

Aus der
Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie
Prof. Dr. med. habil. Gustav Steinhoff
der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock

**Die Auswirkungen hypoxisch
präkonditionierter muriner
mesenchymaler Stammzellen auf
postinfarzielle Arrhythmien
im Mausmodell**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der

Universität Rostock

vorgelegt von

Ahmad, Beschan aus

Sulaimaniyya, Irak

Rostock, 2020

Dekan: Prof. Dr. med. univ. Emil C. Reisinger

Betreuungsausschuss

Betreuer/in Prof. Dr. med. Gustav Steinhoff

Ko-Betreuer/in: Dr. Haval Sadraddin; Dr. Ralf Gäbel

Gutachter_Innen

Gutachter: Steinhoff, Gustav, Klinik für Herzchirurgie

Gutacherin: Pützer, Brigitte, Institut für Experimentelle
Gentherapie und Tumorforschung

Gutachter: Felix, Stephan Klinik für Innere Medizin B

Jahr der Einreichung 2020

Jahr der Verteidigung 2021

Datum der mündlichen Prüfung: 27.04.2021

Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die eingereichte Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Göttingen, den 15.06.2020

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Pathophysiologische Hintergründe	2
1.1.1 Myokardinfarkt und sekundäre Komplikationen.....	2
1.1.2 Der Myokardinfarkt in der Klinik.....	4
1.1.3 Das physiologische Immunsystem.....	7
1.1.4 Immunantwort und Postinfarktphase.....	9
1.1.5 Das molekulare Remodeling.....	13
1.1.6 Elektrophysiologie.....	16
1.1.7 Die Induktion von Arrhythmien im Mausmodell.....	18
1.1.8 Postinfarzielle Arrhythmien	19
1.2 Regenerative Medizin	20
1.2.1 Die Stammzell-basierte Forschung.....	20
1.2.2 Hypoxische Präkonditionierung.....	25
1.3 Zielsetzung.....	26
2 Material und Methoden.....	27
2.1 <i>In vitro</i> Experimente	27
2.1.1 Hardware und Software.....	27
2.1.2 MSC Isolierung.....	29
2.1.3 MSC-Kultivierung.....	30
2.1.4 Identifizierung des mesenchymalen Phänotyps.....	32
2.1.5 MSC Injektion	35
2.2 <i>In vivo</i> Experimente.....	36
2.2.1 Hardware und Software.....	36
2.2.2 Gattung und Haltung der Tiere	38
2.2.3 Aufzeichnung der Herzaktion.....	38
2.2.4 Vorbereitung und Durchführung der Erstoperation.....	38
2.2.5 Vorbereitung und Durchführung der Zweitoperation.....	41
2.2.6 Herzentnahmen.....	41
2.2.7 Gewebeschnitte der Mausherzen.....	42
2.2.8 MSC-Nachweis <i>in vivo</i>	43
2.2.9 Infarktgößenfärbung	44
2.3 Statistische Analyse.....	45

3	Ergebnisse	46
3.1	<i>In vitro</i> Experimente	47
3.1.1	Zellkultur	47
3.1.2	Passage und Reinheit	53
3.1.3	Zelldifferenzierung	58
3.2	<i>In vivo</i> Experimente	62
3.2.1	Arrhythmien nach Reperfusionsinfarkt	62
3.2.2	Arrhythmien nach Permanentinfarkt	65
3.2.3	Postoperative Überlebensrate	67
3.2.4	Signifikanztestung	68
3.2.5	MSCs <i>in vivo</i>	73
3.2.6	Infarktgröße	76
4	Diskussion.....	78
4.1	Zellkultur	78
4.2	Myokardinfarkt	80
4.3	Überleben	82
4.4	Elektrophysiologie	83
4.5	Grenzen dieser Studie	85
4.6	Ausblick	87
5	Zusammenfassung	88
6	Literaturverzeichnis	90
7	Curriculum Vitae	106
8	Anhang	109

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Auswirkungen eines Herzinfarktes	3
Abbildung 2: Leitliniengerechte Diagnostik und Therapie des Herzinfarkts	6
Abbildung 3: Übersicht der Inflammation durch Schlüsselmediatoren	10
Abbildung 4: Einflüsse des TGF- β auf unterschiedliche Zellen.....	14
Abbildung 5: Spezies-spezifische Unterschiede des Aktionspotentials.....	17
Abbildung 6: Die parakrinen Eigenschaften der MSCs.....	24
Abbildung 7: Darstellung des Operationssitus durch das Auflichtmikroskop.....	40
Abbildung 8 Schematische Darstellung des Infarktareals und der Schnittebenen	42
Abbildung 9: Zellkultur nach siebtägiger Inkubation in DMEM.....	47
Abbildung 10: Zellkultur nach Protokoll Masoud Soleimani und Samad Nadri	48
Abbildung 11: Darstellung der Zellen in der P ₁	50
Abbildung 12: Darstellung der CFU in der P ₂	51
Abbildung 13: P ₀ Expression (<i>C57BL/6-Kultur</i> : CD44, CD90, CD45; <i>B6-eGFP-Kultur</i> : GFP) der Oberflächenantigene CD44, CD90, GFP und CD45	54
Abbildung 14: P ₁ (<i>C57BL/6-Kultur</i> : CD44, Sca-1, CD29, CD45) Expression der Oberflächenantigene CD44, Sca-1, CD29 und CD45	55
Abbildung 15: P ₂ (<i>C57BL/6-Kultur</i> : CD44, Sca-1, CD29, CD45,) Expression der Oberflächenantigene CD44, Sca-1, CD29 und CD45	56
Abbildung 16: Collagen II Färbung der mesenchymalen Stammzellen nach chondrozytärer Differenzierung.....	59
Abbildung 17: Osteopontinfärbung der mesenchymalen Stammzellen nach osteozytärer Differenzierung.....	60
Abbildung 18: Lichtmikroskopische Darstellung der mesenchymalen Stammzellen nach osteozytärer Differenzierung.....	60
Abbildung 19: Lichtmikroskopische Darstellung der mesenchymalen Stammzellen nach adipozytärer Differenzierung.....	61
Abbildung 20: FABP-4 Färbung der mesenchymalen Stammzellen nach adipozytärer Differenzierung.....	61
Abbildung 21: Darstellung der verschiedenen Arrhythmien in Abhängigkeit der Zeit	63
Abbildung 22: Häufigkeitsverteilung der einzelnen Arrhythmien nach Reperfusionsinfarkt	64
Abbildung 23: Häufigkeitsverteilung der einzelnen Arrhythmien nach Permanentinfarkt.....	66
Abbildung 24: Vergleich der Arrhythmietypen im Zeitraum 45 min bis 12 h nach Reperfusionsinfarkt	69
Abbildung 25: Vergleich der Arrhythmietypen im Zeitraum 45 min bis 12 h nach Permanentinfarkt.....	71
Abbildung 26 Schematische Darstellung des Infarktareals und der Schnittebenen.....	74
Abbildung 27: MSCs <i>ex vivo</i> Darstellung des Matrigels mit MSCs im Herzgewebe 0 h nach Infarkt	75
Abbildung 28: MSCs <i>ex vivo</i> Darstellung des Matrigels mit MSCs im Herzgewebe 9 d nach Infarkt	75
Abbildung 29: Vergleich des Narbenareals.....	76
Abbildung 30: Signifikanz der Unterschiede in der Narbengröße	77

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Hardware und Software	27
Tabelle 2: Lösungen	28
Tabelle 3: Unterschiede der verwendeten Protokolle.....	31
Tabelle 4: Differenzierung der mMSCs.....	32
Tabelle 5: Reagenzien zur durchflusszytometrischen Untersuchung	34
Tabelle 6: Materialien.....	36
Tabelle 7: Lösungen	37
Tabelle 8: Gewebeschnitte.....	43
Tabelle 9: Statistische Software.....	45
Tabelle 10: Unterschiede der verwendeten Protokolle.....	52
Tabelle 11: Zusammenfassung der durchflusszytometrisch ermittelten Oberflächenmarker.....	57
Tabelle 12: Signifikanzen der Arrhythmien 45 min bis 12 h nach Reperfusionsinfarkt	70
Tabelle 13: Signifikanzen der Arrhythmien 45 min bis 12 h nach Permanentinfarkt.....	72
Tabelle 14: Gewebeschnitte	74

Abkürzungsverzeichnis

ACE	<i>angiotensin converting enzyme</i>
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosintriphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
Bcl 2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bcl-xL	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
Bax	<i>bcl-2-associated X protein</i>
BG	Bigeminus
Birc1b	<i>baculoviral IAP repeat-containing 1b</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CFU	<i>colony forming unit</i>
CPC	<i>cardiac progenitor cell</i>
CPU	<i>chest pain unit</i>
CSC	<i>cardiac stem cell</i>
CRP	C reaktives Protein
DAMPs	<i>danger associated molecular patterns</i>
DAKO	<i>dual endogenous enzyme block</i>
DMEM	<i>dulbecco's modified eagle's medium</i>
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
EKG	Elektrokardiographie
EPO	Erythropoitin
EPOR	Erythropoitin Rezeptor
ES	Extrasystole
et al.	<i>et alii</i>
FABP-4	<i>fatty acid binding protein 4</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
Flk-1	<i>fetale liver kinase 1</i>
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GvHD	<i>graft versus host disease</i>
HDAC-1	<i>histone deacetylase 1</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin

HIF-1 α	<i>hypoxia induced factor-1α</i>
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
HMGB1	<i>high mobility group box 1</i>
IDO	<i>idolamine pyrrole 2,3 dioxygenase</i>
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
JAK	Januskinase
KYNA	<i>kynurenic acid</i>
LAD	<i>left anterior descending</i>
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MIC	<i>myocardial infarction control</i>
MMP	Matrixmetalloprotein
MSC	Mesenchymale Stammzelle
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B-cells</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NSTEMI	<i>non ST elevating myocardial infarction</i>
P _x	Passage X
PD-L1/2	<i>programmed death-ligand-1 & 2</i>
PES	<i>programmed electrical stimulation</i>
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PTCA	<i>percutaneous transluminal coronary angioplasty</i>
RAAS	Renin Angiotensin Aldosteron System
RAGE	<i>receptor of advanced glycation end products</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RT	Raumtemperatur
Sca-1	<i>stem cells antigen 1</i>
Sfrp2	<i>secreted frizzled related protein 2</i>
SSC-A	<i>side scatter area</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
STEMI	<i>ST-elevating myocardial infarction</i>
TGF- β	<i>transforming growth factor-β</i>

T _{hx}	T-Helferzelle x
TLR	<i>toll like receptor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
T _{reg}	Regulatorische T-Zelle
TRI	<i>treated reinfarction</i>
URI	<i>untreated reinfarction</i>
VT	Ventrikuläre Tachykardie

1 Einleitung

Chronisch ischämische Herzerkrankungen, infolge eines Herzinfarktes und langjähriger chronischer Herzkrankheit, betiteln in unserer Zeit die häufigste Todesursache in den westlichen Industrieländern. (Benjamin et al. 2018) Der Myokardinfarkt setzt in seiner akuten Form direkte Veränderungen, wie eine Migration von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten, in Gang. Eine Aktivierung des Sympathikus und der humoralen Antwort des Immunsystems ist ebenfalls Folge dieser Erkrankung. (St. Sutton und Sharpe 2000) Zusätzlich findet eine Kaskade an Remodeling-Prozessen im Infarktgebiet, der Randzone und dem nicht betroffenen Myokard statt. (Lew et al. 1985) Diese Veränderungen haben zum Teil lebenseinschränkende Auswirkungen.

Innerhalb der ersten 2 Jahre nach einem Myokardinfarkt ist eine Mortalität von ca. 10 - 15 % zu verzeichnen. Der überwiegende Anteil ist ursächlich kardialen Ereignissen zuzuordnen. (Bloch Thomsen et al. 2010) In der Hälfte der Fälle wird eine Assoziation mit Herzrhythmusstörungen beschrieben. (Waks und Buxton 2018) Trotz Fortschritt in der Behandlung des Herzinfarktes sind Möglichkeiten zur Verbesserung der Prognose limitiert. Ein Ansatz zur potenziellen Lösung dieser Problematik stellt die Therapie mit mesenchymalen Stammzellen (MSC) dar.

Mesenchymale Stammzellen sind durch spezifische Eigenschaften gekennzeichnet. Die Hauptmerkmale beinhalten die adhärente Kultur *in vitro*, eine spezifische Antigen-Expression und pluripotente Eigenschaften zur Differenzierung in Chondroblasten, Osteoblasten und Adipozyten. (Pittenger et al. 1999) Die aktuelle Forschung beschäftigt sich umfassend mit den Wirkungen und Nebenwirkungen von MSCs auf die Funktion, der Fibrosierung (Di Silvestre et al. 2017) und Revaskularisierung (Cai et al. 2016) des Herzens.

In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen intramyokardial implantiert hypoxisch präkonditionierter muriner MSCs (mMSCs) auf postinfarzielle Arrhythmien in der Maus untersucht.

1.1 Pathophysiologische Hintergründe

In diesem Abschnitt werden zunächst klinische und präklinische Aspekte des Herzinfarktes erläutert. Dabei soll der Fokus auf aktuelle Vorgehensweisen gelenkt werden. Molekulare Prozesse schließen sich an, wobei Inflammation und Remodeling die Hauptaspekte darstellen.

1.1.1 Myokardinfarkt und sekundäre Komplikationen

Der akute Herzinfarkt ist gekennzeichnet durch einen umschriebenen Untergang von Kardiomyozyten im Gebiet der absoluten oder relativen Hypoxie. Die Ausprägung der Ischämie kann einen kleinen Anteil des Herzens oder das ganze Myokard betreffen. Pathophysiologisch stehen Wandbewegungsstörungen und eine Mehrbelastung des Myokards im Vordergrund. Die vermehrte Herzarbeit und eine hämodynamische Fehlbelastung der Herzmuskulatur führen zu einer Hypertrophie der übrigen Kardiomyozyten. Im Zuge der Kontraktilitätseinschränkung entsteht bei erhöhtem enddiastolischem Volumen eine Dilatation der Vorhöfe und Stauung von Lunge und Leber. Dieser Zustand bedingt typische Beschwerden des Herzinfarkts, wie Thoraxschmerzen und Luftnot.

Im Verlauf wird ein aktiver Umbau des Herzgewebes beobachtet. Hierbei werden zwei Zeitabschnitte unterschieden. In den ersten 72 h findet das frühe Remodeling statt, welches durch eine Aktivität von Serin- und Matrixmetalloproteasen (MMP) geprägt ist. Die Auswirkungen dieser Enzyme, die teilweise durch neutrophile Granulozyten und nekrotische Kardiomyozyten freigesetzt werden, erstrecken sich auf eine Ausdünnung des Myokards und eine Dilatation der Ventrikelwand. Diese Veränderungen bedingen eine erhöhte Spannung der Myokardwand mit Hypertrophie, Kontraktilitätsstörung und Minderversorgung des Herzens. (St. Sutton und Sharpe 2000) Darüber hinaus wird der Sympathikus über ein verringertes Herzzeitvolumen aktiviert. Dieser Vorgang kann entweder direkt aus der Nebenniere über eine Freisetzung von Noradrenalin oder indirekt durch Aktivierung des Renin Angiotensin Aldosteron System (RAAS) erfolgen. Durch erhöhte Sympathikusaktivität steigt die Herzfrequenz, was eine verringerte Diastole bedingt und darauffolgend eine kürzere Perfusion des Myokards herbeiführt. (St. Sutton und Sharpe 2000) Eine weitere Problematik wird durch den erhöhten Blutdruck hervorgerufen. Um eine Öffnung der Aortenklappe zu bewirken, werden durch eine

zunehmende Herzarbeit unter dem Einfluss eines hohen diastolischen Blutdruckwertes ein höherer systolischer Druck erzeugt. Hierfür wird der Sympathikus aktiviert und eine erhöhte Herzfrequenz ist die Folge, was wiederum eine verminderte Perfusion des Myokards bedingt. Dieser *Circulus vitiosus* kann, wie es in der Praxis gängig ist, an verschiedenen Stellen durch Medikamente unterbrochen werden. (St. Sutton und Sharpe 2000)

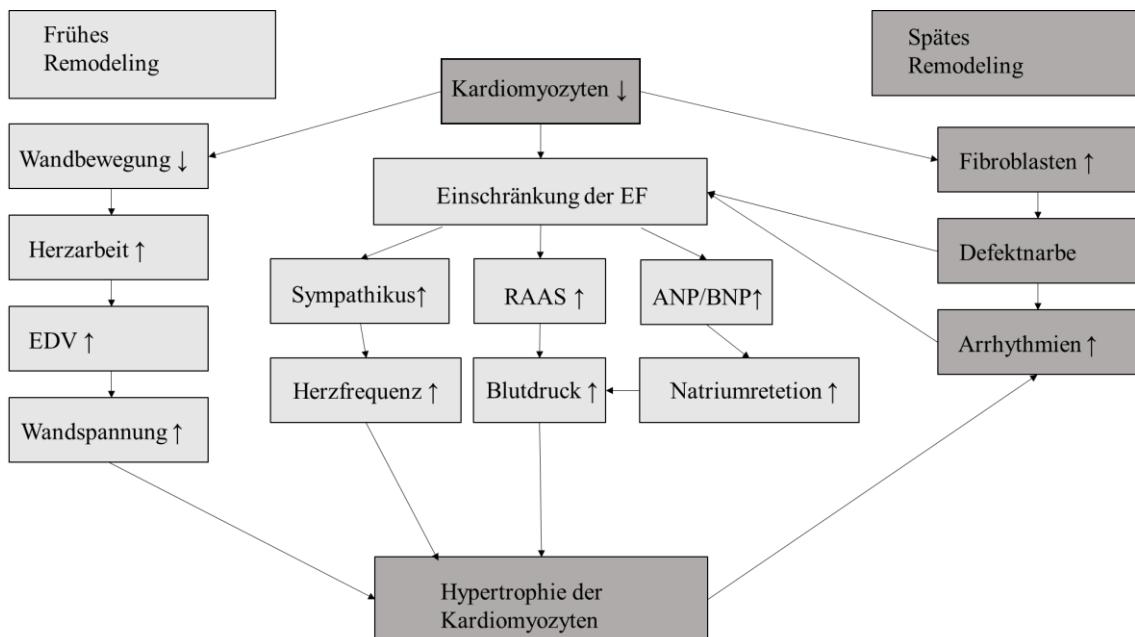


Abbildung 1: Die Auswirkungen eines Herzinfarktes

Nach einem Kardiomyozytenuntergang entsteht in der Akutphase eine Einschränkung der EF und der Wandbewegung. Im Verlauf zeigt sich durch Aktivierung des Sympathikus ein höherer Blutdruck und eine vermehrte Herzarbeit. Aufgrund dessen wird im frühen Remodeling eine Hypertrophie und Ausbildung proarrhythmogener Eigenschaften der übrigen Kardiomyozyten beobachtet. Zusätzlich entsteht im späten Remodeling eine Fibrosierung des übrigen Gewebes, was eine Arrhythmogenese begünstigt.

ANP – Atriales natriuretisches Peptid; BNP - B-Typ Natriuretisches Peptid; EDV – Enddiastolisches Volumen; EF- Ejektionsfraktion; ↑ - erhöht; ↓ - erniedrigt

Das späte Remodeling ist durch einen Beginn nach 72 h gekennzeichnet. In diesem Zeitabschnitt ist eine Hypertrophie der Fibroblasten und Kardiomyozyten charakteristisch. Während die hypertrophierten Kardiomyozyten eine Anpassung an die erhöhte Wandspannung ermöglichen, entsteht durch Fibroblasten eine nicht kontraktile Narbe, welche die Aufgabe besitzt, eine weitere Dilatation der Herzwand zu verhindern. (St. Sutton und Sharpe 2000) Näher betrachtet, setzt sich die Narbe zunächst aus

instabilen Fibrinablagerungen zusammen und wird im Verlauf durch aktivierte Myofibroblasten gefestigt. Das Narbenareal besitzt in der frühen Phase und in der späten Phase des Myokardinfarktes proarrhythmische Eigenschaften. Hierdurch treten nach einem Herzinfarkt diverse Herzrhythmusstörungen auf, die entweder asymptomatisch oder mit hämodynamischen Folgen ablaufen können. Einige dieser Arrhythmien besitzen negative prognostische Eigenschaften und bedingen dadurch eine therapierelevante erhöhte Mortalität. (Bloch Thomsen et al. 2010)

1.1.2 Der Myokardinfarkt in der Klinik

Koronare Herzkrankheit oder Koronarerterienverschlüsse führen als häufigste Ursachen zur Ausprägung eines Herzinfarkts. Die grundlegende Prädisposition beinhaltet Hauptrisikofaktoren wie erhöhtes *low density lipoprotein* (LDL), arterieller Hypertonus, Diabetes Mellitus, Nikotinabusus, eine familiäre koronare Herzkrankheit und ein erhöhtes Lebensalter. Pathophysiologisch tritt dabei ein erhöhter Koronarwiderstand infolge von Makro- und Mikroangiopathie sowie Koronarspasmen auf. Myokardiale Risikofaktoren sind eine Herzhypertrophie, ein erhöhter enddiastolischer Ventrikeldruck und die arterielle Hypertonie. In 90 % der Fälle eines Herzinfarkts entsteht aufgrund einer Ruptur eines arteriosklerotisch veränderten Koronargefäßes der vollständige Verschluss des distalen Anteils der Arterie. (Thygesen et al. 2019)

Die Behandlung des Myokardinfarkts wird präklinisch begonnen und auf speziellen Stationen weitergeführt. Zu den typischen Beschwerden zählen präkordiale intensive, lang anhaltende Thoraxschmerzen ohne Belastungsabhängigkeit oder Nitroglyzerinresponse. Eine typische Konstellation der Angina pectoris besteht in 40 % der Herzinfarkte. Des Weiteren können ein Schwächegefühl, vegetative Symptome, Herzrhythmusstörungen, sowie Symptome einer Linksherzinsuffizienz im Sinne einer Belastungsluftnot auftreten. Zu den Komplikationen, die im Rahmen des Gewebeuntergangs zu verzeichnen sind, zählen in der Frühphase (<48h) bei nahezu allen Patienten die Herzrhythmusstörungen, eine Linksherzinsuffizienz und ein kardiogener Schock. Hierbei erhöht sich die Wahrscheinlichkeit für diese Komplikationen mit dem Umfang des Infarktgebietes. Zu den Arrhythmien zählen sowohl die einfachen Arrhythmien wie ventrikulären Extrasystolen, als auch komplexere Arrhythmien, wie ventrikuläre Tachykardien und Kammerflimmern. Diese Herzrhythmusstörungen können zum Teil lebensbedrohliche Zustände verursachen. Beschwerden, die erst nach 48 h

auftreten, werden zur Spätphase der Komplikationen gezählt und umfassen in absteigender Wahrscheinlichkeit das Herzwandaneurysma, die arterielle Embolie, eine Frühperikarditis und das Dressler Syndrom. (Ibanez et al. 2018)

Für die Diagnostik des Myokardinfarktes bilden laborchemische und klinisch-diagnostische Kriterien die Leitstrukturen in der Praxis. Zu den laborchemischen Kriterien wird die Erhöhung kardialer Biomarker herangezogen. Für klinisch-diagnostische Hinweise wird eine der nachfolgenden Ausprägungen benötigt. Unspezifische ischämische Beschwerden, wie Schmerzen mit Ausstrahlen in *loco typico*, neue signifikante Veränderung der ST-Strecke, eine neu aufgetretene Q-Zacke oder ein neuer Linksschenkelblock im Elektrokardiogramm (EKG) gehören zu den Kriterien eines Herzinfarktes. Pathologien in der Bildgebung mit Nachweis von Bewegungseinschränkungen der Herzwand oder intrakoronare Thromben sind mit spezielleren Untersuchungen zu erheben und können ebenfalls zur Diagnosestellung herangezogen werden. Des Weiteren wird der Myokardinfarkt durch den Befund im EKG in einen *ST elevation myocardial infarction* (STEMI) oder *non STEMI* (NSTEMI) unterteilt. Diese Unterscheidung bedingt ein unterschiedliches Schädigungsmuster und somit ein unterschiedliches therapeutisches Zeitfenster. Es gibt weitere Einteilungen, die eine ursächliche Komponente beinhalten, jedoch im klinischen und präklinischen Gebrauch seltener anzutreffen sind. (Ibanez et al. 2018)

Die Therapie des Myokardinfarkts beginnt im optimalen Fall in der präklinischen Phase. In dieser Zeit wird durch den Notarzt erstmals eine supportive Therapie mit Sauerstoff, Analgetika, Sedativa und Antikoagulantien durchgeführt. Bei der Antikoagulation wird im überwiegenden Anteil Acetylsalicylsäure (ASS) verwendet. Daran schließt sich die Hospitalphase an. Auf einer Intensivstation oder *chest pain unit* (CPU) wird die Medikation der Präklinik weitergeführt, wobei zusätzlich Betablocker, *angiotensin converting enzyme* Inhibitoren (ACE) und Statine verabreicht werden. Eine zeitnahe Reperfusionstherapie wird angestrebt. Hierbei wird als Mittel der ersten Wahl die *percutaneous transluminal coronary angioplasty* (PTCA) im Falle eines STEMIs innerhalb der ersten 90 min und innerhalb von 6-72 h im Falle des NSTEMIs nach Erstkontakt gewählt. Wenn keine PTCA durchführbar ist oder eine Erstkontaktzeit von zwei Stunden überschritten wurde, besteht alternativ die Möglichkeit einer Reperfusion durch Fibrinolytika. (Ibanez et al. 2018)

Nachfolgend wird im Regelfall zur Prophylaxe der koronaren Rethrombose eine sogenannte duale Thrombozytenaggregationshemmung durchgeführt. Diese Kombination besteht aus einer 12-monatigen Ticagrelor-, Prasugrel- oder Clopidogrel-Gabe und einer lebenslangen ASS Therapie. Im Verlauf steht die Behandlung der vorliegenden Komplikationen im Vordergrund. Zu den wichtigsten Begleiterkrankungen gehören Herzrhythmusstörungen, die meist symptomatisch mit einer Frequenzkontrolle durch Antiarrhythmika oder bei vorliegender Lebensgefahr mit einer externen Defibrillation behandelt werden. Eine akute Herzinsuffizienz tritt häufig durch eine Mitralklappeninsuffizienz auf und wird operativ oder interventionell behandelt. Je nach Schwere der Komplikationen erhöht sich die Letalität von < 5 % auf bis zu 90 %. Im weiteren Verlauf werden spezielle kardiologische Rehabilitationen und Life-Style-Änderungen angestrebt und empfohlen. (Ibanez et al. 2018)

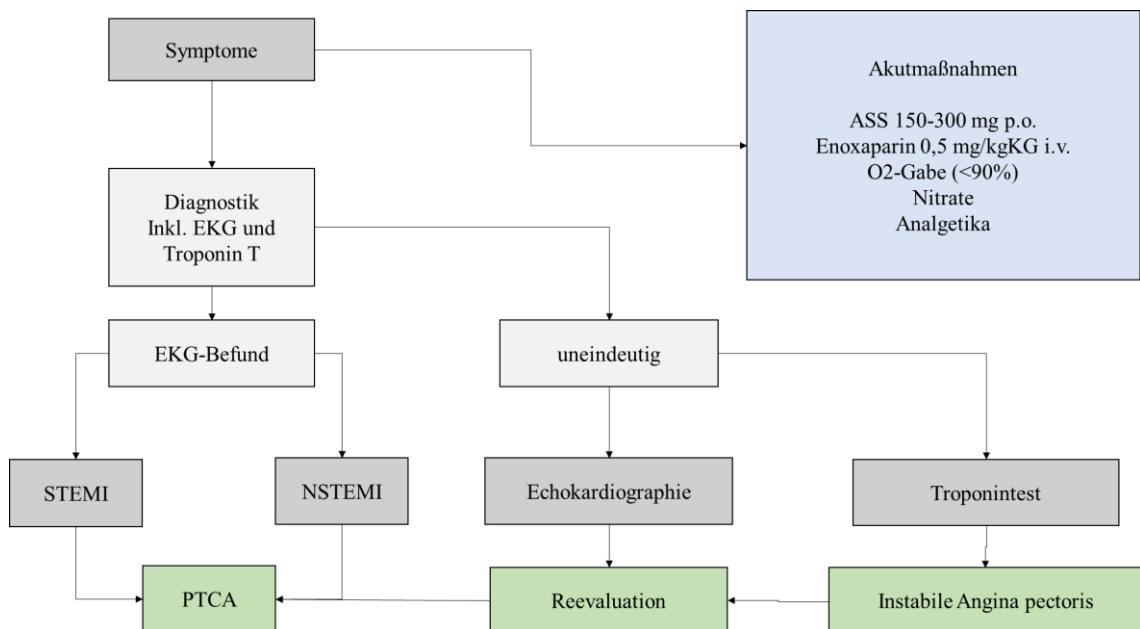


Abbildung 2: Leitliniengerechte Diagnostik und Therapie des Herzinfarkts

Im Rahmen eines Herzinfarkts kommt es zu einer typischen Beschwerdesymptomatik, die zunächst mit Akutmaßnahmen symptomatisch behandelt wird. Nachfolgend wird eine Therapieoption anhand der Befunde im EKG gewählt, wobei durch Bestätigung des Herzinfarkts eine interventionelle Therapie das Mittel der ersten Wahl darstellt.

ASS – Acetylsalicylsäure; EKG – Elektrokardiographie; (N)STEMI – (non) ST-elevating myocardial infarction; PTCA – percutaneous transluminal coronary angioplasty

1.1.3 Das physiologische Immunsystem

Zum Verständnis der Abläufe im Fall einer pathologischen Aktivierung des Immunsystems sind die physiologischen Umstände zu beleuchten. Das menschliche Abwehrsystem setzt sich aus einem angeborenen und einem erworbenen Anteil zusammen. Die angeborenen Abwehrmechanismen werden zusätzlich in physikalische und zelluläre Mechanismen unterteilt.

Die angeborene Immunantwort zeichnet sich durch eine unspezifische Immunreaktion gegenüber Erregern und Toxinen aus. Die physikalische Komponente beinhaltet die schützende Funktion des verhornten Plattenepithels der Haut, eine Schleimproduktion mit Lysozym, Laktoferrin und Immunglobulin Typ-A sowie Schutzreflexe wie der Hustenreiz oder der Kornealreflex. Als zelluläre Mechanismen hingegen werden Abwehrreaktionen auf Basis von *major histocompatibility complex-I* (MHC-I) und MHC-II bezeichnet. Diese MHC-Regionen stellen Genkomplexe dar, welche unter anderem für die Oberflächenantigene *human leukocyte antigen* (HLA) A, B, C und D mit den Untertypen DR, DP und DQ codieren und die Präsentation eigener und fremder Antigene ermöglichen. Hierbei sind MHCI Oberflächenantigene auf allen kernhaltigen und MHC-II Oberflächenantigene im überwiegenden Anteil auf antigenpräsentierenden Zellen zu finden. Zu den humoralen Mechanismen, welche hauptsächlich durch Plasmaproteine eingeleitet werden, zählen zum einen der Anstieg an Akute-Phase-Proteinen, Opsonieren durch das Komplementsystem und die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine. Im Zuge einer Akuten-Phase-Reaktion sind eine Leukozytose zur Abwehr von Erregern, eine erhöhte Thrombogenität zur Wundheilung und die Erhöhung von Akute-Phase-Proteinen zu beobachten. Hierbei sind mehr als 30 verschiedene in der Leber synthetisierte Proteine beteiligt. Zu den wichtigsten Vertretern gehören das C reaktive Protein (CRP), das Ferritin und das Haptoglobin. Während durch CRP Pathogene opsoniert werden, wird durch Ferritin das freie Eisen und durch Haptoglobin freies Hämoglobin im Blut gebunden. Des Weiteren entsteht über Erhöhung von Fibrinogen eine beschleunigte Wundheilung und gleichzeitig eine erhöhte Thrombogenität des Blutes.

Das Komplementsystem beinhaltet mehr als 30 verschiedene Plasmaproteine. Über eine Kaskade werden die funktionstragenden Komplementfaktoren aktiviert. Im Grunde führen diese aktivierte Komplementfaktoren mittels dreier Mechanismen zu einer Erregerabwehr. Über eine Aktivierung von C5b und Anlagerung von C6-C9 entsteht der Membranangriffskomplex, welcher durch Einbringung einer Pore in die Zellmembran

infizierte Zellen depolarisiert und schlussendlich nekrotisiert. Eine Opsonierung erfolgt über die Komplementfaktoren C3b und C4b. Eine weniger spezifische Antwort wird über eine lokale Inflammation durch C2b, C3a, C4a und C5a eingeleitet. Die Funktion dieser humoralen Mechanismen besteht in der Initiierung einer Immunantwort und einer daraus folgenden Vasodilatation, der Erhöhung der Gefäßpermeabilität, der Chemotaxis von Immunzellen und dem Abtöten von Erregern.

Das erworbene Immunsystem stützt sich auf eine Präsentation von Antigenen über MHC-Moleküle. Im Zuge der Immunantwort durch MHC-I Moleküle werden zytotoxische T-Zellen, welche *cluster of differentiation 8* (CD) positiv sind, aktiviert und führen entweder durch Perforine zu einer direkten Zelllyse oder zu einer durch Proteasen vermittelten Apoptose. Eine Präsentation über MHC-II Moleküle initiiert entweder eine Typ-1- oder Typ-2-Reaktion. Die Typ-1 Reaktion beinhaltet eine Stimulation von T_{H1} Zellen zur Produktion von Zytokinen über Makrophagen. Darauffolgend werden weitere Makrophagen durch sezernierte Zytokine aktiviert. Eine Typ-2-Reaktion hingegen stützt sich auf eine Internalisierung von oberflächlichen Immunglobulinen auf B-Lymphozyten, die daraufhin durch eine Präsentation des Antigens über MHC-II durch T-Helfer-Zellen-2 (T_{H2} -Zellen) aktiviert werden. Im Verlauf wird so eine Proliferation der B-Zelle initiiert und die Produktion des antigenspezifischen Immunglobulins erhöht. Eine eher seltene Aktivierung der erworbenen Immunantwort wird unter Internalisierung von Polysacchariden beobachtet. Hierbei kann die B-Zelle ohne Interaktion mit T-Zellen in einen aktivierte Zustand übergehen.

Die unterschiedlichen Ebenen der Abwehrreaktion sind in den Grundzügen dargestellt. Die Interaktion dieser verschiedenen Mechanismen bei einem Herzinfarkt ist weiterhin nicht zur Gänze geklärt.

1.1.4 Immunantwort und Postinfarktphase

Der Ablauf der Regeneration nach einem Myokardinfarkt kann durch eine Abfolge dreier Phasen beschrieben werden. (Frangogiannis 2012) Zu Beginn zeigt sich eine inflammatorische Phase, in der ein Débridement untergegangener Zellen erfolgt. Zur Initiierung dieses Prozesses befinden sich im normalen Herzgewebe zahlreiche gewebsständige Mastzellen. Diese mit Zytokinen beladenen physiologischen Zellen werden über eine Reihe von Molekülen zur Degranulation angeregt. Zu diesen Molekülen gehören die *reactive oxygen species (ROS)*, das Adenosin und die C5a Komplementfaktoren. (Gilles et al. 2003; Linden 2001; Ito et al. 1993) Diese Stoffe werden durch untergegangene Zellen freigesetzt oder über Mediatoren angeregt. Zirkulierende Leukozyten werden durch Chemokine und adhäsive Moleküle zur Transition angetrieben. Zusätzlich fördert im Besonderen das Chemokin CCL2 eine Infiltration des Herzgewebes mit proinflammatorischen Makrophagen. (Gu et al. 1999) Interleukine hemmen in der inflammatorischen Phase die Synthese von extrazellulärem Gewebe, was eine verspätete Fibrose des Gewebes bedingt. Im Verlauf treten antiinflammatorische Makrophagen in das Herz ein. (Saxena et al. 2013)

Überlappend schließt sich die proliferative Phase an. In diesem Zeitabschnitt werden über Wachstumshormone mononukleäre Zellen, Makrophagen Subpopulationen und mesenchymale Zelllinien angeregt. Eine Sekretion von Extrazellulärmatrix durch Fibroblasten bewirkt eine Fibrose des infarzierten Gewebes. Zum Abschluss der proliferativen Phase nimmt die Anzahl der mesenchymalen Zelllinien ab, wodurch die Phase der Alterung eingeleitet wird. Im Verlauf entsteht eine regressive Narbe aus vernetztem Kollagen. (Lerman et al. 1983) Dies ist das mikroskopische Korrelat zu der makroskopisch sichtbaren Narbe, die im postinfarziellen Verlauf entsteht.

Nachfolgend werden die wichtigsten oben genannten Entzündungswege nach einem Herzinfarkt erläutert. Diese Pathways erstrecken sich von der direkten Wirkung pathologisch freigesetzter Moleküle bis hin zur aktiven Förderung der Entzündung.

Am Anfang der inflammatorischen Kaskade steht die Nekrose von Myokardzellen. Dieser Vorgang beinhaltet die Freisetzung von *danger associated molecular patterns (DAMPs)*, (Lerman et al. 1983; Arslan et al. 2011) Hitzeschockproteinen (Zou et al. 2008) und ATP. (Mezzaroma et al. 2011) Zu den wichtigsten Vertretern dieser DAMPs gehört das *high mobility group box 1 (HMGB1)* Molekül, welches über *toll like receptor (TLR)* und *receptor of advanced glycation end products (RAGE)* eine Immunantwort auslöst.

(Andrassy et al. 2008) ATP und Hitzeschockproteine wiederum aktivieren das Immunsystem auf direktem Wege mit einer Initiierung von Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen. Zusätzlich ist eine Einleitung der Immunantwort über Fragmente der Extrazellulärmatrix und der Komplementkaskade zu beobachten. (Zou et al. 2008; Mezzaroma et al. 2011)

Einen obligaten Aspekt der Entzündung stellen die TLR dar. Diese Rezeptoren werden im Verlauf und während der Nekrose durch *desoxyribonucleic acid* (DNA) und *ribonucleic acid* (RNA) aktiviert. Es werden 13 Mitglieder dieser Rezeptorfamilie beschrieben, wobei einige dieser Rezeptoren eine relevante Funktion in der Erregerabwehr besitzen. Speziell die TLR 2 & 4 werden in der Entzündungsphase des Herzinfarktes exprimiert. Eine Beteiligung des TLR 4 an der sekundären Schädigung im Infarktgebiet (Oyama et al. 2004), an der Abnahme der kardialen Pumpfunktion und dem maladaptiven Remodeling (Timmers et al. 2008) wurde beschrieben. Ein Reperfusionschaden des Gewebes konnte mit dem TLR 2 in Verbindung gebracht werden. (Arslan et al. 2010)

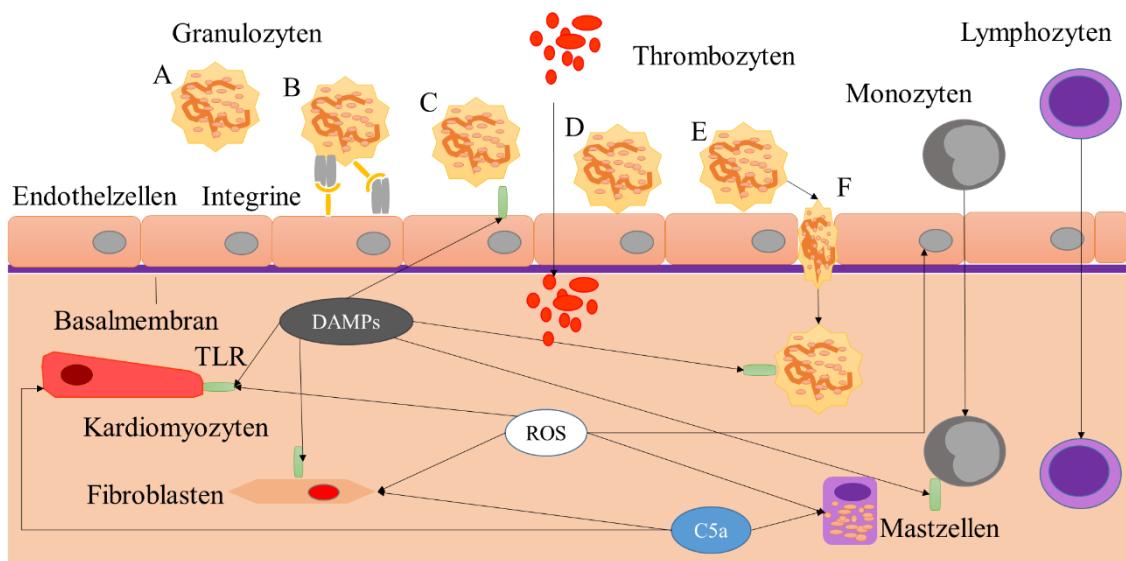


Abbildung 3: Übersicht der Inflammation durch Schlüsselmediatoren

A Granulozyt in der Blutbahn mit *rolling*. B Interaktion mit Integrinen und adhäsiven Molekülen. C Zusätzliche Initiierung der Immunantwort durch DAMPs. D-F Infiltration des Gewebes. DAMPs – *danger associated molecular patterns*; TLR – *toll like receptor*; ROS – *reactive oxygen species*.

