

Aus der
1. Medizinischen Klinik der Technischen Universität München
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. A. Schömig)
und aus dem
Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung
Arbeitsgruppe Experimentelle Chirurgie
der Technischen Universität München
(Direktor: Prof. Dr. med. B. Gänsbacher)

Angefertigt unter der Leitung von
PD Dr. med. M. Seyfarth und
Prof. Dr. med. vet. Dr. med. habil. W. Erhardt

Eingereicht über
Prof. Dr. med. vet. B. Kaspers
Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung
Lehrstuhl für Physiologie
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
(Vorstand: Prof. Dr. med. vet. M. Stangassinger)

**Der Einfluss des thrombozytären Kollagenrezeptors GPVI auf die Infarktgröße
im myokardialen Ischämie-Reperusionsmodell der Maus**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Karen Knote
aus
München

München, 2005

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle
Referent: Univ.-Prof. Dr. B. Kaspers
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. W. Schmahl

Tag der Promotion: 15. Juli 2005

Meiner Familie,

ganz besonders meiner Großmutter

Fr. Dr. med. Gertrud Jergler,

und meinen Freunden

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Schrifttum	2
2.1	Myokardinfarkt.....	2
2.1.1	Pathogenese des Myokardinfarktes	2
2.1.2	Hämostase	3
2.1.3	Einfluss der Thrombozyten auf die Hämostase.....	3
2.1.4	Gefäßwandläsion als Auslösemechanismus der Hämostase.....	5
2.2	Aufbau der Thrombozyten	6
2.3	Aufgaben der Thrombozyten	8
2.3.1	Adhäsion	8
2.3.2	Aktivierung und Sekretion	10
2.3.3	Aggregation.....	11
2.4	Ischämie und Reperfusion.....	12
2.5	Thrombozytäre Kollagenrezeptoren.....	15
2.6	Kollagenrezeptor Glykoprotein VI (GPVI)	17
2.6.1	Aufbau des GPVI	17
2.6.2	Signalübermittlung durch GPVI.....	19
2.6.3	Soluble GPVI: Möglichkeit zur pharmakologischen Intervention.....	22
2.7	Therapieformen des akuten Myokardinfarktes	24
2.8	Myokardiale Ischämie im Tiermodell	26
2.9	Die Maus als Modell für myokardiale Ischämie	27
2.9.1	Die Maus als Modell für kardiale Erkrankungen.....	27
2.9.2	Die Anatomie des Mäus eherzens	28
2.9.3	Thrombozyten von Maus und Mensch	30
2.9.4	Echokardiographie bei der Maus.....	31
3	Eigene Untersuchungen	33
3.1	Zielvorstellung.....	33
3.2	Material und Methoden.....	34
3.2.1	Versuchstiere und Haltungsbedingungen	34
3.2.2	Übersicht Versuchsplan	34
3.2.3	Gruppeneinteilung	36
3.2.4	Sonographische Messung.....	36

3.2.5	Durchführung der Operation	39
3.2.5.1	Vorbereitung und Anästhesie	39
3.2.5.2	Tracheotomie.....	40
3.2.5.3	Thorakotomie mit Ischämie	42
3.2.5.4	Postoperative Versorgung und Analgesie	44
3.2.5.5	Infarktfärbung und Probengewinnung	45
3.2.5.6	Probenaufarbeitung und Auswertung	46
3.2.5.7	Statistische Auswertungen	47
3.3	Ergebnisse	49
3.3.1	Echokardiographie.....	50
3.3.2	Überlebensrate.....	50
3.3.3	Infarktgröße.....	50
4	Diskussion	56
4.1	Diskussion der Versuchsdurchführung.....	56
4.2	Diskussion der Ergebnisse	58
4.2.1	Allgemeines.....	58
4.2.2	Infarkte.....	59
4.2.3	Echokardiographie.....	60
4.3	Schlussfolgerung und Ausblick.....	61
5	Zusammenfassung	62
6	Summary	63
7	Literaturverzeichnis	64
8	Tabellenverzeichnis	84
9	Abbildungsverzeichnis	85
10	Abkürzungsverzeichnis	87
11	Danksagung	90
12	Lebenslauf	91

