

Aus der Klinik für Kardiovaskuläre Chirurgie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

## DISSERTATION

# Intravenöse Knochenmarkstammzell-Transplantation im chronischen Herzinsuffizienzmodell der Ratte

Zur Erlangung des akademischen Grades Doctor Medicinae

Vorgelegt der medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von  
Georg Christoph Heinze  
aus  
Bonn

Gutachter: 1. Univ.-Prof. Dr. med. W. Konertz  
2. Univ.-Prof. Dr. med. F. X. Kleber  
3. Priv.-Doz. Dr. med. A. C. Borges

Datum der Promotion: 18.11.2011

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>5</b>
<b>1.1</b>	<b>Herzinsuffizienz</b>	<b>5</b>
1.1.1	Begriffsbestimmung	5
1.1.2	Ätiologie	5
1.1.3	Pathophysiologie	6
1.1.4	Diagnostische Verfahren	7
1.1.5	Epidemiologie	9
1.1.6	Therapieoptionen	10
1.1.6.1	Kausale Therapie	10
1.1.6.2	Pharmakologische Therapie	11
1.1.6.3	Chirurgische Therapie	12
<b>1.2</b>	<b>Zelltransplantation</b>	<b>14</b>
1.2.1	Myokardiale Regeneration	14
1.2.2	Zelltypen	15
1.2.2.1	Zellen kontraktile und embryonale Ursprungs	15
1.2.2.2	Knochenmarkstammzellen (KMS)	16
1.2.3	Klinische Studien	17
<b>2</b>	<b>ENTWICKLUNG DER FRAGESTELLUNGEN</b>	<b>19</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>20</b>
<b>3.1</b>	<b>Materialien</b>	<b>20</b>
3.1.1	Versuchstiere	20
3.1.2	Chirurgische Instrumente	20
<b>3.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>21</b>
3.2.1	Versuchsaufbau	21
3.2.2	Versuchsdurchführung	23
3.2.2.1	Anästhesie	23
3.2.2.2	Induktion des Myokardinfarktes	24
3.2.2.3	Gewinnung der KMS	25
3.2.2.4	Transplantation	26
3.2.2.5	Explantation	26
3.2.3	Echokardiographische Untersuchungen	27
3.2.3.1	Durchführung und Apparatur	27
3.2.3.2	Standardechokardiographie	28
3.2.3.3	Gewebe-Doppler Echokardiographie (TDI)	29
3.2.3.4	2D-Strain-Analyse	30

3.2.4	Histologie und Pathologie .....	31
3.2.4.1	Aufbereitung der Herzen .....	31
3.2.4.2	Färbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE) .....	32
3.2.4.3	Immunhistochemische Färbung mit dem monoklonalen S100-Antikörper.....	32
3.2.4.4	Infarktgrößenbestimmung mit der Fiji-Software .....	32
3.2.5	Statistische Methoden .....	34
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>36</b>
<b>4.1</b>	<b>Tierbezogene Daten.....</b>	<b>36</b>
<b>4.2</b>	<b>Echokardiographische Daten .....</b>	<b>37</b>
4.2.1	Ejektionsfraktion (EF) und Fractional Shortening (FS) .....	37
4.2.2	Intrakardiale Diameter und Herzwandmaße .....	38
4.2.3	Daten aus der Gewebe-Doppler Echokardiographie (TDI) .....	41
4.2.4	Daten aus der 2D-Strain-Analyse .....	44
<b>4.3</b>	<b>Histologische Daten .....</b>	<b>49</b>
4.3.1	Infarktgröße .....	49
4.3.2	Kapillareinsprossung.....	50
4.3.3	Chondroide Metaplasie .....	52
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>54</b>
5.1	Untersuchungsansatz .....	54
5.2	Kardiale Stammzelltherapie – der intravenöse Applikationsweg .....	56
5.3	Moderne Echokardiographie im Herzinsuffizienz-Rattenmodell .....	58
5.4	Ventrikelfunktion und Morphologie.....	61
5.5	Histopathologische Phänomene .....	64
5.6	Limitierungen der Studie .....	65
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK .....</b>	<b>67</b>
<b>7</b>	<b>VERZEICHNISSE.....</b>	<b>69</b>
7.1	Literatur .....	69
7.2	Abkürzungen .....	78
7.3	Chemikalien.....	79
7.3	Geräte und Materialien .....	79
<b>8</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>81</b>
<b>9</b>	<b>PUBLIKATION .....</b>	<b>82</b>
<b>10</b>	<b>CURRICULUM VITAE.....</b>	<b>83</b>
<b>11</b>	<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....</b>	<b>84</b>

# **1 Einleitung**

## **1.1 Herzinsuffizienz**

### **1.1.1 Begriffsbestimmung**

Nach den 2008 erneuerten Leitlinien der European Society of Cardiology (Task Force on Heart Failure) definiert sich eine Herzinsuffizienz als Kombination aus in Ruhe oder unter Belastung auftretenden Symptomen, wie Kurzatmigkeit, eingeschränkte körperliche Belastbarkeit oder Ödembildung sowie dem Vorhandensein einer objektiv nachgewiesenen morphologischen oder funktionellen Einschränkung des Herzens (Dickstein, et al., 2008). Während in der Vergangenheit Herzinsuffizienz lange Zeit lediglich als reines Pumpversagen und damit als Unvermögen des Herzens definiert wurde, in ausreichendem Maße Blut bis in die peripheren Organe des Körpers zu fördern, ist es in den letzten Jahren in der Forschung zu einer neuen Bewertung des Krankheitsbildes gekommen: Herzinsuffizienz ist danach eher durch einen dynamischen Verlauf gekennzeichnet und weniger auf das chronische Endstadium beschränkt. Veränderungen im Therapieregime sowie die stetige Suche nach weiteren therapeutischen Optionen sind daher in der heutigen Medizin Gegenstand aktueller Studien.

Je nach Ursprung unterscheidet man zwischen Linksherzinsuffizienz, Rechtsherzinsuffizienz oder biventrikulärer (globaler) Herzinsuffizienz, je nach Mechanismus zwischen diastolischer Ventrikelfüllungsbehinderung und systolischer Ventrikelkontraktionsstörung. Nach Verlauf sollte zwischen akuter, zum Beispiel nach einem Herzinfarkt, und chronischer Manifestation unterschieden werden, wobei akute in chronische Formen übergehen können. Der klinische Schweregrad wird anhand von Leitsymptomen international nach Stadien I-IV der New York Heart Association (NYHA) eingeteilt, wobei das Stadium I keine Einschränkung der körperlichen Leistung darstellt; Stadium IV bedeutet das Vorhandensein von Symptomen bereits im Ruhezustand (Chacko, 1995).

### **1.1.2 Ätiologie**

Herzinsuffizienz kann prinzipiell Folge jeder Herzerkrankung sein (Francis and Tang, 2003). Häufige Ursachen sind ischämische Zustände, etwa bei einem Herzinfarkt

infolge einer koronaren Herzerkrankung, druckbelastende Situationen, wie sie bei einem arteriellen Hypertonus oder einer Herzklappenstenose vorkommen oder aber eine Volumenbelastung, wie bei Herzklappeninsuffizienzen. Selten können auch eine vorangegangene Myokarditis, toxische Einwirkungen oder Arrhythmien eine Herzinsuffizienz zur Folge haben. Eine isolierte Rechtsherzinsuffizienz kann zum Beispiel als Folge einer pulmonalen Hypertonie auftreten. Dieser liegt im klinischen Alltag häufig die unter Rauchern verbreitete chronisch obstruktive Lungenerkrankung ursächlich zugrunde.

Diagnostische Methoden und Therapiestrategien sind unter anderem davon abhängig, ob eine koronare Herzerkrankung (KHK) als mögliche Ursache für die Herzinsuffizienz wahrscheinlich ist. Aktuelle Studien zeigen, dass die KHK mit steigender Tendenz häufigster Verursacher einer Linksherzinsuffizienz ist (54-70%); bei 35-52% wird diese von einer arteriellen Hypertonie begleitet (Cleland, et al., 2003; McMurray and Stewart, 2000). In den 1950-60er Jahren wurde bei der Framingham-Population noch die arterielle Hypertonie mit 70% als Hauptverursacher der Herzinsuffizienz genannt. Die Evaluation der Diagnose KHK beginnt klinisch in der Regel mit der Erstellung eines individuellen Risikoprofils anhand der bekannten Faktoren Rauchen, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie, arterielle Hypertonie und genetische Disposition. Seit einigen Jahren gewinnt auch der Nachweis einer Homocysteinämie als Risikofaktor an Bedeutung und wird wissenschaftlich weiter rege diskutiert (Berger, 2003; Cattaneo, 2003).

### **1.1.3 Pathophysiologie**

Körpereigene Kompensationsmechanismen, wie die neuroendokrine Aktivierung des sympathischen Nervensystems, des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) und des natriuretischen Peptidsystems können eine Herzinsuffizienz über viele Jahre symptomfrei halten (Shah, et al., 2001). Die genannten Regulationskreisläufe verlieren jedoch im Verlauf der Erkrankung ihre Wirksamkeit; durch die dauerhafte sympathische Aktivierung des vegetativen Nervensystems wird eine Katecholaminresistenz hervorgerufen, die wiederum für eine erhöhte Katecholaminausschüttung verantwortlich ist. Der anfangs positive Effekt des erhöhten peripheren Gefäßtonus resultiert in der permanenten Dominanz vasokonstriktorischer Systeme und führt längerfristig durch die Erhöhung der Vor-

und Nachlast zwangsläufig zur Schädigung des Herzens (Heyen, et al., 2002). Vielseitige Umbauprozesse, vor allem im Bereich der extrazellulären Matrix der Myokardzellen, werden unter dem Begriff Remodeling zusammengefasst und bilden die morphologische Grundlage der Herzinsuffizienz (Cohn, et al., 2000; Pauschinger, et al., 2002). Die Bewertung dieser Vorgänge auf Molekularebene ist zur Zeit noch in der Diskussion. Die Wissenschaft geht jedoch davon aus, dass die Veränderung in Größe, Form und Funktion des Herzens in nicht unerheblichem Maße auf das kardiale Remodeling zurückzuführen ist. Die Hypertrophie der Myokardzellen ist zum einen durch Ausschüttung von Wachstumsfaktoren auf zellulärer Rezeptorebene Bestandteil dieses Mechanismus, zum anderen natürliche Folge der persistierenden mechanischen Überbelastung. Einen weiteren Schutzmechanismus bildet die temporäre Erhöhung des diastolischen Füllungsvolumens. Hierbei kommt es zu einer Überdehnung des Myokards in der diastolischen Phase, was zunächst eine Zunahme der Faserspannung und folglich eine Erhöhung des Schlagvolumens bewirkt, auch bekannt als Frank-Starling-Mechanismus. Dieser wird jedoch durch die kontinuierliche Abnahme der kardialen Pumpfunktion in seiner Wirkung deutlich eingeschränkt. Das führt dazu, dass die Dilatation des Ventrikels weiter zunimmt, was nach dem LaPlace'schen Gesetz auch die Wandspannung noch weiter steigen lässt. Alle genannten körpereigenen Kompensationsmechanismen erhöhen den myokardialen Sauerstoffverbrauch und summieren sich bei fehlender Behandlung schließlich zum Verlust der kardialen Funktion.

#### **1.1.4 Diagnostische Verfahren**

Für die Diagnose einer Herzinsuffizienz müssen per definitionem Symptome bestehen und der objektive Nachweis einer kardialen Dysfunktion, etwa mittels einer Echokardiographie oder einer Herzkatheter-Untersuchung, erfolgen. Veränderungen im Elektrokardiogramm können ursächlich zugrunde liegende Faktoren (Myokardinfarkt, Hypertrophie) offenbaren. Eine Röntgen-Thorax-Aufnahme zeigt eine eventuelle Vergrößerung des Herzens, Pleuraergüsse oder pulmonale Stauungszeichen. Neben den standardisierten Laborparametern hat in den letzten Jahren die Bedeutung kardialer Biomarker, insbesondere die Verwendung von NT-proBNP, für die Erkennung der Herzinsuffizienz stetig zugenommen. Auch für den Ausschluss und als Verlaufsparemeter der Erkrankung kann der Marker aufgrund

des hohen negativ-prädiktiven Wertes verwendet werden (de Lemos, et al., 2003; Wu, et al., 2003). Die Durchführung einer Koronarangiographie zur Klärung der ursächlichen Ätiologie steht aufgrund der Invasivität am Ende der elektiven Diagnostik. Das Vorliegen von Angina pectoris oder eine kardiale Dekompensation, zum Beispiel im Rahmen eines Myokardinfarktes, bedingt jedoch eine beschleunigte invasive Diagnostik. Bestätigt sich der Verdacht, dass eine KHK ursächlich für eine Herzinsuffizienz ist, spricht man auch von einer ischämischen Kardiomyopathie.

Während die Magnetresonanztomographie in der Diagnostik eine eher untergeordnete Rolle einnimmt, gewinnt die Computertomographie mit den aktuellen technischen Verbesserungen der Untersuchungsgeräte an Bedeutung. Differenzierte morphologische Beurteilungen bei Klappenerkrankungen, aber auch Diagnose, Ausschluss und Beurteilung der koronaren Herzerkrankung, gehören zum Spektrum der modernen Radiologie (Raggi and Berman, 2005).

Wegweisend in Diagnostik und Differenzierung einer kardialen Dysfunktion ist heute sicherlich die Echokardiographie. Auch hier hat die Technik in den letzten 30 Jahren Fortschritte gemacht. Die Echokardiographie ist inzwischen eine der am häufigsten angewandten Methoden in der Kardiologie. Nicht invasiv und ohne Verwendung ionisierender Strahlen ist sie biologisch und ethisch unbedenklich und gerade im Hinblick auf die bereits erwähnte Dynamik beliebig oft zur Beurteilung des Krankheitsverlaufes einsetzbar. In der transthorakalen Echokardiographie (TTE) werden Parameter wie Herzhöhlengröße, Wanddicke und Wandbewegungsstörungen ermittelt. Die Bestimmung der globalen und regionalen rechts- und linksventrikulären Funktion lässt objektive Aussagen zur kardialen Situation zu. Morphologie und Funktion der Herzklappen können differenziert beurteilt werden (Vitiendiagnostik). Neben den bewährten zweidimensionalen und Motion-Mode-Einstellungen (M-Mode) hat sich in jüngerer Zeit unter anderem die Gewebe-Doppler-Echokardiographie (Tissue Doppler Imaging; TDI) etabliert. Eine Modifizierung der Filtereinstellungen ermöglicht hierbei die genaue Bestimmung systolischer und diastolischer Wandbewegungsgeschwindigkeiten; dies erlaubt eine sensitive Beurteilung kardiomyopathischer Wandbewegungsstörungen und somit den Nachweis auch kleiner ischämischer Myokardbereiche oder Infarktareale (Trambaiolo, et al., 2001; Waggoner and Bierig, 2001). Basierend auf dieser Technik wurde das Strain/Strain-Rate Imaging (SRI) entwickelt, das eine Aussage über die regionale Verformung des Herzmuskels in Abhängigkeit zur Wandbewegungs-

geschwindigkeit ermöglicht. Diese Methode erfordert allerdings eine zeitaufwendige offline-Nachbearbeitung und ist stark schallwinkelabhängig (Gilman, et al., 2004; Hoffmann, 2002). Gegenstand der aktuellen Wissenschaft ist die Analyse im 2D-Strain-Verfahren, bei der durch die Verfolgung von akustischen Markern anhand der Graupunkt-Analyse, dem so genannten speckle tracking, aus dem 2D-Bild die Bestimmung der Parameter Geschwindigkeit, Strain und Strain Rate durchgeführt werden kann. Damit ist eine sehr genaue Analyse der regionalen Kontraktilität und folglich die präzise Beurteilung der Funktion beider Ventrikel auch bei vergrößerten Herzen winkelunabhängig ohne aufwendige Bildnachbearbeitung möglich (Amundsen, et al., 2006).

### **1.1.5 Epidemiologie**

In Westeuropa wird die Zahl herzinsuffizienter Patienten auf 1,3 Millionen geschätzt (Cleland, et al., 2001). Die Prävalenz und Inzidenz sind altersabhängig; zwischen 45 und 55 Jahren geht man von weniger als 1% der Bevölkerung aus, zwischen dem 65. und 75. Lebensjahr steigert sich die Häufigkeit auf 2-5%; bei den über 80-Jährigen leiden ca. 10% der Population an einer Herzinsuffizienz (McMurray and Stewart, 2000). Männer sind in einem Verhältnis von 1,5:1 deutlich häufiger betroffen als Frauen. Diese Tatsache ist auf die bei Männern vor allem in jüngeren Jahren häufiger auftretende KHK zurückzuführen. Im Jahr 2006 wurden in der Bundesrepublik Deutschland insgesamt 17 Millionen Patientinnen und Patienten im Krankenhaus vollstationär behandelt. Krankheitsbedingt war hiervon die Herzinsuffizienz mit 317 000 Fällen der häufigste Grund für einen stationären Krankenhausaufenthalt (Statistisches Bundesamt, 2006). Die Kosten belaufen sich auf 1-2% der Gesamtausgaben für das Gesundheitswesen. Nach einer Hospitalisierung aufgrund von Herzinsuffizienz werden ca. 45% der Patienten innerhalb eines Jahres erneut eingewiesen, 15% mindestens zwei weitere Male (Swedberg, et al., 2005). Die steigende Alterserwartung sowie Verbesserungen in Diagnostik und Therapie lassen die Inzidenz der chronischen Herzinsuffizienz vor allen Dingen im hohen Alter weiter zunehmen. Aufgrund zusätzlicher kostenintensiver Behandlungskonzepte steigen die Kosten mit dem Vorhandensein von assoziierten Begleiterkrankungen, wie Diabetes mellitus oder Niereninsuffizienz. Das bedeutet eine immense wirtschaftliche Belastung für die Gesundheitssysteme

und akzentuiert den Bedarf an kostengünstigen Therapiestrategien (Berry, et al., 2001).

Die ischämische Kardiomyopathie als Hauptverursacher der chronischen Herzinsuffizienz war im Jahr 2004 für 10% der in Deutschland registrierten Todesfälle verantwortlich (Gesundheitsberichterstattung des Bundes, 2004). Nach Erstdiagnose einer Herzinsuffizienz, insbesondere nach dem Auftreten eines akuten kardialen Ereignisses bzw. einer Dekompensation, ist die Mortalität in den ersten Wochen besonders hoch (Cowie, et al., 2000).

Der Lebenswandel der Menschen in den westlichen Industrienationen wird für das gehäufte Auftreten oben genannter Erkrankungen verantwortlich gemacht. In südlichen Regionen mit einer anders strukturierten Lebensweise scheint die Herzinsuffizienz weniger häufig vorzukommen. Als Grund dafür werden unter anderem gravierende Unterschiede in der Ernährung diskutiert (mediterrane Ernährung). Die Dominanz von rotem Fleisch und tierischen Fetten gegenüber Obst, Gemüse und Hochseefisch begünstigt das Vorkommen von Krankheitsbildern, wie arteriellem Hypertonus, Diabetes mellitus oder Hypercholesterinämie, die an der Entstehung einer Herzinsuffizienz beteiligt sein können (Kris-Etherton, et al., 2001).

## **1.1.6 Therapieoptionen**

### **1.1.6.1 Kausale Therapie**

Die Prävention und die primäre, nicht-medikamentöse Therapie einer Herzinsuffizienz beginnen stets mit der Suche und der konsequenten Behandlung etwaiger kausaler Erkrankungen. Im Fokus steht hierbei, insbesondere im Hinblick auf die Prävention, die KHK mit ihren bekannten Risikofaktoren arterielle Hypertonie, Hyperlipidämie, Diabetes mellitus, Rauchen und genetische Disposition. Der Stellenwert der positiven Beeinflussung dieser Risikofaktoren, wenn möglich auch medikamentös, ist seit den 1990er Jahren unumstritten (Grundy, et al., 1998). Bei Nachweis eines bereits vorhandenen pathologischen Zustandes sollte dieser, wenn möglich, ursächlich behoben werden. Das bedeutet im Einzelfall die katheterinterventionelle oder chirurgische Behebung von Koronarstenosen oder Herzklappenvitien sowie die rasche Revaskularisation nach einem Myokardinfarkt. Eventuell vorhandene Herzrhythmusstörungen wirken sich ungünstig auf die Hämodynamik aus und beeinflussen dadurch den Verlauf einer Herzinsuffizienz

negativ. Daher sollte auch hier möglichst eine medikamentöse oder elektrische Kardioversion in einen stabilen Sinusrhythmus angestrebt werden. Ist diese nicht erfolgreich, gibt es seit einiger Zeit die Methode der kardialen Resynchronisationstherapie. Diese eröffnet die Möglichkeit, eine Asynchronizität mit Hilfe eines Herzschrittmachers durch eine spezielle biventrikuläre Stimulation zu vermindern (Abraham, et al., 2002). Das Vorgehen kann bei entsprechender Indikation (stark eingeschränkte Pumpfunktion, überlebter Herz-Kreislaufstillstand) mit der Implantation eines Defibrillators (ICD) kombiniert werden (Tebbenjohanns, et al., 2002).

#### **1.1.6.2 Pharmakologische Therapie**

Angiotensin-Converting-Enzyme-Hemmer (ACE-Hemmer) sind der Grundstein der medikamentösen Therapie. Sie verbessern die Belastungstoleranz und die Prognose unabhängig von der Symptomatik (NYHA I-IV), mindern die Hospitalisierungsrate und reduzieren die Mortalität signifikant, was für Captopril und Enalapril in großen Multicenterstudien hinreichend belegt wurde (The CONSENSUS Trial Study Group, 1987; The SOLVD Investigators, 1991; Flather, et al., 2000). Insbesondere nach Herzinfarkt ist die Gabe von ACE-Hemmern nach Erkenntnissen aus der SAVE Studie indiziert (Hall, et al., 1997; St John Sutton, et al., 1997). Durch die Hemmung des RAAS und die Verstärkung der Kinin-vermittelten Prostaglandin-Synthese wird eine Verringerung der linksventrikulären Dilatation, der mykardialen Hypertrophie und des kardialen Remodeling erreicht (Gainer, et al., 1998).

Beta-Adrenozeptor-Blocker werden als ergänzende Therapie ab NYHA-Stadium II empfohlen. Für Carvedilol und Metoprolol ist eine Senkung der Gesamtmortalität, der Inzidenz des plötzlichen Herztodes und der Mortalität aufgrund des Fortschreitens der Herzinsuffizienz unter anderem in der COPERNICUS-Studie nachgewiesen (Hjalmarson, et al., 2000; Krum, et al., 2003; Packer, et al., 2001). Es zeigte sich zudem, dass die Gabe von Beta-Blockern auch im fortgeschrittenen Stadium NYHA IV günstig ist. Die dauerhafte Aktivierung des sympathischen Nervensystems beeinflusst die Progression der kardialen Dysfunktion entscheidend. Eine Blockierung dieser Effekte trägt maßgeblich zu den oben genannten Ergebnissen bei und bewirkt bei einer zusätzlich vorhandenen KHK eine verminderte Wahrscheinlichkeit akuter ischämischer Ereignisse.

Angiotensin-II-Rezeptor-1-Blocker (AT1-Blocker), verschiedene Diuretika und Herzglykoside sind weitere Medikamente zur Behandlung der akuten oder chronischen Herzinsuffizienz. Ihre Wirksamkeit wurde ebenfalls in zahlreichen groß angelegten Multicenter-Studien mehrfach belegt (The Digitalis Investigation Group, 1997; Cosin and Diez, 2002; McMurray, et al., 2003). Es existieren differenzierte Therapieempfehlungen der European Society of Cardiology, die sich eng an die Symptom-Stadieneinteilung der NYHA anlehnen. Die früher gängige Gabe von Calcium-Antagonisten ist nach Studien in den 1990er Jahren unter Umständen sogar mit einer Erhöhung der Letalität assoziiert und daher kontraindiziert (The Danish Verapamil Infarction Trial II -- DAVIT II, 1990; Goldstein, et al., 1991).

### **1.1.6.3 Chirurgische Therapie**

Die Chirurgie bietet multiple, partiell kurative und palliative Ansätze, steht jedoch aufgrund des Risikos eines herzchirurgischen Eingriffs in der Regel erst nach dem Ausschöpfen der bereits beschriebenen konventionellen Therapiemethoden zur Verfügung.

Nach den experimentellen Vorarbeiten von Shumway 1960 und Hardy 1964 gelang dem Südafrikaner Barnard 1967 die erste erfolgreiche Herztransplantation. In den 1970er Jahren blieb das Verfahren aufgrund unzureichender Möglichkeiten der Immunsuppression auf nur wenige Transplantationen beschränkt. Erst seit der Entdeckung des Ciclosporin A 1981 hat sich die Methode flächenübergreifend und nachhaltig durchgesetzt (Reitz, et al., 1981). Bei unter maximaler konventioneller Therapie symptomatischen Patienten (NYHA III-IV) ist für die Herztransplantation eine Verbesserung der Überlebensrate, Belastbarkeit und Lebensqualität nachgewiesen. Nach dem aktuellen Report der International Society for Heart and Lung Transplantation beträgt die 5-Jahre-Überlebensrate 75-80%; nach 15 Jahren reduzieren sich die Überlebenschancen auf 35-40% (Stehlik, et al., 2010). Heute steht die Medizin aufgrund fehlender Spendebereitschaft und zunehmendem Bedarf vor dem Problem der Organknappheit. Die Zahl gemeldeter Patienten nimmt kontinuierlich zu, während die Zahl der Transplantationen seit den 1990er Jahren in etwa stabil bleibt; die längere Wartezeit führt zwangsläufig zu einer erhöhten Sterblichkeit (Deng, et al., 2000). Hinzu kommt, dass eine Reihe von Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz nicht für eine Transplantation geeignet ist. Hierbei ist vor allem das durch den Fortschritt in der konservativen Therapie erreichte höhere

Durchschnittsalter von Gewicht. Gravierende Begleiterkrankungen, aber auch die fehlende psychische Motivation, Compliance und Stabilität im familiären/sozialen Umfeld, stehen weiterhin der Erwägung einer Transplantation entgegen.

Mechanische, ventrikuläre Unterstützungssysteme (Assist Devices) können die kardiale Funktion zeitweise vollständig oder partiell ersetzen (Frazier and Macris, 1994). Diese Therapiemöglichkeit wird klinisch im Hinblick auf die lange Wartezeit vor einer Herztransplantation (bridge to transplant) vielfach erfolgreich genutzt. Weiterhin kann die Implantation eines Assist Devices zum Beispiel im Rahmen akuter kardialer Ereignisse dem geschädigten Myokard die Möglichkeit zur Regeneration (bridge to recovery) bieten. Überbrückungszeiträume von mehreren Monaten bis zu einigen Jahren sind möglich (Dohmen, et al., 1999; Piccione, 1997). Für längere Zeit komplett implantierbare Systeme, möglicherweise als finale, eigenständige Therapieoption (destiny-Therapie), sind daher zunehmend Gegenstand auch experimenteller Forschung (Linneweber, et al., 2004). Assist Systeme sind allerdings bis heute mit einer hohen Komplikationsrate behaftet; das Auftreten von Infektionen, Blutungen und Thromboembolien nimmt häufig einen letalen Verlauf (el-Banayosy, et al., 1997).

Eine erstmals 1994 von Batista durchgeführte und nach ihm benannte Operation beinhaltet eine partielle linksseitige Ventrikelresektion und hat bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie eine Verbesserung der Pumpfunktion und der klinischen Symptomatik zur Folge (Batista, et al., 1996; Konertz, et al., 1999). Durch die ventrikuläre Volumenreduktion wird eine Reduktion der Wandspannung in dem verkleinerten Ventrikel erreicht. Aufgrund der hohen postoperativen Morbidität und Letalität, insbesondere durch das Auftreten maligner ventrikulärer Herzrhythmusstörungen, wich die anfängliche Euphorie in Bezug auf dieses Verfahren (Cury, et al., 2000; Franco-Cereceda, et al., 2001).

Die aktive/dynamische Kardiomyoplastie wurde erstmalig 1985 von Carpentier durchgeführt. Hierbei gelang es, den linken Musculus latissimus dorsi unter Erhalt des Nerven- und Gefäßpedikels um den Herzmuskel zu legen und mittels Schrittmacherelektroden herzsynchron zu stimulieren (Carpentier and Chachques, 1985). Wegen des im Vergleich zu Kunstherzsystemen ausbleibenden Bedarfs der externen Energiezufuhr und des fehlenden Kontaktes von Blut mit Fremdoberflächen (Thromboembolierisiko) galt dieses Verfahren in den 1990er Jahren als vielversprechend und wurde stetig weiter entwickelt (Carpentier, et al., 1993;

Jondeau, et al., 1995). Die in Verlaufskontrollen festgestellte funktionelle Verbesserung korrelierte mit der gesteigerten Leistungsfähigkeit, über die Patienten berichteten. Dies stand jedoch im Gegensatz zu den veröffentlichten hämodynamischen Parametern verschiedener Studien (el Oakley and Jarvis, 1994; Furnary, et al., 1996). Einige Arbeitsgruppen berichteten auch über eine Fibrosierung des Musculus latissimus dorsi aufgrund dessen kontinuierlicher Stimulation (Moreira, et al., 1995). Insgesamt stellten die Ergebnisse heraus, dass der positive Effekt des Aufhaltens der fortschreitenden Ventrikeldilatation entscheidend in der passiven Ummantelung des Herzmuskels gründet.

