem AMI überraschenderweise eine länger anhaltende Wirkung in Bezug auf die Stammzellmobilisation fest (Jujo, Hamada et al. 2010). Auch in der kürzlich veröffentlichten Studie von Jujo et al. konnte gezeigt werden, dass die Mobilisation der Flk-1<sup>+</sup>/Sca-1<sup>+</sup>-Zellen eine Woche lang anhielt. Bei der mit Kochsalzlösung behandelten Kontrollgruppe hingegen konnte die Mobilisation der EPC nur an Tag 1 post AMI beobachtet werden (Jujo, Li et al. 2013).

In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls dargestellt werden, dass die Applikation von AMD3100 drei Tage nach AMI eine verlängerte Mobilisation von Progenitorzellen induziert und konstante Level der mobilisierten HSC und EPC bis zu vier Tage nach der Wirkstoffapplikation beobachtet werden können (siehe Abb. 14 und 15).

Offensichtlich führt die Applikation von AMD3100 unter ischämischen und nicht ischämischen Bedingungen zu einer unterschiedlichen Aktivierung der Signalkaskade.

Diese Beobachtung ist übereinstimmend mit den Daten von Jujo et al., da die Autoren vermuten, dass eine ischämische, inflammatorische Umgebung und die Aktivierung der Entzündungszellkaskade die Grundlage für die verlängerten Effekte von AMD3100 darstellen (Jujo, Hamada et al. 2010). Des Weiteren suggerieren die Autoren, dass die verlängerte Mobilisation der EPC aus dem Knochenmark von der Aktivität der MMP-9 abhängig ist, da AMD3100 eine anhaltende VEGF-Hochregulation ermöglicht. Die höchsten Konzentrationen von VEGF in den MNC des peripheren Blutes wurden an Tag 7 nach AMI festgestellt. Auch in früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die Ausschüttung von VEGF mit einer erhöhten MMP-9-Expression assoziiert ist (Wang and Keiser 1998; Heissig, Rafii et al. 2005; Jujo, Hamada et al. 2010).

Interessanterweise wurde in der Studie von Jujo et al. auch beobachtet, dass die kontinuierliche Infusion von AMD3100 mit einer implantierten osmotischen Pumpe und einer Dosierung von 2,5 mg pro Woche pro Maus über zwei Wochen keine förderlichen Effekte

auf die kardiale Funktion aufweist. Darüber hinaus wurden vermehrt LV-Aneurysmen, Wandausdünnungen, eine größere LV-Fibrose sowie eine reduzierte Anzahl an Kapillaren nach Myokardinfarkt im Vergleich zu den Mäusen, die nur eine einmalige Injektion mit dem CXCR4-Antagonisten erhielten, festgestellt (Jujo, Hamada et al. 2010).

Nach einmaliger Applikation führt AMD3100 zu einer sehr schnellen Mobilisierung von HSC und EPC. Aus diesem Grund stellt der Wirkstoff eine günstigere Therapieoption für den klinischen Gebrauch dar als das Zytokin G-CSF, welches über mehrere Tage verabreicht werden muss. Ein weiterer Nachteil von G-CSF ist die hervorgerufene Leukozytose und die proinflammatorischen Eigenschaften des Zytokins. Aufgrund von entzündlichen Nebenwirkungen wurden in Verbindung mit einer Stentapplikation erhöhte Restenoseraten beobachtet (Kang, Lee et al. 2006). Wie in Abschnitt 2.2.5.2 dargestellt, wurde auch in der Meta-Analyse keine signifikante kardiale Funktionsverbesserung nach der alleinigen Behandlung mit G-CSF nach stattgehabtem AMI beobachtet (Zohlnhöfer 2008; Zohlnhöfer, Dibra et al. 2008).

Ein möglicher Grund für das Versagen der Therapie könnte die unzureichende Mobilisierung von EPC sein, da diese Zellen sehr wichtig für die kardiale Regeneration sind. Auch die Co-Administration von AMD3100 hat keinen additiven Effekt (Pitchford, Furze et al. 2009), wie auch in der vorliegenden Arbeit demonstriert werden konnte (siehe Abb. 14 und 15).

Die kombinierte Anwendung von VEGF und AMD3100 indessen resultiert in einem hochsignifikanten Anstieg der EPC im peripheren Blut im Vergleich zu der Kontrollgruppe (siehe Abb. 14).

In dieser Studie wurde somit ein Behandlungsprotokoll etabliert, welches zu einer effektiven Mobilisation von EPC führt, die Anzahl an Neutrophilen im peripheren Blut hingegen nicht erhöht. Somit werden potenziell schädliche Effekte auf das Myokard minimiert und die kardiale Regeneration durch das Einsprossen neuer Blutgefäße maximal gefördert.

### **6.2 VEGF/AMD3100 verbessert die Neovaskularisation im infarzierten Myokard und in der angrenzenden „Borderzone“**

Aufgrund zahlreicher Hinweise, dass endotheliale Vorläuferzellen eine große Bedeutung für die Neovaskularisation von ischämischem Gewebe darstellen (Isner and Asahara 1999; Losordo and Dimmeler 2004), konzentrierten sich einige Wissenschaftler auf die Förderung der Vaskularisation mithilfe des Einsatzes von proangiogenetischen Faktoren um die kardiale Funktion nach vorausgegangenem AMI zu verbessern (Asahara, Murohara et al. 1997; Asahara, Masuda et al. 1999; Asahara, Takahashi et al. 1999; Yoon, Koyanagi et al.

2010). In experimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass die Erhaltung oder Wiederherstellung der Gefäßversorgung mit einer Verbesserung der LV-Funktion nach AMI korrelierte. Therapieansätze, die eine effektive Gefäßversorgung des ischämischen Myokards gewährleisten, führten demnach zu einer Verbesserung der kardialen Funktion (Kawamoto, Tkebuchava et al. 2003). Die verstärkte Neovaskularisation im Infarktgebiet und in der angrenzenden „Borderzone“ resultierte in einer verbesserten Perfusion des geschädigten Herzmuskels wodurch bereits geschädigte, hypertrophe Kardiomyozyten vor dem Zelltod bewahrt werden konnten (Schuster, Kocher et al. 2004; Tang, Zhao et al. 2005). Weitere positive Effekte der erhöhten Durchblutung äußerten sich neben einer verringerten Infarktgröße in einer reduzierten Fibrosierungsneigung (Kocher, Schuster et al. 2001; Schuster, Kocher et al. 2004; Tang, Zhao et al. 2004).

Die verringerte Apoptoserate führt dazu, dass mehr funktionelles, kontraktiles Herzmuskelgewebe erhalten bleibt und im weiteren Verlauf eine geringere Fibrosierung des LV erfolgt. Dies hat wiederum positive Auswirkungen auf die Globalfunktion und die Kontraktilität des Herzens. Somit liegt eine direkte Korrelation zwischen Kapillardichte, Infarktgröße und linksventrikulärer Ejektionsfraktion vor (Olivetti, Ricci et al. 1986; Takagawa, Zhang et al. 2007; Yoon, Koyanagi et al. 2010).

Auch in der vorliegenden Studie konnte eine Korrelation zwischen Kapillardichte, Infarktgröße und EF festgestellt werden.

Die Tiere, denen VEGF/AMD3100 appliziert wurde, zeigten in der „Borderzone“ im Vergleich zu der mit Kochsalzlösung behandelten Kontrollgruppe eine signifikant höhere Kapillardichte (siehe Abb. 17). In der TTC- und Trichrom-Färbung der Herzen 28 Tage nach induziertem AMI wiesen die mit VEGF/AMD3100 behandelten Mäuse eine signifikant kleinere Infarktgröße als die Kontrollgruppe auf (siehe Abb. 21 und 22). Des Weiteren konnte in der Katheteruntersuchung 28 Tage nach erfolgter LAD-Ligation gezeigt werden, dass die VEGF/AMD3100-Gruppe mit einer EF von 39 % über eine signifikant höhere Auswurfleistung als die Kontrollgruppe verfügte (siehe Abb. 27).

Somit sind die Resultate dieser Arbeit in Übereinstimmung mit den Beobachtungen von Olivetti et al. und Yoon et al. (Olivetti, Ricci et al. 1986; Yoon, Koyanagi et al. 2010).

Die alleinige Applikation von VEGF hingegen führte zu keiner erhöhten Kapillardichte in der „Borderzone“. Lediglich im nicht infarzierten gesunden Gewebe konnte eine erhöhte Anzahl an CD31<sup>+</sup>-Kapillaren festgestellt werden, ohne dabei jedoch statistisch signifikante Werte zu erreichen (siehe Abb. 17). VEGF führte somit nicht zu einer vermehrten Neovaskularisation im ischämischen Gewebe und nachfolgend auch nicht zu einer Verbesserung der kardialen Funktion. In der Katheteruntersuchung wiesen die VEGF-behandelten Mäuse mit einem

Wert von 26,6 % die schlechteste Auswurffraktion im Vergleich zu den Mäusen der anderen Wirkstoffgruppen auf (siehe Abb. 27).

Die Ergebnisse sind in Konkordanz mit früheren klinischen und experimentellen Studien, die zeigten, dass die systemische, intravenöse Administration von VEGF alleine keine förderlichen Effekte auf die kardiale Regeneration hat (Lopez, Laham et al. 1998; Freedman and Isner 2001; Scott, Rosano et al. 2009).

Zudem ist VEGF dafür bekannt, dass es zu einer Ausbildung von unorganisierten, abnormen Blutgefäßen führt und sich somit nachteilig auf die funktionelle kardiale Heilung auswirkt (Lee, Springer et al. 2000; Ozawa, Banfi et al. 2004; Payne, Oshima et al. 2007).

Auch in der vorliegenden Arbeit wurde nach der alleinigen Applikation von VEGF eine vermehrte Induzierung von aberrierenden und vergrößerten Gefäßen beobachtet.

Interessanterweise wurde dieser Effekt mittels der Co-Administration von AMD3100 aufgehoben (siehe Abb. 18, 19 und 20).

In diesem Zusammenhang zeigte eine kürzlich veröffentlichte Studie, dass die therapeutische Angiogenese und das Gleichgewicht zwischen normaler und abnormer Vaskularisation von der Höhe der VEGF Konzentration und von dem thrombozytären Wachstumsfaktor PDGF-BB abhängen. VEGF fördert dabei das endotheliale Wachstum, währenddessen PDGF-BB zu einer Stabilisation der Blutgefäße führt, in dem es Perizyten rekrutiert (Gaengel, Genove et al. 2009; Banfi, von Degenfeld et al. 2012). Bei Perizyten handelt es sich um perivaskuläre, mesenchymale Zellen, die unmittelbar um das Endothel angeordnet sind und über *gap junctions* mit den Endothelzellen verbunden sind. Mit ihren langen Fortsätzen formen sie ein diskontinuierliches Netzwerk und umhüllen die Endothelzellen, was nachfolgend in einer Stabilisation der Kapillarstruktur resultiert (siehe Abschnitt 2.2.3.1; Bergers and Song 2005).