1 EINLEITUNG

Arteriosklerose und Herzinfarkt sind keine neu entstandenen Zivilisationskrankheiten. Schon bei 3000 Jahre alten ägyptischen Mumien konnte RUFFER (1911, zitiert nach STRAUER 2001) arteriosklerotische Veränderungen nachweisen, die schon damals offenbar so häufig wie heutzutage vorkamen. Kardiovaskuläre Erkrankungen verursachen auch weiterhin, wenigstens in den Industrieländern, die meisten Todesfälle. In Deutschland ereignen sich ca. 270 000 Herzinfarkte pro Jahr, mehr als ein Drittel der betroffenen Patienten verstirbt akut (STRAUER 2001).

Wie das Statistische Bundesamt mitteilt, verstarben im Jahre 2003 von den 80 Mio. Einwohnern in Deutschland bei einer mittleren Lebenserwartung von 80 Jahren für Frauen und 74 Jahren für Männer insgesamt 853 946 Personen. Dabei wurde nahezu bei jedem zweiten Verstorbenen (162 210 Männer und 234 412 Frauen) der Tod durch eine Erkrankung des Herzkreislaufsystems ausgelöst. Der Herzinfarkt selbst, der zur Gruppe der Herzkreislauferkrankungen gehört, konnte bei 45,3% der weiblichen und 54,7% der männlichen Verstorbenen als Todesursache ermittelt werden (Statistisches Bundesamt Gesundheitswesen 2005). Trotz adäquater Therapie weisen Patienten, die einen akuten Myokardinfarkt überlebt haben, einen deutlichen Funktionsverlust des Herzens auf, was sich negativ auf Prognose und Lebensqualität auswirkt (STRAUER 2001).

Thrombozyten tragen einen erheblichen Anteil zur Pathogenese des akuten Myokardinfarktes bei: der Verschluss eines Koronargefäßes durch einen Thrombus führt zu Ischämie des distal gelegenen Gewebes und zum Zelluntergang. Außerdem bilden aktivierte Thrombozyten Mikrothromben und tragen so zur Verminderung der Mikrozirkulation bei. Auch die darauf folgenden Entzündungsreaktionen werden durch Thrombozyten beeinflusst (GAWAZ 2004). Bei der Aktivierung der Blutplättchen selbst spielt das Glykoprotein VI (GPVI) als Kollagenrezeptor auf der Thrombozytenoberfläche eine entscheidende Rolle und gilt auch als Risikofaktor für Myokardinfarkte. Thrombozyten ohne GPVI zeigen keine Adhäsion an Kollagen und die Aktivierbarkeit und Aggregation ist deutlich herabgesetzt; Antikörper gegen GPVI oder lösliche Formen von GPVI verhindern diese ebenso (GRÜNER et al. 2005; MOROI und JUNG 2004).

In der vorliegenden Studie soll in einem Ischämie-Reperfusionmodell der Maus der Einfluss von freiem GPVI (soluble GPVI-Fc) auf die Infarktgröße ermittelt werden.

Es sollen Möglichkeiten neuer Ansätze zur pharmakologischen Intervention für die Therapie und Prophylaxe bei Herzinfarktpatienten aufgezeigt werden.

2 **SCHRIFTTUM**

2.1 **Myokardinfarkt**

2.1.1 **Pathogenese des Myokardinfarktes**

Sowohl eine instabile Angina pectoris als auch ein Myokardinfarkt lassen sich auf gemeinsame pathophysiologische Ursachen zurückführen, wie die Ruptur der arteriosklerotischen Plaques mit Erosionen, sowie in verschiedenen Schweregraden auftretenden Koronarthrombosen und distale Embolisierungen (FALK 1983; DAVIES und THOMAS 1985; STRAUER 2001). Begünstigt durch verschiedene Risikofaktoren (Hyperlipidämie, Rauchen, Diabetes, Ernährung) entstehen an Gefäßwänden Ablagerungen, die sog. arteriosklerotischen Plaques. Die intimale Lipideinlagerung („fatty streak“) ist eine der ersten sichtbaren pathologischen Veränderungen im Bereich der Arterienwand und beginnt bereits im Kindesalter (STARY et al. 1994).