Aus den Erfahrungen der aktiven Kardiomyoplastie wurde die Idee einer passiven Kardiomyoplastie entwickelt, wonach das insuffiziente, dilatierende Herz mit einem synthetischen, biokompatiblen Netz umhüllt wird. Das Operationsverfahren wird im Vergleich zu den oben genannten Eingriffen deutlich vereinfacht; damit reduziert sich das Operationsrisiko. In ersten Studien wurden nach der Implantation des Acorn® Cardiac Support Devices (ACSD) myokardiale Prozesse beobachtet, welche durch eine Abnahme des linksventrikulären Durchmessers, eine Zunahme der Ejektionsfraktion und eine Verbesserung der NYHA-Klasse im Sinne eines Reverse Remodeling interpretiert werden können (Konertz, et al., 2001; Sabbah, 2004). Zur abschließenden Beurteilung dieses Verfahrens müssen die Ergebnisse von zur Zeit in Europa und in den USA laufenden Langzeitstudien abgewartet werden.

Nach den strengen Kriterien evidenzbasierter Medizin erreichen die genannten chirurgischen Therapieansätze insgesamt eher geringe Empfehlungsstufen und sind mit Problemen wie Organknappheit bei der Herztransplantation und dem Risiko perioperativer Komplikationen behaftet. Hinzu kommt die intensive Kostenbelastung und damit der Faktor der Wirtschaftlichkeit.

## **1.2 Zelltransplantation**

### **1.2.1 Myokardiale Regeneration**

Noch bis vor wenigen Jahren galt es als erwiesen, dass Regeneration untergegangenen körperlichen Gewebes nur in Organen mit so genanntem mitotischen Gewebe möglich sei. Organe mit hohem Anteil dieses Gewebes und einer damit verbundenen lebenslangen Fähigkeit zur Regeneration sind zum Beispiel die Haut, der Darm oder das Knochenmark. Eine begrenzte Fähigkeit zur

Geweberegeneration aufgrund eines geringeren Zellumsatzes (fakultativ mitotisch) ist etwa für Leber und Niere nachgewiesen. Organe wie das Herz oder das Gehirn gelten als postmitotische Gewebe und seien somit nicht befähigt zur Regeneration. Gegen Ende der 1990er Jahre erschienen dann vielversprechende Publikationen, die die Mitosefähigkeit einzelner ausdifferenzierter Myozyten im Herzen belegen (Anversa and Kajstura, 1998; Beltrami, et al., 2001; Kajstura, et al., 1998). Danach ist davon auszugehen, dass Kardiomyoblasten beziehungsweise adulte Stammzellen in speziellen Nischen des Herzmuskels lebenslang vorhanden sind. Im gesunden Herzen befinden sich diese in einer Art Ruheposition; im Falle einer Schädigung des Herzmuskels, wie etwa einer Kardiomyopathie oder Infarkt Narbe, übernehmen die Zellen ihre Funktion durch Steigerung des mitotischen Zellumsatzes (Beltrami, et al., 2003; Nadal-Ginard and Anversa, 2002). Der neu beschriebene Effekt der myokardialen Regeneration im Falle einer manifesten Kardiomyopathie ist verschwindend gering und somit lediglich im Stande, den natürlichen Zelluntergang eines gesunden Herzens zu kompensieren. Der Ansatz, untergegangenes Myokardgewebe mittels Zelltherapie/-transplantation zu ersetzen, ist daher von medizinischer Bedeutung.

## **1.2.2 Zelltypen**

### **1.2.2.1 Zellen kontraktilen und embryonalen Ursprungs**

Zur Regeneration myokardialen Gewebes schien zunächst die Verwendung von foetalen Kardiomyozyten nahe liegend. So konnte in einigen Studien in den 1990er Jahren die Wirksamkeit im Tiermodell sowohl morphologisch als auch funktionell nachgewiesen werden (Li, et al., 1996; Scorsin, et al., 1997). Aufgrund ethischer Bedenken wegen der foetalen Herkunft der Zellen, der eingeschränkten Verfügbarkeit und nicht zuletzt der Notwendigkeit einer Immunsuppression zur Vermeidung einer möglichen Abstoßungsreaktion spielt dieser Zelltyp hinsichtlich der eingeschränkten Aussicht auf klinische Verwendung heute keine wissenschaftliche Rolle mehr.

Skeletale Myoblasten, auch Satellitenzellen genannt, sind Vorläuferzellen skeletaler Muskelfasern und als residente Zellen zur Genüge in Skelettmuskelfasern vorhanden. Dieser Vorteil der autologen Verfügbarkeit initiierte weitere tierexperimentelle Untersuchungen, in denen positive Effekte - heute unter dem

Begriff reverse Remodeling zusammengefasst – nachgewiesen werden konnten (Menasche, et al., 2001; Pouzet, et al., 2001). Nachdem sich Berichte über das Auftreten von malignen Arrhythmien nach Transplantation skeletaler Myoblasten häuften (Abraham, et al., 2005; Menasche, et al., 2003), wurde die Erforschung auch dieser Zellen nicht weiter verfolgt.

Unter der Annahme, dass die Neo-Angiogenese für eine erfolgreiche Regeneration ebenso wichtig sei wie der Ersatz von Myozyten, wurden auch glatte Muskelzellen als Grafts verwendet. Eine vermehrte Kapillareinsprossung konnte hier nachgewiesen werden (Li, et al., 1999). Allen Zellen kontraktilen Ursprungs ist jedoch gemein, dass lediglich die Differenzierung in ein ähnliches Gewebe möglich ist (Oligopotenz). Multi-, Pluri-, oder gar Omnipotenz weisen nach dem heutigen Kenntnisstand nur Stammzellen auf.

Embryonale Stammzellen besitzen als einziger Zelltyp die Fähigkeit, sich in einen vollständigen, lebensfähigen Organismus zu entwickeln (Omnipotenz) und sind gut expandierbar. Als Transplantat im Herzmuskel sind sie fähig, sich in Kardiomyozyten, Endothelzellen oder weitere nützliche Zellen auszudifferenzieren (Henningson, et al., 2003). Allerdings ist im Falle der Transplantation embryonaler Stammzellen eine Abstoßungsproblematik mit konsekutiver Immunsuppression gegeben. Vereinzelt ist über das Auftreten von Arrhythmien und Teratomen berichtet worden (Strauer and Kornowski, 2003; Zhang, et al., 2002). Ähnlich wie bei den foetalen Kardiomyozyten ist auch die Herkunft dieser Zellen ethisch bedenklich, da zur Gewinnung ein menschlicher Embryo zerstört werden muss, was in Deutschland, wie auch in einigen anderen Ländern, gesetzlich untersagt ist. Die klinische Anwendung in naher Zukunft ist also eher fragwürdig.

#### **1.2.2.2 Knochenmarkstammzellen (KMS)**

Das adulte Knochenmark beherbergt eine Vielzahl von Stammzellen unterschiedlicher Gattung; die wichtigsten Populationen sind hämatopoetische (HSZ) und mesenchymale (MSZ) Stammzellen. Aus letzteren bildet sich die Unterpopulation der endothelialen (EPZ) Progenitorzellen. Während den HSZ, seit vielen Jahren erfolgreich in der onkologischen Therapie der Bluttumore eingesetzt, im Rahmen einer Pluripotenz überwiegend die Differenzierung in Zellen des Blutes zugesprochen wird, bilden die ebenfalls pluripotenten MSZ die Vorläuferzellen für vorwiegend Knorpel-, Fett- und Knochengewebe.

Die Erkenntnisse aus tierexperimentellen Studien weisen allerdings auf die Existenz multipotenter, bisher nicht klar identifizierter Stammzellsubpopulationen, hin. In regelmäßigen Abständen berichten Forschungsgruppen über neu entdeckte Zelltypen im Knochenmark. Einmal werden sie als multipotente, adulte Progenitorzellen (MAPZ) bezeichnet (Herzog, et al., 2003), eine andere Arbeitsgruppe hält die sogenannten Very Small Embryonic-Like Stem Cells (VSEL-SC) für besonders potent (Kucia, et al., 2007). Im adulten Knochenmark scheinen also Zellen zu existieren, die die Fähigkeit besitzen, sich in jede Zellart eines Organismus zu differenzieren, was als Transdifferenzierung oder Plastizität bezeichnet wird. Diese Beobachtung wurde hinsichtlich vieler Gewebetypen, unter anderem neuronal (Mezey, et al., 2000) und hepatozellulär (Lagasse, et al., 2000), nachgewiesen. Die Transdifferenzierung in Kardiomyozyten im Sinne einer Zellersatztherapie sowie in Endothelzellen zur NeoAngiogenese im myopathischen Herzen, vor allem in Infarktgebieten, wurde ebenfalls belegt (Chiu, 2003; Orlic, et al., 2003; Ratajska and Czarowska, 2006).

Es ist prinzipiell zu erwägen, dass es aufgrund des Differenzierungspotentials von KMS nach Transplantation im Zielgewebe auch zu Fehldifferenzierungen im Sinne einer Metaplasie kommen kann. Eine Publikation beschreibt nach Gabe von isolierten mesenchymalen Stammzellpopulationen signifikant vermehrte Kalzifikationen und Ossifikationen (Breitbach, et al., 2007).

Ob allein ein spezieller Zelltyp beziehungsweise eine Subpopulation oder eine Vielzahl unterschiedlicher Zellen und chemotaktischer Reize für das Phänomen des gesteigerten Regenerationspotentials verantwortlich ist, vermag die Wissenschaft derzeit nicht zu belegen.

### **1.2.3 Klinische Studien**

Basierend auf den Ergebnissen aus den tierexperimentellen Studien starteten erste klinische Anwendungen beim Menschen vor etwa einer Dekade. Die Zellen wurden hierbei im Rahmen einer Herzkatheteruntersuchung auf verschiedenen Wegen appliziert. Arbeitsgruppen um Strauer transplantierten autologe KMS bei akuten Infarktpatienten intrakoronar und stellten in kleineren, nicht randomisierten Studien funktionelle und morphologische Verbesserungen fest (Strauer, et al., 2001; Strauer, et al., 2002; Strauer, et al., 2003). Es folgten Untersuchungen, die KMS auf

transendokardialen Weg ins Myokard applizierten und ebenfalls positive Effekte auf LV-Funktion und Myokardperfusion detektierten (Fuchs, et al., 2003; Perin, et al., 2003; Tse, et al., 2003). Die Existenz potenzieller Risiken oder Komplikationen ist aufgrund der kleinen Fallzahlen der Studien bisher nicht sicher abzuschätzen. Im Rahmen einer Bypass-Operation von epikardial transplantierte skeletale Myoblasten führten zu anhaltenden ventrikulären Tachykardien (Menasche, et al., 2003).

Als eine der ersten großen randomisierten klinischen Studien untersucht die BOOST-Studie die intrakoronare KMS-Transplantation nach akutem Myokardinfarkt. Im Jahre 2009 wurde das 5-Jahres-Follow-up veröffentlicht. Nach initial signifikanter Verbesserung der Pumpfunktion im 6-Monats-Follow-up (Wollert, et al., 2004) kann nach fünf Jahren kein signifikanter Unterschied der systolischen LV-Funktion mehr festgestellt werden. Lediglich Patienten mit besonders großen Infarkten oder diastolischen Funktionsstörungen scheinen zu profitieren (Ishii, et al., 2009; Meyer, et al., 2009; Schaefer, et al., 2010). Die REPAIR-AMI-Studie widmete sich dem gleichen Patientengut, kann 2009 aber erst die 2-Jahres-Ergebnisse präsentieren. Die Autoren berichten über eine signifikante Reduktion erneuter kardiovaskulärer Ereignisse (Assmus, et al., 2010). Als einzige Studie widmet sich der Schweizer Ast des TOPCARE-Patienten-Trials auch der Fragestellung eventueller Funktionsverbesserungen nach Zelltherapie für die chronische Herzinsuffizienz. Erstmals wird der positive Effekt einer Stammzelltransplantation auch noch drei Monate nach einem kardialen Ereignis im Sinne einer moderat, jedoch signifikant verbesserten linksventrikulären Ejektionsfraktion nachgewiesen (Assmus, et al., 2006). Relativierend ist bei allen großen Studien zu erwähnen, dass die behandelten Patienten in den jeweiligen Gruppen Placebo und Verum meist auch eine Koronarintervention erhielten und jederzeit unter maximaler konservativer kardiologischer Therapie standen.

## 2 Entwicklung der Fragestellungen

Trotz der Entwicklung in der konservativen, medikamentösen und chirurgischen Therapie ist die chronische Herzinsuffizienz, insbesondere infolge koronarer Herzerkrankung (ischämische Kardiomyopathie), noch immer mit hohen Mortalitäts- und Morbiditätsraten behaftet (Rosamond, et al., 2007).

Der relativ junge Untersuchungsansatz der KMS-Transplantation versucht, sich in der Forschung mit neuen Therapiewegen zu platzieren. Als Applikationswege sind bisher die drei Möglichkeiten intramyokardial, intrakoronar und intravenös in Betracht gezogen worden, wobei die letztere in der Forschung noch wenig Beachtung findet. In der vorliegenden, randomisierten, tierexperimentellen Versuchsreihe soll die transvenöse Applikationsform als mögliche zukünftige minimal invasive Methode genauer untersucht werden. Folgende Fragestellungen werden hierzu bearbeitet:

1. Lassen sich mit aktuellen hochauflösenden Echokardiographie-Geräten unter Verwendung neuerer Software mit Hilfe des TDI-Verfahrens und der 2D-Strain-Analyse auch beginnende oder kleinere kardiomyopathische Veränderungen im insuffizienten Rattenherz detektieren und lokalisieren?
2. Kommt es nach intravenöser KMS-Applikation im chronischen Herzinsuffizienzmodell der Ratte zur funktionellen Verbesserung der Herzfunktion?
3. Treten eventuelle Funktionsverbesserungen durch KMS-Therapie nach Induktion eines Herzinfarktes in bestimmten Arealen (z.B. Infarktnarbe) vermehrt auf?
4. Lässt sich die morphologische Infarktgröße durch intravenöse KMS-Transplantation verkleinern?
5. Führt die intravenöse KMS-Transplantation zur vermehrten Kapillareinsprossung im Infarktgebiet?
6. Gibt es Hinweise auf chondroide Metaplasien im Infarktgebiet nach intravenöser KMS-Gabe?

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Materialien**

#### **3.1.1 Versuchstiere**

Für die Untersuchungen werden ca. 6 Wochen alte Ratten des Inzuchtstammes Lewis aus der Kleintierzucht der Firma Harlaan-Winkelmann Deutschland bezogen. Die Besonderheit der Tiere dieses Stammes liegt in ihrem nahezu identischen Genmuster. Lewis-Inzuchtratten zeigen keinerlei Abstoßungsreaktion und eignen sich daher besonders gut für wissenschaftliche Versuche, insbesondere Transplantationsvorhaben. Die Richtlinien zur Versorgung und Pflege von Versuchstieren wurden stets eingehalten. Die Ratten werden in den Stallungen der tierexperimentellen Abteilung der Klinik für Visceral-, Thorax-, und kardiovaskulären Chirurgie der Charité untergebracht. Permanenter freier Zugang zu Standard-Labor-Futter und Wasser ad libidum ist gewährleistet.

Das Versuchsvorhaben ist nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes von der Ethikkommission der Charité genehmigt worden.

#### **3.1.2 Chirurgische Instrumente**

- Anatomische Pinzette nach DeBakey, 200/2 mm
- Anatomische Pinzette Ultralight, 150/1,2 mm
- Chirurgische Schere, gerade spitz/stmpf, 115 mm
- Knochensplitterzange nach Liston, 190 mm
- Mikrofedernadelhalter nach Jacobson, 185 mm
- Mikrofederschere nach Potts-Smith, 190 mm
- Nadelhalter Durogrip nach Ryder, 135 mm
- Nadelhalter nach Castroviejo, 145 mm
- Präparierschere nach Littler, 115 mm
- Präparierschere nach Toennis, 175 mm

Die verwendeten chirurgischen Instrumente werden von der Firma Aesculap bezogen. Nach jeder Operation erfolgte die sachgemäße Reinigung und Sterilisation im WEBECO Autoclaven.

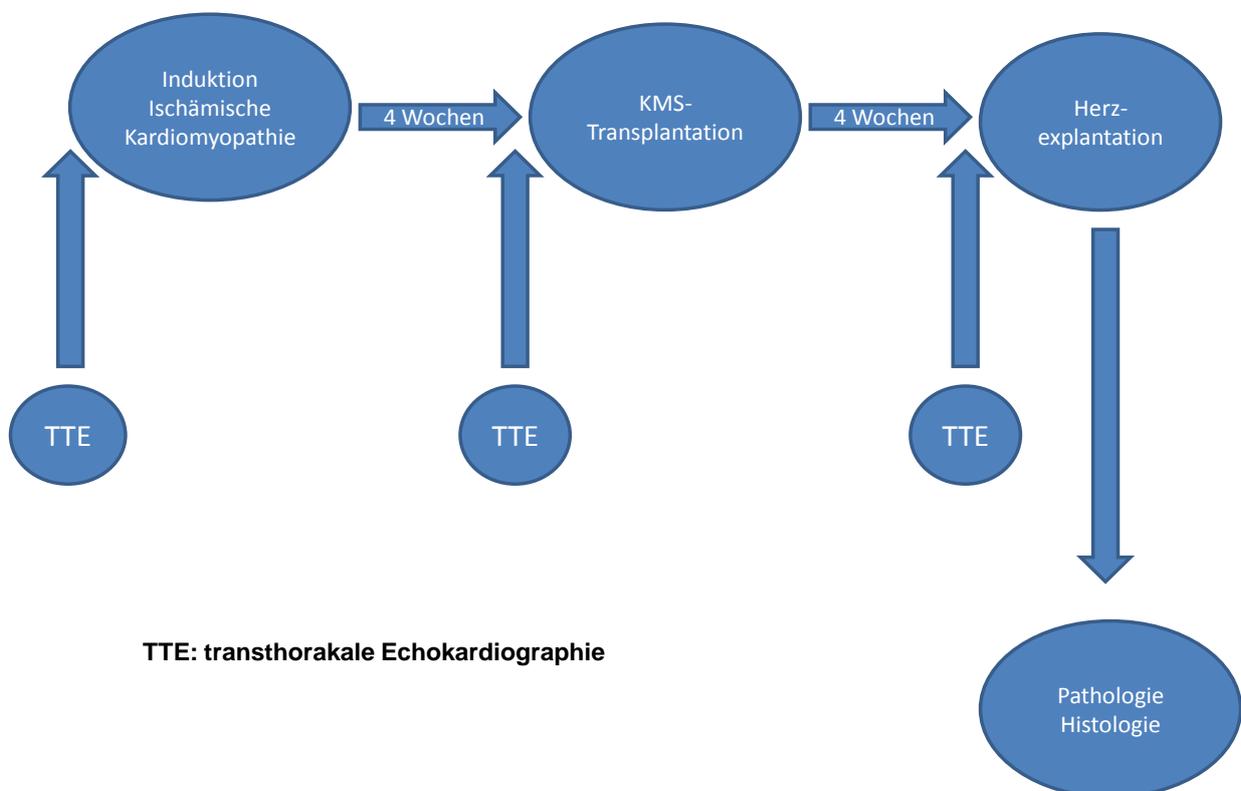
## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Versuchsaufbau

Die Induktion der ischämische Kardiomyopathie erfolgt als iatrogen verursachter Myokardinfarkt durch Ligatur der linken Koronararterie (LCA). Nach Ablauf von vier Wochen wird die Transplantation mittels Injektion der KMS nach medianer Laparotomie in die Vena cava inferior vorgenommen. Nach weiteren vier Wochen werden die Herzen zur pathologischen und histologischen Aufarbeitung explantiert. (vgl. Abbildung 1)

Gruppe	Transplantation
I, Verum-Gruppe (n=10)	Injektion von KMS
II, Kontroll-Gruppe (n=10)	Injektion von NaCl 0,9%

**Tabelle 1:** Gruppeneinteilung

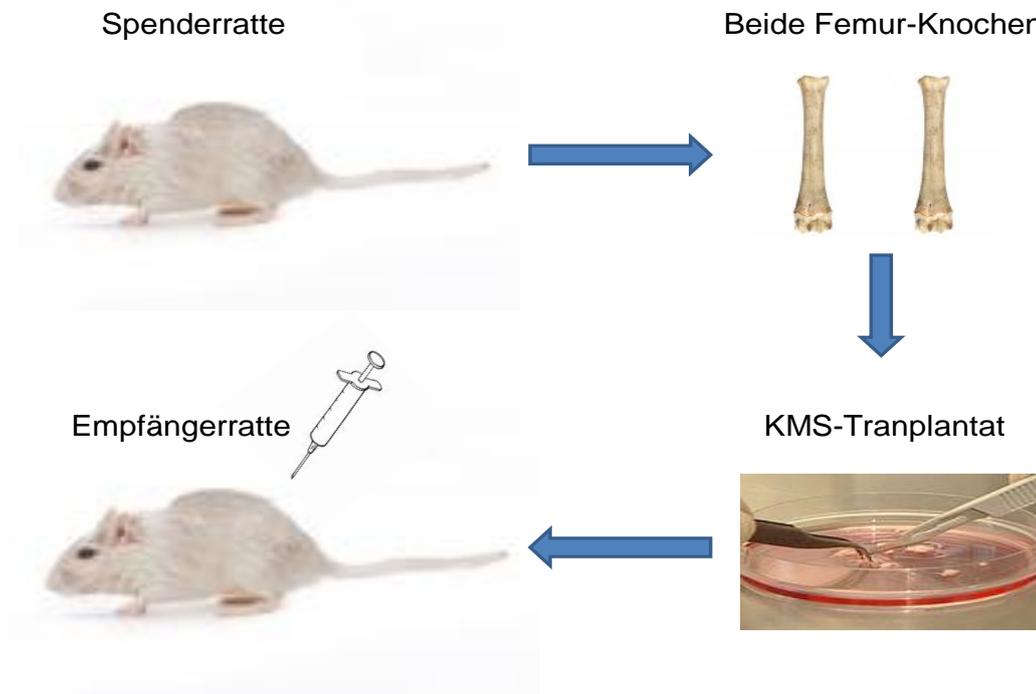


**Abbildung 1:** Allgemeiner Versuchsaufbau

Jeweils kurz vor den drei Operationszeitpunkten Induktion, Transplantation und Explantation wird eine verblindete TTE-Untersuchung zur Bestimmung der funktionellen Herzparameter durchgeführt. Zur Vermeidung einer Verzerrung der Ergebnisse werden die Versuchstiere randomisiert.

Verglichen werden 10 Tiere aus der Verum-Gruppe, die KMS-Zellen erhalten, mit 10 Tieren aus der Kontroll-Gruppe, denen in identischer Prozedur 0,9%iges NaCl injiziert wird. (vgl. Tabelle 1, Seite 21)

Zur Gewinnung des Transplantates werden einer Ratte zwei Femurknochen entnommen. Nach Explantation des gesamten benötigten Knochenmaterials ist die Ratte nicht überlebensfähig. Durch die syngenen Erbgutverhältnisse (Inzuchtratten) wird der reale autologe Transplantationsweg auch im allogenen Transplantationsmodell hinreichend simuliert, so dass die Gewinnung der KMS im gewählten Tierversuch aus den Femurknochen einer Spenderratte realisiert werden kann. (vgl. Abbildung 2) Zellzählungen aus Vorversuchen haben ergeben, dass die durchschnittliche gewonnene Menge pro Spenderratte 50 Millionen Zellen beträgt.



**Abbildung 2:** Ablauf der KMS-Transplantation

## 3.2.2 Versuchsdurchführung

### 3.2.2.1 Anästhesie

Zur Narkose der Versuchstiere wird ein Gemisch aus Ursotamin (Ketanest®) und Rompun im Verhältnis 2:1 hergestellt. Die Applikation erfolgt intraperitoneal mit einer Dosierung von 0,1ml/100g Körpergewicht.

Über einen Führungsdraht wird eine auf 3,5 Zentimeter gekürzte 18g-Flexüle in der Trachea der Ratte platziert. (vgl. Abbildung 3) Die permanente Ventilation übernimmt während der Operation ein Säuglingsrespirator mit einem Gemisch aus Sauerstoff (O<sub>2</sub>) und Raumluft im Verhältnis 2:1 und einer Frequenz von 70 pro Minute. (vgl. Abbildung 4)



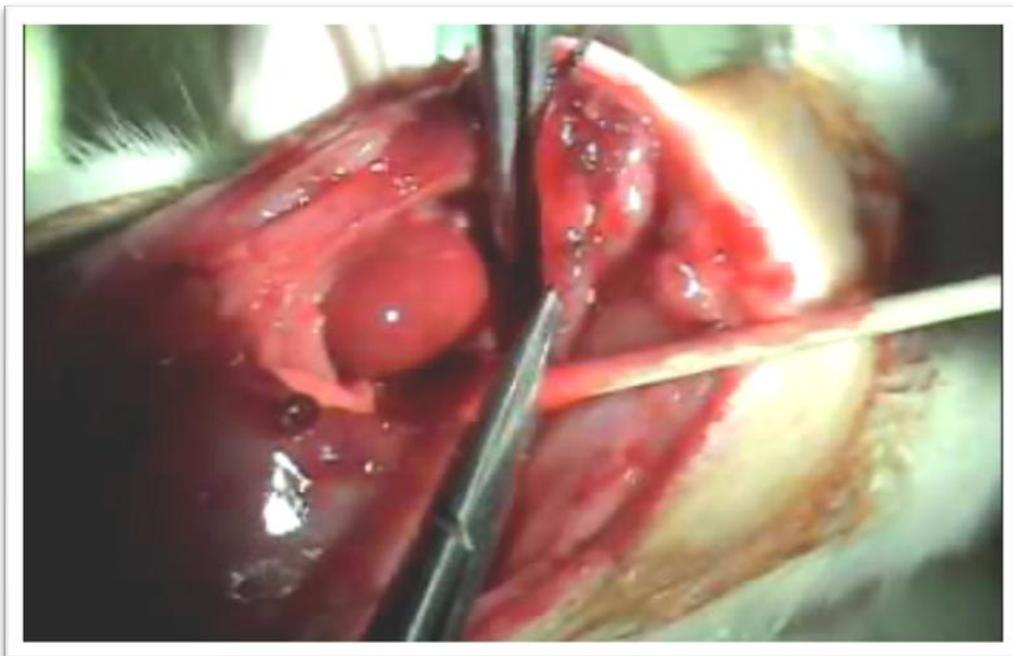
**Abbildung 3:** Intubation



**Abbildung 4:** Beatmung

### 3.2.2.2 Induktion des Myokardinfarktes

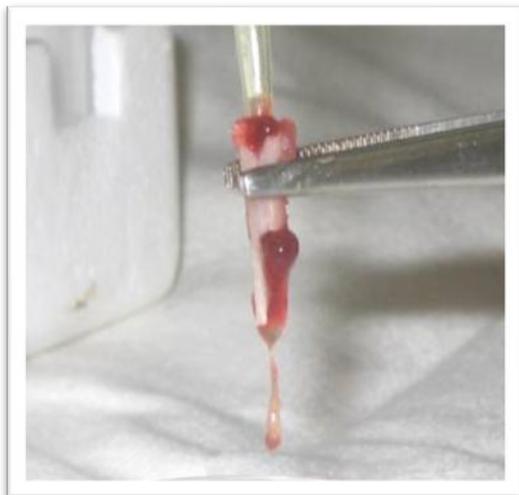
Die Induktion einer ischämischen Kardiomyopathie erfolgt in Anlehnung an etablierte Verfahren durch Ligatur der LCA (Li, et al., 1997; Orlic, et al., 2001). Nach Rasur des Operationsgebietes und dreimaliger Desinfektion mit Betaisodonna (Braunol®) wird durch einen etwa drei Zentimeter langen Hautschnitt eine linkslaterale Thorakotomie als Zugangsweg zum Herzen vorgenommen. Durch Anbringen zweier 3-0 Vicryl-Haltenähte bietet sich eine gute Sicht auf das Operationsfeld. Nach Eröffnung des Perikards wird unter Verwendung einer 8-0 Prolene-Naht die Ligatur der proximalen LCA vollzogen. (vgl. Abbildung 5) Unter kurzer Luxation des Herzens präsentiert sich eine myokardiale Ischämie im Bereich der linken Ventrikelwand. Diese ist stets visuell durch eine livide Verfärbung und das Vorliegen einer Akinesie gekennzeichnet. Nach mehreren Blähmanövern der Lunge und Aspiration der restlichen Luft aus den Pleuren mit einer 18g Flexüle erfolgt dann der Thoraxverschluss unter Zuhilfenahme der Haltenähte mit 3-0 Vicrylfäden. Die Wunde wird subkutan mit 5-0 Vicryl- und kutan mit 5-0 Monocrylfäden vernäht. Nach kurzer Nachbeatmungszeit von ca. 10 Minuten stellt sich wieder eine Spontanatmung ein und die Ratten gelangen zurück in den Tierstall.