Die Applikation von AMD3100 führte zu einer Hochregulation von PDGF-BB (Nishimura, Li et al. 2012). Diese Erkenntnis erklärt die Beobachtungen der vorliegenden Arbeit, da die Administration von AMD3100 nach erfolgter Behandlung mit VEGF zu einer Reduktion von aberrierenden Gefäßen führte und nachfolgend zu einer verbesserten kardialen Regeneration beitrug.

Ein Nachteil der VEGF-Applikation ist die Tatsache, dass Bedenken hinsichtlich der Induktion einer pathologischen Angiogenese bestehen, wie z.B. das vermehrte Wachstum maligner Tumore. Aufgrund der erhöhten Mitoserate im Tumorgewebe besteht ein erhöhter Bedarf an Sauerstoff und Nährstoffen, weshalb es zu einer vermehrten Ausschüttung von angiogenen Wachstumsfaktoren kommt und neue Gefäße gebildet werden. Aus diesem

Grund kann durch die Applikation von VEGF das Tumorwachstum beschleunigt werden (Folkman and Shing 1992).

Ein weiterer Aspekt ist die Anwendung von VEGF bei Patienten, die an einer diabetischen Retinopathie leiden. In der Glaskörperflüssigkeit sind bereits erhöhte Konzentrationen an VEGF nachweisbar (Ling, Birnbaum et al. 2013), welche sich durch die Applikation des Wachstumsfaktors potenzieren könnten.

Weitere Bedenken bestehen bezüglich des Fortschreitens atherosklerotischer Prozesse, da VEGF durch die Induktion der Angiogenese die Plaquestabilität beeinflussen kann und somit Einfluss auf die Progression haben kann (Hoeben, Landuyt et al. 2004).

Darüber hinaus ist nicht auszuschließen, dass VEGF möglicherweise Neoplasmen des hämatopoetischen Systems induzieren kann (Bellamy, Richter et al. 1999).

Ein weiteres Problem bei der intravenösen Anwendung von VEGF besteht hinsichtlich der Entwicklung einer möglichen Hypotension. Durch die Freisetzung von Stickstoffmonoxid kommt es zu einer Vasodilatation und nachfolgend führt dies über den sinkenden systemischen Widerstand zu einer Blutdrucksenkung und kompensatorisch zu einer Tachykardie (Horowitz, Rivard et al. 1997).

Eine denkbare Nebenwirkung der VEGF-Applikation ist des Weiteren die Gefäßpermeabilität steigernde Wirkung des Wachstumsfaktors (syn. *vascular permeability factor*; Neufeld, Cohen et al. 1999), welche zu einer lokalen Gewebeödembildung am Applikationsort führen kann.

In der doppelt verblindeten, placebokontrollierten klinischen Studie von Henry et al. (VIVA-trail = *Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis*) wurden 178 Patienten mit einer stabilen Angina, die jedoch unter Belastungsdyspnoe litten, eingeschlossen. Es wurden zwei verschiedenen Dosierungen (17 ng/kg/min und 50 ng/kg/min) für die 20-minütige intrakoronare und anschließende vierstündige intravenöse Applikation von rekombinanten VEGF (rhVEGF) gewählt. Nur bei einem Patienten, der die höhere Dosierung von rhVEGF erhielt, wurde eine ernste systemische Hypotension mit einem systolischen Blutdruck unter 100 mmHg beobachtet. Andere gefürchtete unerwünschte Wirkungen, wie z.B. ein beschleunigtes Wachstum von bösartigen Tumoren, die Entwicklung einer Retinopathie oder die Progression der Atherosklerose wurden nicht beobachtet, weshalb der Einsatz von rhVEGF prinzipiell als sicher eingestuft wurde.

Jedoch wurde gezeigt, dass die Patienten, die die höhere Dosierung von rhVEGF erhielten, nach 120 Tagen eine signifikante Verschlechterung der Angina aufwiesen. Die Autoren vermuten aus diesem Grund einen dosisabhängigen Effekt von VEGF (Henry, Annex et al. 2003).

VEGF hat demnach eine sehr enge therapeutische Breite. Aus diesem Grund sind die Kontrolle des Wirkstoffspiegels und die korrekte Dosierung essenziell für die Ausbildung von stabilen, funktionierenden Blutgefäßen (Ozawa, Banfi et al. 2004; von Degenfeld, Banfi et al. 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die kombinierte Anwendung von VEGF und AMD3100 synergistische Effekte bezüglich der Mobilisation von EPC aufweist, was nachfolgend durch die Ausbildung von stabilen Blutgefäßen im ischämischen Myokard zu einer kardialen Funktionsverbesserung führt.

Die Bedeutung der EPC und der endothelialen Zellen hinsichtlich der Revaskularisation von ischämischem Gewebe wird in zahlreichen Studien betont (Asahara, Murohara et al. 1997; Asahara, Masuda et al. 1999; Asahara, Takahashi et al. 1999; Yoon, Koyanagi et al. 2010).

Auch die Beobachtungen und Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit unterstreichen die Wichtigkeit einer effizienten Neovaskularisation, um die kardiale Regeneration nach AMI zu fördern.

### **6.3 VEGF/AMD3100 fördert die kardiale Regeneration nach Myokardinfarkt und verbessert die Pumpfunktion**

Nach stattgehabtem AMI erfolgt aufgrund der Gewebeischämie ein *Remodeling*-Prozess. Wie in Abschnitt 2.1.3 dargestellt führt dies zu einer Infarktexpansion, einer Dilatation des LV, einer kompensatorischen Hypertrophie der angrenzenden gesunden Kardiomyozyten und einer Hyperplasie der interstitiellen Fibroblasten. Bedingt durch diese anatomischen Umbauprozesse kann die physiologische kardiale Funktion nicht mehr aufrechterhalten werden. Die daraus entstehende systolische Dysfunktion mündet häufig in einem chronischen Herzversagen (Pfeffer and Braunwald 1990). Dies äußert sich in erhöhten Herzvolumina sowie in einer verminderten EF. Die Volumenüberladung resultiert aus der Wandausdünnung und Dilatation des LV, welche konsekutiv in einer systolischen Dysfunktion mündet. Das Herz ist nicht mehr fähig ausreichend Blut in den Körperkreislauf zu pumpen. Dies führt sekundär zu einer verminderten Auswurfleistung, die sich als erniedrigte EF äußert. Im Druck-Volumen-Diagramm ist dies anhand der charakteristischen Rechtsverschiebung der Kurve zu beobachten, die durch die Volumenüberladung und die verminderte Kontraktilität nach Myokardinfarkt bedingt ist (siehe Abb. 26).

Der *Remodeling*-Prozess und das Ausmaß der Umbauprozesse im Myokard korrelieren mit der Infarktgröße und der bestehenden Vor- und Nachlast (Pfeffer and Braunwald 1990).

Wie in Abschnitt 6.2 dargestellt, besteht des Weiteren eine Korrelation zwischen Kapillardichte, Infarktgröße und EF (Olivetti, Ricci et al. 1986; Yoon, Koyanagi et al. 2010).

Demzufolge wiesen die Tiere, die mit VEGF/AMD3100 behandelt wurden, aufgrund der hohen Kapillardichte in der „Borderzone“ und der kleinen Infarktgröße mit einem Wert von 39 % die beste Auswurfleistung auf (siehe Abb. 27). Auch die enddiastolischen und endsystolischen Volumina waren bei der VEGF/AMD3100-Gruppe im Vergleich zu den anderen Wirkstoffgruppen und der Kontrollgruppe signifikant geringer (siehe Abb. 31).

#### **6.4 Die Applikation von VEGF/AMD3100 führt zu einer geringeren Infarktgröße**

Der positive Effekt der VEGF/AMD3100-Behandlung ist auch anhand der Infarktgröße sichtbar. Wie in der Studie von Pitchford et al. dargestellt, führte die kombinierte Behandlung von VEGF und AMD3100 bei nicht ischämischen Mäusen zu einer Blockierung der Rekrutierung und Infiltration von neutrophilen Granulozyten (Pitchford, Furze et al. 2009). Deshalb führte die kombinierte Therapie mit VEGF und AMD3100 in der vorliegenden Arbeit zu einer potenziellen Reduktion des ungünstigen kardialen *Remodelings*, in dem es die Neovaskularisation förderte und die durch die neutrophilen Granulozyten induzierte inflammatorische Reaktion hemmte. Dies äußerte sich in einer verminderten Infarktgröße und folglich in einer Verbesserung der kardialen Funktion. Die Reduktion der Inflammation nach dem ischämischen Insult resultierte in einer Reduktion der Infarktgröße, wie in anderen Publikationen gezeigt wurde (Liehn, Postea et al. 2011).

Eine Reduktion der Infarktgröße zieht demnach folgende Konsequenzen nach sich:

- Es kommt zu einer verminderten Apoptoserate der Kardiomyozyten, somit bleibt mehr vitales, funktionelles Myokard erhalten.
- Durch die Ausbildung von weniger Granulationsgewebe wird einer Fibrosierung des linken Ventrikels vorgebeugt.
- Dies äußert sich in einer Verbesserung der Kontraktilität und folglich in einer verbesserten kardialen Funktion.

#### **6.5 VEGF/AMD3100-Behandlung senkt die Mortalität nach akutem Myokardinfarkt**

Die Induzierung eines AMI mittels Ligatur des *Ramus interventricularis* der *Arteria coronaria sinistra* impliziert eine hohe Mortalitätsrate. In der Literatur werden Werte zwischen 25-40 % angegeben (Ad and Oron 2001; Beltrami, Barlucchi et al. 2003; Leor, Rozen et al. 2006).

Von Orlic et al. wurde sogar eine bis zu 50 %ige Mortalität festgestellt (Orlic, Kajstura et al. 2001).

Auch in der vorliegenden Arbeit wurden ähnliche Werte erfasst. Die Gesamtüberlebensrate der 177 FVB/N-Mäuse betrug 51,41 %. Die Todeszeitpunkte können anhand der Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse abgelesen werden. Dabei wird deutlich, dass zwischen Tag 1 und 7 nach Infarktinduktion die meisten Mäuse starben (siehe Abb. 23). Nachdem diese kritische Phase überwunden war, erholten sich die Mäuse sehr gut und wiesen ein besseres Allgemeinbefinden auf. Die Mäuse wurden nach Todesfeststellung obduziert, um die vermeintliche Todesursache festzustellen. Der häufigste Obduktionsbefund war ein LV-Aneurysma, welches nachfolgend zu einer Ruptur des Herzens führte. In der Obduktion wurden in der Brusthöhle Blutkoagula gefunden sowie aufgrund der hochgradigen Wandausdünnung und Dilatation eine Rupturstelle im LV. Sofern keine makroskopischen Veränderungen vorlagen, wurden als Todesursachen Arrhythmie bzw. Kammerflimmern oder *“acute low cardiac output syndrome”* (ALCOS) durch Linksherzinsuffizienz mit nachfolgendem kardiogenem Schock angenommen.

