Aus der Klinik und Poliklinik der Herzchirurgie der Universitätsmedizin Rostock
Direktor: Prof. Dr. med. Christian Etz

Forschungslabor Regenerative Medizin in der Herzchirurgie
Leiter: Prof. Dr. rer. nat. Robert David

Multimodale Bildgebung der Herzinfarktheilung nach kardialer Stammzelltherapie im Mausmodell

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der
Universitätsmedizin Rostock

Vorgelegt von
Moritz Michael Schweins, geb. am 27.01.1998 in Frechen
Rostock | 14.06.2025

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00005695

Doktorarbeit
Universitätsmedizin Rostock

Universität Rostock Traditio et Innovatio

Universitätsmedizin Rostock

Gutachter*innen:

Prof. Dr. rer. nat. Robert David, Universitätsmedizin Rostock, Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie

Prof. Dr. med. Timo Kirschstein, Universitätsmedizin Rostock, Oscar Langendorff Institut für Physiologie

Prof. Dr. rer. nat. Katja Schenke-Layland, Universitätsklinikum Tübingen, Institut für Biomedical Engineering

Jahr der Einreichung: 2025
Jahr der Verteidigung: 2026

Doktorarbeit

Universitätsmedizin Rostock

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung 1
1.1 Der akute Myokardinfarkt 2
1.1.1 Pathophysiologische Hintergründe 3
1.1.2 Myokardinfarktheilung 4
1.1.3 Linksventrikuläres Remodeling nach Myokardinfarkt 6
1.1.4 Therapie des akuten Myokardinfarktes 7
1.2 Kardiovaskuläre regenerative Medizin 8
1.2.1 Zellbasierte Therapieansätze 9
1.2.2 Therapeutische Modulierung des Heilungsprozesses nach Myokardinfarkt 10
1.2.3 Messung der Therapieeffekte 12
1.2.3.1 Histologische Untersuchung der Narbenstruktur 13
1.2.3.2 *In-vivo* Bildgebungen des kardialen Remodelings nach MI 14
1.3 Ziele dieser Arbeit 16
II. Material und Methoden 17
2.1 Material 17
2.1.1 Zellen 17
2.1.2 Zellkultur 17
2.1.2.1 Kultivierungsmedien 17
2.1.3 Standard- und Pufferlösungen 18
2.1.4 Tierexperimente 18
2.1.4.1 Operationsgeräte und -materialien 18
2.1.4.2 Medikamente 19
2.1.4.3 Bildgebende Untersuchungen: 20
2.1.5 Histologische Aufbereitung 20
2.1.6 Auswertung 20
2.1.6.1 Histologie 20
2.1.6.2 Softwares 21

2.1.7 Allgemeine Chemikalien und Antikörper 21
2.2 Methoden 23
2.2.1 Zellkulturmethoden 23
2.2.1.1 Kultivierung der Zellen 23
2.2.1.2 Differenzierung der Zellen 23
2.2.2 Tiermodell und Tierhaltung 24
2.2.2.1 Infarktinduzierung und Zelltransplantation 24
2.2.3 Multimodale Bildgebung 26
2.2.3.1 Positronen-Emissions-Tomographie/ Computertomographie (PET/CT) 26
2.2.3.2 Auswertung der PET/CT-Aufnahmen 27
2.2.3.3 Kardiale Magnetresonanztomographie (*CMR*) 27
2.2.3.4 Auswertung der Kardialen Magnetresonanztomographie-Aufnahmen 28
2.2.4 Histologische Aufarbeitung 29
2.2.4.1 Vorbereitung und Durchführung der Herzentnahme 29
2.2.4.2 Verarbeitung der Proben zur histologischen Aufarbeitung und Färbung 30
2.2.5 Bestimmung der Narbengröße 31
2.2.5.1 Kollagenfärbung 31
2.2.5.2 Auswertung 31
2.2.6 Bestimmung der Kapillardichte 32
2.2.6.1 Immunfärbung 32
2.2.6.2 Auswertung 33
2.2.7 Statistische Analysen 34
2.2.8 Versuchsaufbau 34
III. Ergebnisse 35
3.1 Auswirkung der Stammzelltherapie auf die Narbengröße 35
3.2 Kapillardichte des linken Ventrikels 37
3.3 Myokardiales Remodeling 38
3.4 Einfluss auf die funktionellen Parameter des linken Ventrikels 40
3.5 Effekte auf die linksventrikulären Wandverhältnisse 41

3.6 Quantifizierung des metabolischen Defektes 44

IV. Diskussion 46

4.1 Das Mausmodell in der kardioregenerativen Forschung 47

4.2 *Cardiac induced Cells* in der kardialen Stammzelltherapie 49

4.3 Zelltherapeutischer Einfluss auf die Narbenstruktur 49

4.4 Einfluss der Zelltherapie auf globale morphologische LV-Parameter 51

4.5 Zelltherapie verbessert die linksventrikuläre Funktion 52

4.6 Zelltherapie verändert regionale Wandeigenschaften des LV 53

4.7 Stammzellvermittelte Reduzierung des metabolischen Defektes 54

V. Zusammenfassung und Ausblick 56

VI. Abkürzungsverzeichnis 58

VII. Literaturverzeichnis 61

VIII. Anhang 71

8.1 Abbildungsverzeichnis 71

8.2 Tabellenverzeichnis 72

8.3 Thesen der Dissertation 73

8.4 Publikationen 74

8.5 Lebenslauf 76

8.6 Selbständigkeitserklärung 78

8.7 Danksagung 79

I. Einleitung

Die koronare Herzkrankheit (KHK) und deren Folgeerkrankungen, einschließlich chronisches Koronarsyndrom, Myokardinfarkt und Herzinsuffizienz, stellen nach Angaben des Statistischen Bundesamtes und der Weltgesundheitsorganisation die häufigste Todesursache der industrialisierten Länder dar (siehe Abb. 1) [1, 2].
Der akute Myokardinfarkt (AMI) ist die häufigste und klinisch bedeutsamste Form der akuten Herzschädigung und führt zum ischämischen Untergang von Herzgewebe. Der Tod der Kardiomyozyten geht einher mit einer Entzündung, die intensive Reparationsmechanismen aktiviert und letztlich in einem pathologischen Umbauprozess (*Remodeling*) des linken Ventrikels mündet [3].

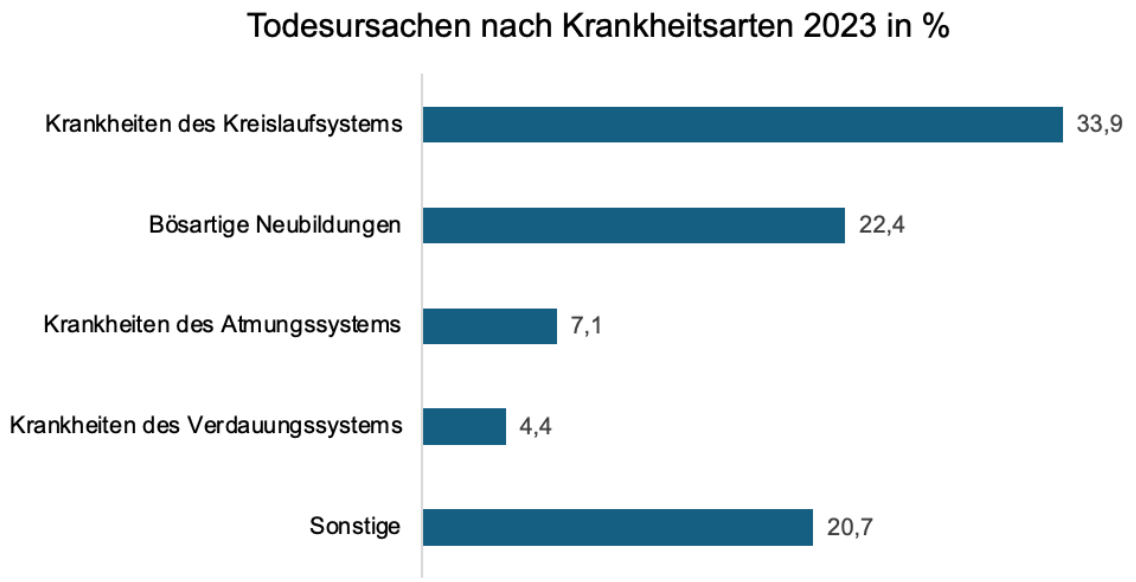


Abb. 1: Häufigste Todesursachen in Deutschland 2023 [2].

Eine Vielzahl an Studien wurden zu kardialen Stammzelltherapien durchgeführt, die darauf abzielen, Myokardschäden nach ischämischer Schädigung zu reduzieren. Experimentelle Studien haben immer wieder über signifikante Verbesserungen der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) nach intramyokardialer Injektion verschiedener Zellpräparate berichtet [4]. Dennoch wird das Feld durch den mangelnden Erfolg bei der Übertragung dieses Konzepts auf Patienten behindert und befindet sich derzeit in einem Prozess der Kurskorrektur. Die Idee des funktionellen Gewebeersatzes wurde von den meisten Forschern aufgegeben und durch das Konzept der sog. "parakrinen Effekte" ersetzt, die von den transplantierten Zellen vermittelt werden [5]. Letzteres wurde kürzlich in Frage gestellt, indem die Hypothese aufgestellt wurde, dass die injizierten Zellen ihre therapeutische Wirkung lediglich durch die Auslösung

einer unspezifischen lokalen Immunantwort entfalten [6, 7]. Dennoch zeigen insbesondere kardiale Zelltherapien der zweiten Generation, wie z. B. aus pluripotenten Stammzellen (*PSC*) gewonnene kardiovaskuläre Zellen, vielversprechende therapeutische Ergebnisse [4, 8].
Im Gegensatz zu den sich rasch entwickelnden molekular- und zellbiologischen Methoden, die in den meisten Kleintiermodellen eingesetzt wurden, verwendeten die meisten Forschenden einen rudimentären bildgebenden Ansatz ohne genaue Informationen über regionale Wandeigenschaften. Dies steht im Gegensatz zu den Bildgebungsstrategien, die bei größeren Tieren und Patienten eingesetzt werden.
Vor diesem Hintergrund wird in der vorliegenden Arbeit ein longitudinaler multimodaler Bildgebungsansatz verwendet, um den therapeutischen Effekt sog. “Cardiac-induced cells” (*CiCs*) auf die Herzfunktion und die Modulation regionaler Ventrikelwandeigenschaften zu bewerten [9].

1.1 Der akute Myokardinfarkt

Die Europäische Gesellschaft für Kardiologie definiert den akuten Myokardinfarkt in der *Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction* von 2018 als Myokardschädigung aufgrund einer akuten Myokardischämie [10].
Die Diagnose erfordert den Nachweis von kardialen Troponinen (vorzugsweise hochsensitive kardiale Troponine T oder I) über der 99. Perzentile. Die Schädigung gilt als akut, wenn eine Dynamik der kardialen Troponine beobachtet wird. Kardiales Troponin I (*cTnI*) und T (*cTnT*) sind Bestandteile des kontraktilen Apparats von Herzmuskelzellen und werden ausschließlich im Herzen exprimiert [10]. Begleitend müssen klinische Hinweise auf eine Ischämie vorliegen. Zu diesen Hinweisen zählen eine infarkttypische Symptomatik, neu aufgetretene ischämische EKG-Veränderungen und der Nachweis regionaler Wandbewegungsstörungen oder Vitalitätsverlust in der Bildgebung [11].
Trotz konstanter Inzidenz der KHK, zeigt sich in den letzten Jahren eine stetige Reduktion der Mortalitätsrate an Herz- und Kreislauferkrankungen in den Industrienationen. Dieser positive Trend ist zu einem großen Teil auf die Verbesserung der Prävention und Akutversorgung von KHK und AMI zurückzuführen [12–15]. Die Fortschritte der interventionellen und pharmakologischen Therapie in der Akutphase sowie die konsequente Behandlungen von Bluthochdruck und Fettstoffwechselstörungen spielen hierbei eine große Rolle [16]. Präventionskampagnen sind in wohlhabenden Ländern eine bewährte Methode zur Warnung vor Risikofaktoren ischämischer Herzerkrankungen. In Entwicklungsländern hingegen nehmen durch den westlichen Lebensstil Risikofaktoren zu, während entsprechende Präventionsprogramme dort oft weniger verbreitet sind. Die Globalisierung trägt somit zu einer steigenden Prävalenz von Risikofaktoren in diesen Regionen bei [15].

Zwar konnte die Sterblichkeit reduziert werden, die überlebenden Herzinfarktpatienten leiden jedoch unter den Folgen der ischämischen Kardiomyopathie. Langfristig kann die Abnahme der Wanddicke des linken Ventrikels im Rahmen des Remodelings zu Aneurysmen der Herzwand, zu Klappenvitien durch Papillarmuskelabriss, zu Dilatation und schließlich zu einer Herzinsuffizienz führen [17, 18].
Aufgrund der begrenzten Behandlungsmöglichkeiten für die ischämische Herzinsuffizienz erleiden viele Patienten eine signifikante Beeinträchtigung ihrer Lebensqualität mit stark eingeschränkter Prognose. Die zunehmende Anzahl von Patienten mit Herzinsuffizienz führt zu einer steigenden Anzahl von Krankenhausaufnahmen und -behandlungen [19]. Im Jahr 2020 beliefen sich die direkten und indirekten Gesundheitskosten für die Behandlung der Herzinsuffizienz in Deutschland auf knapp 7,5 Milliarden Euro [20].

1.1.1 Pathophysiologische Hintergründe

Das akute Koronarsyndrom (*ACS*) umfasst die instabile Angina pectoris, den ST-Hebungsinfarkt (*STEMI*) und den Nicht-ST-Hebungsinfarkt (*NSTEMI*). Der Myokardinfarkt ist in der Regel das Ergebnis einer komplexen Wechselwirkung von modifizierbaren und nicht-modifizierbaren Risikofaktoren. Die wichtigsten bekannten Risikofaktoren sind Nikotinabusus, Dyslipidämie, Bluthochdruck, Diabetes mellitus, körperliche Inaktivität und familiäre Prädisposition [21–23].
Die Pathophysiologie des *ACS* beruht auf drei abgrenzbaren Komponenten: der Atherogenese, der Plaqueerosion und der Thrombusbildung. Die Atherogenese ist ein langfristiger Prozess, der zum allmählichen Gefäßumbau führt und als Voraussetzung für das *ACS* gilt. Die entstandene atherosklerotische Plaque kann rupturieren und dadurch eine Gerinnungskaskade aktivieren. Die anschließende Bildung eines wandständigen Thrombus, der in das Gefäßlumen ragt, kann entweder dazu führen, dass das Gefäß vollständig oder teilweise verschlossen oder der Thrombus aufgrund von Scherkräften von der Gefäßwand gelöst wird und eine periphere Embolie verursacht [23–26]. Der Verschluss eines Koronargefäßes führt zu einer Minderversorgung des entsprechenden Stromgebietes, welche bei andauernder Ischämie eine Nekrose der Kardiomyozyten zu Folge hat [27]. Die nachfolgende Entzündungskaskade sorgt für den Ersatz des geschädigten Gewebes durch eine kollagenreiche Narbe. Große Infarkte induzieren dabei morphologische, histologische und molekulare Veränderungen, die als „ventrikuläres Remodeling“ bezeichnet werden und sowohl infarziertes als auch nicht-infarziertes Myokard betreffen. Klinisch äußert sich das ventrikuläre Remodeling in einer linksventrikulären Dilatation mit erhöhter Sphärizität und einer Verschlechterung der Herzfunktion [18]. Ein ausgeprägtes linksventrikuläres Remodeling korreliert eng mit dem Auftreten von Arrhythmien, plötzlichem Herztod und der Progression einer Herzinsuffizienz [27, 28].

1.1.2 Myokardinfarktheilung

Da das Herz eine vernachlässigbare Regenerationskapazität hat, sind die Reparaturmechanismen nach einem AMI essenziell, um möglichst viel gesundes Myokard zu erhalten und eine widerstandsfähige Narbe zu generieren.

Nach einem AMI wird die Herzreparatur durch eine Reihe von zeitabhängigen Ereignissen charakterisiert, die vom angeborenen Immunsystem orchestriert werden. Der Heilungsprozess kann in drei sich überschneidende Phasen gegliedert werden: 1) Entzündungsphase, 2) Proliferationsphase und 3) Reifungsphase. Die Heilungsreaktion wird durch Reperfusionstherapie erheblich beschleunigt und verbessert das klinische Outcome [3, 19].

1) Entzündungsphase:

Der Verlust von Kardiomyozyten sowie Schäden an der extrazellulären Matrix (EZM) führen zur Freisetzung von *damage-associated molecular pattern*, die durch Bindung an Mustererkennungsrezeptoren zirkulierende Immunzellen rekrutieren. Die ersten Zellen, die das infarzierte Myokard infiltrieren sind neutrophile Granulozyten. Die Adhäsion an aktivierte Endothelzellen wird durch Selektine ermöglicht. In der Selektin-Familie wird zwischen L-Selektin (CD62L), E-Selektin (CD62E) und P-Selektin (GMP-140, CD62P) unterschieden. Dabei spielen alle drei eine wichtige Rolle für den Gewebeeintritt der Leukozyten. Langsames Rollen der Neutrophilen entlang der Endotheloberfläche ermöglicht die Erkennung und Aktivierung durch Chemokine. Dadurch wird das aktivierte β2-Integrin an der Oberfläche der Neutrophilen exprimiert, welches an interzelluläre Adhäsionsmoleküle der Endotheloberfläche bindet. Es folgt die feste Adhäsion und transendotheliale Migration in das geschädigte Myokard [3, 29]. Die extravasierten Neutrophilen phagozytieren dort Zelltrümmer, setzen proteolytische Enzyme frei, produzieren reaktive Sauerstoffspezies und initiieren so die Wundheilungsreaktion [29]. Etwa 24 Stunden nach AMI findet eine Rekrutierung von Monozyten in das betroffene Infarktgebiet statt. Hauptsächlich vermittelt wird die Rekrutierung durch die *monocyte chemoattractant protein (MCP)-1/chemokine receptor (CCR)-2* – Achse. *MCP-1* spielt sowohl eine Rolle bei der Anlockung von *CCR-2*-positiven mononukleären Zellen als auch bei der Zytokinsynthese und Akkumulation von Myofibroblasten im infarzierten Myokard [3, 19, 29]. Die infiltrierenden Monozyten differenzieren in Gewebsmakrophagen und entfernen mithilfe der Neutrophilen nekrotisches Gewebe. Nach Frangogiannis *et al*. ist die Beseitigung von abgestorbenen Zellen und Matrixtrümmern für das Abklingen der Entzündung und den Übergang in die proliferative Phase essenziell [3].

2) Proliferationsphase:

Während des Übergangs zur proliferativen Phase unterdrücken die eindringenden Leukozyten rechtzeitig die Entzündung und verhindern eine weitreichende Ausbreitung in den nicht

infarzierten Bereich des Myokards [3]. Die extrazelluläre Matrixzusammensetzung der Infarktrandzone könnte als Barriere zwischen Infarkt und gesundem Myokard dienen [3, 29]. Die Proliferationsphase setzt etwa vier bis sieben Tage nach dem Infarkt ein. Eingewanderte Neutrophile unterliegen im Laufe des Heilungsprozesses der Apoptose und werden anschließend von Makrophagen phagozytiert. Die Freisetzung entzündungshemmender und profibrotischer Zytokine wie Interleukin (IL)-10 und *Transforming growth factor (TGF)-β* führt zu einem phänotypischen Wechsel der Makrophagen, die dann einen anti-inflammatorische Phänotyp („M2-Makrophagen“) aufweisen und zusammen mit den apoptotischen Neutrophilen ein antientzündliches Milieu erzeugen [29]. Zu Beginn der proliferativen Phase werden Fibroblasten mechanischem Stress, fibrogenen und angiogenen Wachstumsfaktoren sowie Zytokinen ausgesetzt und differenzieren zu Myofibroblasten. Diese aktivierten kardialen Myofibroblasten weisen charakteristische Merkmale von glatten Muskelzellen auf und exprimieren kontraktile Proteine wie *α-smooth muscle actin*. Sie entstehen aus residenten kardialen Fibroblasten oder aus zirkulierenden Vorläuferzellen des Knochenmarks [30]. Darüber hinaus wird sowohl eine Herkunft aus endothelialen Zellen mittels endothelialer-mesenchymaler Transition als auch durch epitheliale-mesenchymale Transition aus Epikardzellen beschrieben [29–31]. Myofibroblasten sind verantwortlich für die Synthese extrazellulärer Matrixproteine wie Fibrin und Fibronektin sowie für den Großteil der interstitiellen Kollagene. Dadurch erhalten sie die strukturelle Integrität der Ventrikelwand. Des Weiteren spielen sie eine wichtige Rolle bei der Bildung des Granulationsgewebes durch die Produktion von entzündungshemmenden und proangiogenen Faktoren [3, 29, 30, 32]. Die angiogenen Wachstumsfaktoren wie der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (*VEGF*) fördern die Entwicklung eines mikrovaskulären Netzwerkes innerhalb des sich regenerierenden Myokards, welches die Myofibroblasten mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt [3, 30].

3) Reifungsphase:

In der Reifungsphase, etwa sieben Tage nach AMI, kommt es zur Apoptose der Myofibroblasten und Ausbildung einer kollagenbasierten Narbe, die das zellreiche Granulationsgewebe ersetzt. Im weiteren Verlauf der Reifungsphase findet ein Austausch von Kollagen III durch Kollagen I statt und durch Vernetzung der EZM-Bestandteile wird eine mechanische stabile Narbe generiert [29, 33]. Durch die räumliche und zeitliche Begrenzung des fibrotischen Umbaus wird ein ausuferndes pathologisches Remodeling verhindert. Bei übermäßiger Fibroblastenaktivierung und ausgeprägtem Remodeling kann es zu einer Dilatation des linken Ventrikels, einer globalen systolischen Dysfunktion und schließlich zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz kommen [29, 32]. Der zeitliche Verlauf der Myokardheilung nach einem Infarkt variiert zwischen Menschen und Nagetieren. Eine Studie von Virag *et al.* beschrieb, dass die vollständige Narbenbildung beim Menschen etwa acht Wochen dauert, während die Heilungsprozesse bei

Mäusen und Ratten deutlich schneller ablaufen [34, 35]. Experimentelle Untersuchungen haben gezeigt, dass bei Mäusen nekrotische Zellen bereits nach einer Woche durch Granulationsgewebe ersetzt werden und sich nach etwa vier Wochen eine reife Narbe gebildet hat. Der schnellere Heilungsverlauf des Myokardinfarktes bei Mäusen ergibt sich vermeintlich aus einem günstigeren Verhältnis von Oberfläche und Volumen. Artspezifische Unterschiede in der intrinsischen Heilung müssen ebenfalls berücksichtigt werden, insbesondere wenn Ergebnisse aus Mausmodellen in die Entwicklung klinischer Forschung für Menschen implementiert werden [34].

1.1.3 Linksventrikuläres Remodeling nach Myokardinfarkt

Das Remodeling nach Myokardinfarkt beschreibt eine strukturelle Veränderung der ventrikulären Architektur, die mit einem erhöhten Volumen und einer veränderten Kammerkonfiguration einhergeht. Auf histologischer Ebene ist dieser Remodeling-Prozess durch pathologische Myozytenhypertrophie und -apoptose, Myofibroblastenproliferation und interstitielle Fibrose gekennzeichnet. Diese strukturellen Veränderungen werden durch den Verlust von kontraktilem Myokard infolge eines ischämischen Ereignisses verursacht, welches nur unzureichend funktionell durch eine kollagenreiche Narbe ersetzt wird. Die fibrotische Reparatur des nekrotischen Bereichs resultiert in der anfänglichen Phase des linksventrikulären Remodelings in einer Narbenbildung, Dilatation und Ausdünnung der infarzierten Zone (siehe Abbildung 2) [18]. Das Ausmaß der ventrikulären Dilatation und die Abnahme der globalen kontraktilen Leistung korrelieren direkt mit der initialen Schädigung des Myokards. Die Zunahme des LV-Volumens ermöglicht trotz einer verminderten Ejektionsfraktion die Aufrechterhaltung des Schlagvolumens und kann vorübergehend den Verlust kontraktilen Gewebes kompensieren [36, 37]. Zusätzlich zu den Wandveränderungen im Infarktgebiet, kommt es zu einer kompensatorischen Hypertrophie im nicht-infarzierten Myokard. Dies führt zu einer Vergrößerung der Kammer und Veränderung von einer elliptischen zu einer eher sphärischen Kammerkonfiguration (Abbildung 2) [18].

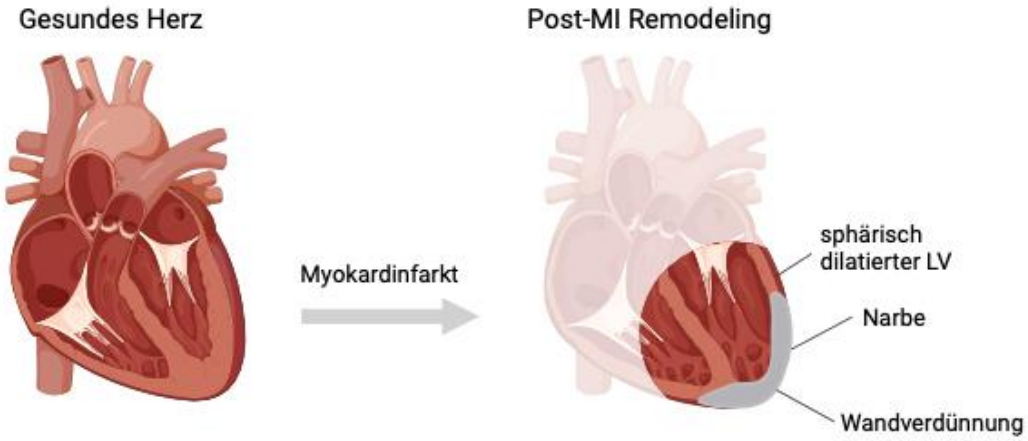


Abb. 2: Schematische Darstellung des LV-Remodeling nach AMI.

Die Frühphase ist gekennzeichnet durch die Abnahme der Wanddicke und Ausbildung einer kollagenreichen Narbe in der infarzierten Zone. Anschließend kommt es zu einer linksventrikulären (LV) Dilatation, wobei sich die Form des Ventrikels von einer ellipsenförmigen zu einer eher kugelförmigen (sphärischen) Konfiguration verändert. Erstellt mit BioRender.com.

Die Myokardschädigung führt zur Hochregulation einer Reihe von neuroendokrinen, parakrinen und autokrinen Faktoren. Die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, eine erhöhte Zytokinexpression und oxidativer Stress tragen wesentlich zum ventrikulären Remodeling bei und fördern Kollagenablagerungen im gesamten Myokard [18, 33]. Dieser Prozess ist mitverantwortlich für die fortschreitenden Rigidität und Dysfunktion des Ventrikels. Die Überexpression neurohumoraler Substanzen wie *Angiotensin II* und *TGF- β1* sowie des AT_1-Rezeptors (Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1) im Myokard fördert die interstitielle Fibrosierung. Neben den interstitiellen Veränderungen führt eine chronische Überlastung des LV zu ausgeprägten Kollageneinlagerungen und Matrixproduktion mit Ersatz von Kardiomyozyten durch Bindegewebe (sog. Ersatzfibrose) [32, 33].

Ein ausgeprägtes linksventrikuläres Remodeling nach AMI mit Verlust der systolischen Kontraktilität und diastolischen Elastizität führt häufig zu einer Herzinsuffizienz. Wie bereits beschrieben, hat sich die Überlebensrate nach Herzinfarkt in den letzten Jahren deutlich verbessert, so dass immer mehr Menschen einem erhöhten Risiko ausgesetzt sind, eine Herzinsuffizienz zu entwickeln [32, 33].

1.1.4 Therapie des akuten Myokardinfarktes

2023 wurde von der *European Society of Cardiology* eine aktualisierte Leitlinie mit Empfehlungen zur Behandlung des akuten ST-Hebungs-Myokardinfarktes publiziert [38].

Bei infarkttypischer Symptomatik und Nachweis von neu aufgetretenen ischämischen EKG-Veränderungen kann bereits ohne serologischen Nachweis einer Myokardschädigung die Indikation für eine Reperfusionstherapie gestellt werden. Nach initialer Thrombozytenaggregationshemmung und therapeutischer Antikoagulation ist die Therapie der ersten Wahl bei *STEMI* die perkutane Koronarintervention (*PCI*). Im Rahmen der *PCI* wird das verschlossene Koronargefäß wiedereröffnet und gegebenenfalls eine Gefäßstütze (*Stent*) eingesetzt. Die präklinische Fibrinolyse ist nur indiziert, wenn innerhalb von 120 Minuten nach dem ersten medizinischen Kontakt keine primäre *PCI* durchgeführt werden kann [38]. Trotz deutlicher Fortschritte in der akuten Behandlung, liegt die Krankenhaussterblichkeit bei *STEMI*-Patienten zwischen 6 und 14%. Die myokardiale Reperfusion ist essenziell für das Überleben von Herzgewebe [39].