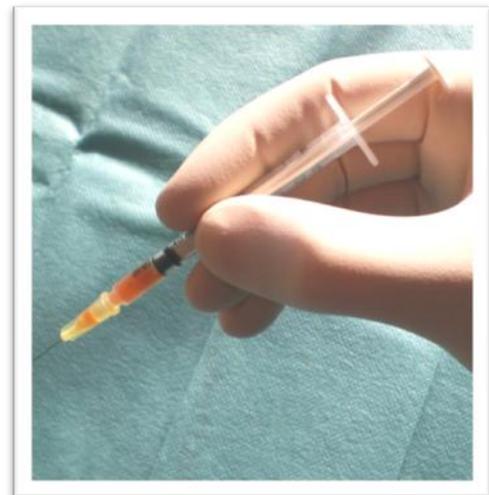
**Abbildung 5:** Induktion des Myokardinfarktes mittels Ligatur der LCA

### 3.2.2.3 Gewinnung der KMS

Die Gewinnung der KMS und die im nächsten Abschnitt beschriebene Transplantation werden zur Vermeidung eines möglichen Vitalitätsverlustes der Zellen zeitgleich durchgeführt. Die Entnahme der Zellen aus beiden Oberschenkelknochen einer Spenderratte erfolgt wieder in Orientierung an bereits bewährten Methoden (Wakitani, et al., 1995). Zur besseren Mobilisierung der Zellen und zur Vermeidung von Thrombenbildung bei der Aufbereitung der Suspension erfolgt mit der regulären Anästhesie der Tiere zunächst eine intravenöse Heparinisierung mit 40IE Heparin/100 mg Körpergewicht in die Penisvene. Nach 30 Minuten Einwirkzeit, Rasur und Desinfektion der Operationsfelder wird eine letale Dosis des Ursotamin (Kentanest®)-Rompun-Gemisches verabreicht. Nach Freipräparation und Darstellung werden beide Femur-Knochen mit der Knochensplitterzange gelenknah entnommen und diaphysennah eröffnet. Zur schonenden Lösung des Knochenmarks werden 100µl des Enzyms Hyaluronidase (25mg in 1ml NaCl 0,9%) in den eröffneten Knochen pipettiert.



**Abbildung 6:** Gewinnung der KMS



**Abbildung 7:** Zellsuspension

Nach drei Minuten Einwirkzeit kann das Knochenmark in Form eines Pflockes mit reichlich NaCl 0,9% herausgespült werden. (vgl. Abbildung 6) Dieser wird über einem Zellsieb durch insgesamt zehn Spülungen mit einer Lösung (5 IE Heparin in 50ml NaCl 0,9%) gewaschen und von der Hyaluronidase befreit. Nach Überführung

in ein Eppendorf-Gefäß erfolgt die Zentrifugation bei 500 G für 10 Minuten sowie das Verwerfen des Überstandes. Aufgelöst in 150µl NaCl 0,9% ergeben die gewonnenen Zellen die zu transplantierende Suspension. (vgl. Abbildung 7, S.25)

#### **3.2.2.4 Transplantation**

Zum Zwecke der Transplantation werden die Versuchstiere erneut narkotisiert, intubiert und beatmet. Nach Rasur und sterilem Abwaschen erfolgt eine mediane Laparotomie über einen ca. 5 cm langen Hautschnitt. Der Darm wird unter Zuhilfenahme feuchter, steriler Kompressen luxiert, um Sicht auf die großen abdominellen Gefäße zu bekommen. Nach Darstellung der Vena cava inferior wird die Punktion dieser mit einer Insulinspritze vorgenommen. Mit Hilfe von Stieltupfern lässt sich durch eine kurze mechanische Kompression eine ausreichende Blutstillung erreichen. Die Wunde wird subkutan mit 5-0 Vicryl- und kutan mit 5-0 Monocrylfäden verschlossen. Nach Extubation gelangen die Tiere wieder in die Stallungen.

#### **3.2.2.5 Explantation**

Nach Durchführung der TTE3 am Vortag wird den Tieren zur Explantation der Herzen zunächst eine letale, intraperitoneale Dosis des Ursotamin (Ketanest®)-Rompun-Gemisches verabreicht. Der gleiche Zugangsweg, wie unter 3.2.2.2 beschrieben, wird unter vorsichtigem Lösen der Verwachsungen freipräpariert. Es folgt die Explantation des Herzens unter Erhalt der Gefäßstümpfe. Die Herzen werden zur weiteren histologischen und pathologischen Begutachtung umgehend in Formalin fixiert. (vgl. Abbildung 8)



**Abbildung 8:** explantiertes Herz

### 3.2.3 Echokardiographische Untersuchungen

#### 3.2.3.1 Durchführung und Apparatur

Echokardiographische Untersuchungen erfolgen zuerst als Baseline-Bestandsaufnahme vor Infarktinduktion (TTE1) sowie im weiteren Verlauf vor KMS-Transplantation (TTE2) und vor Explantation der Herzen (TTE3). (vgl. Abbildung 1, S. 21). Um eine erneute Intubation zu vermeiden, werden die Versuchstiere mit einer geringen Dosis Ketanest®/Rompun (0,03ml/100g KG) sediert. Zum Einsatz kommt ein Echokardiographie-Gerät Vivid 7 Dimension der Firma General Electric (GE Medical Systems, Horton, Norwegen) mit einem 10S 5,5-12 MHz Schallkopf. Die Daten werden digital im DICOM-Format gespeichert und offline an einer externen Work-Station mit Hilfe des Programms EchoPacPC der oben genannten Firma ausgewertet.

Grundlage der transthorakalen Echokardiographie bilden die Richtlinien der American Society of Echocardiography (Lang, et al., 2005). Die Untersuchung erfolgt von transthorakal in Linksseitenlage. Von jeder Einstellung werden mindestens drei Herzzyklen aufgezeichnet. Alle Untersuchungen wurden von demselben Untersucher durchgeführt. Dieser verfügte bereits vor unserer Studie über Erfahrung in der Ratten-Echokardiographie.



**Abbildung 9:** Durchführung der echokardiographischen Untersuchung

### 3.2.3.2 Standardechokardiographie

Übersicht und Auffinden der parasternalen kurzen und langen Achse werden zunächst im zweidimensionalen Schnittbild (B-Mode) durchgeführt. Im M-Mode (eine Aneinanderreihung eindimensionaler Strahlen durch das Herz im zeitlichen Verlauf) werden dann die folgend aufgezählten Parameter zur Bestimmung der intrakardialen Diameter (cm) sowie Dicke (cm) und Kontraktilität der Herzwände (%) ermittelt. (vgl. Abbildung 10)

1. IVSd (Dicke des Interventrikularseptums während der Diastole in cm)
2. IVSs (Dicke des Interventrikularseptums während der Systole in cm)
3. LVIDd (Linksventrikulärer innerer Diameter während der Diastole in cm)
4. LVIDs (Linksventrikulärer innerer Diameter während der Systole in cm)
5. LVPWd (Dicke der linksventrikulären Hinterwand während der Diastole in cm)
6. LVPWs (Dicke der linksventrikulären Hinterwand während der Systole in cm)
7. EF (Ejektionsfraktion, Auswurfsfraktion in %)
8. FS (Fractional shortening, Verkürzungsfraktion in %)

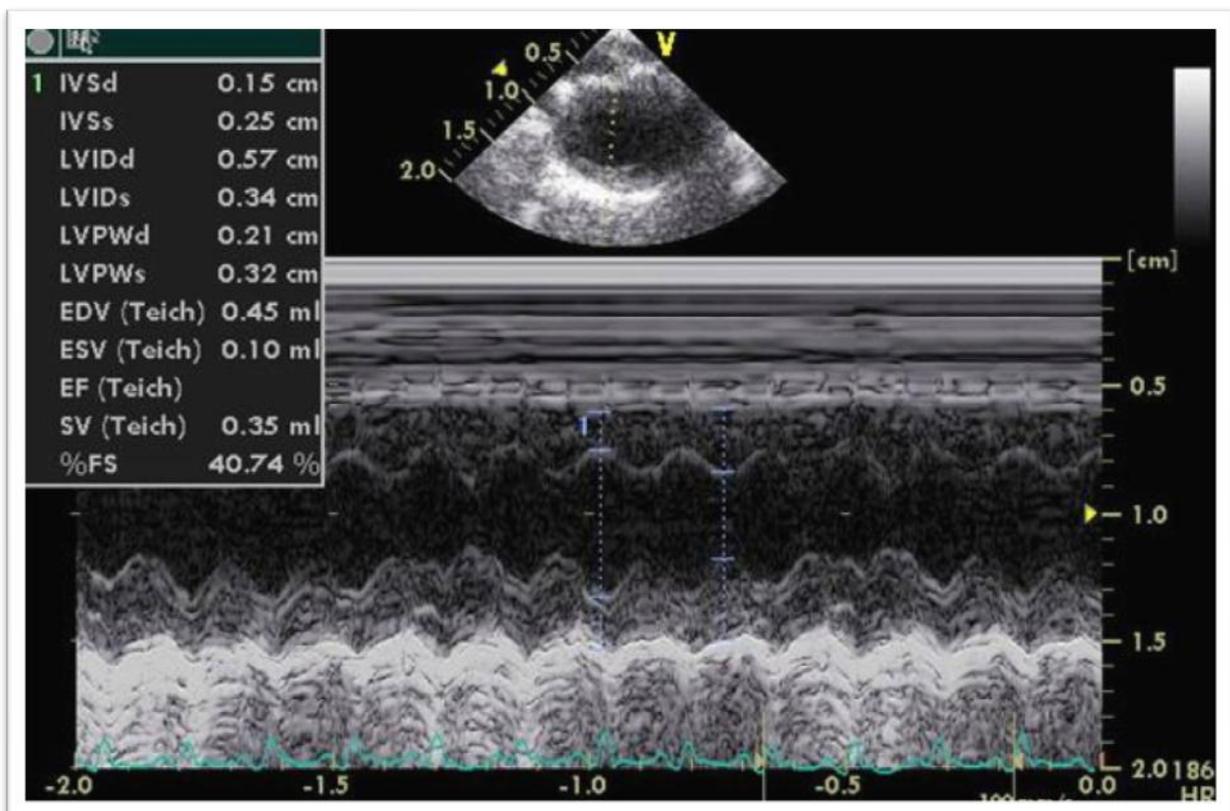


Abbildung 10: M-Mode (TTE1)

### 3.2.3.3 Gewebe-Doppler Echokardiographie (TDI)

Zur Darstellung der Wandbewegungsgeschwindigkeit führen wir Untersuchungen im Gewebe-Doppler-Verfahren durch. Basierend auf der Dopplertechnik werden hierbei die unterschiedlichen Signalpegel von Blut und Gewebe in Korrelation gesetzt. Die Bildrate beträgt 205-230/Sekunde, der Sektorwinkel 30 Grad. In der vorliegenden Arbeit sollen die systolischen Wandbewegungsgeschwindigkeiten ( $V$ ; cm/s) der vorderen (anterior) und hinteren (posterior) Wand des linken Ventrikels bestimmt werden. (vgl. Abbildung 11) Die Messungen erfolgen in der parasternalen langen Achse. Aufgrund der sensiblen Untersuchungsbedingungen werden zur Bestimmung eines Wertes jeweils drei Messungen durchgeführt und zur weiteren statistischen Berechnung gemittelt.

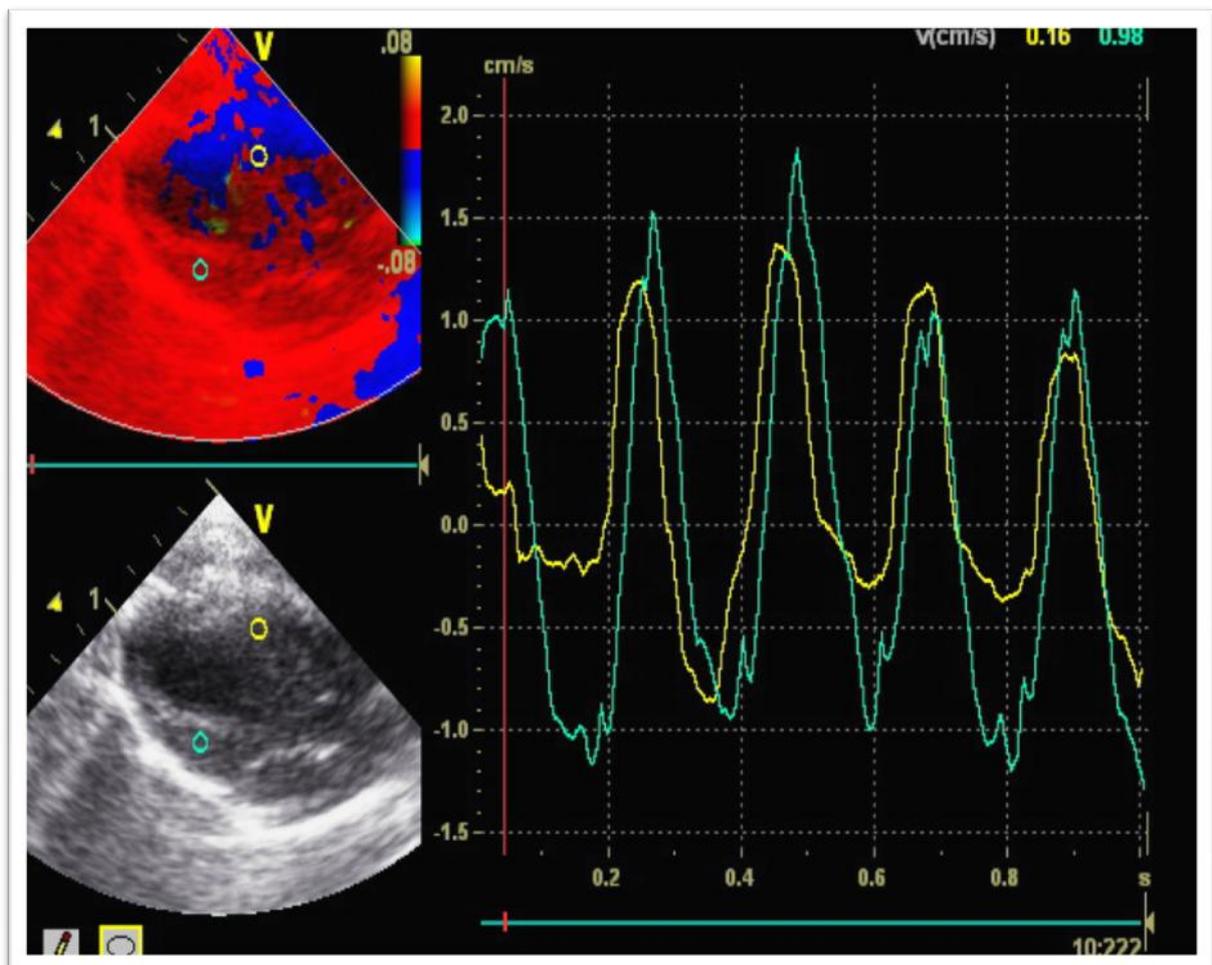


Abbildung 11: Gewebedoppler (TTE1)

### 3.2.3.4 2D-Strain-Analyse

Durch eine Grauwert-Analyse der 2D-Bilder über den Verlauf eines Herzzyklus wird die Bestimmung einer regionalen Verformung möglich (Leitman, et al., 2004). Mit dieser sensitiven neuen Methode erfolgt die Beurteilung der radialen systolischen Kontraktion (%) in den nachfolgend aufgezählten Segmenten des linken Ventrikels:

1. Septum
2. Antero-Septaler Übergang
3. Anteriore Wand
4. Laterale Wand
5. Inferiore Wand
6. Posteriore Wand

(vgl. Abbildung 12)

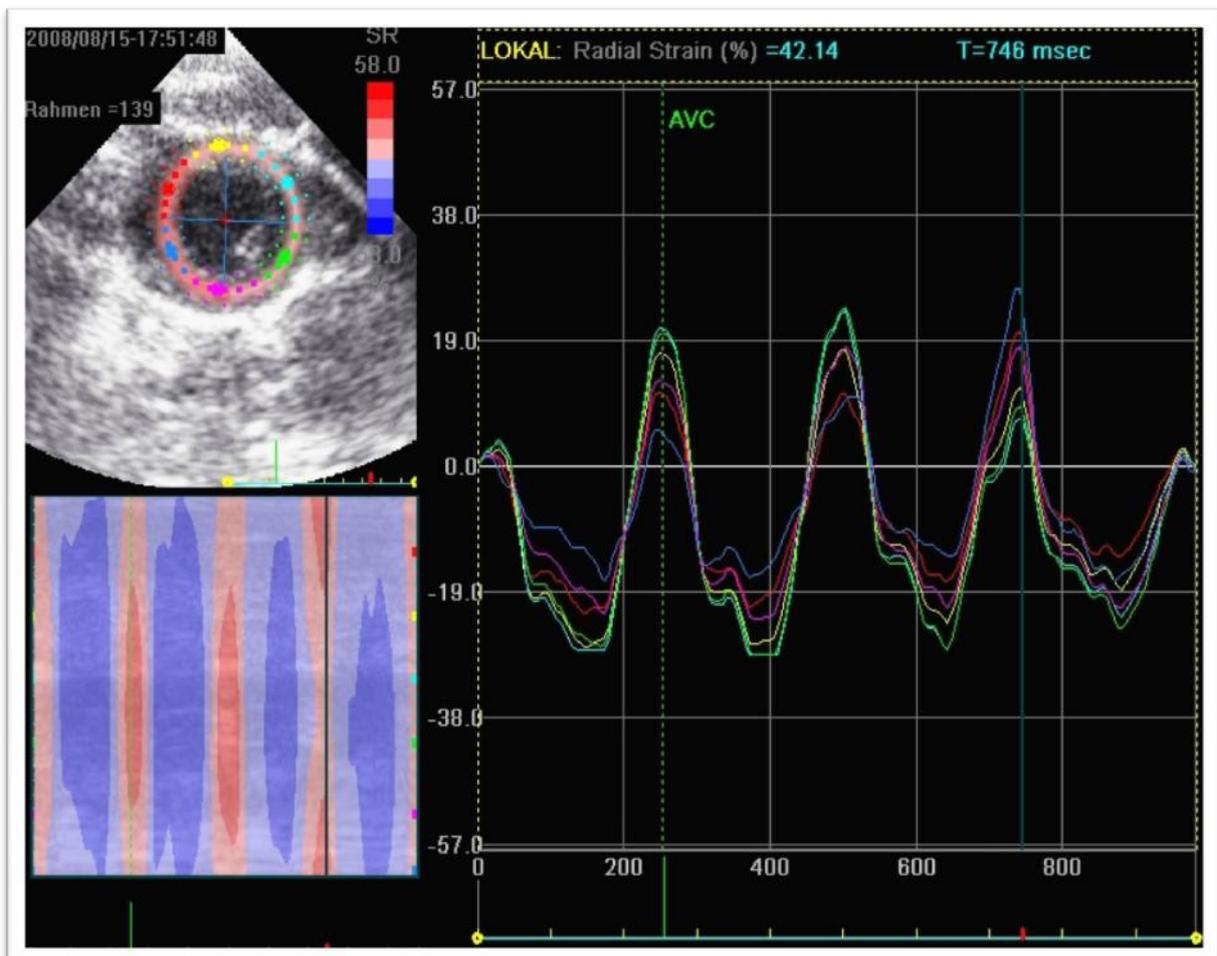


Abbildung 12: 2D-Strain-Analyse (TTE1)

### 3.2.4 Histologie und Pathologie

#### 3.2.4.1 Aufbereitung der Herzen

Zur Vorbereitung der Zellfärbungen für die Lichtmikroskopie werden die entnommenen Herzen je nach Größe von kranial nach kaudal in 6-8 Scheiben mit einer Dicke von 1,9 bis 2,8 mm geschnitten (vgl. Abbildung 13) und in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Danach erfolgt eine Fixierung der Präparate in Paraffin. Von den entstandenen Paraffinblöcken werden dann mit dem Mikrotom 2µm dicke Schnitte hergestellt. Diese werden auf einem Objektträger aufgebracht und bei 70°C getrocknet.

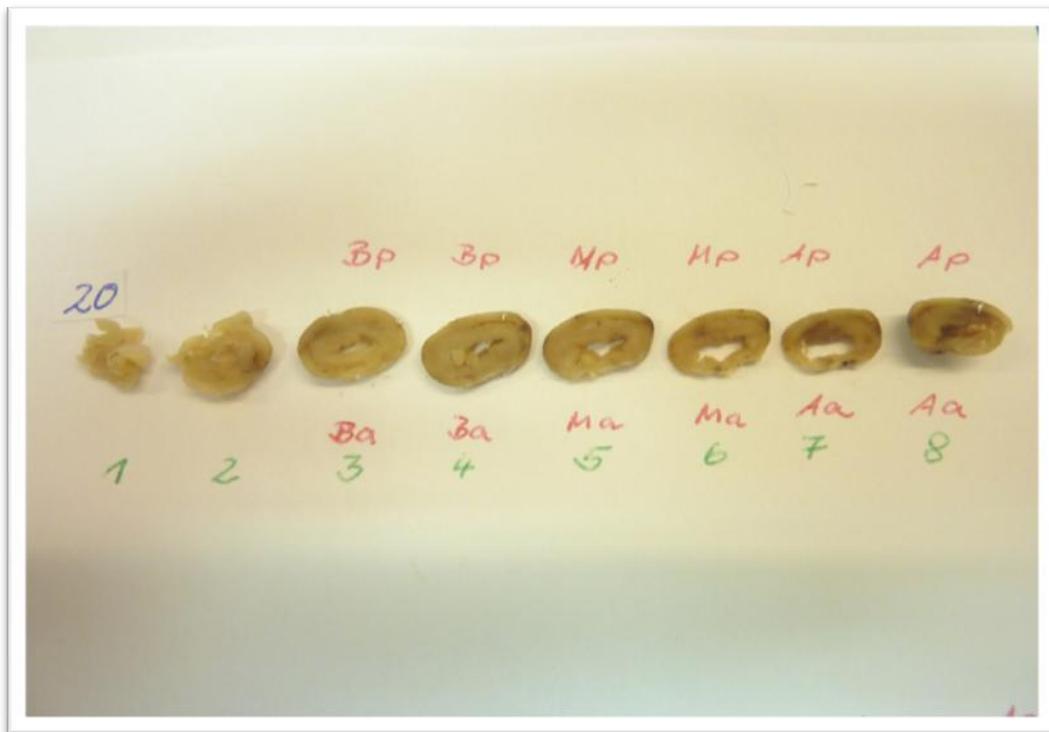


Abbildung 13: Blöcke vor der Einbettung in Paraffin

Legende zur Abbildung 13:

- Bp: Basal posterior
- Mp: Medial posterior
- Ap: Apikal posterior
- Ba: Basal anterior
- Ma: Medial anterior
- Aa: Apikal anterior

### **3.2.4.2 Färbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE)**

Zunächst wird ein Eosin-Ansatz aus 3%igem Eosin (gelöst in 75 ml destilliertem Wasser), 100%igem Ethanol (150 ml) und 1%igem Phloxin (1,5 ml) hergestellt.

Die Objektträger mit den Schnitten werden gewässert und erhalten nach der laborüblichen Methode unter Verwendung von Hämalun nach Meyer die HE-Färbung. Aus jedem Block werden zwei Objektträger hergestellt. Unter dem Lichtmikroskop wird anhand der Präparate eine Zählung der Kapillaren pro Sichtfeld in der 100-fachen Vergrößerung im Infarktgebiet vorgenommen.

### **3.2.4.3 Immunhistochemische Färbung mit dem monoklonalen S100-Antikörper**

Die immunhistochemische Färbung wird mit dem Färbeautomat BenchMarc® der Firma Roche Ventana im pathologischen Institut der Charité, Universitätsmedizin, durchgeführt. Monoklonale Maus-S100-Antikörper des Klons 15E2E2 werden hierfür von der Firma BioGenix Deutschland bezogen.

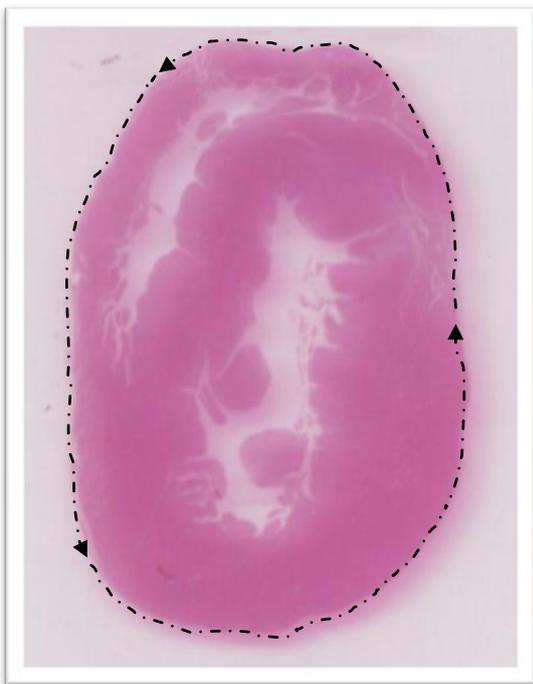
Unter der Bezeichnung S100 werden spezielle calciumbindende Proteine zusammengefasst, die unterschiedliche zelluläre Funktionen erfüllen. Sie kommen vor allem in Chondrozyten, Lipozyten, Melanozyten, Myozyten und Gliazellen vor (Nakajima, et al., 1982). Monoklonale S-100-Antikörper werden in der Histopathologie zur Abgrenzung bestimmter Tumore (Gliome, Melanome, chondroide Tumore) eingesetzt (Kahn, et al., 1983). Trotz der Existenz von S-100-Proteinen auch in Skelett- und Herzmuskelzellen, eignet sich die Methode besonders gut zur Detektion von Chondrozyten/chondroider Metaplasie im Narbengewebe des Infarktgebietes. Unter dem Lichtmikroskop werden die Objektträger auf positive Reaktionen von Chondrozyten im Infarktgebiet durchsucht.

### **3.2.4.4 Infarktgrößenbestimmung mit der Fiji-Software**

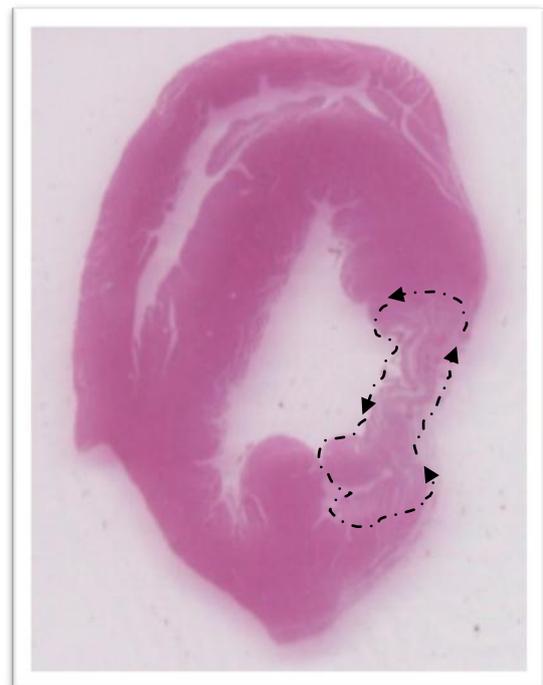
Das Computer-Programm Fiji basiert auf der für wissenschaftliche Zwecke entwickelten Software ImageJ und ist als freeware im Internet erhältlich. Im medizinischen Bereich findet es unter anderem in der radiologischen Diagnostik (CT und MRT), aber auch in Histo- und Pathologie vor allem im Bereich der (Elektronen-) Mikroskopie Anwendung. Neben einer weiteren Vielzahl von Funktionen ermöglicht Fiji sehr genaue Flächen- und Volumenberechnungen (Preibisch, et al., 2009; Walter, et al., 2010).

Zur Bestimmung des Infarktolumens werden die histologischen Schnitte eines Herzens (1 Objektträger pro Parafinblock) mit einem Flachbrettscanner digitalisiert. Länge und Breite eines Objektträgers liefern den Maßstab im Zehntelmillimeterbereich. Mit Hilfe der Fiji-Software werden folgende Flächen bestimmt: (vgl. Abbildung 14 und 15)

1. Herzgesamtumfang ( $\text{mm}^2$ )
2. Hohlraumfläche des linken Ventrikels ( $\text{mm}^2$ )
3. Hohlraumfläche des rechten Ventrikels ( $\text{mm}^2$ )
4. Infarktfläche ( $\text{mm}^2$ )



**Abbildung 14:** Bestimmung Herzgesamtumfang



**Abbildung 15:** Bestimmung Infarktfläche

Multipliziert mit der Schnittdicke ergeben sich nach Addition aller ermittelten Flächen pro Herz die Volumina ( $\text{mm}^3$ ) der oben genannten Entitäten. Die Formel

### **Herzgesamtvolumen – Hohlraumvolumen links – Hohlraumvolumen rechts**

ergibt das Herzmuskelvolumen ( $\text{mm}^3$ ). Setzt man das Infarktvolume hierzu ins Verhältnis, ergibt sich der prozentuale Anteil des Infarktes an der gesamten Herzmasse, welcher in der vorliegenden Arbeit als objektiver Parameter für die Infarktgröße verwendet wird.