Reactive oxygen species stellen eine weitere Ebene der Entzündung dar. Hierbei fungieren diese Schlüsselmoleküle als Mediatoren, die eine Entzündung im Randgebiet des Infarktes auslösen. (Mittal et al. 2014) Nicht nur wird eine Bildung und Freisetzung von ROS durch Interleukine gefördert, umgekehrt kann auch eine Aktivierung von Interleukinen durch ROS verursacht werden. Dadurch entstehen ein positives Feedback und somit eine verstärkte Entzündungsreaktion. Bildung und Sekretion dieser ROS wird überwiegend von polymorphnukleären Leukozyten übernommen und bedingt eine erhöhte Permeabilität der Gefäßwände. (Mittal et al. 2014) Weitere Funktionen wie eine Förderung der Rekrutierung durch Induktion von Integrinen (Mulligan et al. 1992), Chemokinen (Chandrasekar et al. 2001; Mulligan et al. 1992), Zytokinen und Adhäsiven Molekülen sind beschrieben. (Fan et al. 2002)

Zu den Chemokinen und Zytokinen gibt es jeweils eine heterogene Gruppe, die in ihrer Funktion pleiotrope Effekte zeigen. Neutrophile Granulozyten, Monozyten, T- und B-Zellen sind an der Erhöhung sowohl von Chemokinen als auch Zytokinen im infarzierten Gewebe beteiligt. (Frangogiannis 2007; Meager 1998) Eine Rekrutierung inflammatorischer Leukozyten wird den zwei Chemokingruppen C-C und C-X-C zugeschrieben. Während die C-C Gruppenmitglieder einen chemotaktischen Effekt auf Makrophagen ausüben (Gu et al. 1999), sind die Vertreter der C-X-C hauptsächlich mit einer Leukozytenrekrutierung assoziiert. (Ivey et al. 1995) Eine C-C-Gruppen abhängige Infiltration durch antiinflammatorische mononukleäre Zellen und regulatorische T-Zellen wird vermutet. (Dobaczewski et al. 2010)

Weiterhin wird eine gesteigerte Sekretion von Tumornekrosefaktor (TNF), Interleukin (IL)-1 β und IL-6 im infarzierten Gewebe beobachtet. (Dewald et al. 2004) Mechanistisch wird eine Aktivierung über *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) und Januskinase/*signal transducer and activator of transcription* (JAK/STAT) hervorgerufen. Anschließend werden über *nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B-cells* (NF- κ B) und *activator protein-1* (AP-1) Transkriptionsfaktoren zur Bildung von TNF- α und IL-6 freigesetzt. (Beg und Baltimore 1996) Tumornekrosefaktormoleküle bewirken unter anderem kardiogene Effekte, die zum überwiegenden Anteil über TNF-Rezeptor 1 & 2 vermittelt werden. Obwohl die Freisetzung des TNFs über eine Chemotaxis die Entzündung fördert, werden ebenfalls antiapoptotische und somit antiinflammatorische Effekte beschrieben. (Hamid et al. 2009) Interleukin 1 besitzt zusätzliche Eigenschaften, die eine Förderung der Chemotaxis und eine gleichzeitige

Hemmung von Myofibroblasten bewirken. (Saxena et al. 2013; Siwik et al. 2000) Obwohl ein therapeutischer Nutzen in der Rheumatherapie beschrieben wurde, bleibt ein positiver Effekt bei einer Suppression von IL-6 im Herzgewebe aus. Neutrale Effekte (Fuchs et al. 2003) bis hin zu negativen Auswirkungen, wie die erhöhte Inzidenz von Herzwandrupturen (Hilfiker-Kleiner et al. 2010), werden beschrieben.

1.1.5 Das molekulare Remodeling

Das postinfarzielle Remodeling beinhaltet verschiedene Veränderungen in der Struktur und Funktion des Myokards. Die grundsätzlichen Vorgänge beruhen auf einer Hypertrophie, Proliferation, Apoptose und Nekrose der infarzierten Zellen. Zusätzlich zeigen sich Veränderungen wie Akkumulation, Abbau und Fibrosierung der Extrazellulärmatrix. In den Grundzügen wird zwischen Narbenformation und reaktiver Fibrose unterschieden. Hierbei erstreckt sich die Narbenformation ausschließlich auf das Infarktareal, wohingegen die reaktive Fibrose sowohl im infarzierten als auch im gesunden Gewebe zu finden ist. Neben einer Einschränkung der Kontraktilität sind Auswirkungen auf die Elektrophysiologie des Herzens beobachtet worden. Dadurch kann zusätzlich zu einer mechanischen Störung der Herzfunktion eine Prädisposition für Arrhythmien beobachtet werden. (Francis Stuart et al. 2016)

Im Verlauf der einzelnen Phasen des Remodelings werden drei Zeitabschnitte beschrieben. In der Anfangsphase entsteht im Rahmen der Hypoxie und der daraus resultierenden Komplementaktivierung eine Entzündung. Hierzu wandern neutrophile Granulozyten, Makrophagen und mononukleäre Zellen ein. (Talman und Ruskoaho 2016) Im Rahmen dieser inflammatorischen Reaktion ist eine Inhibition der Extrazellulärmatrix und eine stark erhöhte Expression von Zytokinen, wie TNF- α , IL-1 β , und IL-6, charakteristisch. (Saxena et al. 2013; Siwik et al. 2000) Weitere Entzündungsmediatoren wie ROS, MMP und TLR sind ebenfalls an dieser Entzündung beteiligt. (Mittal et al. 2014; St. Sutton und Sharpe 2000; Andrassy et al. 2008) Von der Herzinfarktgröße abhängig entsteht entweder ein Rückgang oder ein weiterer Anstieg inflammatorischer Mediatoren. Im Unterschied zur anfänglichen Entzündungsreaktion wird die Freisetzung der Mediatoren im gesunden und im infarzierten Areal beobachtet. Dieser Zustand kann mehrere Wochen später nachgewiesen werden und wird hauptsächlich durch mechanische Beanspruchung des Myokards ausgelöst. Zusätzlich bewirken Zytokine eine Myokardhypertrophie, Myokardapoptose und Kontraktilitätsstörungen. (Nian et al. 2004)

Im Übergang zwischen der inflammatorischen und der proliferativen Phase besitzt der *transforming growth factor β* (TGF- β) eine wichtige Funktion. Analog zu Zytokinen befindet sich TGF- β im gesunden Herzgewebe eingelagert. (Frangogiannis 2012) Nach Schädigung der Myokardzellen und einer daraus folgenden Aktivierung inflammatorischer Entzündungskaskaden werden diese vorgeformten Moleküle freigesetzt. Die Funktion des TGF- β s besteht in einer für die proliferative Phase

charakteristische Hochregulierung von Fibronectin und Kollagen, einer Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten und einer Förderung von Proteaseinhibitoren. (Kuwahara et al. 2002; Ignotz und Massagué 1986; Schiller et al. 2004)

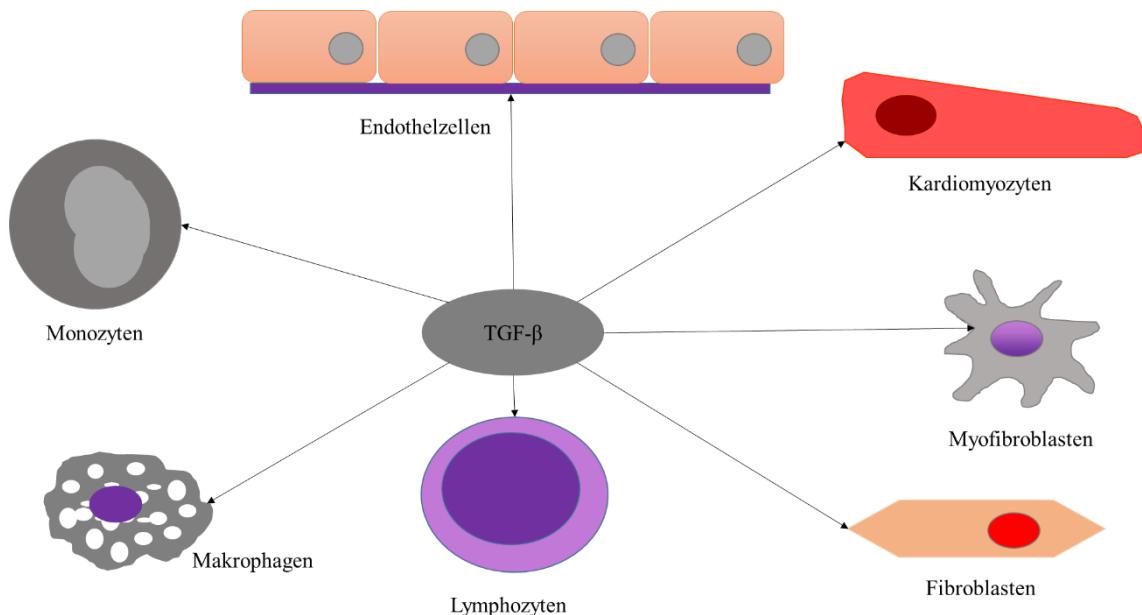


Abbildung 4: Einflüsse des TGF- β auf unterschiedliche Zellen

TGF- β - *transforming growth factor β*

Im weiteren Verlauf etabliert sich die proliferative Phase, die durch eine Narbenformation und Neoangiogenese gekennzeichnet ist. Hierbei ist eine Abnahme der inflammatorischen Zellen und eine Proliferation von Fibroblasten charakteristisch. Eine Zunahme der Extrazellulärmatrix mit verstärkter Synthese von Kollagen, Laminin und adhäsiven Proteinen wird beobachtet. (Shinde und Frangogiannis 2014) Das molekulare Korrelat ist eine Abnahme der inflammatorischen Mediatoren und eine Zunahme an angiogenen und wachstumsfördernden Faktoren. (Talman und Ruskoaho 2016)

An die proliferative Phase schließt sich ein Reifeprozess der Narbe an. Dieser Zeitabschnitt ist gekennzeichnet durch eine Zunahme der Stabilität und Kontraktion des Narbenareals. Ursächlich für die Stabilitätszunahme ist eine Umwandlung von Kollagen III in Kollagen I und ein *cross linking* der Kollagenfasern. (Weber et al. 2013) Die Persistenz der Narbe wird mittels residenter Myofibroblasten durch Erneuerung des Kollagens aufrechterhalten. (Prabhu und Frangogiannis 2016) Die postinfarziell fortschreitende Herzinsuffizienz begründet sich hauptsächlich durch eine Hypertrophie der Kardiomyozyten im gesunden Herzgewebe und einem darauffolgenden fibrösen

Umbau, wobei der anfängliche Untergang von Kardiomyozyten im Infarktareal eine untergeordnete Rolle einnimmt. In Folge der Kontraktion der Infarktnarbe und der Hypertrophie der Kardiomyozyten wird eine progressive Abnahme der systolischen und diastolischen Funktion des Herzens beobachtet. (Weber et al. 2013; Heineke und Molkentin 2006) Ursächlich zeigen sich, aufgrund der höheren mechanischen Beanspruchung, eine erhöhte Aktivität von TGF- β und lokalen Fibroblasten im Interstitium und Adventitia der Koronararterien. (Weber et al. 2013) Des Weiteren ist eine Einengung der Koronararterien und eine infolgedessen abnehmende Blutzufuhr zum Herzen beobachtet worden. (Dai et al. 2012) Diese molekularen Prozesse bedingen eine progrediente Herzinsuffizienz und eine erhöhte Mortalität des Patienten.

1.1.6 Elektrophysiologie

Kardiale Arrhythmien entstehen durch unterschiedliche Veränderungen und Abnormitäten des Herzgewebes. Im Verlauf einer normalen Herzaktion entsteht durch den Sinusknoten eine Depolarisationswelle, die sich über den gesamten Vorhof ausbreitet. Diese Erregung leitet sich darauffolgend über das His-Bündel und die Tawaraschenkel zu den Purkinjefasern fort. Anschließend wird das Myokard durch die Purkinjezellen depolarisiert. Das gesamte Herzgewebe, angefangen vom Apex bis zur Basis, kontrahiert. Dieser Vorgang ist wichtig für die Ejektionsfraktion, der Auswurfleistung des Herzens und das Herzzeitvolumen. Das Aktionspotential der Herzmuskulatur entsteht durch eine Aktivierung diverser Ionenkanäle. Diese Erregung wird über *gap junctions* zwischen den Kardiomyozyten übertragen. (Kanno und Saffitz 2001) Hierbei ist die Ausprägung dieser Ionenkanäle ursächlich für die unterschiedliche Leitfähigkeit der einzelnen Regionen im Herzgewebe. (Nerbonne und GUO 2002)

Die Abläufe während eines Aktionspotentials werden, wie in Abbildung 5 dargestellt, in die Phasen 0 bis 4 unterteilt. Zu Anfang der Phase 0 entsteht eine Depolarisation der Kardiomyozytenzelle bis zum Schwellenpotential. (Kunze 1985) Hierdurch öffnen sich in Phase 1 die spannungsgesteuerten Natriumkanäle, die eine weitere Depolarisation der Zelle bewirken. Dieser Vorgang endet mit Erreichen des Umkehrpotentials oder durch Inaktivierung der Natriumkanäle. Daraufhin öffnen *fast-* und *slow transient outward* Kaliumkanäle, die der Depolarisation entgegenwirken. Im Verlauf der Phase 2 entsteht durch ein Gleichgewicht zwischen spannungsgesteuerten L-Typ Calciumkanälen und spannungsgesteuerten *delayed rectifier* Kaliumkanälen eine Plateauphase. (Carmeliet 1999) In Phase 3 werden die spannungsgesteuerten Calciumkanäle inaktiviert, was eine Repolarisation der Zelle bedingt. Das normale Spannungspotential wird bei bestehendem Einstrom durch die *delayed rectifier* Kaliumkanäle in der vierten Phase des Aktionspotentials erreicht. (Amos et al. 1996)

Da bei jedem Schritt der Erregungsweiterleitung Veränderungen auftreten können, ist die Variabilität von Herzrhythmusstörungen vielfältig. Diese Abweichungen werden im klinischen Alltag unter elektrokardiographischer Darstellung nachgewiesen und beurteilt. Hierbei wird entweder eine einmalige Aufzeichnung der Herzaktion über sechs bis zwölf Sekunden durchgeführt oder eine Langzeitaufnahme im Sinne eines Langzeitelektrokardiogramms über 24 bis 72 h erstellt. Zur Evaluation des EKGs sind Grenzwerte für die einzelnen Abschnitte der Herzaktion festgelegt. Die

Vorhofkontraktion wird durch die PQ-Strecke dargestellt und beinhaltet die P-Welle. Der sich anschließende QRS-Komplex entsteht aus der elektrischen Aktivität des Ventrikelseptums (Q) und der Ventrikelwand (R und S). Nachfolgend wird die vollständige Kontraktion des Myokards durch die ST-Strecke dargestellt. Die T-Welle wird durch eine anschließende Repolarisation der Myokardzellen verursacht.

Unter den Arrhythmien werden Reizbildungsstörungen von Reizleitungsstörungen unterschieden. Zum einen finden sich bei normotopen Reizbildungsstörungen Abweichungen der Herzfrequenz (< 60 bpm; > 100 bpm; Sinusarrhythmie) und zum anderen bei heterotopen Reizbildungsstörungen Extrasystolen, Ersatz- und Extrarhythmen. Zusätzlich sind Sonderformen, wie Sick-Sinus-Syndrom, Tachykardien und *sudden cardiac death*, jeweils einer Kategorie zuzuordnen. Zu den häufigsten hämodynamisch relevanten Herzrhythmusstörungen gehören die ventrikulären Arrhythmien. Neben ventrikulären Extrasystolen finden sich auch komplexere Veränderungen wie Bigemini, Trigemini, Salven und ventrikuläre Tachykardien. Häufig treten diese Arrhythmien postinfarziell oder während eines Herzinfarkts auf.

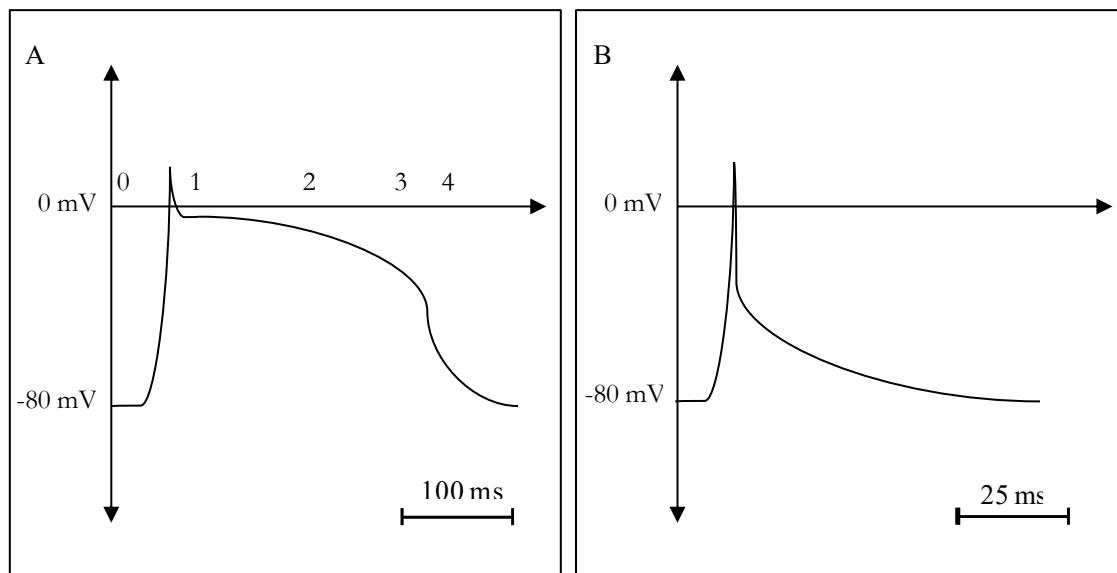


Abbildung 5: Spezies-spezifische Unterschiede des Aktionspotentials

A – Aktionspotential des Menschen mit einer Einteilung in 0 – Ruhemembranpotential 1 – Depolarisation 2 – Plateauphase 3 – Repolarisation 4 – Nachpotential/ Ruhemembranpotential. B – Aktionspotential der Maus ohne Plateauphase.

1.1.7 Die Induktion von Arrhythmien im Mausmodell

Eine der häufigsten Komplikationen in Folge eines Herzinfarkts sind Arrhythmien. (Bloch Thomsen et al. 2010) Das Vorkommen postinfarzieller Herzrhythmusstörungen ist je nach Spezies unterschiedlich. Im Falle der Maus zeigt sich eine geringe Inzidenz und verkürzte Häufigkeit von Arrhythmien nach einem Herzinfarkt. Daher existieren im Rahmen eines Mausmodels unterschiedliche Methoden zur Arrhythmogenese. Zum einen werden Erkrankungen des Herzrhythmus, wie Brugada Syndrom oder Long-QT-Syndrom, durch Veränderung bestimmter Gene verursacht. (Papadatos et al. 2002) Zum anderen können durch externe Stimulation oder durch Induktion eines Herzinfarktes Arrhythmien initiiert werden. (Clasen et al. 2018)

Zur Untersuchung von VES, BG/TG, Salven und VTs werden vornehmlich *programmed electrical stimulation* (PES) des Herzens und die Induktion eines Herzinfarkts genutzt.

Im Rahmen der PES kommen sowohl äußere als auch innere Elektroden mit Zuhilfenahme eines Katheters zur Anwendung. Die Versuchstiere werden für die Untersuchung narkotisiert und durch Impulse zur Erzeugung von Arrhythmien angeregt. Hierbei variierten die Anzahl und die Erfolgsrate dieser Reize in verschiedenen Studien. (Clasen et al. 2018) Für diese Studie war die PES durch die Notwendigkeit einer Anästhesie und eine kurze Beobachtungszeit nicht geeignet.

Zur Induktion von Herzrhythmusstörungen schien die Wahl der Ligatur mit nachfolgendem Herzinfarkt für diese Studie am besten geeignet. Neben der permanenten und temporären Ligatur der *left anterior descending* (LAD), sind ablative und metabolische Methoden vertreten. (Bell et al. 2011; Jensen et al. 1987; Michael et al. 1999; Michael et al. 1995; Nossuli et al. 2000) Wir beobachteten in unseren Experimenten nach einem Reperfusions- oder Permanentinfarkt lediglich ein Auftreten der postinfarziellen Veränderungen ein bis zwei Tage nach der Ligatur. Hierdurch war eine Untersuchung der MSC-Auswirkungen eingeschränkt möglich. Daher schien ein einmaliger Infarkt unzureichend für die Beobachtung der postinfarziellen Arrhythmien. Im Rahmen des nachfolgend verwendeten Doppelinfarktmodells wurde nach dem ersten Reperfusionsinfarkt (erster Infarkt) zusätzlich ein Permanentinfarkt (zweiter Infarkt) an der gleichen Stelle verursacht. Hierdurch traten erneut postinfarzielle Arrhythmien auf. Durch Zuhilfenahme dieser Methodik konnte die Zeitspanne, das Auftreten und die Induktion von Arrhythmien begünstigt werden. (Sadraddin et al. 2019)

1.1.8 Postinfarzielle Arrhythmien

Eine strukturelle Schädigung des Herzgewebes hat, zusätzlich zu den hämodynamischen, metabolischen und biochemischen Veränderungen, (Rahbarghazi et al. 2014; Kim et al. 2018) ebenfalls Auswirkungen auf die Elektrophysiologie des Herzens. Eine solche Schädigung tritt am häufigsten im Rahmen eines Myokardinfarktes auf. Obwohl sich das elektrophysiologische System durch den geringeren Energieverbrauch widerstandsfähiger darstellt, besteht eine postinfarziell erhöhte Arrhythmogenität des Herzens. Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass mit Zunahme der Infarktgröße die Wahrscheinlichkeit für lebensbedrohliche Herzrhythmusstörungen steigt. (van der Weg et al. 2016) Zu Beginn liegt dieser Arrhythmogenität eine erhöhte extrazelluläre Kaliumkonzentration zugrunde. Infolgedessen wird eine inhomogene Verteilung des Kaliums beobachtet, was zur Modulation der Erregbarkeit, spontaner Aktivierung durch Purkinjefasern und Entstehung von ventrikulären Tachykardien führt. (Weiss et al. 2017) Zusätzlich entsteht durch eine erhöhte Sympathikusaktivität über anaerobe Glykolyse, die Bildung freier Fettsäuren und eine erhöhte zytosolische Calciumkonzentration eine Variation der Aktionspotential- und Repolarisationslänge. Eine Begünstigung von Kammerflimmern durch freie Fettsäuren wurde ebenfalls nachgewiesen. (Oliver 2010) Weitere Veränderungen werden an den Connexonen beobachtet. Speziell wird die Kopplung der Zellen durch eine Dephosphorylierung des Connexin 43 aufgehoben und somit die physiologische Erregungsleitung der Gap-Junctions gestört. (Beardslee et al. 2000) Während sich diese Veränderung innerhalb der Narbe durch Wellenabbrüche antiarrhythmogen auswirkt, besteht an der Grenzzone zum Infarktgebiet eine proarrhythmogene Tendenz mit Stückelung der elektromagnetischen Wellen. (Ophof et al. 1993) Weiterhin ist eine Induktion der Herzrhythmusstörungen durch Koronarspasmen nach Reperfusion des geschädigten Myokards beobachtet worden. (Lang et al. 1974)

1.2 Regenerative Medizin

Die Therapie des Myokardinfarkts ist aktuell durch einen hauptsächlich symptomatischen und präventiven Charakter geprägt. Ursächliche Ansätze sind limitiert und stehen oftmals durch einen prolongierten präklinischen oder klinischen Verlauf nicht zur Verfügung. Auch im Falle einer optimalen Reperfusionstherapie ist ein *restitutio ad integrum* nicht zu erwarten. Um eine vollständige Wiederherstellung des Herzens zu ermöglichen sind neue Ansätze zur Therapie notwendig. Zu den Themen in der aktuellen Forschung gehört die Anwendung der MSCs nach einem Herzinfarkt. Sie besitzen pluripotente Eigenschaften und werden anhand von Oberflächenantigenen identifiziert. Auswirkungen auf die Herzfunktion, das Immunsystem und den Remodeling-Prozess werden mittels Injektion oder Infusion der Zellen in das Zielgewebe oder in den Blutkreislauf untersucht. Mesenchymale Stammzellen finden ihre Anwendung bereits in einigen klinischen Studien am Menschen.

1.2.1 Die Stammzell-basierte Forschung

Die am häufigsten verwendeten MSCs haben ihren Ursprung im Knochenmarksgewebe. Alter und Komorbiditäten des Spenders nehmen hierbei eine entscheidende Rolle für Qualität und Quantität dieser Zellen ein. (Fan et al. 2010) Mesenchymale Stammzellen bilden eine heterogene Gruppe aus unterschiedlichen pluripotenten Zellen. Definierend sind unter anderem eine adhärente Kultur auf Plastikoberflächen, pluripotente Eigenschaften und eine Expression von CD44, CD73, CD90, CD105 und *stem cells antigen-1* (Sca-1). (Dominici et al. 2006) Weiterhin besitzen diese Zellen keine hämatopoetischen Oberflächenmarker, wie CD45. (Dominici et al. 2006) Unterschiede zu den gewebsständigen Myofibroblasten bestehen unter anderem in ihrem Proliferations- und Differenzierungspotential. Die Wirkungen von MSCs sind vielfältig. Hieraus entwickelten sich unterschiedliche Strategien zur therapeutischen Anwendung. Zum einen können Eigenschaften der Kontraktilität oder Leitfähigkeit von Kardiomyozyten übernommen werden. (Wei et al. 2011) Zum anderen wird eine Senkung parakriner Moleküle beobachtet. Hierdurch kann das Immunsystem oder das Remodeling im Verlauf beeinflusst werden. Einige dieser Effekte sind auch bei Implantation der Zellen auf der Herzoberfläche oder bei Infusion in die Koronararterien beobachtet worden. (Tano et al. 2016)

Die Wirkungsweise der MSCs kann in drei Kategorien eingeteilt werden. Hierzu gehören regenerative Eigenschaften, parakrin vermittelte lokale Auswirkungen und die Immunmodulation.

Obwohl das Herz längere Zeit als ein nicht regeneratives Organ ohne Dynamik galt, konnte durch den Nachweis von Regenerations- und Apoptose-Herden die Regenerationsfähigkeit des Herzens nachgewiesen werden. Diese Eigenschaft wird durch sogenannte *cardiac stem cells* (CSC), die sich überwiegend in sogenannten Stammzellnischen aufhalten, ermöglicht. Ein vollständiger Ersatz des Herzgewebes durch CSC wird im Mittel nach 4,5 Jahren erreicht. (Anversa et al. 2006) Eine solche Regenerationsfähigkeit stellt sich, wenn auch nur minimal ausgeprägt, für die Herzinfarkttherapie als interessant dar. Obwohl eine postinfarzielle Regenerationsbereitschaft beobachtet werden konnte, ist im Rahmen des massiven Zelluntergangs keine effektive Regeneration möglich. Ein weiterer Grund hierfür ist eine Nekrose der CSCs im Infarktareal. Ein therapeutischer Ansatz von MSCs könnte hier Anschluss finden. (Anversa et al. 2006) Der regenerative therapeutische Ansatz von MSCs beschäftigt sich mit dem primären Ziel, die Funktion des untergegangenen Gewebes wiederherzustellen. Hauptsächlich wurde der Versuch durchgeführt, den geschädigten Herzmuskel durch funktionsfähige Kardiomyozyten zu ersetzen. Diese Ansätze fanden jedoch bislang keinen bleibenden Erfolg.

In MSC-Populationen konnten Subgruppen identifiziert werden, die unter anderem Potential zur Differenzierung in Kardiomyozyten besitzen. Charakteristisch für diese sogenannten *cardiac progenitor cells* (CPC) ist eine Expression kardial spezifischer Marker wie *cardiac troponin-t*, α -Aktin und herzmuskelspezifischen Ionenkanälen. Diese Differenzierung kann durch 5-Azacytidin oder eine Suppression von *histone deacetylase 1* (HDAC1) induziert und dadurch potenziell therapeutisch genutzt werden. (Wei et al. 2011)(Lu et al. 2014)

Die parakrine Funktion von MSCs zeigte in diversen Studien das Potential, die Herzfunktion, die Gewebsregeneration und die Revaskularisierung zu verbessern. (Rahbarghazi et al. 2014; Kim et al. 2018) Diese kardioprotektive Wirkung beinhaltet antiapoptotische, antiarrhythmische und antiinflammatorische Komponenten.

Die antiapoptotische Funktion geht mit einer überwiegenden Expression von *B-cell lymphoma 2* (Bcl2) gegenüber *Bcl-2-associated X protein* (Bax) einher. Erhöhte Expression von antiapoptotischem *baculoviral IAP repeat-containing 1b* (Birc1b) und

Bcl2 werden bei einer Stammzelltherapie ebenfalls beobachtet. (Zhong et al. 2015) Diese Freisetzung beruht auf eine Sekretion von *secreted frizzled related protein 2* (Sfrp 2). Parallel erhöht Sfrp 2 auch die Herzregeneration durch verstärktes zelluläres Katenin (Mirotsou et al. 2007)

Der Einfluss auf das Immunsystem und somit die antiinflammatorische Funktion ist ein Hauptwirkungsprinzip der MSCs. Zu Beginn konnten durch *in vitro* Experimente die antiproliferativen Effekte von MSCs auf T-Lymphozyten verdeutlicht werden. (Aggarwal und Pittenger 2005) In Folge dieser Entdeckung sind erstmalig MSCs therapeutisch verwendet worden. Zu dieser Zeit ist der Einsatz der Zellen bei *graft versus host disease* (GvHD) im Fokus gewesen. Im Verlauf nahm aufgrund überwiegend positiver Ergebnisse in der GvHD Behandlung das Interesse an MSCs für andere Gebiete zu. Darauffolgend konnten Auswirkungen auf alle Zellen des Immunsystems beschrieben werden. Zu den wichtigsten Vertretern dieser Wechselwirkungen zählen die T-Lymphozyten. In diesem Zusammenhang haben die MSCs, durch einen Stillstand des G0/G1 Zellzyklus, eine weitgehend inhibierende Wirkung auf die T-Zell-Proliferation. (Benvenuto et al. 2007) Mechanistisch wird dieser Arrest in Folge einer *idoleamine-pyrrole-2,3-dioxygenase* (IDO), einer Prostaglandin E₂ (PGE₂) Aktivität und einer daraus folgenden *kynureninacid* (KYNA) und Kynurenin Akkumulation verursacht. (Meisel et al. 2004; Benvenuto et al. 2007) Zusätzlich wird eine Expression von *programmed death-ligand-1 & 2* (PD-L1/2) auf MSCs beschrieben, welche einen inhibierenden Einfluss auf die Zytokinsekretion von T-Zellen haben und somit eine antiproliferative Funktion ausüben. (Davies et al. 2017)

Darüber hinaus zeigte sich, dass MSCs Einflüsse auf die Differenzierung der T-Zellen besitzen. Eine Suppression von T-Helferzellen 1/17 (T_{H1/17}) und eine verstärkte Bildung von T_{H2} sind zu beobachten. Dieses veränderte Gleichgewicht bedingt eine verringerte Aktivität zytotoxischer T-Zellen und B-Zellen. Regulatorische T-Zellen (T_{reg}) werden im Einfluss von IDO-Expression, PGE₂ und TGF-β1 Sekretion verstärkt gebildet. (Ghannam et al. 2010b) Effektiv entsteht durch aktive T_{reg}-Zellen eine vermehrte Toleranz gegenüber eigenen Antigenen, was ebenfalls einen antiinflammatorischen Effekt zur Folge hat.

Ein weiterer Einfluss wird an natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) beobachtet. Im Rahmen eines Herzinfarktes werden stark beanspruchte Kardiomyozyten durch NK-Zellen lysiert. Dies bedingt eine Einschränkung der Herzfunktion. Unter dem Einfluss

von MSCs wird die Proliferation dieser Zellen und somit der Untergang von Kardiomyozyten verringert. Hierzu beitragend besteht eine verringerte Aktivität von *natural killer activating receptors*, welche mit der Funktion der NK-Zellen korreliert. (Spaggiari et al. 2008) Zusätzlich konnte unter MSC Einfluss eine verringerte IL-2 und Interferon- γ (IFN- γ) Sekretion nachgewiesen werden. Diese Moleküle sind durch inflammatorische Eigenschaften gekennzeichnet und werden hauptsächlich von T-Zellen sekretiert. (Aggarwal und Pittenger 2005) Der Abfall signalisiert somit eine verringerte Inflammation.

Ein weiterer wichtiger Vertreter in der Pathologie des Herzinfarktes sind Monozyten und die aus den Monozyten entstehenden Makrophagen. Zum einen werden in der frühen Phase des Herzinfarktes M₁-Makrophagen beobachtet. Diese Zellen sind mit Zellnekrose und damit einhergehender Entzündung assoziiert. (Hart et al. 1989) Zum anderen sind mit einer Latenz mehrerer Tage M₂ Makrophagen, welche eher eine Regeneration des Herzens durch Narbenbildung und Vaskularisierung unterstützen, nachzuweisen. (Mantovani et al. 2004) MSCs besitzen die Eigenschaft, das Verhältnis von M₁ zu M₂ Makrophagen zu Gunsten der M₂ Makrophagen zu verändern. (François et al. 2012; Ben-Mordechai et al. 2013) Darüber hinaus konnte eine vermehrte Expression von CD39 und CD73 auf Makrophagen unter Stammzelltherapie beobachtet werden. Dies trägt durch den vermehrten Abbau von Entzündungstriggern (Adenosintriphosphat (ATP) zu Adenosinmonophosphat (AMP) oder Adenosin) zusätzlich zu einem antiinflammatorischen Milieu bei. (Monguió-Tortajada et al. 2017) Des Weiteren sind verringerte T-Zell Proliferation und eine verringerte Zytokinproduktion durch IL-10 beschrieben worden. (Waal Malefyt et al. 1991)

Auswirkungen auf die Elektrophysiologie der Herzaktion konnten ebenfalls beobachtet werden. Im Verlauf des Remodelings nimmt die Dichte an Connexin 43 ab und die Dichte an Connexin 45 zu. Diese Moleküle sind membranständige Poren, die zwei Zellen elektrisch und metabolisch miteinander koppeln können. Das Ungleichgewicht beeinträchtigt die physiologische Erregungsausbreitung. Unter dem Einfluss von MSCs konnte dieses Ungleichgewicht *in vitro* umgekehrt werden. (Li et al. 2018) Weiterhin beobachtet man eine Wiederherstellung der QRS-Breite, der Kaliumkanaldichte und der Calciumhomöostase der Kardiomyozyten. (Cai et al. 2014)

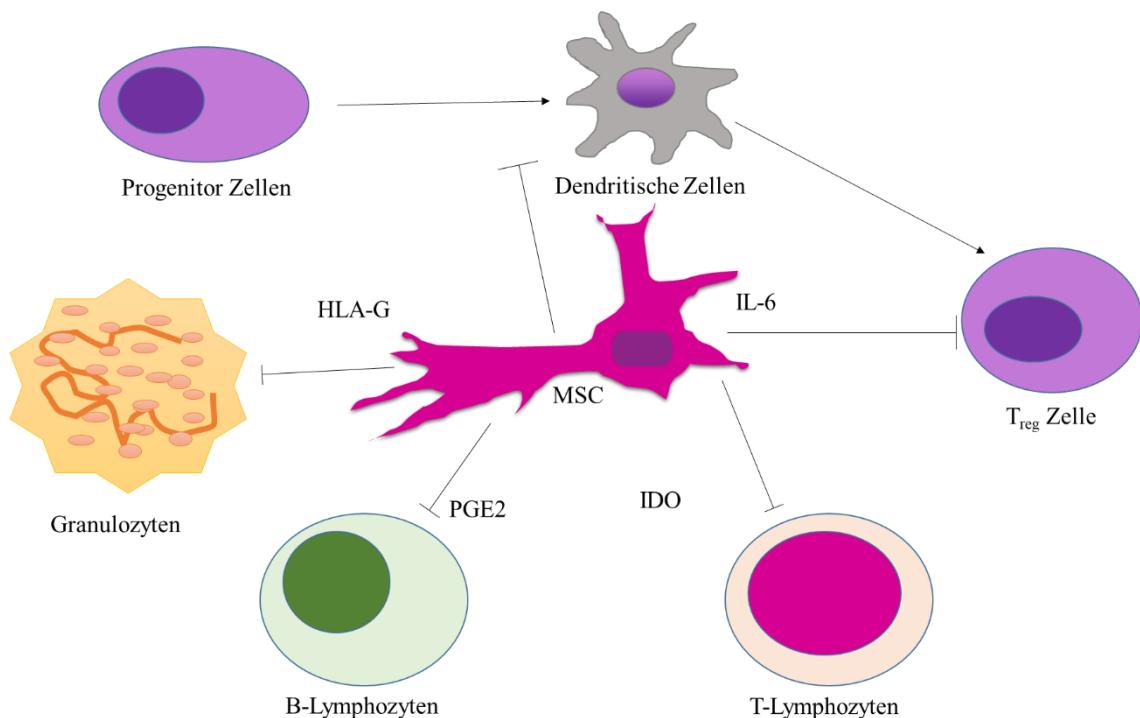


Abbildung 6: Die parakrinen Eigenschaften der MSCs

Die direkten und indirekten Einflüsse der MSCs über Mediatoren auf unterschiedliche Zellen des Immunsystems.

HLA-G - *human leukocyte-antigen-G*; IDO - *idoleamine-pyrrole-2,3-dioxygenase*; IL-6 – Interleukin-6; NO-Stickstoffmonoxid; PGE₂ – Prostaglandin-E₂; TInhibition ↑ Exzitation

1.2.2 Hypoxische Präkonditionierung

Die hypoxische Präkonditionierung bezeichnet eine Kultivierung von Zellen in einem hypoxischen Milieu. Eine verbesserte Wirkung von MSCs konnte bei Durchführung einer hypoxischen Präkonditionierung nachgewiesen werden. In einem solchen hypoxischen Milieu von 1-5 % Sauerstofflevel entsteht bei den meisten Zellgruppen eine durch Sauerstoffmangel induzierte Schädigung des Gewebes. Gegenteilig wirkt sich diese Sauerstoffkarenz bei MSCs aus. Hierbei konnte zusätzlich zu einer verringerten Apoptose, eine erhöhte Proliferations- und Migrationsrate nachgewiesen werden. (Yu et al. 2016) Diese Beobachtungen stützen sich auf eine erhöhte Expression angiogener und wachstumsfördernder Faktoren. Insbesondere *in vitro* Experimente konnten unter subletaler Hypoxie verstärkt *hypoxie-induced-factor-1α* (HIF-1 α), *fetal-liver-kinase-1* (Flk-1), Angiopoetin, Erythropoetin (EPO) und EPO Rezeptor (EPOR) nachweisen. (Hu et al. 2008) Weiterhin zeigten sich signifikant erhöhte antiapoptotische und überlebensfördernde Faktoren. Speziell fanden sich Bcl-2 und *B-cell lymphoma-extra large* (Bcl-xL) als antiapoptotische und p105, p50 und p65 als überlebensfördernde Proteine. Diese Tendenz zum Überleben der hypoxisch präkonditionierten Zellen konnte im nächsten Schritt auch *in vivo* bestätigt werden. (Hu et al. 2008) Neben den Vorteilen für Zellüberleben und Apoptoseresistenz wurden Auswirkungen auf die therapeutische Wirkung von MSCs beobachtet. Eine Infarktzentrenreduktion durch MSCs konnte bei vorheriger hypoxischer Präkonditionierung verstärkt beobachtet werden. (Hu et al. 2008) Weitere positive Auswirkungen auf die Funktionsweise der MSCs sind zu erwarten und werden in dieser Studie einen Anteil zu den Ergebnissen beitragen.

1.3 Zielsetzung

Der Einfluss von MSCs auf diverse Funktionsparameter der Herzaktion nach einem Herzinfarkt ist im Fokus der aktuellen regenerativen Medizin. Obwohl sich viele Studien zu den Einflüssen von MSCs auf die kardiale Gewebsregeneration, die Neovaskularisierung und auf die Pumpfunktion finden, sind die Untersuchungen zur Elektrophysiologie und deren Veränderungen unzureichend abgedeckt. Das Ziel dieser Arbeit soll es sein, die Auswirkungen intramyokardial injizierter MSCs auf die einfachen und komplexeren Arrhythmien nach einem Herzinfarkt zu bewerten.