Zentral in der Sekundärprävention nach einem akuten Myokardinfarkt sind sogenannte Lifestyle-Modifikationen und eine kardioprotektive medikamentöse Behandlung. Patienten sollen eine umfassende Rehabilitation erhalten, die körperliche Aktivität, Rauchentwöhnung und eine gesunde Ernährung umfasst. Bei der medikamentösen Therapie spielen Thrombozytenaggregationshemmer wie Acetylsalicylsäure (ASS) und P2Y12-Inhibitoren als auch die Behandlung kardiovaskulärer Risikofaktoren eine wichtige Rolle. In der langfristigen medikamentösen Behandlung nach AMI können je nach individuellem Risikoprofil der Patienten ACE-Hemmer, Sartane, ARNIs, β-Blocker, SGLT-2-Inhibitoren und Mineralcorticoid-Rezeptor-Antagonisten eingesetzt werden, da sie das linksventrikuläre Remodeling günstig beeinflussen und somit das Risiko für eine ischämische Herzinsuffizienz senken [38].

Die sinkende Sterblichkeit nach Herzinfarkten und die alternde Bevölkerung führen zukünftig zu einer steigenden Prävalenz der Herzinsuffizienz [40]. Trotz bedeutender Fortschritte in medikamentöser und interventioneller Therapie, die zu einer deutlichen Verbesserung der Lebensqualität und Mortalität der Patienten führte, bleibt die Herztransplantation die einzige kurative Behandlungsoption [40, 41]. Im Jahr 2023 wurden in Deutschland insgesamt 330 Herzen transplantiert, wobei zum Jahresende noch rund 1100 Patienten auf der Warteliste für ein Spenderherz verblieben [41].

1.2 Kardiovaskuläre regenerative Medizin

Aufgrund der begrenzten regenerativen Kapazität des menschlichen Herzens und dem Verlust kardialen Gewebes nach einem akuten MI, sind in den letzten beiden Jahrzehnten die Heilungs- und Reparaturmechanismen des Herzens nach einem ischämischen Ereignis zunehmend in den Fokus der Forschung geraten [42]. Es besteht inzwischen ein tiefgreifendes Verständnis der myokardialen Heilung und des kardialen Remodelings, was zur Entwicklung wirksamer Medikamente geführt hat. Dennoch führt der irreversible Verlust von Kardiomyozyten häufig zu einer chronischen Herzinsuffizienz [26, 43].

Daher wurden seit den 2000er Jahren eine Vielzahl an Studien im Rahmen der kardiovaskulären regenerativen Medizin durchgeführt [44]. Die Stammzelltherapie nach akutem Myokardinfarkt zog große Aufmerksamkeit auf sich, zeigte bei der klinischen Translation initial jedoch negative oder uneindeutige Ergebnisse [45, 46]. In der regenerativen Medizin werden zwei komplementäre Ansätze verfolgt - einerseits der Ersatz von geschädigtem und dysfunktionalem Gewebe und andererseits die Modulation endogener immunologischer Reparaturmechanismen durch transplantierte Zellen. Die ursprüngliche Idee des funktionellen Gewebeersatzes wurde inzwischen von den meisten Forschenden aufgegeben und die immunmodulatorische Wirkung ist in den Mittelpunkt aktueller Studien gerückt [4, 8, 44]. Obwohl bereits in zahlreichen präklinischen Studien im Mausmodell gezeigt werden konnte, dass transplantierte Zellen die Funktion des Herzens nach AMI verbessern, bleibt der genaue Mechanismus weiterhin rätselhaft [4, 47, 48].

1.2.1 Zellbasierte Therapieansätze

Da Stammzellen als undifferenzierte Zellen die Fähigkeit besitzen sich selbst zu erneuern und in verschiedene Zell- und Gewebearten zu differenzieren, haben sie große Aufmerksamkeit auf sich gezogen. Es lassen sich drei Zellgruppen mit verschiedenem Differenzierungsgrad unterscheiden: i) totipotente Stammzellen ii) pluripotente Stammzellen wie embryonale Stammzellen (*ESCs*) oder induzierte pluripotente Stammzellen (*iPSCs*) und iii) multipotente Stammzellen wie adulte Stammzellen [42, 49].

Eine Zelle wird als totipotent bezeichnet, wenn sie die Eigenschaft besitzt unter geeigneten Bedingungen einen vollständigen Organismus hervorzubringen. Sie muss daher bei Säugern in der Lage sein, sowohl in embryonales als auch extraembryonales Gewebe zu differenzieren. Der Prototyp einer totipotenten Stammzelle ist demnach die Zygote. Die Totipotenz von Stammzellen geht während der Embryogenese etwa mit dem Erreichen des Achtzell-Stadiums verloren [49, 50].

Pluripotente Stammzellen, deren Prototyp die Embryonalen Stammzellen (*ESCs*) darstellen, können in Zellen und Gewebe aller drei Keimblätter (Entoderm, Mesoderm, Ektoderm) differenzieren, bergen allerdings das Risiko, beim Empfänger Teratome zu bilden. Trotz ihres therapeutischen Potenzials werden *ESCs* daher aus ethischen und rechtlichen Gründen von weiteren klinischen Anwendungen ausgeschlossen [4, 48, 51]. Die Entwicklung induzierter pluripotenter Stammzellen (*iPSCs*) ermöglichte es jedoch, diese Problematik zu umgehen. 2006 beschrieben Yamanaka *et al.* die Induktion pluripotenter Stammzellen aus murinen *ESCs* und adulten Fibroblasten durch die Kombination vier definierter Transkriptionsfaktoren: Oct3/4, Sox2, Klf4, und c-Myc [52]. Es konnte bereits in einigen Arbeiten gezeigt werden, dass sich kardial differenzierte *iPSCs* positiv auf die Herzfunktion und das pathologische Remodeling nach Myokardinfarkt auswirken [4, 47, 53].

Neben der Verwendung von undifferenzierten und induzierten pluripotenten Stammzellen, sind ebenfalls therapeutische Ansätze mit multipotenten Stammzellen entwickelt und beschrieben worden.

Residente kardiale Stammzellen (*CSCs*) und kardiale Progenitorzellen (*CPCs*) bilden eine heterogene Zellpopulation im Herzen, die durch ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Multipotenz gekennzeichnet ist [4]. Multipotente Zellpopulationen besitzen die Eigenschaft in verschiedene Zellen innerhalb eines Keimblattes zu differenzieren [54]. C-kit-positive *CSCs*, die erstmals 2003 von Beltrami *et al.* beschrieben wurden, haben das Potenzial, sich in Kardiomyozyten, glatte Muskelzellen und Endothelzellen zu differenzieren [55]. Eine Metaanalyse um Zwetsloot *et al.* zeigte, dass die Transplantation dieser Zellen nach Myokardinfarkt zur Regeneration des Myokards und Verbesserung der linksventrikulären Funktion beitragen kann [56]. Trotz dieser vielversprechenden Eigenschaften bleibt die tatsächliche Existenz und funktionelle Relevanz dieser Zellen umstritten, insbesondere im Hinblick auf ihre Rolle im endogenen Gewebeersatz [7].

Unfraktionierte mononukleäre Zellen des Knochenmarks (*BM-MNCs*) bestehen aus einer heterogenen Mischung myeloider und lymphoider Zellen sowie kleineren Anteilen mesenchymaler Stammzellen (*MSCs*), endothelialer Vorläuferzellen und hämatopoetischer Stammzellen. Sie können ohne aufwändige Zellkultur oder Expansion durch Knochenmarksaspiration gewonnen werden [48].

MSCs stehen aufgrund ihrer multipotenten, regenerativen und residenten Eigenschaften seit mehr als zwei Jahrzehnten im Fokus der kardioregenerativen Forschung [4]. Sowohl Tiermodelle als auch Phase-I und -II-Studien an Patienten mit ischämischer Herzkrankheit lieferten vielversprechende Ergebnisse hinsichtlich einer besseren Herzfunktion [48, 57]. In der Literatur wurden zahlreiche Oberflächenmarker für die Identifizierung und Isolierung von MSCs beschrieben. Ihre Gewinnung aus verschiedenen Geweben und Organen, wie Knochenmark, Fettgewebe, Plazenta, Nabelschnur, Herz und peripherem Blut, konnte bereits erfolgreich nachgewiesen werden. Humane *MSCs* zeichnen sich durch ihre Adhäsion an Kunststoffoberflächen, eine fibroblastenähnliche Morphologie, die Expression spezifischer Oberflächenmarker (CD105, CD73 und CD90) sowie die Fähigkeit zur Differenzierung in Chondrozyten, Adipozyten und Osteozyten aus [48, 58]. Die Differenzierung von *MSCs* zu Skelettmuskelzellen, Endothelzellen und Kardiomyozyten wurde zwar berichtet, bleibt jedoch umstritten [48].

1.2.2 Therapeutische Modulierung des Heilungsprozesses nach Myokardinfarkt

Unzählige Studien zur kardialen Stammzelltherapie in den letzten 20 Jahren haben gezeigt, dass die Transplantation verschiedener Zelltypen die Funktion des geschädigten Herzens nach Myokardinfarkt verbessert. Das zugrunde liegende Wirkprinzip bleibt jedoch weiterhin nicht vollständig verstanden [4, 48].

Die Zelltherapie führt zu einer langfristigen Funktionsverbesserung des infarzierten Herzens, obwohl bereits gezeigt werden konnte, dass die meisten transplantierten Zellen innerhalb der ersten Stunde ausgewaschen werden und nach einigen Wochen nahezu nicht mehr im Herzen nachweisbar sind. Diese Erkenntnis führte dazu, dass das Konzept der sog. *parakrinen Hypothese* nahezu von allen Forschenden im Bereich der Zelltherapie akzeptiert wird [48, 59]. Diese postuliert, dass die transplantierten Zellen verschiedene Wachstumsfaktoren und biologische aktive Substanzen sezernieren [4, 48, 57]. Wie genau diese Faktoren die kardiale Funktion verbessern, bleibt unklar - jedoch vermutlich durch eine vorübergehende Modulation des myokardialen Heilungsprozesses. Zuletzt wurde die parakrine Wirkweise transplantierter Zellen von der Arbeitsgruppe um Vagnozzi *et al*. infrage gestellt. Diese zeigten in ihrer Arbeit, dass die verbesserte Herzfunktion nach Zelltherapie durch eine akute sterile Immunantwort mit regionaler Rekrutierung von *CCR2*+ (*C-C chemokine receptor type 2 positive*) und *CX3CR1*+ Makrophagen (*C-X3-C motif chemokine receptor 1 positive*) zustande kommt [7]. In der Literatur werden pro- und antiinflammatorische Makrophagen-Subtypen beschrieben, die eine zentrale Rolle bei der Orchestrierung des myokardialen Heilungsprozesses spielen. Vereinfacht können M1- und M2-Makrophagen voneinander abgegrenzt werden. Der M1-Subtyp ist durch die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie Tumornekrosefaktor- α und IL-1β charakterisiert, während M2-Makrophagen mit der Sekretion von IL-10 assoziiert sind [60, 61]. IL-10 entfaltet seine antiinflammatorische Wirkung, indem es zeitlich und örtlich entzündliche Prozesse begrenzt und überschießen der Immunreaktionen verhindert [62]. Nach einem MI werden zunächst M1-Makrophagen durch *CCL2* (*CC-chemokine ligand 2*) an den Ort der Myokardschädigung gelockt. Dort initiieren sie mittels proinflammatorischer Mediatoren die Zersetzung des infarzierten Gewebes. In der anschließenden Reparaturphase werden M2-Makrophagen über *CX3CL1* (*C-X3-C motif ligand 1*) rekrutiert, um die Synthese der extrazellulären Matrix (EZM) und die Angiogenese zu fördern [60]. Diese selektive Makrophagenreaktion moduliert die Aktivität kardialer Fibroblasten und fördert die Reduktion des EZM-Gehaltes in der Peri-Infarktzone. Dadurch verbessern sich die mechanischen Eigenschaften des infarzierten Myokards, was eine verbesserte Pumpfunktion, eine reduzierte Narbengröße und ein abgeschwächtes pathologisches Remodeling nach MI zur Folge hat [7, 48, 57]. Diese Reaktion konnte von Vagnozzi *et al.* sowohl bei der Anwendung viabler als auch nicht-viabler Stammzellen beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass die therapeutische Wirkung der Zelltherapie in erster Linie auf immunmodulatorischen Mechanismen und nicht auf aktiven parakrinen Effekten beruht [7].

In Metaanalysen präklinischer Studien zur Wirksamkeit der kardialen Stammzelltherapie nach AMI von Lang *et al*. und Zwetsloot *et al*. wurde eine signifikante Verbesserung der linksventrikulären Ejektionsfraktion um 10,21 % (Lang *et al*.) bzw. um 10,7 % (Zwetsloot *et al*.) festgestellt. Aus der 2023 veröffentlichten Metaanalyse von Lang *et al.* geht hervor, dass die kardiale

Zelltherapie mit *CPCs*, *iPSCs* und aus *PSC*-abgeleitete Kardiomyozyten (*PSC-CM*) einen signifikant besseren Effekt auf die linksventrikuläre Funktion hat als andere Zellgruppen [4, 56].
In der vorliegenden Arbeit verwendeten wir murine embryonale Stammzellen (*mESCs*) und führten ein kardiales Differenzierungsprotokoll durch, welches kürzlich in unserer Arbeitsgruppe etabliert wurde. Die dabei erzeugten Zellen werden im Folgenden als *Cardiac induced Cells* (*CiCs*) bezeichnet [63].
Obwohl die Sicherheit der therapeutischen Verwendung kardialer Stammzellen in klinischen und präklinischen Studien belegt werden konnte, wurden bisher nur sehr wenige Phase-III-Studien durchgeführt [46, 64, 65].
Die REPAIR-AMI Phase-II Studie untersuchte Anfang der 2000er Jahre die Wirksamkeit von intrakoronar applizierten Stammzellen wenige Tage nach erfolgreicher Reperfusionstherapie nach akutem Myokardinfarkt. Die Studie zeigte einerseits, dass die Stammzelltherapie sicher und durchführbar ist, und lieferte andererseits vielversprechende Ergebnisse hinsichtlich der Verbesserung des klinischen Outcomes und der Reduktion der Mortalität [65]. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurde die BAMI-Studie durchgeführt, um die Wirksamkeit dieses therapeutischen Ansatzes im Rahmen einer Phase-III-Studie zu bestätigen. Der ursprüngliche primäre Endpunkt war die Gesamtmortalität bei Patienten mit einer LVEF < 45 % nach primärer *PCI* bei *STEMI*. Obwohl es sich um die größte Studie zu autologer Stammzelltherapie handelt, erfüllten nicht genügend Patienten die Einschlusskriterien, um eine definitive Aussage zur Wirksamkeit der Zelltherapie treffen zu können. Die sehr geringe Gesamtmortalität der Studie (3,5 %) zeigt zwar die sehr erfolgreiche primäre interventionelle und medikamentöse Versorgung des AMI, macht aber auch deutlich, dass zukünftige Studien mit der Gesamtmortalität als primären Endpunkt vor großen monetären und logistischen Herausforderungen stehen [46].
Dennoch stellt die Identifizierung der genauen Wirkmechanismen weiterhin eine der zentralen Herausforderungen im Bereich der Zelltherapie dar. Das Mausmodell des akuten MI spielt als präklinisches Versuchsmodell eine wichtige Rolle bei der Beantwortung dieser Frage. Ein besonderer Fokus liegt derzeit auf der Erfassung und Analyse globaler und regionaler linksventrikulärer Parameter, um ein fundiertes Verständnis der Effekte der Zelltherapie auf das Remodeling zu erlangen. Dies ermöglicht eine gezielte Weiterentwicklung potenzieller Therapieansätze [4, 48, 66]

1.2.3 Messung der Therapieeffekte

Die meisten präklinischen und klinischen Studien beurteilten das LV-Remodeling mithilfe globaler Surrogatendpunkte wie der LVEF oder mit postmortalen Techniken wie histopathologischen Gewebeanalysen [57, 67]. Durch die rasante Entwicklung der *in-vivo* Kleintierbildgebungen besteht nun jedoch die Möglichkeit regionale Effekte kardialer Zelltherapien präzise

zu erfassen und so detaillierte lokale Parameter der Herzfunktion in Analysen zu integrieren [4, 68].
Globale Parameter der kardialen Funktion, wie die LVEF oder das linksventrikuläre Volumen, sind fest etablierte Größen und dienen in den meisten Studien als primäre Endpunkte. Vor allem die LVEF gilt nach wie vor als Goldstandard zur Bewertung der Herzfunktion [18, 69].
Die Mehrheit der Forschenden setzten in ihren Mausstudien vergleichsweise rudimentäre bildgebende Ansätze für die Erhebung dieser Endpunkte ein, ohne dabei genauere Informationen über regionale Wandeigenschaften zu erhalten [4]. Eine Übersichtsarbeit um van Slochteren *et al*. zeigte jedoch, dass globale Parameter der LV-Funktion ungeeignet sind, um die kleinen und regionalen Effekte kardialer Zelltherapien zu erfassen. Daher wurde bereits in den 2010er Jahren vorgeschlagen, detaillierte lokale Messungen kardialer Funktionen zu integrieren, um die Wirkmechanismen kardialer Zelltherapien besser zu verstehen [4, 66].
Für die Untersuchung globaler und regionaler Effekte kardialer Stammzelltherapien stehen sowohl invasive als auch nicht-invasive Techniken zur Verfügung [66].

1.2.3.1 Histologische Untersuchung der Narbenstruktur

In tierexperimentellen Modellen des akuten MI stellt die Bestimmung des Ausmaßes der Myokardschädigung und -heilung anhand der Größe der resultierenden Narbe einen etablierten Ansatz dar. Dabei greifen die meisten Forschenden auf histologische Methoden zurück, um die Größe und Struktur der Infarktnarbe zu analysieren. Bisherige Studien konnten zeigen, dass sowohl die Ausdehnung als auch die Beschaffenheit der Narbe einen entscheidenden Einfluss auf die kardiale Pumpfunktion und das strukturelle Remodeling des Herzens nach AMI haben. Basierend auf diesen Erkenntnissen hat sich ein ganzes Forschungsfeld etabliert, dessen Ziel es ist, durch gezielte Modifikation der Narbenstruktur die Herzfunktion zu verbessern [70–72].
Die flächenbasierte Messung der Infarktnarbe gilt als gängige Methode zur histologischen Quantifizierung des Ausmaßes der Myokardschädigung. Takagawa *et al.* hinterfragten diese Vorgehensweise und verglichen die histologische Bestimmung der Infarktgröße mittels flächenbasierter und längenmaßbasierter Messungen vier Wochen nach AMI [70].
Beide Methoden korrelieren stark mit der systolischen Dysfunktion des Herzens. Bei der flächenbasierten Messung besteht jedoch eine verzerrte Beziehung zwischen dem Schweregrad des AMI und dem daraus resultierenden prozentualen Anteil der Narbe am gesamten LV. Diese Verzerrung lässt sich durch die gegensätzlichen Veränderungen der Wanddicke im vernarbten und vitalen Myokard erklären. Wie bereits oben beschrieben, führt ein AMI zur Verdünnung der Wand im infarzierten Areal, während in infarktfernen Regionen eine kompensatorische Hypertrophie auftritt. Dies bewirkt eine Abnahme des relativen Anteils des Narbengewebes am gesamten LV im Vergleich zu den ursprünglichen Größenverhältnissen [70]. Virag

et al. veranschaulichten dies bereits 2003 in einem Mausmodell. Sie bestimmten die Infarktgröße vier Tage sowie 28 Tage nach *LAD*-Ligatur mithilfe der flächenbasierten Messmethode. Nach vier Tagen betrug die Infarktgröße durchschnittlich 38 % des LV, wohingegen nach 28 Tagen der durchschnittliche Anteil bei nur noch 20 % lag [34]. Im Gegensatz dazu erfasst die längenmaß-basierte Messung das Ausmaß der Infarktnarbe unabhängig von einer Verdünnung der Ventrikelwand (siehe Abbildung 9). Diese Messmethode ermöglicht außerdem eine präzise Differenzierung zwischen vorhergesagten kleineren und größeren Infarkten, die durch unterschiedliche Ligationsstellen hervorgerufen wurden [70].
Ein weiteres wichtiges histologisches Merkmal der Narbenstruktur stellt die Gefäßdichte dar. Es wird vermutet, dass die Neubildung kleiner Gefäße aus bestehenden Kapillaren (sog. Angiogenese) in der Infarktgrenzzone die Infarktausdehnung begrenzt und so den Übergang zur Herzinsuffizienz lindert [4, 73]. Die Transplantation kardialer Stammzellen bewirkt eine Hochregulation angiogener Gene und stellt damit eine vielversprechende therapeutische Strategie zur Förderung der Angiogenese in der Infarkt- und Peri-Infarkt-Region dar [69, 73]. In den ersten Wochen nach AMI sprossen Gefäße in das Granulationsgewebe und versorgen die metabolisch aktive, unreife Narbe mit Nährstoffen. Nur wenige dieser Gefäße reifen vollständig aus und bleiben langfristig erhalten. Der Großteil der neu gebildeten Mikrogefäße bildet sich im Rahmen der Narbenreifung wieder zurück. Daher ist der Zeitpunkt der Bestimmung der Gefäßdichte entscheidend, um die Ergebnisse angemessen einzuordnen. Die meisten Studien bestimmten diesen Parameter vier Wochen nach AMI und erfassen dabei hauptsächlich die verbliebenen, ausgereiften Gefäße [4, 27].

1.2.3.2 *In-vivo* Bildgebungen des kardialen Remodelings nach MI

Derzeit fehlt ein etablierter Ansatz, um die oben genannten Wirkmechanismen der kardialen Stammzelltherapie adäquat zu messen. Daher rückt die nicht-invasive *in-vivo* Bildgebung des linksventrikulären Remodelings im Kontext regenerativer Therapien in den Fokus der translationalen Forschung. Spezielle Kleintier-PET/CT- und Kleintier-MRT-Scanner ermöglichen eine präzise *in-vivo* Visualisierung und Quantifizierung der Herzfunktion, der Herzmorphologie sowie metabolischer Prozesse [57, 66, 74]. Durch den Einsatz multimodaler Bildgebung im Kleintiermodell können Messgrößen erhoben werden, die die Effekte der Zelltherapie widerspiegeln [66].
Die kardiale Magnetresonanztomographie (*CMR*) ermöglicht eine hochauflösende Analyse der kardialen Funktion und Morphologie und gilt als Goldstandard zur Beurteilung des LV-Remodelings. In bisherigen Studien wurde die *CMR* primär zur Quantifizierung funktioneller Parameter, ventrikulärer Deformitäten sowie der Myokardfibrose nach AMI eingesetzt [66, 67].
Das *Late Gadolinium Enhancement* in der *CMR* bietet dabei ein zuverlässiges Verfahren zur Evaluierung der myokardialen Vitalität und der Infarktnarbe und hat sich als unverzichtbare

diagnostische Methode in der Kardiologie etabliert [66]. Neben globalen Parametern ist es für das Verständnis der Wirkung kardialer Stammzelltherapien entscheidend, auch lokale Veränderungen der Herzfunktion zu berücksichtigen. Zu diesem Zweck entwickelten Lang *et al.* ein Protokoll zur regionalen linksventrikulären Wandanalyse nach AMI, das ausschließlich auf nativer *Cine-CMR* basiert. Dies ermöglicht eine umfassendere Messung und Visualisierung regionaler Wandeigenschaften und damit ein besseres Verständnis der lokalen Effekte der Zelltherapie [66, 67].

Im Gegensatz zur *CMR* liefert die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) Informationen über myokardiale Stoffwechselvorgänge. Die funktionelle ^{18}F-Fluordesoxyglukose (^{18}F-FDG) – PET ist eine nicht-invasive, hochauflösende, serielle *in-vivo*-Untersuchung, die eine quantitative Beurteilung des kardialen Glukosestoffwechsels ermöglicht [68]. Die zelluläre Aufnahme von ^{18}F-markierter Glukose zeigt die Zellviabilität an und dient der Unterscheidung zwischen viablem und irreversibel geschädigtem Gewebe [66].

Die Anwendung von FDG-PET bei Kleintieren wird als innovative Methode zur Beurteilung des kardialen Remodelings und der Regeneration nach akutem MI angesehen. Durch die Visualisierung metabolischer *in-vivo*-Daten erlaubt sie eine detaillierte Analyse der therapeutischen Effekte transplantierter Zellen. Der primäre Endpunkt bisheriger Studien ist der prozentuale Anteil der injizierten Dosis des ^{18}F-FDG pro Gramm (%ID/g) im Herzen. Die Messung der ^{18}F-FDG-Aufnahme und die Bestimmung metabolisch inaktiver Areale lassen Rückschlüsse auf das Ausmaß des Infarktes zu und korrelieren mit dem funktionellen Outcome [60, 68]. Das ventrikuläre Remodeling nach AMI geht mit globalen, vor allem aber mit molekularen und zellbiologischen Veränderungen einher. Die Quantifizierung metabolischer Prozesse nach AMI spielt daher eine bedeutende Rolle, um wertvolle mechanistische Einblicke in die Wirkung von Zelltherapien auf die myokardiale Regeneration und Heilung zu gewinnen [68].

1.3 Ziele dieser Arbeit

Trotz bislang ernüchternder Ergebnisse in klinischen Studien, berichten präklinische Arbeiten weiterhin von einer signifikanten Verbesserung der Herzfunktion nach einem experimentell induzierten akuten Myokardinfarkt durch kardiale Stammzelltherapien [4]. Die anfängliche Vorstellung eines funktionellen Gewebeersatzes hat sich hin zu dem Konzept entwickelt, dass transplantierte Zellen die myokardiale Heilung durch eine lokale Modulation der unspezifischen Immunantwort positiv beeinflussen [7]. Obwohl das Konzept der regionalen Narbenmodulation von den meisten Forschenden anerkannt wird, wurden in bisherigen Studien überwiegend grundlegende Methoden zur Beurteilung der kardialen Funktion eingesetzt. Um die lokalen Effekte der Zelltherapie umfassender zu verstehen, sollten jedoch neben den üblichen globalen morphologischen und funktionellen Parametern auch regionale Eigenschaften des linken Ventrikels analysiert werden [4].

In der vorliegenden Arbeit wurde daher ein multimodaler, longitudinaler Bildgebungsansatz im Mausmodell etabliert, um die therapeutischen Effekte von *Cardiac induced Cells* auf regionale Wandeigenschaften des linken Ventrikels nach Myokardinfarkt zu untersuchen.

Dafür wurden zunächst PET/CT-Aufnahmen erhoben, um zelltherapeutische Effekte auf metabolische Prozesse zu identifizieren und das Ausmaß der irreversiblen Myokardschädigung zu quantifizieren. Des Weiteren wurden globale morphologische und funktionelle Parameter sowie regionale Eigenschaften des linken Ventrikels mittels *CMR* erfasst und analysiert. Für die Beurteilung der regionalen linksventrikulären Wandeigenschaften wurde das kürzlich von unserer Arbeitsgruppe etablierte Protokoll verwendet [67]. Zuletzt wurden die Herzen entnommen und die Narbengröße und Kapillardichte histologisch bestimmt.

Das Hauptziel dieser Arbeit ist die Bestimmung der lokalen heilungsmodulierenden Effekte von intramyokardial injizierten kardialen Stammzellen auf die Infarktnarbe mithilfe eines *in-vivo*-Bildgebungsprotokolls. Damit sollen weitere Fragen hinsichtlich der Wirkmechanismen kardialer Stammzelltherapien beantwortet und das Verständnis der kardialen regenerativen Medizin vorangetrieben werden.

II. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellen

Es wurden murine embryonale Stammzellen („mESC“) der Linie W4 aus 129S6 Mäusen verwendet [75].