### **3.2.5 Statistische Methoden**

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten wird mit Hilfe des Softwareprogramms PRISM 5 (GraphPad Inc., La Jolla, USA) und des Tabellenkalkulationsprogramms Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, USA) durchgeführt.

Es wird eine deskriptive Statistik durch Errechnung von Mittelwerten, Medianen, Standardabweichung und Range erstellt. Zum besseren Verständnis werden die Ergebnisse auch in Form von Box-Plot-Diagrammen nach Tukey visualisiert. Die Länge einer Box entspricht hierbei dem Bereich, in dem die mittleren 50% der Daten liegen (Interquartilsabstand). Hierdurch wird ein unmittelbarer Eindruck über die Streuung der vorliegenden Daten sowie über den Bereich, in welchem die Daten liegen und wie sie sich dort verteilen, vermittelt. Der Median wird als Strich durch die Box dargestellt. Die Whisker zeigen nach der Definition von Tukey (Tukey, 1977) den minimalen und maximalen Datenwert (Range) an, wenn dieser noch im Bereich des 1,5-fachen Interquartilsabstandes liegt. Ausreißer, die über beziehungsweise unter dieser Begrenzung liegen, werden außerhalb des Diagrammes als Punkte gekennzeichnet. Dies ermöglicht eine bessere Darstellung von Extremwerten. Den üblichen statistischen Standards entsprechend wird ein p-Wert von weniger als 0,05 als Signifikanzniveau gewählt.

Aufgrund der geringen Fallzahlen ist eine Prüfung auf Normalverteilung zur Durchführung von parametrischen Tests nicht sinnvoll. Daher werden ausschließlich nichtparametrische Tests angewendet. Anstelle von asymptotischen p-Werten werden jedoch die genauen p-Werte angegeben.

Die beiden Gruppen Verum und Kontrolle werden zunächst unabhängig voneinander betrachtet und hinsichtlich des zeitlichen Verlaufes der Ereignisse (Induktion Myokardinfarkt, KMS-Transplantation) auf signifikante Veränderungen geprüft. Hierfür liegen lediglich metrische Daten vor. Daher erfolgt die Prüfung der Varianzen auf einen signifikanten Unterschied mit dem Wilcoxon-Test für abhängige Stichproben.

Im Weiteren werden die Veränderungstendenzen der Gruppen Verum und Kontrolle miteinander verglichen. Hierzu werden im Falle der echokardiographisch erhobenen Werte die Differenzen der metrischen Werte nach folgender Formel ermittelt:

### **Wert nach Transplantation – Wert vor Transplantation**

Die Ergebnisse dienen als Maß für eine mögliche Verbesserung oder Verschlechterung nach Transplantation der KMS und werden mit dem Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben ausgewertet.

Im einmaligen Falle der nominal skalierten Werte (Pathologie/chondroide Metaplasie Ja/Nein) wird der Chi-Quadrat-Test für unabhängige Stichproben gewählt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Tierbezogene Daten

Die Ratten sind zu jedem Zeitpunkt der Studie den gleichen Haltungsbedingungen ausgesetzt. Zu den drei Zeitpunkten Infarktinduktion, KMS-Transplantation und Explantation sowie für die Spendertiere wird jeweils eine Gewichtsbestimmung durchgeführt. Die gemittelten Gewichte betragen zwischen  $345 \pm 16$  zum Zeitpunkt der Myokardinfarktinduktion und  $387 \pm 29$  zum Zeitpunkt der Explantation. Wie in Abbildung 16 ersichtlich, ergeben sich keine relevanten Gewichtsunterschiede oder statistische Auffälligkeiten.

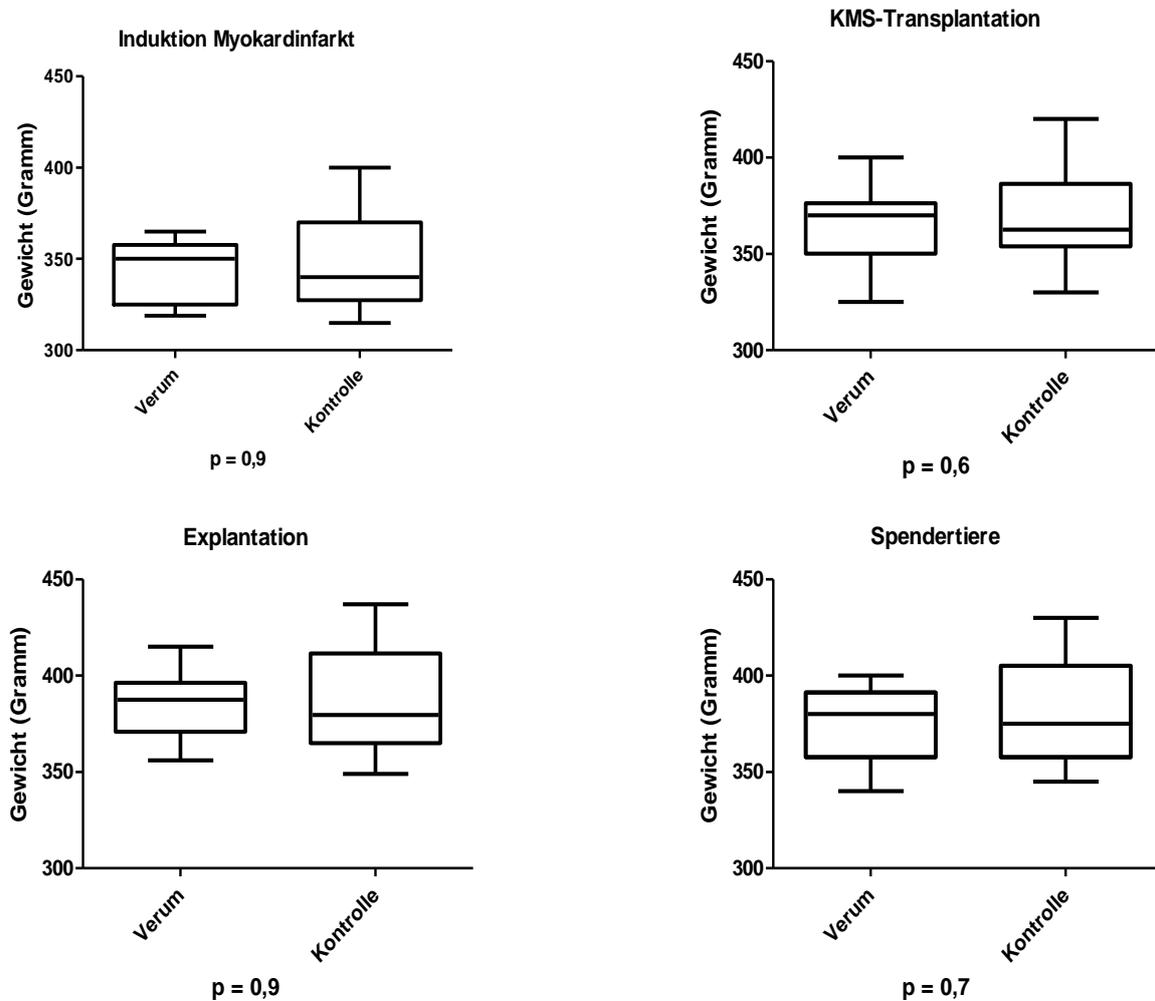


Abbildung 16: Gewichte

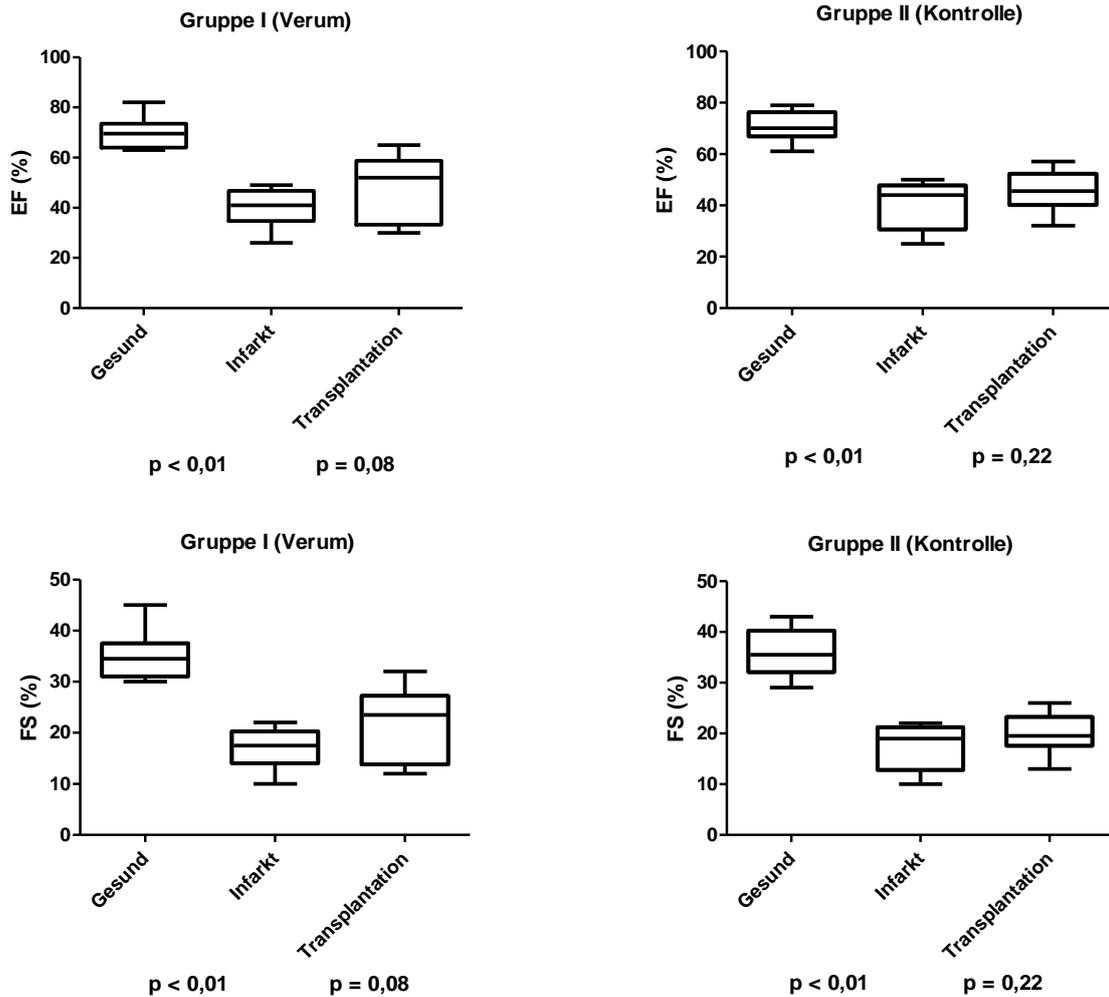
## 4.2 Echokardiographische Daten

### 4.2.1 Ejektionsfraktion (EF) und Fractional Shortening (FS)

Zuerst werden beide Gruppen hinsichtlich einer erfolgreichen Infarktinduktion untersucht. Das Ergebnis zeigt einen statistisch hochsignifikanten Abfall von EF (%) und FS (%) bei allen Tieren. Im Weiteren werden beide Gruppen nach einer funktionellen Verbesserung der Herzfunktion nach KMS-Transplantation auf Veränderungen untersucht. (vgl. Tabelle 2) Signifikante Änderungen sind hier in keiner Gruppe zu finden. Auffällig ist jedoch, dass der p-Wert in Gruppe I (Verum) für die beiden oben genannten Entitäten mit 0,08 deutlich geringer ist als in Gruppe II (Kontrolle) mit 0,22 und somit eine Signifikanz nur knapp verfehlt. (vgl. auch Abbildung 17, S. 38) Vergleicht man allerdings die Verbesserungstendenz beider Gruppen mittels Testung der Differenzen, wird dieser Effekt mit einem p-Wert von 0,8 für EF und 0,7 für FS wieder relativiert. Fragestellung zwei ist hiermit beantwortet.

		Gruppe I (Verum)		Gruppe II (Kontrolle)	
		EF (%)	FS (%)	EF (%)	FS (%)
<b>Gesund (vor Infarkt)</b>	Mittelwert:	70	35	71	36
	Median:	70	35	70	36
	Standabw:	6	4	6	5
	Min:	63	30	61	29
	Max:	82	45	79	43
	Range:	19	15	18	14
<b>Infarkt (4 Wochen nach Infarkt)</b>	Mittelwert:	40	17	40	17
	Median:	41	18	44	19
	Standabw:	8	4	9	4
	Min:	26	10	25	10
	Max:	49	22	50	22
	Range:	23	12	25	12
<b>Transplantation (4 Wochen nach Transplantation)</b>	Mittelwert:	48	22	46	20
	Median:	52	24	46	20
	Standabw:	14	8	8	4
	Min:	30	12	32	13
	Max:	65	32	57	26
	Range:	35	20	25	13
<b>p Infarkt</b>		<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>
<b>p Transplantation</b>		<b>0,08</b>	<b>0,08</b>	<b>0,22</b>	<b>0,22</b>

**Tabelle 2:** EF (%) und FS (%) im gesunden, im infarzierten und im transplantierten Tier



**Abbildung 17:** Darstellung der Veränderungen von EF (%) und FS (%) nach Induktion des Myokardinfarktes sowie nach Transplantation von KMS bzw. NaCl

#### 4.2.2 Intrakardiale Diameter und Herzwandmaße

Wie aus Tabelle 3 und 4 (S. 39 und 40) zu entnehmen ist, zeigt sich in beiden Gruppen die Induktion des Myokardinfarktes durch die typische Dilatation des linken Ventrikels (signifikante Zunahme von LVIDd und LVIDs). Eine signifikante Zunahme der Wanddicke des Septums lässt sich zum Zeitpunkt der Explantation in beiden Gruppen nachweisen. Die Kontrollgruppe weist im Bereich der posterioren Ventrikelwand eine signifikante Hypertrophie nach Transplantation von NaCl auf. Insbesondere im direkten Vergleich der Differenzen nach Anwendung der unter 3.2.5 erläuterten Formel offenbart sich für die Kontroll-Gruppe eine signifikant ( $p=0,05$ ) vermehrte Zunahme der Wanddicke im Bereich der Hinterwand (LVPWs), welche in

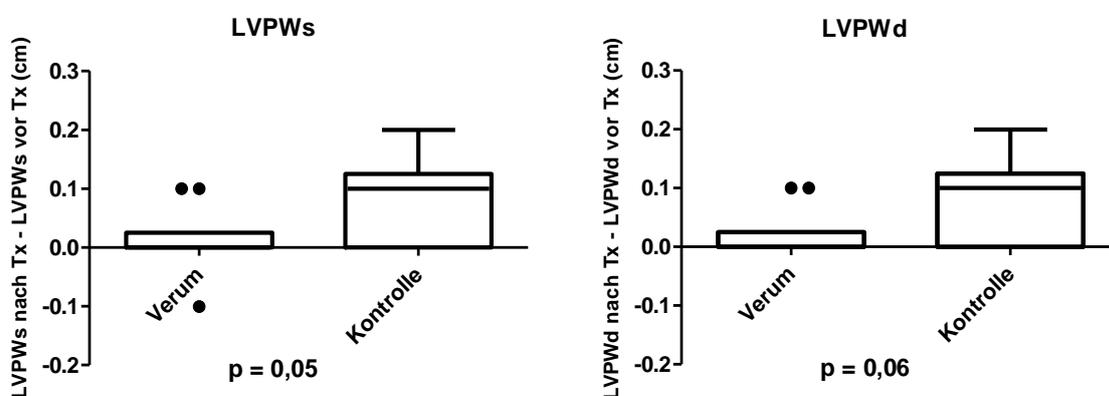
der Verum-Gruppe ausbleibt. Für den Parameter LVPWd wird eine Signifikanz mit einem p-Wert von 0,06 nur knapp verfehlt. (vgl. Abbildung 18, S. 40)

		<b>Gruppe I (Verum)</b>					
		<b>IVSd (cm)</b>	<b>IVSs (cm)</b>	<b>LVIDd (cm)</b>	<b>LVIDs (cm)</b>	<b>LVPWd (cm)</b>	<b>LVPWs (cm)</b>
<b>Gesund (vor Infarkt)</b>	Mittelwert:	0,14	0,24	0,69	0,43	0,21	0,25
	Median:	0,10	0,20	0,70	0,40	0,20	0,25
	Standabw:	0,05	0,05	0,09	0,07	0,03	0,05
	Min:	0,10	0,20	0,50	0,30	0,20	0,20
	Max:	0,20	0,30	0,80	0,50	0,30	0,30
	Range:	0,10	0,10	0,30	0,20	0,10	0,10
<b>Infarkt (4 Wochen nach Infarkt)</b>	Mittelwert:	0,14	0,14	0,87	0,71	0,20	0,27
	Median:	0,10	0,10	0,90	0,70	0,20	0,30
	Standabw:	0,05	0,05	0,07	0,10	0,00	0,05
	Min:	0,10	0,10	0,80	0,60	0,20	0,20
	Max:	0,20	0,20	1,00	0,90	0,20	0,30
	Range:	0,10	0,10	0,20	0,30	0,00	0,10
<b>Transplantation (4 Wochen nach Transplantation)</b>	Mittelwert:	0,18	0,23	0,86	0,70	0,22	0,28
	Median:	0,20	0,20	0,90	0,70	0,20	0,30
	Standabw:	0,04	0,05	0,11	0,12	0,04	0,04
	Min:	0,10	0,20	0,70	0,50	0,20	0,20
	Max:	0,20	0,30	1,00	0,90	0,30	0,30
	Range:	0,10	0,10	0,30	0,40	0,10	0,10
<b>p Infarkt</b>		<b>1,00</b>	<b>0,02</b>	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>	<b>1,00</b>	<b>0,42</b>
<b>p Transplantation</b>		<b>0,13</b>	<b>0,02</b>	<b>0,73</b>	<b>1,00</b>	<b>0,35</b>	<b>0,77</b>

**Tabelle 3:** Intrakardiale Diameter (cm) und Herzwanddicke (cm) der Verum-Gruppe im gesunden, im infarzierten und im zelltransplantierten Tier

		Gruppe II (Kontrolle)					
		IVSd (cm)	IVSs (cm)	LVIDd (cm)	LVIDs (cm)	LVPWd (cm)	LVPWs (cm)
<b>Gesund (vor Infarkt)</b>	Mittelwert:	0,17	0,22	0,72	0,44	0,21	0,24
	Median:	0,20	0,20	0,70	0,40	0,20	0,20
	Standabw:	0,07	0,04	0,08	0,05	0,03	0,05
	Min:	0,10	0,20	0,60	0,40	0,20	0,20
	Max:	0,30	0,30	0,80	0,50	0,30	0,30
	Range:	0,20	0,10	0,20	0,10	0,10	0,10
<b>Infarkt (4 Wochen nach Infarkt)</b>	Mittelwert:	0,13	0,18	0,88	0,73	0,20	0,26
	Median:	0,10	0,20	0,90	0,70	0,20	0,30
	Standabw:	0,05	0,06	0,10	0,07	0,05	0,05
	Min:	0,10	0,10	0,70	0,60	0,10	0,20
	Max:	0,20	0,30	1,00	0,80	0,30	0,30
	Range:	0,10	0,20	0,30	0,20	0,20	0,10
<b>Transplantation (4 Wochen nach Transplantation)</b>	Mittelwert:	0,21	0,22	0,94	0,76	0,28	0,34
	Median:	0,20	0,20	0,90	0,70	0,30	0,30
	Standabw:	0,03	0,04	0,15	0,13	0,08	0,08
	Min:	0,20	0,20	0,70	0,60	0,20	0,20
	Max:	0,30	0,30	1,20	1,00	0,40	0,50
	Range:	0,10	0,10	0,50	0,40	0,20	0,30
<b>p Infarkt</b>		<b>0,13</b>	<b>0,07</b>	<b>0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>	<b>1,00</b>	<b>0,35</b>
<b>p Transplantation</b>		<b>0,01</b>	<b>0,20</b>	<b>0,35</b>	<b>0,49</b>	<b>0,03</b>	<b>0,04</b>

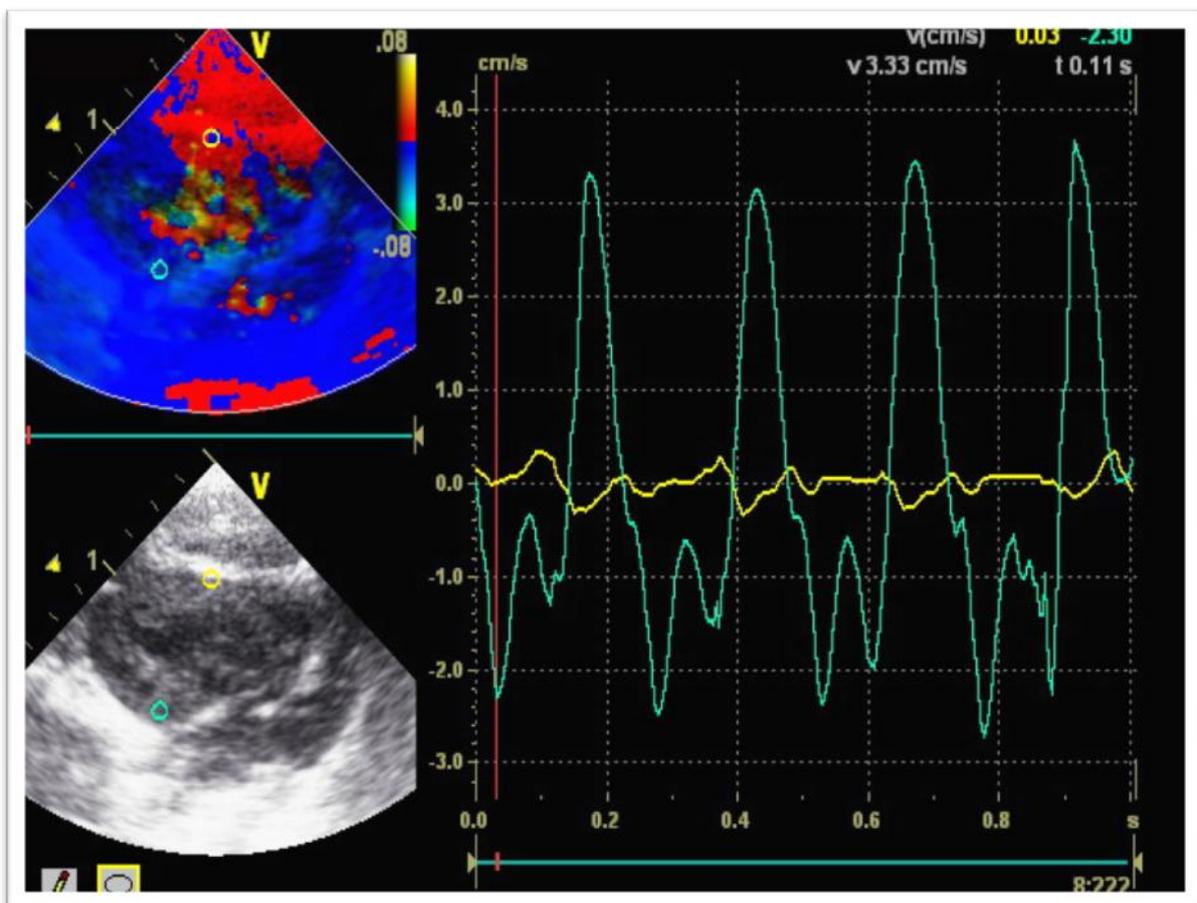
**Tabelle 4:** Intrakardiale Diameter (cm) und Herzwanddicke (cm) der Kontroll-Gruppe im gesunden, im infarzierten und im NaCl-injizierten Tier



**Abbildung 18:** Darstellung der vermehrten Zunahme der Hinterwanddicke in der Kontroll-Gruppe nach Transplantation (Tx) im direkten Vergleich mit der Verum-Gruppe

### 4.2.3 Daten aus der Gewebe-Doppler Echokardiographie (TDI)

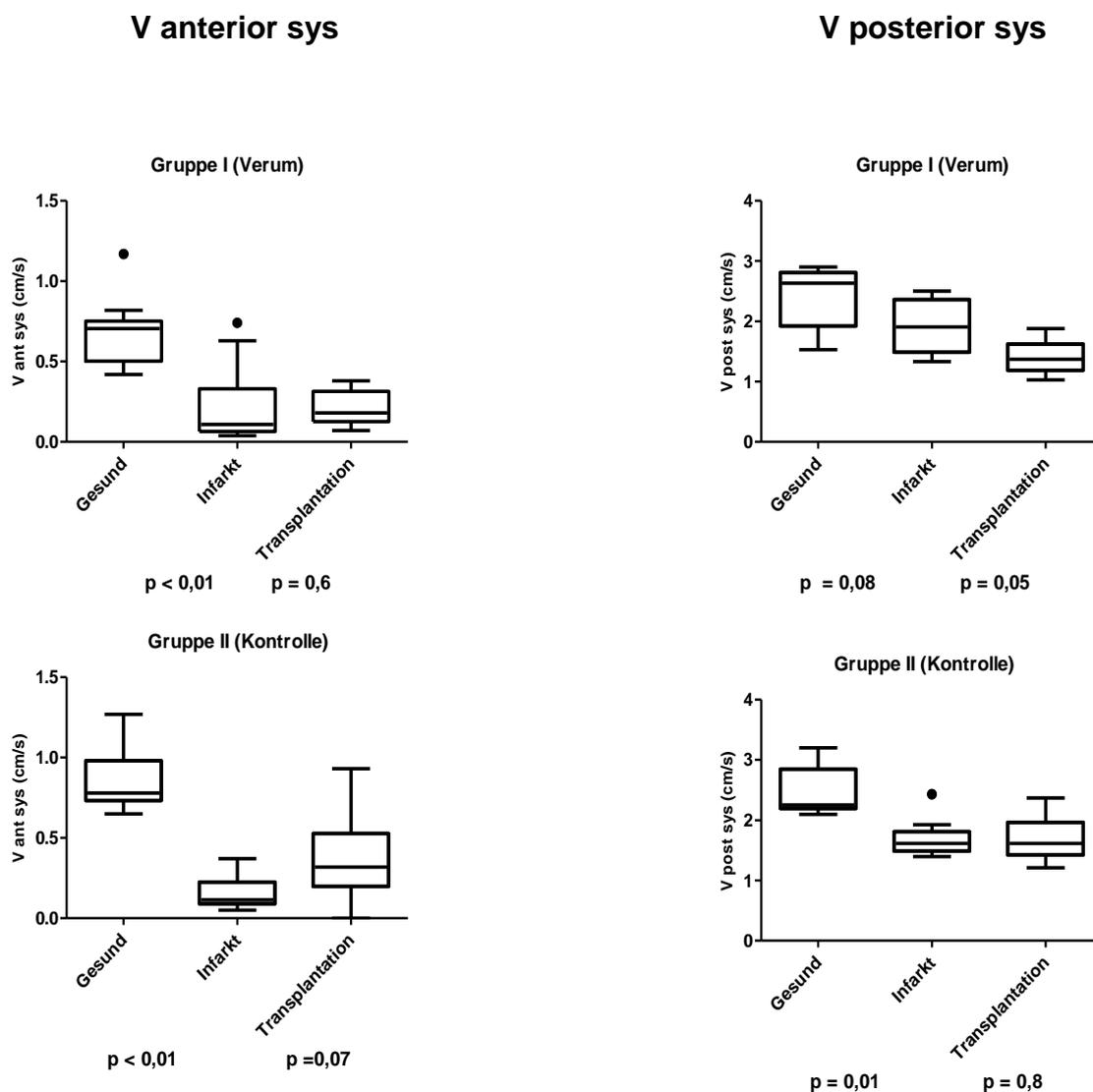
Im Gewebe-Doppler-Verfahren werden anteriore und posteriore systolische Wandbewegungsgeschwindigkeiten ( $V_{\text{sys}}$ ) ermittelt. Die gewonnenen Werte für gesunde Tiere der Verum-Gruppe liegen im Mittel anterior bei  $0,68 \pm 0,22$  cm/s und posterior bei  $2,37 \pm 0,51$  cm/s. Die gesunden Tiere der Kontroll-Gruppe weisen mit  $0,86 \pm 0,18$  cm/s anterior und  $2,44 \pm 0,38$  cm/s posterior Daten im ähnlichen Bereich auf. (vgl. Tabelle 7, Seite 43)