2 Material und Methoden

2.1 *In vitro* Experimente

2.1.1 Hardware und Software

Tabelle 1: Hardware und Software

Materialien	Typ	Firma
Pinzette	Anatomisch gebogen	Aesculap
Petrischale	80 × 15mm	Fisher Scientific
Laminar Luftstrombank	Clean Air	Wahl
Pinzette	Chirurgisch	Aesculap
Schere	Material	Aesculap
Infektionsspritze	10 ml	B.D. Discartid II
Infektionskanüle	18 Gauge	Braun
Pipette	1 ml, 200 µl, 100µl, 10µl	Eppendorf
Filteraufsatz	70µm	EASYstrainer
Zentrifuge	Multifuge 1 SR	Heraeus
Kulturflasche	75 cm ²	Cellstar
Mikroskop	Axiocam MRM	CarlZeiss
Tube	2 ml	Eppendorf
FACS	BD LSR II	BD Bioscience
Konfokales Mikroskop	SP2 Confocal Microscope	Leica
Wasserbad	WNB 22	Memmert
Pipette	Pipetboy ac	Integra Bioscience
15 ml Tube	Cellstar Tubes	Grainer Bio-One
Inkubator	Innova CO-48	Newbrunswick Scientific
Inkubator	BD 23 UL	Binder

Tabelle 2: Lösungen

Material	Firma
<i>stem cell functional identification kit</i>	R&D Systems
<i>dual endogenous enzyme block</i>	Dako North America, Inc.
Protein Block Serumfrei	Dako North America, Inc.
DAKO antibody diluent	Dako North America, Inc.
Alexa Fluor 568	Thermo Fisher Scientific
DAPI Farbstoff	Sigma-Aldrich
Fluoroshield™ Medium	Sigma-Aldrich
Mesenpure	STEMCELL Technologies
Mesenkult	STEMCELL Technologies

2.1.2 MSC Isolierung

Nach Aufarbeitung der Zellen in verschiedenen Versuchsreihen, die bei der Etablierung der MSC-Kultur Anwendung fanden, konnte ein finales Protokoll für unsere Versuchsvorhaben gewählt werden. Hierbei wurden *green fluorescent protein* (GFP)-Mäuse verwendet. Die *B6-eGFP*-Kultur (GFP^+) inkubierte drei Wochen lang unter hypoxischen Bedingungen. Für die Implantation wurde ein 90 %-Anteil von MSCs vorausgesetzt. Alle implantierten Zellen stammten aus zwei *B6-eGFP*-Donor-Mäusen.

Zur Isolierung der MSCs wurden zwei *B6-eGFP*-Mäuse aus eigener Zucht verwendet. Das Alter der Mäuse betrug 8 bis 16 Wochen. Die Tötung der Mäuse erfolgte mittels Luxation der Halswirbelsäule. Nach gründlicher Desinfektion mit 70 % Ethanol wurde die Haut entfernt. Hierdurch konnte die vom Fell ausgehende Kontaminationsgefahr minimiert werden. Die *tibiae* und *femora* wurden heraus präpariert und weitgehend von Muskeln und Sehnen befreit. Nach gründlicher Präparation konnten die Knochen aus der Gelenkpfanne luxiert, die Bänder durchtrennt und die nun isolierten *tibiae* und *femora* in eine Petrischale mit 5ml komplettem Medium (Mesencult plus Mesenpure, 1:1000) überführt werden. Unter einer Sicherheitswerkbank wurde eine zweite leere Petrischale bereitgestellt. Anschließend konnten mittels großer chirurgischer Pinzette die Knochenstücke fixiert und durch Zuhilfenahme einer Materialschere die Epiphysen entfernt werden. Unter Verwendung einer 18 Gauge Injektionsspritze wurden jeweils 2,5 ml Mesencult Medium in den offenen Markraum injiziert und in der Petrischale aufgefangen. Eine Suspension der Knochenmarkszellen konnte durch mehrmaliges Pipettieren hergestellt werden. Darauffolgend wurden verbleibende Knochenstücke durch einen 70 μm Filter entfernt. Mittels einer Zentrifuge konnte die Suspension bei 300 $\times g$ und Raumtemperatur (RT) innerhalb von 10 min sedimentiert werden. Der Überstand wurde entfernt, mit 12 ml komplettem Medium ersetzt und anschließend in eine 75 cm^2 Kulturflasche überführt.

2.1.3 MSC-Kultivierung

Zur Kultivierung wurden die folgenden drei Protokolle herangezogen.

Zunächst wurde, wie in Tabelle 3 dargestellt, ein hMSC-Protokoll verwendet. Im ersten Schritt der mMSC-Kultivierung konnten die mononukleären Zellen aus dem Knochenmark in eine Zellkulturflasche überführt und bei 37°C, 5 % CO₂ inkubiert werden. Nach einer Inkubation von 3 h erfolgte eine Erneuerung des Mediums zur Selektion zwischen adhärenten und suspendierten Zellen. Nach einer weiteren dreitägigen Inkubation wurde das Ergebnis lichtmikroskopisch beurteilt. In einer darauffolgenden Versuchsreihe wurde auf die Selektion der Zellen nach 3 h verzichtet. Hierbei konnte keine ausreichende Anzahl oder Reinheit erzielt werden.

In Anlehnung an das Protokoll von Masoud Soleimani und Samad Nadri (Soleimani und Nadri 2009) konnten nach einer Woche die ersten spindelförmigen adhärenten Zellen in kleinen Gruppen nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurden weitere Kulturen inkubiert, jedoch musste in Anbetracht der Anzahl von Fibroblast-like Zellen und des Aufwandes des Protokollvorhabens diese Durchführung ebenfalls verlassen werden.

Eine Modifizierung (Tabelle 3) des Protokolls der Firma StemCell wurde als finale Option verwendet (siehe Appendix). Nach Gewinnung des Knochenmarkes aus *B6-eGFP*-Mäusen wurden die mononukleären Zellen in einer 75 cm² Kulturflasche mit einer Dichte von $4,67 \times 10^5$ pro cm² bei 37°C, 5 % CO₂ und 1 % O₂ fünf Tage im Brutschrank inkubiert. Sobald eine Konfluenz der Zellen von ca. 90 % vorlag, konnte mit 5 ml PBS und 1 % Trypsinanteil für 2 min bei 37°C und 5 % CO₂ die Adhärenz aufgelöst werden. Andernfalls musste das Medium gewechselt und die Konfluenz nach 3 Tagen Latenz reevaluiert werden. Das Trypsin wurde durch Zugabe von 5 ml Mesencult inaktiviert. Nachfolgend konnte durch Zentrifugation für 10 min bei $300 \times g$ und RT ein Zellpellet hergestellt werden. Der Überstand wurde verworfen. Nach Resuspension in 1 ml Mesencult Medium konnte die Zahl der Zellen pro 1 ml mittels einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt und anschließend berechnet werden. Die Zellen wurden mit einer Dichte von 3×10^5 Zellen pro cm² in 75 cm² Kulturflaschen aufgeteilt. Nach weiterer Inkubation von einer Woche musste eine weitere Passage bei ca. 90 % Konfluenz durchgeführt werden. Sowohl aus den frisch isolierten als auch aus den passagierten Zellsuspensionen wurden Proben für die durchflusszytometrische Analyse entnommen. Die Probenentnahmen dienten, anhand der phänotypischen Ausprägung der Zellen, zur Bestimmung der mesenchymalen Merkmale. Des Weiteren wurden mit dem gleichen

Verfahren mononukleäre Zellen aus dem Knochenmark der non-GFP Mäuse isoliert. Diese Zellen fanden Anwendung für die Einstellung des mehrfarbigen MSC-Panels bei der Durchflusszytometrie.

Tabelle 3: Unterschiede der verwendeten Protokolle

	hMSC-Protokoll	Soleimani & Nadri	STEMCELL Technologies	Modifiziertes Protokoll
Medium	DMEM	DMEM	Mesenkult + Mesenpure	Mesenkult + Mesenpure
Passage	-	Nach 7 Tagen	Nach 5-9 Tagen	Nach 5-9 Tagen
Inkubationsbedingungen	37°C, 5 % CO ₂ , 20 % O₂	37°C, 5 % CO ₂ , 20 % O₂	37°C, 5 % CO ₂ , 5 % O₂	37°C, 5 % CO ₂ , 1 % O₂
Inkubationsdauer	14 Tage	14 Tage	15-29 Tage	15-29 Tage
Mediumwechsel	2 Tage Alle 8 h (0-72 h) 2 Tage (> 72 h)	5 Tage (0-5 Tage) 2 Tage (> 5 Tage)	5 Tage (0-5 Tage) 2 Tage (> 5 Tage)	
Mausstamm	<i>C57BL/6</i>	<i>C57BL/6</i>	<i>C57BL/6</i>	<i>B6-eGFP</i>

2.1.4 Identifizierung des mesenchymalen Phänotyps

Zur Identifizierung der MSCs wurden nachfolgende Kriterien der Arbeit von Dominici et al. 2006 angewendet.

Die Zellen haben die Fähigkeit auf der Plastikoberfläche der Zellkulturflaschen zu adhärieren und besitzen eine fibroblastische Morphologie.

Eine Expression der Spezies-spezifischen Antigene liegt vor. In diesem Vorhaben wurden die Oberflächenmarker Sca-1, CD29 und CD44 gewählt. Weiterhin wurde das Fehlen hämatopoetischer Oberflächenmarker, insbesondere anhand des Antigens CD45, getestet.

Die Zellen weisen ein Potential zur adipozytären, osteoblastären und chondrogenen Differenzierung auf.

2.1.4.1 Differenzierungspotential

Zum Nachweis der pluripotenten Eigenschaften der Zellen musste eine Inkubation mit drei unterschiedlichen Differenzierungsmedien erfolgen. Das Verfahren wurde anhand des beiliegenden Protokolls durchgeführt und ist im Appendix detailliert beschrieben. Die Zellen mussten, wie in Tabelle 4 dargestellt, innerhalb von 10-21 Tagen fixiert und auf die Expression spezifischer Antigene mittels Immunfärbung untersucht werden. Hierauf folgten qualitative mikroskopische Aufnahmen zur Darstellung der Differenzierung und somit als Nachweis der pluripotenten Funktion der Zellen.

Tabelle 4: Differenzierung der mMSCs

	Adipozyten	Osteozyten	Chondrozyten
Zelldichte	2.1×10^4 MSCs/cm ²	4.2×10^3 MSCs/cm ²	2.5×10^5 MSCs
Mediumwechsel	Alle 3-4 Tage	Alle 3-4 Tage	Alle 2-3 Tage
Inkubationszeit	10-14 Tage	14-21 Tage	17-21 Tage
Nachweis	<i>goat anti mouse</i> FABP4	<i>goat anti mouse</i> Osteopontin-Färbung	<i>sheep anti mouse</i> Collagen-II-Färbung
Sekundärer AK	568 <i>donkey anti goat</i>	568 <i>donkey anti goat</i>	633 <i>donkey anti sheep</i>

2.1.4.2 Durchflusszytometrie und Phänotypisierung der Zellen

Die Zellkultur wurde zur Phänotypisierung einer lichtmikroskopischen und durchflusszytometrischen Charakterisierung unterzogen und zuletzt mittels Mouse Mesenchymal Stem Cell Functional Identification Kit auf pluripotente Eigenschaften überprüft. Weiterhin erfolgte anhand der Expression der oben genannten Oberflächenmarker eine Analyse der Reinheit der gewonnenen Zellen. Um Fehlerquellen gezielter zu identifizieren und zu minimieren, ist zunächst die *single staining*-Methode zur Anwendung gekommen. Aufgrund sauberer Ergebnisse konnte im Verlauf auf die *multi staining*-Methode gewechselt werden.

Die Zellen der verschiedenen Passagen wurden jeweils auf die Expression von Oberflächenmarkern CD29, CD44, Sca-1 und CD45 untersucht. Die Expression von CD29, CD44 und Sca-1 weist auf den mesenchymalen Phänotyp hin, wohingegen ein Nachweis von CD45 durch hämatopoetische Zellen gekennzeichnet ist. (Dominici et al. 2006) Zur durchflusszytometrischen Analyse konnten jeweils aus Passage 0 (P_0 , frisch isolierte Zellen), Passage 1 (P_1) und Passage 2 (P_2) 1×10^6 Zellen entnommen werden. Zu Beginn dienten non-GFP Zellen, die mit dem gleichen Verfahren wie die zu untersuchenden Zellen isoliert und kultiviert wurden, zur Einstellung des polychromen MSC-Panels. Hierzu mussten die Proben mit der Zugabe einzelner Antikörper vorbereitet werden. Die Menge an Antikörper, Reagenz, Zellen und Pufferlösung für die jeweiligen Proben der C57BL/6-(GFP)-MSCs sind in Tabelle 5 dargestellt.

Im ersten Schritt erfolgte die Zugabe von Zombie Aqua. In der *single staining*-Methode wurde dies ausschließlich bei der Zombie-Probe durchgeführt. Im Rahmen der *multi staining*-Methode erfolgte bei allen Proben zu Beginn eine Zombiefärbung. Zu diesem Zweck wurden die Zellen in $100 \mu\text{l}$ PBS Puffer resuspendiert und mit $1 \mu\text{l}$ Zombie Aqua Reagenz versetzt. Nach 15-minütiger Inkubation bei RT unter Vermeidung von Lichtexposition, konnten die Zellen gewaschen (Waschschrift: $300 \times \text{g}$, 10 min, 4°C) und nach der Abnahme des Überstandes als Zellpellet in MACS Puffer resuspendiert werden.

Die als “ungefärbt“ beschriftete Probe beinhaltete 1×10^5 MSCs in $90 \mu\text{l}$ MACS-Puffer und $10 \mu\text{l}$ FcR Blocking Reagenz. Dieses Verhältnis wurde sowohl bei den GFP^+ als auch für die GFP^- Zellen verwendet. Die Proben dienten als Kontrolle der unspezifischen Bindung der Antikörper für die jeweiligen zu untersuchenden Kulturen.

Die übrigen Proben zur Färbung von CD29, CD44, CD45 und Sca-1 wurden, wie in Tabelle 5 dargestellt, in MACS-Puffer resuspendiert und daraufhin mit dem jeweiligen Fluorochrom-konjugierten Antikörper und FcR Blocking Reagenz vermischt. Im nächsten Schritt mussten die Zellen für 30 min bei 4°C unter Vermeidung von Lichtexposition inkubiert werden. Anschließend wurden die ungebundenen Antikörper mit einem Waschschritt durch 1 ml PBS, 10 min bei $300 \times g$ und 4°C, entfernt. Zum Schluss konnte der Überstand abgenommen und das Zellpellet mit PBS-Puffer resuspendiert und in ein 5 ml *fluorescence activated cell sorting* (FACS)-Röhrchen überführt werden. Es wurden in der *single staining*-Methode 1×10^4 und in der *multi staining*-Methode 1×10^5 Ereignisse akquiriert. Die Analyse erfolgte mithilfe von BD FACS Diva Software (Version 6.1.2, BD). Die Einstellung der Gates und somit die Analyse der Proben wurde anhand der Parameter aus den „single“ und „ungefärbt“ Proben vorgenommen.

Mit dieser Prozedur wurde der Anteil an vitalen Zellen, die GFP Expression, und die Ausprägung von CD29, 45, 44 und Sca-1 ermittelt. Hierbei musste in der GFP-Kultur aufgrund des identischen Fluoreszenzspektrums von FITC und GFP auf die Bestimmung von CD29 verzichtet werden.

Tabelle 5: Reagenzien zur durchflusszytometrischen Untersuchung

Name	V_{FcR}	$V_{Antikörper/Reagenz [\mu l]}$					MSCs	V_{Total}	V_{MACS}
	FcR Block	FITC	Pacific Blue	PerCP	Sca-1	Zombie			
Neg.	10 µl						1×10^5	100 µl	90 µl
CD29	10 µl	5 µl					1×10^5	100 µl	85 µl
CD44	10 µl		1,25 µl				1×10^5	100 µl	88,75 µl
CD45	10 µl			2 µl			1×10^5	100 µl	88 µl
Sca-1	10 µl				5 µl		1×10^5	100 µl	85 µl
Zombie	10 µl					1 µl	1×10^5	100 µl	89 µl
Multi	10 µl	5 µl	1,25 µl	2 µl	5 µl	1 µl	$0,5 \times 10^6$	100 µl	75,75 µl

2.1.5 MSC Injektion

Bei ausreichender Anzahl der kultivierten MSCs erfolgte mittels einer Trypsinlösung (1 %) die Suspension der Zellen. Daraufhin wurde die Gesamtzellzahl der Zellkultur bestimmt. Durch Zentrifugation der Zellen bei RT, $300 \times g$ für 10 min formte sich ein Zellpellet, welches nach dem Entfernen des Überstandes mit einem Volumen von 2 ml Mesencult resuspendiert wurde. Weiterhin erfolgte eine Zentrifugation in einem 2 ml Eppendorf-Tube unter gleichen Bedingungen. Der Überstand wurde bis auf ein Restvolumen von 10 µl vorsichtig entfernt. Für die Injektion musste eine Mischung aus verbleibendem Mesencult (10 µl) und Matrigel (10µl) hergestellt werden.

Intraoperativ wurde nach 5 min Ligatur das Matrigel auf vier verschiedene Punktionsstellen aufgeteilt und injiziert. Hierbei konnte eine Infiltration des Matrigels anhand der Abblässung und Schwellung des Gewebes beobachtet werden.

2.2 *In vivo* Experimente

2.2.1 Hardware und Software

Tabelle 6: Materialien

Geräte und Materialien	Typ	Firma
Kleintierbeatmungsgerät	SAR-830P	IITC-Life Science
Operationstisch	HI 1220	Leica
Operationsmikroskop	OPM 241 F	Carl Zeiss
Mikroskop	Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss
Mikroskop-Kamera	Axiocam MRm	Carl Zeiss
Confocal Mikroskop	SP2 Confocal Microscope	Leica
Kryo-Mikrotom	CM 1900	Leica
Laminar Luftstrombank	Clean Air	Wahl
Schüttler	Vortex Genie 2	Scientific Industries
Mini-Zentrifuge	Galaxy mini	VWR
Zentrifuge	5417R Centrifuge	Eppendorf
FACS	BD LSR II	BD Bioscience
Pipetten	10,50,100,200,1000 µl	Eppendorf
Verweilkanüle	22; 33 Gauge	Braun
Leukosilk	5 m × 1,25 cm	BSN Medical
Telemeter	TA11ETA-F10 Implant	Data Sciences International
Pinzette	Gebogen	Aesculap
PDS 2-0	Resorbierbar	Ethicon
Minischere	Standard Modell	Aesculap
Wundspreizer	Modell Logan	Aesculap
Mikroknüpfpinzette	Gebogen	Aesculap
Prolene Faden	6-0	Ethicon
Eppendorf-Tube	15 ml	Cellstar
Kryostat	CM 1900	Leica

Objektträger	Geschnitten	Menzel-Gläser
Deckglas	10 mm	Menzel-Gläser

Tabelle 7: Lösungen

Lösungen und Arzneimittel	Firma
Matrikel	BD Biosciences
Pentobarbital	Maria1GmbH
Fentanyl	Jannsen Crag
Metamizol	Ratiopharm
Bepanthen Augen Nasensalbe	Bayer Vital GmbH
Tissue-Tek	Sakura Europe

2.2.2 Gattung und Haltung der Tiere

Für die Durchführung der Versuche wurden 22 *C57BL/6*-Mäuse und 2 *B6-eGFP* Mäuse aus eigener Haltung verwendet. Die Tiere hatten ein Gewicht von 16 bis 26 g bei einer Altersspanne von 8 bis 16 Wochen. Sie wurden unter konstanten Temperatur-, Luftfeuchtigkeits- und Luftdruckverhältnissen bis zur Operation unter Gabe von Maustrockenfutter und frischem Wasser gehalten. Die Haltung wurde nach der Erstoperation und der Zweitoperation zu den gleichen Verhältnissen weitergeführt.

Dieses Projekt wurde am 29. Juni 2016 beim Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern eingereicht und am 15. September 2016 von der Tierschutzkommission genehmigt.

2.2.3 Aufzeichnung der Herzaktion

Zur Aufnahme der Herzaktion wurde ein Telemetersystem verwendet. Ein Telemeter bezeichnet einen kleinen Sender, der die Information über das aufgenommene EKG der Maus auf eine Empfängerplatte übermittelt. Im Rahmen der Erstoperation wurde zur Überwachung der Herzaktion ein Telemeter implantiert, wobei die Ableitung nach Einthoven II verwendet wurde. Die Aufzeichnung erfolgte dabei von der ersten signifikanten ST-Streckenhebung bis 24 h nach dem Infarkt. Um dies zu ermöglichen, mussten die Versuchstiere in einzelnen Käfigen gehalten und diese dann auf die Empfängerplatten platziert werden. In der gesamten Zeit der Aufzeichnung wurden lediglich die Medikamente zur Operation und Metamizol als Analgetikum verabreicht.

2.2.4 Vorbereitung und Durchführung der Erstoperation

Die Mäuse (n=21) konnten in drei Gruppen unterteilt werden. Während der ersten Operation wurde bei allen Mäusen ein Reperfusionsinfarkt induziert. Weiterhin erfolgte eine Injektion des Matrikels ohne MSCs bei der *untreated reinfarction*- (URI; n=7) und der *myocardial infarction control*-Gruppe (MIC; n=7) und Matrikel mit MSCs bei einer *treated reinfarction* Gruppe (TRI; n=7). Hierzu erfolgte eine gewichtsadaptierte Narkose (50 mg/kg, intraperitoneal) mit Pentobarbital, wobei die Narkosetiefe durch äußere taktile Reize wie Zwischenzehenreflex, Schwanzreflex und Umdrehreflex überprüft wurde. Bei ausreichender Narkosetiefe wurde die Maus in Rückenlage an Armen und Beinen fixiert.

Die Augen mussten durch Bepanthen Augen und Nasensalbe gegen Austrocknung und Verletzung geschützt werden. Eine adäquate Analgesie wurde durch eine Fentanylgabe herbeigeführt. Um eine Beatmung sicherzustellen, mussten die oberen Schneidezähne mit einer Schlinge an den Operationstisch fixiert werden. Unter Durchleuchtung der ventralen Halspartie mittels Mikroskops wurde durch Zuhilfenahme einer gebogenen Pinzette die Zunge vorsichtig gefasst und mit einem Spatel eine direkte Sicht auf die Trachea hergestellt. Unter Verwendung einer 22 Gauge Verweilkanüle konnte der Atemweg intubiert und die Kanüle durch Nahtfäden am Untergrund befestigt werden. Die erfolgreiche Intubation wurde angenommen, wenn durch direkte Sicht eine sichere Intubation gelungen war, eine suffiziente Atemexkursion beobachtet werden konnte und die klinische Situation der Maus sich adäquat darstellte. Eine Atemfrequenz von max. 125/min und ein Hubvolumen von max. 225 µl konnte je nach Bedarf eingestellt werden.

Zur Überwachung und Auswertung der Herzaktion bis zu 48 h nach dem Infarkt wurde ein Telemeter implantiert. Zur Verwirklichung der Implantation musste eine mediale Längsinzision bei rasiertem und desinfizierter Haut am Rücken der Maus durchgeführt werden. Nach Präparation einer subkutanen Tasche auf Höhe des unteren Rückenanteils konnte der Telemeter durch eine gebogene Pinzette platziert werden. Mittels Lösen der Haut zur rechten oberen Schulter und zum linken seitlichen Unterbauch wurde die korrekte Lage der zwei Elektroden ermöglicht. Die einzelnen Elektroden konnten im Muskelgewebe auf Höhe einer Isolierungslücke des Drahtes verankert werden. Zur weiteren Befestigung wurden vor und nach dem Eindringen in das Gewebe jeweils zwei Nähte am Draht befestigt. Zum Abschluss konnte durch eine 2-0-PDS-Naht die Wunde verschlossen werden. Die Herzaktion wurde über Ponemah Software aufgezeichnet und über ecgAUTO 3.3.0 (EMKA Technologies) Software analysiert.

Die Thorakotomie begann mit einer Inspektion der Haut nach pathologischen Veränderungen. Bei unauffälligem Hautbild wurde eine Desinfektion der Haut an der linken Thoraxhälfte durchgeführt. Der Zugang erfolgte über eine linksanteriore Thorakotomie. Hierzu wurden mit einer Schere die Kutis und Subkutis eröffnet. Im nächsten Schritt musste der Anschluss der Beatmungsmaschine erfolgen. Während des ganzen Operationsvorhabens wurde die Wunde mit physiologischer Kochsalzlösung feucht gehalten. Interkostal konnte ein Schnitt durch die Muskulatur unterhalb der dritten Rippe durchgeführt werden. Ein Rippenspreizer ermöglichte die Einsicht in die Thoraxhöhle. Daraufhin wurde durch eine Mikro-Knüpfpinzette die Muskulatur unter

Sicht der Lunge bis zu einer ausreichenden Länge eingeschnitten. Durch die Abnahme der Spannung des Gewebes musste der Rippenspreizer angepasst werden. Im nächsten Schritt erfolgte mit einem 8-0-Prolene-Faden die Ligatur der LAD, wie in Abbildung 7 dargestellt, in Form eines reversiblen Knotens. Zur Kontrolle des Myokardinfarkts dienten typische Veränderungen im EKG und die Abblässung des Gewebes im abhängigen Stromgebiet der LAD. Es erfolgte in den letzten fünf Minuten der Ligatur die intramyokardiale Injektion mittels 33 Gauge Kanüle. Hierbei verhinderte ein epikardialer Stopper die Perforation der Herzwand und ermöglichte einen sicheren Halt während der Injektion. Im Verlauf wurden die Qualitätszeichen für einen sicheren Infarkt beobachtet und auf Konstanz geprüft. Mit der vollendeten 45. Minute musste der Knoten eröffnet und der Ligaturfaden *in situ* belassen werden. Die Belüftung der Atelektasen und Entlüftung der Pleurahöhle wurde durch eine kurzzeitige Druckerhöhung an der Beatmungsmaschine verwirklicht. Der Verschluss der Haut erfolgt durch eine Naht mit 2-0 PDS Fäden. Nach Abschluss der Operation konnten die Mäuse vom Beatmungsgerät entwöhnt werden. Zur Beurteilung der Narkosetiefe wurden Schwanz-, Zwischenzehen- und Umdrehreflex getestet. Bei ausreichender Bewusstseinslage und Minimierung des Risikos einer Unterkühlung konnten die Mäuse in entsprechenden Käfigen für 7 Tage in Einzelhaltung beobachtet werden. Als analgetische Behandlung wurde Metamizol dem Trinkwasser hinzugegeben.

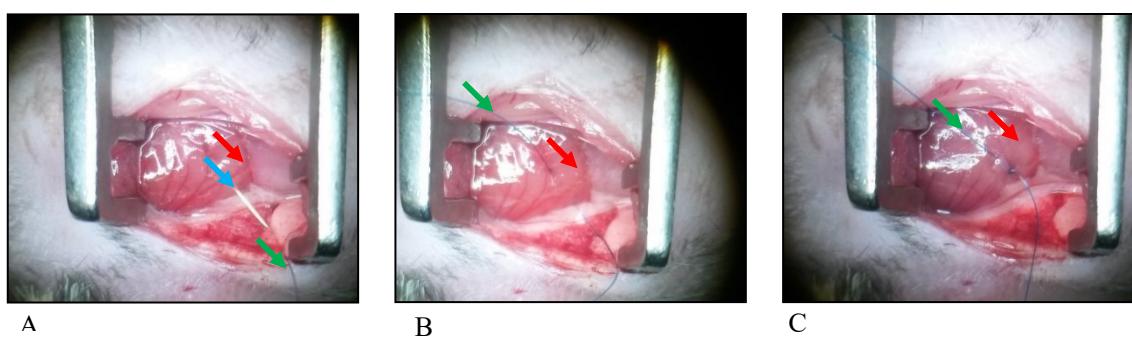


Abbildung 7: Darstellung des Operationssitus durch das Auflichtmikroskop.

Nach der Thorakotomie und Eröffnung der Pleura, erfolgt das Aufsuchen des Herzens mit Darstellung der LAD. A Einstich des Fadenmaterials. B Fadenführung. C Ligatur der LAD mit einem chirurgischen Knoten. Pfeile: rot – Gefäße(C Verlust der Gefäßzeichnung); blau – Nadel; grün - Faden

2.2.5 Vorbereitung und Durchführung der Zweitoperation

Am siebten postoperativen Tag erfolgte eine weitere gewichtsadaptierte Narkose mit einer intraperitonealen Injektion von Pentobarbital. Unter den gleichen Bedingungen wie zur Erstoperation wurde die Lagerung und Intubation durchgeführt. Darauffolgend musste der Zugangsweg der Erstoperation inspiziert und auf Auffälligkeiten wie Infektionszeichen, Wundheilungsstörung oder Sekretion untersucht werden. Bei reizlosen Wundverhältnissen wurde die Fläche um die Narbe rasiert und desinfiziert. Im nächsten Schritt konnte mittels Präparation durch das Narbenareal ein Zugang zum Herzen hergestellt werden. Im Zuge des ersten Infarkts war ein 8-0 Prolene Faden an der Ligaturstelle *in situ* belassen worden. Durch einen vierfachen Knoten wurde ein permanenter Infarkt verursacht. Unter den Gesichtspunkten einer Abblassung des Gewebes im LAD Versorgungsgebiet und einer ST-Strecken Erhöhung im EKG konnte ein Infarkt definiert werden. Darauffolgend wurde eine Belüftung der atelektatischen Lungenabschnitte durch eine kurzzeitige Druckerhöhung am Beatmungsgerät bewirkt. Nach Kürzung des Fadens erfolgte mittels 2-0 PDS Naht zuerst der Thoraxverschluss und anschließend, unter der Voraussetzung einer suffizienten Atmung, die Hautnaht. Unter Beobachtung, EKG Kontrollen und auf einem 37°C beheizten Operationstisch wurde die Maus an das Atemgerät entwöhnt. Mit zunehmender Bewusstseinslage konnte die Extubation erfolgen. Danach wurden die Mäuse für 48 h unter den gleichen Umständen wie zur ersten Operation beobachtet.

2.2.6 Herzentnahme

Die Herzentnahme erfolgte 48 h nach dem Permanentinfarkt. Hierzu wurde mit einem Zugang durch die Thorakotomienarbe der Rippenbogen *post mortem* dargestellt. Mittels einer groben Schere konnte der Rippenbogen linksseitig bis zum Apex des Brustkorbs eröffnet werden. Das Herz wurde mit einer gebogenen Pinzette an der Basis gegriffen und durch eine feine Schere unterhalb der Pinzette abgetrennt. Das Organ musste in isotonischer Natriumchloridlösung von Blut gereinigt und mit Tissue-Tek auf einem Gewebeblock aufgebracht werden. Darauffolgend konnte das Herz in einem 50 ml Eppendorf-Tube im Gefrierschrank bei -20°C aufbewahrt werden. Spätestens nach einer Woche fand eine Überführung aus dem -20°C in einen -80°C Gefrierschrank statt.

2.2.7 Gewebeschnitte der Mausherzen

Zur Anfertigung der Gewebeschnitte wurden die Stempel vorerst, bei einer Temperatur von -20°C, im Kryostaten platziert. Bei stabilen Verhältnissen konnte der Stempel in die Halterung des Kryostaten eingespannt werden. Das Herz wurde nach dem Schema aus Tabelle 8 und Abbildung 8 geschnitten. Hierbei diente der Apex des Herzens als Ausgangspunkt für die grobe Sektion A. In diesen Sektionen konnten jeweils zehn Gewebeschnitte hergestellt werden. Die mit Slide A-D bezeichneten Regionen wurden mit einer Schichtdicke von 5 µm geschnitten. Diese Tissue-Tek-Schnitte konnten mittels eines Pinsels in die richtige Form gestrichen und auf die Oberfläche eines Objektträgers übertragen werden. Dieses Vorgehen erfolgte bei allen zu untersuchenden Herzen. Alle groben Sektionen wurden bei -80°C für spätere Untersuchungen aufbewahrt.

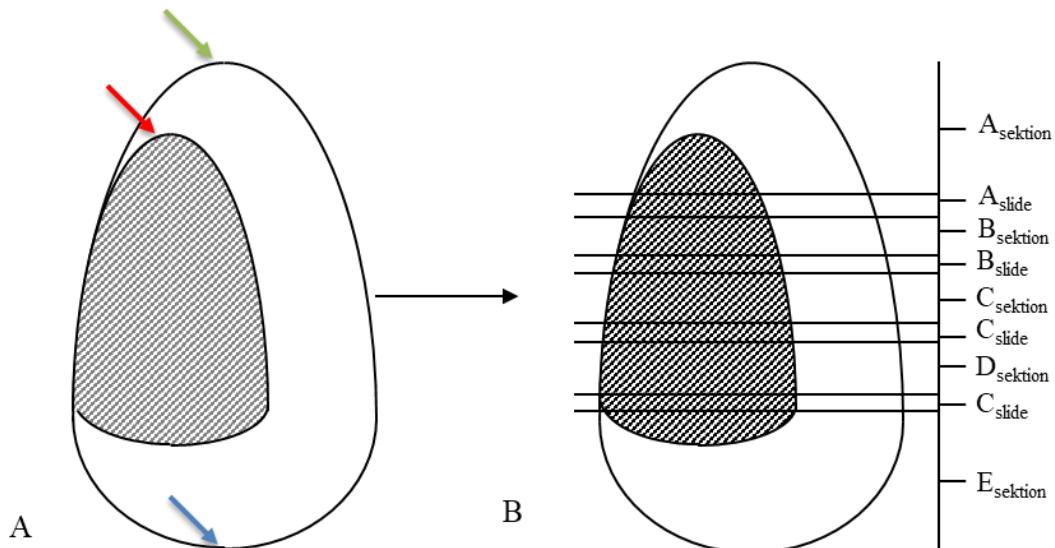


Abbildung 8 Schematische Darstellung des Infarktareals und der Schnittebenen

A – Darstellung des Herzens mit Infarktareal, B – verwendete Schnittebenen

Blauer Pfeil – Basis; Roter Pfeil – Infarktrandzone; Grüner Pfeil – Apex; Schraffierte Fläche – Infarktareal

Tabelle 8: Gewebeschnitte

Sektionsname	Dicke	Slideanzahl
Sektion A-E grob	60 µm	10
Slide A	5 µm	5
Slide B	5 µm	8
Slide C	5 µm	8
Slide D	5 µm	4

2.2.8 MSC-Nachweis *in vivo*

Die Gewebeschnitte wurden im ersten Schritt mit 2 % Paraformaldehyd für 10 min bei RT fixiert. Darauffolgend schloss sich die dreimalige Reinigung mit PBS für 5 min bei RT an. Um die Entfernung der ungebundenen Antikörper zu optimieren, wurde die Färbekammer auf einem Magnetrührer platziert. Nach Trocknung der Gewebeschnitte konnte mittels *dako-cytomation-pen* die zu färbende Region eingekreist werden. Im nächsten Schritt wurde *dual endogenous enzyme block* (DAKO) aufgetragen und nach einer Inkubation von 10 min unter RT durch dreimalige Reinigung mit PBS wieder entfernt. Dieser Vorgang musste mit Protein Block DAKO wiederholt und die verbleibende Flüssigkeit anschließend entfernt werden. Daraufhin konnte eine Inkubation in 50 µl Arbeitslösung mit *rabbit anti GFP*-Antikörper über Nacht bei 4°C erfolgen. Hierbei wurde jeweils eine Negativkontrolle mit 50 µl *DAKO antibody diluent* hergestellt. Darauffolgend konnte die Antikörper-Arbeitslösung mit PBS und einem Magnetschwimmer innerhalb von 30 min gereinigt werden. Ab diesem Schritt wurde auf die Vermeidung von Lichtexposition geachtet. Um eine Visualisierung der GFP-Expression zu gewährleisten, konnte im letzten Färbeschritt die Arbeitslösung, bestehend aus Alexa Fluor 568 *anti rabbit* sekundärem Antikörper im PBS Puffer, für zwei Stunden bei 37°C auf die Gewebeschnitte aufgetragen und nach der Inkubation, wie oben beschrieben, gereinigt werden. Zuletzt wurden die gefärbten Gewebeschnitte mit Fluoroshield™ Medium und DAPI Farbstoff (SIGMA) eingedeckt und mit einem Objektträger fixiert.

2.2.9 Infarktgößenfärbung

Zur Auswertung der Infarktgröße wurden Slides aus den Gewebeschnitten mit unterschiedlichen Färbungen, zur Differenzierung zwischen erstem und zweitem Infarkt, behandelt. Die Färbung mit *fast green* und *sirius red* ermöglichte die Differenzierung zwischen Narbengewebe, welches nach dem ersten Infarkt entstanden ist, und dem gesunden Myokard. Durch die Färbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE) konnte die akute Infiltration des Gewebes mit Leukozyten als Hinweis auf den zweiten Infarkt verwendet werden.

2.2.9.1 Hämatoxylin-Eosin

Zur Darstellung des ersten Infarkts wurde eine HE-Färbung durchgeführt. Die nachfolgenden Schritte erfolgten bei RT. Hierzu wurde eine Inkubation in 10 % Formalin für 10 min durchgeführt. Es erfolgten hiernach zwei Waschschritte in destilliertem Wasser für 5 min. Eine Einbettung der Slides in Mayer-Hämatoxylin für 8 min schloss sich an. Es erfolgte ein weiterer Waschschritt mit Leitungswasser und nachfolgend mit destilliertem Wasser. Im nächsten Schritt wurden die Slides in 80 % Ethanol zehn Mal eingetaucht. Das 0,25 % *eosin y working solution* wurde für 30 s aufgetragen. Weiterhin erfolgte eine Inkubation in 95 % Ethanol für 5 min und zwei Inkubationen für 5 min in 96 % Ethanol. Zweimalige Inkubation in Xylol für jeweils 5 min schlossen sich an. Schlussendlich wurden die Slides mit 10 µl Pertex und einem Coverslip bedeckt. Nachfolgend wurden die Präparate bis zur Auswertung in einem histologischen Kasten aufbewahrt.

2.2.9.2 *Fast green & sirius red*

Zur Darstellung des zweiten Infarkts wurde eine *fast green*- und *sirius red*-Färbung durchgeführt. Zu Beginn wurde eine 10 % Formalinlösung hergestellt. Hierzu mussten 135 ml destilliertes Wasser zu 50 ml 37 % Formalin gegeben werden. Nachfolgend wurden die Gewebeschnitte für 10 min in der hergestellten Lösung bei RT inkubiert. Die Slides mussten zweimal mit destilliertem Wasser für 5 min gewaschen werden. Eine Immersion in 0,1 % *sirius red working solution* für 3 min bei RT und ein Waschschritt mit Eintauchen des Slides in destilliertem Wasser folgten. Im nächsten Schritt wurde der Prozess mit 0,1 % *fast green working solution* für 10 Minuten wiederholt. Es schloss sich eine Behandlung in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit 70 % und 80 % für jeweils 1 min, 90 % für 2 min und 6 min in purem Ethanol an. Die Slides wurden dann zweimal

für 5 min in Xylol bei RT inkubiert und anschließend mit 10 µl Pertex und einem Coverslip verdeckt.

2.3 Statistische Analyse

Die Statistische Analyse wurde mit Hilfe des Programms IBM SPSS Statistics 22 berechnet. Die Auswertung beinhaltet eine deskriptive Statistik mit Bezug zur Normalverteilung, der Standardabweichung und dem Standardfehler. Eine Normalverteilung wurde nach Überprüfung durch den Shapiro-Wilk Test für kleinere Stichproben ($n < 50$) geprüft. Zur Signifikanztestung konnte bei normalverteilten Datensätzen der T-Test für unabhängige Stichproben und für nicht-normalverteilte Datensätze der Whitney-Mann U-Test verwendet werden. Die Varianzgleichheit wurde mit dem Levene-Test berechnet. Als Grenze für die Signifikanz diente bei allen Datensätzen ein p-Wert von $< 0,05$.

Tabelle 9: Statistische Software

Software	Typ	Firma
Bildbearbeitungssoftware	IM 50, V. 1.20 Release 19	Leica
Bildbearbeitungssoftware	Adobe Photoshop CS 8.0.1	Adobe Systems Inc.
EKG Software	IOX 1.8.3.20	emka Technologies
Statistik-Software	IBM SPSS Statistics 22	SPSS

3 Ergebnisse

Die Kultivierung von mMSCs war eine Voraussetzung zur Durchführung dieser experimentellen Studie. Zur Optimierung der Zellqualität und Zellquantität sind verschiedene Protokolle herangezogen worden. Die Wahl des endgültigen Protokolls konnte anhand der lichtmikroskopischen Beurteilung, des Differenzierungsverhaltens und der FACS-Analysen getroffen werden.