Pathophysiologisch gesehen sind die zentralen Auslösemechanismen dieser Veränderung Monozytenchemotaxis, Transmigration durch die Gefäßwand, Makrophagendifferenzierung und Bildung von Schaumzellen durch Lipideinlagerungen. Dieses führt zum Anwachsen der Plaque. Durch die weiche, schwammige Konsistenz wird dieses Gebilde sehr verletzlich (VAN DER WAL et al. 1994) und kann durch verschiedene Ursachen, z.B. plötzlich erhöhten Blutdruck, gelöst werden (HORT 2001). Auf dem Wundgebiet entwickelt sich dann schnell ein Thrombus (CONTI und MEHTA 1987; FUSTER et al. 1992). Bei großen Infarkten verlegt dieser vollständig das Koronararterienlumen, bei der instabilen Angina pectoris ist er meist kleiner (HORT 2001). Dies führt zu Ischämie unterschiedlichen Ausmaßes distal der Okklusion gelegener Bereiche (FUSTER et al. 1999). Das entscheidende morphologische Kriterium eines Herzinfarktes ist der irreversible Untergang von Myozyten, der erst nach dem Überschreiten der Wiederbelebenszeit des Myokards beginnt. Sie liegt beim Hundeherzen nach experimenteller Unterbindung der Koronarien bei etwa 30 bis 40 Minuten. Die endgültige Größe des Infarktes ist im Tierversuch beim Hund nach etwa 4 bis 6 Stunden erreicht (JENNINGS et al. 1960; JENNINGS et al. 1985). Beim Menschen mit einer akuten Koronarthrombose dürfte der Zeitraum der Wiederbelebenszeit ähnlich sein. Hier sind die Chancen der thrombolytischen Therapie sowie der Reperfusionstherapie zu sehen (HORT 2001).

2.1.2 Hämostase

Im physiologischen Zustand zirkuliert das Blut in einem geschlossenen Gefäßsystem, ohne dass es zum Sistieren des Blutflusses oder zum Austritt von Blut in umliegendes Gewebe kommt (Abb.1 A). Schäden in der Gefäßwand führen zur Aufhebung der Integrität der Gefäßwand und zu anschließender Blutung in umliegendes Gewebe. Um dies zu verhindern, bilden Thrombozyten in Verbindung mit löslichen Plasmakomponenten einen hämostatischen Thrombus, der den Schaden abdichtet und die Blutstillung bewirkt. Die zur Blutstillung notwendige Bildung eines Gefäßwandthrombus am geschädigten Endothel wird Hämostase genannt. Diese Reaktion bleibt unter physiologischen Bedingungen auf den Bereich der Läsion beschränkt, ohne den Blutfluss und damit die Versorgung abhängiger Gewebe zu beeinflussen (GAWAZ 1999). Die komplexe Abfolge von Reaktionen, die für die hämostatische Antwort notwendig sind, schließt sowohl biochemische Reaktionen von Blutzellen, den Komponenten der Gefäßwand und aber auch von gelösten Molekülen ein (ROSS 1993; KROLL et al. 1996; ANDREWS et al. 1997).

Einteilung:

- Ø **Primäre Hämostase:** ausgeführt durch Thrombozyten, der Defekt des Endothels wird schnell abgedeckt: Adhäsion und Aggregation der Thrombozyten mit Bildung eines primären, plättchenreichen Thrombus, fragil, löst sich leicht
- Ø **Sekundäre Hämostase:** Gerinnungskaskade, festigt den sekundären hämostatischen Thrombus durch Zusammenspiel der verschiedenen Gerinnungsfaktoren, Komplementkaskade und Gewebesubstanzen
- Ø **Fibrinolyse:** Regulierung der Thrombusbildung, Heilungsphase (GAWAZ 1999)

2.1.3 Einfluss der Thrombozyten auf die Hämostase

1. Thrombozyten und primäre Hämostase

Sobald eine Läsion an einem Blutgefäß auftritt, werden sofort die verschiedenen zellulären und biochemischen Mechanismen in Gang gesetzt, die für die Hämostase notwendig sind.