**Abbildung 19:** Darstellung der systolischen Wandbewegungsgeschwindigkeiten im TDI nach Infarktinduktion (TTE2). Gelbe Kurve =  $V_{\text{anterior}}$ , Grüne Kurve =  $V_{\text{posterior}}$

Anhand des chronologischen Verlaufes der Untersuchungen zu den drei bekannten Zeitpunkten werden in beiden Gruppen wiederum zuerst die erfolgreiche Infarktinduktion sowie eventuelle Veränderungen nach der Transplantation geprüft. In beiden Gruppen zeigt sich zunächst eine hochsignifikante Abnahme der anterioren

Wandbewegungsgeschwindigkeit nach Infarktinduktion. (vgl. Abbildung 19, S.41 und Abbildung 20) In der Kontrollgruppe zeigt sich mit einem p-Wert von 0,01 zudem eine signifikante Abnahme der Wandbewegungsgeschwindigkeit nach Infarktinduktion auch in der posterioren Ventrikelwand. Die Verum-Gruppe weist eine Abnahme der V sys im Bereich der Hinterwand zum Zeitpunkt drei auf, also nach KMS-Transplantation. Mit einem p-Wert von 0,05 wird eine Signifikanz allerdings hier verfehlt. Die Darstellung mittels der Box-plot-Diagramme (vgl. Abbildung 20) verdeutlicht diese Feststellungen. (vgl. auch Tabelle 7, S.43)



**Abbildung 20:** Graphische Gegenüberstellung der Veränderungen von anteriorer und posteriorer Wandbewegungsgeschwindigkeit nach Infarktinduktion sowie nach Transplantation von KMS bzw. NaCl

		Gruppe I (Verum)		Gruppe II (Kontrolle)	
		V ant.sys. (cm/s)	V.post.sys. (cm/s)	V ant.sys. (cm/s)	V.post.sys. (cm/s)
<b>Gesund (vor Infarkt)</b>	Mittelwert:	0,68	2,37	0,86	2,44
	Median:	0,71	2,63	0,78	2,25
	Standabw:	0,22	0,51	0,18	0,38
	Min:	0,42	1,53	0,65	2,10
	Max:	1,17	2,90	1,27	3,20
	Range:	0,75	1,37	0,61	1,10
<b>Infarkt (4 Wochen nach Infarkt)</b>	Mittelwert:	0,22	1,91	0,16	1,69
	Median:	0,11	1,91	0,12	1,62
	Standabw:	0,25	0,45	0,10	0,30
	Min:	0,04	1,33	0,05	1,40
	Max:	0,74	2,50	0,37	2,43
	Range:	0,71	1,17	0,31	1,03
<b>Transplantation (4 Wochen nach Transplantation)</b>	Mittelwert:	0,21	1,41	0,37	1,68
	Median:	0,18	1,37	0,32	1,62
	Standabw:	0,11	0,26	0,27	0,35
	Min:	0,07	1,03	0,00	1,21
	Max:	0,38	1,88	0,93	2,37
	Range:	0,31	0,85	0,93	1,16
<b>p Infarkt</b>		<b>&lt;0,01</b>	<b>0,08</b>	<b>&lt;0,01</b>	<b>0,01</b>
<b>p Transplantation</b>		<b>0,57</b>	<b>0,05</b>	<b>0,07</b>	<b>0,77</b>

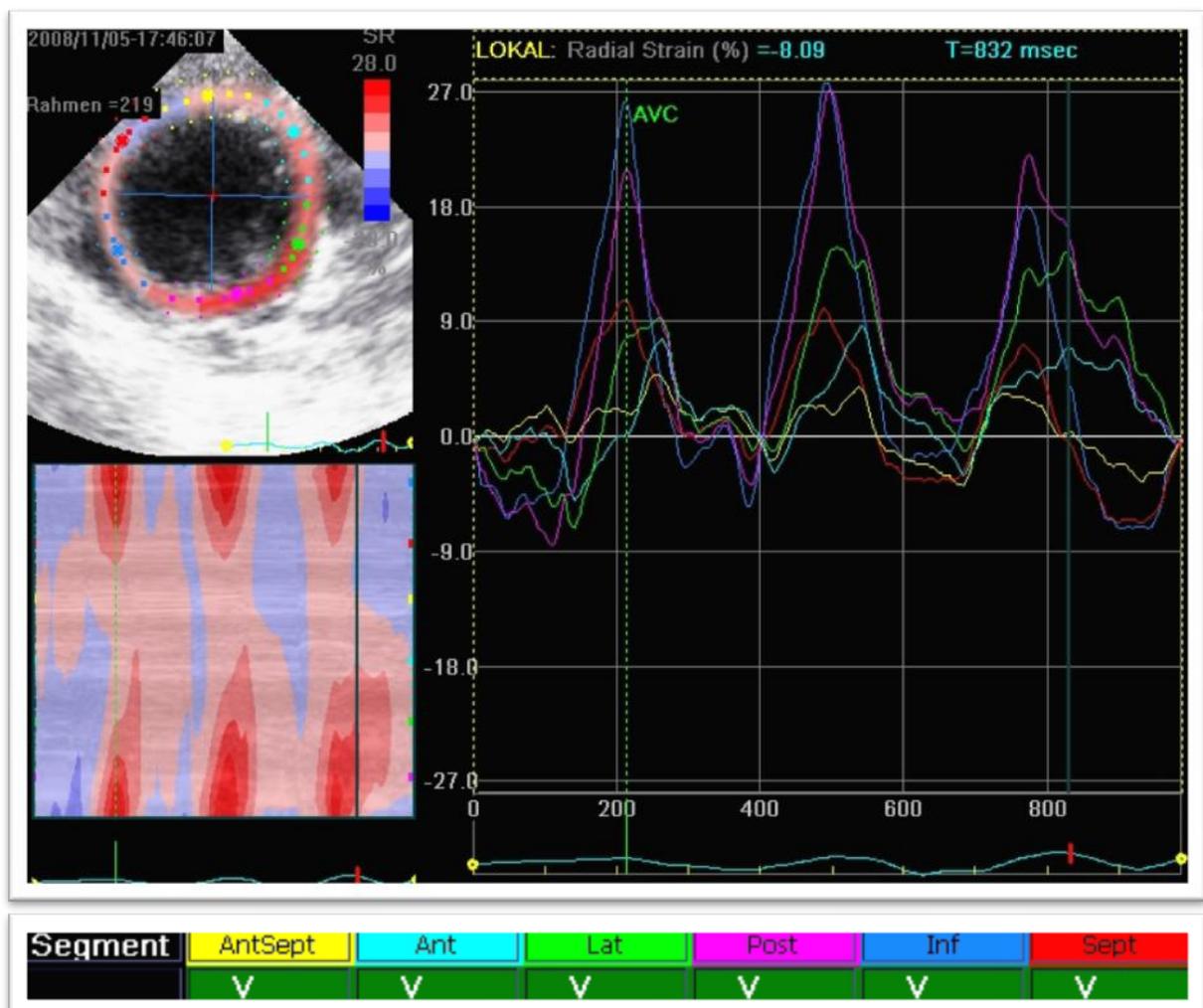
**Tabelle 7:** Wandbewegungsgeschwindigkeiten beider Gruppen im gesunden, im infarzierten und im transplantierten Tier

Der direkte Vergleich beider Gruppen ergibt hinsichtlich der Entitäten V sys anterior ( $p=0,26$ ) und V sys posterior ( $p=0,09$ ) keine signifikanten Unterschiede im Veränderungsverhalten nach Transplantation. Der deutlich geringere p-Wert für die Hinterwand unterstreicht allerdings die oben erläuterte verzögerte Verringerung der Wandbewegungsgeschwindigkeit nach Transplantation der Verum-Gruppe in diesem Bereich. Die V sys nimmt also in der Kontroll-Gruppe schneller und stärker ab als in der Verum-Gruppe.

#### 4.2.4 Daten aus der 2D-Strain-Analyse

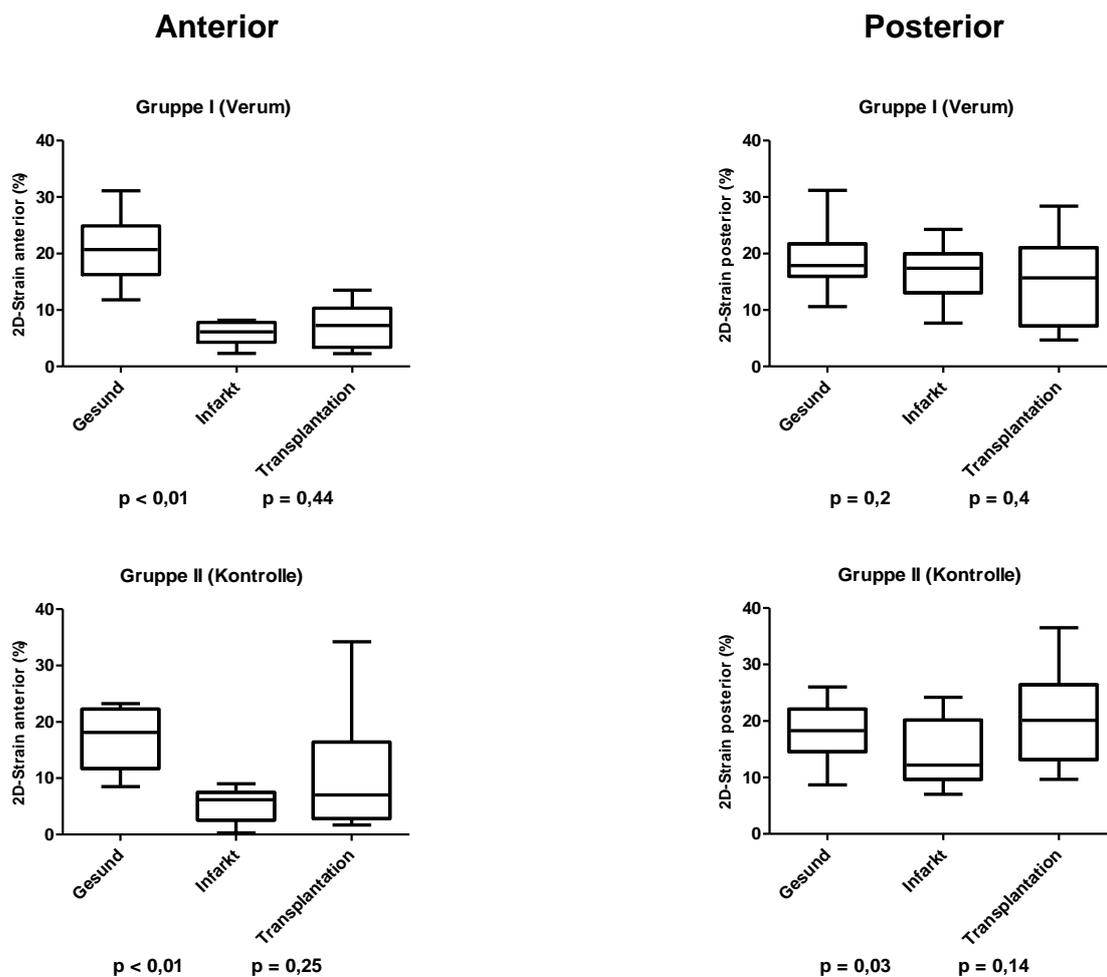
Die 2D-Strain-Analyse erlaubt eine genauere Beurteilung der Ventrikelfunktion und eventueller Einschränkungen. Neben Vorder- und Hinterwand werden die laterale und die inferiore Wand sowie das Septum beurteilt. Damit wird eine Beantwortung der dritten Fragestellung nach Veränderungen in bestimmten Arealen ermöglicht.

Wie in Abbildung 21 gut ersichtlich, demaskiert sich die Funktionseinschränkung nach Infarktinduktion besonders in den anterioren und septalen Bereichen. (vgl. Abbildung 21, türkise, rote und gelbe Kurve) Die Funktionskurven der inferioren und posterioren Wand (blaue und pinke Kurve) hingegen zeigen keinerlei Einschränkungen in diesem Bereich. (vgl. hierzu auch den Normalbefund in Abbildung 12, S. 30)



**Abbildung 21:** Darstellung der Funktionskurven für einzelne Ventrikelbereiche aus der 2D-Strain-Analyse nach Infarktinduktion (TTE2)

Stellt man die Ergebnisse aus der Analyse von anteriorer Wand der posterioren gegenüber (vgl. Abbildung 22), wird nicht nur die hochsignifikante Infarktinduktion, sondern auch die äußerst genaue Lokalisation der Infarktnarbe deutlich.

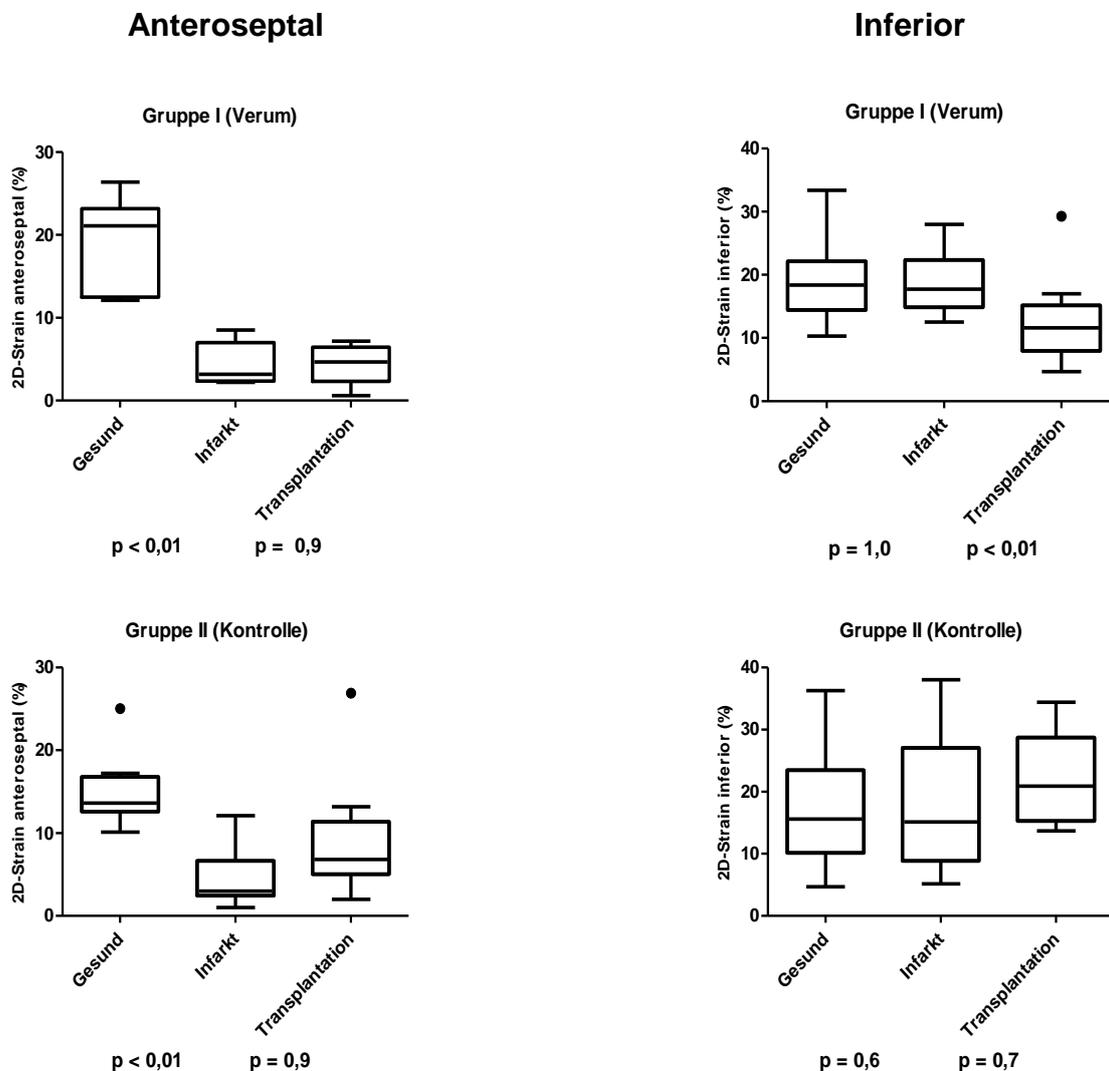


**Abbildung 22:** Gegenüberstellung der Ergebnisse aus der anterioren und posterioren 2D-Strain-Analyse zu den Zeitpunkten Gesund, Infarkt und Transplantation

Auch hier kommt wieder die bereits in den vorhergehenden Untersuchungen diagnostizierte signifikante Funktionsverschlechterung der linksventrikulären Hinterwand nach Infarktinduktion in der Kontrollgruppe zum Ausdruck ( $p=0,03$ ). Eine signifikante Verbesserung nach KMS-Transplantation lässt sich jedoch weder im

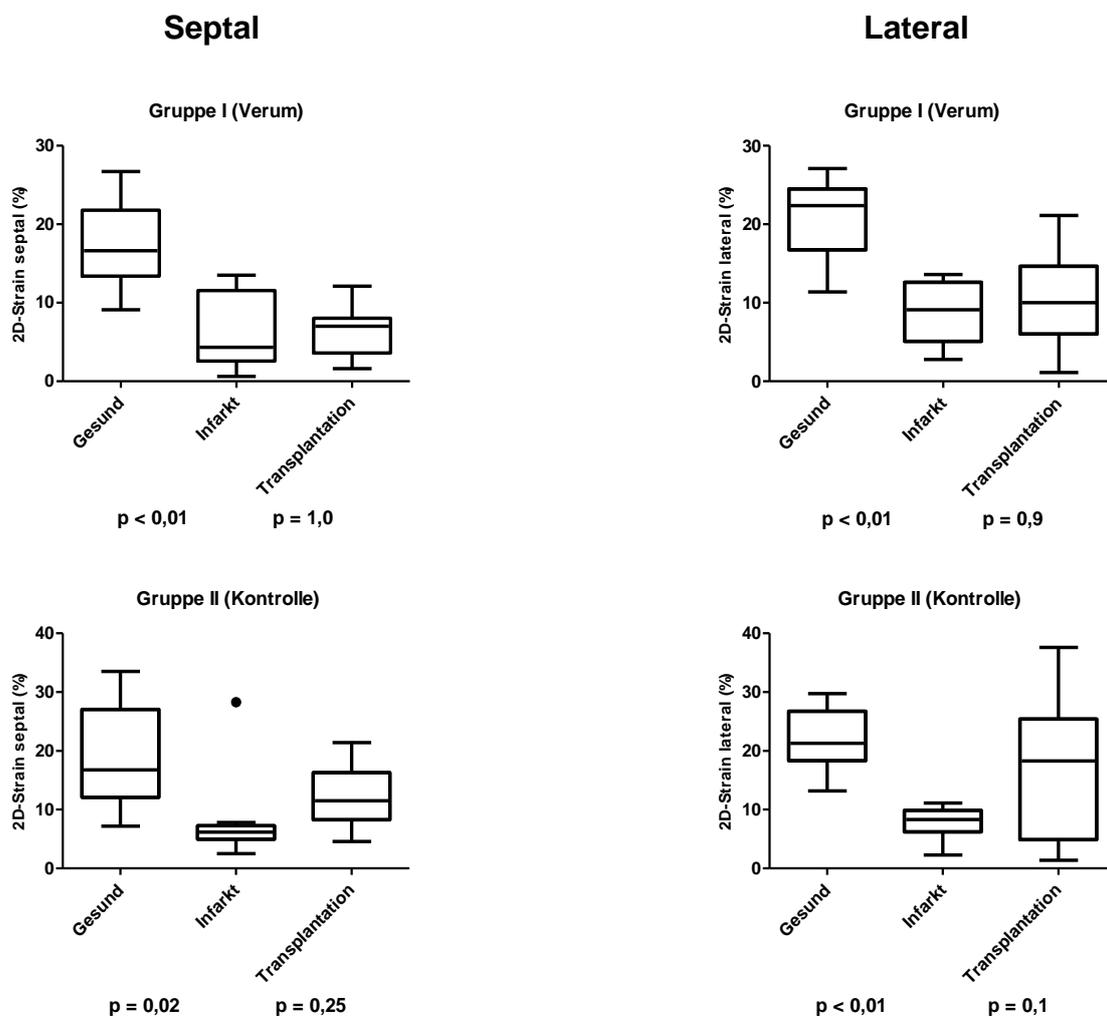
anterioren Infarktgebiet noch im Bereich der gegenüberliegenden Hinterwand nachweisen. (vgl. Abbildung 22, Seite 45)

Der Vergleich der Ergebnisse aus dem anteroseptalen mit dem inferioren Bereich offenbart ein ähnliches Bild. Der Infarkt dehnt sich über den anteroseptalen Bereich aus, der inferiore Bereich des linken Ventrikels bleibt verschont. Es zeigt sich allerdings eine signifikante Verschlechterung der inferioren Funktion ( $p < 0,01$ ) nach KMS-Transplantation in der Verum-Gruppe. (vgl. Abbildung 23), was im Sinne der dritten Fragestellung nach lokalisierten Veränderungen zur Diskussion steht.



**Abbildung 23:** Gegenüberstellung der Ergebnisse aus der anteroseptalen und inferioren 2D-Strain-Analyse zu den Zeitpunkten Gesund, Infarkt und Transplantation

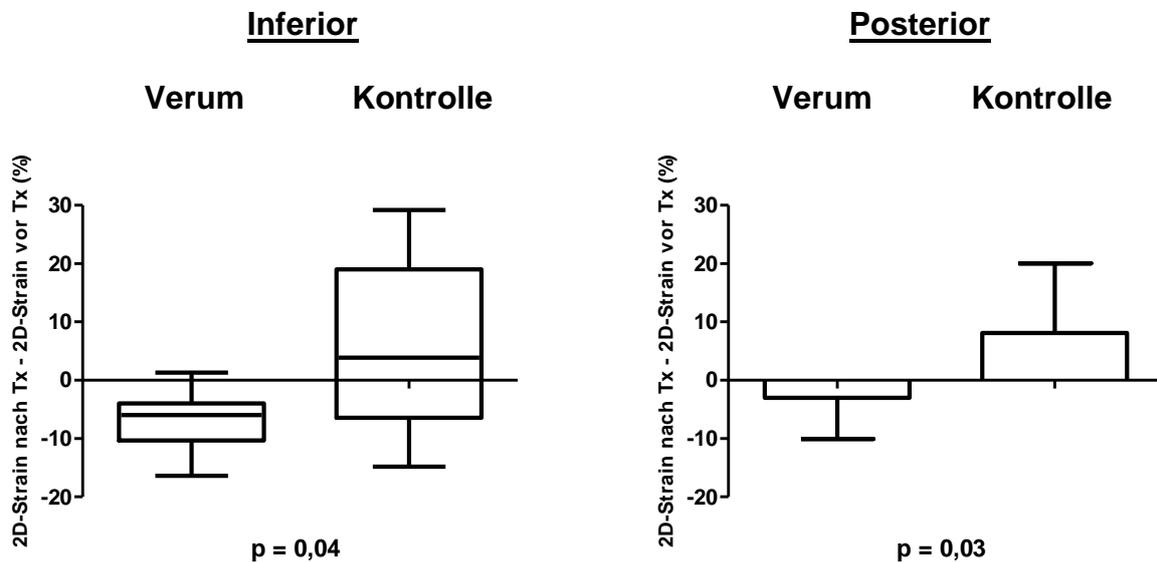
Die graphische Darstellung in Abbildung 24 verdeutlicht schließlich die Ausbreitung der Kontraktionsstörung über das gesamte Septum und die laterale Wand, was sich auch in der Folge durch die Transplantation von KMS nicht signifikant ändert.



**Abbildung 24:** Darstellung der Ergebnisse aus der septalen und lateralen 2D-Strain-Analyse zu den Zeitpunkten Gesund, Infarkt und Transplantation

Bei der Aufarbeitung der Daten aus dem posterioren und inferioren Bereich fällt auf, dass es nach Transplantation von KMS (Verum-Gruppe) eher zu einer Verschlechterung der Funktion kommt, während die Kontroll-Gruppe (Transplantation von NaCl) in den gleichen Arealen eine Verbesserungstendenz aufweist. (vgl. Abbildung 22, Seite 45 und 23, Seite 46) Betrachtet man beide

Gruppen getrennt voneinander, weist diese Beobachtung zunächst nur hinsichtlich der inferioren 2D-Strain-Analyse in der Verum-Gruppe eine Signifikanz auf. Im direkten Vergleich der Veränderungstendenzen in beiden Gruppen mittels Differenzbildung der Ergebnisse nach Transplantation und vor Transplantation ergibt sich jedoch für beide Segmente (inferior und posterior) eine Signifikanz. (vgl. Abbildung 25) Die Testung der übrigen 2D-Strain Parameter mit diesem Verfahren zeigt keine weiteren Auffälligkeiten. Damit ist die Fragestellung drei beantwortet.



**Abbildung 25:** Darstellung der signifikant unterschiedlichen Funktionsänderungen aus der inferioren und posterioren 2D-Strain-Analyse im direkten Vergleich beider Gruppen

## 4.3 Histologische Daten

### 4.3.1 Infarktgröße

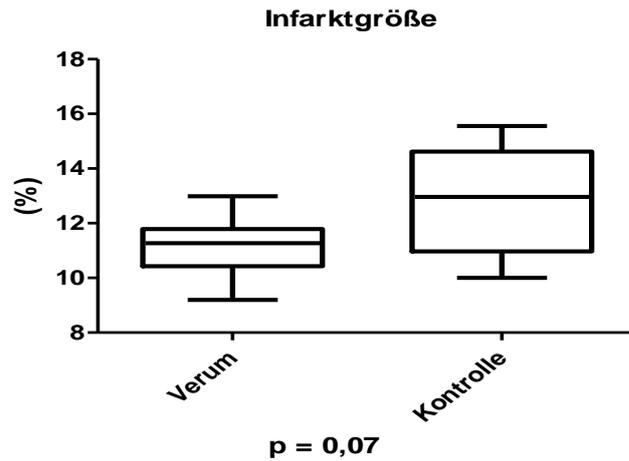
Die Größe des Infarktes wird als prozentualer Anteil des histologisch als Narbengewebe erkannten Herzvolumens am Herzgesamtvolumen ermittelt, wie unter 3.2.4.4 erläutert.

Wie in Tabelle 8 ersichtlich, wird bei der Fragestellung nach potentieller Verkleinerung der morphologischen Infarktgröße nach intravenöser KMS-Transplantation keine statistische Signifikanz erreicht. Mit einem p-Wert von 0,07 lässt sich jedoch sicherlich eine Tendenz zu eher kleineren Infarkten in der Verum-Gruppe ( $11,15\% \pm 1,08$ ), verglichen mit der ermittelten durchschnittlichen Infarktgröße in der Kontroll-Gruppe ( $12,80 \pm 1,84$ ), aufzeigen. (vgl. auch Abbildung 26, S. 50) Damit ist die vierte Fragestellung beantwortet.