2.1.2 Zellkultur

Tabelle 1: Liste der verwendeten Zellkulturmaterialen

Produkt	Typ	Hersteller
Zellkulturflaschen	250 ml (75 cm²)	Greiner Bio-One
Serologische Pipetten	2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	TPP
Pipettenspitzen	Ultratip	Greiner Bio-One
Reaktionsgefäße	Safe-Lock Tubes (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf
Pipetten	Eppendorf Research (2,5–1000 µl)	Eppendorf
Inkubator	CB 150	Binder
Sterilwerkbank	Safeflow 1.2	Nunc
Zellkulturschale, wachstumsfördernd	60.1 cm²	TPP
Zentrifuge	Multifuge 1S-R	Heraeus
Schüttler	Vortex Genie 2	Scientific-Industries
Röhrchen	Cellstar – 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One
Zellzählungsgerät	TC20 Automated Cell Counter	Bio-Rad

2.1.2.1 Kultivierungsmedien

Tabelle 2: Kultivierungsmedium undifferenzierter Zellen (“Kultivierungsmedium“)

Produkt	Hersteller
DMEM (Dulbecco´s modified eagle medium)	Gibco (Thermo Fisher Scientific)
FCS superior (fetales Kälberserum)	PAN Biotech
Cellshield	Minerva Biolabs GmbH

NEA (non-essential amino acids)	Biochrom GmbH
LIF (ESGRO) (Leukemia Inhibitory Factor)	Chemicon
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich

Tabelle 3: Kultivierungsmedium differenzierter Zellen („Differenzierungsmedium“)

Produkt	**Hersteller**
Iscove´s Modified Eagle Medium	Sigma Aldrich
FCS superior (fetales Kälberserum)	PAN Biotech
Cellshield	Minerva Biolabs GmbH
NEA (non-essential amino acids)	Biochrom GmbH
Ascorbinsäure	Sigma Aldrich

2.1.3 Standard- und Pufferlösungen

Tabelle 4: Liste der verwendeten Standard- und Pufferlösungen

Pufferlösung	**Zusammensetzung**
PBS (PAN- Biotech)	70mM NaCl 1,5 mM KCl 4 mM Na_2HPO_4 x $2H_2O$ 1 mM KH_2PO_4 pH 7,4
PBS / 2 mM EDTA	PBS (PAN-Biotech) 0,4% 0,5 M EDTA (Life Technologies) pH 8,0

2.1.4 Tierexperimente

2.1.4.1 Operationsgeräte und -materialien

Tabelle 5: Liste der verwendeten Operationsgeräte und -materialien

Produkt	**Typ**	**Hersteller**
Operationstisch	HI1220	Leica
Operationsmikroskop	OPM 241 F	Carl Zeiss
Kleintierbeatmungsgerät	Minivent Typ 845	Hugo Sachs
Feine Pinzette	gerade; 5-Inox	Dumont

Mikroskopierpinzetten	gebogen; 130 mm	AESCULAP
Feine Schere	La Grange; gezähnt; 110mm	AESCULAP
Mikrofederschere mit Flachgriff	NOYES; 125 mm	AESCULAP
Mikrofederschere mit Flachgriff	VANNAS; 85 mm	AESCULAP
Nadelhalter	Masing; 130 mm	AESCULAP
Wundspreizer	Logan; 50 mm	AESCULAP
Chirurgische Schere	Standardmodell; 145 mm	AESCULAP
Nahtmaterial	8-0 Prolene; nicht resorbierbar 2-0 PDS II; resorbierbar 5-0 Safil; resorbierbar	Ethicon Ethicon B. Braun
Venenverweilkanüle	Vasofix; 22 Gauge	B. Braun
Spritzen	1 ml Spritzen; Typ Omnifix 2 ml Spritzen 10 ml Spritzen	B. Braun Becton Dickinson Discardit Becton Dickinson Discardit
Steriles Skalpell	160 mm	Dahlhausen
Einmalrasierer	einschneidig	Med Comfort
Schlauchkatheter	Typ Polythene Tubing (0,28 mm Innendurchmesser; 0,61 mm Außendurchmesser), 15 cm lang	Smiths Medical

2.1.4.2 Medikamente

Tabelle 6: Liste der verwendeten Medikamente

Medikament	**Hersteller**
Bepanthen Augensalbe	Bayer
Braunol – Lösung	B. Braun
Isufluran (Forene)	Abott
Ketamin 10%	Pharmanovo
Xylazin (Rompun 2%)	Bayer
Fentanyl	Janssen
Metamizol-Tropfen	Ratiopharm

Isotone Kochsalzlösung (NaCl 0,9%)	B. Braun

2.1.4.3 Bildgebende Untersuchungen:

Tabelle 7: Liste der verwendeten bildgebenden Untersuchungen

Produkt	Typ	Hersteller
Kleintier – PET/CT	Inveon MM-PET/CT	Siemens Medical Solutions
Kleintier – MRT	BioSpec 70/30, 7.0 Tesla, Max. Gradienten stärke 440mT/m	Bruker BioSpin GmbH

2.1.5 Histologische Aufbereitung

Tabelle 8: Liste der verwendeten Materialien für die histologische Aufbereitung

Produkt	Typ	Hersteller
Kryostat	CM 1900	Leica
Objektträger	Glas, 76x26x1 mm	Marienfeld
Deckglässchen	Menzel Gläser; 24x50 mm	Thermo-Scientific
Nagellack	Top Coat-transparent	Rival de Loop
Hydrophobischer Stift	PAP pen 1 unit	Abcam

2.1.6 Auswertung

2.1.6.1 Histologie

Tabelle 9: Liste der verwendeten Materialen zur Auswertung der histologischen Präparate

Produkt	Typ	Hersteller
Mikroskop	MZ 12.5	Leica
Mikroskopkamera	DFC 420c	Leica
Computer	Workstation xw4400	HP
Fluoreszenzmikroskop (Konfokales Laser Scanning Mikroskop)	ELYRA PS.1 LSM 780	Carl Zeiss

2.1.6.2 Softwares

Tabelle 10: Liste der verwendeten Softwares

Softwares	Typ	Hersteller
Statistik-Software	SigmaPlot 13.0	Systat Software
Schreib-Software	Office 2019	Microsoft
Literaturverwaltungs-Software	Citavi 6	Swiss Academic Software
Mikroskop-Software	Leica Application	Leica
Auswertung der Mikroskop-Aufnahmen	Fiji Imaging Software (Image J)	National Institutes of Health (Wayne Rasband)
Planimetrie-Software	Axio Vision LE Rel. 4.5	Carl Zeiss
PET/CT-Auswertungs-Software	Carimas 2.1	Turku PET Centre
PET/CT-Bildgebungs-Software	Inveon Research Workplace 4.2	Siemens
MRT-Auswertungs-Software	Segment v3.1	Medviso

2.1.7 Allgemeine Chemikalien und Antikörper

Tabelle 11: Liste der verwendeten allgemeinen Chemikalien und Antikörper

Produkt	Hersteller
Trypanblau-Farbstoff	Sigma-Aldrich
(^{18}F) – Fluordesoxyglucose	Nuklearmedizin Universitätsmedizin Rostock
Braunol – Lösung	B. Braun
Sterilium	Bode Chemie
Esel-anti-Ziege Antikörper Alexa Fluor 488	Thermo Fischer Scientific
Esel-anti-Ziege Antikörper Alexa Fluor 568	Thermo Fischer Scientific
Antibody Diluent (Ak-Verdünnung)	Dako
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich
Hydrophober Stift	Dako
Peroxidase Block Puffer	Dako
Protein Block Puffer	Dako

Ziege-Anti-Biotin (SP-3000)	Vector Laboratories
Fluoroshield with DAPI (4´,6-diamidino-2-phenylindole)	Sigma
Formalin (Formaldehyd 4 %)	Roth
Ethanol absolut	Walter CMP GmbH
Xylol (Xylene)	J. T. Baker
Pertex (Schnelleindeckmittel)	Medite Medical GmbH
Matrigel (Growth Factor Reduced)	Corning Inc.
Tissue-Tek O.C.T. Compound	Sakura
Tomato Lektin (biotinyliert)	Vector Laboratories
Arbeitslösung („Sirius Red“):	
Siriusred F3BA	Chroma Waldeck GmbH
Pikrinsäure 1 %	UKR
Essigsäure 1 %	J.T. Baker
Arbeitslösung („Fast Green“):	
Fast Green FCF	Sigma-Aldrich
Pikrinsäure 1 %	UKR
Essigsäure 1%	J.T. Baker

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturmethoden

2.2.1.1 Kultivierung der Zellen

Gemäß den Standardprotokollen unserer Arbeitsgruppe wurden murine embryonale Stammzellen der Linie W4 kultiviert, die ursprünglich aus dem Mausstamm 129S6 isoliert wurden [76].

Die *mESCs* wurden in 75 cm² Zellkulturflaschen kultiviert, wobei ein speziell formuliertes W4-Kultivierungsmedium verwendet wurde, um die Pluripotenz zu erhalten. Dieses Medium bestand aus *DMEM* (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) ergänzt mit 15% *FCS superior* (fötales Kälberserum), 1% Zellschutz (Zellshield), 100 µM nicht-essenzielle Aminosäuren, 1000 U/ml *Leukemia Inhibitory Factor* (*LIF*), und 100 µM β-Mercaptoethanol. Die Kultivierung fand über zwei Tage bei einer Temperatur von 37 °C, einem CO_2-Gehalt von 5 %, einem Sauerstoffgehalt von 20 %, und einer Luftfeuchtigkeit von 90 % statt.

2.2.1.2 Differenzierung der Zellen

Die Differenzierung der W4-Stammzellen erfolgte über die Herstellung von *Embryoid Bodies* (*EBs*) [77]. Zu Beginn des Differenzierungsprozesses wurden die Zellen durch Absaugen des Mediums entfernt, mit PBS gewaschen und mit Trypsin für 5 Minuten bei 37 °C gelöst. Die Trypsin-Reaktion wurde durch die Zugabe von 5 ml Differenzierungsmedium gestoppt. Diese Zellsuspension wurde zentrifugiert, das entstandene Zellpellet resuspendiert und mit Differenzierungsmedium auf 20.000 Zellen/ml verdünnt.

Nachfolgend wurden die Zellen mit einer 12-Kanal-Pipette als "hängende Tropfen" auf den Deckel einer Zellkulturschale pipettiert, wobei insgesamt 180 hängende Tropfen mit jeweils 400 Zellen pro Tropfen erzeugt wurden. Um ein Austrocknen der Tropfen zu verhindern wurde der Boden der Schale mit Wasser und *DMEM* befüllt. Die Zellen wurden dann über einen Zeitraum von drei Tagen bei 37 °C, 5% CO2, und 20% O2 inkubiert. Hierbei aggregierten die Zellen unter dem Einfluss der Schwerkraft zu *EBs*.

Am dritten Tag wurden die *EBs* abgehangen und in eine ungelatinierte Petrischale überführt. Die Kultivierung erfolgte für weitere drei Tage bei 37 °C. Zwischen dem vierten und sechsten Tag wurden die *EBs* regelmäßig durch Auf- und Abpipettieren von der Schale gelöst, um ein Anhaften am Boden zu verhindern. Am sechsten Tag der Differenzierung wurden die Zellen geerntet und für die Transplantation vorbereitet. Abbildung 3 zeigt ein *EB* am sechsten Tag des Differenzierungsprozesses. Diese Zellen werden im Folgenden als *Cardiac induced cells* – (*CiC*) bezeichnet [9]. .

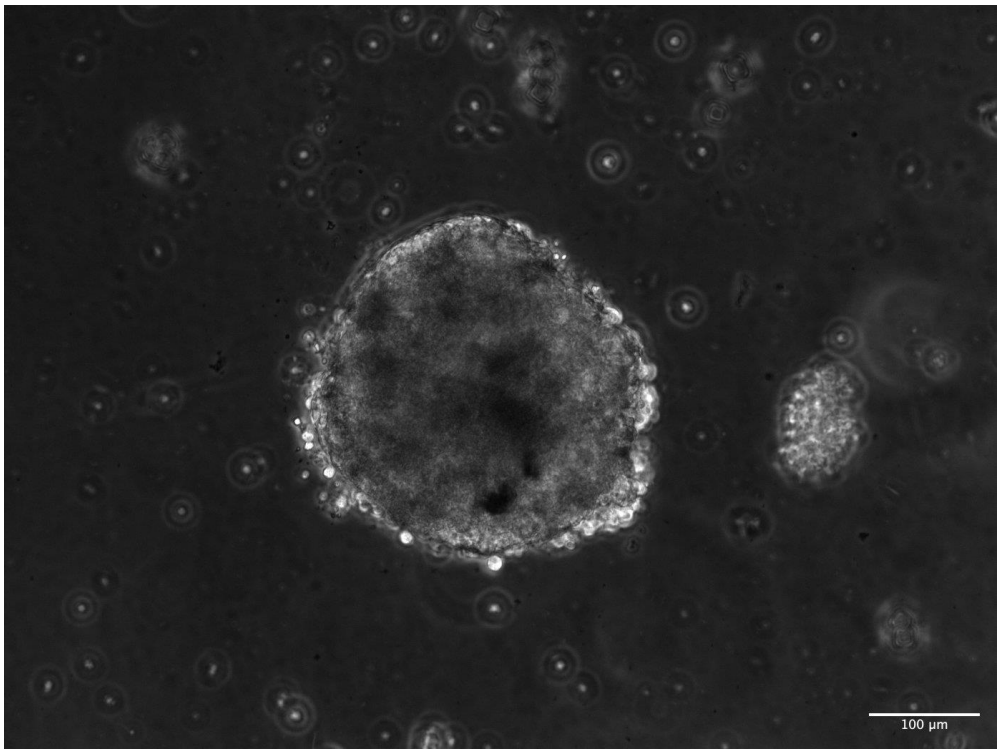


Abb. 3: „Embryoid Body" an Tag 6 des Differenzierungsprotokolls.

Mikroskopische Aufnahme eines dreidimensionalen Aggregates der mESCs, welches sich in der „hanging drop"-Differenzierung formiert. Der Messbalken entspricht einer Länge von 100 µm.

2.2.2 Tiermodell und Tierhaltung

Die Experimente dieser Studie wurden alle vom Bundesausschuss für Tierschutz des Landesamtes für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern (**LALLF M-V/TSD/7221.3–1.1–054/15**) genehmigt und in Übereinstimmung mit den ARRIVE-Richtlinien durchgeführt. Die verwendeten Tiere, 22 weibliche Mäuse des Stammes 129S6/SvEvTac im Alter von 14 bis 20 Wochen, stammten aus eigener Zucht der Core Facility Zentrale Versuchstierhaltung. Die Mäuse wurden unter pathogenfreien Bedingungen gehalten und hatten freien Zugang zu Wasser und Standard-Labornahrung. Um optimale Bedingungen für die Tiere zu gewährleisten, wurden die Tiere zum gesamten Studienzeitraum unter konstanten Temperatur-, Luftfeuchtigkeits- und Luftdruckverhältnissen gehalten.

2.2.2.1 Infarktinduzierung und Zelltransplantation

Für die Operation wurden die Mäuse durch intraperitoneale Verabreichung von Pentobarbital-Natrium (50 mg/kg Körpergewicht) sowie subkutaner Injektion von Fentanyl (0,2 mg/kg) anästhesiert und intubiert. Zur Vermeidung einer Hypothermie wurden die Mäuse nach Verlust der Reflexe mittels Gewebeband auf einer Wärmeplatte (37 °C) fixiert. Um die Augen vor Austrocknung oder Verletzung zu schützen wurde eine Bepanthen® Augen- und Nasensalbe

angewendet. Bei vollständiger Narkose wurden die Tiere anschließend endotracheal mit einem 22-G Venenverweilkatheter intubiert. Die Beatmung wurde mittels eines Mouse-Ventilators Minivent Typ 845 (Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland) sichergestellt. Der operative Teil beginnt mit einer linkslateralen Thorakotomie zwischen dem dritten und vierten Rippenbogen. Die Spreizung der Thoraxöffnung wurde während des Eingriffs mit einem Retraktor gewährleistet. Für den nachfolgenden Teil der Operation wurde ein Operationsmikroskop mit 16 – 100facher Vergrößerung verwendet. Nach der Thorakotomie und Eröffnung des Herzbeutels führte eine dauerhafte Ligatur mit einer nicht-resorbierbaren 8-0 Prolene-Naht der linken absteigenden Vorderwandkoronararterie („left anterior descending artery“ - LAD) zu einem Myokardinfarkt des entsprechenden Areals. Es erfolgte eine Sichtkontrolle über das Ausbleichen des betroffenen Areals (Abbildung 4).

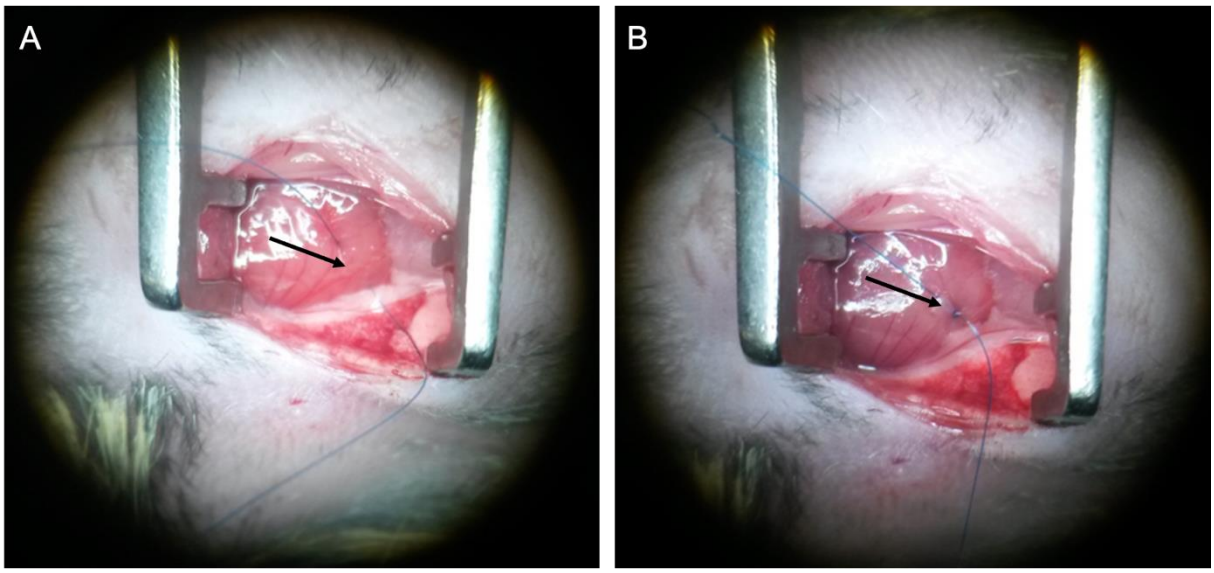


Abb. 4: Chirurgische Induktion des AMI mittels LAD-Ligatur.

***A**: Unterstechung der LAD mittels 8-0 Prolene-Faden vor Ligatur. **B**: Ligatur und somit Induktion des Myokardinfarktes im LAD-versorgten Areal. Pfeil: LAD. LAD = left anterior descending artery. (mit freundlicher Genehmigung von Dr. Ralf Gäbel)*

Anschließend wurden entweder 1×10^6 CiC in PBS (10 µL) und 10 µL Matrigel™ (MIC-Gruppe) oder nur Matrigel™ (MI-Gruppe) intramyokardial injiziert. Vier separate Injektionen von je 4×5 µl wurden entlang der Grenzzone des Infarktes durchgeführt. Die Injektionsstelle wurde zum Zeitpunkt der Transplantation visuell kontrolliert (Abbildung 5).

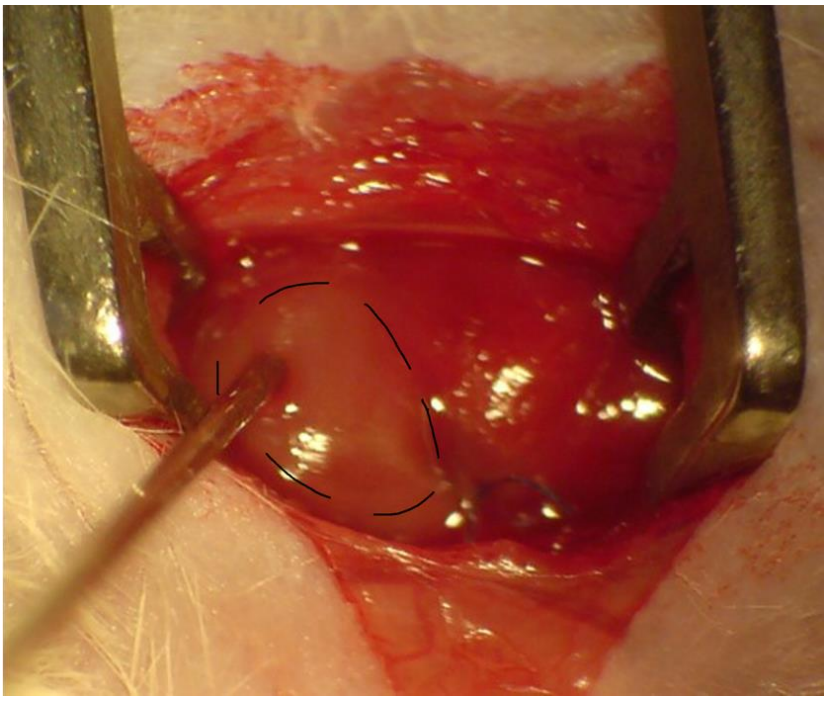


Abb. 5: Transplantation der CiCs in die Peri-Infarkzone.

Intramyokardiale Applikation der „Cardiac induced Cells" in die Randzone des Infarktes. Gestrichelte Linie: Infarktgrenze. (mit freundlicher Genehmigung von Dr. Ralf Gäbel)

Vor Beendigung der Operation wurde die Pleurahöhle durch kurzzeitige Überdruckbeatmung der Lungen entlüftet und anschließend der Thorax mit einer 2-0 PDS-Naht verschlossen. Die Brustmuskulatur sowie die Haut wurden mit einer 5-0 Safil Naht wieder verschlossen.

2.2.3 Multimodale Bildgebung

2.2.3.1 Positronen-Emissions-Tomographie/ Computertomographie (PET/CT)

17 Tage nach Induktion des Infarktes wurde eine FDG-PET mit einem Kleintier-PET/CT-Scanner (Inveon MM-PET/CT, Siemens Medical Solutions, Knoxville, TN, USA) durchgeführt. Für den Scan wurden die Mäuse durch Inhalation von Isofluran (2,5% zur Einleitung und 1% bis 2,5% zur Aufrechterhaltung während der Vorbereitung und des Scannens) anästhesiert. Alle PET/CT-Scans wurden gemäß einem Standardprotokoll durchgeführt: Eine Dosis von 13,21 MBq ± 4,94 MBq [18F] FDG wurde über die Schwanzvene der Mäuse mittels eines speziell hergestellten Mikrokatheters injiziert. Nach einer 60-minütigen Aufnahmezeit des Tracers, wurde der PET/CT-Scan für 20 Minuten in Bauchlage durchgeführt. Die Atmung der Mäuse wurde kontrolliert, und die Körpertemperatur wurde mit einer Infrarot-Heizlampe während des Verfahrens aufrechterhalten.

Für die Rekonstruktion der CT-Bilder wurde ein Feldkamp-Algorithmus verwendet. Die PET-Bilder wurden mit dem dreidimensionalen (3D) iterativen Rekonstruktionsalgorithmus der

geordneten Teilmengenerwartungsmaximierung (3D-OSEM/OP-MAP) unter Verwendung der folgenden Parameter rekonstruiert: 4 Iterationen (OSEM), 32 Iterationen (MAP), eine Zielauflösung von 1,7 mm und eine Matrixgröße von 128×128. Die Rekonstruktion umfasste Korrekturen für zufällige Koinzidenzen, Ausfallzeiten, Absorption, Streuung und radioaktiven Zerfall [9].

2.2.3.2 Auswertung der PET/CT-Aufnahmen

Für die PET-Bildanalyse wurden PET-Bilder von Bq/ml in %ID (prozentualer Anteil der injizierten Dosis) mithilfe von PMOD v4.4 umgewandelt. Die Daten wurde mit der Software Carimas 2.10 (Turku PET Centre, Turku, Finnland) gemäß der Anleitung des Entwicklers ausgewertet. Zunächst werden die Ausrichtung und die Achse mittels der Software bestimmt. Anschließend wird das Herz segmentiert und die epikardialen sowie endokardialen Grenzen des linken Ventrikels (LV) bestimmt. Damit wird die Grundlage der 2-dimensionalen (2D) Darstellung des LV in einer *Polar Map* generiert (siehe Abbildung 6). Die Ergebnisse werden unter Verwendung einer standardisierten myokardialen Segmentierung in 17 Segmente präsentiert. Durch die 2D-Darstellung des LV, wird die Bestimmung des Ausmaßes des metabolischen Defektes möglich. Die Größe des metabolischen Defekts wurde als Bereich definiert, der weniger als 50% der maximalen %ID beträgt [78].

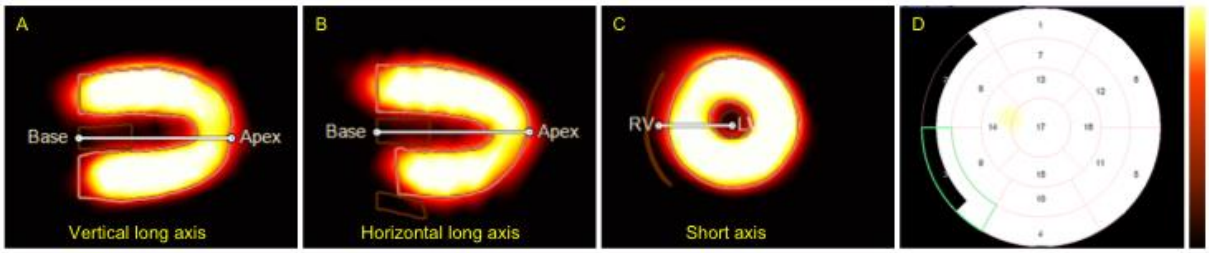


Abb. 6: Generierung einer Polar Map mit FDG-PET Daten einer gesunden Maus.

***A-C**: Segmentierung des linken Ventrikels mit Carimas. Darstellung der horizontalen und vertikalen langen Achse und der kurzen Achse eines gesunden Herzens. Es sind die endo- und epikardialen Grenzen des LV mithilfe der Software bestimmt worden. **D**: Der gesamte linke Ventrikel wird zweidimensional mit dem 17-Segment-Modell (AHA) kartiert. Das zentrale Segment 17 entspricht dabei dem Apex. Es zeigt sich eine homogene Aktivität des Tracers im gesamten Ventrikel. Dies spricht dafür, dass kein metabolischer Defekt vorliegt. Die Skala reicht von 20 bis 40 %ID/ml (Prozent der injizierten Dosis pro Milliliter). RV= Rechter Ventrikel, LV= Linker Ventrikel, Base=Herzbasis, Apex= Herzspitze.*

2.2.3.3 Kardiale Magnetresonanztomographie (*CMR*)

Die *CMR* - Messungen wurden 21 Tage nach LAD-Ligatur auf einem 7-Tesla-Kleintier-MRT-System (BioSpec 70/30, maximale Gradientenstärke 440 mT/m, Bruker BioSpin GmbH,

Ettlingen, Deutschland) durchgeführt. Das MRT-System war mit einer 1H-Sendevolumenspule (86 mm, Volumenresonator) und einem 2-mal-2 Empfangsflächenspulenarray (beides Bruker BioSpin GmbH) ausgestattet. Die Mäuse wurden unter Verwendung von 2% bis 3,5% Isofluran in Sauerstoff anästhesiert und in Rückenlage auf einem speziellen Mäusebett platziert, wobei die Oberflächenspule auf die Brust der Maus gelegt wurde.
Die Atemfrequenz (35 bis 55 Atemzüge pro Minute) und die Körpertemperatur der Mäuse wurden kontinuierlich mit einem MRT-kompatiblen Kleintierüberwachungs- und Gating-System (Modell 1030, SA Instruments, Inc., Stony Brook, NY, USA) überwacht. Die Körpertemperatur der Tiere wurde während des gesamten Scans durch eine mit Wasser gefüllte Heizmatte aufrechterhalten. Die Überwachung der Temperatur der mit Wasser gefüllten Heizmatte, erfolgte mittels eines Wasserbads mit Tauchumwälzpumpe (HAAKE SC 100 und HAAKE S5P, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland). Nach der Sequenzplanung wurden für die Ansicht der Kurzachsenabschnitte abschließende Bilder der linksventrikulären Auswurffraktion (LVEF) mit einer IntraGate-Gradientenecho-Cine-Sequenz (IntraGate Cine-FLASH) in sechs Kurzachsen-Ebenen erworben, die die gesamte linke Herzkammer vollständig abdecken. Die Erfassungsparameter umfassten: Echozeit (TE) 2,38 ms, Repetitionszeit (TR) 5,89 ms, Flipwinkel 15°, 14 Bilder pro Herzzyklus, Oversampling 140, Mittelung 1, Bildfeld (FOV) 29,4×25,2 mm, Matrixgröße 211×180, Auflösung in der Ebene 0,14×0,14 mm, Schichtdicke 1 mm und Scanzeit pro Schicht 2 Minuten. Die mittleren Herzfrequenzen während des Scans betrugen 344,8 ± 24,6 Schläge/min in der Zelltherapiegruppe und 353,0 ± 14,3 Schläge/min in der MI-Gruppe, wobei zwischen den Gruppen kein signifikanter Unterschied festgestellt wurde ($p = 0,38$).

2.2.3.4 Auswertung der Kardialen Magnetresonanztomographie-Aufnahmen

Die kardiale Funktion und Morphologie wurden aus den Cine-Sequenzen mit der frei verfügbaren Software Segment v4.0 R11044b (http://segment.heiberg.se) ausgewertet.
Die Segmentierung des linken Ventrikels wurde manuell durchgeführt. Papillarmuskeln wurden bei der Definition der endo- und epikardialen Grenzen ausgeschlossen. Die Definition von Enddiastole und Endsystole wurde von der Software berechnet. Nach manueller LV-Segmentierung berechnete die Software automatisch das enddiastolische Volumen (EDV), das endsystolische Volumen (ESV), die linksventrikuläre Auswurffraktion (LVEF), das Schlagvolumen (SV) und die linksventrikuläre Masse (LVM). Die Dicke des interventrikulären Septums (IVSd), die linksventrikuläre enddiastolische Dimension (LVEDD) und die Dicke der lateralen Wand (LW) wurden aus dem entsprechenden enddiastolischen mittventrikulären Schnitt erhalten. Die regionale Wandanalyse wurde auf Basis der einzelnen Schnitte gemäß der Benutzeranleitung durchgeführt. Der linke Ventrikel wurde dabei von fünf Kurzachsschnitten von basal (1) bis apikal (5) abgedeckt. Jeder Schnitt wurde in 6 Segmente unterteilt. Die qualitative Analyse durch sog. *Bullseye* - Diagramme zeigte, dass sich die Narbe typischerweise von Schnitt 3 bis

5 erstreckte. Daher wurden diese drei Schnitte in die quantitative regionale Wandanalyse einbezogen. Dabei untersuchten wir sowohl die regionale mittlere Wanddicke als auch die Veränderung der Wanddicke (Wandverdickung) während eines Herzzyklus. Das Septum repräsentiert infarktfernes Areal und entspricht den Segmenten 1 und 6 (septal). Die lateralen Segmente 3 und 4 entsprechen dem infarzierten Myokardareal. Multiplan-Quantifizierungsanalysen der jeweiligen septalen und lateralen Sektoren wurden, wie in Abbildung 7 visualisiert durchgeführt. Der primäre Endpunkt war die LVEF, die durch die kardiale MRT bestimmt wurde [67].