Innerhalb von Sekunden adhären Thrombozyten an freiliegendes Kollagen, werden aktiviert, setzen Substanzen aus Granula frei, rekrutieren andere Thrombozyten und aktivieren auch diese. Es beginnt mit einer Verletzung und endet nur wenige Minuten später mit einem stabilen Thrombus, ein Prozess, der Blutungen verhindert und die Wundheilung ermöglicht (ANDREWS et al. 1997, GAWAZ 2004).

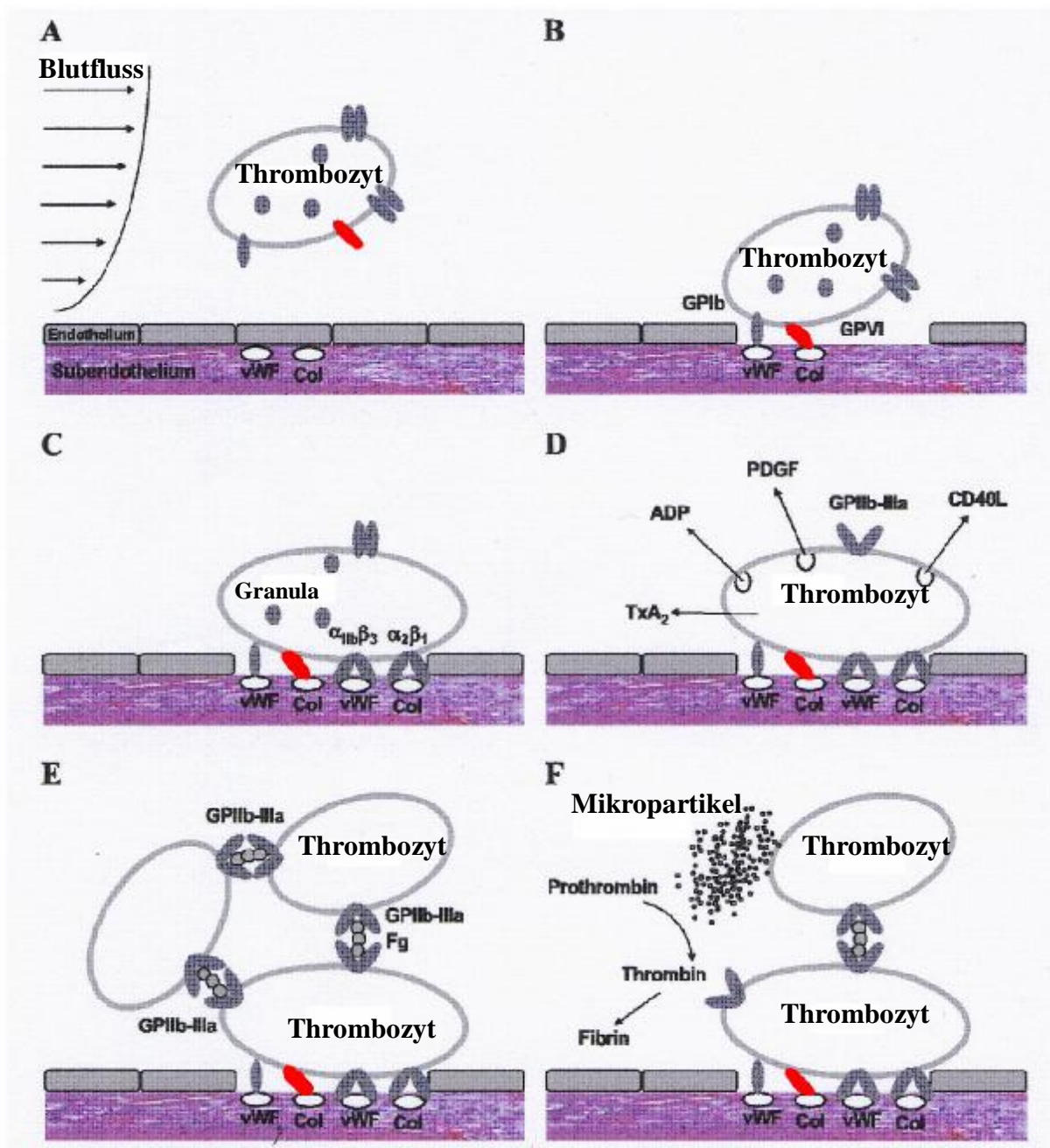


Abb.1 A) Blutfluss bei intaktem Endothel
 B) bei einer Gefäßwandverletzung binden GPIb-V-IX über von-Willebrand-Faktor (vWF) und GPVI (rot) an freiliegendes Kollagen (Col): Adhäsion. C) Aktivierung von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ und $\alpha_2\beta_1$. D) Thrombozytenaktivierung mit Sekretion und Aktivierung des Fibrinogenrezeptors GPIIb-IIIa. E) Aggregation über Fibrinogenbrücken (Fg) durch GPIIb-IIIa. F) Freisetzung von Mikropartikeln und Beginn der sekundären Hämostase: Bildung von Fibrin aus Prothrombin bzw. Thrombin (nach GAWAZ 2004)

2. Thrombozyten und sekundäre Hämostase

Da das primäre Plättchenaggregat relativ instabil ist, erfordert eine effektive und dauerhafte Blutstillung die Konsolidierung des Primärthrombus. So beginnt die sekundäre Hämostase mit Aktivierung der Gerinnungskaskade für die Bildung von Thrombin (MANN et al. 1992; RUGGERI 2002) in der Umgebung des Plättchenaggregates. Thrombin hat zwei wichtige Aufgaben in der Entstehung und Stabilisierung des Plättchenaggregates: Zum einen ist Thrombin ein höchstpotenter Aggregationsvermittler, der auch ohne Thromboxan A₂ und ADP in der Lage ist die Aggregation auszulösen, zum anderen wird mit Hilfe von Thrombin Fibrinogen zu Fibrin umgewandelt, welches das Plättchenaggregat weiter stabilisiert (PACKHAM 