		Herz- gesamt- volumen (mm <sup>3</sup> )	Hohl- raum- volumen RV(mm <sup>3</sup> )	Hohl- raum- volumen LV(mm <sup>3</sup> )	Infarkt- volumen (mm <sup>3</sup> )	Herz- muskel- volumen (mm <sup>3</sup> )	Infarkt- größe (%)
<b>Gruppe I (Verum)</b>	Mittelwert:	995,49	56,82	109,55	92,70	829,12	11,15
	Median:	1013,66	51,24	81,18	90,74	819,73	11,27
	Standabw:	113,16	24,89	54,78	16,96	112,93	1,08
	Min:	816,35	33,05	51,17	61,36	643,04	9,20
	Max:	1140,41	119,11	231,53	129,23	994,89	12,99
<b>Gruppe II (Kontrolle)</b>	Mittelwert:	855,31	48,53	101,43	91,62	705,34	12,80
	Median:	815,09	51,22	88,93	80,63	699,29	12,97
	Standabw:	169,35	16,38	56,75	27,35	132,89	1,84
	Min:	629,50	21,11	43,96	54,08	486,66	10,00
	Max:	1187,08	76,34	253,86	135,46	883,37	15,55

p=0,07

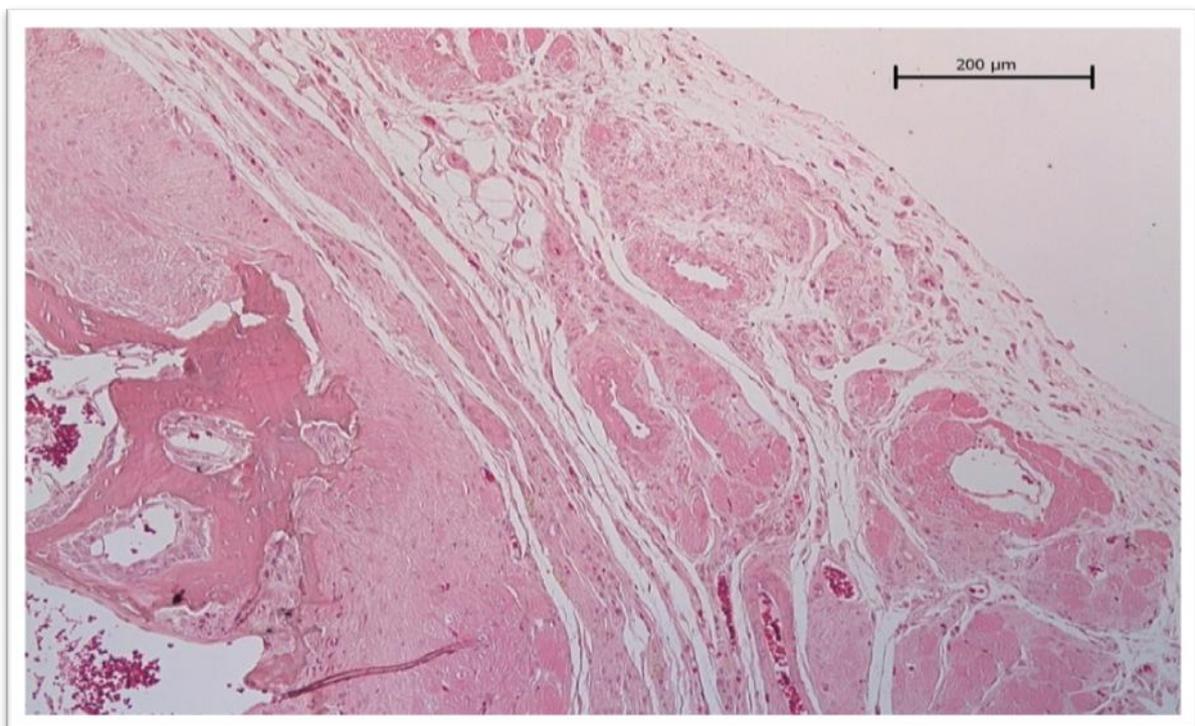
**Tabelle 8:** Bestimmung der Infarktgröße (%) als Anteil des Infarkt volumens am Herzmuskelvolumen unter Zuhilfenahme der Formel: **Herzgesamtvolumen – Hohlraumvolumen LV – Hohlraumvolumen RV = Herzmuskelvolumen**



**Abbildung 26:** Darstellung der berechneten Infarktgröße beider Gruppen im direkten Vergleich

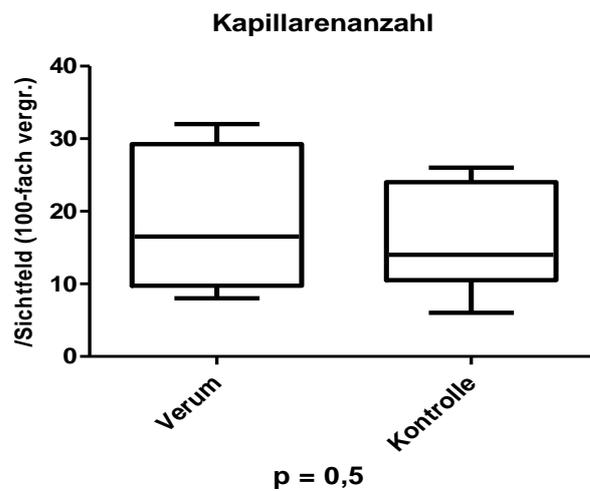
### 4.3.2 Kapillareinsprossung

Die Daten aus der Zählung der Kapillaren im HE-gefärbten Präparat unter dem Lichtmikroskop (vgl. Abbildung 27) verteilen sich über eine Range von 24 Kapillaren/Sichtfeld für die Verum-Gruppe und 20 Kapillaren/Sichtfeld für die Kontrollgruppe.



**Abbildung 27:** Kapillareinsprossung im Infarktareal in der 100-fachen Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop (HE-Färbung)

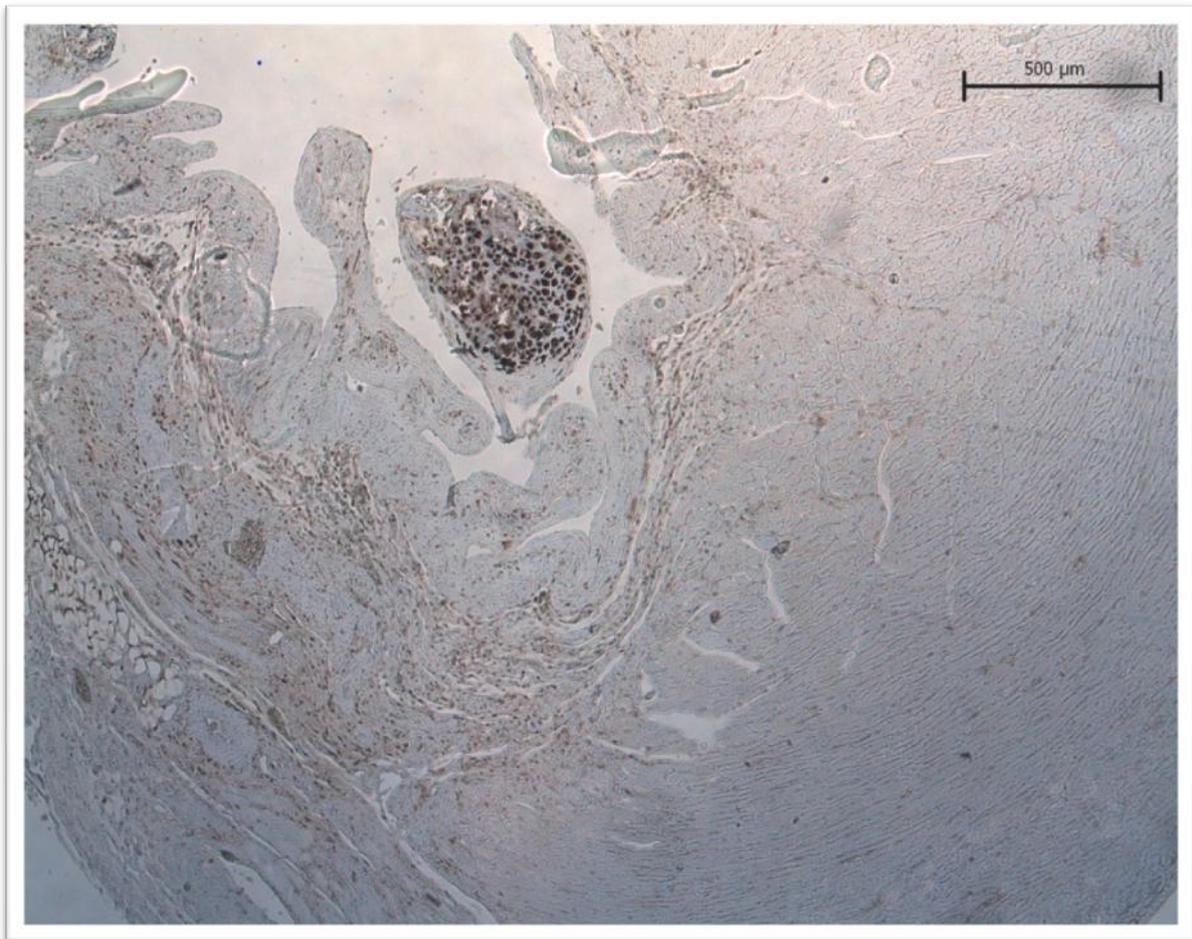
Die durchschnittliche Kapillarenanzahl beträgt in der Verum-Gruppe  $18,8 \pm 9,3$  und in der Kontroll-Gruppe  $15,8 \pm 6,9$ , was auch aufgrund der relativ hohen Streuung der Werte nur einem p-Wert von 0,5 entspricht. (vgl. Abbildung 28) Damit ist eine Signifikanz für die fünfte Fragestellung nach vermehrter Kapillareinsprossung durch intravenöse KMS-Transplantation nicht gegeben.



**Abbildung 28:** Darstellung der Kapillarenanzahl pro Sichtfeld in der 100-fachen Vergrößerung

### 4.3.3 Chondroide Metaplasie

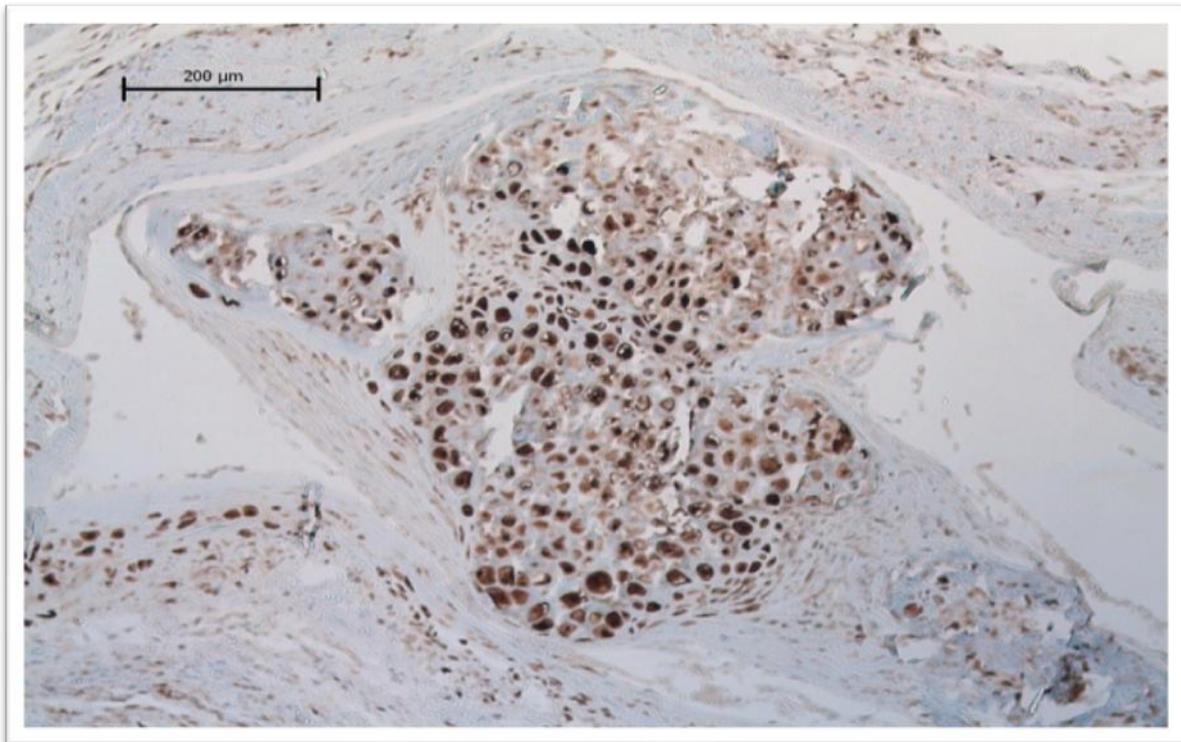
Mittels immunhistochemischer Färbung mit dem monoklonalen S-100-Antikörper wird der Nachweis von Chondrozyten im Infarktgebiet vereinfacht. (vgl. Abbildung 29 und 30, S.52 und 53) Der Nachweis gelingt in drei Präparaten der Verum-Gruppe und in fünf Präparaten der Kontroll-Gruppe, was einem signifikanten Unterschied ( $p < 0,01$ ) entspricht. Chondrozyten finden sich also in den Infarktgebieten nach Transplantation von KMS und nach Injektion von NaCl.



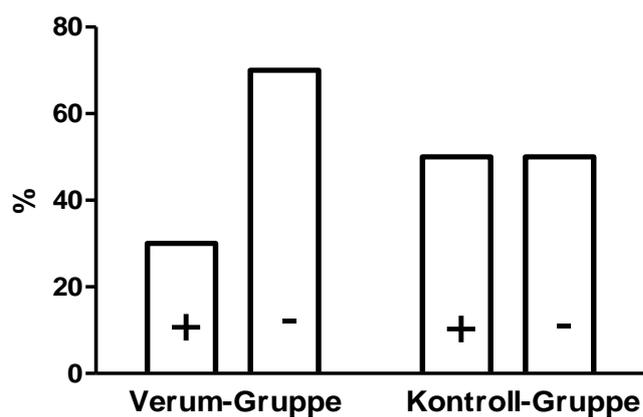
**Abbildung 29:** Immunhistochemische Färbung mit dem monoklonalen S-100-Antikörper zur Detektion chondroider Metaplasie in der 40-fachen Vergrößerung

Eine potentielle chondroide Metaplasie durch Fehldifferenzierung der KMS ist daher nicht gegeben. Betrachtet man die Existenz der Knorpelzellen jedoch als Teil stattfindender Umbauprozesse im Rahmen der Infarktnarbenbildung, ist hier möglicherweise von einer signifikant verringerten Kalzifizierungs- und

Ossifizierungstendenz nach der intravenösen Transplantation auszugehen, was im Sinne der sechsten Fragestellung zur Diskussion steht. (vgl. Abbildung 31)



**Abbildung 30:** Immunhistochemische Färbung mit dem monoklonalen S-100-Antikörper zur Detection chondroider Metaplasie in der 100-fachen Vergrößerung



$p < 0,01$

**Abbildung 31:** Vorkommen von chondroider Metaplasie in % der Präparate (+ chondroider Metaplasie/ - keine chondroide Metaplasie)

## **5 Diskussion**

### **5.1 Untersuchungsansatz**

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde die Zelltherapie als ein mögliches Verfahren zur Behandlung der chronischen Herzinsuffizienz untersucht. Die Daten zu dieser Fragestellung wurden vier Wochen nach intravenöser Transplantation von autologen KMS bei myokardinfarzierten Ratten erhoben und sind Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

In den Fokus experimenteller und klinischer Forschung ist in den letzten Jahren das Remodeling gerückt, ein bedeutender pathophysiologischer Effekt der Erkrankung, der eine Kaskade von Veränderungen der Ventrikelmorphologie, -geometrie und -funktion in Gang setzt (Goldstein, et al., 1998; Greenberg, 2002; Udelson, 2004). Die Transplantation von KMS erscheint hier als ein suffizienter, ursächlicher Therapieansatz, der diesen Prozess aufhaltbar, möglicherweise sogar umkehrbar (Reverse Remodeling) macht. Die Bewertung der Dimension dieses gesteigerten Regenerationspotentials ist jedoch noch in der Diskussion und durch kontroverse wissenschaftliche Publikationen gekennzeichnet. Der klinische Nutzen für den Menschen ist aktuell Gegenstand prospektiver Langzeitstudien, wobei die ersten Follow-up-Ergebnisse eher ernüchternde Ergebnisse erbringen. Insgesamt besteht für den therapeutischen Ansatz der KMS-Transplantation weiterhin intensiver Forschungsbedarf. Ein Ziel der vorliegenden Studie ist daher, Erkenntnisse über eventuelle funktionelle und morphologische Veränderungen nach intravenöser KMS-Transplantation im ischämischen, kardiomyopathischen Herzen zu gewinnen.

Adulten Stammzellen des Knochenmarks wurde in früheren Jahren lediglich die Fähigkeit zur Hämatopoese (hämatopoetische Vorläuferzellen) zugestanden. Das Prinzip der KMS-Transplantation wird daher auf dem Gebiet der Blutbildung seit vielen Jahren in der onkologischen Therapie der Blutzelltumoren durchgeführt. Aktuellen Studien zufolge sind adulte KMS jedoch im Stande, auch andere Zellen des Körpers zu ersetzen. Die Regeneration von Kardiomyozyten (Dawn and Bolli, 2005), aber auch Vaskulo- bzw. Angiogenese (Nagaya, et al., 2004), sind möglich, bedürfen in den kommenden Jahren jedoch sicherlich noch weiterer wissenschaftlicher Analyse, da für dieses Phänomen der Transdifferenzierung adulter Knochenmarkstammzellen (KMS) unterschiedliche Erklärungsmodelle

existieren, die sich zum Teil überschneiden. Es ist möglich, dass HSZ, MSZ und EPZ aus dem Knochenmark erst am Wirkungsort durch Umprogrammierung Multipotenz erlangen, um sich in den benötigten Zelltyp auszudifferenzieren. Eine Abwandlung dieses Modells ist die Aktivierung der gewebespezifischen multipotenten Stammzellen, welche sich dann vermehrt reproduzieren und nach Transdifferenzierung Pluripotenz erlangen (Mailänder, 2005). Eine andere Variante geht einfach von der Existenz multipotenter Stammzellen als eigenständiger Zellgruppe oder als Unterpopulation einer anderen Zellgattung direkt im Knochenmark aus (Jiang, et al., 2002).

Ein weiterer physiologischer Effekt besteht darin, dass nach einem Untergang von Gewebe KMS nach aktivem Überschreiten der Knochen/Blutbarriere in die spezifischen erkrankten Gewebe gelenkt werden. Dieser Vorgang wird als Homing bezeichnet und ist ebenfalls Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen (Jackson, et al., 2001; Lapidot, et al., 2005). Es scheinen chemotaktische Faktoren zu existieren, die nach einer Zellschädigung oder Ischämie vermehrt produziert werden. Diese senden systemische Reize aus, die die endogene Produktion sowie die Freisetzung von pluripotenten Stammzellen im Knochenmark anregen und diese in die betroffenen Gewebe lenken. Einer dieser Faktoren, der stem cell derived factor 1 (SDF-1) und der dazugehörige spezifische Rezeptor CXCR4, konnte bereits 1999 beschrieben werden (Peled, et al., 1999).

Der erläuterte offene Wissensstand im Hinblick auf unterschiedliche Erklärungsmodelle zur Transdifferenzierung und zum Homing der aus dem Knochenmark gewonnenen Stammzellen führt zu folgender Überlegung: Verschiedene Zelltypen werden durch ein bisher noch nicht endgültig geklärtes Zusammenspiel von Reizen, Faktoren und Vorgängen im Knochenmark oder möglicherweise erst am Wirkungsort entsprechend programmiert oder umprogrammiert. Daher werden die KMS in der vorliegenden Arbeit bewusst nicht isoliert oder anderweitig behandelt, sondern möglichst zeitnah, also ohne Vitalitätsverlust, transplantiert.

Die Induktion eines Myokardinfarktes im Rattenmodell zur Evaluation des Krankheitsbildes Herzinsuffizienz und möglicher Therapieformen ist in der tierexperimentellen medizinischen Forschung etabliert. Die Akquise von Daten zur Quantifizierung myokardialer Schäden und funktioneller Einschränkungen oder Verbesserungen ist durch die Größenverhältnisse der Rattenherzen jedoch noch

immer erschwert. Invasive Methoden, zum Beispiel manometrische Verfahren unter Verwendung von Mikrokathetern, sind mit einer relevant erhöhten Komplikations- und Sterberate assoziiert.

Die TTE hat sich als nichtinvasives und kosteneffektives Verfahren im klinischen Alltag manifestiert. 1994 gelang Litwin et al. die grobe Evaluation von Morphologie und globaler Ventrikelfunktion im Rattenmodell (Litwin, et al., 1994). Die Bestimmung genauerer Werte war aufgrund technischer Einschränkungen, wie der geringen Auflösung, nicht möglich. Selbst die klinische Anwendung dieser Methode beim Menschen wurde durch die geringe Sensivität, geschuldet den Auflösungsproblemen, lange Zeit limitiert. Moderne Ultraschall-Geräte erlauben die Anwendung neuer Verfahren, wie Gewebe-Doppler und 2D-Strain-Analyse. Diese ermöglichen heute differenzierte Aussagen über die regionale Kinetik und Morphologie. Im Rattenmodell wurde die Überlegenheit dieser Methode im Vergleich mit der konventionellen Echokardiographie für gesunde Herzen bereits nachgewiesen (Hartmann, et al., 2007). Daten zur Aussagekraft in einem Herzinsuffizienzmodell liegen bisher nicht vor. Weiteres Ziel der vorliegenden Untersuchung ist deshalb, den Nutzen dieses neuen Verfahrens zur sensitiveren Einschätzung von Veränderungen im kardiomyopathischen Herzen tierexperimentell zu belegen und diesen neuen methodischen Zugriff für zukünftige experimentelle, kardiovaskuläre Forschung zu etablieren.

## **5.2 Kardiale Stammzelltherapie – der intravenöse Applikationsweg**

Als mögliche Applikationswege für die kardiale Zelltherapie kommen prinzipiell der intramyokardiale, der intrakoronare und der systemische in Betracht. Innerhalb dieser drei Möglichkeiten werden zur Zeit verschiedene Applikationssysteme erprobt. Intramyokardiale Verfahren von epikardial oder endokardial injizieren die Zellen direkt ins Infarktgebiet oder in die Grenzgebiete zwischen Infarktnarbe und vitalem Myokard. Diese Injektion schafft einen interzellulären Hohlraum, der eine Reihe von Problemen mit sich bringt. Zum einen ist davon auszugehen, dass bei fehlendem Kontakt mit Blut oder umliegenden Kardiomyozyten ein großer Teil der applizierten Zellen im Suspensionsdepot nicht überlebt. Dieser Effekt wird durch die programmierte Inflammationsreaktion nach der myokardialen Gewebsverletzung noch potenziert: Die überlebenden transplantierten Zellen werden durch

einströmende Makrophagen phagozytiert, bevor sie ihre regenerative Wirkung ausüben können (Merx, et al., 2005). Zum anderen kann schon allein durch Punktion des Myokards, erst recht aber durch Schaffung eines intramyokardialen Flüssigkeitsdepots, ein arrhythmogenes ektopes Zentrum geschaffen werden. Nicht zuletzt birgt jede Ventrikelpunktion, insbesondere im infarzierten Herzen, das nicht unerhebliche Risiko einer Ventrikelperforation. Die transepikardiale Route ist wegen der notwendigen Thorakotomie wahrscheinlich nur im Falle einer erforderlichen Operation zu realisieren (Menasche, et al., 2001). Die transendokardiale Route ist unter Verwendung arterieller Herzkatheter möglich und mittlerweile in der klinischen Erprobung (Fuchs, et al., 2006). Neben den bereits erwähnten Problemen einer intramyokardialen Applikation kommt hierbei erschwerend die genaue Platzierung der Injektionen hinzu. Aufwendige, dreidimensionale, elektromechanische Mappingverfahren zur Überwindung dieser Hürde sind Gegenstand aktueller wissenschaftlicher Forschung.

Im Rahmen einer erforderlichen Herzkatheteruntersuchung scheint es daher einfacher und komplikationsärmer, die Zellen intrakoronar zu applizieren. Nachteil hierbei ist die begrenzte Invasion der transplantierten Zellen ins Infarktareal aufgrund fehlender Perfusion (Strauer and Kornowski, 2003). Die ersten Ergebnisse der großen klinischen Studien BOOST und REPAIR-AMI attestieren geringe Komplikationsraten, werfen jedoch auch die Frage nach der Dimension des klinischen Nutzens wegen der abnehmenden/fehlenden Langzeitwirkung auf (Meyer, et al., 2009). Möglich wäre, dass die Applikation von Stammzellen in regelmäßigen Abständen wiederholt werden muss, um einen nachhaltigen Benefit zu erreichen. Die Durchführung einer Herzkatheteruntersuchung im Rahmen eines kardialen Ereignisses ist klinischer Standard. Eine gleichzeitige Applikation von KMS bringt nur geringen Mehraufwand und ist im Begriff, sich klinisch zu etablieren. Sollten jedoch mehrfache, regelmäßige Verabreichungen der Zellen für ein gutes Langzeitresultat von Nöten sein, würde die Applikation mittels transluminärer Herzkatheter einen großen klinischen Aufwand mit erheblichem Risikopotential bedeuten. Stationäre Krankenhausaufnahmen in kurzen, möglicherweise monatlichen Abständen, bedeuten einen immensen Kostenfaktor für das Gesundheitssystem und sind auch den Patienten im Hinblick auf eine moderne, risikoarme Medizin nicht zuzumuten.

Der intravenöse Applikationsweg stellt hier ein gut zu realisierendes Verfahren dar und ist daher Gegenstand dieser Studie. Bewusst werden hierfür die Zeitpunkte von

Transplantation und Nachuntersuchungen im Abstand von jeweils vier Wochen gewählt, um den Nutzen der KMS-Transplantation auch im Verlauf einer chronischen Herzinsuffizienz zu prüfen. Die Invasion intravenös applizierter Stammzellen in ein kurz zuvor geschaffenes myokardiales Infarktareal wurde bereits mittels radioaktiver Markierung im Rattenmodell nachgewiesen. Gleichzeitig zeigte sich auch, dass durch den First-Pass-Effekt nicht alle transplantierten Zellen ihren Wirkungsort im Herzen erreichen (Aicher, et al., 2003). Allerdings ist die Bedeutung regionaler chemotaktischer Faktoren im chronischen Verlauf einer Herzinsuffizienz zur Unterstützung möglicherweise auch Induktion des Homing-Effektes noch nicht hinreichend geklärt. Studien belegen das Vorhandensein von Homingfaktoren für zirkulierende Stammzellen, so genannter stromal derived cells (SDF) mit spezifischen Rezeptoren, in adulten Herzen (Peled, et al., 1999). Nach einem Myokardinfarkt werden diese freigesetzt und vermehrt nachproduziert (Vandervelde, et al., 2005). Die Homingfaktoren lenken also im Blut zirkulierende Stammzellen direkt in das ischämische Gewebe, was den First-Pass-Effekt nach intravenöser Transplantation möglicherweise deutlich abschwächt (Abbott, et al., 2004). So hat die Arbeitsgruppe um Aicher zwar den First-Pass-Effekt für intravenös transplantierte Zellen nachgewiesen, den komplizierten Faktor des Homing-Effektes dabei aber außer Acht gelassen. Die Forschungsgruppe um Nagaya konnte im Rattenmodell nachweisen, dass intravenös applizierte Stammzellen nur drei Stunden nach Induktion eines Herzinfarktes die Infarktgröße signifikant verringert, die Kapillareinsprossung anregt und die Herzfunktion verbessert (Nagaya, et al., 2004). Es stellt sich daher die Frage, ob ein ähnlicher Effekt durch intravenöse KMS-Transplantation auch vier Wochen nach einem Infarkt festgestellt werden kann.

### **5.3 Moderne Echokardiographie im Herzinsuffizienz-Rattenmodell**

Die Echokardiographie liefert im klinischen Alltag verlässliche, reproduzierbare und präzise Daten zur kardialen Anatomie, Hämodynamik und Funktion. Das Prinzip beruht auf der Echo-Lot-Methode. Ausgesendete Schallwellen werden von unterschiedlichen Geweben, Flüssigkeiten oder Luft verschieden reflektiert und im Schallkopf wieder eingefangen. Nach Bearbeitung mit Hilfe eines Verstärkers werden sie auf dem Bildschirm dargestellt. Dank technischer Neuerungen in den letzten Jahren sind moderne Ultraschallgeräte heute im Stande, mit hochauflösenden

Bildgebungsverfahren, wie Computertomographie und Magnetresonanztomographie, zu konkurrieren. Das Risiko für schwerwiegende Komplikationen ist bei der nicht-invasiven Methode von transthorakal nicht vorhanden. Diese Überlegenheit macht die Echokardiographie als diagnostisches Verfahren auch für Tierversuche interessant. Nach ersten Anwendungen an Ratten in den 1990er Jahren (Litwin, et al., 1994) konnten genauere Daten erst ein Jahrzehnt später gewonnen werden. Eine Arbeitsgruppe um Watson bestimmte reproduzierbare funktionelle Parameter der Standardechokardiographie, wie EF und FS, und machte teilweise wenig genaue Aussagen zu Herzklappen mittels Farbdoppler-Verfahren im Rattenmodell (Watson, et al., 2004). Im selben Jahr ermöglichte eine neue Software erstmals die Methode der 2D-Strain-Analyse zur sensitiven Beurteilung der Ventrikelfunktion (Leitman, et al., 2004). Insbesondere das Auffinden und die genaue Lokalisation auch kleinerer Veränderungen waren nun möglich und fanden zunächst erfolgreich klinische Anwendung beim Menschen. Die Verwendung des Verfahrens zur Datenakquise in Tiermodellen scheint naheliegend und machbar und ist bei gesunden Herzen im Rahmen einer Studie zur Evaluation der Therapie von peritonealen Metastasen bereits erfolgreich getestet worden (Hartmann, et al., 2007).

Die erste Fragestellung, ob diese Methode auch im Stande ist, in einem Herzinsuffizienz-Rattenmodell differenzierte Aussagen zur lokalen Ventrikelfunktion und Morphologie zu machen, kann durch die Ergebnisse der vorliegenden Studie beantwortet werden: Die neuen echokardiographischen Methoden, insbesondere die 2D-Strain-Analyse, sind über die Daten der Standardechokardiographie hinaus in der Lage, genaue Aussagen zur Quantifizierung der regionalen Ventrikelfunktion im Herzinsuffizienz-Rattenmodell zu treffen.