Die funktionelle Bedeutung der förderlichen Effekte durch die Co-Administration von VEGF und AMD3100 äußert sich in der Überlebenszeitverlängerung. Wie in Abschnitt 5.4 dargestellt, wurden die Tiere, die die ersten vier Tage nach induziertem AMI überlebt hatten, in einer modifizierten Kaplan-Meier-Kurve erfasst. Der Hintergrund für die Modifikation der Überlebenszeitanalyse ist, dass eventuelle förderliche Effekte durch die Stammzellmobilisation erst 4–7 Tage nach der Applikation der verschiedenen Wirkstoffe beobachtet werden können (siehe Abschnitt 5.4). In der modifizierten Kaplan-Meier-Kurve wird deutlich, dass die mit VEGF/AMD3100 behandelten Mäuse die höchste Überlebensrate aufwiesen. Eine Signifikanz konnte jedoch nicht beobachtet werden. Dennoch konnten bezüglich der verschiedenen Wirkstoffe anhand der Kurve große Unterschiede festgestellt werden. G-CSF wies mit einer Überlebensrate von nur 40,54 % den geringsten Wert auf. Die Co-Administration von AMD3100 hingegen scheint förderliche Effekte auf das Überleben zu haben (siehe Abb. 23 und 24).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die erhöhte Überlebensrate der VEGF/AMD3100 behandelten Mäuse durch die förderlichen Effekte hinsichtlich der Mobilisation der EPC, der erhöhten Kapillardichte in der „Borderzone“, der kleinen Infarktgröße und der daraus resultierenden verbesserten kardialen Funktion zu erklären ist.

Die Administration von G-CSF hingegen scheint durch die überschießende Entzündungsreaktion negative Effekte auf die kardiale Funktion und somit das Überleben der Mäuse aufzuweisen.

## 6.6 Die G-CSF- und G-CSF/AMD3100-Behandlung führen zu einer erhöhten Inzidenz von Perikarditiden

28 Tage nach induziertem Myokardinfarkt wurden die Herzen für die weiterführenden Untersuchungen entnommen. Bei der Obduktion wurde eine erhöhte Inzidenz für das Auftreten von Herzbeutelentzündungen vor allem bei den mit G-CSF (16,66 %) und G-CSF/AMD3100 (18,75 %) behandelten Mäusen beobachtet. Demgegenüber zeigten die mit VEGF (4,76 %) oder VEGF/AMD3100 (4,16 %) behandelten Mäuse nur eine geringe Tendenz zur Ausbildung einer Perikarditis (siehe Abb. 25). Die vorliegenden Ergebnisse unterstreichen die Resultate der Studie von Pitchford et al., da in dieser Arbeit festgestellt wurde, dass die Vorbehandlung mit VEGF dazu führt, dass die durch AMD3100 induzierte Mobilisation von neutrophilen Granulozyten unterdrückt wird und somit die absolute Anzahl der reifen neutrophilen Granulozyten im Knochenmark erniedrigt ist (Pitchford, Furze et al. 2009).

Neutrophile Granulozyten sind die ersten Zellen, die zum Ort der Ischämie rekrutiert werden, um nachfolgend tote Zellen und Gewebstrümmer zu eliminieren. Am Ort der Inflammation werden proteolytische Enzyme freigelassen. Nachfolgend tragen reaktive Sauerstoffspezies zur Aufrechterhaltung der Entzündungszellkaskade bei, indem die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen vermittelt wird, was zu einer direkten Schädigung von Kardiomyozyten und Endothelzellen führt (Dhalla, Elmoselhi et al. 2000; Lefer and Granger 2000; Frangogiannis, Smith et al. 2002). Die zytotoxischen Effekte begünstigen somit die myokardiale Schädigung. Die überschießende Inflammation und proteolytische Aktivität führen zu verzögerten Wundheilungsprozessen, was sich wiederum in einer höheren Mortalität äußert.

G-CSF führt, wie in Abschnitt 2.2.5.1 gezeigt, über die Durchbrechung der SDF1 $\alpha$ /CXCR4-Achse zu einer erhöhten Anzahl von Neutrophilen im peripheren Blut (Levesque, Hendy et al. 2003; Wengner, Pitchford et al. 2008), was sich klinisch anhand der erhöhten Anzahl der Perikarditiden äußert (siehe Abb. 25) und weshalb eine erhöhte Mortalität bei dieser Wirkstoffgruppe beobachtet wurde (siehe Abb. 23).

Somit ist es auch nicht verwunderlich, dass neutrophile Granulozyten-depletierte Tiere nach Infarktinduktion geringere Infarktgrößen ausbilden als nicht depletierte Tiere, da anscheinend ein erheblicher Anteil der Herzmuskelschädigung durch die neutrophilen Granulozyten und ihre Zytotoxizität bedingt ist (Jolly, Kane et al. 1986; Litt, Jeremy et al. 1989).

Aus diesem Grund resultiert die Blockierung der Rekrutierung von Neutrophilen in einer Verringerung der Infarktgröße und bewahrt somit die kardiale Funktion (Liehn, Postea et al. 2011).

Deshalb führte die kombinierte Therapie mit VEGF und AMD3100 über die Reduktion von ungünstigem kardialen *Remodeling* mittels Förderung der Neovaskularisation und Reduktion der neutrophilen Entzündungszellkaskade zu einer verbesserten Herzregeneration.

### 6.7 Limitationen der Arbeit

Die Maus als Versuchstier bietet viele Vorteile im Hinblick auf experimentelle Studien. Zum einen sind die einfache und kostengünstige Haltung zu nennen, des Weiteren die schnelle Reproduktion und die Möglichkeit der genetischen Manipulation des Mäusegenoms (Verdouw, van den Doel et al. 1998), da viele Inzuchtstämme und Mutanten von Mäusen zur Verfügung stehen. Weitere Vorzüge liegen darin, dass die Operation von nur einem Operateur durchgeführt werden kann und die postischämische Mortalität relativ gering ist. Auch in der postoperativen Versorgung sind Mäuse verhältnismäßig anspruchslos (Zolotareva and Kogan 1978). Ein Nachteil hingegen ist die Größe der Maus, da die mikrochirurgischen Eingriffe zum einen eine hohe Anforderung an die Technik verlangen und zum anderen ein hohes operatives Geschick des Chirurgen erfordern (Salto-Tellez, Yung Lim et al. 2004). Für die Wahl der Maus als Tiermodell gegenüber anderen Tierarten spricht die Möglichkeit die Blutgefäßversorgung am Herzen mit der des Menschen vergleichen zu können (Verdouw, van den Doel et al. 1998). In einer experimentellen Studie über den induzierten Myokardinfarkt von Zolotareva et al. fanden die Autoren heraus, dass die morphologischen Veränderungen im Myokard der Maus nach einem Verschluss der Koronararterie mit denen von anderen Versuchstieren und vom Mensch vergleichbar sind (Zolotareva and Kogan 1978).

Trotz der oben genannten Vorteile ist ein entscheidender Nachteil, dass die Induktion des Myokardinfarkts durch die Ligation der LAD nicht exakt mit einem Myokardinfarkt beim Menschen vergleichbar ist, da bei der Myokardinfarktinduktion die Koronararterie von außen verschlossen wird und es sich nicht um einen schleichenden, atherosklerotischen Prozess handelt, der die Koronararterie obliteriert. Somit hat der Organismus keine Zeit, sich an die Verengung der Herzkranzarterie zu gewöhnen, denn der ischämische Insult tritt plötzlich auf. Auch die Effekte der rekrutierten Entzündungszellen durch die Gefäßwandläsion und endotheliale Dysfunktion (Falk 1983; Libby, Ridker et al. 2002) entfallen bei der operativen Ligation der LAD.

Ein weiterer Aspekt in der Humanmedizin ist die sofortige Wiedereröffnung des verschlossenen Herzkranzgefäßes mittels PCI (Andersen, Nielsen et al. 2003) oder Lyse-Therapie (Bonney, Lapostolle et al. 2002). Dies lässt sich im Mausmodell nur schwer verwirklichen. Ebenso gilt die Gabe von Thrombozytenaggregationshemmern (Collaboration 2002) und  $\beta$ -

Blockern (Wienbergen, Gitt et al. 2005) in der Humanmedizin als standardisierte Therapie nach AMI, in experimentellen Studien wird sie jedoch nicht eingesetzt.

Des Weiteren wurde den Tieren nicht nur ein Herzinfarkt zugeführt, sondern es erfolgte auch eine stark belastende Operation und Thorakotomie. Die damit verbundenen Folgen oder Komplikationen, wie z.B. eine postoperative Infektion, konnten in der vorliegenden Studie nicht verifiziert werden. Auch kann der Einfluss von etwaigen Vorerkrankungen, wie Diabetes mellitus, Adipositas, Hypercholesterinämie oder Hypertonie auf die Behandlung mit den verschiedenen Wirkstoffen nicht geklärt werden.

Dessen ungeachtet bot sich die Maus als Versuchstier für die vorliegende Arbeit an, wie zahlreiche experimentelle Studien belegen und da das Verfahren gut etabliert ist (Michael, Entman et al. 1995; Salto-Tellez, Yung Lim et al. 2004; van den Borne, van de Schans et al. 2009).

## **7 ZUSAMMENFASSUNG**

### **Einleitung:**

Die koronare Herzkrankheit und der hieraus resultierende Myokardinfarkt zählen weltweit zu einer der Haupttodesursachen. Trotz der Fortschritte im Bereich der Diagnosestellung und revascularisierenden Therapie, erleiden viele Patienten aufgrund der Umbauprozesse nach einem akuten Myokardinfarkt (AMI) eine Herzinsuffizienz. Bis heute wurde noch keine ausreichende Therapie entwickelt, um den Herzmuskel zu regenerieren und bereits untergegangenes Myokard zu revitalisieren. Wie in mehreren Studien gezeigt wurde, führt ein AMI zu einer physiologischen Mobilisierung von endothelialen Progenitorzellen (EPC) aus dem Knochenmark (KM) in das periphere Blut. Dennoch sind diese intrinsischen Mechanismen nicht ausreichend, um eine vollständige Regeneration zu bewirken. Aus diesem Grund stellt ein Ansatzpunkt zur Verbesserung der kardialen Funktion die Mobilisierung von EPC zum ischämischen Gebiet dar, um dort mittels der Realisierung einer effektiven Neovaskularisation die endogene Regeneration zu verbessern. In dieser Arbeit wurden verschiedene Wirkstoffe und Wirkstoffkombinationen angewendet, die das Potenzial besitzen, Stamm- und Progenitorzellen aus dem Knochenmark in das periphere Blut zu mobilisieren. Nachfolgend wurden die potenziellen förderlichen Effekte der mobilisierten hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen (HSPC) und EPC auf die kardiale Regeneration im murinen Herzinfarktmodell untersucht.

### **Methoden:**

Mittels Ligatur der linken Koronararterie wurde bei 177 FVB/N Mäusen ein Herzinfarkt induziert. Zuvor wurden die Tiere in sechs Behandlungsgruppen randomisiert und nach erfolgter Operation die Wirkstoffe G-CSF (engl. *granulocyte-colony stimulating factor*), VEGF (engl. *vascular endothelial growth factor*), AMD3100 oder der Kombination aus G-CSF/AMD3100 bzw. VEGF/AMD3100 subkutan appliziert. Die Administration von G-CSF, respektive VEGF wurde 1 h nach der OP (Tag 1) begonnen und erfolgte an den beiden folgenden Tagen (Tag 2 und 3). An Tag 4 wurde der Wirkstoff AMD3100 injiziert. Die Kontrollgruppe erhielt anstelle der Wirkstoffe Injektionen mit physiologischer Kochsalzlösung. An den Tagen 0, 7, 14 und 28 wurden Blutproben zur weiterführenden Untersuchung aus der Schwanzvene entnommen. Nach der anschließenden Isolation der HSPC und EPC aus dem peripheren Blut erfolgte die durchflusszytometrische Untersuchung der Zellen mithilfe der FACS-Analyse (engl. *fluorescence-activated cell sorting*). Nach 28 Tagen wurden mittels Katheteruntersuchungen hämodynamische Parameter aufgezeichnet, um die ventrikuläre Funktion zu beurteilen. Nach der Euthanasie der Mäuse und Entnahme der Herzen wurden histologische Untersuchungen zur Bestimmung der Kapillardichte im

kardialen Gewebe durchgeführt. Des Weiteren erfolgten die Infarktgrößenmessung und die Bestimmung der linksventrikulären Fibrose.