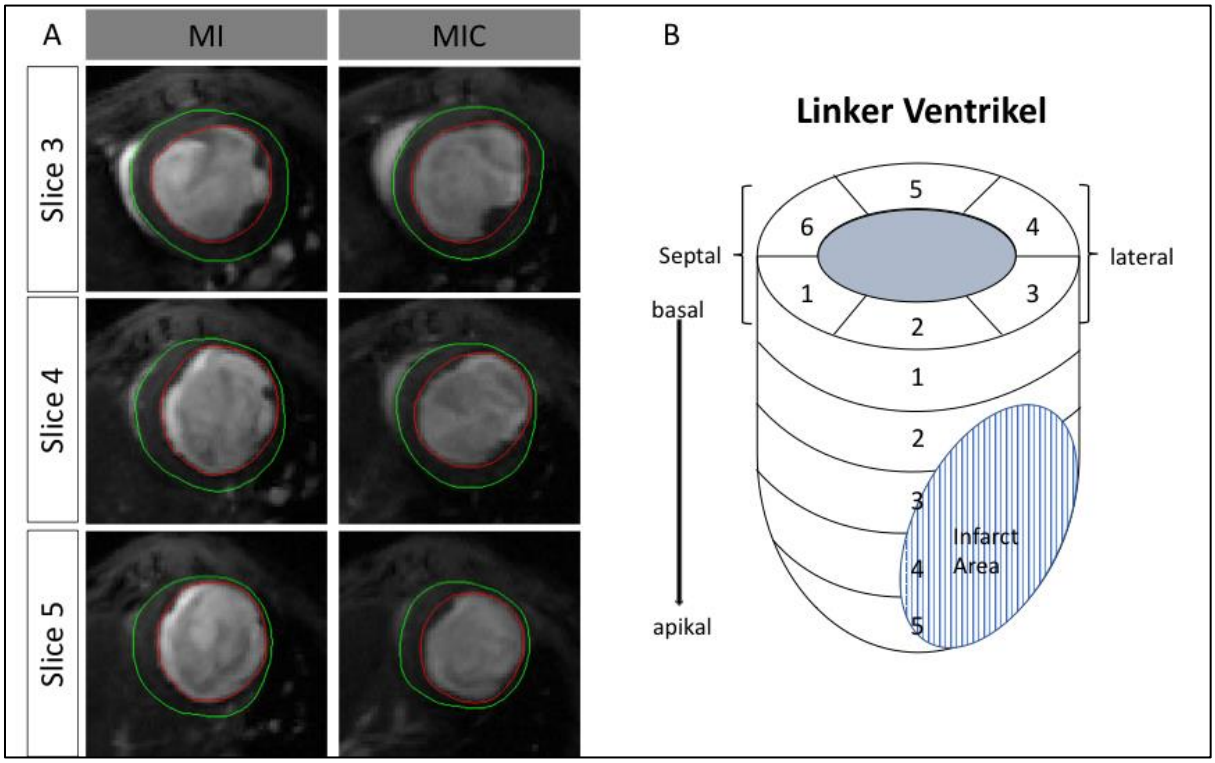


Abb. 7: Visualisierung der Auswertung der CMR-Aufnahmen.

***A**: Repräsentative CMR-Kurzachsen-Aufnahmen der Ebenen 3-5 der beiden Studiengruppen. Die Narbe erstreckt sich typischerweise von Ebene 3 bis 5. **B**: Schematische Zeichnung der multisegmentalen Gliederung des linken Ventrikels. Alle 5 Ebenen in der kurzen Achse, werden in 6 Segmente gegliedert. Die Segmente 1 und 6 entsprechen dem Septum. Die laterale Wand wird abgebildet durch die Segmente 3 und 4.*

2.2.4 Histologische Aufarbeitung

2.2.4.1 Vorbereitung und Durchführung der Herzentnahme

Die Entnahme des Herzens erfolgte am 21. Tag nach *LAD*-Ligatur, unmittelbar nach der kardialen Magnetresonanztomographie. Es erfolgte die Euthanasie mittels zervikaler Dislokation unter Narkose. Nach sachgerechter Lagerung und Fixierung des Tieres erfolgte die

vollständige Eröffnung des Brustkorbs mit einer Schere. Mit einer Pinzette wurde die Basis des Herzens mobilisiert und mittels einer feinen Schere abgetrennt. Die Entnahme des gesamten Herzens erfolgte unter größtmöglicher Schonung des Gewebes, um entnahmebedingte Artefakte wie Blutungen oder Gewebequetschungen zu minimieren. Anschließend wurde das Herz mit isotonischer Natriumchloridlösung gesäubert, in Tissue-Tek® eingebettet, auf einem Kryostat-Probenhalter platziert und schockgefroren. Die eingebetteten Herzen wurden für die weitere histologische Aufarbeitung in einem Gefrierschrank bei -80 °C aufbewahrt.

2.2.4.2 Verarbeitung der Proben zur histologischen Aufarbeitung und Färbung

Die gefrorenen Herzen wurden in vier axiale Ebenen von apikal nach basal unterteilt. Wie in Abbildung 8 gezeigt, wurde ein Abstand von 600 µm zwischen den Ebenen eingehalten, um eine eindeutige Trennung dieser sicherzustellen. In jeder Ebene wurden mit einem Kryo-Mikrotom axiale Gewebeschnitte von 6 µm Dicke angefertigt und anschließend auf einen Objektträger übertragen. Für die Auswertung wurden Herzschnitte aus zwei benachbarten Ebenen verwendet, um die Verhältnisse des Infarktes so präzise wie möglich darzustellen.

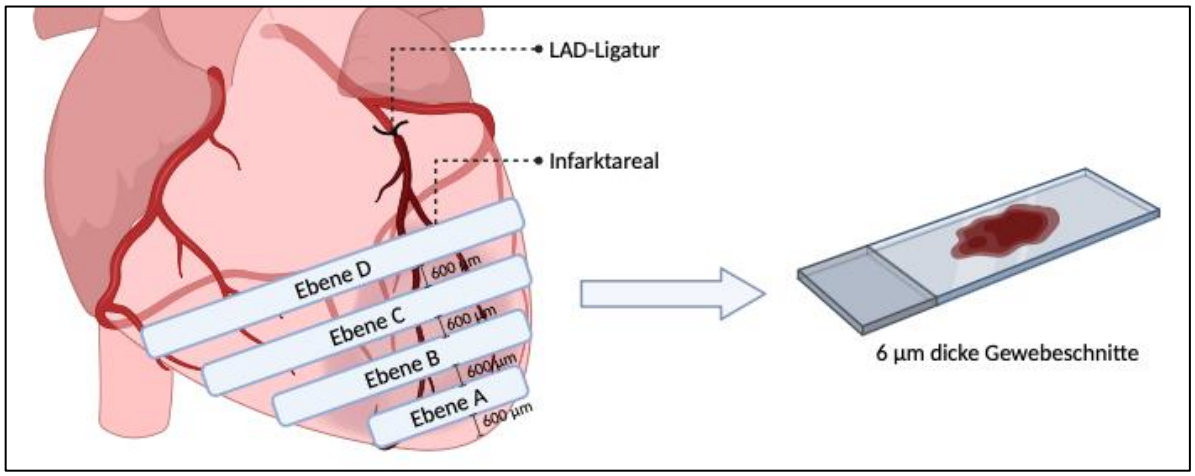


Abb. 8: Schematische Darstellung des Infarktareals und der histologischen Schnittebenen.

Darstellung der axialen Schnittebenen A-D (von apikal nach basal). Der Abstand zwischen den Ebenen beträgt 600 µm. Die Gewebeschnitt wurde mit einer Dicke von 6 µm angefertigt. Erstellt mit BioRender.com.

2.2.5 Bestimmung der Narbengröße

2.2.5.1 Kollagenfärbung

Für die Bestimmung der Narbengröße wurden die Herzgewebeschnitte mit *Sirius Red* und *Fast Green* Arbeitslösungen gefärbt. Da *Sirius Red* selektiv an Kollagenfasern bindet und diese charakteristisch für Narbengewebe sind, ermöglicht die Färbung die optimale Visualisierung des fibrotischen Gewebes. Um das geschädigte Myokard vom gesunden zu differenzieren, wurde zusätzlich *Fast Green* genutzt [79].

Bevor die Gewebeschnitte gefärbt wurden, wurden sie in einer 10 %igen Formalinlösung fixiert und mit destilliertem Wasser abgespült. Anschließend wurden die Schnitte drei Minuten lang in die *Sirius Red*-Arbeitslösung getaucht und für die Darstellung des gesunden Myokards 30 Minuten lang in der Fast Green-Arbeitslösung inkubiert. Darauffolgend wurden die Schnitte mittels einer ansteigenden Alkoholreihe dehydratisiert und mit Pertex abgedeckt. Zuletzt mussten die Schnitte trocknen und konnten dann mit einem Deckglas und Nagellack hermetisch abgedichtet werden.

2.2.5.2 Auswertung

Aus jeder axialen Ebene wurde ein mit *Sirius Red / Fast Green* gefärbter Schnitt ausgewertet. Die Bilder der gefärbten Schnitte wurden mithilfe der computergestützten Planimetrie-Software Axio Vision LE Rel. 4.5 aufgenommen. Im Anschluss wurde die Bildbearbeitungssoftware Fiji (Ver. 2.90) genutzt, um die *Sirius Red*- und *Fast Green*-positiven Areale auszuwerten [80]. Die relative fibrotische Fläche wurde in zwei benachbarten Ebenen quantifiziert, indem der prozentuale Anteil der *Sirius Red*-positiven Fläche zur Gesamtfläche des linken Ventrikels bestimmt wurde. Neben der flächenmaß-basierten Analyse der Narbengröße wendeten wir die von Takagawa *et al.* beschriebene längenmaß-basierte Messmethode an. Dabei wurde die Mittellinie zwischen Epikard- und Endokardoberfläche, genutzt, um den relativen Anteil der Narbe am Gesamtumfang des LV in zwei benachbarten Ebenen zu bestimmen (Siehe Abbildung 9) [70].

Die Größe der Narbe im LV wurde in beiden Verfahren schließlich durch die Berechnung des Mittelwertes der Kollagenanteile aus diesen beiden repräsentativen Ebenen ermittelt.

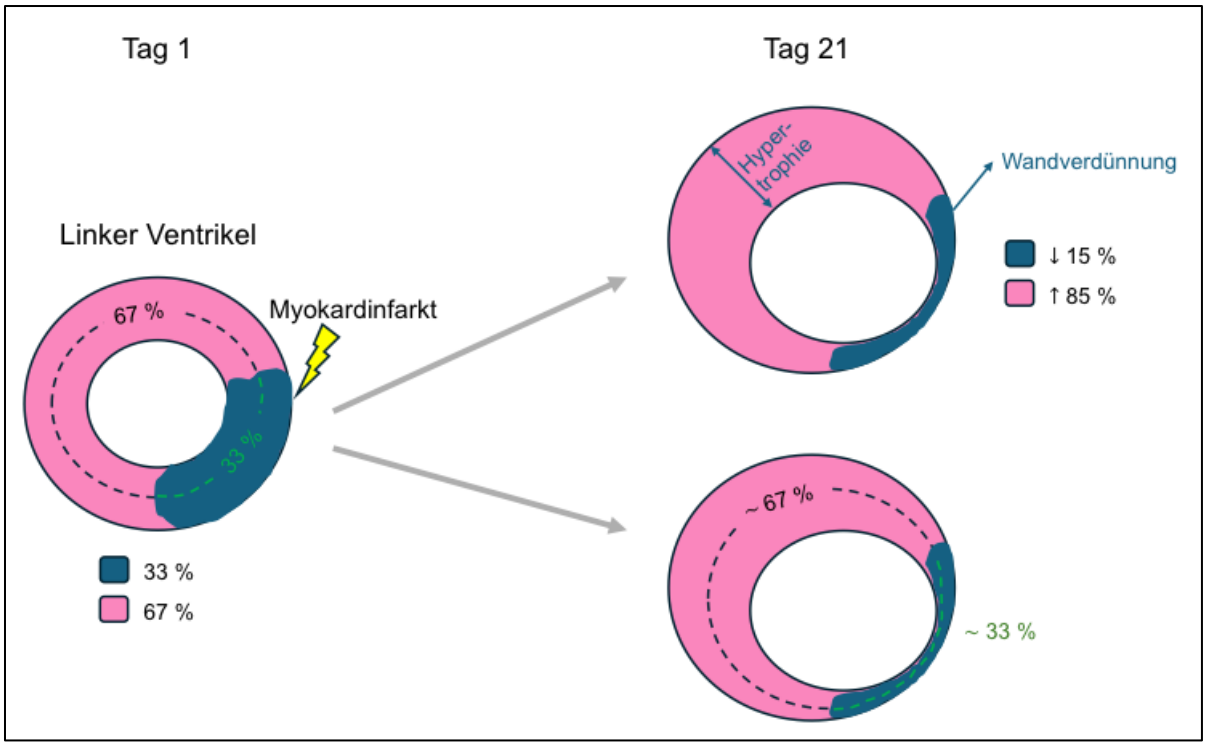


Abb. 9: Schematische Darstellung der beiden histologischen Messmethoden für die Bestimmung der Narbengröße.

Dargestellt ist der Linke Ventrikel (LV) im Transversalschnitt mit einem transmuralen akuten Myokardinfarkt (AMI). Gesundes Myokard ist rosa und infarziertes Gewebe dunkler dargestellt. ***Linke Seite****: Am Tag des AMI wird in der flächen- und in der längenmaß-basierten Methode die gleiche Narbengröße (33 % des gesamten LV) ermittelt.* ***Rechte Seite****: 21 Tage nach AMI zeigen sich eine Erweiterung der Ventrikelkammer, eine Hypertrophie des infarktfernen Myokards sowie eine deutliche Wandverdünnung im Bereich der Infarktnarbe.* ***Oben rechts:*** *Aufgrund der veränderten Größenverhältnisse des LV drei Wochen nach dem AMI, nimmt die infarzierte Fläche einen deutlich geringeren relativen Anteil der Gesamtfläche des LV ein. Dies führt zu einer verzerrten und fälschlich kleineren Darstellung der ursprünglichen Infarktgröße.* ***Unten rechts****: Die längenmaß-basierte Messung der Narbengröße bleibt von der Hypertrophie und der Verdünnung der Ventrikelwand weitgehend unbeeinflusst und spiegelt das Ausmaß des Infarktes näher an den ursprünglichen Verhältnissen wider.*

2.2.6 Bestimmung der Kapillardichte

2.2.6.1 Immunfärbung

Bevor die Herzen entnommen wurden, wurde ein speziell angefertigter Katheter in die Schwanzvene der Maus gelegt und 100 µg/100 µl biotinyliertes Lycopersicon esculentum bzw. *Tomato-Lektin* (Vector Laboratories, Burlingame, USA) injiziert [81]. *Tomato-Lektin* ist ein Kohlenhydrat-bindendes Protein, das spezifisch Poly-N-Acetyl-Lactosamin-Reste erkennt, die sich auf der Plasmamembran endothelialer Zellen befinden (siehe Abbildung 10) [82]. Dies ermöglicht die fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Kapillaren des linken Ventrikels.

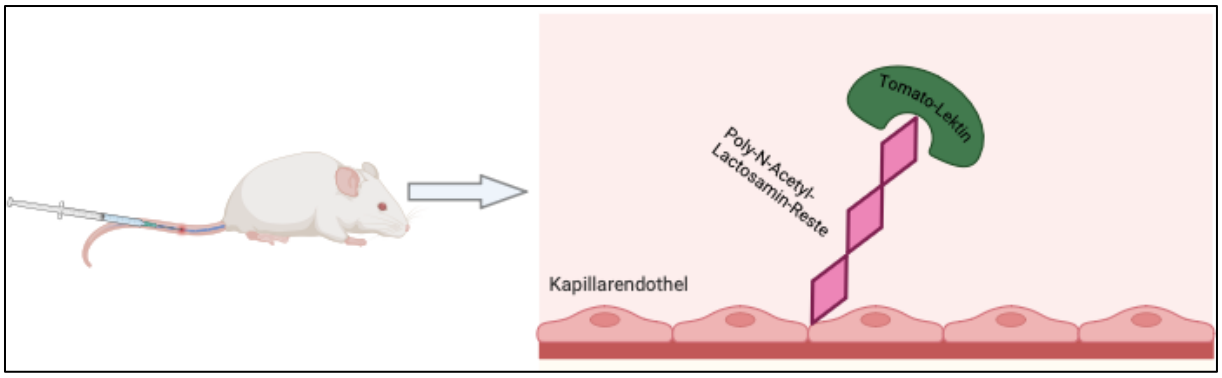


Abb. 10: Injektion von Tomato-Lectin und dessen Bindung an das Kapillarendothel.

Schematische Darstellung der intravenösen Injektion des Tomato-Lektins in die Schwanzvene der Maus. Die Bindung erfolgt an Poly-N-Acetyl-Lactosamin-Reste an der Oberfläche des Kapillarendothels. Erstellt mit BioRender.com.

Zunächst wurden die histologischen Schnitte für zehn Minuten mit 2% Paraformaldehyd fixiert. Um unspezifische Bindungen zu reduzieren, wurde DAKO-Protein und Peroxidase Blockierung hinzugefügt. Nach Säuberung mit destilliertem Wasser wurde das Tomato-Lektin in den endothelialen Zellen durch einen polyklonalen Ziegen-Anti-Biotin-Primärantikörper markiert. Die Proben wurden anschließend für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert und über Nacht bei 4 °C gelagert. Am Folgetag wurden die Proben für 2 Stunden bei 37 °C mit AlexaFluor Esel-Anti-Ziege-Sekundärantikörper (Thermo Fisher Scientific) inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Gewebeschnitte auf Objektträger mit DAKO-Montagemedium mit DAPI fixiert. DAPI oder 4′,6-Diamidin-2-phenylindol ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der an doppelsträngige DNS (Desoxyribonukleinsäure) bindet und bei Anregung mit ultraviolettem Licht blau fluoresziert. Dies ermöglicht die Darstellung der Zellkerne in der Fluoreszenzmikroskopie.

2.2.6.2 Auswertung

Die Fluoreszenzbilder der Gewebeschnitte wurden mit einem konfokalen Bildgebungssystem (Zeiss ELYRA PS.1 LSM 780) unter Verwendung eines 20x/0,8 Objektivs aufgenommen. Zur computergestützten Quantifizierung der Kapillardichte im Infarktareal (lateral) sowie im infarktfernen Myokard (septal) wurde die Software Fiji (Version 2.90) eingesetzt [80]. In jedem Gewebeabschnitt wurden drei zufällig ausgewählte Felder sowohl lateral als auch septal mit einer Fläche von 0,2 mm² analysiert, wobei die Anzahl der Kapillaren in jedem Feld erfasst wurde. Insgesamt wurden sechs Felder pro Abschnitt untersucht. Die durchschnittliche Anzahl der Kapillaren pro 0,2 mm² wurde sowohl für das Infarktareal als auch das infarktferne Areal bestimmt. Zur optimalen Repräsentation der Infarktregion wurden zwei benachbarte axiale Ebenen des Herzens verwendet.

2.2.7 Statistische Analysen

Alle Daten in dieser Arbeit werden als Mittelwerte ± Standardabweichung (SD) dargestellt, sofern nicht anders angegeben. Die Normalität der Daten wurde durch den Shapiro-Wilk-Test überprüft und zeigte eine Normalverteilung. Der Student's t-Test wurde verwendet, um den statistischen Unterschied zwischen den Gruppen zu bewerten. Werte von $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet. Zur Veranschaulichung der Datenverteilung wurden Boxplots verwendet. Diese Darstellung zeigt die Medianwerte durch Boxen, die die Interquartilsbereich zwischen dem 25. und 75. Perzentil repräsentieren, während die Whisker die Maximal- und Minimalwerte außerhalb dieser Bereiche abbilden. Für die Untersuchung eines Zusammenhangs zweier Variablen wurde die Pearson-Produkt-Moment Korrelation verwendet. Die statistischen Analysen wurden mit SigmaPlot 13.0 durchgeführt.

2.2.8 Versuchsaufbau

Die Mäuse wurden in zwei Studiengruppen eingeteilt. Bei allen Tieren wurde, wie oben beschrieben, eine *LAD*-Ligatur sowie nachfolgend vier separate Injektionen entlang der Grenzzone des Infarktgebietes durchgeführt. Lediglich bei der „Myokardinfarkt + Zelltherapie (MIC)“ - Gruppe wurden *CiCs* appliziert. Anschließend an dieses Verfahren durchliefen die Mäuse ein longitudinales multimodales Bildgebungsmodell (siehe Abbildung 11). Die Bildgebungen fanden in beiden Gruppen zunächst 17 Tage (PET/CT) und dann 21 Tage (kardiales MRT) nach dem Myokardinfarkt statt. Die folgende Abbildung veranschaulicht das experimentelle Design der Studie, wie auch die Einteilung der Gruppen.

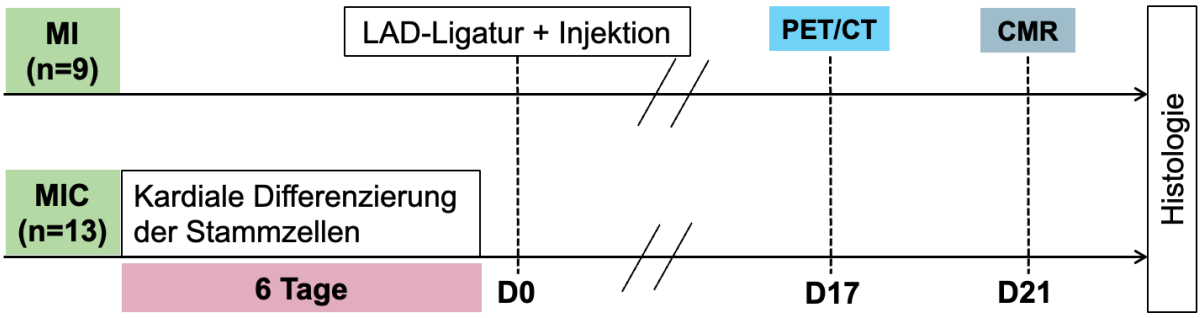


Abb. 11: Experimenteller Aufbau der Studie.

6 Tage vor LAD-Ligatur wurde die Differenzierung der mESCs zu CiCs initiiert. D0: LAD-Ligatur + Injektion mit oder ohne Stammzellen. Dadurch sind zwei Studiengruppen entstanden: 1. Zelltherapiegruppe (MIC) und 2. Kontrollgruppe (MI). D17: Durchführung der ^{18}FDG-PET/CT. D21: Durchführung der CMR, Euthanasie der Tiere und Entnahme der Herzen. Anschließend erfolgten die histologische Aufarbeitung und Untersuchung.

III. Ergebnisse

3.1 Auswirkung der Stammzelltherapie auf die Narbengröße

Direkt nach der MRT-Messung wurden die Herzen für die histologischen Untersuchungen entnommen. Um die Narbengröße möglichst genau zu bestimmen, wurde sowohl eine flächen- als auch umfangsbasierte Methode zur Bestimmung der Narbengröße verwendet [70]. Die *ex-vivo* Daten wurden anschließend durch *in-vivo* Daten ergänzt. Dazu wurden axiale MRT-Bilder, welche dem jeweiligen Level der histologischen Schnitte entsprachen (siehe Abbildung 12), nach dem gleichen Schema ausgewertet. In Bezug auf die flächenbasierte Bestimmung der Narbengrößen zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den magnetresonanztomographisch und den histologisch ermittelten Werten, mit einer durchschnittlichen Differenz von 8,7 Prozentpunkten ($p < 0{,}001$). Im Gegensatz dazu wiesen die umfangsbasierten Messungen der MRT- und histologischen Narbengrößen keinen signifikanten Unterschied auf ($p = 0{,}68$), wobei die durchschnittliche Größendifferenz lediglich 0,5 Prozentpunkte betrug. Hinsichtlich der beiden Versuchsgruppen zeigte sich drei Wochen nach Zelltransplantation keine statistisch signifikante Differenz der Narbengröße (flächenbasiert: Histologie: 10,4 % ± 3,4 % (MI) vs. 11,4 % ± 2,2 % (MIC) ($p = 0{,}42$); MRT: 20,4 % ± 7,9 % (MI) vs. 19,3 % ± 7,0 % (MIC) ($p = 0{,}73$); umfangs-basiert: Histologie: 25,0 % ± 5,2 % (MI) vs. 25,2 % ± 5,0 % (MIC) ($p = 0{,}93$); MRT: 24,6 % ± 7,7 % (MI) vs. 26,3 % ± 6,1 % (MIC) ($p = 0{,}55$)).

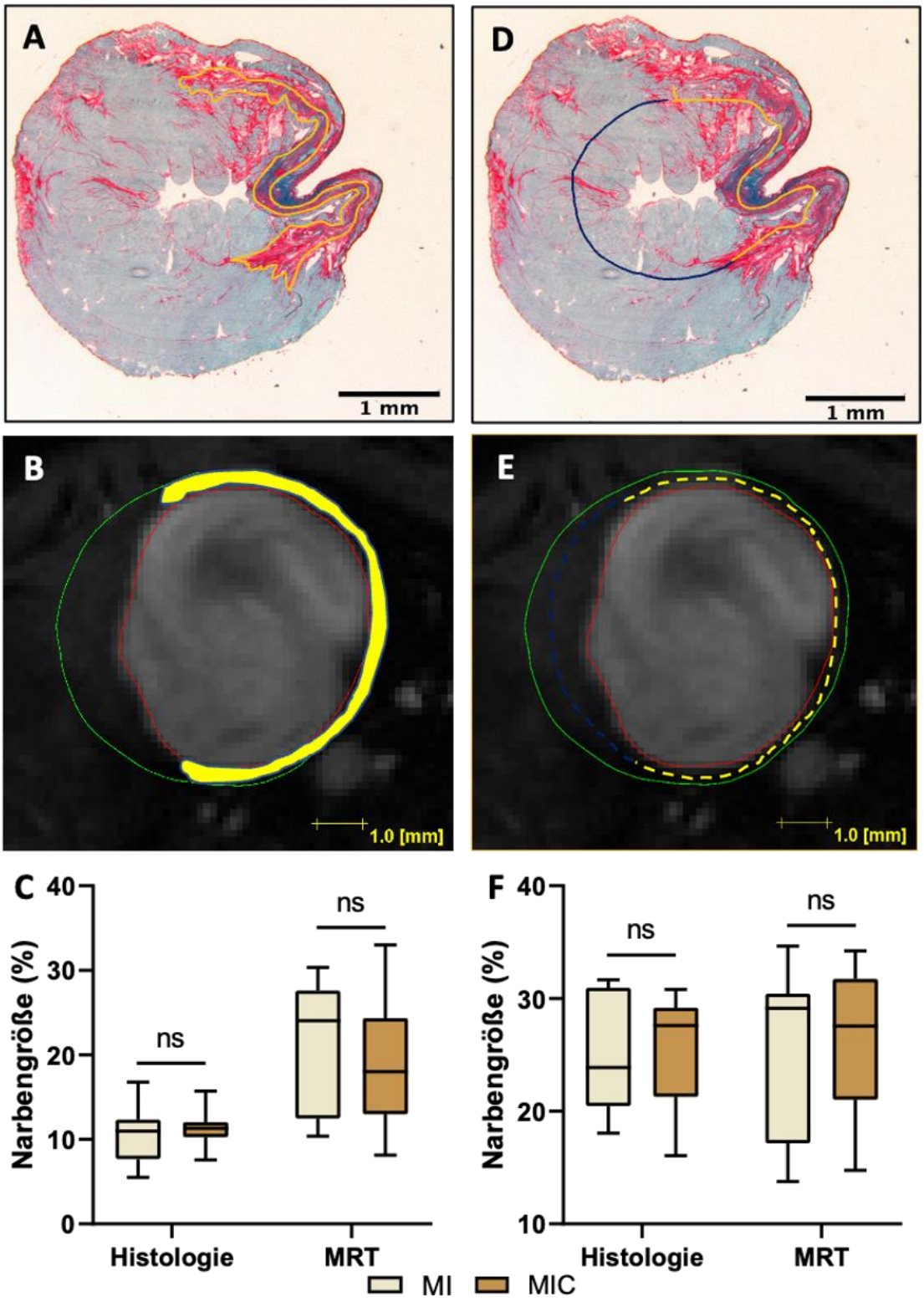


Abb. 12: Auswertung der Narbengröße.