3.1 *In vitro* Experimente

3.1.1 Zellkultur

Nach Abschluss des hMSC-Protokolls (Tabelle 10) mit einer Selektion nach 3 h zeigten sich nach einer Woche Inkubation, wie in Abbildung 9 dargestellt, vereinzelte kleine adhärente Zellen mit spärlichem Zytoplasmasmaum und Nuklei ohne erkennbare Nukleoli. Bei weiterer Inkubation und Passagierung dieser Zellen konnten keine Veränderungen der Zellzahl oder Morphologie festgestellt werden. Aufgrund der rasanten Reduktion der Zellzahl und des Fehlens von Zellen mit mesenchymalem Charakter wurde in einem weiteren Versuch auf die Selektion nach drei Stunden verzichtet. Obwohl eine hohe Gesamtzahl der Zellen beobachtet wurde, zeigten diese keine Eigenschaften, die auf MSCs hinwiesen. Im Versuch dieser Proliferation entgegen zu wirken, wurden die Zellkulturen in kürzeren Abständen passagiert. Aufgrund mehrmaliger negativer Resultate wurde ein weiteres Protokoll zur Kultivierung herangezogen.

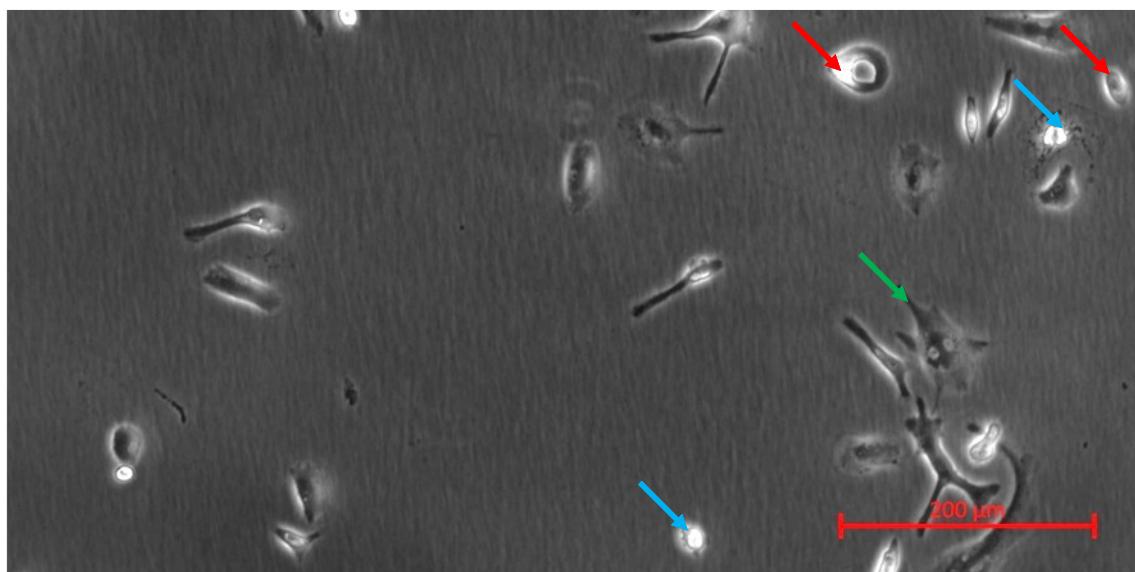


Abbildung 9: Zellkultur nach siebentägiger Inkubation in DMEM.

Darstellung der residuellen Zellen nach sieben Tagen Inkubation in *dulbecco's modified eagle's medium* (DMEM) bei normoxischen Bedingungen. Pfeile: rot – epitheloide Zellen; grün – mesenchymal-like Zellen; blau – Zelldetritus.

Das Protokoll nach Masoud Soleimani und Samad Nadri zeigte innerhalb einer Woche, wie in Abbildung 10 dargestellt, kleinere Gruppen von Zellen mit spindelförmigem flächigem Zytoplasma, Ausläufern und großen Nuklei mit abgrenzbaren Nukleoli. Im Verlauf konnte die Reinheit der Kultur verbessert, jedoch die Gesamtzahl der zu untersuchenden Zellen nicht vergrößert werden. Um eine weitere Steigerung der Zellzahl und Reinheit zu erreichen wurde dieses Protokoll verlassen.

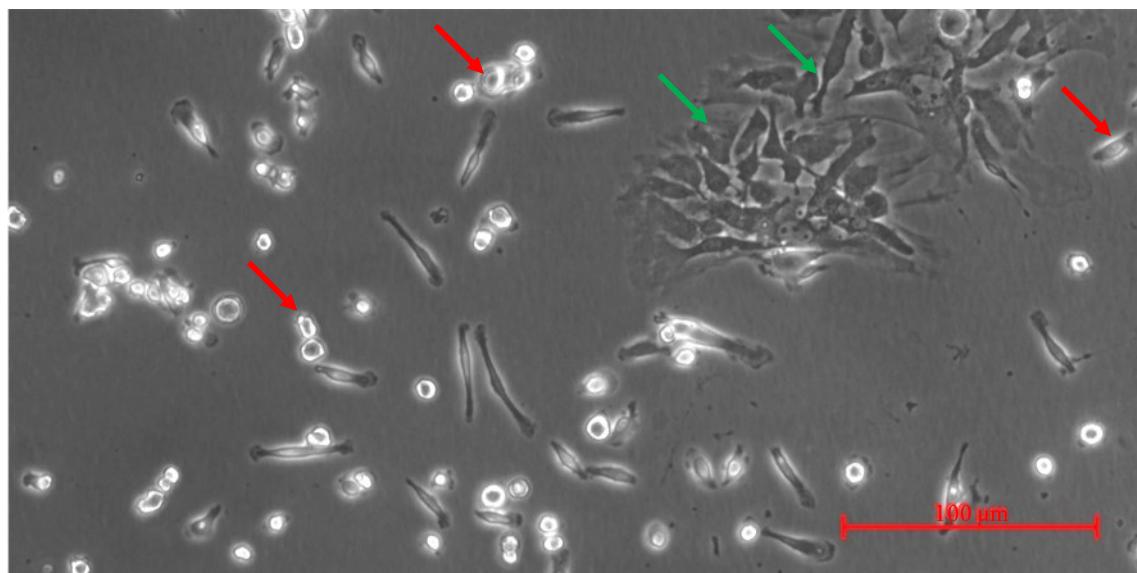


Abbildung 10: Zellkultur nach Protokoll Masoud Soleimani und Samad Nadri

Darstellung der Kultur nach 21 Tagen Inkubation in DMEM bei normoxischen Bedingungen. Pfeile: rot – epitheloide Zellen; grün – mesenchymal-like Zellen.

Die final etablierte Zellkultur stellte eine modifizierte Form des Protokolls von STEMCELL Technologies dar (Catalog #05513). Die Änderungen sind der Tabelle 10 zu entnehmen. Bei diesem Protokoll erfolgte eine einwöchige Inkubation der Zellen bei einem Sauerstofflevel von 1 %. Nach einer Konfluenz von 90 % konnte eine Passagierung mit einer weiteren einwöchigen Inkubation bis zum Erreichen der gewünschten Zellzahl durchgeführt werden. Lichtmikroskopisch zeigten sich in der P₀ (nach 5 Tagen in Hypoxie) wie im Protokoll nach Masoud Soleimani und Samad Nadri einige Zellen mit mesenchymalem Charakter. Diese Zellpopulation lag entweder vereinzelt oder in *colony forming units* (CFUs) vor. Weiterhin zeigte sich eine höhere Anzahl an Zellen mit einer hämatopoetischen Morphologie und epithelialem Charakter. Aufgrund der durchflusszytometrisch ermittelten unzureichenden Reinheit der Zellkultur und der geringen Anzahl der Zellen wurde eine Passage durchgeführt.

Die lichtmikroskopische Beurteilung der P₁ zeigte eine vermehrte Anzahl von CFUs mit mesenchymalem Charakter und eine geringere Kontamination durch Zellen mit hämatopoetischen und epithelialen Eigenschaften. Auch hier waren die großen flächigen Zellen mit kurzen Ausläufern wiederzufinden. Dabei zeigten sich große Ansammlungen von CFUs und zusätzlich vereinzelte Zellen mit mesenchymalem Charakter innerhalb der CFUs. Hierbei fiel eine deutliche Reduktion der Gesamtzellzahl auf. Gleichzeitig konnte eine Zunahme von Zelldetritus festgestellt werden. Insgesamt verschob sich das Verhältnis zu Zellen mit mesenchymalem Charakter. Bei weiterhin unzureichender Reinheit der Zellen erfolgte eine weitere Passage der Zellkultur.

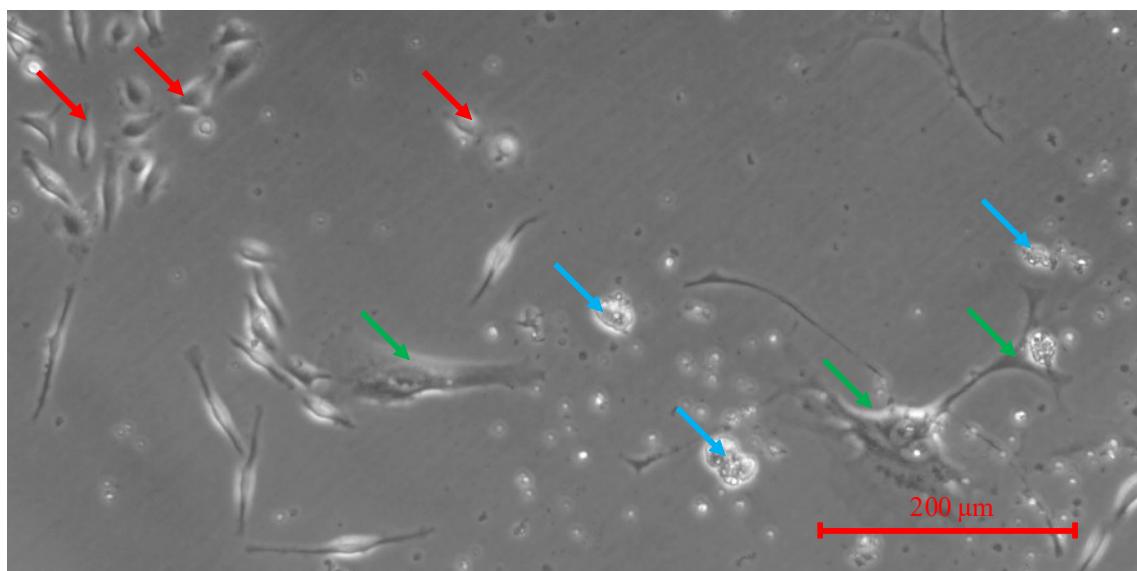


Abbildung 11: Darstellung der Zellen in der P₁

Darstellung der Zellkultur nach modifiziertem STEMCELL-Technologies-Protokoll bei 14-tägiger Inkubation vor der zweiten Passage. Pfeile: rot – epitheloide Zellen; grün – mesenchymal-like Zellen; blau – Zelldetritus.

Die lichtmikroskopische Untersuchung der P₂ zeigte sowohl in der GFP⁺- als auch in der GFP-Kultur eine hohe Anzahl adhärenter Zellen mit mesenchymalem Charakter. Des Weiteren konnten eine geringe Anzahl hämatopoetischer und epithelialer Zellen beobachtet werden. Durch den geringen Anteil des Zelldetritus war eine unwesentliche Trübung des Mediums festzustellen. Im Vergleich zu den anderen Passagen fielen die in Größe zugenommenen CFUs mit einer hohen Anzahl an Zellen auf. Diese wiesen in einigen Abschnitten eine Konfluenz bis 100 % auf. Zellen, die in diesen Regionen vorzufinden waren, zeigten im Vergleich zu den einzelnen MSCs ein kompaktes Zytosol.

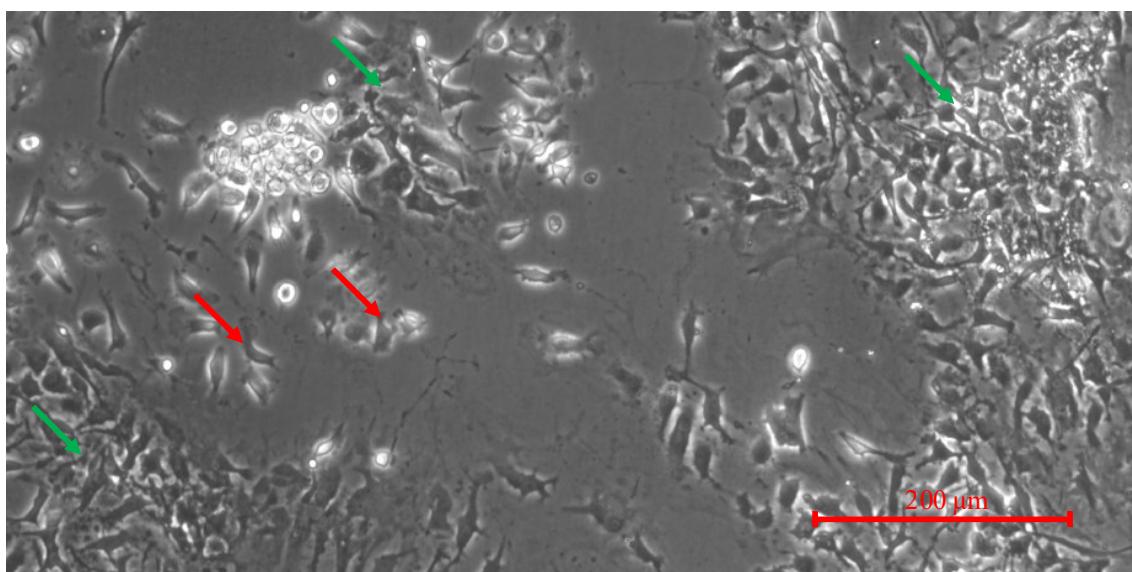


Abbildung 12: Darstellung der CFU in der P₂

Darstellung der Zellkultur nach modifiziertem STEMCELL-Technologies-Protokoll bei 21-tägiger Inkubation vor der Implantation in das Herzgewebe. Pfeile: rot – epitheloide Zellen; grün – mesenchymal-like Zellen; blau – Zelldetritus.

Tabelle 10: Unterschiede der verwendeten Protokolle

	hMSC-Protokoll	Soleimani & Nadri	STEMCELL Technologies	Modifiziertes Protokoll
Medium	DMEM	DMEM	Mesenkult + Mesenpure	Mesenkult + Mesenpure
Passage	-	Nach 7 Tagen	Nach 5-9 Tagen	Nach 5-9 Tagen
Inkubationsbedingungen	37°C, 5 % CO ₂ , 20 % O₂	37°C, 5 % CO ₂ , 20 % O₂	37°C, 5 % CO ₂ , 5 % O₂	37°C, 5 % CO ₂ , 1 % O₂
Inkubationsdauer	14 Tage	14 Tage	15-29 Tage	15-29 Tage
Mediumwechsel	2 Tage	Alle 8 h (0-72 h) 2 Tage (> 72 h)	5 Tage (0-5 Tage) 2 Tage (> 5 Tage)	5 Tage (0-5 Tage) 2 Tage (> 5 Tage)
Mausstamm	<i>C57BL/6</i>	<i>C57BL/6</i>	<i>C57BL/6</i>	<i>B6-eGFP</i>

3.1.2 Passage und Reinheit

Parallel zur Kultivierung erfolgte eine durchflusszytometrische Untersuchung auf typische Oberflächenantigene, die Reinheit und das Überleben der Zellen in den fortlaufenden Passagen (P_0 , P_1 , P_2). Hierbei zeigten CD29, CD90, CD44 und Sca-1 das Vorhandensein von MSCs und CD45 eine hämatopoetische Differenzierung an.

In der P₀ der C57BL/6-(GFP⁻) und B6-eGFP-Kulturen (GFP⁺) wurden in der *Single-Staining*-Methode minimal 10.000 Zellen für jeden Oberflächenmarker analysiert. Die Auswertung der B6-eGFP-Kultur zeigte 97 % vitale und 69,6 % GFP⁺ Zellen. CD44 konnte bei 47,3 % und CD90 bei 7,3 % nachgewiesen werden. Expression von CD45 wurde bei 30 % aller lebenden Zellen beobachtet. In den nachfolgenden Färbungen musste aufgrund der unzureichenden Menge der Antikörper von CD90 auf Sca-1 gewechselt werden.

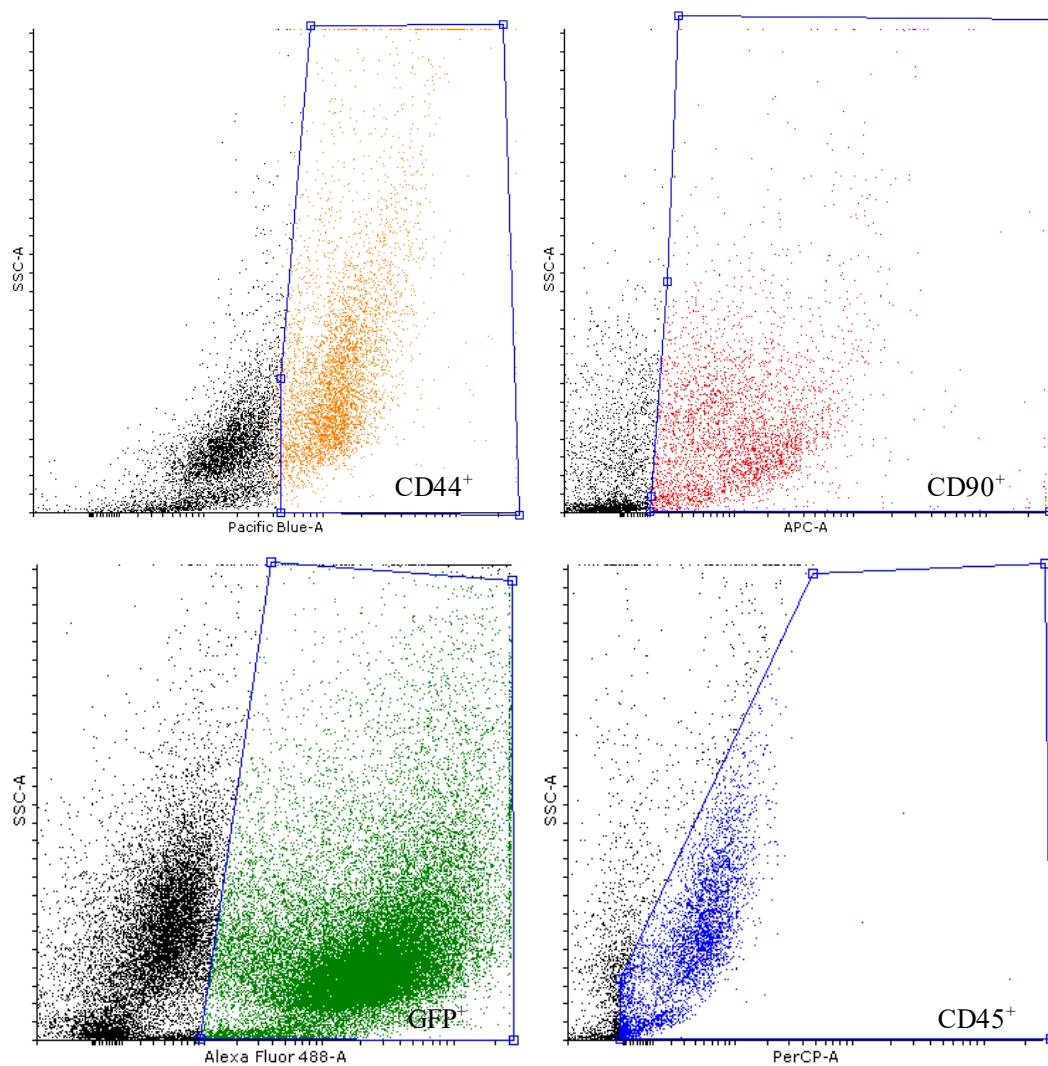


Abbildung 13: P₀ Expression (C57BL/6-Kultur: CD44, CD90, CD45; B6-eGFP-Kultur: GFP) der Oberflächenantigene CD44, CD90, GFP und CD45

A. Darstellung des CD44-Anteils mit 47,3 %. B Darstellung der CD90-tragenden Zellen mit einem Anteil von 7,3 %. C Darstellung der GFP⁺-Zellen mit einem Anteil von 70 %. D Darstellung der CD45-tragenden Zellen mit einem Anteil von 30%. CD – cluster of differentiation; SSC-A – side scatter area

Die P₁ wurde ebenfalls in *single staining* Methode mit minimal 10.000 Zellen per Tube analysiert. Die C57BL/6-Kultur (GFP-) wurde hierbei als Referenz für die B6-eGFP-Kultur verwendet. Die Auswertung der GFP- Kultur zeigte bei 97,9% vitalen Zellen in 23,7 % eine CD44, in 69,6 % eine CD29 und in 70,6 % eine Sca-1 Ausprägung. Die CD45-Expression erstreckte sich auf 31,5 % der Zellen. Aus der durchflusszytometrischen Untersuchung der B6-eGFP-Kultur wurden ähnliche Daten erhoben. Der GFP⁺-Anteil der Zellen entsprach 82,2 %. (Tabelle 11)

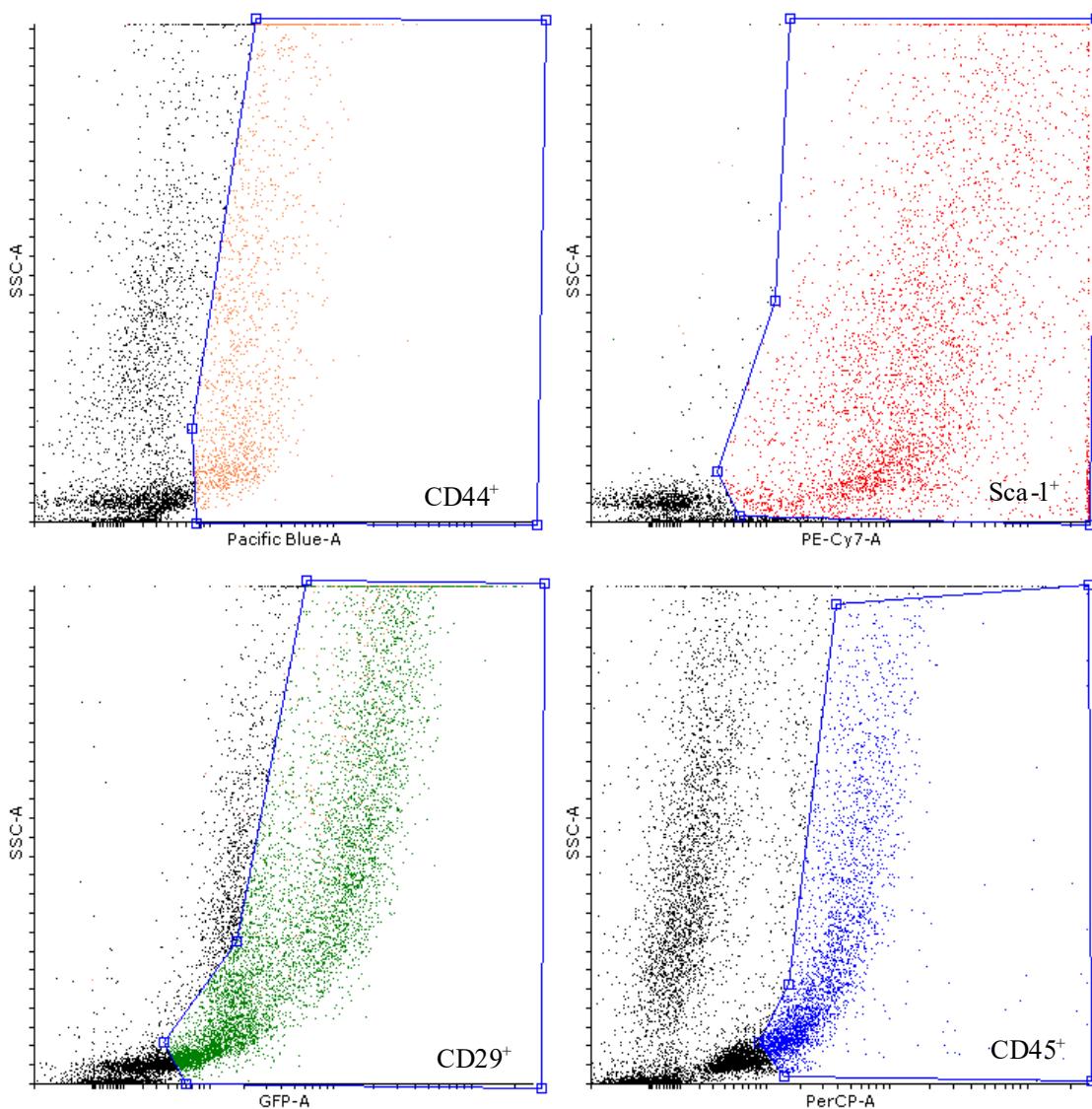


Abbildung 14: P₁ (C57BL/6-Kultur: CD44, Sca-1, CD29, CD45) Expression der Oberflächenantigene CD44, Sca-1, CD29 und CD45

A. Darstellung des CD44-Anteils mit 23,7 %. B Darstellung der Sca-1-tragenden Zellen mit einem Anteil von 70,6 %. C Darstellung der CD29-Zellen mit einem Anteil von 69,6 %. D Darstellung der CD45-tragenden Zellen mit einem Anteil von 31,5 %. CD – cluster of differentiation; Sca-1 – stem cell antigen-1; SSC-A – side-scatter-area

Die P₂ wurde in *multi staining*-Methode ausgewertet. Hierbei sind weiterhin 10.000 Zellen pro Oberflächenmarker analysiert worden. Im Falle der C57BL/6-Kultur sind folgende Anteile bestimmt worden. In 90,3 % aller Zellen konnte Sca-1 nachgewiesen werden. CD44 trat mit einem Anteil von 68,7 % auf. Das Vorkommen des hämatopoietischen Markers CD45 trat lediglich in 7,3 % der Zellen auf. CD29 konnte in 39,5 % der Fälle nachgewiesen werden. Die B6-eGFP-Kultur beschrieb ähnliche Werte. Anteilig zeigten 55,9 % der Zellen eine GFP-Expression.

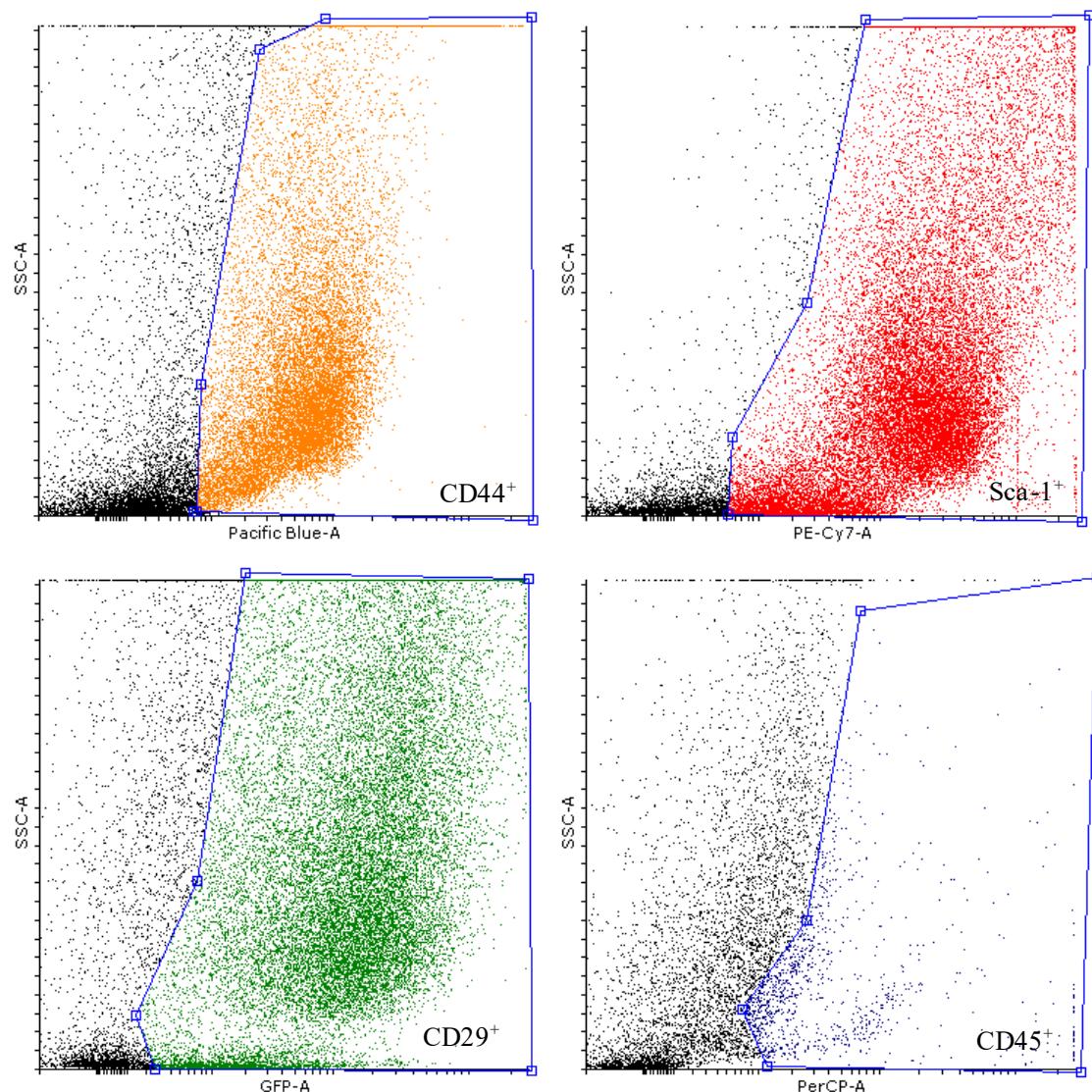


Abbildung 15: P₂ (C57BL/6-Kultur: CD44, Sca-1, CD29, CD45,) Expression der Oberflächenantigene CD44, Sca-1, CD29 und CD45

A Darstellung des CD44-Anteils mit 68,7 %. B Darstellung der Sca-1-tragenden Zellen mit einem Anteil von 90,3 %. C Darstellung der CD29-Zellen mit einem Anteil von 39,5 %. D Darstellung der CD45-tragenden Zellen mit einem Anteil von 7,3 %. CD – cluster of differentiation; Sca-1 – stem cell antigen-1; SSC-A – side-scatter-area

Zombie-positive Zellen waren in der nullten und ersten Passage mit einem Maximum von 5 % aufgetreten. In der zweiten Passage erhöhte sich dieser Wert auf durchschnittlich 10 %.

In der Zusammenfassung der Ergebnisse (Tabelle 11) der FACS-Analyse entschieden wir uns für die Implantation der Zellen nach der zweiten Passage. Dieser Entscheidung zugrundeliegend waren der hohe Anteil mesenchymaler Oberflächenmarker (Sca-1: 82,2 %, CD44: 76,4 %) und der geringe Anteil hämatopoetischer Oberflächenmarker (CD45: 5,2 %). Zusätzlich ist in dieser Passage eine ausreichende Anzahl an implantierbaren MSCs gegeben.

Tabelle 11: Zusammenfassung der durchflusszytometrisch ermittelten Oberflächenmarker

Zellpopulation	P ₀	P ₁	P ₂
CD44 ⁺ C57BL/6-Kultur	47,3 %	23,7 %	68,7 %
CD45 ⁺ C57BL/6-Kultur	30 %	31,5 %	7,3 %
CD29 ⁺ C57BL/6-Kultur	-	69,6 %	39,5 %
Sca-1 ⁺ C57BL/6-Kultur	-	70,6 %	90,3 %
GFP ⁺ B6-eGFP-Kultur	69,6 %	82,2 %	55,9 %
Zombie ⁺ C57BL/6-Kultur	3 %	2,1 %	10 %

3.1.3 Zelldifferenzierung

Der nächste Schritt zur Etablierung des Protokolls für die Kultivierung von mMSCs war eine Testung des Differenzierungspotentials mesenchymaler Stammzellen. Zur Anwendung kam hierbei das Mouse Mesenchymal Stem Cell Functional Identification Kit der Firma R&D Systems. Nach dem oben genannten Protokoll wurden zum einen mit einem Microtom Gefrierschnitte (Chondrozyten) hergestellt und durch Deckgläser fixiert und zum anderen Zellen in Wellplatten kultiviert.

Die einzelnen Präparate wurden vorher mit der jeweiligen Färbung behandelt. Chondrozyten erhielten eine Collagen II Färbung mittels Primärantikörper, sowie eine Behandlung mit einem 633 *donkey anti sheep* Sekundärantikörper. Zur Identifizierung der Adipozyten wurde primär *fatty acid binding protein 4* (FABP 4) sichtbar gemacht und daraufhin eine Sekundärfärbung mit 568 *donkey anti goat* durchgeführt. Osteozyten erhielten einen Primärantikörper gegen Osteopontin und daraufhin 568 *donkey anti goat* als Sekundärantikörper. Zusätzlich konnte aufgrund der verwendeten Donor-Maus GFP dargestellt werden. Zur Identifizierung des Nukleus wurde DAPI verwendet.

Im Chondrozytenpräparat zeigten sich, wie in Abbildung 16 dargestellt, nach Abschluss der Färbung vereinzelte Collagen II positive Zellen im Gewebeverband. Der überwiegende Anteil dieser Zellen zeigte eine grüne Fluoreszenz, wodurch eine GFP-Expression dargestellt wurde. Die Nuklei wurden mit DAPI gefärbt. Einige der Zellen grenzen sich ausschließlich durch ihren Nukleus ab. An den sichtbaren Nukleolen und der Größe des Zellkerns kann eine grobe Abgrenzung der Chondrozyten zu anderen Zellen erfolgen.

Das Osteozytenpräparat (Abbildung 17) wurde im Gegensatz zum Chondrozytenpräparat in einer Kultur differenziert. Durch den Antikörper wurde Osteopontin im Zytoplasma netzartig rot angefärbt. Zusätzlich wurde GFP dargestellt und auch hier der Nukleus angefärbt. Durch die unterschiedliche Kultur zu den Chondrozyten konnten weitere Eigenschaften der MSCs dargestellt werden. Die Zellen zeigten eine flächige Zytoplasmatausbreitung mit Ausläufern auf der Plastikoberfläche. Ebenfalls fiel das ausgeprägte Zytoskelett der MSCs auf. (Abbildung 18)

Adipozyten konnten analog zum Chondrozytenpräparat in einzelnen Zellen in der Kultur nachgewiesen werden. Hierbei wurde FABP 4 sichtbar gemacht. Charakteristisch für diese Zellen waren intrazytoplasmatische Einschlüsse. Hierbei handelte es sich um

Vakuolen, die für Adipozyten als Fettspeicher dienen. In der näheren Umgebung konnten ebenfalls MSCs nachgewiesen werden. Wie auch in den anderen Präparaten wurden das GFP und die Zellkerne angefärbt. (Abbildung 19, Abbildung 20)

Zusammenfassend konnten durch die Färbung pluripotente Eigenschaften der MSCs nachgewiesen werden. Die Zellen erfüllten somit die Voraussetzung zur Implantation im Rahmen dieses Experiments.

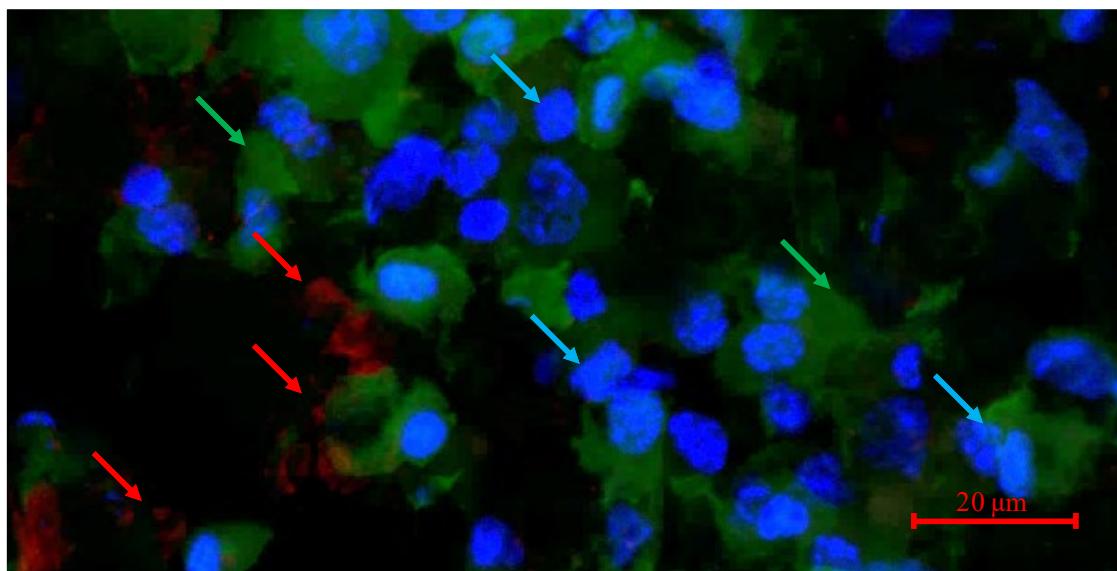


Abbildung 16: Collagen II Färbung der mesenchymalen Stammzellen nach chondrozytärer Differenzierung.

Darstellung der Zellen nach 21-tägiger Inkubation im Differenzierungsmedium und mikroskopischer Aufarbeitung mittels Mikrotoms in Tissue-Tek. Pfeile: rot – Collagen II positive Areale; grün – GFP; blau – Dapi gefärbte Zellkerne.

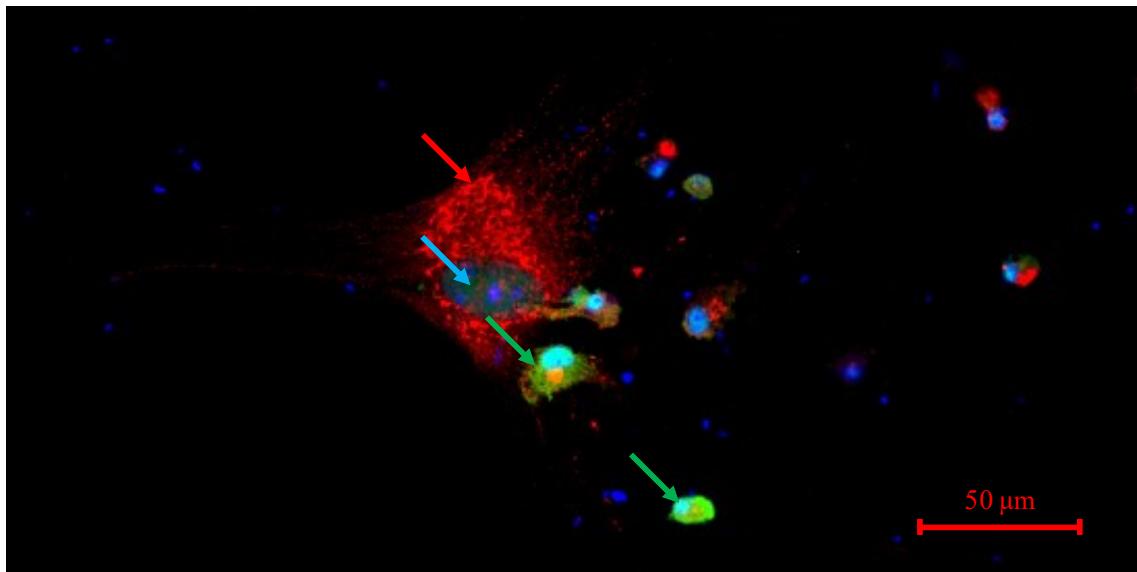


Abbildung 17: Osteopontinfärbung der mesenchymalen Stammzellen nach osteozytärer Differenzierung.

Darstellung der Zellen nach 14-tägiger Inkubation im Differenzierungsmedium. Pfeile: rot – Osteozyt; grün – GFP⁺ mesenchymale Stammzellen ; blau – Dapi gefärbter Zellkern.