**Ergebnisse:**

Die Analyse des peripheren Blutes zeigte bei allen Gruppen einen Anstieg der mobilisierten HPSC und EPC nach induziertem Herzinfarkt. In der Durchflusszytometrie konnte gezeigt werden, dass die Gruppe, die eine kombinierte Therapie mit VEGF und AMD3100 erhielt, am effektivsten Flk-1<sup>+</sup>/Sca-1<sup>+</sup>-EPC in das periphere Blut mobilisierte. Auch hinsichtlich der CD31<sup>+</sup>-Zellen in der Immunfluoreszenz-Färbung der Herzen konnte in der „Borderzone“ eine signifikant höhere Anzahl an Kapillaren in der mit VEGF/AMD3100 behandelten Gruppe nachgewiesen werden. Die verbesserte Neoangiogenese führte konsekutiv zu einer Reduktion der Infarktgröße und somit zu einer gut erhaltenen Pumpfunktion nach induziertem Myokardinfarkt, welche sich auch in einer erhöhten Überlebensrate äußerte.

Im Gegensatz dazu konnte bei den Mäusen, die mit VEGF resp. AMD3100 alleine sowie bei den mit G-CSF und G-CSF/AMD3100 behandelten Mäusen keine Verbesserung der linksventrikulären Pumpfunktion beobachtet werden. Auch im Hinblick auf die Infarktgröße, die Vaskularisation des ischämischen Myokards und die Überlebensrate wurden bei diesen Wirkstoffgruppen keine förderlichen Effekte auf die myokardiale Regeneration festgestellt.

**Diskussion:**

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die kombinierte Therapie mit VEGF/AMD3100 nicht nur die endogene Mobilisation der EPC fördert, sondern dass die rekrutierten Zellen auch zu einer verbesserten myokardialen Neovaskularisation beitragen, welche sich nachfolgend positiv auf die Herzfunktion nach stattgehabtem AMI auswirkt. Dieser Effekt ließ sich bei den Mäusen, die singuläre Wirkstoffe oder die kombinierte Behandlung mit G-CSF und AMD3100 erhielten, nicht beobachten. So führte zum Beispiel die alleinige Gabe von VEGF zu einer Ausbildung von abnorm großen vaskulären Strukturen. Auch bei der Administration von G-CSF bzw. der Kombination von G-CSF und AMD3100 wurden nachteilige Effekte im Hinblick auf die myokardiale Regeneration nach AMI beobachtet, wie beispielsweise das vermehrte Auftreten von Perikarditiden. Resümierend lässt sich sagen, dass in dieser Arbeit zum ersten Mal demonstriert wurde, dass die Co-Administration mit VEGF und AMD3100 im Hinblick auf die EPC-Mobilisation, die Vaskularisation im ischämischen Myokard, die Erhaltung der Herzfunktion nach AMI und die damit verbundene erhöhte Überlebensrate effektiver ist als die alleinige Gabe der jeweiligen Wirkstoffe bzw. die Behandlung mit G-CSF resp. G-CSF/AMD3100. Die Verwendung dieser neuartigen kombinierten Mobilisierungsstrategie, die weder eine aufwendige *ex-vivo* Zellaufreinigung benötigt, noch mit der risikoreichen intrakoronaren respektive intramyokardialen Transplantation von Stammzellen verbunden ist, könnte eine therapeutische Alternative für zukünftige klinische Versuche im Hinblick auf die kardiale Regeneration nach AMI darstellen.

## **8 SUMMARY**

### ***"Novel Mobilization Strategies for the Myocardial Regeneration after Acute Myocardial Infarction"***

***Annalena Krost***

#### **Introduction:**

Coronary heart disease and the resulting myocardial infarction include one of the leading causes of death worldwide. Despite the progress made in the field of diagnosis and therapy, many patients suffer from heart failure after acute myocardial infarction (AMI) as a result of the restructuring processes. Until today, no adequate treatment option has been developed to regenerate the heart muscle and revitalize already lost myocardial tissue.

As has been shown in several studies, an AMI leads to a physiological mobilization of endothelial progenitor cells (EPC) from the bone marrow into the peripheral blood. However, these intrinsic mechanisms are insufficient to bring about a full recovery. Therefore, one of the most promising approaches to support endogenous regeneration is the establishment of an effective neovascularization via recruitment of EPC into ischemic heart tissue.

In this work various drugs and drug combinations have been applied, which have the potential to mobilize stem and progenitor cells from the bone marrow into the peripheral blood. For this reason the potential beneficial effects of mobilized hematopoietic stem and progenitor cells (HSPC) and EPC on the cardiac regeneration in the murine myocardial infarction model were investigated.

#### **Methods:**

AMI was induced in 177 FVB/NJ mice by ligation of the left coronary artery. The animals were randomized into six treatment groups and the active G-CSF (*granulocyte-colony stimulating factor*), VEGF (*vascular endothelial growth factor*), AMD3100 or the combination of G-CSF/AMD3100 or VEGF/AMD3100 was administered subcutaneously after surgery. The application of G-CSF and VEGF started 1 h post OP (day 1) and was continued on the two following days (day 2 and 3). The active ingredient AMD3100 was injected on day 4. The control group received injections of saline instead of the active ingredients.

Blood samples for further examination from the tail vein were collected on days 0, 7, 14 and 28. HSPC and EPC were isolated from the peripheral blood and progenitor cell numbers were evaluated by fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis. After 28 days, hemodynamic parameters were recorded to assess the ventricular function by means of catheter examinations. After sacrificing the mice and removal of the heart, histological

studies to determine the capillary density in the cardiac tissue were performed. Furthermore infarct size and left ventricular fibrosis were measured.

**Results:**

The analysis of peripheral blood in all groups showed a rise of mobilized HPSC and EPC after induced heart attack. In Flow Cytometry we could demonstrate that the group that received the combined therapy with VEGF and AMD3100 mobilized most effective Flk-1<sup>+</sup>/Sca-1<sup>+</sup> EPC into the peripheral blood. Immunofluorescence staining of CD31 EPC marker in the infarcted left ventricle demonstrated significantly enhanced capillary density in the heart tissues of VEGF/AMD3100 treated mice. The improved neovascularization consecutively led to a reduction of the infarct tissue and a well-preserved pumping function after induced myocardial infarction, which manifested itself in an increased survival rate. In contrast to this no improvement of left ventricular pump function could be observed in the mice treated with AMD3100 respectively VEGF alone, as well as in the mice treated with G-CSF or G-CSF/AMD3100. No beneficial effects on the myocardial regeneration were observed in regard to the infarct size, vascularization of the ischemic myocardium and the survival rate in these groups of active ingredients.

**Discussion:**

The results indicate that the combined therapy with VEGF/AMD3100 not only promotes the endogenous mobilization of the EPC, but that the recruited cells also contribute to an improved myocardial neovascularization with positive effects on heart function after AMI.

This effect was not observed in the mice who received singular active substances or the combined treatment with G-CSF and AMD3100. So for example the sole administration of VEGF led to a formation of abnormally large vascular structures. Adverse effects in terms of the myocardial regeneration were also observed in the administration of G-CSF or the combination of G-CSF and AMD3100 after AMI, like for example the increased occurrence of pericardial inflammation.

In conclusion our study demonstrates that co-administration of VEGF and AMD3100 is more effective than each drug alone or treatment with G-CSF respectively G-CSF/AMD3100 with regard to EPC mobilization, myocardium vascularization, preservation of heart function after AMI and preventing cardiac death.

The use of this new combinatorial therapy that does not require ex vivo cell purification and intracoronary or intramyocardial injection of stem cells may become a therapeutic alternative for future clinical trials for cardiac repair after AMI.

## **9 TABELLENVERZEICHNIS**

Tabelle 1: Klinische Studien mit G-CSF nach akutem Myokardinfarkt .....	20
Tabelle 2: Die Mitglieder der VEGF-Familie und die Bindung an ihre Rezeptoren.....	26
Tabelle 3: Versuchsgruppen und Behandlungsschemata .....	39
Tabelle 4: Fluorochrome und ihre Adsorptions- und Emissionsmaxima.....	43
Tabelle 5: Verwendete Laser zur Detektion der Fluorochrome .....	44
Tabelle 6: Parameter zur Beurteilung der systolischen linksventrikulären Funktion.....	49
Tabelle 7: Parameter zur Beurteilung der diastolischen linksventrikulären Funktion .....	49
Tabelle 8: Histologische Schnittpräparate von Apex respektive Basis und schematische Darstellung der geplanten histologischen Färbungen .....	53
Tabelle 9: Überlebensrate in % der verschiedenen Wirkstoffgruppen.....	75
Tabelle 10: Tabellarische Darstellung der gemessenen systolischen und diastolischen Parameter zur Beurteilung der Herzfunktion 28 Tage nach induziertem Myokardinfarkt .....	80

## **10 ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

Abbildung 1: Entstehung der Atherosklerose .....	5
Abbildung 2: Vaskulogenese und Angiogenese .....	12
Abbildung 3: G-CSF.....	15
Abbildung 4: Chemische Struktur von AMD3100 .....	21
Abbildung 5: VEGF/VEGFR-1 Komplex .....	26
Abbildung 6: VEGF-Rezeptoren .....	27
Abbildung 7: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus .....	38
Abbildung 8: Durchführung des Herzinfarktmodells .....	42
Abbildung 9: Isolierung von mononukleären Zellen.....	44
Abbildung 10: Repräsentative Darstellung eines Druck-Volumen-Diagrammes .....	47
Abbildung 11: HE- und Masson-Trichrom-Färbung .....	55
Abbildung 12: Repräsentative Darstellung eines TTC-gefärbten Herzens .....	57
Abbildung 13: FACS-Analyse der mobilisierten EPC .....	59
Abbildung 14: FACS-Analyse der Flk-1 <sup>+</sup> /Sca1 <sup>+</sup> -gefärbten mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut .....	61
Abbildung 15: FACS-Analyse der c-Kit <sup>+</sup> /Sca1 <sup>+</sup> -gefärbten mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut .....	62
Abbildung 16: Masson-Trichrom-Färbung .....	63
Abbildung 17: CD31/PECAM Immunfluoreszenzfärbung zur Bestimmung der Kapillardichte in der „Borderzone“ und im nicht infarzierten Bereich .....	66
Abbildung 18: Anzahl der abnorm großen Gefäße pro Blickfeld .....	67
Abbildung 19: Morphometrische Analyse der Gefäße .....	69

Abbildung 20: Relative Häufigkeit des mittleren Gefäßdurchmessers/mm <sup>2</sup> in der nicht infarzierten Region und in der „Borderzone“ .....	70
Abbildung 21: TTC-Färbung .....	72
Abbildung 22: Prozentuale linksventrikuläre Infarktgröße .....	74
Abbildung 23: Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse .....	76
Abbildung 24: Modifizierte Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse .....	77
Abbildung 25: Perikarditiden in % .....	79
Abbildung 26: Druck-Volumen-Diagramm .....	79
Abbildung 27: Ejektionsfraktion in % .....	85
Abbildung 28: Schlagarbeit .....	86
Abbildung 29: Schlagarbeit in % .....	87
Abbildung 30: Linksventrikuläre Druckerstiegs- und Druckabfallsgeschwindigkeit.....	89
Abbildung 31: Endsystolisches und Enddiastolisches Volumen .....	91
Abbildung 32: VEGF/AMD3100 .....	93

## **11 LITERATURVERZEICHNIS**

Abdel-Latif, A., R. Bolli, et al. (2008). "Granulocyte colony-stimulating factor therapy for cardiac repair after acute myocardial infarction: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials." Am Heart J **156**(2): 216-226 e219.