Die Messungen der Narbengröße wurden sowohl histologisch (mit Fast Green- und Sirius Red-Färbung) als auch in den entsprechenden axialen Schnitten der MRT-Bilder durchgeführt. ***A–C*** *(linke Spalte): Flächenbasierte Messung und* ***D–F*** *(rechte Spalte): längenmaß-basierte Messung. Drei Wochen nach der LAD-Ligatur gab es keine Unterschiede in der Narbengröße zwischen den beiden Versuchsgruppen (MIC: n = 13; MI: n = 9).*

3.2 Kapillardichte des linken Ventrikels

Die Kapillardichte, ein Marker für die durch die Therapie verursachte Gefäßbildung, wurde sowohl im infarktfernen („Septum“) als auch im infarzierten („Infarkt“) Myokard quantifiziert. Durch die endotheliale Bindung des *Tomato-Lektins* ließen sich die Kapillaren des linken Ventrikels fluoreszenzmikroskopisch darstellen. Dies ist in Abbildung 14 repräsentativ veranschaulicht. Im Infarktbereich zeigt sich eine deutliche verminderte Kapillardichte gegenüber den infarktfernen Regionen. Die reduzierte Kapillardichte in der Infarktnarbe drei Wochen nach AMI deckt sich mit den Ergebnissen früherer Studien [4, 27, 73].

Im septalen Myokard, fernab des Infarktes, war die Kapillardichte signifikant höher als im Infarktareal. Drei Wochen nach AMI ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen in den jeweiligen Myokardarealen (siehe Abbildung 13).

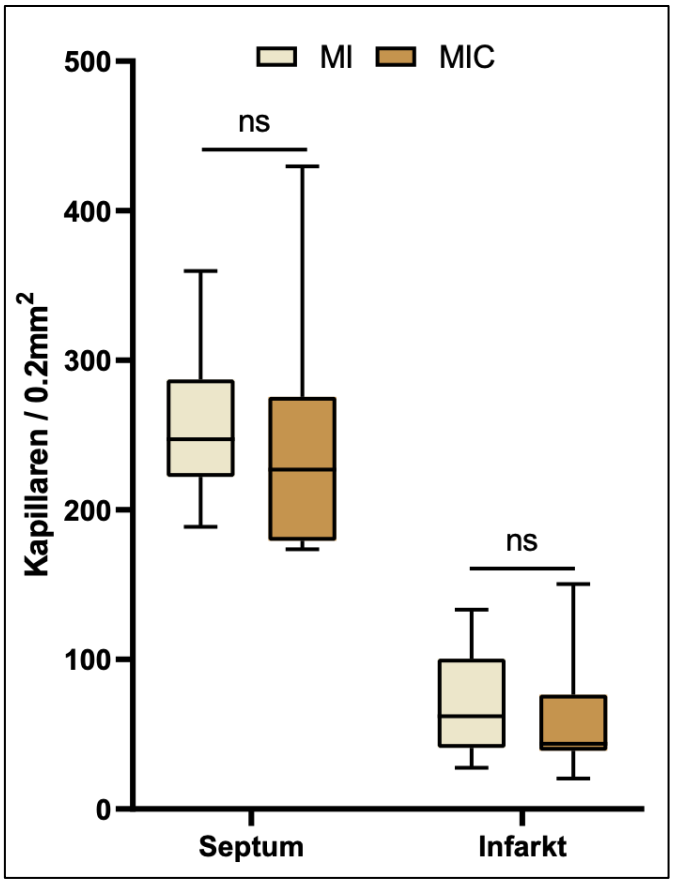


Abb. 13: Einfluss der CiCs auf die Kapillardichte des linken Ventrikels.

Zwischen den beiden Gruppen (MIC: n = 13; MI: n = 9) wurden keine Unterschiede in der Kapillardichte festgestellt, weder im Bereich fernab des Infarkts noch in der Infarktzone des linken Ventrikels. „Septum“: 259,39 ± 50,24 Kapillaren / 0,2mm² vs. 239,33 ± 74,72 Kapillaren / 0,2mm² und „Infarkt“: 69,54 ± 34,85 Kapillaren / 0,2mm² vs. 59,09 ± 36,75 Kapillaren / 0,2mm².

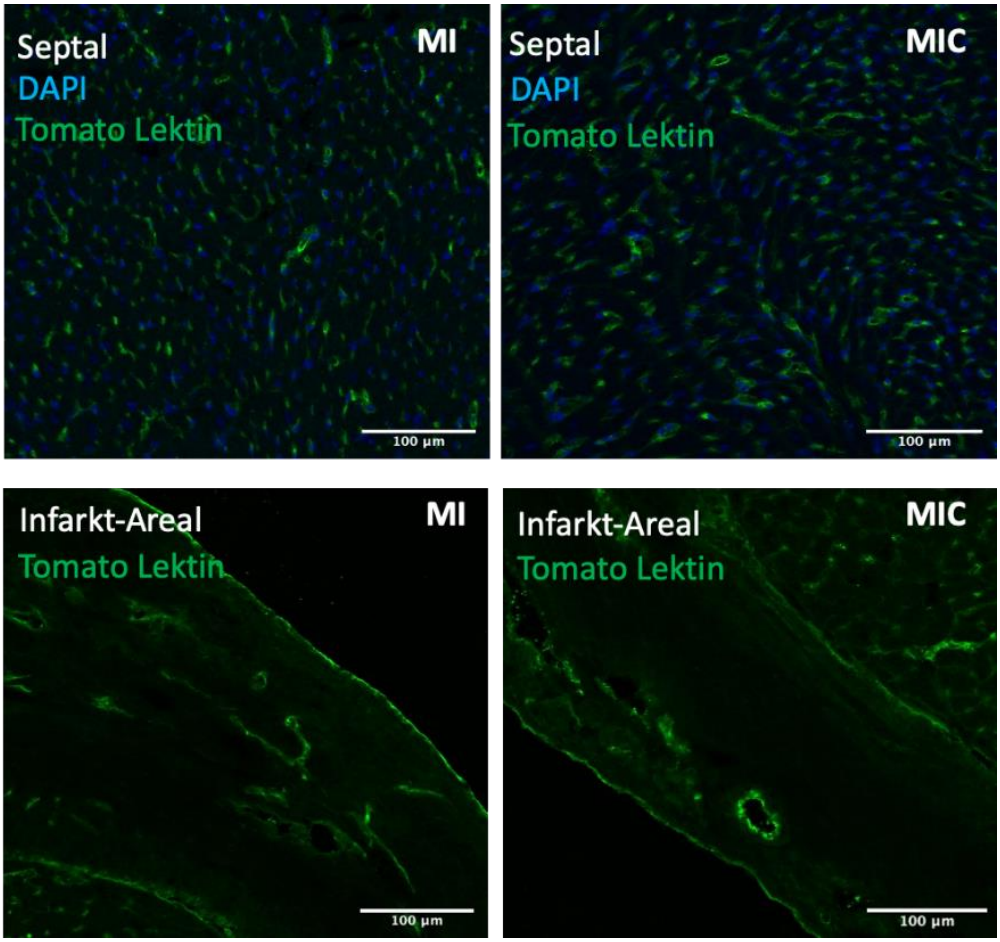


Abb. 14: Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Kapillaren im LV.

Die quantitative Bewertung der Kapillardichte wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie unter Verwendung von Tomaten-Lektin und DAPI-Färbung durchgeführt. ***Obere Reihe****: Bildausschnitt des nicht-infarzierten (septal) linksventrikulären Myokards beider Versuchsgruppen.* ***Untere Reihe****: Bildausschnitt der Infarktnarbe 21 Tage nach Ligatur der LAD. Das Tomato-Lektin markierte Endothel stellt sich grüngefärbt dar. Die Zellkerne sind mittels DAPI blau gefärbt. Die Messbalken entsprechen 100 µm. MI = Myokardinfarkt ohne Zelltherapie. MIC = Myokardinfarkt + Zelltherapie.*

3.3 Myokardiales Remodeling

Die Auswirkungen der Zelltherapie auf die linksventrikuläre Remodellierung wurden anhand des enddiastolischen Volumens und des endsystolischen Volumens erhoben. Sowohl das EDV als auch das ESV sind etablierte Messparameter für die Quantifizierung des Remodellierungsprozesses [18]. Es konnten ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der Kontroll- und der Therapiegruppe festgestellt werden (EDV: 106,3 µl ± 35,1 µl vs.108,9 µl ± 22,0 µl (p = 0,84); ESV: 82,8 µl ± 32,5 µl vs. 76,1 µl ± 22,2 µl, (p = 0,58)) (Abbildung 15).

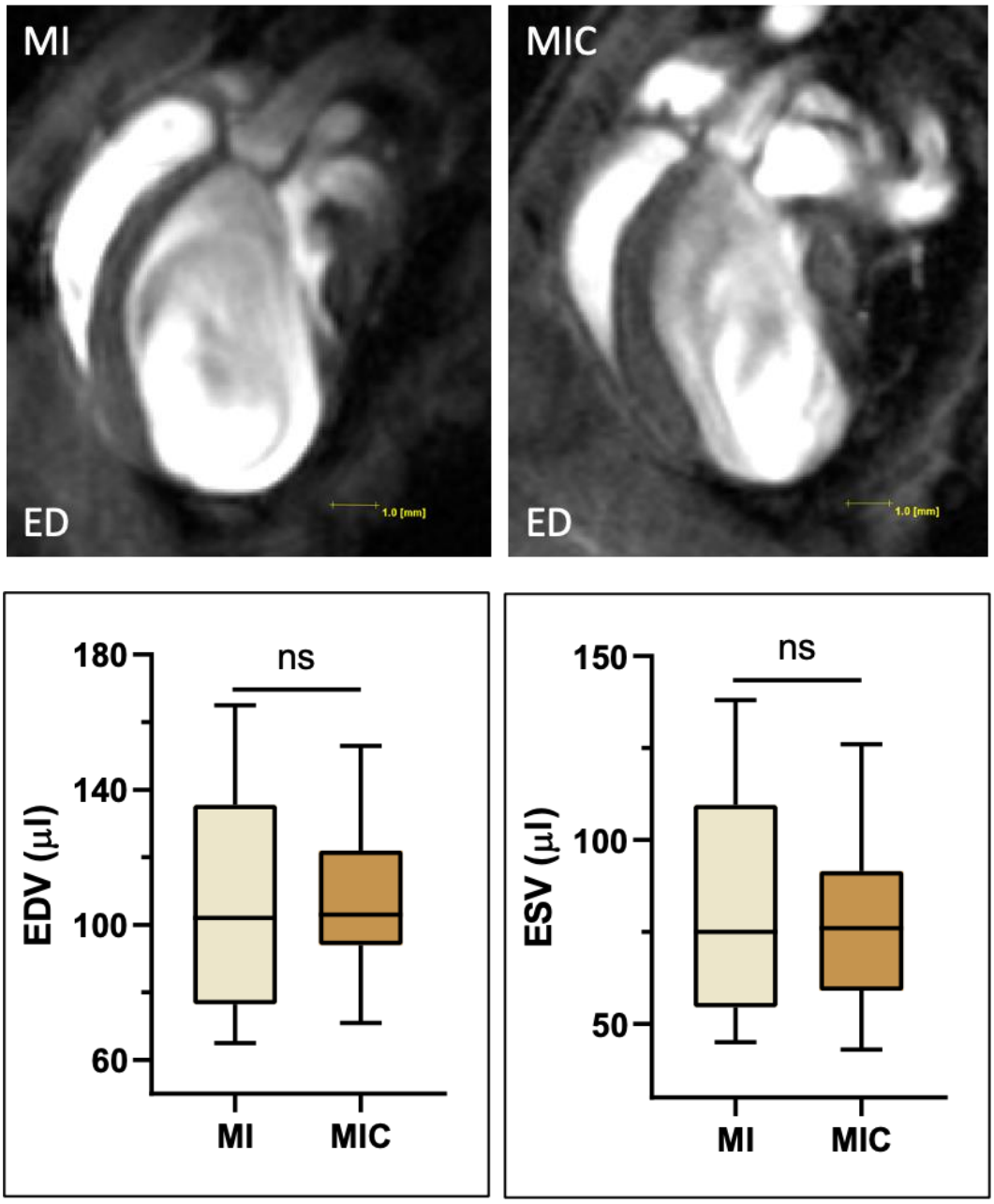


Abb. 15: Einfluss der Zelltherapie auf linksventrikuläre Volumina

***Oben**: Repräsentative enddiastolische CMR-Bilder des linken Ventrikels drei Wochen nach einem akuten Myokardinfarkt. Die Langachsenansicht visualisiert deutlich die Folgen des Myokardinfarkts: schwere Dilatation, Wandverdünnung im Infarktbereich und Übergang von einer elliptischen zu einer eher kugelförmigen Form des linken Ventrikels. **Unten**: Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich des enddiastolischen Volumens und des endsystolischen Volumens zwischen beiden experimentellen Gruppen gemessen werden. ED = enddiastolisch. (MIC: n = 13; MI: n = 9)*

3.4 Einfluss auf die funktionellen Parameter des linken Ventrikels

Die Zelltransplantation führte zu einer signifikanten Verbesserung der linksventrikulären Leistungsfähigkeit. Obwohl keine Auswirkungen auf globale morphologische Parameter – EDV und ESV - nachgewiesen werden konnten, führte die die Zelltransplantation zu einer signifikanten Verbesserung der kontraktilen Funktion (Abbildung 16 und 17). Diese wurde mittels folgender Parameter quantifiziert: 1) linksventrikuläre Ejektionsfraktion, 2) Herzminutenvolumen (HMV) und 3) Schlagvolumen. Es zeigten sich in der Therapiegruppe signifikant höhere Werte dieser Parameter als in der Kontroll-Gruppe (SV: 23,1 µl ± 5,3 µl vs. 32,9 µl ± 7,1 µl ($p < 0,0024$); CO: 8,1 ml/min ± 1,9 ml/min vs. 11,4 ml/min ± 2,9 ml/min ($p<0,0074$) und LVEF: 23,1 % ± 7,0 % vs. 31,2 % ± 8,5 % ($p < 0,029$)) (Abbildung 17).

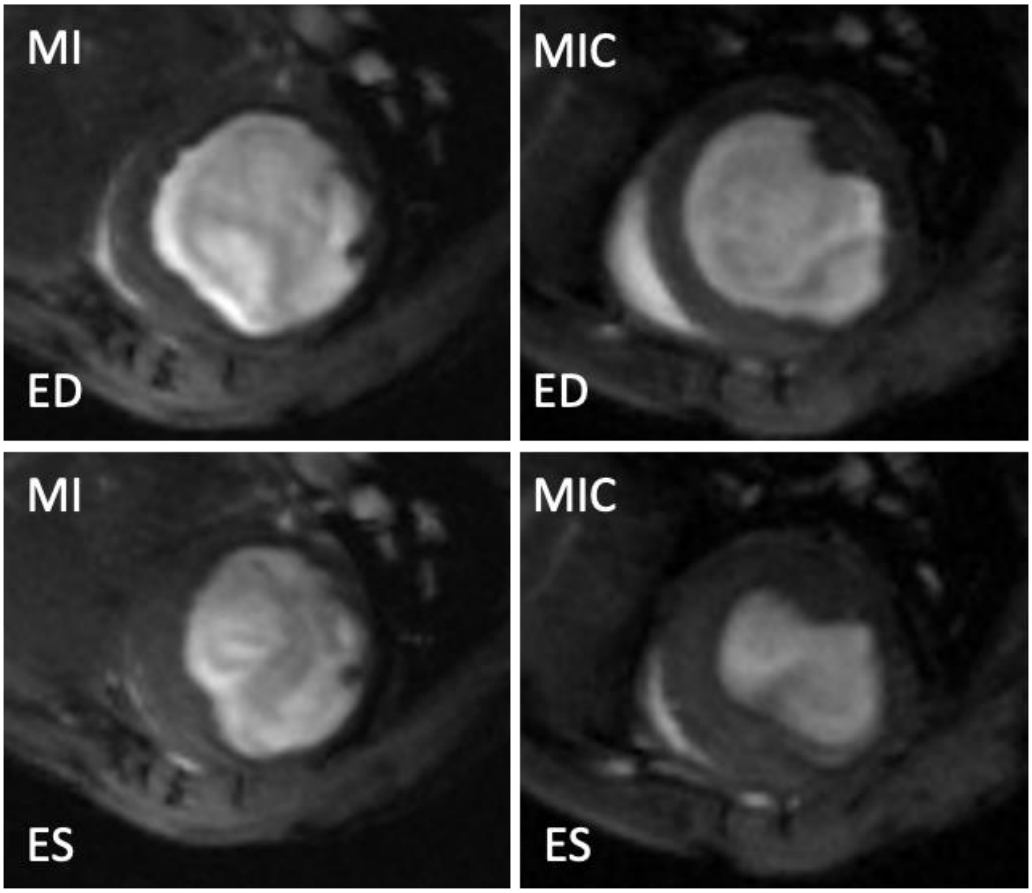


Abb. 16: Repräsentative mittventrikuläre CMR-Kurzachsen-Aufnahmen.

Kurzachsen-Aufnahmen der CMR zeigen die erhöhte radiale Kontraktilität nach Zelltherapie (MIC) gegenüber der Kontrollgruppe (MI). Obere Reihe: Enddiastolisch (ED). Untere Reihe: Endsystolisch (ES).

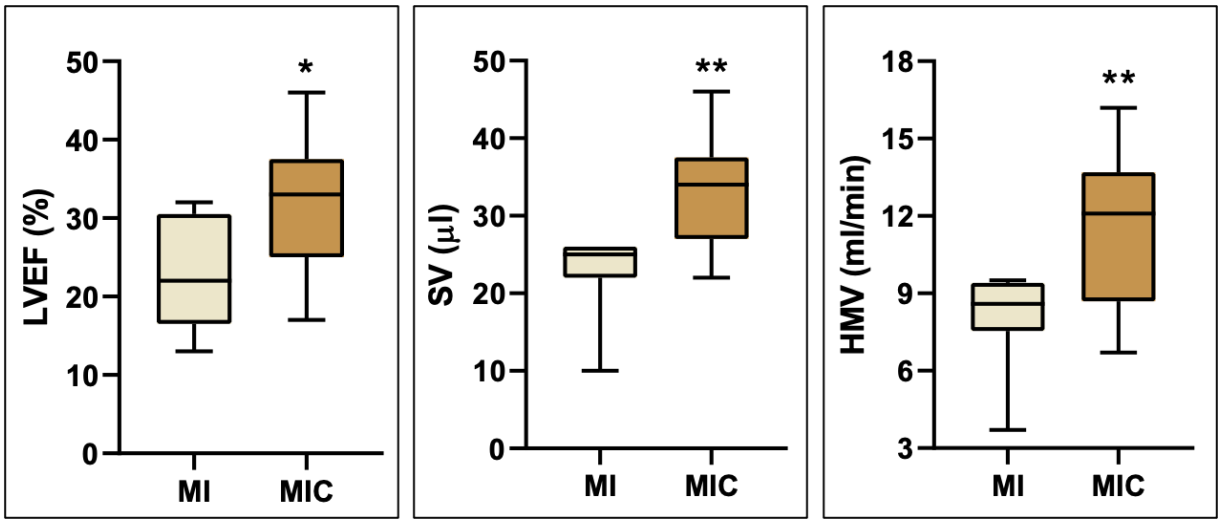


Abb. 17: Einfluss der Zelltherapie auf die linksventrikuläre Funktion.

*Die Therapie mit CiCs führte zu einer signifikanten Verbesserung der linksventrikulären funktionellen Parameter. LVEF: Linksventrikuläre Ejektionsfraktion, SV: Schlagvolumen, HMV: Herzminutenvolumen. * p < 0,05 vs. MI, ** p < 0,01 vs. MI. MI: n = 9, MIC: n = 13.*

3.5 Effekte auf die linksventrikulären Wandverhältnisse

Die Beobachtung, dass die Zelltherapie zu einer besseren linksventrikulären Funktion führt, ohne jedoch Auswirkungen auf die globale Dimension des linken Ventrikels zu haben, führte zur Hypothese, dass die Therapie zu einer Veränderung regionaler Wandeigenschaften geführt haben könnte.

Um diese Hypothese zu überprüfen, führten wir sowohl qualitative als auch quantitative Analysen der regionalen Wandeigenschaften des linken Ventrikels durch. Dabei untersuchten wir zum einen die regionale Wanddicke und zum anderen die regionale Veränderung der Wanddicke während des Herzzyklus (dynamische Wandverdickung) und visualisierten diese mittels *Bullseye* - Diagrammen. Die septalen infarktfernen (Segmente 1 und 6) und die lateralen infarzierten (Segmente 3 und 4) Segmente wurden für die Untersuchung der linksventrikulären Wandverhältnisse berücksichtigt. In den lateralen Segmenten zeigte sich in der Zelltherapie-Gruppe eine signifikant größere Wanddicke gegenüber der Kontrollgruppe (MI vs. MIC: 0,30 mm ± 0,05 mm vs. 0,36 mm ± 0,07 mm; $p < 0,05$) (Abbildung 18). Septal konnte keine statistisch relevante Differenz der Wanddicke nachgewiesen werden. Die radiale Kontraktilität des Herzens beschreibt die Fähigkeit des Herzmuskels sich in Richtung des Zentrums der Herzkammer zusammenzuziehen und trägt maßgeblich zur Auswurfleistung des Herzens bei [83]. Die Messung der regionalen dynamischen Wandverdickung während des Herzzyklus spiegelt diesen Parameter wider. Wie in Abbildung 19 dargestellt, führte die Zelltherapie sowohl septal als auch lateral zu einer signifikanten Verbesserung dieses Parameters (MI vs. MIC: septal:

0,09 mm ± 0,05 mm vs. 0,22 mm ± 0,06 mm; ($p < 0,001$); lateral: -0,01 mm ± 0,03 mm vs. 0,12 mm ± 0,04 mm; ($p < 0,001$)).

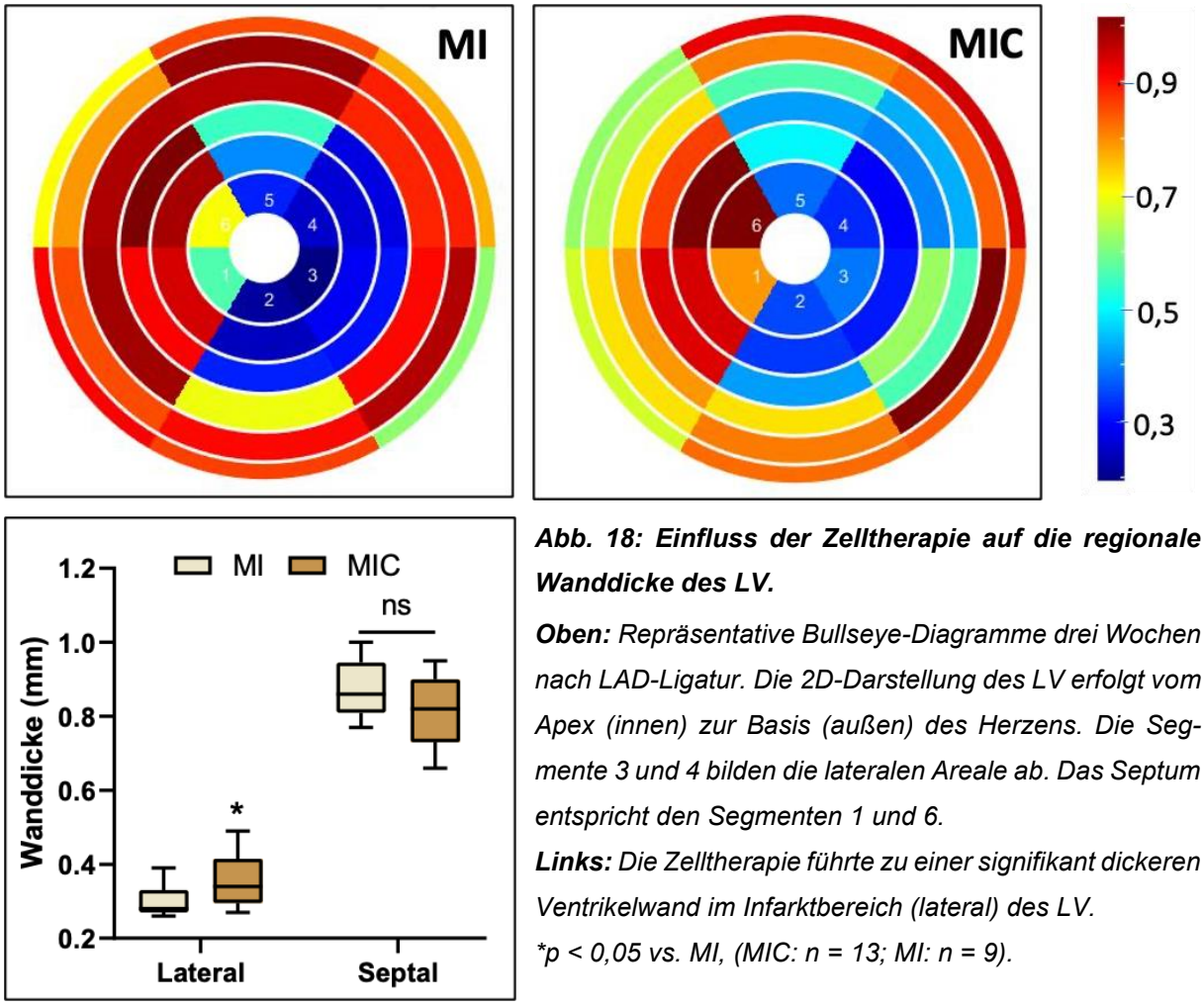
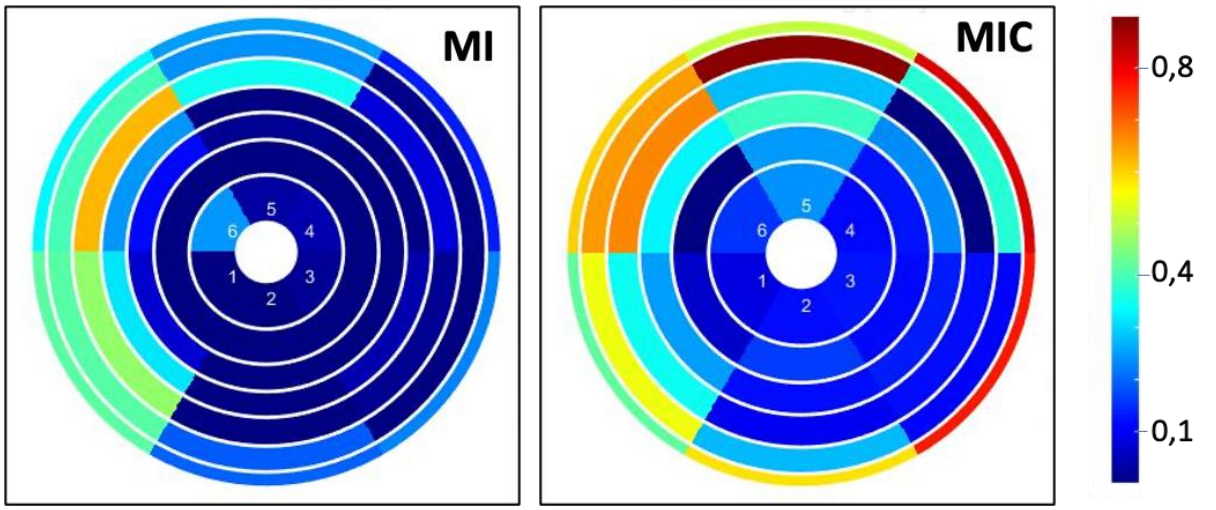


Abb. 18: Einfluss der Zelltherapie auf die regionale Wanddicke des LV.

Oben: *Repräsentative Bullseye-Diagramme drei Wochen nach LAD-Ligatur. Die 2D-Darstellung des LV erfolgt vom Apex (innen) zur Basis (außen) des Herzens. Die Segmente 3 und 4 bilden die lateralen Areale ab. Das Septum entspricht den Segmenten 1 und 6.*

Links: *Die Zelltherapie führte zu einer signifikant dickeren Ventrikelwand im Infarktbereich (lateral) des LV.*

**p < 0,05 vs. MI, (MIC: n = 13; MI: n = 9).*



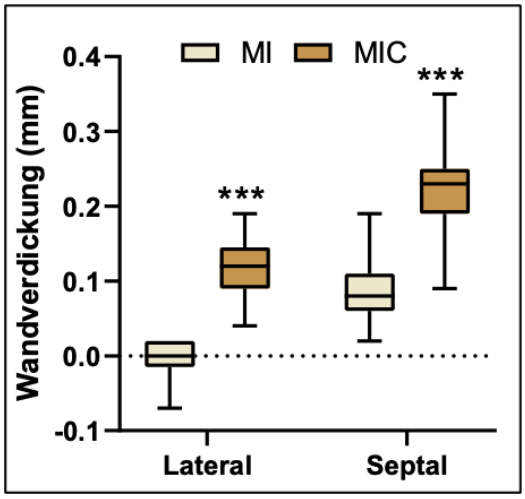


Abb. 19: Einfluss der Zelltherapie auf die regionale dynamische Wandverdickung des LV.

Oben: *Repräsentative Bullseye-Diagramme drei Wochen nach LAD-Ligatur (siehe Abb. 18 für Erklärung der Bullseye-Diagramme).*

Links: *Die Wandverdickung konnte sowohl lateral als auch septal signifikant durch die Zelltherapie verbessert werden. ***p < 0,001 vs. MI (MIC: n = 13; MI: n = 9).*

3.6 Quantifizierung des metabolischen Defektes

Zusätzlich zu der regionalen linksventrikulären Wandanalyse wurde mittels [18F] FDG PET-Bildgebung untersucht, inwiefern der regionale Glukosestoffwechsel durch den Myokardinfarkt und die Stammzelltherapie beeinflusst wird. Die Bildgebung erfolgte 17 Tage nach *LAD*-Ligatur. Die Auswertung der PET-Daten ergab, dass die Zelltherapie die Größe des „Metabolischen Defektes“ nach einem akuten Myokardinfarkt um etwa 40 % reduzieren konnte (MIC: 14,4 % ± 7,9 % vs. MI: 23,9 % ± 9,9 % ($p < 0,05$)). Repräsentative Aufnahmen dieser Auswertung sind in Abbildung 20 dargestellt.