1994). Die primäre Hämostase wird im Wesentlichen von den Thrombozyten getragen, die sekundäre Hämostase ist die Domäne des plasmatischen Gerinnungssystems und wird durch die Gerinnungsfaktoren, also von Serumproteinen, gewährleistet. Sie mündet in der Bildung eines Fibringerinnsels, welches im Verein mit dem Thrombozytenaggregat den entgeltigen stabilen Wundverschluss in Form eines Thrombus aus Thrombo- und Erythrozyten sowie aus Fibrin bildet. Nach abgeschlossener Thrombusbildung setzt dann die Reorganisation des Gewebes, vergleichbar mit der Wundheilung, ein (GAWAZ 2004).

2.1.4 Gefäßwandläsion als Auslösemechanismus der Hämostase

Auch das Endothel spielt durch die Regulation der Permeabilität für Plasmalipoproteine, Leukozytenadhäsion und die Sezernierung von pro- und antithrombotischen Faktoren sowie vasoaktiven Substanzen eine zentrale Rolle bei der arteriellen Hämostase (VANE et al. 1990). Das Endothel, die einschichtige Gefäßwandauskleidung, die den Blutstrom von den thrombogenen Strukturen des Subendothels trennt, sezerniert eine Reihe von anti-thrombogenen und vasoaktiven Substanzen: Prostaglandin und Stickstoffmonoxid (NO) wirken einer überschießenden Thrombozytenaktivierung entgegen. Stickstoffmonoxid (NO), „endothelium derived relaxing factor“ (EDRF) und Prostaglandin regulieren als Vasodilatoren (Relaxation der glatten Muskelzellen) den Gefäßtonus. Als Gegenspieler setzen aktivierte Thrombozyten vasokonstriktorische Substanzen frei (Adeninnukleotide wie ADP und ATP, Serotonin und Thromboxan A₂), die im Endothel die Synthese von cGMP stimulieren. Ein erhöhter cGMP-Spiegel führt in einem Feedback-Mechanismus durch vermehrte Bildung von NO und EDRF zur Thrombozyteninhibierung und Vasodilatation (LIAO 1998).