Ad, N. and U. Oron (2001). "Impact of low level laser irradiation on infarct size in the rat following myocardial infarction." Int J Cardiol **80**(2-3): 109-116.

Adams, V., K. Lenk, et al. (2004). "Increase of circulating endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease after exercise-induced ischemia." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(4): 684-690.

Aicher, A., C. Heeschen, et al. (2003). "Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells." Nat Med **9**(11): 1370-1376.

Aicher, A., A. M. Zeiher, et al. (2005). "Mobilizing endothelial progenitor cells." Hypertension **45**(3): 321-325.

Aiuti, A., I. J. Webb, et al. (1997). "The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood." J Exp Med **185**(1): 111-120.

Alasady, M., W. P. Abhayaratna, et al. (2011). "Coronary artery disease affecting the atrial branches is an independent determinant of atrial fibrillation after myocardial infarction." Heart Rhythm **8**(7): 955-960.

Anderlini, P., D. Przepiorka, et al. (1996). "Biologic and clinical effects of granulocyte colony-stimulating factor in normal individuals." Blood **88**(8): 2819-2825.

Andersen, H. R., T. T. Nielsen, et al. (2003). "A comparison of coronary angioplasty with fibrinolytic therapy in acute myocardial infarction." N Engl J Med **349**(8): 733-742.

Asahara, T. and A. Kawamoto (2004). "Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis." Am J Physiol Cell Physiol **287**(3): C572-579.

Asahara, T., H. Masuda, et al. (1999). "Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization." Circ Res **85**(3): 221-228.

Asahara, T., T. Murohara, et al. (1997). "Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis." Science **275**(5302): 964-967.

Asahara, T., T. Takahashi, et al. (1999). "VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells." EMBO J **18**(14): 3964-3972.

Askari, A. T. and M. S. Penn (2003). "Stromal cell-derived factor-1 mediates stem cell homing and tissue regeneration." Discov Med **3**(18): 46-47.

Assmus, B., J. Honold, et al. (2006). "Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction." N Engl J Med **355**(12): 1222-1232.

Assmus, B., V. Schachinger, et al. (2002). "Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI)." Circulation **106**(24): 3009-3017.

Avalos, B. R. (1996). "Molecular analysis of the granulocyte colony-stimulating factor receptor." Blood **88**(3): 761-777.

Baan, J., E. T. van der Velde, et al. (1984). "Continuous measurement of left ventricular volume in animals and humans by conductance catheter." Circulation **70**(5): 812-823.

Banerjee, S., E. Brilakis, et al. (2006). "Endothelial progenitor cell mobilization after percutaneous coronary intervention." Atherosclerosis **189**(1): 70-75.

Banfi, A., G. von Degenfeld, et al. (2012). "Therapeutic angiogenesis due to balanced single-vector delivery of VEGF and PDGF-BB." FASEB J **26**(6): 2486-2497.

Barleon, B., S. Sozzani, et al. (1996). "Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1." Blood **87**(8): 3336-3343.

Bellamy, W. T., L. Richter, et al. (1999). "Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in hematopoietic malignancies." Cancer Res **59**(3): 728-733.

Beltrami, A. P., L. Barlucchi, et al. (2003). "Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration." Cell **114**(6): 763-776.

Bergers, G. and S. Song (2005). "The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance." Neuro Oncol **7**(4): 452-464.

Bonnefoy, E., F. Lapostolle, et al. (2002). "Primary angioplasty versus prehospital fibrinolysis in acute myocardial infarction: a randomised study." Lancet **360**(9336): 825-829.

Breier, G. (2000). "Angiogenesis in embryonic development-a review." Placenta **21 Suppl A**: S11-15.

Broxmeyer, H. E., C. M. Orschell, et al. (2005). "Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist." J Exp Med **201**(8): 1307-1318.

Burkhoff, D., E. van der Velde, et al. (1985). "Accuracy of volume measurement by conductance catheter in isolated, ejecting canine hearts." Circulation **72**(2): 440-447.

Busk, M., M. Maeng, et al. (2009). "Timing, causes, and predictors of death after three years follow-up in the Danish Multicenter Randomized Study of Fibrinolysis versus Primary Angioplasty in Acute Myocardial Infarction (DANAMI-2) trial." Am J Cardiol **104**(2): 210-215.

Calandra, G., J. McCarty, et al. (2008). "AMD3100 plus G-CSF can successfully mobilize CD34+ cells from non-Hodgkin's lymphoma, Hodgkin's disease and multiple myeloma patients previously failing mobilization with chemotherapy and/or cytokine treatment: compassionate use data." Bone Marrow Transplant **41**(4): 331-338.

Capoccia, B. J., R. M. Shepherd, et al. (2006). "G-CSF and AMD3100 mobilize monocytes into the blood that stimulate angiogenesis in vivo through a paracrine mechanism." Blood **108**(7): 2438-2445.

- Carmeliet, P. (2000). "Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis." *Nat Med* **6**(4): 389-395.
- Ceradini, D. J., A. R. Kulkarni, et al. (2004). "Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1." *Nat Med* **10**(8): 858-864.
- Christopherson, K. W., 2nd, S. Cooper, et al. (2003). "Cell surface peptidase CD26/DPPIV mediates G-CSF mobilization of mouse progenitor cells." *Blood* **101**(12): 4680-4686.
- Christopherson, K. W., S. Cooper, et al. (2003). "CD26 is essential for normal G-CSF-induced progenitor cell mobilization as determined by CD26<sup>-/-</sup> mice." *Exp Hematol* **31**(11): 1126-1134.
- Cohn, J. N., R. Ferrari, et al. (2000). "Cardiac remodeling-concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling." *J Am Coll Cardiol* **35**(3): 569-582.
- Collaboration, A. T. (2002). "Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients." *BMJ* **324**(7329): 71-86.
- Cowie, M. R., A. Mosterd, et al. (1997). "The epidemiology of heart failure." *Eur Heart J* **18**(2): 208-225.
- De Clercq, E. (2005). "Potential clinical applications of the CXCR4 antagonist bicyclam AMD3100." *Mini Rev Med Chem* **5**(9): 805-824.
- De Clercq, E. (2010). "Recent advances on the use of the CXCR4 antagonist plerixafor (AMD3100, Mozobil) and potential of other CXCR4 antagonists as stem cell mobilizers." *Pharmacol Ther* **128**(3): 509-518.
- De Falco, E., D. Porcelli, et al. (2004). "SDF-1 involvement in endothelial phenotype and ischemia-induced recruitment of bone marrow progenitor cells." *Blood* **104**(12): 3472-3482.
- Deindl, E., M. M. Zaruba, et al. (2006). "G-CSF administration after myocardial infarction in mice attenuates late ischemic cardiomyopathy by enhanced arteriogenesis." *FASEB J* **20**(7): 956-958.
- Devine, S. M., N. Flomenberg, et al. (2004). "Rapid mobilization of CD34<sup>+</sup> cells following administration of the CXCR4 antagonist AMD3100 to patients with multiple myeloma and non-Hodgkin's lymphoma." *J Clin Oncol* **22**(6): 1095-1102.
- Dhalla, N. S., A. B. Elmoselhi, et al. (2000). "Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury." *Cardiovasc Res* **47**(3): 446-456.
- Dickstein, K., A. Cohen-Solal, et al. (2008). "ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM)." *Eur Heart J* **29**(19): 2388-2442.
- Dimmeler, S., A. Aicher, et al. (2001). "HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway." *J Clin Invest* **108**(3): 391-397.

Dimmeler, S. and A. Zeiher (2005). Stammzelltherapie in der Kardiologie-Stand und Perspektiven Bremen, UNI-MED Verlag.

Dimmeler, S., A. M. Zeiher, et al. (2005). "Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair." J Clin Invest **115**(3): 572-583.

Donzella, G. A., D. Schols, et al. (1998). "AMD3100, a small molecule inhibitor of HIV-1 entry via the CXCR4 co-receptor." Nat Med **4**(1): 72-77.

Engelmann, M. G., H. D. Theiss, et al. (2006). "Autologous bone marrow stem cell mobilization induced by granulocyte colony-stimulating factor after subacute ST-segment elevation myocardial infarction undergoing late revascularization: final results from the G-CSF-STEMI (Granulocyte Colony-Stimulating Factor ST-Segment Elevation Myocardial Infarction) trial." J Am Coll Cardiol **48**(8): 1712-1721.

Erdo, F., C. Buhle, et al. (2003). "Host-dependent tumorigenesis of embryonic stem cell transplantation in experimental stroke." J Cereb Blood Flow Metab **23**(7): 780-785.

Falk, E. (1983). "Plaque rupture with severe pre-existing stenosis precipitating coronary thrombosis. Characteristics of coronary atherosclerotic plaques underlying fatal occlusive thrombi." Br Heart J **50**(2): 127-134.

Feldman, M. D., Y. Mao, et al. (2000). "Development of a multifrequency conductance catheter-based system to determine LV function in mice." Am J Physiol Heart Circ Physiol **279**(3): H1411-1420.

Ferrara, N. (1996). "Vascular endothelial growth factor." Eur J Cancer **32A**(14): 2413-2422.

Ferrara, N. (1999). "Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects." Curr Top Microbiol Immunol **237**: 1-30.

Ferrara, N. (2001). "Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis." Am J Physiol Cell Physiol **280**(6): C1358-1366.

Ferrara, N. (2004). "Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress." Endocr Rev **25**(4): 581-611.

Ferrara, N., H. P. Gerber, et al. (2003). "The biology of VEGF and its receptors." Nat Med **9**(6): 669-676.

Flomenberg, N., S. M. Devine, et al. (2005). "The use of AMD3100 plus G-CSF for autologous hematopoietic progenitor cell mobilization is superior to G-CSF alone." Blood **106**(5): 1867-1874.

Folkman, J. and Y. Shing (1992). "Angiogenesis." J Biol Chem **267**(16): 10931-10934.

Frangogiannis, N. G., C. W. Smith, et al. (2002). "The inflammatory response in myocardial infarction." Cardiovasc Res **53**(1): 31-47.