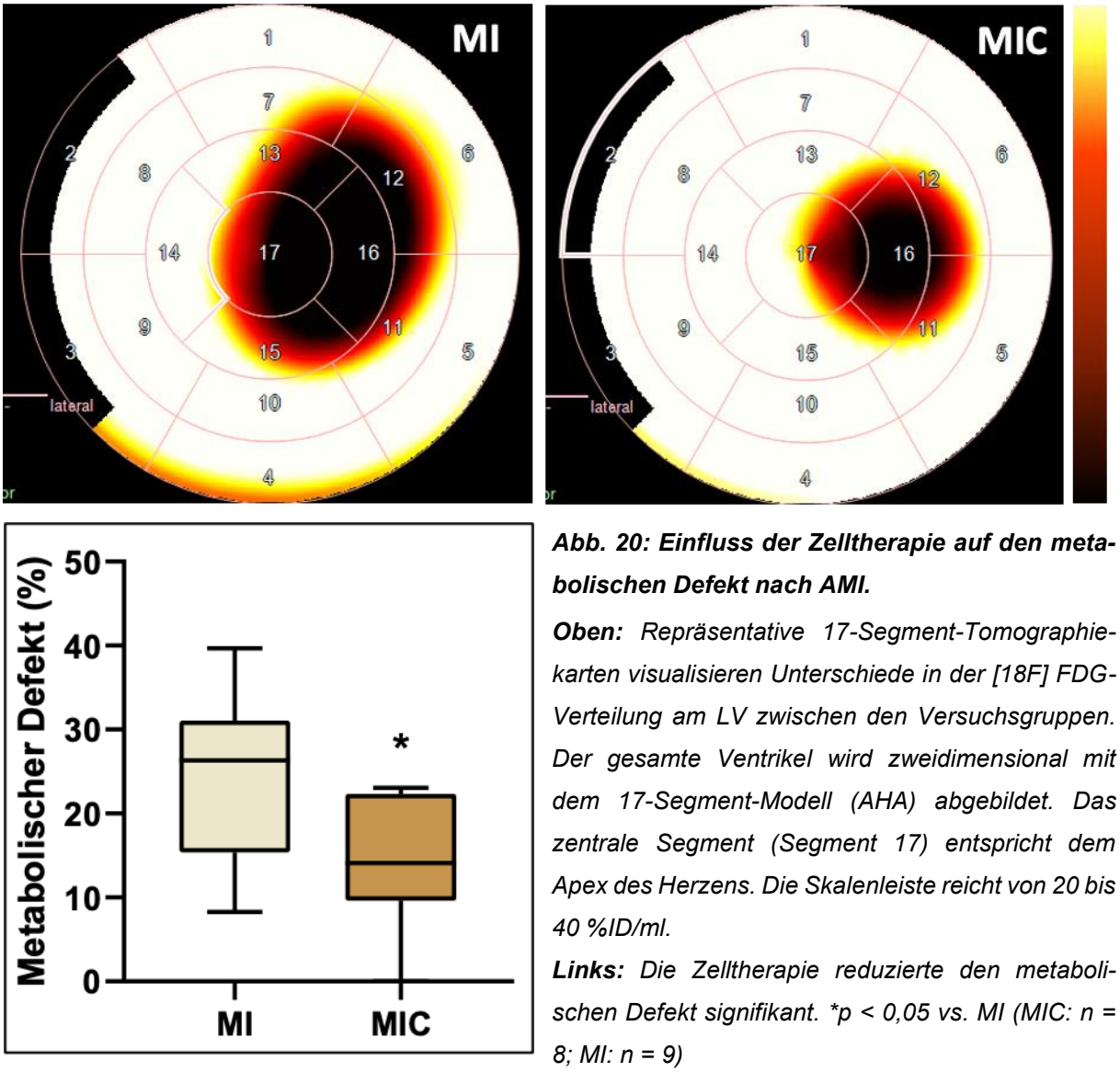


Abb. 20: Einfluss der Zelltherapie auf den metabolischen Defekt nach AMI.

Oben: *Repräsentative 17-Segment-Tomographiekarten visualisieren Unterschiede in der [18F] FDG-Verteilung am LV zwischen den Versuchsgruppen. Der gesamte Ventrikel wird zweidimensional mit dem 17-Segment-Modell (AHA) abgebildet. Das zentrale Segment (Segment 17) entspricht dem Apex des Herzens. Die Skalenleiste reicht von 20 bis 40 %ID/ml.*

Links: *Die Zelltherapie reduzierte den metabolischen Defekt signifikant. *p < 0,05 vs. MI (MIC: n = 8; MI: n = 9)*

Dabei zeigte die Größe des metabolischen Defektes eine signifikante Korrelation mit der Beeinträchtigung der linksventrikulären Funktion (R = - 0,83; p < 0,001). Dieser Zusammenhang wird in Abbildung 21 dargestellt.

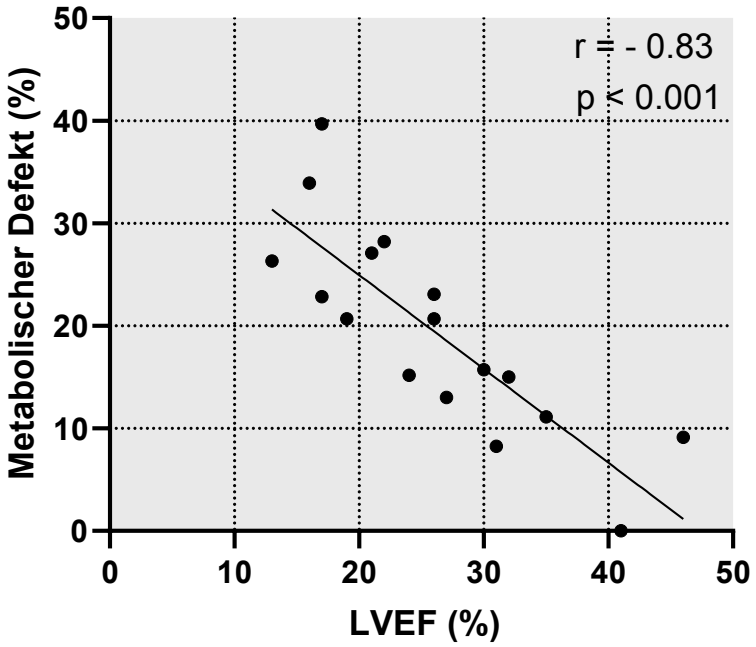


Abb. 21: Zusammenhang des metabolischen Defektes mit der linksventrikulären Funktion.

Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation des metabolischen Defektes mit der LVEF. Es zeigt sich eine signifikante negative Korrelation zwischen der Größe des metabolischen Defektes und der LVEF (R = - 0,83; p < 0,001). MIC: n = 8; MI: n = 9.

IV. Diskussion

Aufgrund der limitierten regenerativen Kapazitäten des Herzens gelangte die Stammzelltherapie nach Myokardinfarkt seit Beginn des 21. Jahrhunderts in den Fokus der kardialen regenerativen Medizin. Die Therapie mit Stammzellen demonstrierte in einer Vielzahl von präklinischen Modellen ihre Wirksamkeit, zeigte bisher jedoch negative oder uneindeutige Ergebnisse in der klinischen Translation [4, 45, 46].
Die Wirksamkeit transplantierter Zellen wird vorrangig anhand der linksventrikulären Ejektionsfraktion bewertet, die nach wie vor als Goldstandard für die Beurteilung der Herzfunktion gilt [69]. Da jedoch das Konzept einer lokalen parakrinen und immunmodulatorischen Wirkweise kardialer Stammzellen mittlerweile von den meisten Forschenden anerkannt ist, erscheint die Messung globaler morphologischer und funktioneller Parameter ungeeignet, um die spezifischen regionalen Effekte der Zelltherapie abzubilden. Zusätzlich zu den bisher erhobenen Parametern sollten daher auch regionale Eigenschaften des linken Ventrikels analysiert werden, um die postulierten lokalen Effekte zelltherapeutischer Ansätze besser verstehen zu können [7, 66].
Auf Grundlage dessen wurde in dieser Arbeit ein multimodaler, longitudinaler Bildgebungsansatz im Mausmodell etabliert, um die therapeutischen Effekte von *Cardiac induced Cells* auf regionale Wandeigenschaften des linken Ventrikels nach einem akuten Myokardinfarkt zu untersuchen. Dabei ergaben sich folgende wesentliche Ergebnisse:

1) Weder die Größe der Infarktnarbe noch die Kapillardichte werden durch die Zelltherapie wesentlich beeinflusst.

2) Die kardiale Stammzelltherapie hatte keinen Effekt auf das globale morphologische Remodeling des linken Ventrikels.

3) Dennoch führte die Zelltherapie zu einer signifikanten Verbesserung der linksventrikulären Funktion.

4) Regionale linksventrikuläre Wandeigenschaften wurden durch die Transplantation von *CiCs* verbessert.

5) Durch die Zelltransplantation konnte der metabolische Defekt nach Myokardinfarkt signifikant reduziert werden.

4.1 Das Mausmodell in der kardioregenerativen Forschung

Tiermodelle sind eine bewährte Methode, um menschliche Pathologien in einem präklinischen Umfeld sicher zu untersuchen und innerhalb verschiedener Studiendesigns nachvollziehbar darzustellen. Insbesondere Kleintiermodelle haben wertvolle Erkenntnisse zu kardiovaskulären Erkrankungen geliefert und damit die Entwicklung innovativer pharmakologischer und interventioneller Therapien für den klinischen Alltag entscheidend gefördert. Das Mausmodell stellt dabei einen kostengünstigen als auch weitreichend verfügbaren Ansatz dar. Die kurze Generationszeit und vor allem die breite Verfügbarkeit von relevanten transgenen und Knockout-Stämmen machen die Maus zu einem besonders attraktiven Modell für die Erforschung der molekularen Grundlagen kardialer Erkrankungen [84, 85].

Das Verfahren der *LAD*-Ligatur wird bereits seit Jahrzehnten durchgeführt und ist eines der am häufigsten verwendeten Mausmodelle zur Untersuchung der Wirksamkeit kardialer Stammzelltherapien [4, 84]. Ein wesentlicher Nachteil bei der Verwendung dieses Mausmodells ist die erforderliche Expertise und Erfahrung, um chirurgische Eingriffe an Mäusen komplikationsarm durchzuführen. Darüber hinaus stellen die geringe Herzgröße sowie die strukturellen Unterschiede im Vergleich zum menschlichen Herzen zwei weitere wichtige Einschränkungen für die klinische Translation dar. Aufgrund der Unterschiede in Herzarchitektur, Herzfrequenz und Proteinexpression zwischen Nagetieren und Menschen ist der Einsatz von Großtiermodellen ein entscheidender Schritt in Richtung klinischer Translation. Das Schwein, dessen Herzgröße und Koronaranatomie denen des Menschen ähneln, gilt dabei als bevorzugtes Großtiermodell für den akuten Myokardinfarkt. Die Notwendigkeit von speziellen chirurgischen Einrichtungen, geschultem Personal und geeigneter Infrastruktur sowie die hohen Kosten begrenzen allerdings die Anzahl der Labore, die diese Studien durchführen können [84].

Drei weitere Aspekte müssen berücksichtigt werden, wenn Erkenntnisse aus experimentellen Mausmodellen auf klinische Therapien übertragen werden sollen:

1. Spezies-spezifische Unterschiede des zeitlichen Verlaufs und der Mechanismen der Herzinfarktheilung
2. Geschlecht der Tiere
3. Unterschiedliche gesundheitliche und altersbedingte Voraussetzungen der Mäuse im Vergleich zu Patienten

Die Übertragung der aus Tierstudien gewonnen Schlussfolgerungen auf menschliche pathologische Prozesse, setzt ähnliche Mechanismen der jeweiligen Spezies voraus. Ein wesentlicher Unterschied in Studien zum akuten Myokardinfarkt besteht in den zeitlich variierenden Heilungsverläufen zwischen Großtier- und Kleintiermodellen [71, 86]. Murine Infarkte zeichnen sich durch einen deutlich schnelleren Ablauf der Heilungsphasen aus als Infarkte bei größeren

Lebewesen wie Schweinen, Hunden oder auch Menschen. Zudem bestehen einige artspezifische Unterschiede des inflammatorischen Prozesses während der myokardialen Heilung nach AMI. Bei Mäusen kommt es im Vergleich zu höheren Säugetieren wie dem Hund nur zu einer kurzzeitigen Infiltration von Makrophagen und zu einem schnelleren Ersatz der geschädigten Kardiomyozyten durch Granulationsgewebe. Im weiteren Verlauf nimmt die Zahl der Entzündungszellen im Infarktareal durch die geringe Induktion von Wachstumsfaktoren wie *M-CSF* (Makrophagen – Koloniestimulierender Faktor) und *SCF* (Stammzellfaktor) rasch ab. Im Gegensatz dazu führt die Hochregulation dieser Wachstumsfaktoren beim Hund zu einer länger anhaltenden Population von Mastzellen und Makrophagen im Infarktbereich, was für deren Reifung und Proliferation entscheidend ist [86].

Diese Unterschiede sollten bei der Interpretation von Ergebnissen aus Mausstudien beachtet werden. Nichtsdestotrotz gilt die Maus weiterhin als ein geeignetes Modell für die zelluläre und molekulare Untersuchung der Herzinfarktheilung [86].

Die Metaanalyse von Lang *et al.* ergab, dass der Effekt von Stammzelltherapien auf die Verbesserung der LVEF bei weiblichen Mäusen signifikant stärker ausgeprägt ist als bei männlichen Tieren [4]. Unabhängig von kardialen Stammzellen wurden bei weiblichen Tieren eine bessere post-ischämische Erholung der linksventrikulären Funktion und kleinere Infarktgrößen im Vergleich zu männlichen Tieren festgestellt [87]. Das unterschiedliche Outcome nach AMI könnte demnach auf geschlechtsspezifische Unterschiede der myokardialen Heilung zurückgeführt werden. Weibliche Herzen zeigen auf molekularer und zellulärer Ebene eine geringere Aktivierung entzündlicher Signalwege, die zur Progression des pathologischen Remodelings beitragen, sowie eine post-ischämische Zunahme anti-inflammatorischer M2-Makrophagen, die bei männlichen Tieren nicht beobachtet werden konnte [88–90]. Nach Vagnozzi *et al.* beruht die therapeutische Wirkung kardialer Zelltherapien in erster Linie auf immunmodulatorischen Mechanismen [7]. Dies führt zu der Annahme, dass geschlechtsspezifische Unterschiede in der Heterogenität von Makrophagen die größeren Effekte der Zelltherapie bei Frauen erklären könnten. Um diese Annahme zu bestätigen, sollte der Einfluss des Geschlechts des Empfängers auf die Wirksamkeit zelltherapeutischer Ansätze in zukünftigen Studien genauer untersucht werden [44].

Des Weiteren weichen der Gesundheitszustand und das Alter der Mäuse in präklinischen Studien deutlich von den Voraussetzungen potenzieller Patienten im klinischen Alltag ab. Sowohl experimentelle als auch klinische Studien konnten nachweisen, dass das zunehmende Alter negative Auswirkungen auf das linksventrikuläre Remodeling nach Herzinfarkten hat [4, 91].

Während junge weibliche Mäuse im Rahmen der Myokardinfarktheilung ein anti-inflammatorisches Milieu generieren, kommt es im Alter zu einem signifikanten Anstieg pro-inflammatorischer Zytokine – ein Effekt, der in männlichen Herzen nicht beobachtet wird [90]. Das Altern führt zu einer dysregulierten Entzündungsreaktionen, einer verzögerten Bildung von

Granulationsgewebe und einer reduzierten Kollagenablagerung. Diese Defizite im Heilungsprozess des alternden Herzens gehen mit einem verstärkten pathologischem Remodeling sowie einer schlechteren linksventrikulären Funktion einher [90, 91].
Die Patienten im klinischen Umfeld sind in der Regel älter und leiden häufig unter Begleiterkrankungen. Letzteres verdeutlicht einen weiteren Punkt, der zu beachten ist. Der AMI wird in Mausmodellen typischerweise künstlich durch *LAD*-Ligatur herbeigeführt und nicht die Folge arteriosklerotischer Gefäßveränderungen [84, 85].
Diese Beobachtungen legen nahe, dass experimentelle Erkenntnisse und die klinische Translation dieser auf den erkrankten Patienten hinterfragt werden sollten.
Dennoch werden in den meisten Studien zur kardialen Stammzelltherapie nach AMI, wie auch in der vorliegenden Arbeit, junge gesunde Mäuse verwendet. Dies könnte einer der Gründe sein, warum Mausstudien im Vergleich zu Untersuchungen am Menschen bisher vielversprechendere Ergebnisse hinsichtlich der Wirksamkeit zelltherapeutischer Ansätze zeigen.

4.2 *Cardiac induced Cells* in der kardialen Stammzelltherapie

Die intramyokardiale Applikation von Stammzellen in die Randzone des infarzierten Myokards ist eine etablierte Methode in der Forschung zur Wirksamkeit dieser Therapien und führte in der bisherigen Literatur häufig zu einer signifikanten Verbesserung der kardialen Funktion nach AMI. Auf diese Weise wurde die Wirksamkeit einer Vielzahl unterschiedlicher Zellpräparate untersucht. Während in klinischen Studien vor allem adulte Stammzellen im Fokus standen, wurde in Mausmodellen ein breites Spektrum an Zellpopulationen erforscht. Dabei zeigten *CPCs* und vor allem aus *iPSCs* und *ESCs* hervorgehende Populationen einen signifikant besseren Einfluss auf die LVEF als andere Zelltypen [4].
In der vorliegenden Arbeit wurden sogenannte *Cardiac induced cells* verwendet, eine Zellpopulation, die am ehesten kardial andifferenzierten murinen *ESC* entspricht.
Dafür wurden murine embryonale Stammzellen einem kardialen Differenzierungsprotokolls unterzogen, das von unserer Arbeitsgruppe etabliert wurde [9]. Der Einfluss von *CiCs* auf die immunologischen Prozesse der Herzinfarktheilung ist nach wie vor nicht vollständig verstanden. Weitere Studien sind notwendig, um die genauen Wirkmechanismen dieser Zellen zu entschlüsseln.

4.3 Zelltherapeutischer Einfluss auf die Narbenstruktur

Die Wirksamkeit von Herzinfarkttherapien wird in Mausmodellen häufig durch die Bestimmung der Infarktgröße bewertet. Die Größe der Infarktnarbe wiederum korreliert typischerweise positiv mit dem Ausmaß des kardialen Remodelings und negativ mit der kontraktilen Funktion nach AMI [70, 71]. Trotz verbesserter LVEF nach Zelltherapie zeigte sich interessanterweise drei Wochen nach *LAD*-Ligatur weder histologisch noch mittels *CMR* ein signifikanter

Unterschied in der Narbengröße zwischen den beiden Versuchsgruppen. Eine vergleichbare Studie unseres Labors um Vasudevan *et al.* berichtete über ähnliche Ergebnisse [63]. Im Rahmen der Bestimmung der Narbengröße wurden zwei histologische Messmethoden, eine flächenbasierte und eine längenmaß-basierte, miteinander verglichen. Darüber hinaus wurde die Möglichkeit evaluiert, die Größe der Narbe mittels nativem *CMR* zu bestimmen.
Obwohl es keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen gab, konnten dennoch deutlich unterschiedliche Aussagen zur Infarktgröße innerhalb der verschiedenen Messmethoden ausgemacht werden.

Die Infarktfläche wurde ermittelt, indem der prozentuale Anteil des fibrotischen Gewebes (*Sirius Red*-positiv) an der Gesamtfläche des linken Ventrikels im histologischen Präparat gemessen wurde. Dem hingegen steht die längenmaß-basierte Messung. Dabei wurde die Mittellinie zwischen Epikard- und Endokardoberfläche, genutzt, um den relativen Anteil der Narbe am Gesamtumfang des LV zu bestimmen (siehe Abbildung 9).
Wie bereits von Takagawa *et al.* beschrieben, liegen die Messwerte der Infarktfläche deutlich unterhalb der Werte, die mit der längenmaß-basierten Methode drei Wochen nach AMI ermittelt wurden [70]. Letzteres Messverfahren erfasst das Ausmaß der Infarktnarbe unabhängig von der Dilatation des LVs und der Ausdünnung der Narbe, die im Rahmen des kardialen Remodelings auftreten, und erlaubt eine zuverlässige Differenzierung von Infarktgrößen, die durch unterschiedlich hohe Ligaturen der Koronararterien verursacht werden [70].
Zusätzlich wurde die Narbengröße mittels nativer *Cine CMR*-Aufnahmen bestimmt. Obwohl das *Late-Gadolinium Enhancement* (*LGE*) weiterhin als Goldstandard zur Bestimmung der Narbengröße in der CMR gilt, bietet die Auswertung nativer Aufnahmen eine attraktive Alternative [66]. Bei der Verwendung des *LGE* wird Gadolinium haltiges Kontrastmittel über die Schwanzvene der Maus injiziert. Die Anlage des Katheters ist zum einen invasiv und zum anderen besteht durch die Applikation des Kontrastmittels eine vermeidbare Volumenbelastung des kürzlich infarzierten Herzens [92]. In dieser Arbeit wurde daher eine Methode etabliert, in der die Narbenregion indirekt auf Basis der Ventrikelwanddicke abgeschätzt wird [67].
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die längenmaßbasierte Messung nicht nur eine vielversprechende Alternative zur Bestimmung der Narbenfläche bietet, sondern auch einige Vorteile gegenüber flächenbasierten Messmethoden aufweist. In zukünftigen Studien sollten die Dilatation des LV und die Ausdünnung der Infarktnarbe berücksichtigt werden, um das Ausmaß des Infarktes präzise nachzuvollziehen.

Wie auch die Narbengröße wird die Kapillardichte als Surrogatparameter für die Angiogenese in einer Vielzahl von Studien verwendet [4]. Eine ausgeprägte Angiogenese in der Grenzzone des Infarktes soll die Infarktausdehnung begrenzen. Daher stellt die verstärkte Induktion

angiogener Gene durch kardiale Stammzellen einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz dar [4, 69, 73].

In Einklang mit einer Vorarbeit unserer Arbeitsgruppe führte die Therapie mit *CiCs* drei Wochen nach *LAD*-Ligatur weder in der Infarktzone noch in der infarktfernen Zone zu einer signifikanten Veränderung der Kapillardichte [63]. In der Literatur konnte gezeigt werden, dass die Transplantation kardialer Stammzellen eine Hochregulation angiogener Gene bewirkt und dadurch potenziell die Angiogenese in der Infarkt- und Peri-Infarkt-Region fördert [69, 73]. Allerdings bildet sich ein Großteil der neu entstandenen Mikrogefäße während des Reifungsprozesses der Narbe wieder zurück. Da die Kapillardichte in dieser Studie drei Wochen nach *LAD*-Ligatur bestimmt wurde, wurden vor allem die verbleibenden ausgereiften Gefäße erfasst [4, 27]. Ob und inwieweit die transplantierten Zellen die Angiogenese in den frühen Phasen der Infarktheilung beeinflussen, muss noch geklärt werden.

4.4 Einfluss der Zelltherapie auf globale morphologische LV-Parameter

Während des Remodelings nach AMI treten morphologische Veränderungen der Ventrikelgeometrie auf, die zu einer progredienten Beeinträchtigung der linksventrikulären Funktion führen. Zunächst kommt es zu einer Dilatation des Ventrikels und einer Ausdünnung des infarzierten Gewebes. Im infarktfernen Myokard findet hingegen eine hypertrophe Verlängerung der Kardiomyozyten statt, die sowohl zu einer Zunahme der Wandmasse als auch zu einer Vergrößerung der Kammer führt. Dadurch verändert sich die ursprünglich elliptische Kammerkonfiguration des gesunden Herzens in eine eher sphärische Form. Die linksventrikulären Volumina nehmen schließlich zu, was mit einer Zunahme des Schlagvolumens und damit einer Aufrechterhaltung des Herzzeitvolumens verbunden ist [18].

Die LV-Dilatation nach AMI wurde in den meisten Studien durch die Messung der end-systolischen und end-diastolischen Volumina bestimmt [4]. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Ligatur der *LAD* zu einer massiven Dilatation des LV mit signifikant erhöhten ES- und ED-Volumina führt [67]. Darüber hinaus korrelierten diese Parameter mit dem Ausmaß der linksventrikulären Dysfunktion und stellen somit neben der LVEF einen weiteren prädiktiven Wert für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz sowie für die Mortalität von Herzinfarkt-Patienten dar [18].

In der vorliegenden Arbeit wurden das EDV und ESV mittels *CMR* bestimmt. Die *CMR* hat sich als Goldstandard für die *in-vivo* Beurteilung des LV-Remodelings sowohl in präklinischen als auch in klinischen Studien etabliert [93, 94]. Drei Wochen nach AMI konnten keine signifikanten Unterschiede im EDV und ESV nach der Zelltherapie beobachtet werden. In einer vergleichbaren Vorarbeit unseres Labors von Vasudevan *et al.* konnte ebenfalls kein relevanter Effekt der Zelltherapie auf die LV-Volumina beobachtet werden [63].

Die Beurteilung der linksventrikulären Funktion und Volumina ist zwar grundlegend für die Bewertung neuer therapeutischer Ansätze, jedoch ungeeignet, um die kleinen und regionalen Effekte kardialer Zelltherapien zu erfassen. Um die Wirksamkeit transplantierter Zellen zu beurteilen, ist es daher wichtig, den Fokus von globalen morphologischen Parametern auf detaillierte lokale Messgrößen der kardialen Funktion zu erweitern [66].
In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Therapie mit *CiCs* zu einer signifikanten Verbesserung der LVEF führte, obwohl sie die global morphologischen Parameter des LV nicht beeinflusste.

4.5 Zelltherapie verbessert die linksventrikuläre Funktion

Die Wirksamkeit kardialer Zelltherapien wird in der Literatur größtenteils durch die Messung der linksventrikulären Ejektionsfraktion beurteilt [4]. Die LVEF gilt in präklinischen und klinischen Studien als Goldstandard zur Bewertung der Herzfunktion und ist eng mit der Prognose nach AMI verknüpft [18, 69]. Die *CMR* ermöglicht eine hochauflösende *in-vivo* Bewertung der kardialen Funktion und hat sich daher als bevorzugte Methode zur Bestimmung der LVEF etabliert [93, 95]. In der Literatur wurde die LVEF in Zeiträumen von einer bis über 30 Wochen nach AMI bestimmt. Der Großteil dieser experimentellen Studien wählte jedoch einen Zeitpunkt innerhalb von vier Wochen [4]. In dieser Arbeit wurde daher die linksventrikuläre Funktion drei Wochen nach *LAD*-Ligatur mittels *CMR* bestimmt.
In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus der Literatur und Vorarbeiten unseres Labors, konnte in dieser Arbeit eine signifikant bessere linksventrikuläre Funktion nach der Therapie mit *CiCs* gegenüber der Kontrollgruppe nachgewiesen werden [4, 9, 56]. Die Transplantation der *CiCs* in die Peri-Infarkt Zone nach *LAD*-Ligatur führte zu einer Verbesserung der LVEF um etwa 8 Prozentpunkte (31,2 % vs. 23,1 %). Dies deckt sich mit den Ergebnissen, die in Metaanalysen zur Wirksamkeit kardialer Stammzelltherapien nach AMI berichtet wurden [4, 56].
Die vielversprechenden Ergebnisse aus der präklinischen Forschung konnten bisher jedoch noch nicht in klinischen Studien bestätigt werden [4, 66].
Anfang der 2000er Jahre untersuchte die REPAIR-AMI Phase-II Studie die Wirksamkeit von intrakoronar applizierten Stammzellen wenige Tage nach erfolgreicher Reperfusionstherapie nach akutem Myokardinfarkt. Der primäre Endpunkt der Studie bestand in der absoluten Veränderung der LVEF gegenüber dem Ausgangswert über einen Nachbeobachtungszeitraum von 4 Monaten. Es konnte gezeigt werden, dass die Stammzelltherapie nicht nur sicher durchführbar ist, sondern auch mit einer signifikanten Verbesserung der linksventrikulären Funktion bei Patienten mit optimal behandeltem *STEMI* einhergeht [65].
Basierend auf den aussichtsreichen Ergebnissen dieser Arbeit wurde die BAMI-Studie initiiert [46, 65]. Ziel dieser Phase-III-Studie war es, das Konzept der REPAIR-AMI-Studie auf eine größere Studienpopulation zu übertragen und die Wirksamkeit der Zelltherapie hinsichtlich der

Reduktion der Gesamtmortalität nachzuweisen. Eingeschlossen wurden in die Studie nur Patienten, die nach erfolgreicher Reperfusionstherapie mit oder ohne Stentimplantation eine LVEF < 45 % aufwiesen. Obwohl es sich um die bisher größte Studie zur autologen Stammzelltherapie nach AMI handelt, führte dies dazu, dass nur 375 Patienten die Einschlusskriterien erfüllten, wovon 185 Patienten der Behandlungsgruppe zugeordnet wurden. Als die BAMI-Studie im Jahr 2011 konzipiert wurde, deuteten die damaligen Daten auf eine 2-Jahres-Gesamtmortalität von 12 % bei dieser Patientengruppe hin. Im Studienzeitraum von 2013 bis 2017 ergab sich jedoch eine deutlich niedrigere Gesamtmortalität von lediglich 3,5 %.
Die unerwartet geringe Gesamtmortalität in Kombination mit der geringen Studiengröße ließen weder statistisch belastbare Vergleiche der Versuchsgruppen zu noch erlaubte sie definitive Aussagen zur Wirksamkeit der Zelltherapie [46].
Die BAMI-Studie verdeutlicht einerseits den Fortschritt in der interventionellen und medikamentösen Behandlung von *STEMI*-Patienten und andererseits die Notwendigkeit, zukünftige Studiendesigns zur Wirksamkeit kardialer Stammzellen nach AMI um zusätzliche klinische Endpunkte neben der Gesamtmortalität zu erweitern [46].
Zusammenfassend gilt die LVEF weiterhin als Goldstandard zur Bewertung der Herzfunktion. Um jedoch zu verstehen, warum kardiale Zelltherapien die linksventrikuläre Funktion in präklinischen Studien verbessern, sind regionale Analysen der linksventrikulären Wand erforderlich [4, 69].