2.2 Aufbau der Thrombozyten

Thrombozyten, die kernlosen kleinsten Blutzellen, entstehen aus dem Zytoplasma der Megakaryozyten im blutbildenden Knochenmark. Ihre Form als Fragmente der Megakaryozyten erhalten sie durch die Scheerkräfte in der Blutzirkulation (STENBERG und LEVIN 1989). Ihre Überlebenszeit beträgt ca. 10 Tage, bis sie im retikuloendothelialen System der Leber und Milz abgebaut werden. Etwa ein Drittel der Thrombozyten ist in der Milz gespeichert und steht so dem Austausch zirkulierender Plättchen zur Verfügung (BEHNKE und FORER 1998; GEORGE 2000).

Werden Thrombozyten aktiviert, ändern sie ihre Form (Shape-change) von der typischen diskoiden Form in die sog. Echinosphärozyten. Dabei bilden sie durch Ausstülpung der Plasmamembran Pseudopodien aus und vergrößern so ihre Oberfläche von $8 \mu\text{m}^2$ auf $13 \mu\text{m}^2$ (BEHNKE 1970; GEORGE 2000).

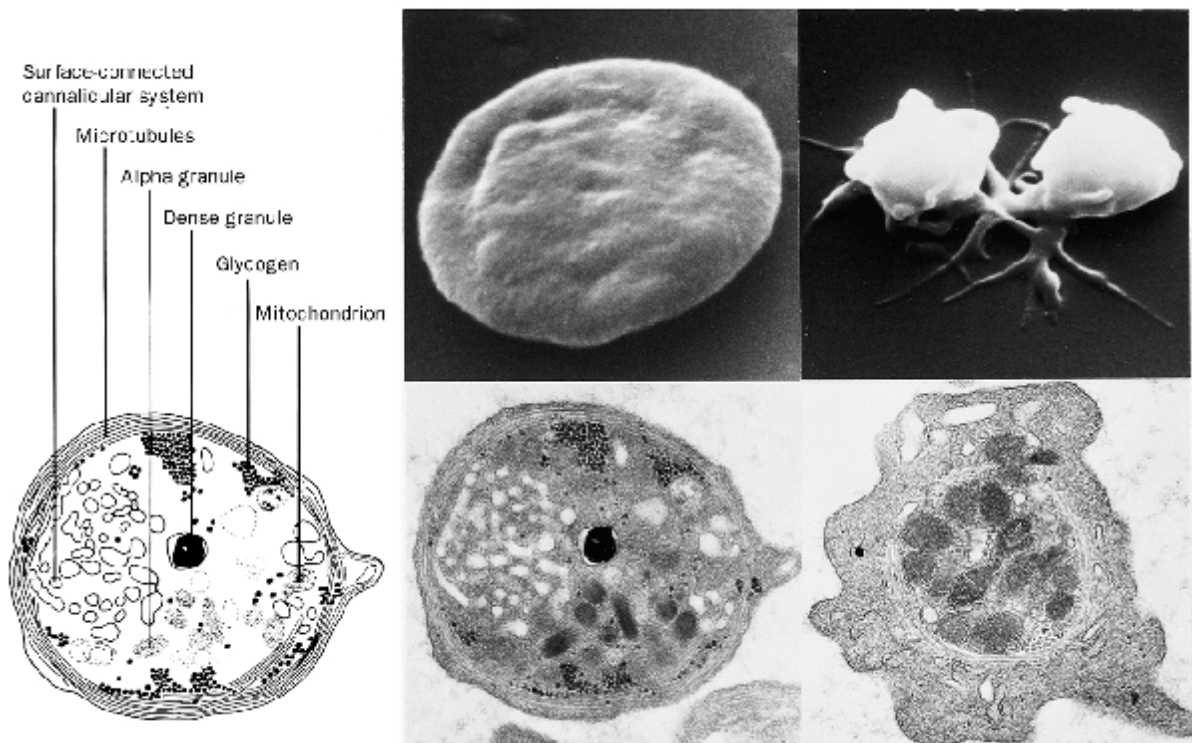


Abb.2 Form und Zellorganellen ruhender und aktivierter Thrombozyten (GEORGE 2000)