Freedman, S. B. and J. M. Isner (2001). "Therapeutic angiogenesis for ischemic cardiovascular disease." J Mol Cell Cardiol **33**(3): 379-393.

Fruehauf, S., T. Seeger, et al. (2006). "The CXCR4 antagonist AMD3100 releases a subset of G-CSF-primed peripheral blood progenitor cells with specific gene expression characteristics." Exp Hematol **34**(8): 1052-1059.

- Gaengel, K., G. Genove, et al. (2009). "Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**(5): 630-638.
- Gaudron, P., C. Eilles, et al. (1993). "Progressive left ventricular dysfunction and remodeling after myocardial infarction. Potential mechanisms and early predictors." *Circulation* **87**(3): 755-763.
- Gaudron, P., I. Kugler, et al. (2001). "Time course of cardiac structural, functional and electrical changes in asymptomatic patients after myocardial infarction: their inter-relation and prognostic impact." *J Am Coll Cardiol* **38**(1): 33-40.
- Gerber, H. P., F. Condorelli, et al. (1997). "Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia." *J Biol Chem* **272**(38): 23659-23667.
- Gerber, H. P., A. McMurtrey, et al. (1998). "Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation." *J Biol Chem* **273**(46): 30336-30343.
- Gill, M., S. Dias, et al. (2001). "Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)AC133(+) endothelial precursor cells." *Circ Res* **88**(2): 167-174.
- Grothey, A. and E. Galanis (2009). "Targeting angiogenesis: progress with anti-VEGF treatment with large molecules." *Nat Rev Clin Oncol* **6**(9): 507-518.
- Harada, M., Y. Qin, et al. (2005). "G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes." *Nat Med* **11**(3): 305-311.
- Hattori, K., S. Dias, et al. (2001). "Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells." *J Exp Med* **193**(9): 1005-1014.
- Hattori, K., B. Heissig, et al. (2002). "Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1(+) stem cells from bone-marrow microenvironment." *Nat Med* **8**(8): 841-849.
- Heeschen, C., A. Aicher, et al. (2003). "Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization." *Blood* **102**(4): 1340-1346.
- Heeschen, C., R. Lehmann, et al. (2004). "Profoundly reduced neovascularization capacity of bone marrow mononuclear cells derived from patients with chronic ischemic heart disease." *Circulation* **109**(13): 1615-1622.
- Heissig, B., K. Hattori, et al. (2002). "Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand." *Cell* **109**(5): 625-637.
- Heissig, B., S. Rafii, et al. (2005). "Low-dose irradiation promotes tissue revascularization through VEGF release from mast cells and MMP-9-mediated progenitor cell mobilization." *J Exp Med* **202**(6): 739-750.
- Hellermann, J. P., T. Y. Goraya, et al. (2003). "Incidence of heart failure after myocardial infarction: is it changing over time?" *Am J Epidemiol* **157**(12): 1101-1107.

Hendrix, C. W., A. C. Collier, et al. (2004). "Safety, pharmacokinetics, and antiviral activity of AMD3100, a selective CXCR4 receptor inhibitor, in HIV-1 infection." J Acquir Immune Defic Syndr **37**(2): 1253-1262.

Henry, T. D., B. H. Annex, et al. (2003). "The VIVA trial: Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis." Circulation **107**(10): 1359-1365.

Hill, C. P., T. D. Osslund, et al. (1993). "The structure of granulocyte-colony-stimulating factor and its relationship to other growth factors." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(11): 5167-5171.

Hill, J. M., M. A. Syed, et al. (2005). "Outcomes and risks of granulocyte colony-stimulating factor in patients with coronary artery disease." J Am Coll Cardiol **46**(9): 1643-1648.

Hoeben, A., B. Landuyt, et al. (2004). "Vascular endothelial growth factor and angiogenesis." Pharmacol Rev **56**(4): 549-580.

Honold, J., R. Lehmann, et al. (2006). "Effects of granulocyte colony stimulating factor on functional activities of endothelial progenitor cells in patients with chronic ischemic heart disease." Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(10): 2238-2243.

Horowitz, J. R., A. Rivard, et al. (1997). "Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor produces nitric oxide-dependent hypotension. Evidence for a maintenance role in quiescent adult endothelium." Arterioscler Thromb Vasc Biol **17**(11): 2793-2800.

Houck, K. A., N. Ferrara, et al. (1991). "The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA." Mol Endocrinol **5**(12): 1806-1814.

Ince, H., M. Petzsch, et al. (2005). "Prevention of left ventricular remodeling with granulocyte colony-stimulating factor after acute myocardial infarction: final 1-year results of the Front-Integrated Revascularization and Stem Cell Liberation in Evolving Acute Myocardial Infarction by Granulocyte Colony-Stimulating Factor (FIRSTLINE-AMI) Trial." Circulation **112**(9 Suppl): I73-80.

Ince, H., M. Petzsch, et al. (2005). "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 **112**(20): 3097-3106.

Investigators, T. S. (1991). "Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fractions and congestive heart failure. The SOLVD Investigators." N Engl J Med **325**(5): 293-302.

Ismail, J. A., V. Poppa, et al. (2003). "Immunohistologic labeling of murine endothelium." Cardiovasc Pathol **12**(2): 82-90.

Isner, J. M. and T. Asahara (1999). "Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization." J Clin Invest **103**(9): 1231-1236.

Isner, J. M., C. Kalka, et al. (2001). "Bone marrow as a source of endothelial cells for natural and iatrogenic vascular repair." Ann N Y Acad Sci **953**: 75-84.

- Iwakura, A., S. Shastry, et al. (2006). "Estradiol enhances recovery after myocardial infarction by augmenting incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells into sites of ischemia-induced neovascularization via endothelial nitric oxide synthase-mediated activation of matrix metalloproteinase-9." Circulation **113**(12): 1605-1614.
- Iyer, N. V., L. E. Kotch, et al. (1998). "Cellular and developmental control of O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha." Genes Dev **12**(2): 149-162.
- Jackson, G., C. R. Gibbs, et al. (2000). "ABC of heart failure. Pathophysiology." BMJ **320**(7228): 167-170.
- Jackson, K. A., S. M. Majka, et al. (2001). "Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells." J Clin Invest **107**(11): 1395-1402.
- Jolly, S. R., W. J. Kane, et al. (1986). "Reduction of myocardial infarct size by neutrophil depletion: effect of duration of occlusion." Am Heart J **112**(4): 682-690.
- Jujo, K., H. Hamada, et al. (2010). "CXCR4 blockade augments bone marrow progenitor cell recruitment to the neovasculature and reduces mortality after myocardial infarction." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(24): 11008-11013.
- Jujo, K., M. Li, et al. (2013). "CXC-chemokine receptor 4 antagonist AMD3100 promotes cardiac functional recovery after ischemia/reperfusion injury via endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism." Circulation **127**(1): 63-73.
- Kalka, C., T. Asahara, et al. (2000). "[Angiogenesis and vasculogenesis. Therapeutic strategies for stimulation of postnatal neovascularization]." Herz **25**(6): 611-622.
- Kalka, C., H. Masuda, et al. (2000). "Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(7): 3422-3427.
- Kang, H. J., H. S. Kim, et al. (2004). "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 **363**(9411): 751-756.
- Kang, H. J., H. Y. Lee, et al. (2006). "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 **114**(1 Suppl): I145-151.
- Kawamoto, A., H. C. Gwon, et al. (2001). "Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia." Circulation **103**(5): 634-637.
- Kawamoto, A., T. Tkebuchava, et al. (2003). "Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia." Circulation **107**(3): 461-468.
- Khakoo, A. Y. and T. Finkel (2005). "Endothelial progenitor cells." Annu Rev Med **56**: 79-101.

- Kim, H. K., M. De La Luz Sierra, et al. (2006). "G-CSF down-regulation of CXCR4 expression identified as a mechanism for mobilization of myeloid cells." Blood **108**(3): 812-820.
- Kocher, A. A., M. D. Schuster, et al. (2001). "Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function." Nat Med **7**(4): 430-436.
- Kovacic, J. C., D. W. Muller, et al. (2007). "Actions and therapeutic potential of G-CSF and GM-CSF in cardiovascular disease." J Mol Cell Cardiol **42**(1): 19-33.
- Krakauer, H., M. J. Lin, et al. (2005). "Projected survival benefit as criterion for listing and organ allocation in heart transplantation." J Heart Lung Transplant **24**(6): 680-689.
- Kroll, J. and J. Waltenberger (1999). "A novel function of VEGF receptor-2 (KDR): rapid release of nitric oxide in response to VEGF-A stimulation in endothelial cells." Biochem Biophys Res Commun **265**(3): 636-639.
- Krum, H. (2005). "The Task Force for the diagnosis and treatment of chronic heart failure of the European Society of Cardiology. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure: full text (update 2005)." Eur Heart J **26**(22): 2472; author reply 2473-2474.
- Kuethé, F., H. R. Figulla, et al. (2005). "Treatment with granulocyte colony-stimulating factor for mobilization of bone marrow cells in patients with acute myocardial infarction." Am Heart J **150**(1): 115.
- Kuhlmann, M. T., P. Kirchhof, et al. (2006). "G-CSF/SCF reduces inducible arrhythmias in the infarcted heart potentially via increased connexin43 expression and arteriogenesis." J Exp Med **203**(1): 87-97.
- Kukk, E., A. Lymboussaki, et al. (1996). "VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development." Development **122**(12): 3829-3837.
- Labrosse, B., A. BreLOT, et al. (1998). "Determinants for sensitivity of human immunodeficiency virus coreceptor CXCR4 to the bicyclam AMD3100." J Virol **72**(8): 6381-6388.
- Lagasse, E., J. A. Shizuru, et al. (2001). "Toward regenerative medicine." Immunity **14**(4): 425-436.
- Lapidot, T. and I. Petit (2002). "Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells." Exp Hematol **30**(9): 973-981.
- Larochelle, A., A. Krouse, et al. (2006). "AMD3100 mobilizes hematopoietic stem cells with long-term repopulating capacity in nonhuman primates." Blood **107**(9): 3772-3778.
- Laufs, U., N. Werner, et al. (2004). "Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis." Circulation **109**(2): 220-226.
- Lee, R. J., M. L. Springer, et al. (2000). "VEGF gene delivery to myocardium: deleterious effects of unregulated expression." Circulation **102**(8): 898-901.
- Lee, S. H., P. L. Wolf, et al. (2000). "Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction." N Engl J Med **342**(9): 626-633.