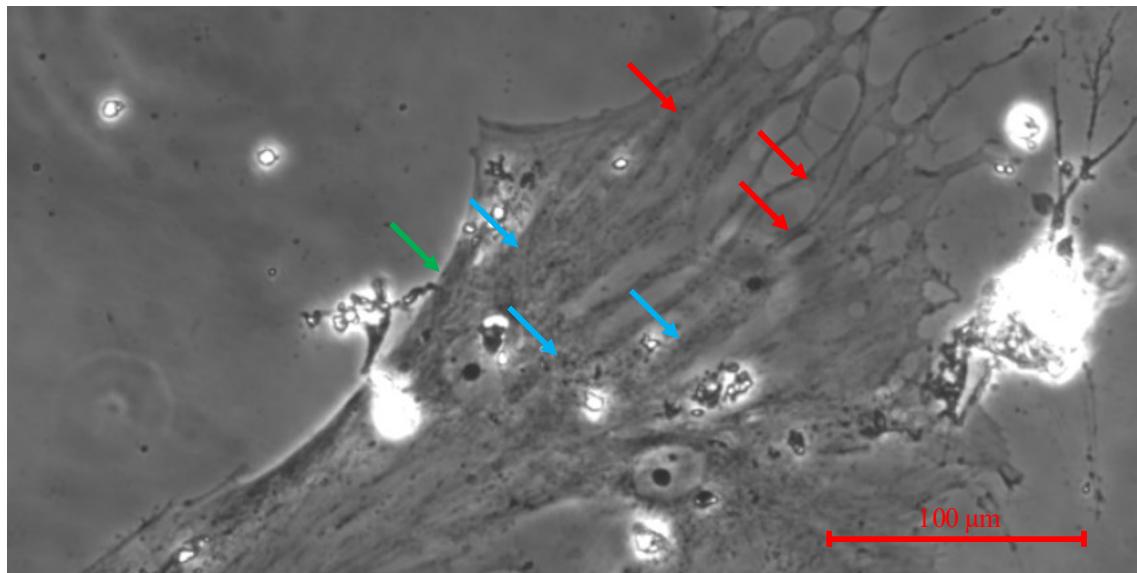


Abbildung 18: Lichtmikroskopische Darstellung der mesenchymalen Stammzellen nach osteozytärer Differenzierung.

Darstellung der Zellen nach 14-tägiger Inkubation im Differenzierungsmedium. Pfeile: rot – Zytoskelettdarstellung; grün – mesenchymale Stammzelle ; blau – Osteopontin.

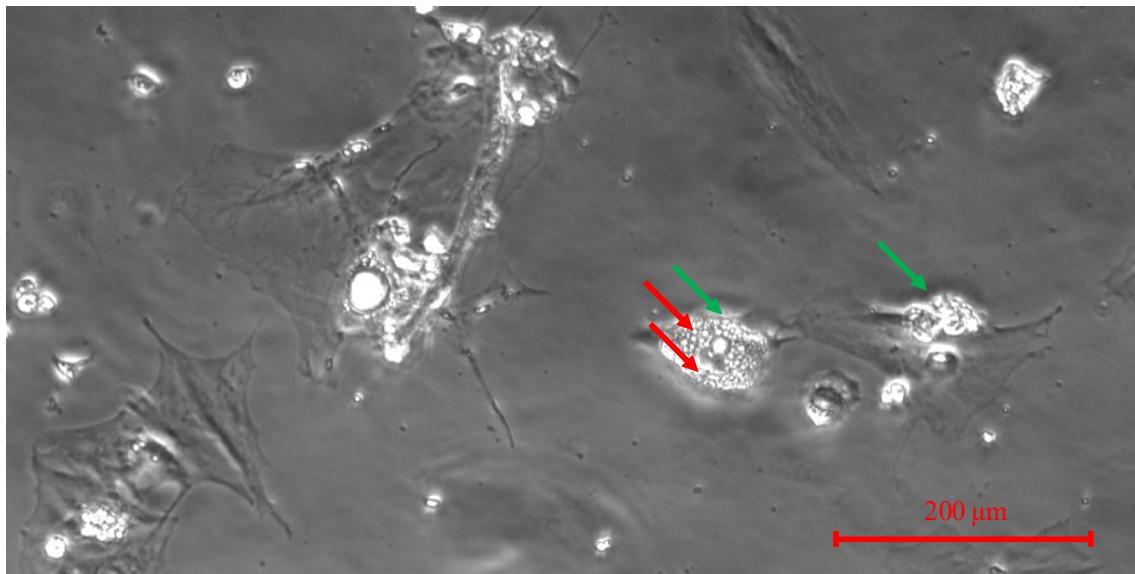


Abbildung 19: Lichtmikroskopische Darstellung der mesenchymalen Stammzellen nach adipozytärer Differenzierung.

Darstellung der Zellen nach 14-tägiger Inkubation im Differenzierungsmedium. Pfeile: rot – Vakuolen; grün – Adipozyten.

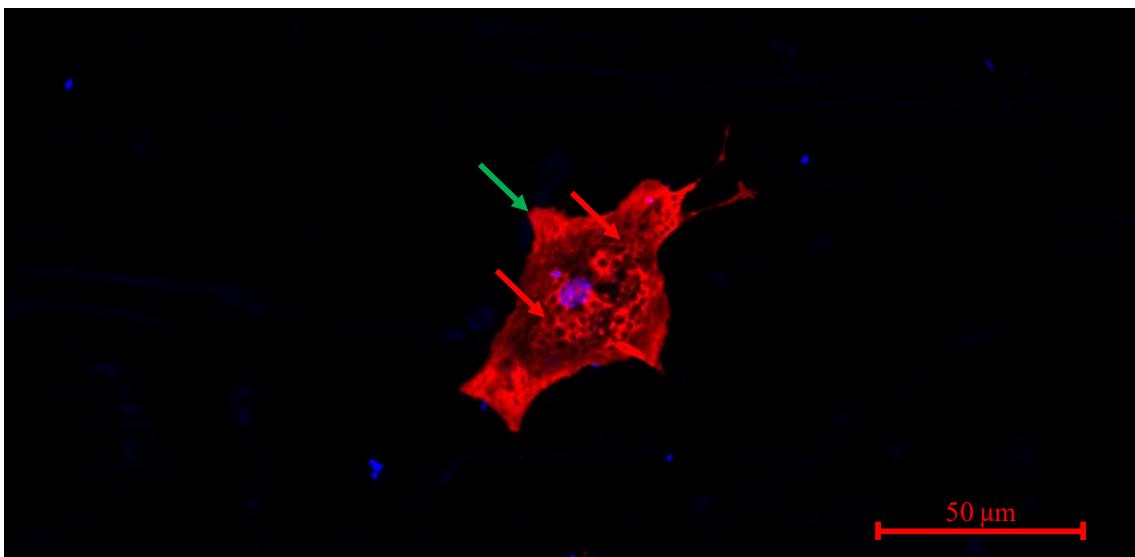


Abbildung 20: FABP-4 Färbung der mesenchymalen Stammzellen nach adipozytärer Differenzierung.

Darstellung der Zellen nach 14-tägiger Inkubation im Differenzierungsmedium. Pfeile: rot – Vakuolen; grün – Adipozyt.

3.2 *In vivo* Experimente

In unserem Experiment wurde während der Erstoperation ein Telemeter implantiert und eine Aufzeichnung der Herzaktion, jeweils 24 h nach Reperfusions- und nach Permanentinfarkt, durchgeführt. Die Auswertung der Arrhythmien wird im Folgenden auf qualitativer und quantitativer Ebene erfolgen.

3.2.1 Arrhythmien nach Reperfusionsinfarkt

Die Auswertung der Herzrhythmusstörungen wurde in drei Zeitabschnitte unterteilt. Die erste Phase der Arrhythmien betrifft die akute Reaktion durch Elektrolytenverschiebung nach einem Herzinfarkt. Die zweite Phase lässt sich auf den Zelluntergang zurückführen und die dritte Phase erstreckt sich bis zur zwölften Stunde nach dem Herzinfarkt und wird vorrangig durch Connexindysfunktion hervorgerufen. (Kolettis 2013) Die beobachteten Arrhythmien wurden in vier Kategorien eingesortiert und mittels *ecgAUTO* im Zeitverlauf markiert und gespeichert. In diesem Zusammenhang wurden zwischen Extrasystolen (ES), Bigeminus/Trigeminus (BG/TG), ventrikulären Tachykardien (VT) und Salven unterschieden. Zusätzlich wurde zu Beginn der Ligaturzeitpunkt in der Aufzeichnung aufgesucht und markiert. Durch Muskelaktivität artifizierte Regionen konnten bedingt in die Analyse eingearbeitet werden. In der gesamten Auswertung wurden in einem Ausschnitt von fünf bis zehn Sekunden die Rhythmik, die einzelnen Herzschläge, sowie arrhythmische Abschnitte gekennzeichnet. Zusätzlich wurde anhand der Häufigkeit und Periodik der einzelnen Extrasystolen zwischen Bigeminus, Trigeminus, Salven und VT unterschieden. Ein Bigeminus lag vor, wenn eine Extrasystole abwechselnd auf eine normale Herzaktion folgte. Ein Trigeminus lag vor, wenn zwei Extrasystolen mit jeweils einem normalen Schlag folgend auftraten. Salven wurden als zwei bis drei aufeinanderfolgende und ventrikuläre Tachykardien über drei Extrasystolen definiert. Weiterhin wurden Auffälligkeiten markiert und auf Relevanz kritisch untersucht. Beispiele für die jeweiligen Arrhythmien sind in Abbildung 21 dargestellt.

Im ersten Zeitabschnitt von 0 bis 15 min konnten bei fünf von 20 Tieren Arrhythmien beobachtet werden. Es traten im Mittel $2,19 \pm 1,22$ (Mittelwert \pm SEM) ES auf. Der Median fand sich bei 0,00 ES. Bei 2 Tieren konnten einzelne komplexere Arrhythmien gefunden werden. Es wurden keine VT oder Auffälligkeiten außerhalb dieser Kriterien beobachtet.

Im Zeitabschnitt von 15 bis 45 min zeigten sich bei 11 von 20 Tieren Arrhythmien. Extrasystolen traten bei der Hälfte der Mäuse mit einer Häufigkeit im Mittel von $4,62 \pm 2,11$ auf. Fünf Tiere zeigten zusätzlich komplexere Arrhythmien. BG/TG sind im Mittel mit einer Häufigkeit von $0,29 \pm 0,171$ und Salven von $0,19 \pm 0,11$ aufgetreten. Es wurden keine weiteren Auffälligkeiten außerhalb dieser Kriterien beobachtet.

Im Zeitabschnitt von 45 min bis 12 h wurden bei 18 von 20 Tieren Arrhythmien aufgezeichnet. Extrasystolen sind mit einer mittleren Häufigkeit von $55,00 \pm 15,62$ aufgetreten. Es wurden maximal 224 und minimal 0 Extrasystolen beobachtet. Salven konnten in 9/20 Fällen durchschnittlich mit einer Häufigkeit von $2,71 \pm 1,14$, BG/TG in 11/20 Fällen mit einer Häufigkeit von $2,90 \pm 1,03$ und VT in 9/20 Fällen mit einer Häufigkeit von $1,67 \pm 0,70$ beobachtet werden. Es wurden keine weiteren Auffälligkeiten außerhalb dieser Kriterien beobachtet.

Die verschiedenen Arrhythmien sind in Abhängigkeit der Zeit in Abbildung 22 dargestellt.

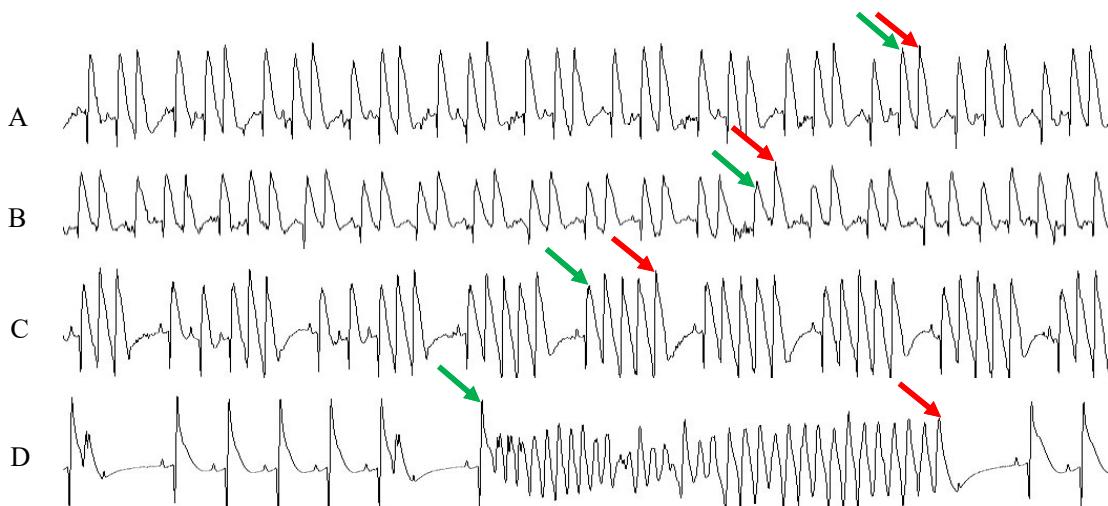


Abbildung 21: Darstellung der verschiedenen Arrhythmien in Abhängigkeit der Zeit.

A – TG: Zwei normale Herzaktionen gefolgt von einer ES. B – BG: Normale Herzaktion und Extrasystolen im Wechsel. C – Salven: Drei bis vier aufeinanderfolgende ES. D – VT: über vier aufeinanderfolgende ES.

BG/TG – Bigeminus/Trigeminus; ES – Extrasystolen; VT – Ventrikuläre Tachykardie; Pfeile: rot – letzte Extrasystole; grün – normale Herzaktion.

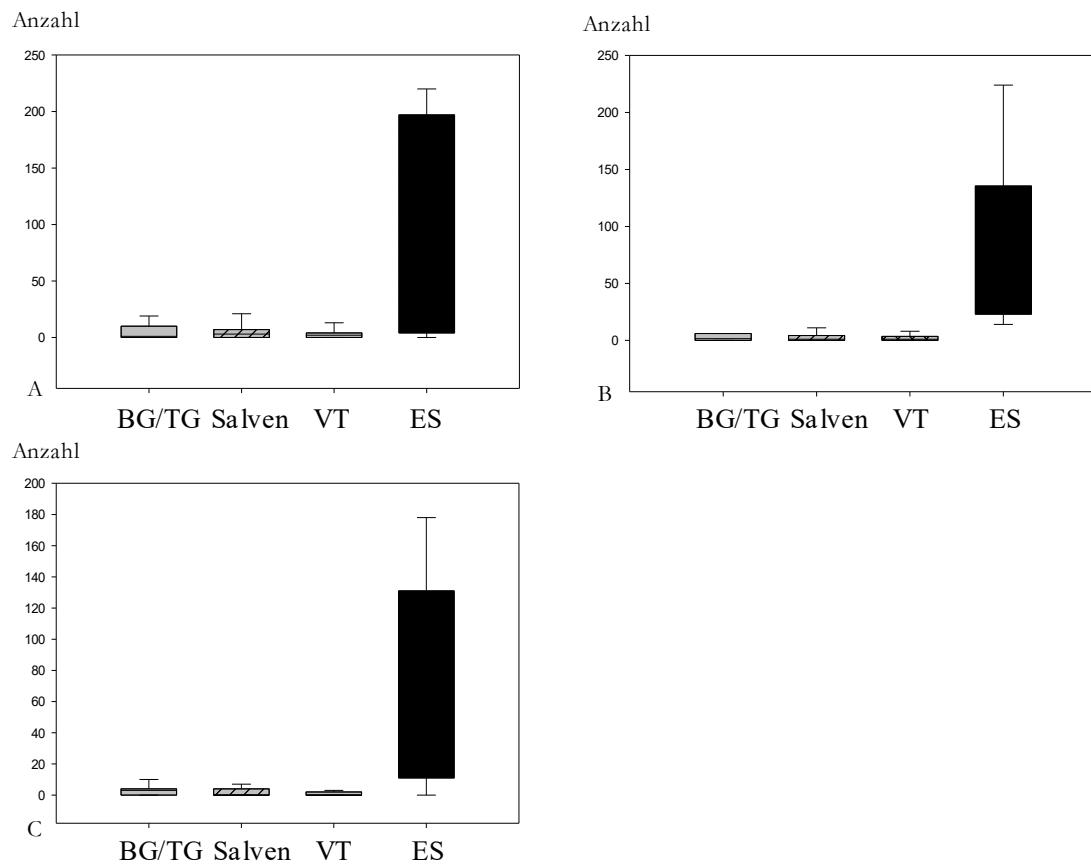


Abbildung 22: Häufigkeitsverteilung der einzelnen Arrhythmien nach Reperfusionsinfarkt

Boxplotdarstellung der Gruppen URI (n=7), TRI (n=6) und MIC (n=7). A – URI-Gruppe (n=7) B – TRI-Gruppe (n=6). C – MIC-Gruppe (n=7). (ES: $55,00 \pm 15,62$; BG/TG: $2,90 \pm 1,03$. Salven: $2,71 \pm 1,14$, VT: $1,67 \pm 0,70$)

BG/TG – Bigeminus/Trigeminus; ES – Extrasystolen; VT – Ventrikuläre Tachykardie

3.2.2 Arrhythmien nach Permanentinfarkt

Zur Vergleichbarkeit der Herzaktion nach dem permanenten Myokardinfarkt wurden identische Zeitabschnitte (0-15 min, 15-45 min, 45 min-12 h) und Kategorien (ES, BG/TG, VT, Salven) der Arrhythmien wie für den Reperfusionsinfarkt gewählt.

Im gesamten Beobachtungszeitraum sind bei allen Mäusen der MIC-Gruppe (n=7) weder einfache noch komplexere Arrhythmien aufgetreten und es konnten keine weiteren Auffälligkeiten beschrieben werden.

Die URI-Gruppe (URI) (n=7) zeigte im Beobachtungszeitraum bis 15 min nach dem Infarkt bei 3 von 20 Tieren Herzrhythmusstörungen. Hierbei fanden sich bei allen Mäusen auch komplexere Arrhythmien. Die Extrasystolen traten bei zwei Mäusen mit einer Häufigkeit von $12,57 \pm 9,11$ und einem Maximum von 63 ES auf. Komplexere Arrhythmien fanden ihren Mittelwert bei geringeren Werten. Salven konnten bei 2 Mäusen mit einer Häufigkeit von $0,43 \pm 0,30$ und BG/TG mit $0,57 \pm 0,43$ beobachtet werden. Es traten keine VT oder Auffälligkeiten außerhalb dieser Kriterien auf.

Im Beobachtungszeitraum zwischen 15 bis 45 min zeigten in der URI-Gruppe von 20 Tieren ebenfalls 3 Tiere Arrhythmien. Extrasystolen fanden sich mit einem Mittelwert von $7,43 \pm 4,60$ und einem Maximum von 28. Als komplexere Arrhythmie trat ausschließlich eine Salve auf. Es wurden keine BG/TG, VT oder Auffälligkeiten außerhalb dieser Kriterien beobachtet.

Bei der Auswertung der TRI-Gruppe (n=6) sind in diesen Zeitabschnitten (0 bis 45 min) keine Herzrhythmusstörungen aufgetreten.

Im längsten Zeitabschnitt, welcher sich von 45 min nach der permanenten Ligatur bis 12 h nach dem Ereignis erstreckt, zeigten alle Tiere der URI- und TRI Gruppe einfache Arrhythmien. In der URI-Gruppe sind als häufigste eingetretene Arrhythmie Extrasystolen mit einem durchschnittlichen Vorkommen von $2789,43 \pm 760,55$, einem Minimum von 338 und einem Maximum von 4706 aufgetreten. Bei einer Standardabweichung von 2012,23 lag das 95 %-Konfidenzintervall zwischen 928,43 und 4650,43. Komplexere Arrhythmien traten ebenfalls in höherer Anzahl auf. BG/TG fanden ihren Mittelwert bei $218,29 \pm 66,47$ bei einem Minimum von 32 und einem Maximum von 555. Bei einer Standardabweichung von 175,87 berechnete sich das 95 %-Konfidenzintervall zwischen 55,64 und 380,93. Des Weiteren traten Salven mit einer mittleren Häufigkeit von $80,14 \pm 38,87$, einem Minimum von 0 und einem Maximum von

298 auf. Mit einer Standardabweichung von 102,85 lag somit das Konfidenzintervall zwischen -14,98 und 175,26. Bei zwei von sieben Tieren konnten ventrikuläre Tachykardien beobachtet werden. Hierbei lag der Mittelwert bei $3,00 \pm 2,535$, wobei das Maximum bei 18 VT vorzufinden war.

In der TRI-Gruppe hingegen zeigten drei von sechs Versuchstieren auch komplexere Herzrhythmusstörungen. Extrasystolen konnten mit einer Häufigkeit von $51,17 \pm 28,46$ beobachtet werden. Hierbei lag das Minimum bei 1 und das Maximum bei 183 ES. Bei einer Standardabweichung von 69,72 berechnete sich ein 95 prozentiges Konfidenzintervall zwischen -22,00 und 124,33 ES. Zusätzlich traten sowohl Salven als auch BG/TG auf. Die Häufigkeit der Salven betrug $0,17 \pm 0,16$. BG/TG traten im Mittel mit $4,33 \pm 3,95$ auf. Im gesamten Zeitraum konnten keine VT beobachtet werden.

Die verschiedenen Arrhythmien sind in Abbildung 23 abgebildet.

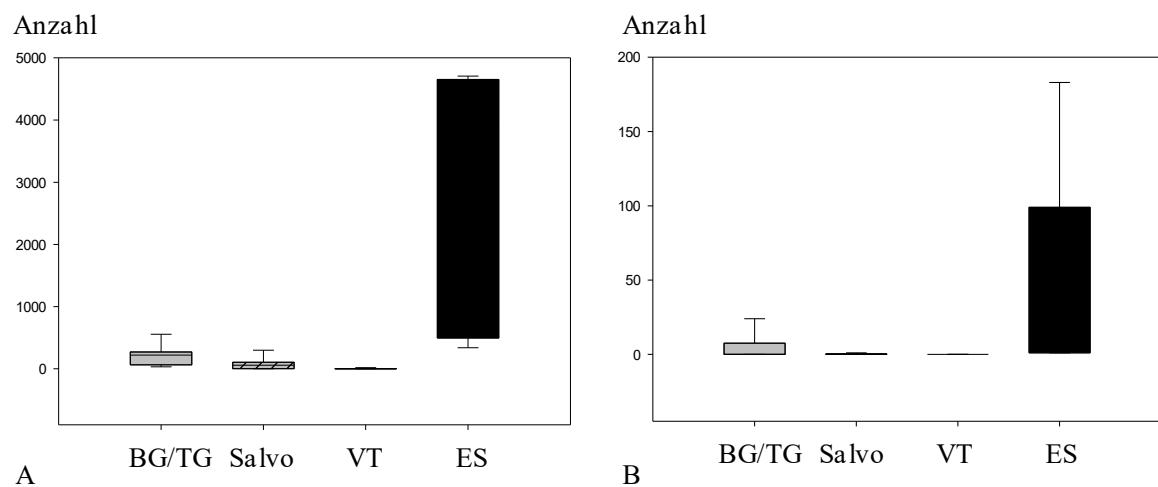


Abbildung 23: Häufigkeitsverteilung der einzelnen Arrhythmien nach Permanentinfarkt

Boxplotdarstellung der Gruppen URI (n=7), TRI (n=6) und MIC (n=7). A – URI-Gruppe (ES: $2789,43 \pm 760,55$; BG/TG: $218,29 \pm 66,47$. Salven: $80,14 \pm 38,87$, VT: $3,00 \pm 2,535$) B – TRI-Gruppe (ES: $51,17 \pm 28,46$; BG/TG: $4,33 \pm 3,95$. Salven: $0,17 \pm 0,16$, VT: 0)

BG/TG – Bigeminus/Trigeminus; ES – Extrasystolen; VT – Ventrikuläre Tachykardie

3.2.3 Postoperative Überlebensrate

Innerhalb der Grundgesamtheit von 24 C57BL/6-Mäusen haben 21 die Operation überlebt. Ein Tier musste wegen starker Abweichung von den Standardprozeduren ausgeschlossen werden. In der MIC-Gruppe (n=7) mussten keine Tiere ausgeschlossen werden. In der URI-Gruppe mussten von 9 Tieren 2 Tiere ausgeschlossen werden. Die erste Maus verstarb präoperativ bei der Injektion des Pentobarbitals und die zweite Maus aufgrund einer unzureichend kontrollierbaren Blutung intraoperativ. In der TRI-Gruppe mussten von 8 Tieren 2 Tiere ausgeschlossen werden. Hierbei verstarb eine Maus bei der Injektion der MSCs und eine Maus konnte aufgrund eines dislozierten Fadens nicht operiert werden. In den 7 postoperativen Tagen nach dem ersten Infarkt und 48 h nach dem zweiten Infarkt sind keine Tiere verstorben. Die übrigen Mäuse (MIC n=7; URI n=7; TRI n=6) überlebten die Narkose, sowie die Operation und die Extubation. Die meisten Tiere verstarben perioperativ beim Versuch eines Permanentinfarkts, wobei die Gründe unterschiedlich ausfielen. Somit zeigte sich in den jeweiligen Gruppen eine Überlebensrate in der MIC-Gruppe von 100.00 %, in der URI-Gruppe von 78.89 % und in der TRI-Gruppe von 75.00 %. Im Vergleich konnte kein Unterschied zwischen der URI-Gruppe und der TRI-Gruppe innerhalb von 9 Tagen nach dem ersten und innerhalb von 2 Tagen nach dem zweiten Herzinfarkt festgestellt werden.

3.2.4 Signifikanztestung

Zur Testung der Signifikanz der einzelnen Ergebnisse kam unter Berücksichtigung der Grundgesamtheit von 20 Tieren sowie der Normalverteilung der Whitney-Mann-U-Test für nicht normalverteilte unabhängige Stichproben oder der T-Test für unabhängige normalverteilte Stichproben zum Einsatz. Im Folgenden sind die drei unterschiedlichen Gruppen MIC, URI und TRI in den ebenfalls drei Zeitabschnitten (0-15 min, 15-45 min, 45 min-12 h) miteinander verglichen worden. Zusätzlich wurde im Falle einer Normalverteilung die Varianzgleichheit überprüft. Das Signifikanzniveau wurde durch $p \leq 0,05$ definiert.

3.2.4.1 Reperfusionsinfarkt

Zur Testung der Normalverteilung wurde der Shapiro-Wilk-Test angewandt. Dem zufolge waren die Arrhythmien in allen Zeitabschnitten bis auf ES von 45 min bis 12 h nicht normalverteilt und wurden mit einem Whitney-Mann-U-Test auf Signifikanzen untersucht. Hierbei waren im Vergleich der Mittelwerte sowohl zwischen der MIC, der URI- als auch der TRI-Gruppe keine signifikanten Unterschiede zu finden. Die dazugehörige Darstellung findet sich in Abbildung 24 und Tabelle 12.

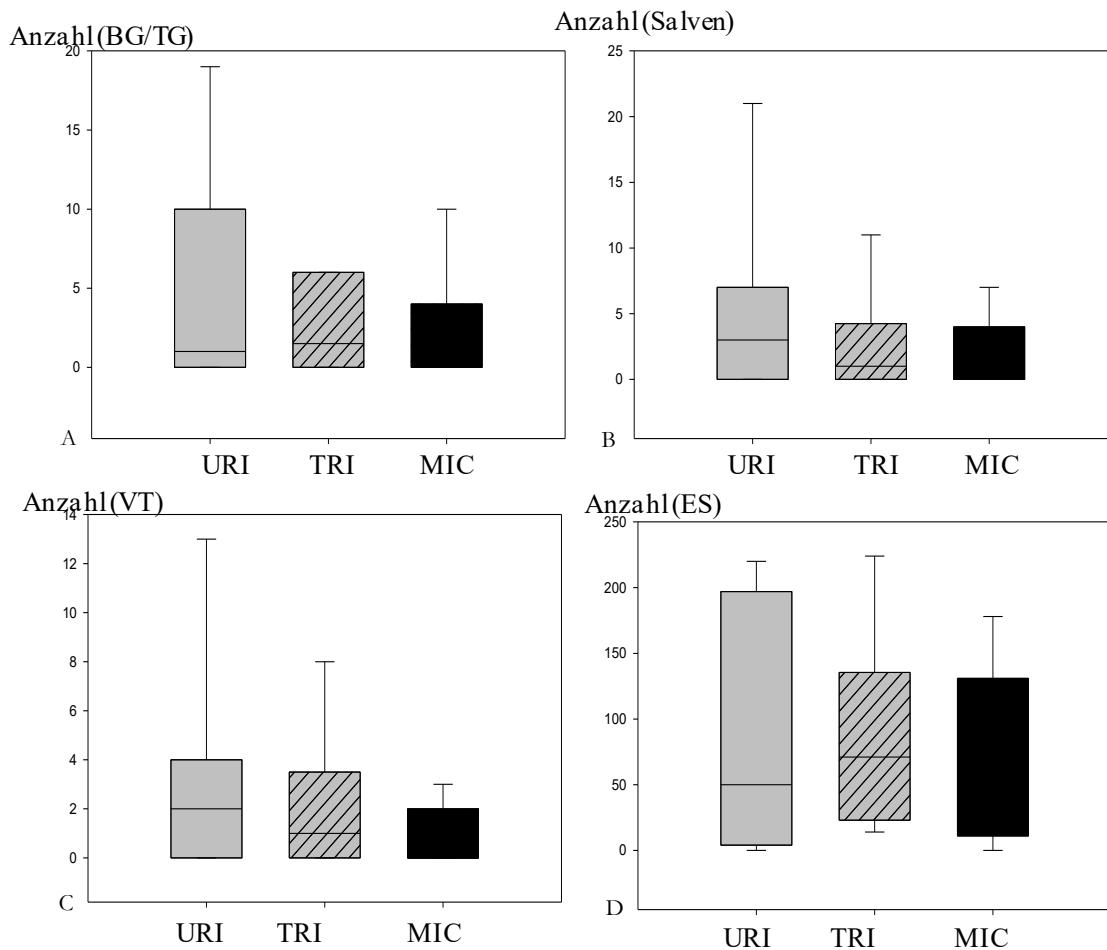


Abbildung 24: Vergleich der Arrhythmietypen im Zeitraum 45 min bis 12 h nach Reperfusionsinfarkt

Boxplotdarstellung der Gruppen URI(n=7), TRI (n=6) und MIC(n=7). A – BG/TG. B – Salven. C – VT. D - ES. Keine signifikanten Unterschiede. Signifikanzen bei allen Gruppen: p < 0,05

BG/TG – Bigeminus/Trigeminus; ES – Extrasystolen; MIC – myocardial infarction control; URI – untreated reinfarction; TRI – treated reinfarction; VT – ventrikuläre Tachykardien; * - signifikante Unterschiede

Tabelle 12: Signifikanzen der Arrhythmien 45 min bis 12 h nach Reperfusionsinfarkt

Arrhythmien	URI vs. TRI	URI vs. MIC	TRI vs. MIC
ES	0,440	0,363	0,299
BG/TG	0,199	0,153	0,414
Salven	0,232	0,165	0,393
VT	0,395	0,252	0,433

3.2.4.2 Permanentinfarkt

Der Shapiro-Wilk-Test zeigte, mit einer Ausnahme bei den BG/TG im Zeitabschnitt von 45 min bis 12h, einen nicht normalverteilten Datensatz. Dementsprechend wurde die Signifikanztestung mit dem Whitney-Mann-U-Test überprüft.

Der Vergleich zwischen URI-Gruppe und der TRI-Gruppe ergab keine signifikanten Unterschiede in den Zeitabschnitten von 0 bis 45 min. Die URI-Gruppe zeigte im Zeitabschnitt zwischen 45 min bis 12 h signifikant mehr ES, Salven und BG/TG. Extrasystolen traten mit einer Signifikanz von $p < 0,01$, BG/TG mit einer Signifikanz von $p < 0,01$ und Salven mit einer Signifikanz von $p < 0,05$ vermehrt auf. Ventrikuläre Tachykardien waren mit $p > 0,05$ nicht signifikant erhöht. Jedoch traten VT nur in der URI-Gruppe auf.

Im Vergleich zwischen URI- und MIC-Gruppe bestanden ebenfalls keine Unterschiede in den ersten 45 min postinfarziös. Darüber hinaus fanden sich signifikante Unterschiede in BG/TG, Salven und ES. Hierbei waren die Signifikanzniveaus bei ES $p < 0,01$, BG/TG $p < 0,01$ und Salven $p < 0,05$. VT fanden sich auch in diesem Vergleich nicht signifikant erhöht. Auch in diesem Zeitabschnitt traten VTs nur in der URI-Gruppe auf.

Im letzten Vergleich von der MIC- zur TRI-Gruppe konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Alle Vergleiche sind in Abbildung 25 und die dazugehörigen Signifikanzen in Tabelle 13 dargestellt.

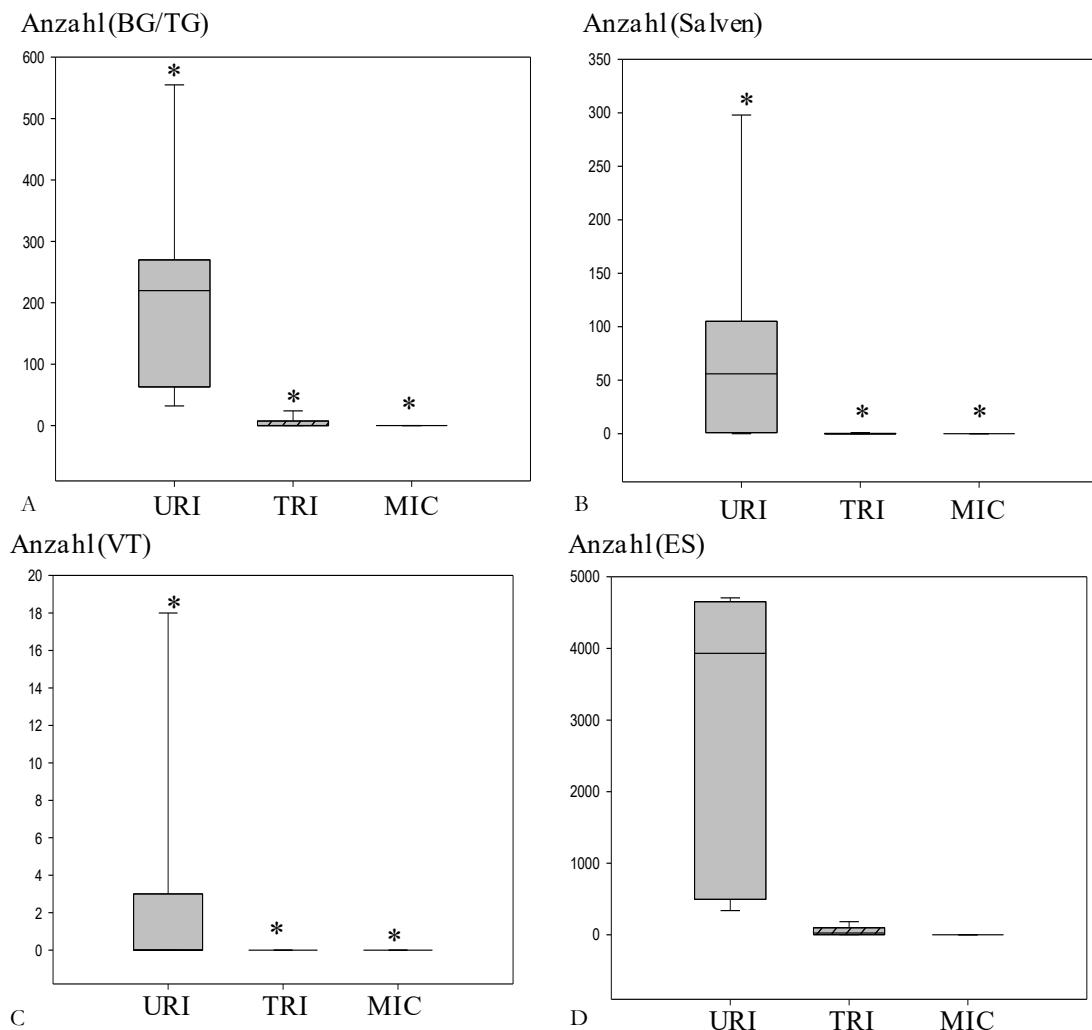


Abbildung 25: Vergleich der Arrhythmietypen im Zeitraum 45 min bis 12 h nach Permanentinfarkt

Boxplotdarstellung der Gruppen URI (n=7), TRI (n=6) und MIC (n=7) A – BG/TG. B – Salven. C – VT. D - ES. Signifikanzen: URI vs. TRI: ES p < 0,01; BG/TG p < 0,01; Salven p < 0,05; VT p > 0,05/ URI vs. MIC: ES p < 0,01; BG/TG p < 0,01; Salven p < 0,05; VT p > 0,05/ TRI vs. MIC: Alle Arrhythmien p > 0,05.

BG/TG – Bigeminus/Trigeminus; ES – Extrasystolen; MIC – myocardial infarction control; URI – untreated reinfarction; TRI – treated reinfarction; VT – ventrikuläre Tachykardien; * - signifikante Unterschiede

Tabelle 13: Signifikanzen der Arrhythmien 45 min bis 12 h nach Permanentinfarkt

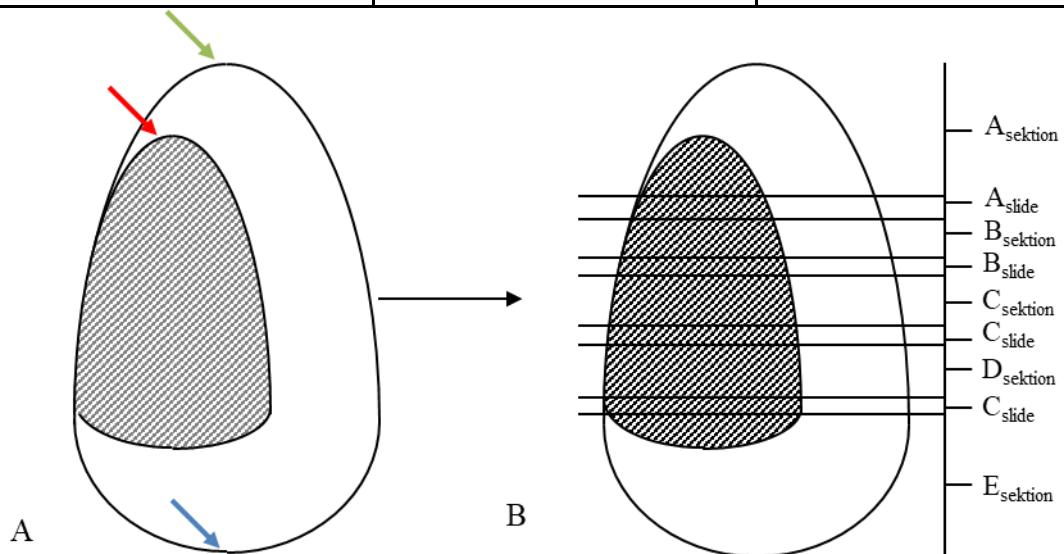
Gruppen	URI vs. TRI	URI vs. MIC	TRI vs. MIC
ES	0,005*	0,005*	0,066
BG/TG	0,009*	0,008*	0,161
Salven	0,042*	0,042*	0,181
VT	0,140	0,140	

3.2.5 MSCs *in vivo*

Zur Beurteilung der Zellen *in situ* wurden die Herzen 48 h nach dem Permanentinfarkt entnommen und in fünf Sektionen geschnitten. Alle Sektionen wurden in einen groben Sektionsanteil und einen Slidesektionsanteil unterteilt. Zum einen wurde Sektion A am Apex des Herzens festgelegt, zum anderen Sektion E an der Herzbasis. Die Schnitte erfolgten parallel zur Herzbasis. Die groben Sektionen wurden mit 60 µm Dicke und einer Anzahl von 10 Schnitten angefertigt. Für die auszuwertenden Slides wurde eine Dicke von 5 µm gewählt. Die Sektion A beinhaltete fünf, Sektion B und C acht und Sektion D vier solcher Slides. Die Herstellung der Schnitte ist in Tabelle 14 abgebildet. Die schematische Darstellung der Schnitte ist in Abbildung 26 verdeutlicht. Im ersten Schritt wurden die Schnitte, wie oben beschrieben, gefärbt. Nach Abschluss der Färbung wurden die Slides mittels eines konfokalen Mikroskops auf Veränderungen des Gewebes, dem Verbleib des GFP Signals und der Färbung durch den sekundären und primären Antikörper untersucht. Bei der Beurteilung des Gewebes zeigt sich eine Autofluoreszenz des Myokards und der Gefäßendothelen. Unter diesen Voraussetzungen konzentrierte sich die Auswertung auf die Sektionen C und D der angefertigten Slides. Zum Vergleich wurde ein Herz direkt nach der Implantation der Zellen verwendet. In diesem Ausschnitt des Präparats der Sektionen C und D zeigten sich, wie in Abbildung 27 dargestellt, kolumnenartige Anhäufungen flächenartiger Zellen, welche ein GFP⁺-Signal im Zytosol vorwiesen. Die Kerne waren deutlich größer als im umgebenden Gewebe. Hierbei handelte es sich um MSCs. Repräsentativ für die Zellgruppe zeigten sich im Präparat der vierten Maus aus der TRI-Gruppe auf den Ebenen B₂ und D₄, wie in Abbildung 28 dargestellt, die Verhältnisse nach neun Tagen *in vivo*. Auch in diesem Präparat konnten GFP⁺-Zellen nachgewiesen werden. Die kolumnenartige Anordnung war hierbei verloren gegangen. Des Weiteren zeigte sich auch hier der Unterschied in der Kerngröße der implantierten Zellen zum umgebenden Herzgewebe. Auffällig stellte sich die diffuse Verteilung der Zellen im Herzgewebe dar.