4.6 Zelltherapie verändert regionale Wandeigenschaften des LV

Im Forschungsfeld der kardialen Stammzelltherapie wurde bereits in zahlreichen Studien postuliert, dass die Untersuchung regionaler Wandeigenschaften wichtige Wirkmechanismen dieser Therapien offenlegen könnte [4, 66, 71]. Dennoch wurden bisher nur wenige Arbeiten durchgeführt, die die morphologischen und funktionellen Eigenschaften der linksventrikulären Wand nach Zelltherapie erfasst und analysiert haben [53, 61, 96]. Paulis *et al.* konnten in einer dieser Studien zeigen, dass die Applikation kardialer Stammzellen sowohl die globale als auch die lokale kontraktile Funktion in der Peri-Infarkt-Zone nach AMI verbessert [96].
Um die regionalen Effekte der *Cardiac Induced Cells* auf das LV-Remodeling differenziert beurteilen zu können, wurden daher in dieser Arbeit die regionalen Eigenschaften der Ventrikelwand analysiert. Hierzu wurde ein kürzlich von unserer Arbeitsgruppe etabliertes *CMR*-Bildgebungsprotokoll verwendet [67].
Dabei wurden die regionale Wanddicke und die dynamische Wandverdickung in die quantitative Analyse einbezogen und mittels *Bullseye*-Diagrammen visualisiert. Definierte infarzierte (laterale) und infarktferne (septale) Segmente des LV wurden in der Analyse festgelegt und bei der Auswertung der Daten berücksichtigt [67].

In der vorliegenden Arbeit führte die Zelltherapie zu einer signifikant größeren Wanddicke in den infarzierten Segmenten, während septal keine relevanten Unterschiede in der Wanddicke nachgewiesen werden konnte. In einer Arbeit von Lang *et al.* konnte bereits gezeigt werden, dass die laterale Wanddicke nach einem AMI signifikant abnimmt [67]. Die geringere Wandverdünnung und die damit wahrscheinlich einhergehende höhere mechanische und kontraktile Kapazität im Infarktbereich könnten die vermuteten regionalen Effekte der kardialen Stammzelltherapie widerspiegeln [4, 69, 96]. Die Bestimmung der Wanddicke ist ein geeigneter regionaler morphologischer Parameter zur Beurteilung sowohl der linksventrikulären Hypertrophie als auch der Verdünnung der Infarktnarbe [67].
Da die Zelltherapie zu einer Verbesserung der kontraktilen Funktion des Herzens führte, wurde neben der Wanddicke auch die regionale Wandverdickung untersucht. Diese wird durch die Differenz zwischen der endsystolischen und enddiastolischen Wanddicke ermittelt. Die Wandverdickung gilt als Surrogatmaß für die radiale Kontraktilität des Herzens, die wesentlich zur Auswurfleistung des Herzens beiträgt [67, 83].
Die Auswertung der regionalen Wandverdickung ergab, dass die Therapie mit *CiCs* sowohl in den septalen als auch lateralen Segmenten eine signifikante Verbesserung dieses Parameters bewirkte. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Zelltherapie die regionalen Wandeigenschaften des Septums und der Infarktnarbe positiv beeinflusst und somit zur Erhaltung der kontraktilen Funktion beiträgt. Wie oben bereits erwähnt, haben nur wenige andere Studien die regionalen Wandeigenschaften nach kardialer Stammzelltherapie untersucht, jedoch wurden ähnliche Beobachtungen berichtet [53, 61, 96]. Der negative Wandverdickungswert im Bereich der dilatierten Narbe in der Kontrollgruppe deutet auf eine passive systolische Expansion der aneurysmatischen lateralen Ventrikelwand hin, eine Beobachtung, die auch in der Arbeit von Lang *et al.* beschrieben wurde [67]. Dass die Zelltherapie-Gruppe einen positiven Wert aufweist, könnte durch die erhöhte mechanische Stabilität der Narbe erklärt werden. Wie genau die Zelltherapie die Zusammensetzung der Infarktnarbe beeinflusst, bleibt jedoch weiterhin Gegenstand zukünftiger Forschung.
Diese Studie zeigt, dass die Anwendung eines standardisierten *CMR*-Bildgebungsprotokolls eine präzise *in-vivo* Visualisierung und Quantifizierung zelltherapeutischer Effekte auf die LV-Wand ermöglicht.

4.7 Stammzellvermittelte Reduzierung des metabolischen Defektes

Die ^{18}F-Fluordesoxyglukose (^{18}F-FDG) – PET ermöglicht eine nicht hochauflösende, nicht-invasive *in-vivo* Analyse des Glucose-Metabolismus des Herzens. Durch die Kombination von PET und CT können gleichzeitig umfassende anatomische (CT) sowie auch funktionelle (PET) kardiale Parameter erhoben und analysiert werden [68, 97]. In der klinischen Anwendung hat sich diese Untersuchung daher als bewährte Methode zur quantitativen Bewertung des vitalen

Myokardgewebes und der Infarktgröße etabliert [74]. In der präklinischen Forschung hat sich die Anwendung der Kleintier-^{18}F-FDG-PET-CT als wichtige Methode zur Beurteilung des kardialen Remodelings und der Regeneration nach AMI im Mausmodell erwiesen. Durch die Visualisierung der metabolischen Prozesse liefert sie wertvolle mechanistische Einblicke in die Wirkmechanismen kardialer Stammzellen auf zellulärer und molekularer Ebene [60, 66, 68, 98]. Die Ergebnisse bisheriger Studien zeigen, dass kardiale Stammzelltherapien zu einer Reduktion metabolisch inaktiver Areale („Metabolischer Defekt“) beitragen können, wodurch die kardiale Regeneration gefördert und das pathologische Remodeling nach AMI vermindert wird [47, 68, 69, 97].

Daher wurde die ^{18}F-FDG-PET in dieser Arbeit verwendet, um die möglichen therapeutischen Effekte von *CiCs* auf die metabolischen Eigenschaften des infarzierten Myokards zu untersuchen. Die Durchführung der Bildgebung erfolgte 17 Tage nach *LAD*-Ligatur.

Bemerkenswerterweise ergab die Auswertung der PET-Daten, dass die Zelltherapie das Ausmaß des metabolischen Defektes nach AMI um etwa 40% reduzieren konnte.

Vergleichend zu bestehender Literatur zeigten die Ergebnisse dieser Arbeit, dass der Einsatz kardialer Stammzellen zu einer Vergrößerung des vitalen Myokards im Bereich der Peri-Infarkt-Zone führt [47, 68, 69]. Darüber hinaus konnte eine signifikante Korrelation zwischen der LVEF und der Größe des metabolischen Defektes festgestellt werden. Die Studien um Gross *et al.* und Tachibana *et al.* demonstrierten bereits den Zusammenhang zwischen der LVEF und der Myokardvitalität und kamen zu vergleichbaren Ergebnissen [68, 69].

In Zusammenschau mit den positiven Auswirkungen auf die regionalen Wandeigenschaften des LV deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass die Verbesserung der linksventrikulären Funktion auf regionale Effekte der Zelltherapie zurückzuführen ist. Diese Effekte scheinen dabei auf einer lokalen Modulierung des linksventrikulären Remodelings zu beruhen, da die globalen morphologischen Parameter und die Narbengröße durch die Zelltherapie unbeeinflusst blieben. Dies steht im Einklang mit der Hypothese von Vagnozzi *et al.*, die die therapeutischen Effekte kardialer Stammzellen auf eine lokale Modulation der Immunantwort nach AMI zurückführen [7].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die ^{18}F-FDG-PET ein relevantes Werkzeug zur Beurteilung zelltherapeutischer Effekte nach AMI im Mausmodell bietet. In dieser Arbeit konnten wir mittels *in-vivo* Bildgebungen zeigen, dass die Transplantation von *CiCs* die regionalen Eigenschaften der Infarktnarbe auch auf molekularer Ebene positiv beeinflusst. Die Untersuchung der zugrundeliegenden biologischen Mechanismen dieser Effekte sollte im Mittelpunkt zukünftiger Studien stehen.

V. Zusammenfassung und Ausblick

Seit Beginn des 21. Jahrhunderts steht die kardiale Stammzelltherapie nach akutem Myokardinfarkt im Fokus der kardioregenerativen Forschung. Experimentelle Studien haben dabei immer wieder über signifikante Verbesserungen der linksventrikulären Funktion nach intramyokardialer Injektion verschiedener Zellpräparate berichtet. Die ursprüngliche Idee des funktionellen Gewebeersatzes wurde von den meisten Forschenden aufgegeben und durch das Konzept der parakrinen und lokalen immunmodulatorischen Wirkung der Zelltherapie abgelöst. Der genaue Einfluss kardialer Stammzellen auf die regionalen Wandeigenschaften des linken Ventrikels ist noch nicht vollständig verstanden.

In dieser Studie wurde ein longitudinaler multimodaler Bildgebungsansatz im Mausmodell verwendet, um den therapeutischen Effekt von *Cardiac induced Cells* auf die Herzfunktion und die regionalen Wandeigenschaften des linken Ventrikels nach AMI zu untersuchen. Hierzu erfolgten nach *LAD*-Ligatur intramyokardiale Injektionen mit oder ohne *CiCs* entlang der Grenzzone des Infarktes. Anschließend wurden 17 und 21 Tage nach AMI PET- und *CMR*-Untersuchungen durchgeführt. An Tag 17 wurde mittels ^{18}F-FDG-PET/CT der kardiale Glukosestoffwechsel quantitativ beurteilt. In der *CMR* an Tag 21 wurden sowohl Daten zur globalen als auch zur regionalen linksventrikulären Funktion erhoben und analysiert. Zuletzt wurden die Herzen entnommen und histologisch untersucht.
Es konnte gezeigt werden, dass die Therapie mit *CiCs* nach AMI zu einer signifikanten Verbesserung der LVEF führt. Dabei ließen sich weder histologisch noch global morphologische Veränderungen in der *CMR* nachweisen, die die zelltherapeutische Wirkung auf die Herzfunktion erklärten. In den regionalen Wandanalysen des linken Ventrikels konnten jedoch signifikante Veränderungen in der Zelltherapie-Gruppe identifiziert werden, die die Verbesserung der LVEF erklären könnten. Die *CiC*-Transplantation führte sowohl zu einer geringeren Wandverdünnung im Infarktbereich als auch zu einer erhöhten regionalen Wandverdickung septal und im Infarktbereich. Weiterhin konnte nach Zelltherapie eine signifikante Reduktion des metabolischen Defektes 17 Tage nach AMI beobachtet werden. Letzteres unterstreicht die regionalen Effekte der transplantierten Zellen auf die Infarktnarbe auf zellulärer und molekularer Ebene.
Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass regionale Effekte kardialer Stammzelltherapien auf die Infarktnarbe mit einem longitudinalen multimodalen Bildgebungsansatz nicht-invasiv und *in-vivo* visualisiert und quantifiziert werden können.

In Anbetracht der Ergebnisse dieser Studie empfehlen sich weiterführende Untersuchungen der zugrundeliegenden biologischen Mechanismen zelltherapeutischer Ansätze. Zudem

sollten innovative Studienkonzepte ausgearbeitet werden, um die Übertragung experimenteller Erkenntnisse aus Mausmodellen in die klinische Praxis zukünftig umfassender zu fördern.

VI. Abkürzungsverzeichnis

ACS	*Acute coronary syndrome*
AMI	Akuter Myokardinfarkt
ASS	Acetylsalicylsäure
AT1	Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1
BM	*Bone Marrow*
Bq	Becquerel
Bzw.	Beziehungsweise
CCL	*CC-chemokine ligand*
CCR	*CC-chemokine receptor*
CiC	*Cardiac-induced cells*
CM	*Cardiomyocyte*
CMR	*Cardiovascular magnetic resonance*
CPC	*cardiac progenitor cell*
CRM	*Cardiovascular regenerative medicine*
CSC	*Cardiac stem cell*
cTnI	*Cardiac Troponin I*
cTnT	*Cardiac Troponin T*
CT	Computertomographie
CX3CL	*C-X3-C motif chemokine ligand*
CX3CR	*C-X3-C motif chemokine receptor*
DAPI	*4´6-diamidino-2-phenylindole*
DMEM	*Dulbecco´s modified eagle medium*
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ED	Enddiastole
EDV	Enddiastolisches Volumen
EF	Ejektionsfraktion

EKG	Elektrokardiographie
ESC	*Embryonic stem cell*
ES	Endsystole
ESV	Endsystolisches Volumen
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	*Fetale bovine serum*
FDG	Fluordesoxyglucose
HMV	Herzminutenvolumen
IL	Interleukin
iPSC	*Induced pluripotent stem cell*
IVSd	Interventrikuläres Septum diastolisch
KHK	Koronare Herzkrankheit
LAD	*Left anterior descending artery*
LIF	*Leukemia Inhibitory Factor*
LW	Laterale Wand
LV	Linker Ventrikel
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
LVEDD	Linksventrikulärer enddiastolische Durchmesser
LVM	Linksventrikuläre Masse
MI	Myokardinfarkt
MIC	Myokardinfarkt + Zelltherapie
MCP	*Monocyte chemoattractant protein*
MNC	*Mononuclear cell*
MRT	Magnetresonanztomographie
MSC	*Mesenchymal stem cell*
MW	Mittelwert
mESC	*Murine embryonic stem cell*
NEA	*Non-essential amino acids*

NSTEMI *Non-ST-segment elevation myocardial infarction*

PBS *Phosphate buffered salin*

PCI *Percutaneous coronary intervention*

PET Positronen-Emissions-Tomographie

PSC *Pluripotent stem cell*

PTCA *Percutaneous transluminal coronary angioplasty*

RV Rechter Ventrikel

SD *Standard deviation*

STEMI *ST-segment elevation myocardial infarction*

SV Schlagvolumen

TGF-β *Tumor growth factor – β*

VEGF *Vascular endothelial growth factor*

Vs. *Versus*

VII. Literaturverzeichnis

[1] Weltgesundheitsorganisation, R. f. E. Leading causes of death in Europe Fact Sheet (Ger).

[2] Statistisches Bundesamt. 2019. *Statistisches Jahrbuch Deutschland 2019*. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden.

[3] Frangogiannis, N. G. 2008. The immune system and cardiac repair. *Pharmacological research* 58, 2, 88–111.

[4] Lang, C. I., Dahmen, A., Vasudevan, P., Lemcke, H., Gäbel, R., Öner, A., Ince, H., David, R., and Wolfien, M. 2023. Cardiac cell therapies for the treatment of acute myocardial infarction in mice: systematic review and meta-analysis. *Cytotherapy*.

[5] Hansson, E. M. and Lendahl, U. 2013. Regenerative medicine for the treatment of heart disease. *Journal of internal medicine* 273, 235–245.

[6] Sadek, H. and Olson, E. N. 2020. Toward the Goal of Human Heart Regeneration. *Cell stem cell* 26, 1, 7–16.

[7] Vagnozzi, R. J., Maillet, M., Sargent, M. A., Khalil, H., Johansen, A. K. Z., Schwanekamp, J. A., York, A. J., Huang, V., Nahrendorf, M., Sadayappan, S., and Molkentin, J. D. 2020. An acute immune response underlies the benefit of cardiac stem cell therapy. *Nature* 577, 7790, 405–409.

[8] Zhang, J. J., Pogwizd, S. M., Fukuda, K., Zimmermann, W.-H., Fan, C., Hare, J. M., Bolli, R., and Menasché, P. 2024. Trials and tribulations of cell therapy for heart failure: an update on ongoing trials. *Nature reviews. Cardiology*.

[9] Vasudevan, P., Gaebel, R., Doering, P., Mueller, P., Lemcke, H., Stenzel, J., Lindner, T., Kurth, J., Steinhoff, G., Vollmar, B., Krause, B. J., Ince, H., David, R., and Lang, C. I. 2019. 18F-FDG PET-Based Imaging of Myocardial Inflammation Predicts a Functional Outcome Following Transplantation of mESC-Derived Cardiac Induced Cells in a Mouse Model of Myocardial Infarction. *Cells* 8, 12.

[10] Thygesen, K., Alpert, J. S., Jaffe, A. S., Chaitman, B. R., Bax, J. J., Morrow, D. A., White, H. D., Mickley, H., Crea, F., van de Werf, F., Bucciarelli-Ducci, C., Katus, H. A., Pinto, F. J., Antman, E. M., Hamm, C. W., Caterina, R. de, Januzzi, J. L., Apple, F. S., Alonso Garcia, M. A., Underwood, S. R., Canty, J. M., Lyon, A. R., Devereaux, P. J., Zamorano, J. L., Lindahl, B., Weintraub, W. S., Newby, L. K., Virmani, R., Vranckx, P., Cutlip, D., Gibbons, R. J., Smith, S. C., Atar, D., Luepker, R. V., Robertson, R. M., Bonow, R. O., Steg, P. G., O'Gara, P. T., Fox, K. A. A., Hasdai, D., Aboyans, V., Achenbach, S., Agewall, S., Alexander, T., Avezum, A., Barbato, E., Bassand, J.-P., Bates, E., Bittl, J. A., Breithardt, G., Bueno, H., Bugiardini, R., Cohen, M. G., Dangas, G., Lemos, J. A. de, Delgado, V., Filippatos, G., Fry, E., Granger, C. B., Halvorsen, S.,

Hlatky, M. A., Ibanez, B., James, S., Kastrati, A., Leclercq, C., Mahaffey, K. W., Mehta, L., Müller, C., Patrono, C., Piepoli, M. F., Piñeiro, D., Roffi, M., Rubboli, A., Sharma, S., Simpson, I. A., Tendera, M., Valgimigli, M., van der Wal, A. C., Windecker, S., Chettibi, M., Hayrapetyan, H., Roithinger, F. X., Aliyev, F., Sujayeva, V., Claeys, M. J., Smajić, E., Kala, P., Iversen, K. K., El Hefny, E., Marandi, T., Porela, P., Antov, S., Gilard, M., Blankenberg, S., Davlouros, P., Gudnason, T., Alcalai, R., Colivicchi, F., Elezi, S., Baitova, G., Zakke, I., Gustiene, O., Beissel, J., Dingli, P., Grosu, A., Damman, P., Juliebø, V., Legutko, J., Morais, J., Tatu-Chitoiu, G., Yakovlev, A., Zavatta, M., Nedeljkovic, M., Radsel, P., Sionis, A., Jemberg, T., Abid, L., Abaci, A., Parkhomenko, A., and Corbett, S. 2019. Fourth universal definition of myocardial infarction (2018). *European heart journal* 40, 3, 237–269.

[11] Collet, J.-P., Thiele, H., Barbato, E., Barthélémy, O., Bauersachs, J., Bhatt, D. L., Dendale, P., Dorobantu, M., Edvardsen, T., Folliguet, T., Gale, C. P., Gilard, M., Jobs, A., Jüni, P., Lambrinou, E., Lewis, B. S., Mehilli, J., Meliga, E., Merkely, B., Mueller, C., Roffi, M., Rutten, F. H., Sibbing, D., and Siontis, G. C. M. 2021. 2020 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *European heart journal* 42, 14, 1289–1367.

[12] Müller-Riemenschneider, F., Andersohn, F., and Willich, S. N. 2010. Trends in age-standardised and age-specific mortality from ischaemic heart disease in Germany. *Clinical research in cardiology : official journal of the German Cardiac Society* 99, 9, 545–551.

[13] Gößwald, A., Schienkiewitz, A., Nowossadeck, E., and Busch, M. A. 2013. Prävalenz von Herzinfarkt und koronarer Herzkrankheit bei Erwachsenen im Alter von 40 bis 79 Jahren in Deutschland: Ergebnisse der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1). *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* 56, 5-6, 650–655.

[14] Löwel, H., Meisinger, C., Heier, M., and Hörmann, A. 2005. The population-based acute myocardial infarction (AMI) registry of the MONICA/KORA study region of Augsburg. *Gesundheitswesen (Bundesverband der Arzte des Offentlichen Gesundheitsdienstes (Germany))* 67 Suppl 1, S31-7.

[15] Nowbar, A. N., Gitto, M., Howard, J. P., Francis, D. P., and Al-Lamee, R. 2019. Mortality From Ischemic Heart Disease. *Circulation. Cardiovascular quality and outcomes* 12, 6, e005375.

[16] Prugger, C., Heidrich, J., Wellmann, J., Dittrich, R., Brand, S.-M., Telgmann, R., Breithardt, G., Reinecke, H., Scheld, H., Kleine-Katthöfer, P., Heuschmann, P. U., and Keil, U. 2012. Trends in cardiovascular risk factors among patients with coronary heart

disease: results from the EUROASPIRE I, II, and III surveys in the Münster region. *Deutsches Arzteblatt international* 109, 17, 303–310.

[17] Sutton, M. and Sharpe, N. 2000. Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction. *Circulation* 101, 2981–2988.

[18] Konstam, M. A., Kramer, D. G., Patel, A. R., Maron, M. S., and Udelson, J. E. 2011. Left ventricular remodeling in heart failure: current concepts in clinical significance and assessment. *JACC. Cardiovascular imaging* 4, 1, 98–108.

[19] Frangogiannis, N. G. 2012. Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. *Circulation research* 110, 1, 159–173.

[20] Ute Bölt, Sabine Nemitz, Torsten Schelhase, Heiko Schirrmacher. 2024. Gesundheit. Auszug aus dem Sozialbericht 2024. *Statistisches Bundesamt (Destatis)*.

[21] Gibbons, G. H., Seidman, C. E., and Topol, E. J. 2021. Conquering Atherosclerotic Cardiovascular Disease - 50 Years of Progress. *The New England Journal of Medicine* 384, 9, 785–788.

[22] Benjamin, E. J., Blaha, M. J., Chiuve, S. E., Cushman, M., Das, S. R., Deo, R., Ferranti, S. D. de, Floyd, J., Fornage, M., Gillespie, C., Isasi, C. R., Jiménez, M. C., Jordan, L. C., Judd, S. E., Lackland, D., Lichtman, J. H., Lisabeth, L., Liu, S., Longenecker, C. T., Mackey, R. H., Matsushita, K., Mozaffarian, D., Mussolino, M. E., Nasir, K., Neumar, R. W., Palaniappan, L., Pandey, D. K., Thiagarajan, R. R., Reeves, M. J., Ritchey, M., Rodriguez, C. J., Roth, G. A., Rosamond, W. D., Sasson, C., Towfighi, A., Tsao, C. W., Turner, M. B., Virani, S. S., Voeks, J. H., Willey, J. Z., Wilkins, J. T., Wu, J. H., Alger, H. M., Wong, S. S., and Muntner, P. 2017. Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 135, 10, e146-e603.

[23] Erdmann, E. 2008. *Klinische Kardiologie*. *Krankheiten des Herzens, des Kreislaufs und der herznahen Gefäße*. Springer Medizin Verlag, Heidelberg.

[24] Libby, P. 2001. Current Concepts of the Pathogenesis of the Acute Coronary Syndromes. *Circulation* 104, 365–372.

[25] Libby, P. 2013. Mechanisms of acute coronary syndromes and their implications for therapy. *The New England Journal of Medicine* 368, 21, 2004–2013.

[26] Frangogiannis, N. G. 2015. Pathophysiology of Myocardial Infarction. *Comprehensive Physiology* 5, 4, 1841–1875.

[27] Frangogiannis, N. G. 2006. The Mechanistic Basis of Infarct Healing. *Antioxidants & Redox Signaling*, 1907–1939.

[28] Ertl, G. and Frantz, S. 2005. Healing after myocardial infarction. *Cardiovascular research* 66, 1, 22–32.

[29] Weil, B. R. and Neelamegham, S. 2019. Selectins and Immune Cells in Acute Myocardial Infarction and Post-infarction Ventricular Remodeling: Pathophysiology and Novel Treatments. *Frontiers in immunology* 10, 300.

[30] Talman, V. and Ruskoaho, H. 2016. Cardiac fibrosis in myocardial infarction-from repair and remodeling to regeneration. *Cell and tissue research* 365, 3, 563–581.

[31] Ali, S. R., Ranjbarvaziri, S., and Ardehali, R. 2014. Developmental Heterogeneity of Cardiac Fibroblasts Does Not Predict Pathological Proliferation and Activation. *Circulation research* 115, 7, 625–635.

[32] Frangogiannis, N. G. 2021. Cardiac fibrosis. *Cardiovascular research* 117, 6, 1450–1488.

[33] van den Borne, S. W. M., Diez, J., Blankesteijn, W. M., Verjans, J., Hofstra, L., and Narula, J. 2010. Myocardial remodeling after infarction: the role of myofibroblasts. *Nature reviews. Cardiology* 7, 1, 30–37.

[34] Virag, J. I. and Murry, C. E. 2003. Myofibroblast and Endothelial Cell Proliferation during Murine Myocardial Infarct Repair. *American Journal of Pathology,* 6, 2433–2440.

[35] Mallory G., White P., and Salcedo-Salga J. 1939. The speed of healing of myocardial infarction. A study of the pathologic anatomy in 72 cases. *American Heart Journal,* 18, 647–671.

[36] Opie, L. H., Commerford, P. J., Gersh, B. J., and Pfeffer, M. A. 2006. Controversies in ventricular remodelling. *The Lancet* 367, 9507, 356–367.

[37] Pfeffer, M. A. and Braunwald, E. 1990. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation,* 81, 1161–1172.

[38] Byrne, R. A., Rossello, X., Coughlan, J. J., Barbato, E., Berry, C., Chieffo, A., Claeys, M. J., Dan, G.-A., Dweck, M. R., Galbraith, M., Gilard, M., Hinterbuchner, L., Jankowska, E. A., Jüni, P., Kimura, T., Kunadian, V., Leosdottir, M., Lorusso, R., Pedretti, R. F. E., Rigopoulos, A. G., Rubini Gimenez, M., Thiele, H., Vranckx, P., Wassmann, S., Wenger, N. K., and Ibanez, B. 2023. 2023 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes. *European heart journal* 44, 38, 3720–3826.

[39] Fröhlich, G. M., Meier, P., White, S. K., Yellon, D. M., and Hausenloy, D. J. 2013. Myocardial reperfusion injury: looking beyond primary PCI. *European heart journal* 34, 23, 1714–1722.

[40] Elgendy, I. Y., Mahtta, D., and Pepine, C. J. 2019. Medical Therapy for Heart Failure Caused by Ischemic Heart Disease. *Circulation research* 124, 11, 1520–1535.

[41] Herausgeber Deutsche Stiftung Organtransplantation and April 2024. DSO Jahresbericht 2023.

[42] Laflamme, M. A. and Murry, C. E. 2011. Heart regeneration. *Nature* 473, 7347, 326–335.

[43] Frangogiannis, N. G. 2014. The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling. *Nature reviews. Cardiology* 11, 5, 255–265.

[44] Fernández-Avilés, F., Sanz-Ruiz, R., Climent, A. M., Badimon, L., Bolli, R., Charron, D., Fuster, V., Janssens, S., Kastrup, J., Kim, H.-S., Lüscher, T. F., Martin, J. F., Menasché, P., Simari, R. D., Stone, G. W., Terzic, A., Willerson, J. T., and Wu, J. C. 2017. Global position paper on cardiovascular regenerative medicine. *European heart journal* 38, 33, 2532–2546.

[45] Bolli, R. 2020. Cell therapy for acute myocardial infarction: Requiescat in Pace. *European heart journal* 41, 38, 3711–3714.

[46] Mathur, A., Fernández-Avilés, F., Bartunek, J., Belmans, A., Crea, F., Dowlut, S., Galiñanes, M., Good, M.-C., Hartikainen, J., Hauskeller, C., Janssens, S., Kala, P., Kastrup, J., Martin, J., Menasché, P., Sanz-Ruiz, R., Ylä-Herttuala, S., and Zeiher, A. 2020. The effect of intracoronary infusion of bone marrow-derived mononuclear cells on all-cause mortality in acute myocardial infarction: the BAMI trial. *European heart journal* 41, 38, 3702–3710.