- Lefer, D. J. and D. N. Granger (2000). "Oxidative stress and cardiac disease." Am J Med **109**(4): 315-323.
- Leone, A. M., S. Rutella, et al. (2005). "Mobilization of bone marrow-derived stem cells after myocardial infarction and left ventricular function." Eur Heart J **26**(12): 1196-1204.
- Leone, A. M., S. Rutella, et al. (2008). "Effect of intensive vs standard statin therapy on endothelial progenitor cells and left ventricular function in patients with acute myocardial infarction: Statins for regeneration after acute myocardial infarction and PCI (STRAP) trial." Int J Cardiol **130**(3): 457-462.
- Leor, J., L. Rozen, et al. (2006). "Ex vivo activated human macrophages improve healing, remodeling, and function of the infarcted heart." Circulation **114**(1 Suppl): I94-100.
- Levesque, J. P., J. Hendy, et al. (2003). "Disruption of the CXCR4/CXCL12 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by G-CSF or cyclophosphamide." J Clin Invest **111**(2): 187-196.
- Levesque, J. P., Y. Takamatsu, et al. (2001). "Vascular cell adhesion molecule-1 (CD106) is cleaved by neutrophil proteases in the bone marrow following hematopoietic progenitor cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor." Blood **98**(5): 1289-1297.
- Libby, P., P. M. Ridker, et al. (2002). "Inflammation and atherosclerosis." Circulation **105**(9): 1135-1143.
- Liehn, E. A., O. Postea, et al. (2011). "Repair after myocardial infarction, between fantasy and reality: the role of chemokines." J Am Coll Cardiol **58**(23): 2357-2362.
- Liles, W. C., H. E. Broxmeyer, et al. (2003). "Mobilization of hematopoietic progenitor cells in healthy volunteers by AMD3100, a CXCR4 antagonist." Blood **102**(8): 2728-2730.
- Liles, W. C., E. Rodger, et al. (2005). "Augmented mobilization and collection of CD34+ hematopoietic cells from normal human volunteers stimulated with granulocyte-colony-stimulating factor by single-dose administration of AMD3100, a CXCR4 antagonist." Transfusion **45**(3): 295-300.
- Ling, S., Y. Birnbaum, et al. (2013). "MicroRNA-dependent cross-talk between VEGF and HIF1alpha in the diabetic retina." Cell Signal **25**(12): 2840-2847.
- Lip, G. Y., C. R. Gibbs, et al. (2000). "ABC of heart failure: aetiology." BMJ **320**(7227): 104-107.
- Litt, M. R., R. W. Jeremy, et al. (1989). "Neutrophil depletion limited to reperfusion reduces myocardial infarct size after 90 minutes of ischemia. Evidence for neutrophil-mediated reperfusion injury." Circulation **80**(6): 1816-1827.
- Lopez, J. J., R. J. Laham, et al. (1998). "VEGF administration in chronic myocardial ischemia in pigs." Cardiovasc Res **40**(2): 272-281.
- Losordo, D. W. and S. Dimmeler (2004). "Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease: part II: cell-based therapies." Circulation **109**(22): 2692-2697.
- Lowel, H. and C. Meisinger (2006). "[Epidemiology and demographic evolution exemplified for cardiovascular diseases in Germany]." Med Klin (Munich) **101**(10): 804-811.

- Lusso, P. (2006). "HIV and the chemokine system: 10 years later." EMBO J **25**(3): 447-456.
- Ma, J., J. Ge, et al. (2005). "Time course of myocardial stromal cell-derived factor 1 expression and beneficial effects of intravenously administered bone marrow stem cells in rats with experimental myocardial infarction." Basic Res Cardiol **100**(3): 217-223.
- Macia, E. and P. A. Boyden (2009). "Stem cell therapy is proarrhythmic." Circulation **119**(13): 1814-1823.
- Maglione, D., V. Guerriero, et al. (1991). "Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(20): 9267-9271.
- Martin, C., P. C. Burdon, et al. (2003). "Chemokines acting via CXCR2 and CXCR4 control the release of neutrophils from the bone marrow and their return following senescence." Immunity **19**(4): 583-593.
- Massa, M., V. Rosti, et al. (2005). "Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction." Blood **105**(1): 199-206.
- Massberg, S., I. Konrad, et al. (2006). "Platelets secrete stromal cell-derived factor 1alpha and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo." J Exp Med **203**(5): 1221-1233.
- Mathur, A. and J. F. Martin (2004). "Stem cells and repair of the heart." Lancet **364**(9429): 183-192.
- Menasche, P., A. A. Hagege, et al. (2003). "Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction." J Am Coll Cardiol **41**(7): 1078-1083.
- Michael, L. H., M. L. Entman, et al. (1995). "Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model." Am J Physiol **269**(6 Pt 2): H2147-2154.
- Minatoguchi, S., G. Takemura, et al. (2004). "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 **109**(21): 2572-2580.
- Morimoto, A., Y. Sakata, et al. (1990). "Leucocytosis induced in rabbits by intravenous or central injection of granulocyte colony stimulating factor." J Physiol **426**: 117-126.
- Morita, S., R. L. Kormos, et al. (2000). "Standardized ejection fraction as a parameter of overall ventricular pump function." Jpn Circ J **64**(7): 510-515.
- Neufeld, G., T. Cohen, et al. (1999). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors." FASEB J **13**(1): 9-22.
- Newman, P. J. (1997). "The biology of PECAM-1." J Clin Invest **99**(1): 3-8.
- Nishimura, Y., M. Ii, et al. (2012). "CXCR4 antagonist AMD3100 accelerates impaired wound healing in diabetic mice." J Invest Dermatol **132**(3 Pt 1): 711-720.
- Oddone, A., G. Tommasini, et al. (1977). "[ "Pericarditis epistenocardica" as a marker of extensive myocardial infarction. Clinical, electrocardiographic and enzymatic study (author's transl)]." G Ital Cardiol **7**(8): 760-769.

- Ohtsuka, M., H. Takano, et al. (2004). "Cytokine therapy prevents left ventricular remodeling and dysfunction after myocardial infarction through neovascularization." FASEB J **18**(7): 851-853.
- Olivetti, G., R. Abbi, et al. (1997). "Apoptosis in the failing human heart." N Engl J Med **336**(16): 1131-1141.
- Olivetti, G., R. Ricci, et al. (1986). "Response of the border zone to myocardial infarction in rats." Am J Pathol **125**(3): 476-483.
- Olofsson, B., K. Pajusola, et al. (1996). "Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(6): 2576-2581.
- Olsson, A. K., A. Dimberg, et al. (2006). "VEGF receptor signalling - in control of vascular function." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(5): 359-371.
- Orlic, D., J. M. Hill, et al. (2002). "Stem cells for myocardial regeneration." Circ Res **91**(12): 1092-1102.
- Orlic, D., J. Kajstura, et al. (2001). "Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(18): 10344-10349.
- Ozawa, C. R., A. Banfi, et al. (2004). "Microenvironmental VEGF concentration, not total dose, determines a threshold between normal and aberrant angiogenesis." J Clin Invest **113**(4): 516-527.
- Packer, M., M. R. Bristow, et al. (1996). "The effect of carvedilol on morbidity and mortality in patients with chronic heart failure. U.S. Carvedilol Heart Failure Study Group." N Engl J Med **334**(21): 1349-1355.
- Park, J. E., G. A. Keller, et al. (1993). "The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF." Mol Biol Cell **4**(12): 1317-1326.
- Payne, T. R., H. Oshima, et al. (2007). "A relationship between vascular endothelial growth factor, angiogenesis, and cardiac repair after muscle stem cell transplantation into ischemic hearts." J Am Coll Cardiol **50**(17): 1677-1684.
- Peichev, M., A. J. Naiyer, et al. (2000). "Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors." Blood **95**(3): 952-958.
- Pelosi, E., M. Valtieri, et al. (2002). "Identification of the hemangioblast in postnatal life." Blood **100**(9): 3203-3208.
- Petit, I., M. Szyper-Kravitz, et al. (2002). "G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4." Nat Immunol **3**(7): 687-694.
- Pfeffer, M. A. and E. Braunwald (1990). "Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications." Circulation **81**(4): 1161-1172.
- Pitchford, S. C., R. C. Furze, et al. (2009). "Differential mobilization of subsets of progenitor cells from the bone marrow." Cell Stem Cell **4**(1): 62-72.

- Plendl, J. (2000). "Angiogenesis and vascular regression in the ovary." Anat Histol Embryol **29**(5): 257-266.
- Powell, T. M., J. D. Paul, et al. (2005). "Granulocyte colony-stimulating factor mobilizes functional endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(2): 296-301.
- Puri, M. C., J. Rossant, et al. (1995). "The receptor tyrosine kinase TIE is required for integrity and survival of vascular endothelial cells." EMBO J **14**(23): 5884-5891.
- Rehman, J., J. Li, et al. (2003). "Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors." Circulation **107**(8): 1164-1169.
- Renz-Polster, H., S. Krautzig, et al. (2004). Basislehrbuch Innere Medizin. Elsevier, Urban & Fischer
- Ribatti, D., A. Vacca, et al. (2002). "Cross-talk between hematopoiesis and angiogenesis signaling pathways." Curr Mol Med **2**(6): 537-543.
- Ripa, R. S. (2012). "Granulocyte-colony stimulating factor therapy to induce neovascularization in ischemic heart disease." Dan Med J **59**(3): B4411.
- Ripa, R. S., E. Jorgensen, et al. (2006). "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 **113**(16): 1983-1992.
- Risau, W. (1997). "Mechanisms of angiogenesis." Nature **386**(6626): 671-674.
- Roberts, A. W. (2005). "G-CSF: a key regulator of neutrophil production, but that's not all!" Growth Factors **23**(1): 33-41.
- Roger, V. L., A. S. Go, et al. (2012). "Heart disease and stroke statistics--2012 update: a report from the American Heart Association." Circulation **125**(1): e2-e220.
- Ross, R. (1986). "The pathogenesis of atherosclerosis--an update." N Engl J Med **314**(8): 488-500.
- Ross, R. (1999). "Atherosclerosis--an inflammatory disease." N Engl J Med **340**(2): 115-126.
- Roy, H., S. Bhardwaj, et al. (2006). "Biology of vascular endothelial growth factors." FEBS Lett **580**(12): 2879-2887.
- Salto-Tellez, M., S. Yung Lim, et al. (2004). "Myocardial infarction in the C57BL/6J mouse: a quantifiable and highly reproducible experimental model." Cardiovasc Pathol **13**(2): 91-97.
- Schachinger, V., B. Assmus, et al. (2004). "Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial." J Am Coll Cardiol **44**(8): 1690-1699.
- Schachinger, V., S. Erbs, et al. (2006). "Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction." N Engl J Med **355**(12): 1210-1221.