Tabelle 14: Gewebeschnitte

Sektionsname	Dicke	Slideanzahl
Sektion A-E grob	60 µm	10
Slide A	5 µm	5
Slide B	5 µm	8
Slide C	5 µm	8
Slide D	5 µm	4

**Abbildung 26 Schematische Darstellung des Infarktareals und der Schnittebenen**

A – Darstellung des Herzens mit Infarktareal, B – verwendete Schnittebenen

Blauer Pfeil – Basis; Roter Pfeil – Infarktrandzone; Grüner Pfeil – Apex; Schraffierte Fläche – Infarktareal

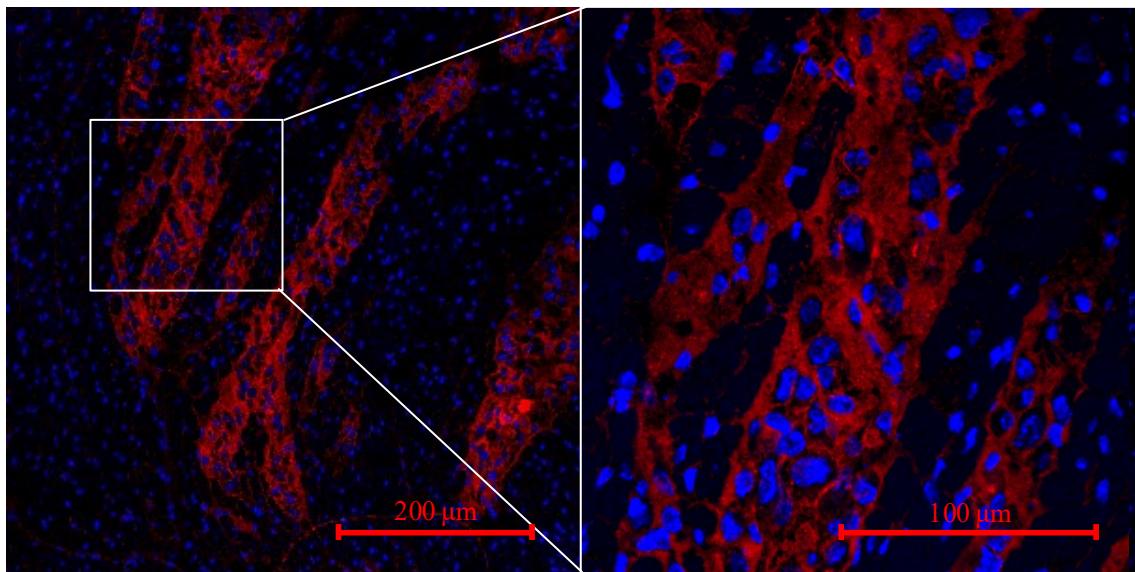


Abbildung 27: MSCs *ex vivo* Darstellung des Matrikels mit MSCs im Herzgewebe 0 h nach Infarkt

Darstellung der Zellen unmittelbar nach Injektion (0 h).

Rot – GFP⁺-Zellen; Blau – Dapi-gefärbte Zellkerne.

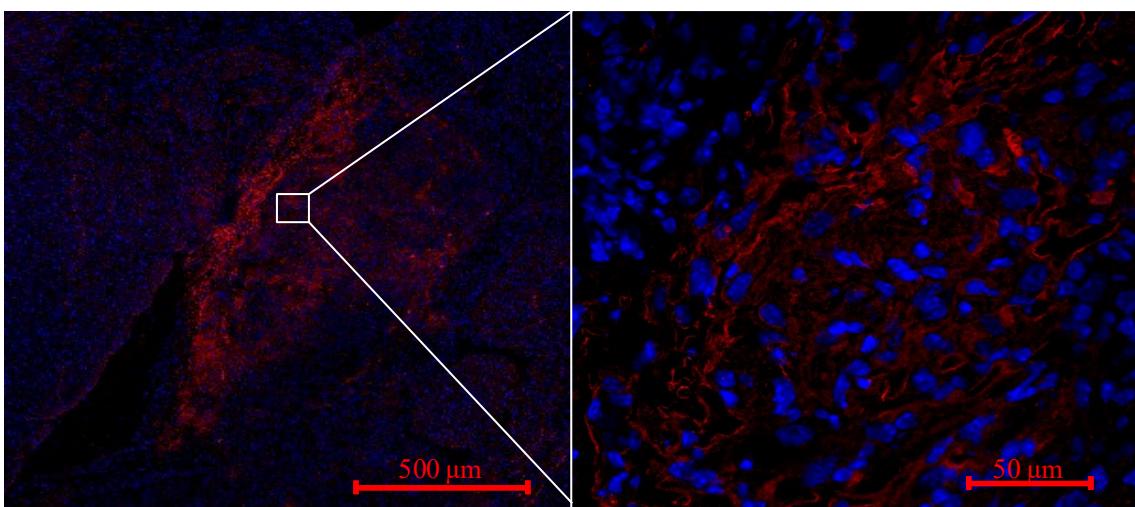


Abbildung 28: MSCs *ex vivo* Darstellung des Matrikels mit MSCs im Herzgewebe 9 d nach Infarkt

Darstellung der Zellen 9 Tage nach Reperfusionsinfarkt und 2 Tage nach Permanentinfarkt.

Rot – GFP⁺-Zellen; Blau – Dapi-gefärbte Zellkerne.

3.2.6 Infarktgröße

Zum Vergleich der Infarktgröße zwischen den Gruppen wurden eine *fast green/sirius red*-Färbung und eine HE-Färbung durchgeführt. Diese sind in Abbildung 29 dargestellt. Die Auswertung der Narbengröße mit *fast green* und *sirius red* zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen der TRI- und URI-Gruppe ($p < 0,05$). Der Vergleich zwischen TRI- und MIC-Gruppe zeigte ein kleineres Infarktareal zu Gunsten der MIC-Gruppe, jedoch ohne signifikanten Unterschied. Mit der HE-Färbung wurde die Leukozyteninfiltration beurteilt, wobei dies den zweiten Infarkt repräsentierte. Hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen URI und TRI gegenüber der MIC-Gruppe ($p < 0,05$). Eine Tendenz mit verringrigerter, jedoch nicht signifikanter Leukozyteninfiltration konnte bei der TRI-Gruppe nachgewiesen werden (Abbildung 30).

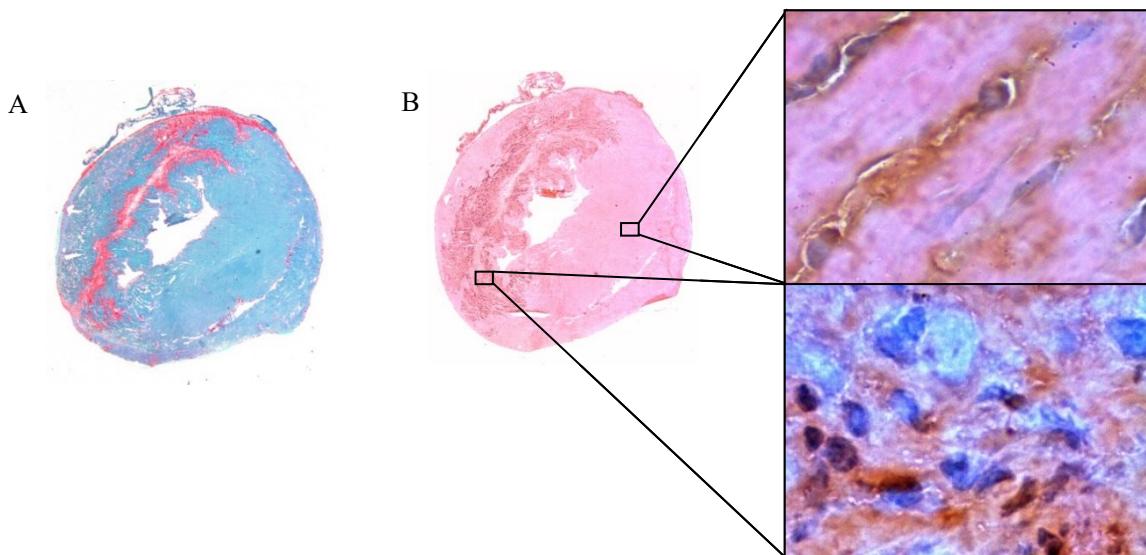
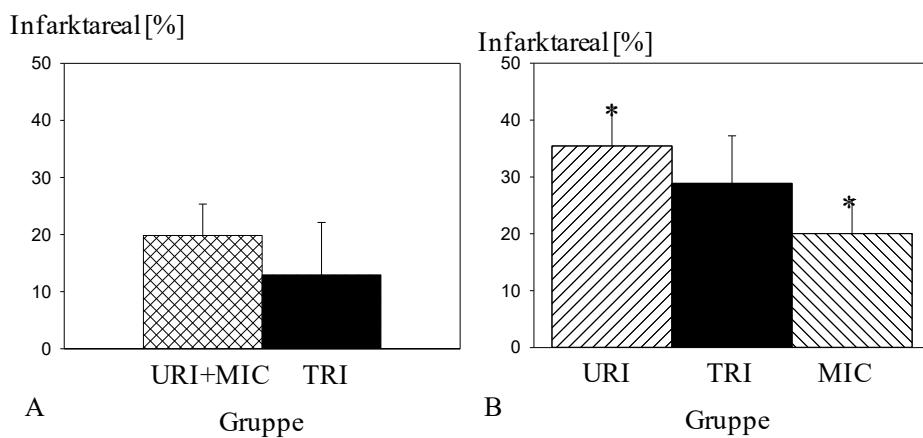


Abbildung 29: Vergleich des Narbenareals

A Darstellung des Narbenareals 9 Tage postinfarziell durch *fast green/sirius red*-Färbung. – B Darstellung der Leukozyteninfiltration mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung.



A Vergleich der Narbengröße mit nichtsignifikantem Unterschied zwischen TRI und URI+MIC. - B Vergleich der Leukozyteninfiltration mit signifikantem Unterschied zwischen URI und MIC.

MIC – myocardial infarction control; URI – untreated reinfarction; TRI – treated reinfarction; * - signifikanter Unterschied : $p < 0,05$

4 Diskussion

Die zugrundeliegende Studie verdeutlicht zum ersten Mal die Auswirkungen allogen implantierter hypoxisch präkonditionierter MSCs auf postinfarzielle Arrhythmien. Hierbei fand sich eine signifikante Abnahme der Herzrhythmusstörungen im Zeitabschnitt von 45 min bis 12 h nach dem Infarkt. Im Besonderen konnte die Häufigkeit einfacher und komplexerer Arrhythmien gesenkt werden. Das Ausmaß dieser Senkung spiegelt sich im Vergleich der Therapiegruppe zu den Kontrollgruppen MIC und URI wider. Durch die Behandlung der Tiere konnten die Herzrhythmusstörungen der TRI-Gruppe soweit abgesenkt werden, dass kein signifikanter Unterschied zu der MIC-Gruppe nachzuweisen war.

4.1 Zellkultur

Als vielversprechendes Therapiekonzept stehen MSCs mitunter im Fokus der regenerativen Medizin. Aktuell besteht die Gewinnung der MSCs aus einer Knochenmarkentnahme, der Aufreinigung des gewonnenen Materials und der anschließenden Kultivierung der verbleibenden Zellen. Andere Zellverbände wie Fettgewebe, Nabelschnur, Wharton Sulze und sogar peripheres Blut konnten vor diesem Hintergrund für die Isolation dieser Zellen verwendet werden. Eine Gewinnung von MSCs aus Plazenta und Muskelgewebe wurde ebenfalls durchgeführt. (Bilal et al. 2015; Araña et al. 2014; Ouryazdanpanah et al. 2018; Hare et al. 2012; Čamernik et al. 2019) Die Kultivierung mesenchymaler Stammzellen gelingt bei den verschiedenen Tierarten deutlich unterschiedlich. Zusätzlich bestehen auch Unterschiede bei der Dauer, Atmosphäre und Passage der Kultur. Nach Aufreinigung und Kultivierung der Zellen kann eine Implantation über Infusionstherapie oder direkte Injektion in das Zielorgan durchgeführt werden.

MSCs besitzen vorteilhafte Eigenschaften zur Anwendung als Zelltherapie. Neben einer einfachen Expansion und Handhabung während der Zellkultur konnte bei allogener und xenogener Transplantation eine geringe Abstoßung durch den Wirt nachgewiesen werden. (Saito et al. 2002) Durch diese immunmodulatorische Funktion ist eine weitgehend einfache und vom Spender unabhängige Transplantation möglich.

Trotz dieser praktikablen Handhabung sind Schwierigkeiten insbesondere bei der Auswahl der Spender, der Injektion und der Implantation der MSCs zu beobachten. Der Zustand des Donors hat einen erheblichen Anteil an der Qualität und Quantität dieser Zellen. (Fan et al. 2010) Daher kann die Auswahl der Spender einen großen Einfluss auf die Effektivität in Experimenten besitzen. Weiterhin sind eine geringe Anzahl und somit auch eine potenzielle Einschränkung der Funktion residernter Zellen durch das hypoxische Milieu, mechanische Beanspruchung und Apoptose zu verzeichnen. (Sanganalmath und Bolli 2013) Daher bestehen die vorrangigen Ziele in der richtigen Auswahl mesenchymaler Stammzellen, einer Optimierung der Zellimplantation und eine hierdurch bedingte Verbesserung der Langzeiteffekte dieser Zellen.

Einen zusätzlichen Faktor stellt die hypoxische Präkonditionierung dar. In diversen Studien konnten positive Einflüsse auf das Kulturverhalten, die Effektivität *in vitro* und die Residenz präkonditionierter Stammzellen beobachtet werden. Neben verringertem Zelltod und verlangsamtem Stoffwechsel konnte ein verbessertes Überleben und somit eine erhöhte Anzahl der Zellen bei Injektion verdeutlicht werden. (Beegle et al. 2015) Trotz dieser vielversprechenden Daten sind in der genauen Anwendung dieser Zellen Unklarheiten zu finden. In den vorliegenden Studien werden eine Mindestdauer, die Art der Zellen und der Sauerstofflevel der hypoxischen Präkonditionierung nicht ersichtlich. Unter dieser Fragestellung sind Inkubationszeiten von Stunden bis Tagen dokumentiert. Dabei ist weiterhin unklar, welchen Einfluss eine Variation auf die Effektivität dieser Stammzellen besitzt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Inkubation unter hypoxischen Bedingungen durchgeführt. Da eine Kultivierung in normoxischem Milieu keine ausreichende Anzahl der MSCs nachwies, sind vornehmlich die Effekte der hypoxisch präkonditionierten Zellen zu untersuchen. Durch dieses Vorhaben ist ein positiver Einfluss der hypoxischen Präkonditionierung auf die implantierten Zellen und somit die Versuchstiere wahrscheinlich.

4.2 Myokardinfarkt

Die Behandlung eines Herzinfarktes in der Klinik beinhaltet unterschiedliche Medikamente und interventionelle Therapien. Eine Revaskularisierung erfolgt ausschließlich in den ersten Stunden nach Eintreten des Myokardinfarkts und besitzt im weiteren Verlauf einen symptomatischen und präventiven Charakter. Hierdurch treten infarktassoziierte Sekundärkomplikationen wie linksventrikuläres Remodeling, Herzinsuffizienz und Arrhythmien auf. Zur Verwirklichung neuer Ansätze sind in der Vergangenheit verschiedene adulte Zellen wie Kardiomyozyten, skeletale und immortalisierte Myoblasten, glatte Muskelzellen und Fibroblasten zur Anwendung gekommen. (Hutcheson et al. 2000; Kocher et al. 2001; Ortiz et al. 2003; Planat-Bénard et al. 2004) Obwohl sich vereinzelt Effekte, wie eine verstärkte Revaskularisierung (Kocher et al. 2001), eine Verbesserung der systolischen und diastolischen Funktion (Hutcheson et al. 2000) und die Aufgabe als Schrittmacherzellen zu fungieren (Planat-Bénard et al. 2004), nachweislich bestätigen ließen, ist die Anwendung der adulten Zellen eingeschränkt. Als Folge wurden die Auswirkungen der Applikation gering differenzierter Zellen untersucht. Mit vielversprechenden Auswirkungen adulter Stammzellen auf die Funktion, die Neovaskularisierung und das Remodeling des Herzgewebes stehen diese Zellen nun im Vordergrund. Seitdem entwickelten sich unterschiedliche Wege zur therapeutischen Anwendung von MSCs. (Wei et al. 2011) (Lu et al. 2014) (Rahbarghazi et al. 2014) (Ghannam et al. 2010a) In diesem Rahmen bestehen Unterschiede in Isolation, Kultivierung und Implantation. Neben der klassischen intramyokardialen Applikation und der verbreiteten Infusionstherapie mit MSCs finden sich Anwendungen mittels Applikation auf der Herzoberfläche. (Tano et al. 2016)

Eine schnelle Proliferation, reproduzierbare Kulturen, genetische Stabilität, *homeing* und die Möglichkeit der lokalen oder systemischen Anwendung sind einige Vorteile dieser Zelltherapie. Mit der praktikablen Handhabung und guten Zugänglichkeit der Zellen sind MSCs in klinischen Studien vertreten. (Hare et al. 2012; Anastasiadis et al. 2012) Umfangreiche Effekte auf das kardiale Remodeling, die Herzaktion und das Immunsystem sind beschrieben. Hierzu zählen sowohl eine reduzierte Infarktgröße und verringerte Narbenbildung als auch die verbesserte ventrikuläre Funktion und Durchblutung. (Gnecchi et al. 2006; Halkos et al. 2008)

Neben zahlreichen positiven Einflüssen sind in einigen Studien auch gegenteilige Veränderungen beobachtet worden. Abgekapselte ossifizierte und kartilaginäre

Ablagerungen um das Infarktgebiet sind in einer Studie von Breitbach *et al.* zum ersten Mal beschrieben worden. (Breitbach et al. 2007) Des Weiteren zeigten die Ergebnisse von Janssens *et al.* bei intrakoronarer Applikation keine linksventrikuläre Verbesserung der Herzfunktion. (Janssens et al. 2006) Somit besteht ein großes Spektrum zwischen proarrhythmischen und antiarrhythmischen Eigenschaften, die MSCs zugeschrieben werden. Zur vollständigen Klärung dieser Frage ist ein standardisierter Umgang mit Festlegung der Faktoren wie Art der Applikation, Menge der mesenchymalen Stammzellen, Dauer der Therapie und Beobachtungszeitraum zu etablieren.

Obwohl diese Arbeit keinen Anspruch auf die Beantwortung der nachfolgenden Fragestellung erhebt, könnten zusätzliche positive Effekte durch das Studiendesign begründet sein. Im Rahmen des Doppelinfarktmodells konnte der Einfluss dieser MSCs nach dem zweiten Infarkt nachgewiesen werden. Plaquerupturen, Stentverlagerungen und Stenthrombosen sind in Folge eines Herzinfarkts ernstzunehmende Komplikationen. In diesen Fällen treten erneute ischämische Ereignisse auf. Ein isolierter positiver Effekt bei diesen Patienten ist daher noch unklar.

4.3 Überleben

Ein hoher Anteil der Sterblichkeit nach einem Herzinfarkt lässt sich auf maligne Arrhythmien zurückführen. (Ibanez et al. 2018) Ein durch Herzrhythmusstörungen erhöhtes Risiko für eine kardiale Dekompensation durch eine nachfolgende Stauung in Leber und Lunge und einer daraus resultierenden erhöhten Hospitalisierungsrate sind ursächlich für eine erhöhte Mortalität bei diesen Patienten. (Ibanez et al. 2018) In Anbetracht der postinfarziellen Sterblichkeit von Patienten und der festgestellten Reduktion der Arrhythmien in dieser Studie stellt sich die Frage nach den Auswirkungen auf die Überlebenszeit. In experimentellen Studien kann lediglich ein Beobachtungszeitraum definiert werden. Der in dieser Studie verwendete Zeitraum beschränkte sich auf zwei Tage nach dem Permanentinfarkt. Die Auswertung dieser Daten zeigte keine direkte Tendenz der Überlebensrate in den verschiedenen Gruppen. Das Ergebnis lässt keine direkte Aussage zu, da die gewählte Gesamtzahl, Faktoren wie technisches Versagen, Unterschied in der Aufwachphase der Mäuse und die Ausführung der Operationstechnik eine große Rolle spielen. Auch wenn in diesem Vorhaben nur geringfügige Unterschiede zu verzeichnen waren und die Versuchstiere keine Komplikationen zeigten, ist eine Abhängigkeit dieser Faktoren nicht auszuschließen. Obwohl der Großteil der frühen Komplikationen in diesem Zeitabschnitt bis 48 h postoperativ zu erwarten sind, können Spätkomplikationen nicht beurteilt werden. Schlussfolgernd lässt diese Arbeit eine Aussage über direkte postoperative Sterblichkeit jedoch nicht über das Langzeitüberleben zu.

4.4 Elektrophysiologie

Zu Beginn eines Herzinfarkts sind akute inflammatorische Prozesse mit Sekretion von Chemokinen, Wachstumsfaktoren und Zytokinen zu beobachten. Weiterhin sind Veränderungen durch den Untergang des Herzgewebes, Remodeling des Herzmuskels und Auswirkungen auf die Elektrophysiologie zu verzeichnen. Obwohl eine Verbesserung in der präventiven und interventionellen Therapie des Herzinfarkts zu verzeichnen ist, besitzen Patienten nach einem Myokardinfarkt eine 1-Jahres Mortalität von 13 %. (Santos et al. 2015) Durch den postinfarziellen Umbau entstehen im Rahmen des Myokardremodelings proarrhythmische Tendenzen. (Bloch Thomsen et al. 2010) Dieser Vorgang erhöht zum einen das Risiko für maligne Arrhythmien und zum anderen einer kardialen Dekompensation. (Ibanez et al. 2018) Vor diesem Hintergrund werden für eine weitere Reduktion der Mortalität Methoden benötigt, die eine Verbesserung der Herzfunktion auf längere Sicht erreichen. Die Zelltransplantation bezeichnet eine vielversprechende Therapie für Patienten mit Myokardinfarkt.

Neben kardialer Regeneration, Neovaskularisierung und Antiinflammation sind Einflüsse auf die Kontraktilität, das Remodeling und postinfarzielle Apoptose beschrieben. (Rahbarghazi et al. 2014; Kim et al. 2018; Zhong et al. 2015) Auswirkungen auf die Elektrophysiologie wurden selten untersucht. Dies lässt sich auf die Kombination aus den spärlich untersuchten elektrophysiologischen Wirkmechanismen der MSCs und der komplexen Pathophysiologie von Arrhythmien zurückführen. Da in frühen Experimenten einige Zellen wie skeletale Myoblasten proarrhythmische Eigenschaften zeigten, sind diese Nebenwirkungen bei Verwendung von MSCs nicht auszuschließen. (Smits et al. 2003) Grundlegend konnte in Versuchen eine Differenzierung der MSCs in kardialer Richtung nachgewiesen werden. (Wei et al. 2011) (Lu et al. 2014) Bei exprimierten kardialen Oberflächenmarkern zeigten sich jedoch keine funktionellen Kardiomyozyten. In weiteren Untersuchungen konnten elektrophysiologische Eigenschaften dieser Zellen beschrieben werden. (Li et al. 2018) Genauere Betrachtungen zeigten jedoch Unterschiede zu physiologischen Kardiomyozyten. In einer *in vitro* Studie von Chang et al. konnten vor diesem Hintergrund proarrhythmische Eigenschaften in der Kokultur von MSCs und neonatalen Myozyten beobachtet werden. (Chang et al. 2006)

Gegensätzlich hierzu konnten sowohl in umfangreichen tierischen Untersuchungen und klinischen Studien keine proarrhythmischen Eigenschaften beobachtet werden. (Joung et al. 2007; Schuleri et al. 2009; Hare et al. 2009) Diese Diskrepanz verdeutlicht einen weiterhin bestehenden Bedarf der Forschung in dieser Richtung.

Im Hauptaspekt dieser Studie wurde mithilfe eines Doppelinfarktmodells eine Induktion von Arrhythmien eingeleitet. (Sadraddin et al. 2019) Im Versuch das Auftreten postinfarzieller Arrhythmien zu verringern, konnte eine quantitative und qualitative Abnahme sowohl von ES als auch von BG/TG und Salven beobachtet werden. Hierbei wurden die Gesamtzahl, Häufigkeit und Anteil an einfachen und komplexeren Arrhythmien dezimiert. Als Ausnahme zu dieser Reduktion zeigten sich VT. Obwohl diese schwerwiegenden Arrhythmien nur bei der URI-Gruppe zu beobachten waren, konnte kein signifikanter Unterschied zu TRI oder MIC gezeigt werden. Im gesamten Beobachtungszeitraum wurden keine proarrhythmogenen Effekte nachgewiesen. In Anbetracht der kurzen Zeitspanne ist hierdurch eine Aussage über Frühfolgen, jedoch nicht über Spätfolgen des Infarkts zu treffen.

4.5 Grenzen dieser Studie

Im Fokus steht eine Untersuchung der Effekte von MSCs auf die Elektrophysiologie des Herzens. Bei der Induktion des Herzinfarkts dieser Studie ist keine arteriosklerotische Ätiologie führend. Daher ist die Möglichkeit, den Einfluss dieser Grunderkrankung zu untersuchen, nicht gegeben. Dies hat Auswirkungen auf die Genese postinfarzieller Arrhythmien, Folgeschäden und letztendlich der Wirkung der MSCs. Dennoch ist von einem geeigneten Modell auszugehen. (Sadraddin et al. 2019)

Darüber hinaus zeigt sich eine Limitation durch die Methodik dieses Versuchs. Bei einer einmaligen Applikation von MSCs sind Auswirkungen durch Variation der Kultur, Quantität der Zellen und mehrmaliger Anwendung dieser Therapie nicht zu eruieren. In Anbetracht der kurzen Beobachtungszeit und der vorliegenden Studien wurde diese Arbeit für einen Rahmen konzipiert, in dem die Wirkung der Zellen hauptsächlich auf diese verfügbare Zeitspanne beschränkt ist. Weitere Untersuchungen für die Anwendung bei erkrankten Patienten sind für ein besseres Verständnis notwendig. Vor diesem Hintergrund ist weiterhin anzumerken, dass keine proarrhythmischen Tendenzen weder nach dem Reperfusionsinfarkt noch nach dem Permanentinfarkt zu beobachten waren.

Im Weiteren wurde zur Untersuchung der Elektrophysiologie ein Mausmodell verwendet. Mit diesem Vorhaben ergeben sich einige Unterschiede zur Herzaktion des Menschen. Zum einen ist hervorzuheben, dass die Zeitspanne der einzelnen Aktionspotentiale im Vergleich sehr kurz ausfällt und somit die Ruheherzfrequenz der Maus im Mittel 600 Schläge pro Minute beträgt. Durch die schnelle Herzaktion ist eine Plateau-Phase des Aktionspotentials, die beim Menschen charakteristisch ist, nicht vorhanden. Zusätzlich haben die elektrophysiologischen Abläufe im Vergleich zum Menschen einen anderen Ursprung. Obwohl sich die Depolarisation in beiden Spezies ähnlich verhält, zeigt sich ein deutlicher Unterschied in der Repolarisation der Zelle. (Nerbonne 2016) Da dieser Mechanismus einen Anteil an der Entstehung postinfarzieller Arrhythmien besitzt, ist die Anwendbarkeit in der Klinik zu prüfen. Hinzukommend ist ein Unterschied in der Aufnahme der Herzaktion zu beachten. In der Klinik wird zur besseren Bewertung der Herzaktion ein EKG oder eine Langzeitaufzeichnung verwendet. Hierbei handelt es sich in den meisten Fällen um eine 12-Kanal-Ableitung, wodurch eine differenzierte Analyse der Herzaktion möglich ist. Aufgrund des kleinen Körpers der Maus und in Anbetracht der zur Verfügung stehenden Systeme zur Überwachung der Herzaktion bei Mäusen ist lediglich eine einfache Ableitung durch zwei Elektroden durchgeführt worden. Auch

wenn diese Aufnahme sich über 24 Stunden erstreckt, kann eine Maskierung von Pathologien durch Muskelaktivität oder ungünstige Vektorlage nicht ausgeschlossen werden. Im Rahmen der unterschiedlichen Vorhaben der einzelnen Studien ist eine direkte Aussage über die Effekte dieser Zellen unklar. Das Studiendesign mit Festlegung von Zelldonor, Isolations-, Kultivierungsverfahren und dem letztendlichen Tiermodell haben einen großen Einfluss auf die Effektivität der Zellen und das Vorkommen von Arrhythmien. Weiterhin kommen Methoden wie hypoxische Präkonditionierung, verschiedene Implantationsarten und unterschiedliche Subgruppen der MSCs in Frage.

4.6 Ausblick

Neben den Maßnahmen bei Verdacht auf ein akutes Koronarsyndrom mit Sauerstoff, Analgesie, Nitraten, Thrombozytenaggregationshemmern und einer suffizienten Antikoagulation ist eine schnellstmögliche Durchführung einer PTCA Mittel der ersten Wahl. Grundlegend ist hierbei der Untergang des Herzgewebes sechs Stunden nach ischämischem Insult. Eine Reperfusionstherapie innerhalb dieses Zeitfensters bewirkt eine direkte Mortalitätsverringerung und einen besseren *Outcome*. Da eine Reduktion von Herzinfarktgröße, Narbenareal, Arrhythmien und des kardialen Remodelings nach einer Stammzelltherapie nachgewiesen werden konnte, ist eine Administration dieser Zellen innerhalb der PTCA transendokardial oder bei einer Notfalloperation transepikardial möglich. Im weiteren Verlauf könnten im Anschluss durch eine weniger invasive Therapie MSCs als Infusionstherapie verabreicht werden.

5 Zusammenfassung

Die aktuelle Lage der Studien verzeichnet einen Nutzen der MSCs in der Therapie des Myokardinfarkts. Unter diesem Einfluss finden sich sowohl hämodynamische, zellbiologische als auch elektrophysiologische Effekte. (Rahbarghazi et al. 2014; Kim et al. 2018; Li et al. 2018) Diese Studie untersuchte die therapeutische Effizienz einer einmaligen MSC Injektion und deren Auswirkungen auf die Elektrophysiologie des Herzens. In einem neuartigen murinen Doppelinfarktmodell stand das Verhalten der postinfarziellen Herzrhythmusstörungen im Fokus. In diesem Rahmen wurden alle positiven und negativen Einflüsse, die infolge der Therapie auftraten, aufgezeichnet und analysiert.

Zu Beginn wurde nach Etablierung des finalen Protokolls eine Kultur von MSCs einer GFP⁺-Maus erstellt und mittels Phänotypisierung auf Reinheit, Zusammensetzung und Überleben untersucht. Im Verlauf konnte nach Festlegung der Passage für die Identifizierung der MSCs eine Differenzierung der Zellen durchgeführt werden. Bei vorliegender Anzahl und Reinheit der Zellkultur wurden die Versuchstiere für die Studie vorbereitet. Nach Einbau eines Telemeters und künstlicher Induktion eines Reperfusionsinfarkts, erfolgte eine intramyokardiale Injektion von Matrikel mit und ohne 1×10^5 MSCs entlang der Randzone des Herzinfarkts. Nach einer Aufzeichnung von 24 h und einer Latenzzeit von zusätzlichen sechs Tagen wurde ein Permanentinfarkt (URI- und TRI-Gruppe) oder eine Scheinoperation (ohne Induktion eines Myokardinfarkts; MIC-Gruppe) durchgeführt. Darauffolgend konnte die Herzaktion weitere 48 h aufgezeichnet werden. Nach Abschluss der Aufzeichnung wurde das Herz zur Untersuchung entnommen und für die Beurteilung zu Gewebeschnitten weiterbearbeitet.

Die Zellkultur wies nach der zweiten Passage mindestens eine Reinheit mit MSC-typischer Oberflächenantigene wie CD29, CD90, CD44 und Sca-1 von 90 % auf. Darüber hinaus fand sich eine geringe Menge an CD45 positiven Zellen. Eine Differenzierung konnte sowohl in Adipozyten, Osteozyten als auch in Chondrozyten induziert werden. Die Anzahl der gewonnenen Zellen erstreckte sich auf ca. $1,5-2 \times 10^6$ MSCs pro Spendertier. Hierdurch konnte die Injektion, für alle Versuchstiere der TRI-Gruppe, aus einer Kultur erfolgen.

In der Auswertung der Arrhythmien zeigte sich nach Reperfusionsinfarkt eine homogene Verteilung der Arrhythmien mit Vorkommen aller Arrhythmietyphen. Hierbei konnten

keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Gruppen nachgewiesen werden. Die Herzaktion nach dem Permanentinfarkt zeigte im Vergleich zu den anderen Gruppen, insbesondere im Vergleich zu der URI-Gruppe, eine signifikante Reduktion der ES, BG/TG und Salven in der Therapiegruppe. Obwohl ein signifikanter Effekt auf das Vorkommen von ventrikulären Tachykardien nicht verzeichnet werden konnte, traten diese Rhythmusstörungen ausschließlich in der URI-Gruppe auf. Im Gegensatz zu anderen Studien konnten keine proarrhythmischen Tendenzen beobachtet werden.

Die Gewebeschnitte wurden mittels Immunfluoreszenz gefärbt und auf residente Zellen untersucht. In der Untersuchung der TRI-Gruppen-Herzen stellten sich zusätzlich GFP⁺-Zellen inmitten des amorphen Materials dar. Aufgrund der Morphologie, der Lokalisation und der Färbung handelte es sich um die injizierten MSCs.

Zur Untersuchung der Infarktgröße wurde das fibröse Gewebe und die Leukozyteninfiltration anhand einer HE-, *fast green*- und *sirius red*-Färbung dargestellt. Hierbei zeigte sich die geringste Infarktausprägung in der MIC-Gruppe mit signifikantem Unterschied zur URI-Gruppe mit der ausgeprägtesten Infarktgröße. Die TRI-Gruppe lag zwischen beiden Werten, weswegen lediglich eine Tendenz, jedoch kein signifikanter Unterschied nachgewiesen wurde.

Zusammenfassend verringerte die intramyokardiale Injektion der MSCs das Auftreten einfacher und komplexerer Arrhythmien. Dieser Effekt ist im Zusammenhang mehrerer Mechanismen zu sehen und wurde in dieser Studie anhand der Infarktgröße bestätigt. Im Weiteren werden zukünftige Studien die Handhabung dieser Therapie in der klinischen Anwendung beleuchten.

6 Literaturverzeichnis

- Aggarwal, Sudeepa; Pittenger, Mark F. (2005): Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. In: *Blood* 105 (4), S. 1815–1822. DOI: 10.1182/blood-2004-04-1559.
- Amos, G. J.; Wettwer, E.; Metzger, F.; Li, Q.; Himmel, H. M.; Ravens, U. (1996): Differences between outward currents of human atrial and subepicardial ventricular myocytes. In: *The Journal of physiology* 491 (1), S. 31–50. DOI: 10.1113/jphysiol.1996.sp021194.
- Anastasiadis, Kyriakos; Antonitsis, Polychronis; Doumas, Argirios; Koliakos, Georgios; Argiriadou, Helena; Vaitsopoulou, Christina et al. (2012): Stem cells transplantation combined with long-term mechanical circulatory support enhances myocardial viability in end-stage ischemic cardiomyopathy. In: *International journal of cardiology* 155 (3), e51-3. DOI: 10.1016/j.ijcard.2011.07.062.
- Andrassy, Martin; Volz, Hans C.; Igwe, John C.; Funke, Benjamin; Eichberger, Sebastian N.; Kaya, Ziya et al. (2008): High-mobility group box-1 in ischemia-reperfusion injury of the heart. In: *Circulation* 117 (25), S. 3216–3226. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.769331.
- Anversa, Piero; Kajstura, Jan; Leri, Annarosa; Bolli, Roberto (2006): Life and death of cardiac stem cells: a paradigm shift in cardiac biology. In: *Circulation* 113 (11), S. 1451–1463. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.595181.
- Araña, Miriam; Gavira, Juan J.; Peña, Estefanía; González, Arantxa; Abizanda, Gloria; Cilla, Myriam et al. (2014): Epicardial delivery of collagen patches with adipose-derived stem cells in rat and minipig models of chronic myocardial infarction. In: *Biomaterials* 35 (1), S. 143–151. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.09.083.
- Arslan, Fatih; Kleijn, Dominique P. de; Pasterkamp, Gerard (2011): Innate immune signaling in cardiac ischemia. In: *Nature reviews. Cardiology* 8 (5), S. 292–300. DOI: 10.1038/nrcardio.2011.38.
- Arslan, Fatih; Smeets, Mirjam B.; O'Neill, Luke A. J.; Keogh, Brian; McGuirk, Peter; Timmers, Leo et al. (2010): Myocardial ischemia/reperfusion injury is mediated by leukocytic toll-like receptor-2 and reduced by systemic administration of a novel anti-

- toll-like receptor-2 antibody. In: *Circulation* 121 (1), S. 80–90. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.880187.
- Beardslee, M. A.; Lerner, D. L.; Tadros, P. N.; Laing, J. G.; Beyer, E. C.; Yamada, K. A. et al. (2000): Dephosphorylation and intracellular redistribution of ventricular connexin43 during electrical uncoupling induced by ischemia. In: *Circulation research* 87 (8), S. 656–662. DOI: 10.1161/01.res.87.8.656.
- Beegle, Julie; Lakatos, Kinga; Kalomoiris, Stefanos; Stewart, Heather; Isseroff, R. Rivkah; Nolta, Jan A.; Fierro, Fernando A. (2015): Hypoxic preconditioning of mesenchymal stromal cells induces metabolic changes, enhances survival, and promotes cell retention in vivo. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 33 (6), S. 1818–1828. DOI: 10.1002/stem.1976.
- Beg, A. A.; Baltimore, D. (1996): An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. In: *Science (New York, N.Y.)* 274 (5288), S. 782–784. DOI: 10.1126/science.274.5288.782.
- Bell, Robert M.; Mocanu, Mihaela M.; Yellon, Derek M. (2011): Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion. In: *Journal of molecular and cellular cardiology* 50 (6), S. 940–950. DOI: 10.1016/j.jmcc.2011.02.018.
- Benjamin, Emelia J.; Virani, Salim S.; Callaway, Clifton W.; Chamberlain, Alanna M.; Chang, Alexander R.; Cheng, Susan et al. (2018): Heart Disease and Stroke Statistics-2018 Update: A Report From the American Heart Association. In: *Circulation* 137 (12), e67-e492. DOI: 10.1161/CIR.0000000000000558.
- Ben-Mordechai, Tamar; Holbova, Radka; Landa-Rouben, Natalie; Harel-Adar, Tamar; Feinberg, Micha S.; Abd Elrahman, Ihab et al. (2013): Macrophage subpopulations are essential for infarct repair with and without stem cell therapy. In: *Journal of the American College of Cardiology* 62 (20), S. 1890–1901. DOI: 10.1016/j.jacc.2013.07.057.
- Benvenuto, Federica; Ferrari, Stefania; Gerdoni, Ezio; Gualandi, Francesca; Frassoni, Francesco; Pistoia, Vito et al. (2007): Human mesenchymal stem cells promote survival of T cells in a quiescent state. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 25 (7), S. 1753–1760. DOI: 10.1634/stemcells.2007-0068.

Bilal, Muhammad; Haseeb, Abdul; Sher Khan, Muhammad Ahad (2015): Intracoronary infusion of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells: a novel treatment in patients of acute myocardial infarction. In: *JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association* 65 (12), S. 1369.

Bloch Thomsen, Poul Erik; Jons, Christian; Raatikainen, M. J. Pekka; Moerch Joergensen, Rikke; Hartikainen, Juha; Virtanen, Vesa et al. (2010): Long-term recording of cardiac arrhythmias with an implantable cardiac monitor in patients with reduced ejection fraction after acute myocardial infarction: the Cardiac Arrhythmias and Risk Stratification After Acute Myocardial Infarction (CARISMA) study. In: *Circulation* 122 (13), S. 1258–1264. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.902148.

Breitbach, Martin; Bostani, Toktam; Roell, Wilhelm; Xia, Ying; Dewald, Oliver; Nygren, Jens M. et al. (2007): Potential risks of bone marrow cell transplantation into infarcted hearts. In: *Blood* 110 (4), S. 1362–1369. DOI: 10.1182/blood-2006-12-063412.