[47] Mauritz, C., Martens, A., Rojas, S. V., Schnick, T., Rathert, C., Schecker, N., Menke, S., Glage, S., Zweigerdt, R., Haverich, A., Martin, U., and Kutschka, I. 2011. Induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived Flk-1 progenitor cells engraft, differentiate, and improve heart function in a mouse model of acute myocardial infarction. *European heart journal* 32, 21, 2634–2641.

[48] Bolli, R., Solankhi, M., Tang, X.-L., and Kahlon, A. 2022. Cell therapy in patients with heart failure: a comprehensive review and emerging concepts. *Cardiovascular research* 118, 4, 951–976.

[49] Deutsches Referenzzentrum für Ethik in den Biowissenschaftem. o.D. *Totipotenz und Pluripotenz*. Accessed 6 April 2025.

[50] Ott, M. 2014. Bewertung von artifiziellen »totipotenten« Stammzellen aus naturwissenschaftlicher und medizinischer Sicht. In *Entwicklungsbiologische Totipotenz in Ethik und Recht*, T. Cantz, H.-G. Dederer and T. Heinemann, Eds. V&R Unipress, Göttingen, 67–78. DOI=10.14220/9783737003421.67.

[51] Kolios, G. and Moodley, Y. 2013. Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration; international review of thoracic diseases* 85, 1, 3–10.

[52] Yamanaka, S. and Takahashi, K. 2006. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by defined Factors. *Cell,* 126, 663–676.

[53] Yamada, S., Nelson, T., Kane, G., Martinez-Fernandez, A., Crespo-Diaz, R., Ikeda, Y., Perez-Terzic, C., and Terzic, A. 2013. Induced pluripotent stem cell intervention rescues ventricular wall motion disparity, achieving biological cardiac resynchronization post-infarction. *The Journal of physiology,* 591.17, 4335–4349.

[54] Wobus, A. M. and Boheler, K. R. 2005. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiological reviews* 85, 2, 635–678.

[55] Beltrami, A., Barlucchi, L., Torella, D., Baker, M., Limana, F., Chimenti, S., Kasahara, H., Rota, M., Musso, E., Urbanek, K., Leri, A., Kajstura, J., Nadal-Ginard, B., and Anversa, P. 2003. Adult Cardiac Stem Cells are Multipotent and Support Myocardial Regeneration. *Cell,* 114, 763–776.

[56] Zwetsloot, P. P., Vegh, A. M. D., Jansen of Lorkeers, Sanne J., van Hout, G. P. J., Currie, G. L., Sena, E. S., Gremmels, H., Buikema, J. W., Goumans, M.-J., Macloed, M. R., Doevendans, P. A., Chamuleau, S. A. J., and Sluijter, J. P. G. 2016. Cardiac Stem Cell Treatment in Myocardial Infarction. A Systemic Review and Meta-Analysis of Preclinical Studies. *Circulation research*.

[57] Zhang, J., Bolli, R., Garry, D. J., Marbán, E., Menasché, P., Zimmermann, W.-H., Kamp, T. J., Wu, J. C., and Dzau, V. J. 2021. Basic and Translational Research in Cardiac Repair and Regeneration: JACC State-of-the-Art Review. *Journal of the American College of Cardiology* 78, 21, 2092–2105.

[58] Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., and Horwitz, E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 4, 315–317.

[59] Lang, C., Lehner, S., Todica, A., Boening, G., Franz, W.-M., Bartenstein, P., Hacker, M., and David, R. 2013. Positron emission tomography based in-vivo imaging of early phase stem cell retention after intramyocardial delivery in the mouse model. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 40, 11, 1730–1738.

[60] Rischpler, C., Dirschinger, R. J., Nekolla, S. G., Kossmann, H., Nicolosi, S., Hanus, F., van Marwick, S., Kunze, K. P., Meinicke, A., Götze, K., Kastrati, A., Langwieser, N., Ibrahim, T., Nahrendorf, M., Schwaiger, M., and Laugwitz, K.-L. 2016. Prospective Evaluation of 18F-Fluorodeoxyglucose Uptake in Postischemic Myocardium by Simultaneous Positron Emission Tomography/Magnetic Resonance Imaging as a Prognostic Marker of Functional Outcome. *Circulation. Cardiovascular imaging*.

[61] Ben-Mordechai, T., Holbova, R., Landa-Rouben, N., Harel-Adar, T., Feinberg, M. S., Abd Elrahman, I., Blum, G., Epstein, F. H., Silman, Z., Cohen, S., and Leor, J. 2013. Macrophage subpopulations are essential for infarct repair with and without stem cell therapy. *Journal of the American College of Cardiology* 62, 20, 1890–1901.

[62] O'Garra, A. and Vieira, P. 2007. T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nature reviews. Immunology* 7, 6, 425–428.

[63] Vasudevan, P., Wolfien, M., Lemcke, H., Lang, C. I., Skorska, A., Gaebel, R., Koczan, D., Lindner, T., Engelmann, R., Vollmar, B., Krause, B. J., Wolkenhauer, O., Lang, H.,

Steinhoff, G., and David, R. 2020. Cardiomyocyte Transplantation after Myocardial Infarction Alters the Immune Response in the Heart. *Cells* 9, 8.

[64] Nguyen, P. K., Rhee, J.-W., and Wu, J. C. 2016. Adult Stem Cell Therapy and Heart Failure, 2000 to 2016: A Systematic Review. *JAMA cardiology* 1, 7, 831–841.

[65] Schächinger, V., Erbs, S., Elsässer, A., Haberbosch, W., Hambrecht, R., Hölschermann, H., Yu, J., Corti, R., Mathey, D. G., Hamm, C. W., Süselbeck, T., Assmus, B., Tonn, T., Dimmeler, S., and Zeiher, A. M. 2006. Intracoronary Bone Marrow-Derived Progenitor Cells in Acute Myocardial Infarction. *The New England Journal of Medicine,* 355, 1210–1221.

[66] van Slochteren, F. J., Teske, A., and van der Spoel, T. e. a. 2012. Advanced measurement techniques of regional myocardial function to assess the effects of cardiac regenerative therapy in different models of ischaemic cardiomyopathy. *European heart journal* 13, 808–818.

[67] Lang, C. I., Vasudevan, P., Döring, P., Gäbel, R., Lemcke, H., Lindner, T., Steinhoff, G., Krause, B. J., Vollmar, B., Meinel, F. G., Yücel, S., Öner, A., Ince, H., and David, R. 2021. Expedient assessment of post-infarct remodeling by native cardiac magnetic resonance imaging in mice. *Scientific reports* 11, 1, 11625.

[68] Gross, L., Paintmayer, L., Lehner, S., Huber, B., Todica, A., and Brunner, S. 2016. FDG-PET reveals improved cardiac regeneration and attenuated adverse remodelling following Sitagliptin + G-CSF theraoy after acute myocardial infarction. *European heart journal cardiovascular Imaging* 17, 136–145.

[69] Tachibana, A., Santoso, M. R., Mahmoudi, M., Shukla, P., Wang, L., Bennett, M., Goldstone, A. B., Wang, M., Fukushi, M., Ebert, A. D., Woo, Y. J., Rulifson, E., and Yang, P. C. 2017. Paracrine Effects of the Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiac Myocytes Salvage the Injured Myocardium. *Circulation research* 121, 6, e22-e36.

[70] Takagawa, J., Zhang, Y., Wong, M. L., Sievers, R. E., Kapasi, N. K., Wang, Y., Yeghiazarians, Y., Lee, R. J., Grossman, W., and Springer, M. L. 2007. Myocardial infarct size measurement in the mouse chronic infarction model: comparison of area- and length-based approaches. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 102, 6, 2104–2111.

[71] Richardson, W. J., Clarke, S. A., Quinn, T. A., and Holmes, J. W. 2015. Physiological Implications of Myocardial Scar Structure. *Comprehensive Physiology* 5, 4, 1877–1909.

[72] Yokota, T., McCourt, J., Ma, F., Ren, S., Li, S., Kim, T.-H., Kurmangaliyev, Y. Z., Nasiri, R., Ahadian, S., Nguyen, T., Tan, X. H. M., Zhou, Y., Wu, R., Rodriguez, A., Cohn, W., Wang, Y., Whitelegge, J., Ryazantsev, S., Khademhosseini, A., Teitell, M. A., Chiou, P.-Y., Birk, D. E., Rowat, A. C., Crosbie, R. H., Pellegrini, M., Seldin, M., Lusis, A. J.,

and Deb, A. 2020. Type V Collagen in Scar Tissue Regulates the Size of Scar after Heart Injury. *Cell* 182, 3, 545-562.e23.

[73] Cochain, C., Channon, K. M., and Silvestre, J.-S. 2013. Angiogenesis in the infarcted myocardium. *Antioxidants & Redox Signaling* 18, 9, 1100–1113.

[74] Lang, C. I., Krause, B. J., and David, R. 2016. Cardiac FDG-PET: a straight forward tool with high potential. *European heart journal cardiovascular Imaging* 17, 2, 130–131.

[75] Auerbach, W., Dunmore, J., Fairchild-Huntress, V., Fang, Q., Auerbach, A. B., Huszar, D., and Joyner, A. L. 2000. Establishment and Chimera Analysis of 129/SvEv- and C57BL/6-Derived Mouse Embryonic Stem Cell Lines. *Biotechniques* 29, 5, 1024–1032.

[76] Lang, C. I., Döring, P., Gäbel, R., Vasudevan, P., Lemcke, H., Müller, P., Stenzel, J., Lindner, T., Joksch, M., Kurth, J., Bergner, C., Wester, H.-J., Ince, H., Steinhoff, G., Vollmar, B., David, R., and Krause, B. J. 2020. 68Ga-NODAGA-RGD Positron Emission Tomography (PET) for Assessment of Post Myocardial Infarction Angiogenesis as a Predictor for Left Ventricular Remodeling in Mice after Cardiac Stem Cell Therapy. *Cells* 9, 6.

[77] Maltsev, V., Rohwedel, J., Hescheler, J., and Wobus, A. 1993. Embryonic stem cells differentiate in vitro into cardiomyocytes representing sinusnodal, atrial and ventricular cell types. *Mechanisms of Development* 44, 1, 41–50.

[78] Crean, A. and Khan, S. 2009. Assessment of Myocardial Scar; Comparison Between 18F-FDG PET, CMR and 99Tc-Sestamibi. *Clinical Medicine: Cardiology* 3, 69–76.

[79] Cristina Segnani, Chiara Ippolito, Luca Antonioli, Carolina Pellegrini, Corrado Blandizzi, Amelio Dolfi, Nunzia Bernardini. 2015. Histochemical Detection of Collagen Fibers by Sirius Red/Fast Green Is More Sensitive than van Gieson or Sirius Red Alone in Normal and Inflamed Rat Colon. *PloS one,* 10.

[80] Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., and Cardona, A. 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods* 9, 7, 676–682.

[81] Robertson, R. T., Levine, S. T., Haynes, S. M., Gutierrez, P., Baratta, J. L., Tan, Z., and Longmuir, K. J. 2015. Use of labeled tomato lectin for imaging vasculature structures. *Histochemistry and cell biology* 143, 2, 225–234.

[82] Villacampa, N., Almolda, B., González, B., and Castellano, B. 2013. Tomato lectin histochemistry for microglial visualization. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1041, 261–279.

[83] Opdahl, A., Remme, E. W., Helle-Valle, T., Lyseggen, E., Vartdal, T., Pettersen, E., Edvardsen, T., and Smiseth, O. A. 2009. Determinants of left ventricular early-diastolic

lengthening velocity: independent contributions from left ventricular relaxation, restoring forces, and lengthening load. *Circulation* 119, 19, 2578–2586.

[84] Zaragoza, C., Gomez-Guerrero, C., Martin-Ventura, J. L., Blanco-Colio, L., Lavin, B., Mallavia, B., Tarin, C., Mas, S., Ortiz, A., and Egido, J. 2011. Animal models of cardiovascular diseases. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2011, 497841.

[85] Patten, R. D. and Hall-Porter, M. R. 2009. Small animal models of heart failure: development of novel therapies, past and present. *Circulation. Heart failure* 2, 2, 138–144.

[86] Dewald, O., Ren, G., Duerr, G., Zoerlein, M., Klemm, C., Entman, M. L., and Frangogiannis, N. G. 2004. Of Mice and Dogs: Species-Specific Differences in the Inflammatory Response Following Myocardial Infarction. *American Journal of Pathology,* 164, 665–677.

[87] Regitz-Zagrosek, V. and Kararigas, G. 2017. Mechanistic Pathways of Sex Differences in Cardiovascular Disease. *Physiological reviews* 97, 1, 1–37.

[88] Stone, G., Choi, A., Oliva, M., Gorham, J., Heydarpour, M., Seidman, C. E., Seidman, J. G., and Muehlschlegel, J. D. 2019. Sex differences in gene expression in response to ischemia in the human left ventricular myocardium. *Human Molecular Genetics,* 28, 1682–1693.

[89] Kessler, E. L., Rivaud, M. R., Vos, M. A., and van Veen, T. A. B. 2019. Sex-specific influence on cardiac structural remodeling and therapy in cardiovascular disease. *Biology of sex differences* 10, 1, 7.

[90] Barcena de Arellano, M. L., Pozdniakova, S., Kuehl, A., Baczko, I., Ladilov, Y., and Regitz-Zagrosek, V. 2019. Sex differences in the aging human heart: decreased sirtuins, pro- inflammatory shift and reduced anti-oxidative defense. *Aging,* 11, 1918–1933.

[91] Bujak, M., Kweon, H. J., Chatila, K., Li, N., Taffet, G., and Frangogiannis, N. G. 2008. Aging-Related Defects Are Associated With Adverse Cardiac Remodeling in a Mouse Model of Reperfused Myocardial Infarction. *Journal of the American College of Cardiology,* 51, 1384–1392.

[92] Price, A. N., Cheung, K. K., Lim, S. Y., Yellon, D. M., Hausenloy, D. J., and Lythgoe, M. F. 2011. Rapid assessment of myocardial infarct size in rodents using multi-slice inversion recovery late gadolinium enhancement CMR at 9.4T. *Journal of cardiovascular magnetic resonance : official journal of the Society for Cardiovascular Magnetic Resonance* 13, 1, 44.

[93] Ibanez, B., Aletras, A. H., Arai, A. E., Arheden, H., Bax, J., Berry, C., Bucciarelli-Ducci, C., Croisille, P., Dall'Armellina, E., Dharmakumar, R., Eitel, I., Fernández-Jiménez, R., Friedrich, M. G., García-Dorado, D., Hausenloy, D. J., Kim, R. J., Kozerke, S., Kramer, C. M., Salerno, M., Sánchez-González, J., Sanz, J., and Fuster, V. 2019. Cardiac MRI

Endpoints in Myocardial Infarction Experimental and Clinical Trials: JACC Scientific Expert Panel. *Journal of the American College of Cardiology* 74, 2, 238–256.

[94] Vanhoutte, L., Gerber, B. L., Gallez, B., Po, C., Magat, J., Balligand, J.-L., Feron, O., and Moniotte, S. 2016. High field magnetic resonance imaging of rodents in cardiovascular research. *Basic research in cardiology* 111, 4, 46.

[95] Salerno, M., Sharif, B., Arheden, H., Kumar, A., Axel, L., Li, D., and Neubauer, S. 2017. Recent Advances in Cardiovascular Magnetic Resonance: Techniques and Applications. *Circulation. Cardiovascular imaging* 10, 6.

[96] Paulis, L., Klein, A. M., Ghanem, A., and Geelen, T. e. a. 2013. Embryonic cardiomyocyte, but not autologous stem cell transplantation, restricts infarct expansion, enhances ventricular function, and improves long-term survival. *PloS one* 8.

[97] Beeres, S., Bengel, F. M., Bartunek, J., Atsma, D., Hill, J., Vanderheyden, M., Penicka, M., Schalij, M., Wijns, W., and Bax, J. 2007. Role of Imaging in Cardiac Stem Cell Therapy. *Journal of the American College of Cardiology,* 49, 1137–1148.

[98] Döbert, N., Britten, M., Assmus, B., Berner, U., Menzel, C., Lehmann, R., Hamscho, N., Schächinger, V., Dimmeler, S., Zeiher, A. M., and Grünwald, F. 2004. Transplantation of progenitor cells after reperfused acute myocardial infarction: evaluation of perfusion and myocardial viability with FDG-PET and thallium SPECT. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 31, 8, 1146–1151.

VIII. Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Häufigste Todesursachen in Deutschland 2023. 1

Abb. 2: Schematische Darstellung des LV-Remodelings nach AMI. 7

Abb. 3: „Embryoid Body“ an Tag 6 des Differenzierungsprotokolls. 24

Abb. 4: Chirurgische Induktion des AMI mittels LAD-Ligatur. 25

Abb. 5: Transplantation der CiCs in die Peri-Infarkzone. 26

Abb. 6: Generierung einer „Polar Map“ mit FDG-PET Daten einer gesunden Maus. 27

Abb. 7: Visualisierung der Auswertung der CMR-Aufnahmen. 29

Abb. 8: Schematische Darstellung des Infarktareals und der histologischen Schnittebenen. 30

Abb. 9: Schematische Darstellung der beiden histologischen Messmethoden für die Bestimmung der Narbengröße. 32

Abb. 10: Injektion von Tomato-Lectin und dessen Bindung an das Kapillarendothel. 33

Abb. 11: Experimenteller Aufbau der Studie. 34

Abb. 12: Auswertung der Narbengröße. 36

Abb. 13: Einfluss der CiCs auf die Kapillardichte des linken Ventrikels. 37

Abb. 14: Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Kapillaren im LV. 38

Abb. 15: Einfluss der Zelltherapie auf linksventrikuläre Volumina 39

Abb. 16: Repräsentative mittventrikuläre CMR-Kurzachsen-Aufnahmen. 40

Abb. 17: Einfluss der Zelltherapie auf die linksventrikuläre Funktion. 41

Abb. 18: Einfluss der Zelltherapie auf die regionale Wanddicke des LV. 42

Abb. 19: Einfluss der Zelltherapie auf die regionale dynamische Wandverdickung des LV. . 43

Abb. 20: Einfluss der Zelltherapie auf den metabolischen Defekt nach AMI. 44

Abb. 21: Zusammenhang des metabolischen Defektes mit der linksventrikulären Funktion. 45

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der verwendeten Zellkulturmaterialen 17

Tabelle 2: Kultivierungsmedium undifferenzierter Zellen ("Kultivierungsmedium") 17

Tabelle 3: Kultivierungsmedium differenzierter Zellen („Differenzierungsmedium")..... 18

Tabelle 4: Liste der verwendeten Standard- und Pufferlösungen..... 18

Tabelle 5: Liste der verwendeten Operationsgeräte und -materialien 18

Tabelle 6: Liste der verwendeten Medikamente..... 19

Tabelle 7: Liste der verwendeten bildgebenden Untersuchungen..... 20

Tabelle 8: Liste der verwendeten Materialien für die histologische Aufbereitung 20

Tabelle 9: Liste der verwendeten Materialen zur Auswertung der histologischen Präparate 20

Tabelle 10: Liste der verwendeten Softwares 21

Tabelle 11: Liste der verwendeten allgemeinen Chemikalien und Antikörper 21

8.3 Thesen der Dissertation

„Multimodale Bildgebung der Herzinfarktheilung nach kardialer Stammzelltherapie im Mausmodell“

1) Es wird angenommen, dass weder die Größe der Infarktnarbe noch die Kapillardichte durch die Zelltherapie wesentlich beeinflusst werden.

2) Die längenmaß-basierte Messung der Narbengröße stellt vermutlich eine vielversprechende Alternative zur flächenbasierten Messung dar, da sie die Dilatation und Ausdünnung der linksventrikulären Wand berücksichtigt.

3) Die kardiale Stammzelltherapie hat vermutlich keinen Effekt auf das globale morphologische Remodeling des linken Ventrikels.

4) Es wird vermutet, dass die Zelltherapie dennoch zu einer signifikanten Verbesserung der linksventrikulären Funktion führt.

5) Es wird die Hypothese aufgestellt, dass durch die Transplantation von *Cardiac induced cells* regionale linksventrikuläre Wandeigenschaften verbessert werden.

6) Die Zelltransplantation führt vermutlich zu einer signifikanten Reduktion des metabolischen Defektes nach Myokardinfarkt.

7) Es besteht die Annahme, dass das Ausmaß des metabolischen Defektes mit der Beeinträchtigung der linksventrikulären Funktion korreliert.

8) Es besteht die Hypothese, dass ein standardisiertes multimodales *in-vivo* Bildgebungsprotokoll mittels *CMR* und ^{18}F-FDG-PET ein relevantes Werkzeug zur Beurteilung zelltherapeutischer Effekte nach akutem Myokardinfarkt im Mausmodell bietet.

8.4 Publikationen

Veröffentlichte Originalarbeit

Schweins, M., Gäbel, R., Raitza, M., Vasudevan, P., Lemcke, H., Joksch, M., Schildt, A., Kurth, J., Lindner, T., Meinel, F. G., Öner, A., Ince, H., Vollmar, B., Krause, B. J., David, R., & Lang, C. I. (2024). Multi-modal assessment of a cardiac stem cell therapy reveals distinct modulation of regional scar properties. *Journal of translational medicine*, 22(1), 187. https://doi.org/10.1186/s12967-024-04986-2
Impact factor: 8,440

Originalarbeit im "Review"-Prozess

Raitza, M. [*], Wolfien M. [*], Gäbel, R., Vasudevan, P., **Schweins, M.,** Lindner, T., Joksch, M., Schildt, A., Kurth, J., Glass, Ä., Öner, A., Ince, H., Meinel, F. G., Krause, B. J., Vollmar, B., David, R., & Lang, C. I. [68Ga] Ga-NODAGA-RGD post MI reflects activated Fibroblasts rather than Angiogenesis. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*

In Kürze eingereichte Originalarbeiten

1. Lemcke, H., Wörner P., Dalmer, A., **Schweins, M.,** Raitza, M., Gäbel, R., Vasudevan, P., Lindner, T., Öner, A., Ince, H., Krause, B. J., Vollmar, B., Meinel, F. G., David, R., & Lang, C. I.; Age-dependent effects on cardiac remodeling – a longitudinal MRI study.

2. Lang, C. I., Schenke, R., Schlüter, S., Gäbel, R., Vasudevan, P., **Schweins, M.,** Raitza, M., Lindner, T., Joksch, M., Kurth, J., Öner, A., Ince, H., Meinel, F. G., Halle M., Lutter, C., Krause, B. J., Vollmar, B., David, R.,; Endurance training in old mice reduces decline of cardiac function after myocardial infarction.

Kongressbeiträge

1. **Schweins M.,** Gäbel R., Vasudevan P., Lindner T., Vollmar B., Krause B.J., Ince H., David R., Lang C. „Multimodal and longitudinal imaging of myocardial healing following cardiac stem cell therapy in mice." *9th Cardiac Regeneration and Vascular Biology conference*, San Servolo, Venedig, Italien, 18. - 20. Oktober 2021, Posterbeitrag

2. **Schweins M.,** Gäbel R., Vasudevan P., Lindner T., Vollmar B., Krause B.J., Ince H., David R., Lang C. „Multimodal and longitudinal imaging of myocardial healing following cardiac stem cell therapy in mice." *Forschungscamp der Universität Rostock*, 18. November 2021, Posterbeitrag

Auszeichnung im Rahmen dieser Arbeit

Kaltenbach-Doktorandenstipendium der Deutschen Herzstiftung e.V. (2020)

8.5 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Moritz Michael Schweins
Geburtsdatum	27.01.1998
Anschrift	Riemannstraße 34
	04107 Leipzig
Telefon	+49 177 5012517
E-Mail	moritz.schweins@medizin.uni-leipzig.de
Geburtsort	Frechen-Hücheln
Staatsangehörigkeit	deutsch

Arbeitsverhältnisse

Seit 03/2025	Arzt in Weiterbildung in der Klink für Orthopädie, Unfallchirurgie und Plastische Chirurgie, Universitätsklinikum Leipzig

Bildungsweg

	Studium
11/2023 – 10/2024	Praktisches Jahr 1. Tertial: Orthopädie - Inselspital Bern 2. Tertial: Innere Medizin - Universitätsklinikum Leipzig 3. Tertial: Chirurgie - Universitätsklinikum Leipzig
10/2017 – 11/2024	Studium der Humanmedizin an der Universitätsmedizin Rostock 1. Staatsexamen (09/2019), Note 2,0 2. Staatsexamen (10/2023), Note 2,0 3. Staatsexamen (11/2024), Note 1,0
	Schulbildung
2008 - 2016	Gymnasium Lechenich Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (06/2016), Note 1,3

Forschungstätigkeit

	Experimentelle Promotionsarbeit
10/2019 – aktuell	“Multimodale Bildgebung der Herzinfarktheilung nach kardialer Stammzelltherapie im Mausmodell“ Forschungslabor für kardialen Gewebe- und Organersatz der Klinik für Herzchirurgie

	Universitätsmedizin Rostock Direktor der Klinik: Prof. Dr. med. Christian D. Etz Leiter des Forschungslabors: Prof. Dr. rer. nat. Robert David
10/2020 – 10/2021	Forschungssemester im Rahmen der Promotionsarbeit

Klinische Praktika

03/2019	2-wöchiges Praktikum in der Klinik für Herzchirurgie, herzchirurgische Intensivmedizin und Thoraxchirurgie, Uniklinik Köln
05/2017 – 06/2017	4-wöchiges Praktikum in der Allgemein-, Viszeral- und Tumorchirurgie, Uniklinik Köln
02/2014	Schulpraktikum in der Plastisch – Ästhetischen und Rekonstruktiven Chirurgie, Handchirurgie, Agaplesion Diakonieklinikum Rotenburg
01/2014	Schulpraktikum in der Orthopädie / Unfallchirurgie, PAN – Klinik Köln

Famulaturen

07/2022 – 08/2022	Allgemeinmedizin, MVZ Klenow Tor der Universitätsmedizin Rostock
08/2021	Kardiologische Praxis Burgstraße, München
11/2020 – 12/2020	Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie, Universitätsmedizin Rostock
02/2020 – 03/2020	Klinik für Herzchirurgie, herzchirurgische Intensivmedizin und Thoraxchirurgie, Uniklinik Köln

Sprachen

Englisch	sehr gute Kenntnisse, B2/C1
Spanisch	sehr gute Kenntnisse, B2
Italienisch	grundlegende Kenntnisse, A2

Extracurriculare Aktivitäten

Seit 07/2024	Mitglied bei AGA-Student
Seit 12/2022	Mitglied bei der Gesellschaft für Orthopädisch-Traumatologische Sportmedizin (GOTS)
10/2021 – 04/2024	Dozent für Anatomie an der staatlich anerkannten Schule für medizinische Technolog*innen für Laboranalytik oder Radiologie, Köln-Hohenlind

Auszeichnungen

04/2020 – 04/2021	Kaltenbach-Doktorandenstipendium der Deutschen Herzstiftung e.V.

8.6 Selbständigkeitserklärung

Ich versichere eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Rostock, 14.06.2025

Moritz Schweins

8.7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich gerne all jenen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. Robert David für die wertvolle Unterstützung und die konstruktiven Gespräche während des gesamten Promotionsprozesses sowie für das Vertrauen in dieses Projekt bedanken.
Ein besonderes Dankeschön möchte ich an PD Dr. Cajetan Lang richten. Vielen Dank für so viele Ideen und kritisches Hinterfragen. Du hast mich gefordert aber vor allem immer gefördert. Ich würde dich nicht nur als einen großartigen Betreuer, sondern inzwischen auch als Freund bezeichnen. Vielen Dank dafür!
Ein großer Dank gilt ebenso dem gesamten Laborteam. Besonders möchte ich mich bei Ralf bedanken, der mich ab der ersten Sekunde stetig unterstützt hat und als unersetzlicher Mäuse-Operateur diese Arbeit erst möglich gemacht hat. Zudem möchte ich mich bei Praveen für seine große Fachexpertise und die Stunden im Mikroskopier-Raum bedanken. Vielen Dank auch an Madeleine, Mandy, Anna und Heiko für eure händische als auch fachliche Unterstützung. Unseren gemeinsamen Kongressausflug nach Venedig werde ich immer in guter Erinnerung behalten und nie vergessen!

Ich möchte diese Arbeit gerne meiner lieben Familie widmen.
An erster Stelle möchte ich mich herzlich bei meiner Mutter bedanken. Ohne deine bedingungslose Unterstützung, deinen Glauben an mich und vor allem deine Geduld mit mir wäre mein Weg in dieser Form nicht möglich gewesen - Danke dafür! Besonders widme ich diese Arbeit meinem Vater. Auch wenn er diesen Moment nicht miterleben kann, bleibt er für mich mein größtes Vorbild und mein stiller Motivator. Ich denke viel an dich!
Auch meinen Brüdern, Julian und Felix, danke ich von Herzen – einfach dafür, dass es euch gibt und dafür, dass ihr mir stets das Gefühl gebt, nie allein zu sein.

Von Herzen danke ich auch meinen Freundinnen und Freunden. Dass ihr immer für mich da seid und das Leben jenseits von Studium und Arbeit so schön macht, bedeutet mir sehr viel!

Zum Schluss möchte ich dir danken, liebe Leni. Mit dir an meiner Seite ist einfach alles so viel leichter. Danke für deine Liebe, deine Wärme, dein Verständnis und dein stets offenes Ohr. Mit dir zu lachen und einfach zu sein, zeigt mir immer wieder, was wirklich im Leben zählt. Danke, dass es dich gibt!