- Schuster, M. D., A. A. Kocher, et al. (2004). "Myocardial neovascularization by bone marrow angioblasts results in cardiomyocyte regeneration." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **287**(2): H525-532.
- Scott, R. C., J. M. Rosano, et al. (2009). "Targeting VEGF-encapsulated immunoliposomes to MI heart improves vascularity and cardiac function." *FASEB J* **23**(10): 3361-3367.
- Semerad, C. L., M. J. Christopher, et al. (2005). "G-CSF potently inhibits osteoblast activity and CXCL12 mRNA expression in the bone marrow." *Blood* **106**(9): 3020-3027.
- Shalaby, F., J. Rossant, et al. (1995). "Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice." *Nature* **376**(6535): 62-66.
- Shepherd, R. M., B. J. Capoccia, et al. (2006). "Angiogenic cells can be rapidly mobilized and efficiently harvested from the blood following treatment with AMD3100." *Blood* **108**(12): 3662-3667.
- Shi, Q., S. Rafii, et al. (1998). "Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells." *Blood* **92**(2): 362-367.
- Shintani, S., T. Murohara, et al. (2001). "Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction." *Circulation* **103**(23): 2776-2779.
- Sirker, A. A., Z. M. Astroulakis, et al. (2009). "Vascular progenitor cells and translational research: the role of endothelial and smooth muscle progenitor cells in endogenous arterial remodelling in the adult." *Clin Sci (Lond)* **116**(4): 283-299.
- Strydom, H. C. (2000). "Lipid and macrophage accumulations in arteries of children and the development of atherosclerosis." *Am J Clin Nutr* **72**(5 Suppl): 1297S-1306S.
- Statistisches Bundesamt, (2010). Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Krankheitskostenrechnung.
- Statistisches Bundesamt, (2011). Pressemitteilung Nr. 354 vom 23.09.2011. Wiesbaden.
- Steendijk, P., E. Staal, et al. (2001). "Hypertonic saline method accurately determines parallel conductance for dual-field conductance catheter." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **281**(2): H755-763.
- Stein, A., D. Zohlnhöfer, et al. (2010). "Expression of CXCR4, VLA-1, LFA-3 and transducer of ERB in G-CSF-mobilised progenitor cells in acute myocardial infarction." *Thromb Haemost* **103**(3): 638-643.
- Stein, I., M. Neeman, et al. (1995). "Stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by hypoxia and hypoglycemia and coregulation with other ischemia-induced genes." *Mol Cell Biol* **15**(10): 5363-5368.
- Takagawa, J., Y. Zhang, et al. (2007). "Myocardial infarct size measurement in the mouse chronic infarction model: comparison of area- and length-based approaches." *J Appl Physiol* (1985) **102**(6): 2104-2111.
- Takahashi, T., C. Kalka, et al. (1999). "Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization." *Nat Med* **5**(4): 434-438.

Tallquist, M. D., P. Soriano, et al. (1999). "Growth factor signaling pathways in vascular development." Oncogene **18**(55): 7917-7932.

Tang, Y. L., Q. Zhao, et al. (2005). "Paracrine action enhances the effects of autologous mesenchymal stem cell transplantation on vascular regeneration in rat model of myocardial infarction." Ann Thorac Surg **80**(1): 229-236; discussion 236-227.

Tang, Y. L., Q. Zhao, et al. (2004). "Autologous mesenchymal stem cell transplantation induce VEGF and neovascularization in ischemic myocardium." Regul Pept **117**(1): 3-10.

Tatibouet, L., J. Olivier, et al. (1979). "[Secondary pericarditis after myocardial infarction (author's transl)]." Sem Hop **55**(31-32): 1422-1426.

Tischer, E., R. Mitchell, et al. (1991). "The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing." J Biol Chem **266**(18): 11947-11954.

Turner, N. A. and K. E. Porter (2013). "Function and fate of myofibroblasts after myocardial infarction." Fibrogenesis Tissue Repair **6**(1): 5.

Urbanek, K., D. Torella, et al. (2005). "Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(24): 8692-8697.

Urbich, C. and S. Dimmeler (2004). "Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology." Circ Res **95**(4): 343-353.

Valgimigli, M., G. M. Rigolin, et al. (2005). "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 **26**(18): 1838-1845.

Van de Werf, F., J. Bax, et al. (2008). "Management of acute myocardial infarction in patients presenting with persistent ST-segment elevation: the Task Force on the Management of ST-Segment Elevation Acute Myocardial Infarction of the European Society of Cardiology." Eur Heart J **29**(23): 2909-2945.

Van den Borne, S. W., V. A. van de Schans, et al. (2009). "Mouse strain determines the outcome of wound healing after myocardial infarction." Cardiovasc Res **84**(2): 273-282.

Vasa, M., S. Fichtlscherer, et al. (2001). "Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease." Circulation **103**(24): 2885-2890.

Vasa, M., S. Fichtlscherer, et al. (2001). "Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease." Circ Res **89**(1): E1-7.

Velagaleti, R. S., M. J. Pencina, et al. (2008). "Long-term trends in the incidence of heart failure after myocardial infarction." Circulation **118**(20): 2057-2062.

Verdouw, P. D., M. A. van den Doel, et al. (1998). "Animal models in the study of myocardial ischaemia and ischaemic syndromes." Cardiovasc Res **39**(1): 121-135.

von Degenfeld, G., A. Banfi, et al. (2006). "Microenvironmental VEGF distribution is critical for stable and functional vessel growth in ischemia." FASEB J **20**(14): 2657-2659.

- Walter, D. H., K. Rittig, et al. (2002). "Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells." Circulation **105**(25): 3017-3024.
- Wang, G. L., B. H. Jiang, et al. (1995). "Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(12): 5510-5514.
- Wang, H. and J. A. Keiser (1998). "Vascular endothelial growth factor upregulates the expression of matrix metalloproteinases in vascular smooth muscle cells: role of flt-1." Circ Res **83**(8): 832-840.
- Wengner, A. M., S. C. Pitchford, et al. (2008). "The coordinated action of G-CSF and ELR + CXC chemokines in neutrophil mobilization during acute inflammation." Blood **111**(1): 42-49.
- Wienbergen, H., A. K. Gitt, et al. (2005). "[Actual clinical practice of guideline-recommended therapy of acute ST elevation myocardial infarction]." Herz **30**(8): 700-703.
- Wojakowski, W. and M. Tendera (2005). "Mobilization of bone marrow-derived progenitor cells in acute coronary syndromes." Folia Histochem Cytobiol **43**(4): 229-232.
- Wojakowski, W., M. Tendera, et al. (2004). "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 **110**(20): 3213-3220.
- Wollert, K. C. (2008). "Cell therapy for acute myocardial infarction." Curr Opin Pharmacol **8**(2): 202-210.
- Wollert, K. C. and H. Drexler (2005). "Clinical applications of stem cells for the heart." Circ Res **96**(2): 151-163.
- Wollert, K. C. and H. Drexler (2010). "Cell therapy for the treatment of coronary heart disease: a critical appraisal." Nat Rev Cardiol **7**(4): 204-215.
- Wollert, K. C., G. P. Meyer, et al. (2004). "Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial." Lancet **364**(9429): 141-148.
- World Health Organization, (2011). The top 10 causes of death, The 10 leading causes of death by broad income group (2008)
- Yamaguchi, J., K. F. Kusano, et al. (2003). "Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization." Circulation **107**(9): 1322-1328.
- Yoon, C. H., M. Koyanagi, et al. (2010). "Mechanism of improved cardiac function after bone marrow mononuclear cell therapy: role of cardiovascular lineage commitment." Circulation **121**(18): 2001-2011.
- Zachary, I. (2001). "Signaling mechanisms mediating vascular protective actions of vascular endothelial growth factor." Am J Physiol Cell Physiol **280**(6): C1375-1386.
- Zander, R. and S. N. (2002). Stammzellforschung: Diesseits des Rubikon. Deutsches Ärzteblatt **99**(6): A-341 / B-275 / C-258.

Zhang, Y., Y. Adachi, et al. (2006). "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 **16**(2): 367-371.

Ziegler, B. L., M. Valtieri, et al. (1999). "KDR receptor: a key marker defining hematopoietic stem cells." Science **285**(5433): 1553-1558.

Zohlhöfer, D. (2008). "G-CSF for left ventricular recovery after myocardial infarction: is it time to face reality?" Cardiovasc Drugs Ther **22**(5): 343-345.

Zohlhöfer, D., A. Dibra, et al. (2008). "Stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor for myocardial recovery after acute myocardial infarction: a meta-analysis." J Am Coll Cardiol **51**(15): 1429-1437.

Zohlhöfer, D., A. Kastrati, et al. (2007). "Stem cell mobilization by granulocyte-colony-stimulating factor in acute myocardial infarction: lessons from the REVIVAL-2 trial." Nat Clin Pract Cardiovasc Med **4 Suppl 1**: S106-109.

Zohlhöfer, D., I. Ott, et al. (2006). "Stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor in patients with acute myocardial infarction: a randomized controlled trial." JAMA **295**(9): 1003-1010.

Zolotareva, A. G. and M. E. Kogan (1978). "Production of experimental occlusive myocardial infarction in mice." Cor Vasa **20**(4): 308-314.

## **12 PUBLIKATIONSVERZEICHNIS**

Teile dieser Arbeit wurden bereits vorab veröffentlicht:

### **Originalartikel:**

Constantin Rüder, Tobias Haase, Annalena Krost, Nicole Langwieser, Stefanie Böttcher, and Dietlind Zohlnhöfer

“Combinatorial G-CSF/AMD3100 treatment in cardiac repair after myocardial infarction”

PLOS ONE (Publikation am 14.08.2014)

Versuchsplanung:	<u>Annalena Krost</u> , Dietlind Zohlnhöfer, Constantin Rüder
Versuchsdurchführung:	<u>Annalena Krost</u> , Constantin Rüder, Tobias Haase, Nicole Langwieser
Auswertung der Experimente:	<u>Annalena Krost</u> , Constantin Rüder, Tobias Haase, Nicole Langwieser, Stefanie Böttcher, Dietlind Zohlnhöfer
Verfassung des Manuskripts:	Constantin Rüder, Tobias Haase, <u>Annalena Krost</u> , Nicole Langwieser, Stefanie Böttcher, Dietlind Zohlnhöfer

### **Poster:**

Annalena Krost, Constantin Rüder, Nicole Langwieser, Jan Peter, Heinz-Peter Schultheiss, Dietlind Zohlnhöfer-Momm

“Novel mobilization strategies for myocardial regeneration after acute myocardial infarction”

Berlin-Brandenburg School for Regenerative Therapies, PhD Symposium: "Stem cells: Hopes, Fears and Reality", 01.12.2010 - 03.12.2010 Berlin

## **13 DANKSAGUNG**

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Dietlind Zohlnhöfer-Momm für die Bereitstellung des außerordentlich interessanten Themas und für die Betreuung meiner Arbeit im Berlin-Brandenburger Centrum für Regenerative Therapien.

Herrn Prof. Dr. Achim D. Gruber, Ph.D., danke ich sehr herzlich für die Übernahme der Arbeit am veterinärmedizinischen Fachbereich der Freien Universität Berlin sowie für die überaus freundliche und motivierende Unterstützung.

Ich danke Herrn Dr. Constantin Rüder für die Betreuung meiner Arbeit. Vielen Dank für die schöne Zusammenarbeit.

Vielen Dank auch an Herrn Dr. Tobias Haase, der mir mit seinen wissenschaftlichen Ratschlägen und seiner fachlichen Kompetenz stets zur Seite stand.

Frau Dr. Nicole Langwieser danke ich sehr für die Hilfe bei den tierexperimentellen Arbeiten, insbesondere für Ihre Unterstützung beim Erlernen der mikrochirurgischen Tätigkeiten.

Den Tierpflegern des FEM danke ich für die fürsorgliche Versorgung und Pflege der Mäuse.

Herrn Jan Peter danke ich für die technische Hilfe bei der Durchführung der Versuche.

Frau Dr. Steffanie Böttcher, vielen Dank für die wertvollen Tipps und die schönen Stunden im CBF.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich von ganzem Herzen für die bedingungslose Liebe, den Rückhalt, die motivierenden Gespräche und die fortwährende Unterstützung.

## **14 SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG**

Hiermit bestätige ich, Annalena Krost, geboren am 15.08.1984 in Wiesbaden (Hessen), dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Wiesbaden, den 20.11.2015

Annalena Krost