Die signifikante Abnahme der Parameter LV-EF und FS ( $p < 0,01$ ) aus der Standardechokardiographie nach Ligatur der linken Koronararterie deuten auf das Vorliegen eines großen Herzinfarktes unter Einbeziehung des linken Ventrikels hin. Weitere Daten aus dem M-Mode liefern grobe Aussagen zur Ventrikelgeometrie und -morphologie. Eine Dilatation des linken Ventrikels sowie die Hypertrophie des Septums sind nachweisbar. Zusammenfassend lassen die Methoden der Standardechokardiographie jedoch nur die Feststellung einer starken Funktionseinschränkung (großer Herzinfarkt) des linken Ventrikels zu. Hinsichtlich der weiteren geplanten Detektion von möglicherweise geringen, lokalisierten Veränderungen von Ventrikelmorphologie, -geometrie und -funktion nach KMS-

Transplantation reicht die Aussagekraft der standardechokardiographischen Parameter nicht aus.

Mit der Gewebedopplermethode lassen sich pathologische Wandbewegungsgeschwindigkeiten sensibel detektieren und lokalisieren. (vgl. hierzu auch Abbildungen 11, Seite 29 und 19, Seite 41) Die Methode ermöglicht außerdem die Unterscheidung zwischen vorderer und hinterer Wand des linken Ventrikels. Durch die Bestimmung der Wandbewegungsgeschwindigkeiten können Aussagen zur Funktion in groben lokalen Bereichen getroffen werden. Die Lokalisation einer Infarkt Narbe im anterioren Bereich gelingt. Die feinen Unterschiede im zeitlichen Verlauf der Myokardregeneration nach Infarktinduktion und Transplantation in der posterioren Ventrikelwand sind durch die Anwendung dieser Methode diagnostiziert worden und wären in der konventionellen Standardechokardiographie sicherlich nicht nachweisbar gewesen.

Das diagnostische Herzstück dieser Untersuchung ist die nicht doppler-basierte, radiale 2D-Strain-Analyse. Im Rattenmodell gelingen nicht nur die Abbildung eines gesunden Herzens sowie die Diagnose eines Herzinfarktes, sondern es ist auch ein detaillierter Daten-Verlauf nach Therapieversuchen einer Herzinsuffizienz möglich. Der linke Ventrikel wird in der kurzen Achse in die sechs Bereiche anterior, septal, anteroseptal, lateral, inferior und posterior aufgeteilt. Dies erlaubt eine sehr genaue Lokalisation kardiomyopathischer Vorgänge. In der vorliegenden Studie eröffnet es eine klare Einschätzung der Dimensionen der vorliegenden Infarkte. Verglichen mit den bisherigen Methoden sind zusätzlich auch Aussagen für die inferioren und lateralen Wandbereiche möglich. Funktionseinschränkungen des vorderen und hinteren Septums sowie der Vorder- und Hinterwand lassen sich mit dieser Methode genauer einschätzen als mit den konventionellen Möglichkeiten der Standardechokardiographie. Damit ist es gelungen, eine der Kernaussagen der Studie, bezogen auf die Fragestellung der Wirksamkeit einer intravenösen KMS-Transplantation, mit dem neuen Zugriff der 2D-Strain-Analyse zu verifizieren. Aufgrund der einfachen, reproduzierbaren Einstellung in der kurzen Achse wurde die Datenerhebung im radialen Verfahren durchgeführt. Longitudinale und zirkumferelle 2D-Strain-Einstellungen in der langen Achse bringen keine vergleichbar stabilen Bilder und verfälschen somit die Ergebnisse; sie sollten jedoch in jedem Fall Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

Es lässt sich also feststellen, dass die 2-D-Strain-Analyse als Teil einer TTE Untersuchung im Herzinsuffizienz-Rattenmodell möglich ist. Mit ihrer Hilfe konnte insbesondere die genaue Beurteilung von Kardiomyopathien an thorakal voroperierten Ratten erzielt werden. Eine beliebig oft durchführbare Verlaufsuntersuchung zur differenzierten Beurteilung speziell der regionalen Ventrikelfunktion im chronischen Herzinsuffizienzmodell ist somit etabliert.

#### **5.4 Ventrikelfunktion und Morphologie**

Für die aussagekräftigen, funktionellen Parameter EF und FS können nach Transplantation von KMS keine signifikanten Änderungen festgestellt werden. Es zeigt sich jedoch mit einem p-Wert von 0,08 eine deutliche Tendenz zur Funktionsverbesserung durch die Transplantation der Stammzellen im Vergleich mit der NaCl-Gruppe (p-Wert 0,22).

Nach grober Lokalisation der Veränderungen durch Bestimmung der intrakardialen Diameter und Wanddicken können im Bereich der Ventrikelgeometrie einige Änderungen aufgezeigt werden: Das Septum ist in beiden Untersuchungsgruppen durch eine signifikante Dickenzunahme nach Transplantation gekennzeichnet. Da sich jedoch nach Infarkt eine Verringerung des Durchmessers in diesem Bereich ergibt, ist hier eher von einer Wiederherstellung des Ursprungszustandes als von einer Hypertrophie auszugehen. Dieser Effekt tritt allerdings in beiden Untersuchungsgruppen gleichmäßig auf; daher ist hier keine weitere Aussage möglich. Im Bereich der Hinterwand kommt es allerdings ohne Transplantation von KMS längerfristig zu einer signifikanten Dickenzunahme (LVPWd und LVPWs nach Transplantation von NaCl mit p-Werten von 0,03 und 0,04; direkter Vergleich der beiden Gruppen LVPWs  $p=0,05$  und LVPWd  $p=0,06$ ; vgl. auch S.38-40). Diese Hypertrophie könnte eine kompensatorische Reaktion auf die Ausbildung einer großen Infarktnarbe im Bereich der gegenüberliegenden vorderen Ventrikelwand sein. Das Fehlen dieser Reaktion in der Verum-Gruppe weist möglicherweise auf die Konzentration der Kompensationsmechanismen im Narbengebiet hin.

Die Untersuchungen mit dem Gewebedoppler ermöglichen durch die Geschwindigkeitsmessungen der Ventrikelwände tiefere Einblicke in die Ventrikelfunktion. Die Messungen im Bereich der anterioren Wand, also im Infarktgebiet, ergeben keine signifikanten Verbesserungen nach KMS-

Transplantation. Hier wird mit einem p-Wert von 0,07 zwar ein besseres Ergebnis für die Kontrollgruppe erzielt; dies hält dem direkten Vergleich beider Gruppen hinsichtlich der Verbesserungstendenz jedoch nicht Stand ( $p=0,3$ ).

Interessanter ist die Betrachtung der posterioren Wandbewegungsgeschwindigkeit. Diese nimmt in der Kontrollgruppe in der frühen Phase nach Infarkt, also vor der Transplantation, signifikant ab; eine Signifikanz in der Verum-Gruppe wird hier verfehlt ( $p=0,08$ ). Nach KMS-Transplantation erhärtet sich diese Feststellung, da sich die  $V_{\text{sys}}$  posterior in der Verum-Gruppe zwar verringert, eine Signifikanz allerdings erneut knapp verfehlt wird ( $p=0,05$ ). (vgl. hierzu auch S. 42-43) Vielleicht könnte dieses Phänomen in der posterioren Ventrikelwand auf das Vorliegen unterschiedlich großer Infarkte nach Induktion hindeuten. Dies ist allerdings durch das in der Studie angewendete Randomisierungsprinzip äußerst unwahrscheinlich. Des Weiteren fällt bei genauer Betrachtung der erhobenen funktionellen Parameter EF und FS nach Myokardinfarktinduktion auf, dass diese ohne relevante Streuung in einem ähnlichen Bereich liegen. (vgl. hierzu auch S. 37-38) Schließlich käme diesem Faktor auch keine relevante Bedeutung zu, da im Rahmen der statistischen Auswertung durch Bildung der Differenzen der Werte nach und vor Transplantation die Veränderungstendenzen für jede Gruppe individuell erstellt und dann verglichen werden, was für die Entitäten  $V_{\text{sys}}$  anterior und  $V_{\text{sys}}$  posterior keine signifikanten Unterschiede ergibt. Mögliche abweichende Infarktausdehnungen nach Induktion würden auch nicht ins Gewicht fallen.

Vielmehr könnte der festgestellte Unterschied auch als eingeschränkte Mobilität der dem Infarkt gegenüberliegenden Ventrikelwand in der Kontrollgruppe interpretiert werden. Dies würde die bereits erläuterte These der kompensatorischen Hypertrophie stützen, da hypertrophes Herzmuskelgewebe träger kontrahiert (Hypomobilität) als gesundes.

Die besonders sensitiven Daten aus der 2D-Strain-Analyse zeichnen insgesamt ein ähnliches Bild. Wieder lässt sich im Infarktbereich, also anterior, septal, anteroseptal und lateral, keine signifikante Funktionsverbesserung detektieren. Interessanterweise präsentieren sich die infarktfreien Gebiete, also posterior und inferior, in der Kontroll-Gruppe eher hyperagil, während die Transplantation von KMS hier einen Funktionserhalt, teilweise sogar eine Funktionsverminderung, produziert. (vgl. hierzu auch S. 45-58) Dies zeigt sich deutlich im direkten Vergleich beider Gruppen durch p-Werte von 0,04 für den posterioren und 0,03 für den inferioren Bereich. Mit Letzterem

rückt nun ein weiterer nicht-infarzierter Bereich in den Diskussionsfokus. Durch die in diesem Verfahren typische Aufteilung des Ventrikels in sechs Regionen lässt sich also postulieren, dass der erläuterte Kompensationsmechanismus nicht nur die dem Infarkt gegenüberliegende posteriore Wand betrifft, sondern sich in allen extrainfarziellen Gebieten vollzieht. Im Sinne der bereits aufgestellten These der kompensatorischen Hypertrophie/Hypomobilität kommt diese Beobachtung nicht unbedingt einer verbesserten Ventrikelfunktion gleich. Dies hätte sich zudem in signifikanten Verbesserungen der Parameter EF und FS zeigen müssen. Es ist davon auszugehen, dass es sich um eine ungerichtete Zunahme von Muskelkontraktionen durch die Vermehrung von Masse handelt, und somit eigentlich Remodeling-Vorgänge abgebildet werden.

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse aus den echokardiographischen Untersuchungen keinen klaren, hochsignifikanten Vorteil durch die KMS-Transplantation erkennen. Es kann, insbesondere für den wichtigen Bereich der Infarkt Narbe, keine deutliche Verbesserung von Funktion oder Morphologie festgestellt werden. Die groben Parameter EF und FS weisen eine positive Tendenz in Richtung KMS-Transplantation auf. Als typisches Phänomen im Rahmen der natürlichen Reaktion auf untergegangene Gewebe nach einem Myokardinfarkt ist die kardiale Hypertrophie klinisch bekannt. In dem vorliegenden Modell zeigen die Ratten der Kontrollgruppe zusätzlich eine Hypomobilität, besonders in den nicht infarkt betroffenen Regionen. Die transplantierten KMS scheinen die kompensatorische Reaktion in diesen Gebieten im Sinne eines Reverse-Remodeling abzuschwächen beziehungsweise aufzuheben.

Eine mögliche Erklärung hierfür liegt in dem bereits erläuterten Homing-Prozess, der die im Blut zirkulierenden KMS in das ischämische Randgebiet des Infarktes transportiert (Jackson, et al., 2001). Der Fokus des Regenerationsprozesses wird somit möglicherweise verstärkt auf das Infarktgebiet gelenkt; die Aktivität der Umbauprozesse im übrigen Herzen wird herabgesetzt. Leider lassen sich zu den gewählten Untersuchungszeitpunkten keine funktionellen Verbesserungen im Infarktgebiet feststellen. Eventuell ist dieser Prozess erst im weiteren zeitlichen Verlauf des Regenerationsprozesses signifikant nachzuweisen.

## **5.5 Histopathologische Phänomene**

Neben der Infarktgröße ist im Rahmen der histopathologischen Aufarbeitung besonders der Aspekt der Neo-Vaskulo/Angiogenese von Interesse. Im Rahmen der Transdifferenzierung ist die Ausdifferenzierung von KMS in Endothelzellen zur Bildung von Blutgefäßen mehrfach beschrieben worden (Bailey, et al., 2004; Hur, et al., 2004; Ratajska and Czarnowska, 2006).

Die Daten aus der histologischen Infarktgrößenbestimmung erhärten die These aus den bereits diskutierten echokardiographischen Ergebnissen: Die Transplantation von KMS scheint, verglichen mit einer Kontrollgruppe, diskrete Vorteile zu verschaffen. Eine klare Tendenz zu kleineren Infarktfolgen ist in der Verum-Gruppe zu erkennen. Die statistische Signifikanz wird knapp verfehlt ( $p = 0,07$ ). Insgesamt sind die Ergebnisse aus der Infarktgrößenbestimmung mit einer gewissen Vorsicht zu beurteilen. Die Größe des Infarktes lässt sich mit den zur Verfügung stehenden Methoden sicherlich nur abschätzen.

Die Zählung der Kapillaren als Maß für die Kapillareinsprossung ergibt keine signifikanten Unterschiede, wobei hier auch zu bemerken ist, dass nach KMS-Transplantation durchschnittlich mehr Kapillaren im Infarktgebiet gezählt werden als in der Kontrollgruppe.

In den letzten Jahren mehren sich kritische Publikationen, die Hinweise auf eine erhöhte Kalzifizierungstendenz sowie mögliche Metaplasien chondroider oder ossärer Genese nach KMS-Transplantation äußern. So gelang einer Arbeitsgruppe aus Boston 2004 der Nachweis von signifikant vermehrten Kalzifikationen, allerdings nach intramyokardialer KMS-Transplantation (Yoon, et al., 2004). Des Weiteren sind auch ossäre Metaplasien und nicht weiter differenzierbare Abkapselungen beschrieben worden (Breitbach, et al., 2007). Im Rahmen der vorliegenden Studie kommt ein immunhistochemisches Verfahren zum Nachweis von Chondrozyten zum Einsatz. Diese sind möglicherweise nur ein Zwischenstadium im Rahmen des geweblichen Umbauprozesses zu Kalzifikationen und Ossifikationen; in jedem Fall ist das Knorpelgewebe einer myokardialen Regeneration nicht förderlich.

Chondroide Metaplasien werden sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der Verum-Gruppe nachgewiesen. Interessanterweise ist das Vorkommen in der Kontrollgruppe signifikant höher als in der Verum-Gruppe ( $p < 0,01$ ). Die These, eine derartige Metaplasie trete als Folge einer möglichen Fehldifferenzierung der transplantierten Zellen besonders nach KMS-Transplantation vermehrt auf, ist durch das bloße

Vorhandensein von Chondrozyten in den Präparaten der Kontrollgruppe widerlegt. Wahrscheinlich ist vielmehr, dass es, wie bereits 1995 beschrieben, im Rahmen der lokalen myokardialen Umbauvorgänge nach einem Infarkt zu Kalzifikationen, sowie ossären und chondroiden Metaplasien kommt (Asanuma, et al., 1995). Die vorliegende Untersuchung lässt also die These zu, dass die intravenöse Transplantation von KMS nach Myokardinfarkt die Kalzifizierungstendenz im Infarktgebiet vermindert.

## **5.6 Limitierungen der Studie**

Eine empirische Studie ist immer mit Limitierungen und Einschränkungen verbunden; sie kann nur begrenzte Aussagen machen und stets nur ausschnitthaft eine bestimmte wissenschaftliche Dimension vermitteln. Die Auswahl der methodischen Zugriffe ist beschränkt, dies gilt insbesondere für Tierversuche.

Das Rattenmodell ist zwar etabliert; es bestehen jedoch im Hinblick auf die Anwendung beim Menschen entscheidende Unterschiede. Insoweit handelt es sich um ein simulatives Modell. Ergebnisse aus Tierversuchen sind daher immer nur wegweisend; wie ein Mensch schließlich auf eine Behandlung reagiert, ist nicht sicher voraussagbar.

Die Verwendung von Ratten des Stammes Lewis simuliert in der vorliegenden Studie den autologen Transplantationsweg. Lewis-Ratten sind beinahe genetisch identisch. Geringe Unterschiede zwischen den Tieren können trotzdem nicht sicher ausgeschlossen werden. Die Tiere können unterschiedlich auf die Induktion des Infarktes und die Transplantation von KMS reagieren. Mehrere exemplarisch durchgeführte Zellzahlbestimmungen der gewonnenen KMS erbrachten nur minimal unterschiedliche Ergebnisse. Trotzdem ist die genaue jeweils transplantierte Zellmenge aus Gründen der Zellschonung nicht bekannt.

Die Echokardiographie ist in großem Maße abhängig von der Schallqualität. Insbesondere nach Thorakotomie können die Schallbedingungen erschwert und damit die Bildqualität eingeschränkt sein. Die Untersuchungen mit dem Gewebe-Doppler sind, wie alle doppler-basierten Untersuchungen, schallwinkelabhängig, was zur Verfälschung der Werte beitragen kann. Zur Vermeidung von untersucherassoziierten Einflüssen wurden die Echokardiographien immer von

demselben Untersucher durchgeführt. Dennoch ist natürlich jede einzelne Untersuchung individuell.

Die für die histopathologischen Untersuchungen angefertigten Schnitte und Präparate unterliegen Qualitätsunterschieden. Die Herstellung der Präparate kann mit Materialverlust einhergehen. Bei der Bestimmung der Infarktgröße werden die Grenzen der methodischen Möglichkeiten erreicht.

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde in einer randomisierten tierexperimentellen Versuchsreihe die intravenöse Applikationsform von Knochenmarkstammzellen (KMS) als eine neue, noch junge Möglichkeit zur Therapie der chronischen Herzinsuffizienz untersucht. Zur Datenakquise konnten die neuen echokardiographischen Verfahren Gewebe-Doppler (TDI) und 2D-Strain unter der Verwendung moderner Geräte erfolgreich eingesetzt werden. Im Rahmen der Studie sollte der Nutzen und die Machbarkeit dieser Untersuchungen im kardiomyopathischen Rattenmodell belegt werden.

Der Versuchsaufbau beinhaltete zwei Gruppen von jeweils 10 Lewis-Ratten, die im Verlauf der Untersuchung miteinander verglichen wurden. Der Zustand der gesunden Herzen wurde bei allen 20 Tieren mit einer ausführlichen Echokardiographie-Untersuchung dokumentiert (TTE1). Es folgte die Induktion eines großen linksventrikulären Myokardinfarktes durch Ligatur der linken Koronararterie. In einer nach vier Wochen folgenden zweiten Echokardiographie-Untersuchung (TTE2) konnten eindeutige, infarkttypische Funktions- und Morphologieveränderungen mit den konventionellen Parametern nachgewiesen werden. Es gelang darüber hinaus, mit den oben genannten neuen, sensitiven Untersuchungsverfahren und Analysen diese Phänomene genau zu lokalisieren und zu quantifizieren. Damit war eine Zielsetzung der Studie, die TDI und 2D-Strain-Methode im chronischen Herzinsuffizienz-Modell der Ratte zu etablieren, erreicht. Vier Wochen nach der Induktion des Herzinfarktes wurden die Ratten randomisiert und in eine Kontroll-Gruppe und eine Verum-Gruppe eingeteilt. Zur Gewinnung der KMS wurden pro Transplantation einer genetisch synergenen Spenderratte beide Femurknochen entnommen. Auf diesem simulierten autologen Transplantationsweg erfolgte die Injektion der Zellen nach Laparotomie in die Vena Cava inferior. Die Kontrollgruppe erhielt im identischen Operationsverfahren 0,9%iges NaCl. Nach weiteren vier Wochen wurden in einer dritten Verlaufs-Echokardiographie eventuelle Veränderungen der Ventrikelfunktion, -geometrie und -morphologie dokumentiert. Danach folgte die Explantation der Herzen zur histopathologischen und immunhistochemischen Auswertung.

Mit Hilfe der bereits erwähnten echokardiographischen Methoden war es möglich, auch minimale Veränderungen nachzuweisen: Der Nutzen der modernen

Echokardiographie-Geräte und -verfahren (TDI, 2D-Strain) für kommende kleintierexperimentelle Studien am kranken Herzen ist hiermit belegt.

Die gewonnenen Ergebnisse hinsichtlich des intravenösen Transplantationsweges ermöglichen folgende Aussagen: Nach Auswertung der funktionellen Parameter aus der Echokardiographie konnten im eigentlichen Infarktgebiet nach KMS-Transplantation keine signifikanten Veränderungen festgestellt. Die Daten lassen jedoch diskrete Tendenzen erkennen, die zu folgenden Thesen ermutigen:

1. Die intravenöse Transplantation von KMS auch Wochen nach einem Herzinfarkt scheint die Erholung der globalen Ventrikelfunktion positiv zu beeinflussen.
2. Ventrikuläre Remodeling-Vorgänge der nicht infarzierten Areale scheinen durch die KMS-Transplantation gebremst oder aufgehalten zu werden.

Um weitere zukunftsweisende, aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen, sollten kommende Studien den Langzeitverlauf nach KMS-Transplantation im Herzinsuffizienzmodell untersuchen. Weiterhin sind Studien zur Erforschung einer wiederholten Gabe von KMS im Krankheitsverlauf einer Herzinsuffizienz sinnvoll und von wissenschaftlichem Interesse.

Im Rahmen der histopathologischen Auswertung interessierte die Frage nach einer potentiellen Verringerung der morphologischen Infarktgröße sowie nach vermehrtem Auftreten von chondrozytären Metaplasien als möglichen Vorläufergeweben für Kalzifikationen und Ossifikationen im Myokard. Die Ergebnisse aus der vorliegenden Studie lassen folgende Feststellungen zu:

1. Die intravenöse Transplantation von KMS führt nicht zu Fehldifferenzierungen im Sinne einer chondroiden Metaplasie.
2. Kalzifizierungs- und Ossifizierungstendenzen im Rahmen der normalen, postinfarziellen myokardialen Umbauvorgänge werden durch intravenöse Transplantation von KMS vermindert.
3. Nach intravenöser Transplantation von KMS lässt sich die Tendenz zu einer morphologischen Verkleinerung des Infarktareals erkennen.

## 7 Verzeichnisse

### 7.1 Literatur

- Abbott, J. D.; Huang, Y.; Liu, D., et al.: *Stromal cell-derived factor-1alpha plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury*, *Circulation*, 2004 (vol. 110), No. 21, pp. 3300-3305.
- Abraham, M. R.; Henrikson, C. A.; Tung, L., et al.: *Antiarrhythmic engineering of skeletal myoblasts for cardiac transplantation*, *Circ Res*, 2005 (vol. 97), No. 2, pp. 159-167.
- Abraham, W. T.; Fisher, W. G.; Smith, A. L., et al.: *Cardiac resynchronization in chronic heart failure*, *N Engl J Med*, 2002 (vol. 346), No. 24, pp. 1845-1853.
- Aicher, A.; Brenner, W.; Zuhayra, M., et al.: *Assessment of the tissue distribution of transplanted human endothelial progenitor cells by radioactive labeling*, *Circulation*, 2003 (vol. 107), No. 16, pp. 2134-2139.
- Amundsen, B. H.; Helle-Valle, T.; Edvardsen, T., et al.: *Noninvasive myocardial strain measurement by speckle tracking echocardiography: validation against sonomicrometry and tagged magnetic resonance imaging*, *J Am Coll Cardiol*, 2006 (vol. 47), No. 4, pp. 789-793.
- Anversa, P. and Kajstura, J.: *Ventricular myocytes are not terminally differentiated in the adult mammalian heart*, *Circ Res*, 1998 (vol. 83), No. 1, pp. 1-14.
- Asanuma, A.; Sonoki, H. and Koga, T.: *Experimental myocardial infarction with cartilaginous and osseous metaplasia in SHR and WKY rats*, *Exp Anim*, 1995 (vol. 44), No. 2, pp. 163-167.
- Assmus, B.; Honold, J.; Schachinger, V., et al.: *Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction*, *N Engl J Med*, 2006 (vol. 355), No. 12, pp. 1222-1232.
- Assmus, B.; Rolf, A.; Erbs, S., et al.: *Clinical outcome 2 years after intracoronary administration of bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction*, *Circ Heart Fail*, 2010 (vol. 3), No. 1, pp. 89-96.
- Bailey, A. S.; Jiang, S.; Afentoulis, M., et al.: *Transplanted adult hematopoietic stem cells differentiate into functional endothelial cells*, *Blood*, 2004 (vol. 103), No. 1, pp. 13-19.
- Batista, R. J.; Santos, J. L.; Takeshita, N., et al.: *Partial left ventriculectomy to improve left ventricular function in end-stage heart disease*, *J Card Surg*, 1996 (vol. 11), No. 2, pp. 96-97; discussion 98.
- Beltrami, A. P.; Barlucchi, L.; Torella, D., et al.: *Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration*, *Cell*, 2003 (vol. 114), No. 6, pp. 763-776.
- Beltrami, A. P.; Urbanek, K.; Kajstura, J., et al.: *Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction*, *N Engl J Med*, 2001 (vol. 344), No. 23, pp. 1750-1757.
- Berger, P.: *Hyperhomocysteinemia: an important risk factor for cardiovascular disease? Not yet!*, *J Thromb Haemost*, 2003 (vol. 1), No. 9, pp. 1876-1877.
- Berry, C.; Murdoch, D. R. and McMurray, J. J.: *Economics of chronic heart failure*, *Eur J Heart Fail*, 2001 (vol. 3), No. 3, pp. 283-291.
- Breitbach, M.; Bostani, T.; Roell, W., et al.: *Potential risks of bone marrow cell transplantation into infarcted hearts*, *Blood*, 2007 (vol. 110), No. 4, pp. 1362-1369.

- Carpentier, A. and Chachques, J. C.: *Myocardial substitution with a stimulated skeletal muscle: first successful clinical case*, Lancet, 1985 (vol. 1), No. 8440, p. 1267.
- Carpentier, A.; Chachques, J. C.; Acar, C., et al.: *Dynamic cardiomyoplasty at seven years*, J Thorac Cardiovasc Surg, 1993 (vol. 106), No. 1, pp. 42-52; discussion 52-44.
- Cattaneo, M.: *Hyperhomocysteinemia: an important risk factor for cardiovascular disease? Potentially, yes*, J Thromb Haemost, 2003 (vol. 1), No. 9, pp. 1878-1879.
- Chacko, K. A.: *AHA Medical/Scientific Statement: 1994 revisions to classification of functional capacity and objective assessment of patients with diseases of the heart*, Circulation, 1995 (vol. 92), No. 7, pp. 2003-2005.
- Chiu, R. C.: *Bone-marrow stem cells as a source for cell therapy*, Heart Fail Rev, 2003 (vol. 8), No. 3, pp. 247-251.
- Cleland, J. G.; Khand, A. and Clark, A.: *The heart failure epidemic: exactly how big is it?*, Eur Heart J, 2001 (vol. 22), No. 8, pp. 623-626.
- Cleland, J. G.; Swedberg, K.; Follath, F., et al.: *The EuroHeart Failure survey programme-- a survey on the quality of care among patients with heart failure in Europe. Part 1: patient characteristics and diagnosis*, Eur Heart J, 2003 (vol. 24), No. 5, pp. 442-463.
- Cohn, J. N.; Ferrari, R. and Sharpe, N.: *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, 2000 (vol. 35), No. 3, pp. 569-582.
- Cosin, J. and Diez, J.: *Torsemide in chronic heart failure: results of the TORIC study*, Eur J Heart Fail, 2002 (vol. 4), No. 4, pp. 507-513.
- Cowie, M. R.; Wood, D. A.; Coats, A. J., et al.: *Survival of patients with a new diagnosis of heart failure: a population based study*, Heart, 2000 (vol. 83), No. 5, pp. 505-510.
- Cury, P. M.; Higuchi, M. L.; Gutierrez, P. S., et al.: *Autopsy findings in early and late postoperative death after partial left ventriculectomy*, Ann Thorac Surg, 2000 (vol. 69), No. 3, pp. 769-773.
- Dawn, B. and Bolli, R.: *Adult bone marrow-derived cells: regenerative potential, plasticity, and tissue commitment*, Basic Res Cardiol, 2005 (vol. 100), No. 6, pp. 494-503.
- de Lemos, J. A.; McGuire, D. K. and Drazner, M. H.: *B-type natriuretic peptide in cardiovascular disease*, Lancet, 2003 (vol. 362), No. 9380, pp. 316-322.
- Deng, M. C.; De Meester, J. M.; Smits, J. M., et al.: *Effect of receiving a heart transplant: analysis of a national cohort entered on to a waiting list, stratified by heart failure severity. Comparative Outcome and Clinical Profiles in Transplantation (COCPIT) Study Group*, BMJ, 2000 (vol. 321), No. 7260, pp. 540-545.
- Dickstein, K.; Cohen-Solal, A.; Filippatos, G., et al.: *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 J Heart Fail, 2008 (vol. 10), No. 10, pp. 933-989.