Cai, Benzhi; Wang, Gang; Chen, Nan; Liu, Yanju; Yin, Kun; Ning, Chunping et al. (2014): Bone marrow mesenchymal stem cells protected post-infarcted myocardium against arrhythmias via reversing potassium channels remodelling. In: *Journal of cellular and molecular medicine* 18 (7), S. 1407–1416. DOI: 10.1111/jcmm.12287.

Cai, Mengting; Ren, Lei; Yin, Xiaoqin; Guo, Zhide; Li, Yesen; He, Tingting et al. (2016): PET monitoring angiogenesis of infarcted myocardium after treatment with vascular endothelial growth factor and bone marrow mesenchymal stem cells. In: *Amino acids* 48 (3), S. 811–820. DOI: 10.1007/s00726-015-2129-4.

Čamernik, Klemen; Mihelič, Anže; Mihalič, Rene; Marolt Presen, Darja; Janež, Andrej; Trebše, Rihard et al. (2019): Skeletal-muscle-derived mesenchymal stem/stromal cells from patients with osteoarthritis show superior biological properties compared to bone-derived cells. In: *Stem cell research* 38, S. 101465. DOI: 10.1016/j.scr.2019.101465.

Carmeliet, E. (1999): Cardiac ionic currents and acute ischemia: from channels to arrhythmias. In: *Physiological reviews* 79 (3), S. 917–1017. DOI: 10.1152/physrev.1999.79.3.917.

Chandrasekar, B.; Smith, J. B.; Freeman, G. L. (2001): Ischemia-reperfusion of rat myocardium activates nuclear factor-KappaB and induces neutrophil infiltration via

lipopolysaccharide-induced CXC chemokine. In: *Circulation* 103 (18), S. 2296–2302. DOI: 10.1161/01.cir.103.18.2296.

Chang, Marvin G.; Tung, Leslie; Sekar, Rajesh B.; Chang, Connie Y.; Cysyk, Josh; Dong, Peihong et al. (2006): Proarrhythmic potential of mesenchymal stem cell transplantation revealed in an in vitro coculture model. In: *Circulation* 113 (15), S. 1832–1841. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.593038.

Clasen, Lukas; Eickholt, Christian; Angendohr, Stephan; Jungen, Christiane; Shin, Dong-In; Donner, Birgit et al. (2018): A modified approach for programmed electrical stimulation in mice: Inducibility of ventricular arrhythmias. In: *PLoS one* 13 (8), e0201910. DOI: 10.1371/journal.pone.0201910.

Dai, Zhehao; Aoki, Tatsuo; Fukumoto, Yoshihiro; Shimokawa, Hiroaki (2012): Coronary perivascular fibrosis is associated with impairment of coronary blood flow in patients with non-ischemic heart failure. In: *Journal of cardiology* 60 (5), S. 416–421. DOI: 10.1016/j.jcc.2012.06.009.

Davies, Lindsay C.; Heldring, Nina; Kadri, Nadir; Le Blanc, Katarina (2017): Mesenchymal Stromal Cell Secretion of Programmed Death-1 Ligands Regulates T Cell Mediated Immunosuppression. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 35 (3), S. 766–776. DOI: 10.1002/stem.2509.

Dewald, Oliver; Ren, Guofeng; Duerr, Georg D.; Zoerlein, Martin; Klemm, Christina; Gersch, Christine et al. (2004): Of mice and dogs: species-specific differences in the inflammatory response following myocardial infarction. In: *The American journal of pathology* 164 (2), S. 665–677. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63154-9.

Di Silvestre, Dario; Brambilla, Francesca; Scardoni, Giovanni; Brunetti, Pietro; Motta, Sara; Matteucci, Marco et al. (2017): Proteomics-based network analysis characterizes biological processes and pathways activated by preconditioned mesenchymal stem cells in cardiac repair mechanisms. In: *Biochimica et biophysica acta* 1861 (5 Pt A), S. 1190–1199. DOI: 10.1016/j.bbagen.2017.02.006.

Dobaczewski, Marcin; Xia, Ying; Bujak, Marcin; Gonzalez-Quesada, Carlos; Frangogiannis, Nikolaos G. (2010): CCR5 signaling suppresses inflammation and reduces adverse remodeling of the infarcted heart, mediating recruitment of regulatory T cells. In: *The American journal of pathology* 176 (5), S. 2177–2187. DOI: 10.2353/ajpath.2010.090759.

- Dominici, M.; Le Blanc, K.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, Fc; Krause, Ds et al. (2006): Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. In: *Cytotherapy* 8 (4), S. 315–317. DOI: 10.1080/14653240600855905.
- Fan, Haiying; Sun, Baogui; Gu, Qiuping; Lafond-Walker, Anne; Cao, Suyi; Becker, Lewis C. (2002): Oxygen radicals trigger activation of NF-kappaB and AP-1 and upregulation of ICAM-1 in reperfused canine heart. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 282 (5), H1778-86. DOI: 10.1152/ajpheart.00796.2000.
- Fan, Ming; Chen, Wei; Liu, Wei; Du, Guo-Qing; Jiang, Shu-Lin; Tian, Wei-Chen et al. (2010): The effect of age on the efficacy of human mesenchymal stem cell transplantation after a myocardial infarction. In: *Rejuvenation research* 13 (4), S. 429–438. DOI: 10.1089/rej.2009.0986.
- Francis Stuart, Samantha D.; Jesus, Nicole M. de; Lindsey, Merry L.; Ripplinger, Crystal M. (2016): The crossroads of inflammation, fibrosis, and arrhythmia following myocardial infarction. In: *Journal of molecular and cellular cardiology* 91, S. 114–122. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2015.12.024.
- François, Moïra; Romieu-Mourez, Raphaëlle; Li, Mengyang; Galipeau, Jacques (2012): Human MSC suppression correlates with cytokine induction of indoleamine 2,3-dioxygenase and bystander M2 macrophage differentiation. In: *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 20 (1), S. 187–195. DOI: 10.1038/mt.2011.189.
- Frangogiannis, Nikolaos G. (2007): Chemokines in ischemia and reperfusion. In: *Thrombosis and haemostasis* 97 (5), S. 738–747.
- Frangogiannis, Nikolaos G. (2012): Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. In: *Circulation research* 110 (1), S. 159–173. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.111.243162.
- Fuchs, Martin; Hilfiker, Andres; Kaminski, Karol; Hilfiker-Kleiner, Denise; Guener, Zeynep; Klein, Gunnar et al. (2003): Role of interleukin-6 for LV remodeling and survival after experimental myocardial infarction. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17 (14), S. 2118–2120. DOI: 10.1096/fj.03-0331fje.

- Ghannam, Soufiane; Bouffi, Carine; Djouad, Farida; Jorgensen, Christian; Noël, Danièle (2010a): Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. In: *Stem cell research & therapy* 1 (1), S. 2. DOI: 10.1186/scrt2.
- Ghannam, Soufiane; Pène, Jérôme; Moquet-Torcy, Gabriel; Torcy-Moquet, Gabriel; Jorgensen, Christian; Yssel, Hans (2010b): Mesenchymal stem cells inhibit human Th17 cell differentiation and function and induce a T regulatory cell phenotype. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 185 (1), S. 302–312. DOI: 10.4049/jimmunol.0902007.
- Gilles, Stefanie; Zahler, Stefan; Welsch, Ulrich; Sommerhoff, Christian P.; Becker, Bernhard F. (2003): Release of TNF-alpha during myocardial reperfusion depends on oxidative stress and is prevented by mast cell stabilizers. In: *Cardiovascular research* 60 (3), S. 608–616.
- Gnecchi, Massimiliano; He, Huamei; Noiseux, Nicolas; Liang, Olin D.; Zhang, Lunan; Morello, Fulvio et al. (2006): Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 20 (6), S. 661–669. DOI: 10.1096/fj.05-5211com.
- Gu, L.; Tseng, S. C.; Rollins, B. J. (1999): Monocyte chemoattractant protein-1. In: *Chemical immunology* 72, S. 7–29. DOI: 10.1159/000058723.
- Halkos, Michael E.; Zhao, Zhi-Qing; Kerendi, Faraz; Wang, Ning-Ping; Jiang, Rong; Schmarkey, L. Susan et al. (2008): Intravenous infusion of mesenchymal stem cells enhances regional perfusion and improves ventricular function in a porcine model of myocardial infarction. In: *Basic research in cardiology* 103 (6), S. 525–536. DOI: 10.1007/s00395-008-0741-0.
- Hamid, Tariq; Gu, Yan; Ortines, Roger V.; Bhattacharya, Chhandashri; Wang, Guangwu; Xuan, Yu-Ting; Prabhu, Sumanth D. (2009): Divergent tumor necrosis factor receptor-related remodeling responses in heart failure: role of nuclear factor-kappaB and inflammatory activation. In: *Circulation* 119 (10), S. 1386–1397. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.802918.
- Hare, Joshua M.; Fishman, Joel E.; Gerstenblith, Gary; DiFede Velazquez, Darcy L.; Zambrano, Juan P.; Suncion, Viky Y. et al. (2012): Comparison of allogeneic vs autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells delivered by

- transendocardial injection in patients with ischemic cardiomyopathy: the POSEIDON randomized trial. In: *JAMA* 308 (22), S. 2369–2379. DOI: 10.1001/jama.2012.25321.
- Hare, Joshua M.; Traverse, Jay H.; Henry, Timothy D.; Dib, Nabil; Strumpf, Robert K.; Schulman, Steven P. et al. (2009): A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction. In: *Journal of the American College of Cardiology* 54 (24), S. 2277–2286. DOI: 10.1016/j.jacc.2009.06.055.
- Hart, P. H.; Vitti, G. F.; Burgess, D. R.; Whitty, G. A.; Piccoli, D. S.; Hamilton, J. A. (1989): Potential antiinflammatory effects of interleukin 4: suppression of human monocyte tumor necrosis factor alpha, interleukin 1, and prostaglandin E2. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (10), S. 3803–3807. DOI: 10.1073/pnas.86.10.3803.
- Heineke, Joerg; Molkentin, Jeffery D. (2006): Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 7 (8), S. 589–600. DOI: 10.1038/nrm1983.
- Hilfiker-Kleiner, Denise; Shukla, Praphulla; Klein, Gunnar; Schaefer, Arnd; Stapel, Britta; Hoch, Melanie et al. (2010): Continuous glycoprotein-130-mediated signal transducer and activator of transcription-3 activation promotes inflammation, left ventricular rupture, and adverse outcome in subacute myocardial infarction. In: *Circulation* 122 (2), S. 145–155. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.933127.
- Hu, Xinyang; Yu, Shan Ping; Fraser, Jamie L.; Lu, Zhongyang; Ogle, Molly E.; Wang, Jian-An; Wei, Ling (2008): Transplantation of hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells improves infarcted heart function via enhanced survival of implanted cells and angiogenesis. In: *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 135 (4), S. 799–808. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2007.07.071.
- Hutcheson, K. A.; Atkins, B. Z.; Hueman, M. T.; Hopkins, M. B.; Glower, D. D.; Taylor, D. A. (2000): Comparison of benefits on myocardial performance of cellular cardiomyoplasty with skeletal myoblasts and fibroblasts. In: *Cell transplantation* 9 (3), S. 359–368.
- Ibanez, Borja; James, Stefan; Agewall, Stefan; Antunes, Manuel J.; Bucciarelli-Ducci, Chiara; Bueno, Héctor et al. (2018): 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force

- for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). In: *European heart journal* 39 (2), S. 119–177. DOI: 10.1093/eurheartj/ehx393.
- Ignatz, R. A.; Massagué, J. (1986): Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. In: *The Journal of biological chemistry* 261 (9), S. 4337–4345.
- Ito, B. R.; Engler, R. L.; del Balzo, U. (1993): Role of cardiac mast cells in complement C5a-induced myocardial ischemia. In: *The American journal of physiology* 264 (5 Pt 2), H1346-54. DOI: 10.1152/ajpheart.1993.264.5.H1346.
- Ivey, C. L.; Williams, F. M.; Collins, P. D.; Jose, P. J.; Williams, T. J. (1995): Neutrophil chemoattractants generated in two phases during reperfusion of ischemic myocardium in the rabbit. Evidence for a role for C5a and interleukin-8. In: *The Journal of clinical investigation* 95 (6), S. 2720–2728. DOI: 10.1172/JCI117974.
- Janssens, Stefan; Dubois, Christophe; Bogaert, Jan; Theunissen, Koen; Deroose, Christophe; Desmet, Walter et al. (2006): Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. In: *Lancet (London, England)* 367 (9505), S. 113–121. DOI: 10.1016/S0140-6736(05)67861-0.
- Jensen, J. A.; Kosek, J. C.; Hunt, T. K.; Goodson, W. H.; Miller, D. C. (1987): Cardiac cryolesions as an experimental model of myocardial wound healing. In: *Annals of surgery* 206 (6), S. 798–803. DOI: 10.1097/00000658-198712000-00019.
- Joung, Boyoung; Kim, Il-kwon; Lee, Moon-Hyoung; Yoo, Kyung-Jong; Kim, Sung-Soo (2007): Bone marrow mononuclear stem cells transplanted in rat infarct myocardium improved the electrical conduction without evidence of proarrhythmic effects. In: *Yonsei medical journal* 48 (5), S. 754–764. DOI: 10.3349/ymj.2007.48.5.754.
- Kanno, Shigeto; Saffitz, Jeffrey E. (2001): The role of myocardial gap junctions in electrical conduction and arrhythmogenesis. In: *Cardiovascular Pathology* 10 (4), S. 169–177. DOI: 10.1016/S1054-8807(01)00078-3.
- Kim, Su Hyun; Cho, Jang Hyun; Lee, Yoon Ho; Lee, Ji Hye; Kim, Soo Sung; Kim, Mi Yang et al. (2018): Improvement in Left Ventricular Function with Intracoronary Mesenchymal Stem Cell Therapy in a Patient with Anterior Wall ST-Segment Elevation

- Myocardial Infarction. In: *Cardiovascular Drugs and Therapy* 32 (4), S. 329–338. DOI: 10.1007/s10557-018-6804-z.
- Kocher, A. A.; Schuster, M. D.; Szabolcs, M. J.; Takuma, S.; Burkhoff, D.; Wang, J. et al. (2001): Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. In: *Nature medicine* 7 (4), S. 430–436. DOI: 10.1038/86498.
- Kolettis, Theofilos M. (2013): Coronary artery disease and ventricular tachyarrhythmia: pathophysiology and treatment. In: *Current opinion in pharmacology* 13 (2), S. 210–217. DOI: 10.1016/j.coph.2013.01.001.
- Kunze, D. L. (1985): Cardiac Na currents and the inactivating, reopening, and waiting properties of single cardiac Na channels. In: *The Journal of General Physiology* 86 (5), S. 691–719. DOI: 10.1085/jgp.86.5.691.
- Kuwahara, Fumitaka; Kai, Hisashi; Tokuda, Keisuke; Kai, Mamiko; Takeshita, Akira; Egashira, Kensuke; Imaizumi, Tsutomu (2002): Transforming growth factor-beta function blocking prevents myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in pressure-overloaded rats. In: *Circulation* 106 (1), S. 130–135. DOI: 10.1161/01.cir.0000020689.12472.e0.
- Lang, Tzu-Wang; Corday, Eliot; Gold, Herbert; Meerbaum, Samuel; Rubins, Steven; Costantini, Costantino et al. (1974): Consequences of reperfusion after coronary occlusion. In: *The American Journal of Cardiology* 33 (1), S. 69–81. DOI: 10.1016/0002-9149(74)90741-3.
- Lerman, R. H.; Apstein, C. S.; Kagan, H. M.; Osmers, E. L.; Chichester, C. O.; Vogel, W. M. et al. (1983): Myocardial healing and repair after experimental infarction in the rabbit. In: *Circulation research* 53 (3), S. 378–388. DOI: 10.1161/01.res.53.3.378.
- Lew, W. Y.; Chen, Z. Y.; Guth, B.; Covell, J. W. (1985): Mechanisms of augmented segment shortening in nonischemic areas during acute ischemia of the canine left ventricle. In: *Circulation research* 56 (3), S. 351–358. DOI: 10.1161/01.res.56.3.351.
- Li, Jin-Yi; Ke, Hong-Hong; He, Yan; Wen, Li-Na; Xu, Wei-Yan; Wu, Zhi-Fu et al. (2018): Transplantation of mesenchymal stem cells modulated Cx43 and Cx45 expression in rats with myocardial infarction. In: *Cytotechnology* 70 (1), S. 225–234. DOI: 10.1007/s10616-017-0136-x.

- Linden, J. (2001): Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue protection. In: *Annual review of pharmacology and toxicology* 41, S. 775–787. DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.41.1.775.
- Lu, Dong-feng; Yao, Yan; Su, Zi-zhuo; Zeng, Zhao-hua; Xing, Xiao-wen; He, Zhi-yu; Zhang, Chunxiang (2014): Downregulation of HDAC1 is involved in the cardiomyocyte differentiation from mesenchymal stem cells in a myocardial microenvironment. In: *PloS one* 9 (4), e93222. DOI: 10.1371/journal.pone.0093222.
- Mantovani, Alberto; Sozzani, Silvano; Locati, Massimo; Schioppa, Tiziana; Saccani, Alessandra; Allavena, Paola; Sica, Antonio (2004): Infiltration of tumours by macrophages and dendritic cells: tumour-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. In: *Novartis Foundation symposium* 256, 137-45; discussion 146-8, 259-69.
- Meager, Tony (1998): The molecular biology of cytokines. Chichester u.a.: Wiley (Molecular medical science series).
- Meisel, Roland; Zibert, Andree; Laryea, Maurice; Göbel, Ulrich; Däubener, Walter; Diloo, Dagmar (2004): Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. In: *Blood* 103 (12), S. 4619–4621. DOI: 10.1182/blood-2003-11-3909.
- Mezzaroma, Eleonora; Toldo, Stefano; Farkas, Daniela; Seropian, Ignacio M.; van Tassell, Benjamin W.; Salloum, Fadi N. et al. (2011): The inflammasome promotes adverse cardiac remodeling following acute myocardial infarction in the mouse. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (49), S. 19725–19730. DOI: 10.1073/pnas.1108586108.
- Michael, L. H.; Ballantyne, C. M.; Zachariah, J. P.; Gould, K. E.; Pocius, J. S.; Taffet, G. E. et al. (1999): Myocardial infarction and remodeling in mice: effect of reperfusion. In: *The American journal of physiology* 277 (2 Pt 2), H660-8. DOI: 10.1152/ajpheart.1999.277.2.H660.
- Michael, L. H.; Entman, M. L.; Hartley, C. J.; Youker, K. A.; Zhu, J.; Hall, S. R. et al. (1995): Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model. In: *The American journal of physiology* 269 (6 Pt 2), H2147-54. DOI: 10.1152/ajpheart.1995.269.6.H2147.

- Mirotsou, Maria; Zhang, Zhongyan; Deb, Arjun; Zhang, Lunan; Gnechi, Massimiliano; Noiseux, Nicolas et al. (2007): Secreted frizzled related protein 2 (Sfrp2) is the key Akt-mesenchymal stem cell-released paracrine factor mediating myocardial survival and repair. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (5), S. 1643–1648. DOI: 10.1073/pnas.0610024104.
- Mittal, Manish; Siddiqui, Mohammad Rizwan; Tran, Khiem; Reddy, Sekhar P.; Malik, Asrar B. (2014): Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. In: *Antioxidants & redox signaling* 20 (7), S. 1126–1167. DOI: 10.1089/ars.2012.5149.
- Monguió-Tortajada, Marta; Roura, Santiago; Gálvez-Montón, Carolina; Franquesa, Marcella; Bayes-Genis, Antoni; Borràs, Francesc E. (2017): Mesenchymal Stem Cells Induce Expression of CD73 in Human MonocytesIn Vitroand in a Swine Model of Myocardial InfarctionIn Vivo. In: *Frontiers in immunology* 8, S. 1577. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01577.
- Mulligan, M. S.; Varani, J.; Warren, J. S.; Till, G. O.; Smith, C. W.; Anderson, D. C. et al. (1992): Roles of beta 2 integrins of rat neutrophils in complement- and oxygen radical-mediated acute inflammatory injury. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 148 (6), S. 1847–1857.
- Nerbonne, Jeanne M. (2016): Molecular Basis of Functional Myocardial Potassium Channel Diversity. In: *Cardiac electrophysiology clinics* 8 (2), S. 257–273. DOI: 10.1016/j.ccep.2016.01.001.
- Nerbonne, Jeanne M.; GUO, WEINONG (2002): Heterogeneous Expression of Voltage-Gated Potassium Channels in the Heart: Roles in Normal Excitation and Arrhythmias. In: *J Cardiovasc Electrophysiol* 13 (4), S. 406–409. DOI: 10.1046/j.1540-8167.2002.00406.x.
- Nian, Min; Lee, Paul; Khaper, Neelam; Liu, Peter (2004): Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. In: *Circulation research* 94 (12), S. 1543–1553. DOI: 10.1161/01.RES.0000130526.20854.fa.
- Nossuli, T. O.; Lakshminarayanan, V.; Baumgarten, G.; Taffet, G. E.; Ballantyne, C. M.; Michael, L. H.; Entman, M. L. (2000): A chronic mouse model of myocardial ischemia-reperfusion: essential in cytokine studies. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 278 (4), H1049-55. DOI: 10.1152/ajpheart.2000.278.4.H1049.

- Oliver, Michael F. (2010): Control of free fatty acids during acute myocardial ischaemia. In: *Heart (British Cardiac Society)* 96 (23), S. 1883–1884. DOI: 10.1136/heart.2010.205534.
- Ophof, T.; Coronel, R.; Vermeulen, J. T.; Verberne, H. J.; van Capelle, F. J.; Janse, M. J. (1993): Dispersion of refractoriness in normal and ischaemic canine ventricle: effects of sympathetic stimulation. In: *Cardiovascular research* 27 (11), S. 1954–1960.
- Ortiz, Luis A.; Gambelli, Frederica; McBride, Christine; Gaupp, Dina; Baddoo, Melody; Kaminski, Naftali; Phinney, Donald G. (2003): Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (14), S. 8407–8411. DOI: 10.1073/pnas.1432929100.
- Ouryazdanpanah, Noushin; Dabiri, Shahriar; Derakhshani, Ali; Vahidi, Reza; Farsinejad, Alireza (2018): Peripheral Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells: Growth Factor-Free Isolation, Molecular Characterization and Differentiation. In: *Iranian journal of pathology* 13 (4), S. 461–466.
- Oyama, Jun-ichi; Blais, Charles; Liu, Xiaoli; Pu, Minying; Kobzik, Lester; Kelly, Ralph A.; Bourcier, Todd (2004): Reduced myocardial ischemia-reperfusion injury in toll-like receptor 4-deficient mice. In: *Circulation* 109 (6), S. 784–789. DOI: 10.1161/01.CIR.0000112575.66565.84.
- Papadatos, G. Alex; Wallerstein, Polly M. R.; Head, Catherine E. G.; Ratcliff, Rosemary; Brady, Peter A.; Benndorf, Klaus et al. (2002): Slowed conduction and ventricular tachycardia after targeted disruption of the cardiac sodium channel gene Scn5a. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (9), S. 6210–6215. DOI: 10.1073/pnas.082121299.
- Pittenger, M. F.; Mackay, A. M.; Beck, S. C.; Jaiswal, R. K.; Douglas, R.; Mosca, J. D. et al. (1999): Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. In: *Science (New York, N.Y.)* 284 (5411), S. 143–147. DOI: 10.1126/science.284.5411.143.
- Planat-Bénard, V.; Menard, C.; André, M.; Puceat, M.; Perez, A.; Garcia-Verdugo, J-M et al. (2004): Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. In: *Circulation research* 94 (2), S. 223–229. DOI: 10.1161/01.RES.0000109792.43271.47.

- Prabhu, Sumanth D.; Frangogiannis, Nikolaos G. (2016): The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis. In: *Circulation research* 119 (1), S. 91–112. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.303577.
- Rahbarghazi, Reza; Nassiri, Seyed Mahdi; Ahmadi, Seyed Hossein; Mohammadi, Elham; Rabbani, Shahram; Araghi, Atefeh; Hosseinkhani, Hossein (2014): Dynamic induction of pro-angiogenic milieu after transplantation of marrow-derived mesenchymal stem cells in experimental myocardial infarction. In: *International journal of cardiology* 173 (3), S. 453–466. DOI: 10.1016/j.ijcard.2014.03.008.
- Sadraddin, Haval; Gaebel, Ralf; Skorska, Anna; Lux, Cornelia Aquilina; Sasse, Sarah; Ahmad, Beschan et al. (2019): CD271+ Human Mesenchymal Stem Cells Show Antiarrhythmic Effects in a Novel Murine Infarction Model. In: *Cells* 8 (12). DOI: 10.3390/cells8121474.
- Saito, Takayuki; Kuang, Jin-Qiang; Bittira, Bindu; Al-Khaldi, Abdulaziz; Chiu, Ray C. J. (2002): Xenotransplant cardiac chimera: immune tolerance of adult stem cells. In: *The Annals of thoracic surgery* 74 (1), 19-24; discussion 24. DOI: 10.1016/s0003-4975(02)03591-9.
- Sanganalmath, Santosh K.; Bolli, Roberto (2013): Cell therapy for heart failure: a comprehensive overview of experimental and clinical studies, current challenges, and future directions. In: *Circulation research* 113 (6), S. 810–834. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.113.300219.
- Santos, Itamar Souza; Goulart, Alessandra Carvalho; Brandão, Rodrigo Martins; Santos, Rafael Caire de Oliveira; Bittencourt, Márcio Sommer; Sitnik, Débora et al. (2015): One-year Mortality after an Acute Coronary Event and its Clinical Predictors: The ERICO Study. In: *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 105 (1), S. 53–64. DOI: 10.5935/abc.20150044.
- Saxena, Amit; Chen, Wei; Su, Ya; Rai, Vikrant; Uche, Olisambu U.; Li, Na; Frangogiannis, Nikolaos G. (2013): IL-1 induces proinflammatory leukocyte infiltration and regulates fibroblast phenotype in the infarcted myocardium. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 191 (9), S. 4838–4848. DOI: 10.4049/jimmunol.1300725.
- Schiller, Meinhard; Javelaud, Delphine; Mauviel, Alain (2004): TGF-beta-induced SMAD signaling and gene regulation: consequences for extracellular matrix remodeling

- and wound healing. In: *Journal of dermatological science* 35 (2), S. 83–92. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2003.12.006.
- Schuleri, Karl H.; Feigenbaum, Gary S.; Centola, Marco; Weiss, Eric S.; Zimmet, Jeffrey M.; Turney, Jennifer et al. (2009): Autologous mesenchymal stem cells produce reverse remodelling in chronic ischaemic cardiomyopathy. In: *European heart journal* 30 (22), S. 2722–2732. DOI: 10.1093/eurheartj/ehp265.
- Shinde, Arti V.; Frangogiannis, Nikolaos G. (2014): Fibroblasts in myocardial infarction: a role in inflammation and repair. In: *Journal of molecular and cellular cardiology* 70, S. 74–82. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2013.11.015.
- Siwik, D. A.; Chang, D. L.; Colucci, W. S. (2000): Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha decrease collagen synthesis and increase matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts in vitro. In: *Circulation research* 86 (12), S. 1259–1265. DOI: 10.1161/01.RES.86.12.1259.
- Smits, Pieter C.; van Geuns, Robert-Jan M.; Poldermans, Don; Bountiokos, Manolis; Onderwater, Emile E. M.; Lee, Chi Hang et al. (2003): Catheter-based intramyocardial injection of autologous skeletal myoblasts as a primary treatment of ischemic heart failure: clinical experience with six-month follow-up. In: *Journal of the American College of Cardiology* 42 (12), S. 2063–2069.
- Soleimani, Masoud; Nadri, Samad (2009): A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow. In: *Nature protocols* 4 (1), S. 102–106. DOI: 10.1038/nprot.2008.221.
- Spaggiari, Grazia Maria; Capobianco, Andrea; Abdelrazik, Heba; Becchetti, Flavio; Mingari, Maria Cristina; Moretta, Lorenzo (2008): Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. In: *Blood* 111 (3), S. 1327–1333. DOI: 10.1182/blood-2007-02-074997.
- St. Sutton, M. G. J.; Sharpe, N. (2000): Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction. Pathophysiology and Therapy. In: *Circulation* 101 (25), S. 2981–2988. DOI: 10.1161/01.CIR.101.25.2981.
- Talman, Virpi; Ruskoaho, Heikki (2016): Cardiac fibrosis in myocardial infarction—from repair and remodeling to regeneration. In: *Cell and tissue research* 365 (3), S. 563–581. DOI: 10.1007/s00441-016-2431-9.

- Tano, Nobuko; Kaneko, Masahiro; Ichihara, Yuki; Ikebe, Chiho; Coppen, Steven R.; Shiraishi, Manabu et al. (2016): Allogeneic Mesenchymal Stromal Cells Transplanted Onto the Heart Surface Achieve Therapeutic Myocardial Repair Despite Immunologic Responses in Rats. In: *Journal of the American Heart Association* 5 (2). DOI: 10.1161/JAHA.115.002815.
- Thygesen, Kristian; Alpert, Joseph S.; Jaffe, Allan S.; Chaitman, Bernard R.; Bax, Jeroen J.; Morrow, David A. et al. (2019): Fourth universal definition of myocardial infarction (2018). In: *European heart journal* 40 (3), S. 237–269. DOI: 10.1093/eurheartj/ehy462.
- Timmers, Leo; Sluijter, Joost P. G.; van Keulen, J. Karlijn; Hoefer, Imo E.; Nederhoff, Marcel G. J.; Goumans, Marie-Jose et al. (2008): Toll-like receptor 4 mediates maladaptive left ventricular remodeling and impairs cardiac function after myocardial infarction. In: *Circulation research* 102 (2), S. 257–264. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.107.158220.
- van der Weg, Kirian; Majidi, Mohamed; Haeck, Joost D. E.; Tijssen, Jan G. P.; Green, Cynthia L.; Koch, Karel T. et al. (2016): Ventricular arrhythmia burst is an independent indicator of larger infarct size even in optimal reperfusion in STEMI. In: *Journal of electrocardiology* 49 (3), S. 345–352. DOI: 10.1016/j.jelectrocard.2016.03.013.
- Waal Malefyt, R. de; Abrams, J.; Bennett, B.; Fidler, C. G.; Vries, J. E. de (1991): Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. In: *The Journal of experimental medicine* 174 (5), S. 1209–1220. DOI: 10.1084/jem.174.5.1209.
- Waks, Jonathan W.; Buxton, Alfred E. (2018): Risk Stratification for Sudden Cardiac Death After Myocardial Infarction. In: *Annual review of medicine* 69, S. 147–164. DOI: 10.1146/annurev-med-041316-090046.
- Weber, Karl T.; Sun, Yao; Bhattacharya, Syamal K.; Ahokas, Robert A.; Gerling, Ivan C. (2013): Myofibroblast-mediated mechanisms of pathological remodelling of the heart. In: *Nature reviews. Cardiology* 10 (1), S. 15–26. DOI: 10.1038/nrcardio.2012.158.
- Wei, Feng; Wang, Tingzhong; Liu, Juanjuan; Du, Yuan; Ma, Aiqun (2011): The subpopulation of mesenchymal stem cells that differentiate toward cardiomyocytes is

cardiac progenitor cells. In: *Experimental cell research* 317 (18), S. 2661–2670. DOI: 10.1016/j.yexcr.2011.08.011.

Weiss, James N.; Qu, Zhilin; Shivkumar, Kalyanam (2017): Electrophysiology of Hypokalemia and Hyperkalemia. In: *Circulation. Arrhythmia and electrophysiology* 10 (3). DOI: 10.1161/CIRCEP.116.004667.

Yu, Jing; Liu, Xing-Long; Cheng, Qi-Guang; Lu, Shan-Shan; Xu, Xiao-Quan; Zu, Qing-Quan; Liu, Sheng (2016): G-CSF and hypoxic conditioning improve the proliferation, neural differentiation and migration of canine bone marrow mesenchymal stem cells. In: *Experimental and therapeutic medicine* 12 (3), S. 1822–1828. DOI: 10.3892/etm.2016.3535.

Zhong, Ze; Hu, Jiaqing; Sun, Yong; Jiang, Jun; Wu, Xindong; Xiang, Peng; Luo, Xiuying (2015): Impact of mesenchymal stem cells transplantation on myocardial myocardin-related transcription factor-A and bcl-2 expression in rats with experimental myocardial infarction. In: *Zhonghua xin xue guan bing za zhi* 43 (6), S. 531–536.

Zou, Ning; Ao, Lihua; Cleveland, Joseph C.; Yang, Xiaoping; Su, Xin; Cai, Guang-Yun et al. (2008): Critical role of extracellular heat shock cognate protein 70 in the myocardial inflammatory response and cardiac dysfunction after global ischemia-reperfusion. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 294 (6), H2805-13. DOI: 10.1152/ajpheart.00299.2008.

7 Curriculum Vitae

Beschan Ahmad
Theaterstraße 19, 37073 Göttingen
Mobil: +49 15774435583
Email: beschan.ahmad@med.uni-goettingen.de

PERSÖNLICHE DATEN

Geburtsdatum: 18.01.1992
Geburtsort: Sulaimaniyya, Irak
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

SCHULAUSBILDUNG

1999 -2000 Sonnenberg Grundschule, Chemnitz, Sachsen
2001 - 2004 Albert-Einstein-Grundschule, Chemnitz, Sachsen
2004 – 2005 Dr. Wilhelm-André-Gymnasium, Chemnitz, Sachsen
2005 - 2012 Tannenbusch Gymnasium Bonn, Nordrhein-Westfalen
06/2012 Abschluss Abitur (1,8)

STUDIUM

10/2012 Humanmedizin an der Universität Rostock
08/2014 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung (2,0)
11/2017 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (2,0)
11/2018 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (1,0)

KRANKENPFLEGEDIENST

08/2013 Universitätsklinik Rostock (Tropenmedizin)
09/2013 Universitätsklinik Rostock (Tropenmedizin) 02/2014
Universitätsklinik Rostock (Kardiologie)

FAMULATUREN

- 08/2015 Praxis für Allgemeinmedizin, Dr. med. Jürgen Dorn, Internist
- 02/2016 Klinik für Neurochirurgie, Universität Rostock
Aufgaben: Routinetätigkeiten im stationären Bereich,
Assistenz bei interventionellen und operativen Eingriffen
- 07/2016 Praxis für Neurologie, Dr. med. Merten Schulz, Neurologe
Aufgaben: Ambulante Versorgung neurologischer Patienten
- 09/2016 Klinik für Neurologie, Georg-August-Universität Göttingen
Aufgaben: Stationäre Versorgung auf der Stroke-Unit

PRAKTISCHES JAHR

- 11/2017 - 03/2018 Klinik für Neurochirurgie, Universität Rostock
- 03/2018 - 07/2018 Unfallchirurgie, Krankenhaus Bad Doberan
- 07/2018 – 10/2018 Intermediat Care der Nephrologie
Chest-Pain-Unit der Kardiologie
Georg-August-Universität Göttingen

ARBEITSVERHÄLTNISSE

- 02/2017-05/03/2018 Hilfswissenschaftler der Universität Rostock
Aufgaben: Dateneingabe, Datenmanagement und
Verlaufskontrolle
- Seit 02/2018 Assistenzarzt der Georg-August-Universität Göttingen
Klinik und Poliklinik für Neurologie
Robert-Kochstraße 40

DISSERTATION

- Seit 02/2014 Forschungslabor für kardiale Gewebe- und Organersatz der
Klinik für Herzchirurgie an der Universität Rostock Thema:
Die Auswirkungen von hypoxisch präkonditionierten murinen
mesenchymalen Stammzellen auf Arrhythmien nach einem
Herzinfarkt im Doppelinfarktmodell der Maus Aufgaben: -
Etablierung einer Kultur von mMSCs
-Implantation von Telemetern bei Mäusen
-Durchführung der Thorakotomie und Ligatur
-Entnahme der Organe und Anfertigung von Gewebeschnitten

-Auswertung der FACS-Daten, Herzfunktionsaufnahmen und
Organpräparaten

SONSTIGES

Sprachkenntnisse: Englisch, Kurdisch (Muttersprache)

Interessen: Quanten- und Astrophysik, Kunst, Sport Freizeittätigkeiten:
Joggen, Parcours, Malen

Göttingen, den 15.06.2020

8 Anhang

Nachfolgend sind die zwei verwendeten Protokolle angehängt. Zur Kultivierung der MSCs wurde eine modifizierte Form des MesenCult™ Expansion Kit (Mouse) der Firma StemCell durchgeführt worden. Die Differenzierung erfolgte durch das Mouse Mesenchymal Stem Cell Functional Identification Kit der Firma R&D Systems.

MesenCult™ Expansion Kit (Mouse)

For the culture of mouse MSCs and MEFs

Catalog #05513

1 Kit



Scientists Helping Scientists™ | www.STEMCELL.COM

TOLL FREE PHONE 1 800 667 0322 • PHONE +1 604 877 0713

INFO@STEMCELL.COM • TECHSUPPORT@STEMCELL.COM

FOR GLOBAL CONTACT DETAILS VISIT OUR WEBSITE

Product Description

MesenCult™ Expansion Kit (Mouse) is standardized for the culture of mouse mesenchymal stromal cells (MSCs; also known as mesenchymal stem cells) and mouse embryonic fibroblasts (MEFs). The kit includes MesenCult™ Basal Medium (Mouse), MesenCult™ 10X Supplement (Mouse), and MesenPure™. MesenCult™ Expansion Medium has been optimized for the derivation and expansion of mouse MSCs and MEFs in vitro as well as for the detection of colony-forming unit-fibroblasts (CFU-F). This kit was optimized using cells from the mouse strain C57BL/6.

To facilitate the enrichment of MSCs and MEFs during cell culture without serial passaging and frequent medium changes, simply add MesenPure™ to complete MesenCult™ Expansion Medium just prior to use. Although not required, the addition of MesenPure™ is strongly recommended, as the resulting MSC and MEF cultures are more homogeneous and exhibit more robust proliferation, differentiation, and colony formation when compared to complete MesenCult™ Expansion Medium alone.

NOTE: MesenCult™ Expansion Medium must be supplemented with L-Glutamine (Catalog #07100).

Product Information

The following components are sold as a complete kit (Catalog #05513) and are not available for individual sale.

COMPONENT NAME	COMPONENT #	SIZE	STORAGE	SHELF LIFE
MesenCult™ Basal Medium (Mouse)	05514	450 mL	Store at 2 - 8°C.	Stable for 12 months from date of manufacture (MFG) on label.
MesenCult™ 10X Supplement (Mouse)	05515	50 mL	Store at -20°C.	Stable for 24 months from date of manufacture (MFG) on label.
MesenPure™*	05500	0.5 mL	Store at -20°C.	Stable until expiry date (EXP) on label.

*Please refer to the Safety Data Sheet (SDS) for hazard information. This product contains components dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO). DMSO is a strong solvent and skin penetrant, and can transport many substances through the skin. DMSO can also penetrate some protective glove materials including latex and silicone. Extra caution should be used when handling this product.

None of the above components contain antibiotics.

Preparation of Complete MesenCult™ Expansion Medium (Mouse)

Use sterile techniques to prepare complete MesenCult™ Expansion Medium (MesenCult™ Basal Medium + MesenCult™ 10X Supplement + L-Glutamine). The following example is for preparing 500 mL of complete medium. If preparing other volumes, adjust accordingly.

1. Thaw 10X Supplement at room temperature (15 - 25°C) or at 2 - 8°C overnight. Mix thoroughly.

NOTE: Once thawed, use immediately or aliquot and store at -20°C. Do not exceed the shelf life of the supplement. After thawing the aliquots, use immediately. Do not re-freeze.

2. Add 50 mL of 10X Supplement to 450 mL of Basal Medium.

3. Add 5 mL of L-Glutamine (Catalog #07100) to achieve a final concentration of 2 mM. Mix thoroughly.

NOTE: If not used immediately, store complete MesenCult™ Expansion Medium at 2 - 8°C for up to 2 weeks. Do not exceed the shelf life of the individual components.

OPTIONAL: Add MesenPure™ for setting up the CFU-F assay or for expanding MSCs or MEFs (see next section).

MesenPure™ Addition (Recommended)

Although not required, the addition of MesenPure™ to complete MesenCult™ Expansion Medium is strongly recommended, as the resulting MSC and MEF cultures are more homogeneous and exhibit more robust proliferation, differentiation, and colony formation compared to cultures grown in the medium without MesenPure™. MesenPure™ facilitates the enrichment of MSCs and MEFs without serial passaging or frequent medium changes. MesenPure™ has been optimized using cells from the mouse strain C57BL/6. The efficacy of MesenPure™ on culture of cells from other mouse strains may vary.

1. Thaw MesenPure™ at room temperature (15 - 25°C). Mix thoroughly.
NOTE: Once thawed, use immediately or aliquot and store at -20°C until expiry date (EXP) on label. After thawing the aliquoted MesenPure™, use immediately. Do not re-freeze.
2. Dilute MesenPure™ 1 in 1000 in complete MesenCult™ Expansion Medium (e.g. add 1 µL of MesenPure™ per 1 mL of complete medium) and mix thoroughly.
NOTE: Always add MesenPure™ to complete MesenCult™ Expansion Medium immediately prior to use. Do not store complete MesenCult™ Expansion Medium containing MesenPure™.

Directions for Use

Please read the entire protocol before proceeding.

For optimal results, culture cells under hypoxic conditions (5% O₂ and 5 - 10% CO₂) at 37°C in a humidified cell culture incubator or use a Hypoxia Incubator Chamber (Catalog #27310). For instructions on how to use the Hypoxia Incubator Chamber refer to the Product Information Sheet (PIS; Document #29829) available at www.stemcell.com.

Use sterile techniques when performing the following protocols:

- A) Isolation of Mouse MSCs from Compact Bone (CB) and Bone Marrow (BM)
- B) CFU-F Assay
- C) Expansion of Mouse MSCs and MEFs

NOTE: For detailed instructions on how to isolate mouse MSCs from adipose tissue or MEFs contact us at techsupport@stemcell.com.

A) Isolation of Mouse MSCs from Compact Bone (CB) and Bone Marrow (BM)

NOTE: MesenPure™ is not required in the following isolation protocols.

1. Prepare complete MesenCult™ Expansion Medium and warm to 37°C.
2. Sacrifice mice using procedures approved by your institution. Remove the femurs and tibias from each mouse. Ensure that the bones are free of skin and muscle tissue. Keep bones on ice in phosphate-buffered saline (PBS) containing 2% fetal bovine serum (FBS) and 1 mM EDTA (e.g. EasySep™ Buffer; Catalog #20144). Antibiotics may be added to the buffer during isolation if desired.
3. Use bone-cutting scissors to cut both ends of bones to expose the interior of the marrow shaft. Place bones in a sterile 100 mm dish containing 2% FBS and 1 mM EDTA on ice.
4. Using a 6 mL syringe with a 23 gauge needle, draw up warm complete MesenCult™ Expansion Medium. Using sterile forceps, hold a bone over a 50 mL conical tube (e.g. Catalog #38010). Insert the needle into one end of the bone and gently push the syringe plunger to flush out the marrow with medium.
5. Repeat step 4 until all marrow has been flushed out of all bones (i.e. bones are white) and collect into the same 50 mL tube.
6. Resuspend the bone marrow by pipetting up and down until no clumps are observed.

To obtain CB-derived MSCs follow steps 7 - 15; to obtain BM-derived MSCs follow steps 16 - 17.

CB-derived MSCs:

7. Transfer the bones (from step 5) to a 100 mm dish containing 2 mL of Collagenase Type I (0.25%; Catalog #07902). Incubate at room temperature (15 - 25°C) for 3 - 4 minutes.
8. Use bone-cutting scissors to cut the bones into 1 - 2 mm fragments.
9. Transfer the bone suspension into a 50 mL conical tube. Add Collagenase Type I (0.25%) to reach a final volume of 2 mL per mouse, or a minimum of 10 mL.
10. Incubate the tightly capped tube at 37°C for 1 hour, on its side, while shaking at approximately 200 rpm.
11. Add PBS containing 2% FBS and 1 mM EDTA to the tube to achieve a final volume of 30 mL.
12. Filter the bone suspension through a 70 µm cell strainer (e.g. Catalog #27260) into a new 50 mL conical tube.
13. Wash the strainer with 10 mL of PBS containing 2% FBS and 1 mM EDTA and collect the wash into the same tube as in step 12.
14. Centrifuge the tube at 300 x g for 10 minutes.
15. Discard the supernatant and resuspend the cell pellet in complete MesenCult™ Expansion Medium.

BM-derived MSCs:

16. Centrifuge the 50 mL tube containing bone marrow (from step 6) at 300 x g for 10 minutes.
17. Discard the supernatant. Resuspend the cell pellet in complete MesenCult™ Expansion Medium.

Expected Number of Total Cells Recovered After Isolation From CB and BM

Following isolation, count nucleated cells using 3% Acetic Acid with Methylene Blue (Catalog #07060). Refer to the PIS (Document #29604) for directions for use. See Table 1 for expected cell numbers.

Table 1: Expected Number of Total Cells Recovered After Isolation

SOURCE	EXPECTED NUMBER OF TOTAL CELLS RECOVERED PER MOUSE (i.e. two femurs and two tibias)
Compact bone (CB)	7 - 12 x 10 ⁶
Bone marrow (BM)	5.5 - 6.5 x 10 ⁷

B) CFU-F Assay

NOTE: If using MesenPure™ to facilitate the enrichment of MSCs and MEFs, add MesenPure™ to complete MesenCult™ Expansion Medium just prior to use. Refer to the MesenPure™ Addition section for complete instructions.

The following protocol is for setting up a CFU-F assay in a 6-well plate. If using other cultureware, adjust cell numbers and volumes accordingly.

NOTE: Only use tissue culture-treated cultureware.

1. Plate cells in 2 mL of complete MesenCult™ Expansion Medium (with or without MesenPure™) per well. Plate cells at 3 different densities for each cell type used, in duplicate wells. Refer to Table 2 for recommended cell plating densities.

NOTE: During the initial MSC isolation, antibiotics may be added to complete medium if desired.

Table 2: Recommended Cell Plating Densities for Setting up the CFU-F Assay

CELL TYPE	RECOMMENDED PLATING DENSITY (cells/cm ²)	EXAMPLE OF NUMBER OF CELLS PER WELL OF A 6-WELL PLATE
CB-derived MSCs	0.5 - 2.5 x 10 ⁴	5 x 10 ⁴ 10 x 10 ⁴ 25 x 10 ⁴
BM-derived MSCs	0.25 - 1 x 10 ⁵	2.5 x 10 ⁵ 5 x 10 ⁵ 10 x 10 ⁵
Adipose-derived MSCs	0.5 - 2.5 x 10 ⁴	5 x 10 ⁴ 10 x 10 ⁴ 25 x 10 ⁴
MEFs	0.5 - 2.5 x 10 ⁴	5 x 10 ⁴ 10 x 10 ⁴ 25 x 10 ⁴

2. Incubate cells at 37°C under hypoxic conditions until colonies (> 20 cells/colony) appear. This takes approximately 7 days.
3. If more time is needed, perform a half-medium change (i.e. aspirate 1 mL of medium and add 1 mL of complete MesenCult™ Expansion Medium [with or without MesenPure™] per well).
4. Incubate cells at 37°C under hypoxic conditions for an additional 2 - 7 days until ideal colony size is achieved.
5. Fix, stain, and count the CFU-F colonies.

C) Expansion of Mouse MSCs and MEFs

NOTE: If using MesenPure™ to facilitate the enrichment of MSCs and MEFs, add MesenPure™ to complete MesenCult™ Expansion Medium just prior to use. Refer to the MesenPure™ Addition section for complete instructions.

The following protocol is for culturing cells in a single T-75 cm² flask. If using other cultureware, adjust cell numbers and volumes accordingly.

NOTE: Only use tissue culture-treated cultureware.

1. Plate freshly isolated MSCs or MEFs in 10 mL of complete MesenCult™ Expansion Medium (with or without MesenPure™) per flask. Refer to Table 3 for recommended cell plating densities of freshly isolated primary cells.

Table 3: Recommended Cell Plating Densities for Cell Expansion of Freshly Isolated Cells

CELL TYPE	RECOMMENDED PLATING DENSITY (freshly isolated cells/cm ²)	EXAMPLE OF NUMBER OF CELLS PER T-75 cm ² FLASK
CB-derived MSCs	3 - 6 x 10 ⁴	2.5 - 5 x 10 ⁶
BM-derived MSCs	3 - 6 x 10 ⁵	25 - 50 x 10 ⁶
Adipose-derived MSCs	3 - 6 x 10 ⁴	2.5 - 5 x 10 ⁶
MEFs	3 - 6 x 10 ³	2.5 - 5 x 10 ⁵

2. Incubate cells at 37°C under hypoxic conditions for 7 days.

NOTE: When plating freshly isolated cells, do not culture for more than 10 days and do not exceed 80% confluency.

- If cells have reached 80% confluency, continue to step 3 to passage cells.

OR

- If cells are < 80% confluent:

- i. Perform a half-medium change (i.e. aspirate 5 mL of medium and add 5 mL of complete MesenCult™ Expansion Medium [with or without MesenPure™] per flask).
- ii. Incubate cells at 37°C under hypoxic conditions until cells have reached approximately 80% confluency. This takes approximately an additional 2 - 3 days (i.e. 9 - 10 days in total). Continue to step 3 to passage cells.

3. Passage cells as follows:

- i. Wash cells once with 5 mL of D-PBS (Without Ca++ and Mg++; Catalog #37350).
- ii. Add 5 mL of Trypsin-EDTA (0.25%; Catalog #07901) and incubate at 37°C for 5 minutes. Tap the flask to detach cells. If less than 90% of cells have detached, incubate at 37°C for an additional 2 minutes and tap the flask again.
- iii. Add 5 mL of complete MesenCult™ Expansion Medium and collect cells in a 15 mL conical tube.
- iv. Centrifuge at 300 x g for 10 minutes.
- v. Discard the supernatant and resuspend the cell pellet in complete MesenCult™ Expansion Medium.
- vi. Count and plate cells (with or without MesenPure™) according to Table 4.

Table 4: Recommended Cell Plating Densities for Expansion of Passaged or Frozen Cells

CELL TYPE	RECOMMENDED PLATING DENSITY (cells/cm ²)	EXAMPLE OF NUMBER OF CELLS PER T-75 cm ² FLASK
CB-derived MSCs	4 - 6.7 X 10 ³	3 - 5 x 10 ⁵
BM-derived MSCs*	4 - 6.7 x 10 ³	3 - 5 x 10 ⁵
Adipose-derived MSCs	3.3 - 4.6 x 10 ³	2.5 - 3.5 x 10 ⁵
MEFs	3.3 - 4.6 x 10 ³	2.5 - 3.5 x 10 ⁵

*If MesenPure™ is not used in complete medium, seed 1.5 - 2 times more cells for BM-derived MSCs.

Related Products

For a complete list of related products available from STEMCELL Technologies, including differentiation media, visit www.stemcell.com or contact us at techsupport@stemcell.com.

STEMCELL TECHNOLOGIES INC.'S QUALITY MANAGEMENT SYSTEM IS CERTIFIED TO ISO 13485. PRODUCTS ARE FOR RESEARCH USE ONLY AND NOT INTENDED FOR HUMAN OR ANIMAL DIAGNOSTIC OR THERAPEUTIC USES UNLESS OTHERWISE STATED.

Copyright © 2019 by STEMCELL Technologies Inc. All rights reserved including graphics and images. STEMCELL Technologies & Design, STEMCELL Shield Design, Scientists Helping Scientists, EasySep, MesenCult, and MesenPure are trademarks of STEMCELL Technologies Canada Inc. All other trademarks are the property of their respective holders. While STEMCELL has made all reasonable efforts to ensure that the information provided by STEMCELL and its suppliers is correct, it makes no warranties or representations as to the accuracy or completeness of such information.

Mouse Mesenchymal Stem Cell Functional Identification Kit

Catalog Number SC010

Reagents for the identification of mouse bone marrow-derived stem cells (BMSC)/mesenchymal stem cells (MSC) by *in vitro* functional differentiation.

This package insert must be read in its entirety before using this product.
For laboratory research use only. Not for diagnostic use.
The safety and efficacy of this product in diagnostic or
other clinical uses has not been established.

TABLE OF CONTENTS

SECTION	PAGE
PRINCIPLE OF THE ASSAY	1
LIMITATIONS OF THE PROCEDURE	1
PRECAUTIONS.....	1
MATERIALS PROVIDED & STORAGE CONDITIONS	2
OTHER SUPPLIES REQUIRED	3
REAGENT & MATERIAL PREPARATION	4
PREPARATION OF LYOPHILIZED ANTIBODIES.....	4
PROCEDURE OUTLINE	5
ADIPOGENIC DIFFERENTIATION PROTOCOL	6
OSTEOGENIC DIFFERENTIATION PROTOCOL.....	8
CHONDROGENIC DIFFERENTIATION PROTOCOL.....	10
DATA EXAMPLES	12
REFERENCES	13

Manufactured and Distributed by:

USA R&D Systems, Inc.

614 McKinley Place NE, Minneapolis, MN 55413

TEL: 800 343 7475 612 379 2956

FAX: 612 656 4400

E-MAIL: info@bio-techne.com

Distributed by:

Europe | Middle East | Africa Bio-Techne Ltd.

19 Barton Lane, Abingdon Science Park

Abingdon OX14 3NB, UK

TEL: +44 (0)1235 529449

FAX: +44 (0)1235 533420

E-MAIL: info.emea@bio-techne.com

China Bio-Techne China Co., Ltd.

Unit 1901, Tower 3, Raffles City Changning Office,

1193 Changning Road, Shanghai PRC 200051

TEL: +86 (21) 52380373 (400) 821-3475

FAX: +86 (21) 52371001

E-MAIL: info.cn@bio-techne.com

PRINCIPLE OF THE ASSAY

Stem cells are functionally defined by their capacity to self renew and their ability to generate a large number of differentiated progenitor cells, which commit to further maturation along specific lineages. Multiple stem cell populations have been discovered from various adult tissues, including bone marrow-derived stem cells (BMSCs) and mesenchymal stem cells (MSCs). BMSCs/MSCs are capable of differentiating into multiple cell types including adipocytes, chondrocytes, osteocytes, hepatocytes, cardiomyocytes, and neurons (1-6). With the availability of cell selection technologies and recombinant growth factors, many labs undertake isolation and expansion of stem cells *in vitro* (7-10). During the isolation and expansion of BMSCs/MSCs, the status of stem cells is best evaluated by measuring their ability to differentiate into multiple mesenchymal lineages.

The Mouse Mesenchymal Stem Cell Functional Identification Kit is designed for the identification of mouse BMSCs/MSCs based on their ability to differentiate into multiple mesenchymal lineages. This kit contains specially formulated Adipogenesis, Chondrogenesis, and Osteogenesis Media Supplements, which can be used to effectively differentiate BMSCs/MSCs into adipogenic, chondrogenic, or osteogenic lineages. A panel of antibodies, consisting of anti-mFABP4, anti-mCollagen II, and anti-mOsteopontin, are included to define the mature phenotypes of adipocytes, chondrocytes, and osteocytes, respectively.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

- FOR LABORATORY RESEARCH USE ONLY. NOT FOR DIAGNOSTIC USE.
- The safety and efficacy of this product in diagnostic or other clinical uses has not been established.
- The kit should not be used beyond the expiration date on the kit label.
- The quality of the mesenchymal stem cells and any variation in the procedure can cause variation in the efficiency of cell differentiation.
- The supplements may contain a precipitate. Mix well before use.

PRECAUTIONS

The Adipogenic Supplement contains 95% ethanol and is highly flammable. Keep the container tightly closed, and keep it away from sources of ignition.

The acute and chronic effects of over-exposure to the reagents in this kit are unknown. Safe laboratory handling procedures should be followed and protective clothing should be worn when handling kit reagents.

The ITS Supplement contains human transferrin. The transferrin was tested at the donor level using an FDA licensed method and found to be non-reactive for anti-HIV-1/2, anti-HCV, and Hepatitis B surface antigen. As no testing can offer complete assurance of freedom from infectious agents, this reagent should be handled as if capable of transmitting infection.

MATERIALS PROVIDED & STORAGE CONDITIONS

Store unopened kit at $\leq -20^{\circ}\text{C}$ in a manual defrost freezer. Do not use past kit expiration date.

PART	PART #	DESCRIPTION	STORAGE OF OPENED/ RECONSTITUTED REAGENTS
Adipogenic Supplement	390415	0.5 mL of a 100X concentrated solution containing hydrocortisone, isobutylmethylxanthine, and indomethacin in 95% ethanol; enough to supplement 50 mL of medium.	Store tightly sealed at $2\text{-}8^{\circ}\text{C}$ for up to 6 months.*
Mouse/Rat Osteogenic Supplement	390441	2.5 mL of a 20X concentrated solution containing ascorbate-phosphate, β -glycerolphosphate, and recombinant human BMP-2; enough to supplement 50 mL of medium.	
Chondrogenic Supplement	390417	0.5 mL of a 100X concentrated solution containing dexamethasone, ascorbate-phosphate, proline, pyruvate, and recombinant human TGF- β 3; enough to supplement 50 mL of medium.	Aliquot and store at $\leq -20^{\circ}\text{C}$ in a manual defrost freezer for up to 6 months.* Avoid repeated freeze-thaw cycles.
ITS Supplement	390418	0.5 mL of a 100X concentrated solution containing insulin, transferrin, selenious acid, bovine serum albumin, and linoleic acid; enough to supplement 50 mL of medium.	
anti-mFABP4	967799	50 μg of lyophilized goat anti-mouse FABP4 polyclonal antibody; enough to make 5 mL of staining solution when used at the suggested concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.	
anti-mCollagen II	967803	50 μg of lyophilized sheep anti-mouse Collagen II polyclonal antibody; enough to make 5 mL of staining solution when used at the suggested concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.	Store at $2\text{-}8^{\circ}\text{C}$ for up to 1 month or aliquot and store at $\leq -20^{\circ}\text{C}$ in a manual defrost freezer for up to 6 months.* Avoid repeated freeze-thaw cycles.
anti-mOsteopontin	967802	50 μg of lyophilized goat anti-mouse Osteopontin polyclonal antibody; enough to make 5 mL of staining solution when used at the suggested concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.	

*Provided this is within the expiration date of the kit.

OTHER SUPPLIES REQUIRED

Materials

- Mouse mesenchymal stem cells
- 24-well culture plates
- 12 mm coverslips
- 15 mL centrifuge tubes
- Pipettes and pipette tips
- Serological pipettes
- Fine pointed curved forceps
- Glass slides
- Slide box
- Liquid barrier pen

Reagents

- α Minimum Essential Medium (α MEM)
- D-MEM/F-12 (1X)
- Fetal Bovine Serum
- Phosphate-Buffered Saline (PBS)
- Penicillin-Streptomycin-Glutamine (100X)
- Zinc Formalin
- 4% Paraformaldehyde in PBS
- 95% Ethanol
- 1% BSA in PBS
- Triton™ X-100
- Normal Donkey Serum
- Fibronectin [optional; R&D Systems®, Catalog # 1030-FN (bovine) or 1918-FN (human)]
- Mounting medium (R&D Systems®, Catalog # CTS011)
- Secondary developing reagents (R&D Systems®, Catalog # NL001 and NL010)
- Universal Antigen Retrieval Reagent (R&D Systems®, Catalog # CTS015)
- Deionized or distilled water

Equipment

- 37 °C and 5% CO₂ incubator
- Centrifuge
- Hemocytometer
- Inverted microscope
- 37 °C water bath
- Fluorescence microscope
- Cryostat

REAGENT & MATERIAL PREPARATION

αMEM Basal Media - For use with Adipogenic Supplement and Osteogenic Supplement.

Mix the following sterile ingredients to make 101 mL of media. Store at 2-8 °C for up to 1 month. Alternatively, basal medium that has been prequalified for Adipogenic and Osteogenic differentiation may be used (R&D Systems®, Catalog # CCM007).

ITEM	AMOUNT	FINAL CONCENTRATION
α MEM	90 mL	90%
Fetal Bovine Serum	10 mL	10%
100X Penicillin-Streptomycin-Glutamine	1 mL	100 U/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin, 2 mM L-Glutamine

D-MEM/F-12 Basal Media - For use with Chondrogenic Supplement. Mix the following sterile ingredients to make 50 mL of media. Store **in the dark** at 2-8 °C for up to 1 month.

ITEM	AMOUNT	FINAL CONCENTRATION
D-MEM/F-12	49 mL	99%
ITS Supplement	500 µL	1%
100X Penicillin-Streptomycin-Glutamine	500 µL	100 U/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin, 2 mM L-Glutamine

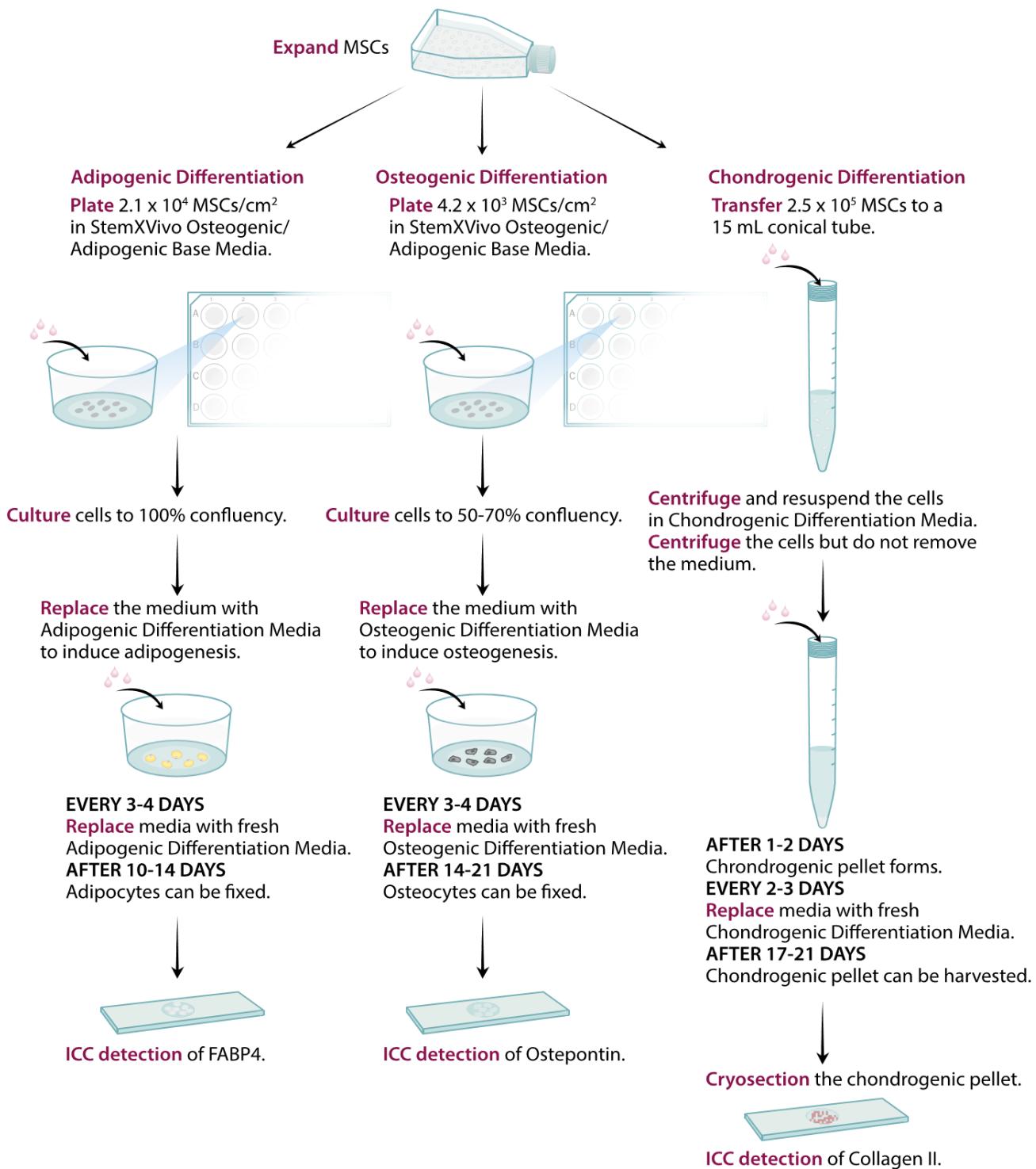
PREPARATION OF LYOPHILIZED ANTIBODIES

Anti-mFABP4 - Reconstitute with 500 µL of sterile PBS. Mix gently. Results in a 100 µg/mL stock solution.

Anti-mCollagen II - Reconstitute with 500 µL of sterile PBS. Mix gently. Results in a 100 µg/mL stock solution.

Anti-mOsteopontin - Reconstitute with 500 µL of sterile PBS. Mix gently. Results in a 100 µg/mL stock solution.

PROCEDURE OUTLINE



ADIPOGENIC DIFFERENTIATION PROTOCOL

Fresh supplemented media should be made for each usage or media change. The recommended amount of medium for a 24-well plate is 0.5 mL/well. Make 5.0 mL of media for 10 wells.

PREPARATION OF ADIPOGENIC DIFFERENTIATION MEDIA

1. If a precipitate forms, warm the Adipogenic Supplement vial in a 37 °C water bath for 5 minutes. Vortex until the precipitate dissolves.
2. Add 50 µL of the Adipogenic Supplement to 5.0 mL of a MEM Basal Media. Mix gently.

PREPARATION OF CULTURE PLATES FOR ADIPOGENIC DIFFERENTIATION

1. Insert a sterile coverslip (sterilized with 95% Ethanol and flamed) into each well of a 24-well plate.
2. Add 0.5 mL of sterile PBS to each well. Gently sink the floating coverslips with a sterile pipette tip.
3. Store in a 37 °C incubator until needed.
4. Remove the PBS from the wells before beginning the Adipogenesis Culture Protocol.

ADIPOGENESIS CULTURE PROTOCOL

Note: 50 mL of Adipogenic Differentiation Media is sufficient to culture and differentiate 12 wells for 14 days with 6 media changes. The culturing of 10 wells will provide enough coverslips for 2 monitor stainings and 1 final staining of cells; 1 coverslip for oil red staining and 2 coverslips for immunostaining.

1. Seed cells at a density of 2.1×10^4 cells/cm². Each well is approximately 1.76 cm² requiring 3.7×10^4 cells/well.
2. Prepare 3.7×10^5 cells in 5.0 mL of a MEM Basal Media.
3. Dispense 0.5 mL of the cell suspension into each of the 10 wells. Incubate overnight in a 37 °C and 5% CO₂ incubator. **Note:** Cells should be 100% confluent after overnight incubation. If they are not confluent, replace the medium every 2-3 days with a MEM Basal Media until 100% confluency is reached.
4. When the cells are 100% confluent, replace the media in each well with 0.5 mL of Adipogenic Differentiation Media to induce adipogenesis.
5. Replace with fresh Adipogenic Differentiation Media (0.5 mL/well) every 3-4 days. After 10 days, lipid vacuoles will start to appear in the induced cells. **Note:** The adipogenic cells are fragile; media replacement should be performed gently so as not to disturb the lipid vacuoles. The appearance of vacuoles can be monitored by microscopic examination. Coverslips may be removed for oil red staining (refer to the Procedure Outline on page 5). For a staining protocol, please see reference 8.
6. After 10-14 days, adipocytes can be fixed and saved for immunostaining (refer to the Fixing and Staining Protocol on page 7).

FIXING & STAINING PROTOCOL-IMMUNOCYTOCHEMISTRY OF ADIPOCYTES

1. Wash the cells twice with 1.0 mL of PBS.
2. Fix the cells with 0.5 mL of 4% paraformaldehyde in PBS for 20 minutes at room temperature.
3. Wash the cells three times with 0.5 mL of 1% BSA in PBS for 5 minutes.
4. Permeabilize and block the cells with 0.5 mL of 0.3% Triton X-100, 1% BSA, and 10% normal donkey serum in PBS at room temperature for 45 minutes.
5. During the blocking, dilute the reconstituted anti-mFABP4 antibody in PBS containing 0.3% Triton X-100, 1% BSA, and 10% normal donkey serum to a final concentration of 10 µg/mL. **Note:** A negative control should be run using PBS containing 0.3% Triton X-100, 1% BSA, and 10% normal donkey serum with no primary antibody.
6. After blocking, incubate the cells with 300 µL/well of anti-mFABP4 antibody working solution for 3 hours at room temperature or overnight at 2-8 °C.
7. Wash the cells three times with 0.5 mL of 1% BSA in PBS for 5 minutes.
8. Dilute the secondary antibody (e.g., NL557-conjugated donkey anti-goat secondary antibody, Catalog # NL001) 1:200 in 1% BSA in PBS.
9. Incubate the cells with secondary antibody working solutions at 300 µL/well **in the dark** for 60 minutes at room temperature.
10. Wash the cells three times with 0.5 mL of 1% BSA in PBS for 5 minutes.
11. Cover the cells with 1.0 mL of PBS, and visualize with a fluorescence microscope.
12. Alternatively, aspirate the PBS from the wells and add 0.5 mL of distilled water. Carefully remove the coverslips with forceps and mount cell side down onto a drop of mounting medium on a glass slide.
13. The slides are ready for microscopic observation (refer to the images in the Procedure Outline on page 5).

OSTEOGENIC DIFFERENTIATION PROTOCOL

Fresh supplemented media should be made for each usage or media change. The recommended amount of media for a 24-well plate is 0.5 mL/well. Make 5.0 mL of media for 10 wells.

PREPARATION OF OSTEOGENIC DIFFERENTIATION MEDIA

1. Warm the Mouse/Rat Osteogenic Supplement vial in a 37 °C water bath for 5 minutes.
2. Add 250 µL of the Mouse/Rat Osteogenic Supplement to 5.0 mL of a MEM Basal Media. Mix gently.
3. Divide the unused supplement into 250 µL aliquots.

PREPARATION OF CULTURE PLATES FOR OSTEOGENIC DIFFERENTIATION

1. Insert a sterile coverslip (sterilized with 95% Ethanol and flamed) into each well of a 24-well plate.
2. Add 0.5 mL of sterile PBS to each well. Gently sink the floating coverslips with a sterile pipette tip.
3. Store in a 37 °C incubator until needed.
4. Remove the PBS from the wells before beginning the Osteogenesis Culture Protocol.

OSTEOGENESIS CULTURE PROTOCOL

Note: 50 mL of Osteogenic Differentiation Media will provide adequate medium to culture and differentiate 16 wells for 21 days with 6 media changes. The culturing of 10 wells will provide enough coverslips for weekly monitoring of cells. Additional coverslips can be used for Alizarin red staining if desired.

Cell detachment can occur during osteogenic differentiation. Coating the coverslips with fibronectin can be used to delay cell detachment. Add 0.5 mL of a fibronectin solution at a concentration of 1.0 µg/mL to each well. Incubate at 37 °C for 3-30 hours. Refer to R&D Systems®, Catalog # 1918-FN for Human Fibronectin.

1. Seed cells at a density of 4.2×10^3 cells/cm². Each well is approximately 1.76 cm² requiring 7.4×10^3 cells/well.
2. Prepare 7.4×10^4 cells in 5.0 mL of a MEM Basal Media.
3. Dispense 0.5 mL of the cell suspension into each of the 10 wells. Incubate overnight in a 37 °C and 5% CO₂ incubator. **Note:** The cells should be about 50-70% confluent in 1-2 days.
4. At 50-70% confluence, replace the media in each well with 0.5 mL of Osteogenic Differentiation Media to induce osteogenesis.
5. Replace with 0.5 mL of fresh Osteogenic Differentiation Media (0.5 mL/well) every 3-4 days.
6. After 14-21 days (or when cells start to detach), osteocytes can be fixed and saved for immunostaining (refer to the Fixing and Staining Protocol on page 9). Cells may also be ethanol fixed and stained with Alizarin Red. For a staining protocol, see reference 8.

FIXING & STAINING PROTOCOL-IMMUNOCYTOCHEMISTRY OF OSTEOCYTES

1. Wash the cells twice with 1.0 mL of PBS.
2. Fix the cells with 0.5 mL of 4% paraformaldehyde in PBS for 20 minutes at room temperature.
3. Wash the cells three times with 0.5 mL of 1% BSA in PBS for 5 minutes.
4. Permeabilize and block the cells with 0.5 mL of 0.3% Triton X-100, 1% BSA, and 10% normal donkey serum in PBS at room temperature for 45 minutes.
5. During the blocking, dilute the reconstituted anti-mOsteopontin antibody in PBS containing 0.3% Triton X-100, 1% BSA, and 10% normal donkey serum to a final concentration of 10 µg/mL.
Note: *A negative control should be run using PBS containing 0.3% Triton X-100, 1% BSA, and 10% normal donkey serum with no primary antibody.*
6. After blocking, incubate the cells with 300 µL/well of anti-mOsteopontin antibody working solution for 3 hours at room temperature or overnight at 2-8 °C.
7. Wash the cells three times with 0.5 mL of 1% BSA in PBS for 5 minutes.
8. Dilute the secondary antibody (e.g., NL557-conjugated donkey anti-goat secondary antibody, Catalog # NL001) 1:200 in 1% BSA in PBS.
9. Incubate the cells with secondary antibody working solution at 300 µL/well **in the dark** for 60 minutes at room temperature.
10. Wash the cells three times with 0.5 mL of 1% BSA in PBS for 5 minutes.
11. Cover the cells with 1.0 mL of PBS, and visualize with a fluorescence microscope.
12. Alternatively, aspirate the PBS from the wells and add 0.5 mL of distilled water. Carefully remove the coverslips with forceps and mount cell side down onto a drop of mounting medium on a glass slide.
13. The slides are ready for microscopic observation (refer to the images in the Procedure Outline on page 5).

CHONDROGENIC DIFFERENTIATION PROTOCOL

This kit contains adequate media to culture 10 pellets for 3 weeks with media changes 3 times per week. Fresh supplemented media should be made for each use or medium change. Make 2.5 mL of media for 5 tubes. Culture the cells in 15 mL conical tubes (each 15 mL conical tube requires 0.5 mL of media).

PREPARATION OF CHONDROGENIC DIFFERENTIATION MEDIA

1. Warm the Chondrogenic Supplement vial in a 37 °C water bath for 5 minutes.
2. Add 25 µL of the Chondrogenic Supplement to 2.5 mL of D-MEM/F-12 Basal Media. Mix gently.
3. Divide the unused supplement into 25 µL aliquots.

CHONDROGENESIS CULTURE PROTOCOL

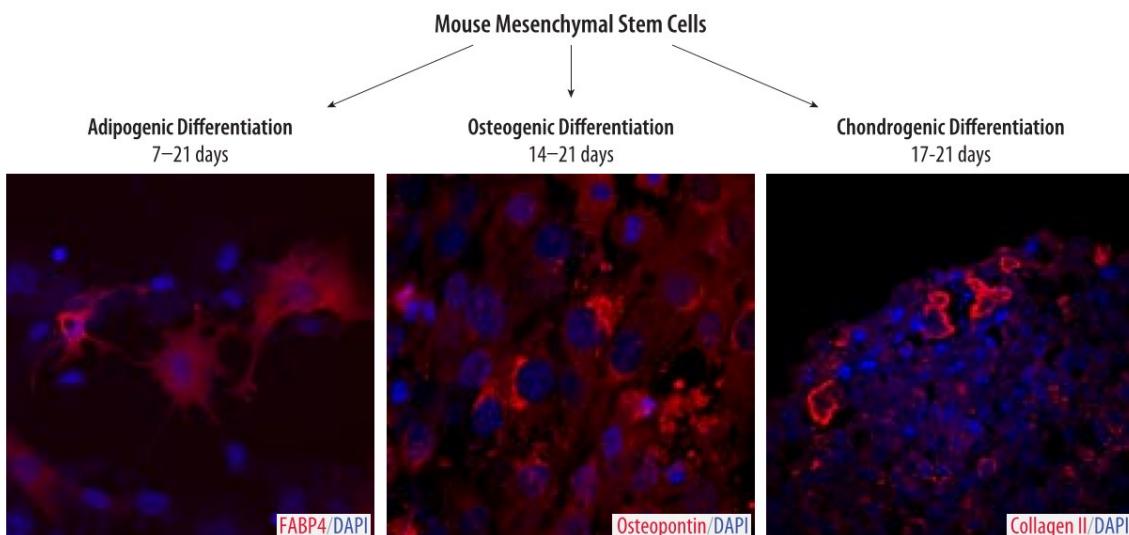
1. Transfer 250,000 cells in their existing culture media to a 15 mL conical tube.
2. Centrifuge the cells at 200 x g for 5 minutes at room temperature. Remove the media and resuspend the cells with 1.0 mL of D-MEM/F-12 Basal Media.
3. Centrifuge the cells at 200 x g for 5 minutes. Aspirate and discard the media.
4. Resuspend the cells in 0.5 mL of Chondrogenic Differentiation Media, and centrifuge the cells at 200 x g for 5 minutes at room temperature. Do not remove the media.
5. Loosen the cap(s) of the tubes to allow gas exchange, and incubate upright at 37 °C and 5% CO₂.
6. Replace the media with 0.5 mL of fresh Chondrogenic Differentiation Media every 2-3 days. The pellet should not be attached to the tube. **Note:** Use caution when replacing the media to avoid aspirating the pellet.
7. After 17-21 days, the chondrocyte pellet can be fixed and prepared for frozen sectioning (refer to the Fixing and Staining Protocol on page 11).

FIXING & STAINING PROTOCOL-IMMUNOCYTOCHEMISTRY OF CHONDROCYTES

Note: Staining is done on glass slides. To contain the solutions, use a liquid barrier pen to circle the tissue sections. Amounts of solutions needed to cover the tissue will vary depending on the size of the circle drawn. The amounts listed in the following procedure will be more than adequate.

1. Wash the pellet twice with 1.0 mL of PBS.
2. Fix the pellet with 0.5 mL of Zinc formalin solution overnight at 2-8 °C.
3. After the overnight incubation, wash the pellet twice with 1.0 mL of PBS for 5 minutes.
4. Freeze and section the pellet using standard cryosectioning methods. Cut the sections at a nominal thickness of 5-10 µm.
5. Perform antigen retrieval using the Universal Antigen Retrieval Reagent from (R&D Systems®, Catalog # CTS015) according to the instructions in the product insert.
6. Permeabilize and block the mounted pellet sections with 0.15 mL of 0.3% Triton X-100, 1% BSA, and 10% normal donkey serum in PBS at room temperature for 45 minutes.
7. During blocking, dilute the reconstituted anti-mCollagen II antibody in PBS containing 0.3% Triton® X-100, 1% BSA, and 10% normal donkey serum at 1:10 to a final concentration of 10 µg/mL. **Note:** A negative control should be run using PBS containing 0.3% Triton X-100, 1% BSA, and 10% normal donkey serum with no primary antibody.
8. After blocking, incubate sections with anti-mCollagen II antibody working solution overnight at 2-8 °C. Keep in a covered container with adequate moisture.
9. Wash the slides three times with PBS containing 0.1% BSA for 5 minutes.
10. Dilute the secondary antibody (e.g., NL557-conjugated donkey anti-sheep secondary antibody, Catalog # NL010) 1:200 in PBS containing 1% BSA.
11. Incubate the sections with secondary antibody working solution at 300 µL per section **in the dark** for 60 minutes at room temperature.
12. Wash the slides three times with PBS containing 1% BSA for 5 minutes.
13. Wash the slides once with distilled water, and remove excess water.
14. Place a drop of mounting medium on the section, and cover with a glass coverslip.
15. The slides are ready for microscopic observation (refer to the images in the Procedure Outline on page 5).

DATA EXAMPLES



Verification of Multipotency using the Mouse Mesenchymal Stem Cell Functional Identification Kit.

Identification Kit. Mouse mesenchymal stem cells were cultured in StemXVivo™ Mesenchymal Stem Cell Expansion Media (R&D Systems®, Catalog # CCM004) and differentiation was induced as indicated using the media supplements included in this kit. The cells were stained using the NorthernLights™ 557-conjugated Donkey Anti-Goat (R&D Systems®, Catalog # NL001; red) or Anti-Sheep (R&D Systems®, Catalog # NL010; red) IgG Secondary Antibodies, and the nuclei were counterstained with DAPI (blue).

REFERENCES

1. Gronthos, S. *et al.* (1995) Blood **85**:929.
2. Pittenger, M.F *et al.* (1999) Science **284**:143.
3. Liechty, K.W. *et al.* (2000) Nature Med. **6**:1282.
4. Orlic, D. *et al.* (2001) Nature **410**:701.
5. Lagasse, E. *et al.* (2000) Nature Med. **6**:1229.
6. Mezey, E. *et al.* (2000) Science **290**:1779.
7. Simmons, P.J. *et al.* (1991) Blood **78**:55.
8. Colter, D.C. *et al.* (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98**:7841.
9. Sun, S. *et al.* (2003) Stem Cells **21**:527.
10. Phinney, D.G. *et al.* (1999) J. Cell. Biochem. **72**:570.

NOTES

All trademarks and registered trademarks are the property of their respective owners.

04.08

©2019 R&D Systems®, Inc.

725943.7

2/19

14

For research use only. Not for use in diagnostic procedures.