- Dohmen, P. M.; Laube, H.; de Jonge, K., et al.: *Mechanical circulatory support for one thousand days or more with the Novacor N100 left ventricular assist device*, J Thorac Cardiovasc Surg, 1999 (vol. 117), No. 5, pp. 1029-1030.
- el-Banayosy, A.; Minami, K.; Arusoglu, L., et al.: *Long-term mechanical circulatory support*, Thorac Cardiovasc Surg, 1997 (vol. 45), No. 3, pp. 127-130.
- el Oakley, R. M. and Jarvis, J. C.: *Cardiomyoplasty. A critical review of experimental and clinical results*, Circulation, 1994 (vol. 90), No. 4, pp. 2085-2090.
- Flather, M. D.; Yusuf, S.; Kober, L., et al.: *Long-term ACE-inhibitor therapy in patients with heart failure or left-ventricular dysfunction: a systematic overview of data from individual patients. ACE-Inhibitor Myocardial Infarction Collaborative Group*, Lancet, 2000 (vol. 355), No. 9215, pp. 1575-1581.
- Francis, G. S. and Tang, W. H.: *Pathophysiology of congestive heart failure*, Rev Cardiovasc Med, 2003 (vol. 4 Suppl 2), pp. S14-20.
- Franco-Cereceda, A.; McCarthy, P. M.; Blackstone, E. H., et al.: *Partial left ventriculectomy for dilated cardiomyopathy: is this an alternative to transplantation?*, J Thorac Cardiovasc Surg, 2001 (vol. 121), No. 5, pp. 879-893.
- Frazier, O. H. and Macris, M. P.: *Current methods for circulatory support*, Tex Heart Inst J, 1994 (vol. 21), No. 4, pp. 288-295.
- Fuchs, S.; Kornowski, R.; Weisz, G., et al.: *Safety and feasibility of transendocardial autologous bone marrow cell transplantation in patients with advanced heart disease*, Am J Cardiol, 2006 (vol. 97), No. 6, pp. 823-829.
- Fuchs, S.; Satler, L. F.; Kornowski, R., et al.: *Catheter-based autologous bone marrow myocardial injection in no-option patients with advanced coronary artery disease: a feasibility study*, J Am Coll Cardiol, 2003 (vol. 41), No. 10, pp. 1721-1724.
- Furnary, A. P.; Chachques, J. C.; Moreira, L. F., et al.: *Long-term outcome, survival analysis, and risk stratification of dynamic cardiomyoplasty*, J Thorac Cardiovasc Surg, 1996 (vol. 112), No. 6, pp. 1640-1649; discussion 1649-1650.
- Gainer, J. V.; Morrow, J. D.; Loveland, A., et al.: *Effect of bradykinin-receptor blockade on the response to angiotensin-converting-enzyme inhibitor in normotensive and hypertensive subjects*, N Engl J Med, 1998 (vol. 339), No. 18, pp. 1285-1292.
- Gesundheitsberichterstattung des Bundes: *Sterbefälle (absolut, Sterbeziffer, Ränge, Anteile) für die 10/20/50/100 häufigsten Todesursachen (ab 1998)*, , 2004 (Accessed April 9, 2011, at URL: [http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/dboowasys921.xwdevkit/xwd\\_init?gbe.isgbetol/xs\\_st\\_art\\_neu/&p\\_aid=i&p\\_aid=91324458&nummer=516&p\\_sprache=D&p\\_indsp=-&p\\_aid=7830040](http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/dboowasys921.xwdevkit/xwd_init?gbe.isgbetol/xs_st_art_neu/&p_aid=i&p_aid=91324458&nummer=516&p_sprache=D&p_indsp=-&p_aid=7830040))
- Gilman, G.; Khandheria, B. K.; Hagen, M. E., et al.: *Strain rate and strain: a step-by-step approach to image and data acquisition*, J Am Soc Echocardiogr, 2004 (vol. 17), No. 9, pp. 1011-1020.
- Goldstein, R. E.; Boccuzzi, S. J.; Cruess, D., et al.: *Diltiazem increases late-onset congestive heart failure in postinfarction patients with early reduction in ejection fraction. The Adverse Experience Committee; and the Multicenter Diltiazem Postinfarction Research Group*, Circulation, 1991 (vol. 83), No. 1, pp. 52-60.
- Goldstein, S.; Ali, A. S. and Sabbah, H.: *Ventricular remodeling. Mechanisms and prevention*, Cardiol Clin, 1998 (vol. 16), No. 4, pp. 623-632, vii-viii.
- Greenberg, B. H.: *Effects of angiotensin converting enzyme inhibitors on remodeling in clinical trials*, J Card Fail, 2002 (vol. 8), No. 6 Suppl, pp. S486-490.

- Grundy, S. M.; Balady, G. J.; Criqui, M. H., et al.: *Primary prevention of coronary heart disease: guidance from Framingham: a statement for healthcare professionals from the AHA Task Force on Risk Reduction. American Heart Association, Circulation*, 1998 (vol. 97), No. 18, pp. 1876-1887.
- Hall, A. S.; Murray, G. D. and Ball, S. G.: *Follow-up study of patients randomly allocated ramipril or placebo for heart failure after acute myocardial infarction: AIRE Extension (AIREX) Study. Acute Infarction Ramipril Efficacy, Lancet*, 1997 (vol. 349), No. 9064, pp. 1493-1497.
- Hartmann, J.; Knebel, F.; Eddicks, S., et al.: *Noninvasive monitoring of myocardial function after surgical and cytostatic therapy in a peritoneal metastasis rat model: assessment with tissue Doppler and non-Doppler 2D strain echocardiography, Cardiovasc Ultrasound*, 2007 (vol. 5), p. 23.
- Henningson, C. T., Jr.; Stanislaus, M. A. and Gewirtz, A. M.: *28. Embryonic and adult stem cell therapy, J Allergy Clin Immunol*, 2003 (vol. 111), No. 2 Suppl, pp. S745-753.
- Herzog, E. L.; Chai, L. and Krause, D. S.: *Plasticity of marrow-derived stem cells, Blood*, 2003 (vol. 102), No. 10, pp. 3483-3493.
- Heyen, J. R.; Blasi, E. R.; Nikula, K., et al.: *Structural, functional, and molecular characterization of the SHHF model of heart failure, Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002 (vol. 283), No. 5, pp. H1775-1784.
- Hjalmarson, A.; Goldstein, S.; Fagerberg, B., et al.: *Effects of controlled-release metoprolol on total mortality, hospitalizations, and well-being in patients with heart failure: the Metoprolol CR/XL Randomized Intervention Trial in congestive heart failure (MERIT-HF). MERIT-HF Study Group, JAMA*, 2000 (vol. 283), No. 10, pp. 1295-1302.
- Hoffmann, R.: *Tissue Doppler echocardiography--already of clinical significance?, Z Kardiol*, 2002 (vol. 91), No. 9, pp. 677-684.
- Hur, J.; Yoon, C. H.; Kim, H. S., et al.: *Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasculogenesis, Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004 (vol. 24), No. 2, pp. 288-293.
- Ishii, K.; Suyama, T.; Imai, M., et al.: *Abnormal regional left ventricular systolic and diastolic function in patients with coronary artery disease undergoing percutaneous coronary intervention: clinical significance of post-ischemic diastolic stunning, J Am Coll Cardiol*, 2009 (vol. 54), No. 17, pp. 1589-1597.
- Jackson, K. A.; Majka, S. M.; Wang, H., et al.: *Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells, J Clin Invest*, 2001 (vol. 107), No. 11, pp. 1395-1402.
- Jiang, Y.; Jahagirdar, B. N.; Reinhardt, R. L., et al.: *Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow, Nature*, 2002 (vol. 418), No. 6893, pp. 41-49.
- Jondeau, G.; Dorent, R.; Bors, V., et al.: *Dynamic cardiomyoplasty: effect of discontinuing latissimus dorsi muscle stimulation on left ventricular systolic and diastolic performance and exercise capacity, J Am Coll Cardiol*, 1995 (vol. 26), No. 1, pp. 129-134.
- Kahn, H. J.; Marks, A.; Thom, H., et al.: *Role of antibody to S100 protein in diagnostic pathology, Am J Clin Pathol*, 1983 (vol. 79), No. 3, pp. 341-347.
- Kajstura, J.; Leri, A.; Finato, N., et al.: *Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans, Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998 (vol. 95), No. 15, pp. 8801-8805.

- Konertz, W. F.; Shapland, J. E.; Hotz, H., et al.: *Passive containment and reverse remodeling by a novel textile cardiac support device*, *Circulation*, 2001 (vol. 104), No. 12 Suppl 1, pp. I270-275.
- Konertz, W.; Hotz, H.; Khoyneshad, A., et al.: *Results after partial left ventriculectomy in a European heart failure population*, *J Card Surg*, 1999 (vol. 14), No. 2, pp. 129-135.
- Kris-Etherton, P.; Eckel, R. H.; Howard, B. V., et al.: *AHA Science Advisory: Lyon Diet Heart Study. Benefits of a Mediterranean-style, National Cholesterol Education Program/American Heart Association Step I Dietary Pattern on Cardiovascular Disease*, *Circulation*, 2001 (vol. 103), No. 13, pp. 1823-1825.
- Krum, H.; Roecker, E. B.; Mohacsi, P., et al.: *Effects of initiating carvedilol in patients with severe chronic heart failure: results from the COPERNICUS Study*, *JAMA*, 2003 (vol. 289), No. 6, pp. 712-718.
- Kucia, M.; Zuba-Surma, E. K.; Wysoczynski, M., et al.: *Adult marrow-derived very small embryonic-like stem cells and tissue engineering*, *Expert Opin Biol Ther*, 2007 (vol. 7), No. 10, pp. 1499-1514.
- Lagasse, E.; Connors, H.; Al-Dhalimy, M., et al.: *Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo*, *Nat Med*, 2000 (vol. 6), No. 11, pp. 1229-1234.
- Lang, R. M.; Bierig, M.; Devereux, R. B., et al.: *Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology*, *J Am Soc Echocardiogr*, 2005 (vol. 18), No. 12, pp. 1440-1463.
- Lapidot, T.; Dar, A. and Kollet, O.: *How do stem cells find their way home?*, *Blood*, 2005 (vol. 106), No. 6, pp. 1901-1910.
- Leitman, M.; Lysyansky, P.; Sidenko, S., et al.: *Two-dimensional strain-a novel software for real-time quantitative echocardiographic assessment of myocardial function*, *J Am Soc Echocardiogr*, 2004 (vol. 17), No. 10, pp. 1021-1029.
- Li, Q.; Li, B.; Wang, X., et al.: *Overexpression of insulin-like growth factor-1 in mice protects from myocyte death after infarction, attenuating ventricular dilation, wall stress, and cardiac hypertrophy*, *J Clin Invest*, 1997 (vol. 100), No. 8, pp. 1991-1999.
- Li, R. K.; Jia, Z. Q.; Weisel, R. D., et al.: *Smooth muscle cell transplantation into myocardial scar tissue improves heart function*, *J Mol Cell Cardiol*, 1999 (vol. 31), No. 3, pp. 513-522.
- Li, R. K.; Jia, Z. Q.; Weisel, R. D., et al.: *Cardiomyocyte transplantation improves heart function*, *Ann Thorac Surg*, 1996 (vol. 62), No. 3, pp. 654-660; discussion 660-651.
- Linneweber, J.; Nonaka, K.; Ichikawa, S., et al.: *Current status on the development of a totally implantable biventricular assist device: the Baylor Gyro BVAD*, *Thorac Cardiovasc Surg*, 2004 (vol. 52), No. 1, pp. 1-5.
- Litwin, S. E.; Katz, S. E.; Morgan, J. P., et al.: *Serial echocardiographic assessment of left ventricular geometry and function after large myocardial infarction in the rat*, *Circulation*, 1994 (vol. 89), No. 1, pp. 345-354.
- Mailänder, Rojewski M, Burkhart J, Körper S, Schrezenmeier H: *hope for regenerative medicine*, *Hämotherapie*, 2005 (vol. 4).
- McMurray, J. J.; Ostergren, J.; Swedberg, K., et al.: *Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and reduced left-ventricular systolic function taking*

- angiotensin-converting-enzyme inhibitors: the CHARM-Added trial*, Lancet, 2003 (vol. 362), No. 9386, pp. 767-771.
- McMurray, J. J. and Stewart, S.: *Epidemiology, aetiology, and prognosis of heart failure*, Heart, 2000 (vol. 83), No. 5, pp. 596-602.
- Menasche, P.; Hagege, A. A.; Scorsin, M., et al.: *Myoblast transplantation for heart failure*, Lancet, 2001 (vol. 357), No. 9252, pp. 279-280.
- Menasche, P.; Hagege, A. A.; Vilquin, J. T., et al.: *Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction*, J Am Coll Cardiol, 2003 (vol. 41), No. 7, pp. 1078-1083.
- Merx, M. W.; Zerneck, A.; Liehn, E. A., et al.: *Transplantation of human umbilical vein endothelial cells improves left ventricular function in a rat model of myocardial infarction*, Basic Res Cardiol, 2005 (vol. 100), No. 3, pp. 208-216.
- Meyer, G. P.; Wollert, K. C.; Lotz, J., et al.: *Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: 5-year follow-up from the randomized-controlled BOOST trial*, Eur Heart J, 2009 (vol. 30), No. 24, pp. 2978-2984.
- Mezey, E.; Chandross, K. J.; Harta, G., et al.: *Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow*, Science, 2000 (vol. 290), No. 5497, pp. 1779-1782.
- Moreira, L. F.; Stolf, N. A.; Bocchi, E. A., et al.: *Clinical and left ventricular function outcomes up to five years after dynamic cardiomyoplasty*, J Thorac Cardiovasc Surg, 1995 (vol. 109), No. 2, pp. 353-362; discussion 362-353.
- Nadal-Ginard, B. and Anversa, P.: *Chimera or not chimera?*, Circ Res, 2002 (vol. 90), No. 9, p. E72.
- Nagaya, N.; Fujii, T.; Iwase, T., et al.: *Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis*, Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004 (vol. 287), No. 6, pp. H2670-2676.
- Nakajima, T.; Watanabe, S.; Sato, Y., et al.: *An immunoperoxidase study of S-100 protein distribution in normal and neoplastic tissues*, Am J Surg Pathol, 1982 (vol. 6), No. 8, pp. 715-727.
- Orlic, D.; Kajstura, J.; Chimenti, S., et al.: *Bone marrow stem cells regenerate infarcted myocardium*, Pediatr Transplant, 2003 (vol. 7 Suppl 3), pp. 86-88.
- Orlic, D.; Kajstura, J.; Chimenti, S., et al.: *Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium*, Nature, 2001 (vol. 410), No. 6829, pp. 701-705.
- Packer, M.; Coats, A. J.; Fowler, M. B., et al.: *Effect of carvedilol on survival in severe chronic heart failure*, N Engl J Med, 2001 (vol. 344), No. 22, pp. 1651-1658.
- Pauschinger, M.; Chandrasekharan, K.; Li, J., et al.: *[Mechanisms of extracellular matrix remodeling in dilated cardiomyopathy]*, Herz, 2002 (vol. 27), No. 7, pp. 677-682.
- Peled, A.; Petit, I.; Kollet, O., et al.: *Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4*, Science, 1999 (vol. 283), No. 5403, pp. 845-848.
- Perin, E. C.; Dohmann, H. F.; Borojevic, R., et al.: *Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure*, Circulation, 2003 (vol. 107), No. 18, pp. 2294-2302.
- Piccione, W., Jr.: *Mechanical circulatory assistance: changing indications and options*, J Heart Lung Transplant, 1997 (vol. 16), No. 6, pp. S25-28.
- Pouzet, B.; Ghostine, S.; Vilquin, J. T., et al.: *Is skeletal myoblast transplantation clinically relevant in the era of angiotensin-converting enzyme inhibitors?*, Circulation, 2001 (vol. 104), No. 12 Suppl 1, pp. I223-228.

- Preibisch, S.; Saalfeld, S. and Tomancak, P.: *Globally optimal stitching of tiled 3D microscopic image acquisitions*, Bioinformatics, 2009 (vol. 25), No. 11, pp. 1463-1465.
- Raggi, P. and Berman, D. S.: *Computed tomography coronary calcium screening and myocardial perfusion imaging*, J Nucl Cardiol, 2005 (vol. 12), No. 1, pp. 96-103.
- Ratajska, A. and Czarnowska, E.: *Vasculogenesis of the embryonic heart: contribution of nucleated red blood cells to early vascular structures*, Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets, 2006 (vol. 6), No. 3, pp. 219-225.
- Reitz, B. A.; Bieber, C. P.; Raney, A. A., et al.: *Orthotopic heart and combined heart and lung transplantation with cyclosporin-A immune suppression*, Transplant Proc, 1981 (vol. 13), No. 1 Pt 1, pp. 393-396.
- Rosamond, W.; Flegal, K.; Friday, G., et al.: *Heart disease and stroke statistics--2007 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee*, Circulation, 2007 (vol. 115), No. 5, pp. e69-171.
- Sabbah, H. N.: *Effects of cardiac support device on reverse remodeling: molecular, biochemical, and structural mechanisms*, J Card Fail, 2004 (vol. 10), No. 6 Suppl, pp. S207-214.
- Schaefer, A.; Zwadlo, C.; Fuchs, M., et al.: *Long-term effects of intracoronary bone marrow cell transfer on diastolic function in patients after acute myocardial infarction: 5-year results from the randomized-controlled BOOST trial--an echocardiographic study*, Eur J Echocardiogr, 2010 (vol. 11), No. 2, pp. 165-171.
- Scorsin, M.; Hagege, A. A.; Marotte, F., et al.: *Does transplantation of cardiomyocytes improve function of infarcted myocardium?*, Circulation, 1997 (vol. 96), No. 9 Suppl, pp. II-188-193.
- Shah, M.; Ali, V.; Lamba, S., et al.: *Pathophysiology and clinical spectrum of acute congestive heart failure*, Rev Cardiovasc Med, 2001 (vol. 2 Suppl 2), pp. S2-6.
- St John Sutton, M.; Pfeffer, M. A.; Moye, L., et al.: *Cardiovascular death and left ventricular remodeling two years after myocardial infarction: baseline predictors and impact of long-term use of captopril: information from the Survival and Ventricular Enlargement (SAVE) trial*, Circulation, 1997 (vol. 96), No. 10, pp. 3294-3299.
- Statistisches Bundesamt: *Herzinsuffizienz häufigster Grund für einen Krankenhausaufenthalt in 2006*, 2006 (Accessed April 9, 2011, at URL: [http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Presse/pm/2008/03/PD08\\_095\\_231.psmI](http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Presse/pm/2008/03/PD08_095_231.psmI))
- Stehlik, J.; Edwards, L. B.; Kucheryavaya, A. Y., et al.: *The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-seventh official adult heart transplant report--2010*, J Heart Lung Transplant, 2010 (vol. 29), No. 10, pp. 1089-1103.
- Strauer, B. E.; Brehm, M.; Zeus, T., et al.: *Intracoronary, human autologous stem cell transplantation for myocardial regeneration following myocardial infarction*, Dtsch Med Wochenschr, 2001 (vol. 126), No. 34-35, pp. 932-938.
- Strauer, B. E.; Brehm, M.; Zeus, T., et al.: *Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans*, Circulation, 2002 (vol. 106), No. 15, pp. 1913-1918.
- Strauer, B. E.; Brehm, M.; Zeus, T., et al.: *Stem cell therapy in acute myocardial infarction*, Med Klin (Munich), 2003 (vol. 98 Suppl 2), pp. 14-18.

- Strauer, B. E. and Kornowski, R.: *Stem cell therapy in perspective*, *Circulation*, 2003 (vol. 107), No. 7, pp. 929-934.
- Swedberg, K.; Cleland, J.; Dargie, H., et al.: *Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure: executive summary (update 2005): The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure of the European Society of Cardiology*, *Eur Heart J*, 2005 (vol. 26), No. 11, pp. 1115-1140.
- Tebbenjohanns, J.; Niehaus, M. and Korte, T.: *[Indications for implantable cardioverter-defibrillator]*, *Dtsch Med Wochenschr*, 2002 (vol. 127), No. 41, pp. 2120-2124.
- The CONSENSUS Trial Study Group: *Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS)*, *N Engl J Med*, 1987 (vol. 316), No. 23, pp. 1429-1435.
- The Danish Verapamil Infarction Trial II -- DAVIT II: *Effect of verapamil on mortality and major events after acute myocardial infarction*, *Am J Cardiol*, 1990 (vol. 66), No. 10, pp. 779-785.
- The Digitalis Investigation Group: *The effect of digoxin on mortality and morbidity in patients with heart failure*, *N Engl J Med*, 1997 (vol. 336), No. 8, pp. 525-533.
- The SOLVD Investigators: *Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fractions and congestive heart failure*, *N Engl J Med*, 1991 (vol. 325), No. 5, pp. 293-302.
- Trambaiolo, P.; Tonti, G.; Salustri, A., et al.: *New insights into regional systolic and diastolic left ventricular function with tissue Doppler echocardiography: from qualitative analysis to a quantitative approach*, *J Am Soc Echocardiogr*, 2001 (vol. 14), No. 2, pp. 85-96.
- Tse, H. F.; Kwong, Y. L.; Chan, J. K., et al.: *Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation*, *Lancet*, 2003 (vol. 361), No. 9351, pp. 47-49.
- Tukey, J. W.: *Some thoughts on clinical trials, especially problems of multiplicity*, *Science*, 1977 (vol. 198), No. 4318, pp. 679-684.
- Udelson, J. E.: *Ventricular remodeling in heart failure and the effect of beta-blockade*, *Am J Cardiol*, 2004 (vol. 93), No. 9A, pp. 43B-48B.
- Vandervelde, S.; van Luyn, M. J.; Tio, R. A., et al.: *Signaling factors in stem cell-mediated repair of infarcted myocardium*, *J Mol Cell Cardiol*, 2005 (vol. 39), No. 2, pp. 363-376.
- Waggoner, A. D. and Bierig, S. M.: *Tissue Doppler imaging: a useful echocardiographic method for the cardiac sonographer to assess systolic and diastolic ventricular function*, *J Am Soc Echocardiogr*, 2001 (vol. 14), No. 12, pp. 1143-1152.
- Wakitani, S.; Saito, T. and Caplan, A. I.: *Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine*, *Muscle Nerve*, 1995 (vol. 18), No. 12, pp. 1417-1426.
- Walter, T.; Shattuck, D. W.; Baldock, R., et al.: *Visualization of image data from cells to organisms*, *Nat Methods*, 2010 (vol. 7), No. 3 Suppl, pp. S26-41.
- Watson, L. E.; Sheth, M.; Denyer, R. F., et al.: *Baseline echocardiographic values for adult male rats*, *J Am Soc Echocardiogr*, 2004 (vol. 17), No. 2, pp. 161-167.
- Wollert, K. C.; Meyer, G. P.; Lotz, J., et al.: *Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial*, *Lancet*, 2004 (vol. 364), No. 9429, pp. 141-148.

- Wu, A. H.; Smith, A.; Wieczorek, S., et al.: *Biological variation for N-terminal pro- and B-type natriuretic peptides and implications for therapeutic monitoring of patients with congestive heart failure*, Am J Cardiol, 2003 (vol. 92), No. 5, pp. 628-631.
- Yoon, Y. S.; Park, J. S.; Tkebuchava, T., et al.: *Unexpected severe calcification after transplantation of bone marrow cells in acute myocardial infarction*, Circulation, 2004 (vol. 109), No. 25, pp. 3154-3157.
- Zhang, Y. M.; Hartzell, C.; Narlow, M., et al.: *Stem cell-derived cardiomyocytes demonstrate arrhythmic potential*, Circulation, 2002 (vol. 106), No. 10, pp. 1294-1299.

## 7.2 Abkürzungen

ACE	Angiotensin – Converting -- Enzyme
ACSD	Acorn® Cardiac Support Device
AT1	Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-1
EF	Ejektionsfraktion
EPZ	Endotheliale Progenitorzelle
EF	Ejektionsfraktion
FS	Fractional Shortening
HE	Hämatoxylin-Eosin
HSZ	Hämatopoetische Stammzelle
ICD	Implantierbarer Kardioverter/Defibrillator
IE	Internationale Einheit
KHK	Koronare Herzerkrankung
KMS	Knochenmarksstammzelle
LCA	Linke Koronararterie
LV	Linker Ventrikel
MAPZ	Multipotente Adulte Progenitorzelle
MSZ	Mesenchymale Stammzelle
NaCl	Natrium-Chlorid
NT-proBNP	N-Terminales Pro Brain Natriuretic Peptide
NYHA	New York Heart Association
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
SDF	Stromal Derived Cells
SRI	Strain-Rating Imaging
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
STEMI	ST-Strecken-Elevations-Myokardinfarkt
TDI	Tissue Doppler Imaging
TTE	Transthorakale Echokardiographie
VSEL-SC	Very Small Embryonic-Like Stem Cells

### 7.3 Chemikalien

<b>Chemikalie</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Braunol®	Braun
Eosin	Chromat
Ethanol	Dr. Hollborn & Söhne
Formaldehydlösung	Herbeta
Hämalaun	Sigma
Heparin	Roche
Hyaluronidase	Roche
Natriumchlorid	Fresenius
Parafin	Merck
Rompun	Bayer
S100 Antikörper Klon 15E2E2	BioGenix
Ursotamin (Ketanest®)	Serumwerk Bernburg
Xylol	Merck

### 7.3 Geräte und Materialien

<b>Gerät/Material</b>	<b>Bezugsquelle</b>
10S Echokardiographie-Schallkopf 5,5-12-MHz	General Electric
Amsterdam Infant Ventilator MK2	Elphymed
Autoclav automatischer Sterilisator	WEBECO
Automatische Pipetierhilfe Pippetus	Hirschmann
BenchMark Immunhistochemischer Färbeautomat	Ventana Roche
Betaisodona	3M
EchoPAC PC	General Electric

Entwässerungsautomat	Sanyo
Eppendorfgefäße 1ml	Sarstaedt
Ethicon Monocryl 5-0	Johnson & Johnson
Ethicon Vicryl 3-0	Johnson & Johnson
Ethicon Vicryl 5/0	Johnson&Johnson
Flexüle 18g	Neoflon
Fumalen Prolene 8-0	Fumedica
Insulinspritze	Becton Dickinson
Koagulator Typ 6 K4	Aesculap
Konisches Röhrchen Blue Max. 50 ml	Falcon
Laborkühlschrank	Liebherr
Latex OP-Handschuhe	Ausell
Microtomklingen A35	Feather
Mullkompressen RK	Lohmann/Rauscher
Objektträger selianisiert	Langenbrinck
Omnikon 40	Sterican
Rasierer	Wilkinson
Rotationsmikrotom RM2125 RT	Leica
Schüttler MTS4	IKA
Sterile Tücher	3M
Tragbare Waage PT 1200	Satorius
VIVID 7 Dimension Echokardiographie-System	General Electric
Zellsieb 100 µm	Falcon
Zentrifuge Biofuge	Haraeus Sepatech

## 8 Danksagung

Bei der Entstehung der vorliegenden Dissertation haben mich eine Reihe von Personen begleitet und unterstützt. Hierfür möchte ich mich bei allen herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Universitäts-Professor Dr. med. W. Konertz, der mir die Möglichkeit geboten hat, die Thematik als Promotion zu bearbeiten und die erforderlichen Untersuchungen in seiner Klinik durchzuführen.

Herrn Dr. S. Holinski danke ich speziell für die hilfreiche und kritische Betreuung meiner Arbeit sowie für die engagierte Begleitung während des gesamten Projektes. Sein beständiges Interesse und die wertvollen Ratschläge haben entscheidend zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Großer Dank gilt außerdem den Mitarbeitern des Echokardiographielabors der Abteilung für Kardiologie. Insbesondere möchte ich hier die Hilfe von Herrn PD Dr. F. Knebel bei der zeitintensiven Auswertung der echokardiographischen Bilder erwähnen.

Frau Dr. B. Rudolph möchte ich für die geduldige Unterstützung bei der Bearbeitung der histopathologischen und immunhistochemischen Auswertung danken.

Herrn Dr. K. Schluens gilt mein Dank für die Hilfestellung bei der Arbeit mit dem Computerprogramm Fiji sowie für die Nutzung der EDV-Anlage.

Herrn Dr. K. Neumann danke ich für seine Anleitung bei den statistischen Auswertungen.

Besonders danken möchte ich auch Frau Katrin Krüger aus dem Labor der Klinik für kardiovaskuläre Chirurgie für ihre kompetente Begleitung der tierexperimentellen Versuchsdurchführung sowie für die Anfertigung der histologischen Präparate.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie und meinen Kollegen.

## 9 Publikation

**“Noninvasive monitoring of cardiac function in a chronic ischemic heart failure model in the rat: Assessment with tissue Doppler and non-Doppler 2D-strain echocardiography”**

Sebastian Holinski, Fabian Knebel, Georg Heinze, Wolfgang Konertz, Gert Baumann and Adrian C Borges

In press: Cardiovasc Ultrasound

## **10 Curriculum Vitae**

Ein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## 11 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Georg Christoph Heinze, geboren am 30.09.1976 in Bonn, die vorgelegte Dissertation mit dem Thema ***Intravenöse Konchenmarkstammzell-Transplantation im chronischen Herzinsuffizienzmodell der Ratte*** selbstständig und ohne fremde Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt zu haben. Bei der Anfertigung der Dissertation wurden keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt.

.....

Datum

.....

Unterschrift