Die Ultrastruktur der Thrombozyten wird nach GAWAZ (1999) in vier morphologische Bereiche unterteilt:

- Ø **Periphere Zone**
- Ø **Strukturelle Zone**
- Ø **Zone der Organellen**
- Ø **Membransystem**

Die periphere Zone besteht aus einer Zytoplasmamembran, aufgebaut aus Glykoproteinen, Proteinen und Mukopolysacchariden, die sog. Glykokalyx, die in eine Phospholipidschicht (Bilayer) eingebettet sind. Hier sind die Proteine integriert, die nach Stimulation von Agonisten (ADP oder Thrombin) oder für Adhäsionsproteine (Fibrinogen oder von-Willebrand-Faktor) als Rezeptoren fungieren: Plättchenfaktor 3 wird gebildet, second messenger zur Signalübermittlung und Arachidonsäure werden freigesetzt.

Die strukturelle Zone setzt sich aus Mikrotubuli und anderen Strukturproteinen zusammen, die für die Ruheform der Thrombozyten, aber auch für die Ausbildung der Pseudopodien bei Aktivierung verantwortlich sind. Diese Strukturproteine bilden das Zytoskelett aus Aktin und Myosin.

Die Zone der Organellen im Zytoplasma enthält Mitochondrien, Glykogenspeicher und Speichergranula:

- Ø **Dichte Granula (dense bodies):** ADP, ATP, GTP, GDP, Kalzium, Serotonin
- Ø **α-Granula:** Enzyme, adhäsive Proteine (wie GPIIb-IIIa, GPIb, GPIX und GPV) (BERGER et al. 1996), Wachstumsfaktoren, zytokinähnliche Proteine, Koagulationsfaktoren
- Ø **Lysosomen:** hydrolytische Enzyme

Das Membransystem setzt sich aus einem offenen kanalikulären System und einem dichten tubulären System, dem Hauptspeicher für freie Kalziumionen, zusammen. Freies Kalzium spielt die Hauptrolle in der Regulation des Plättchenmetabolismus und in der Aktivierung (RINK und SAGE 1990). Wird der Schwellenwert der zytoplasmatischen freien Kalziumkonzentration überschritten, kommt es zur Formveränderung und Degranulation (GAWAZ 1999). Sekretion und Endozytose finden hier statt (GEORGE 2000).

2.3 Aufgaben der Thrombozyten

2.3.1 Adhäsion

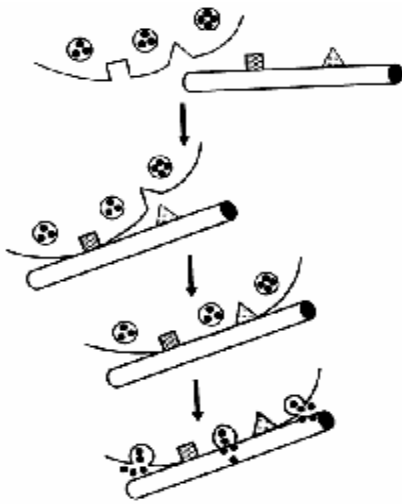
Bei einem Endothelschaden der Gefäßwand und der nun offenliegenden thrombogenen subendothelialen Matrix kommt es im Rahmen der Hämostase zur Adhäsion ruhender, im Blut zirkulierender Thrombozyten an nun freiliegendes Kollagen (BAUMGARTNER 1977) (primäre Adhäsion). Dieser initiale Adhäsionsvorgang wird durch thrombozytäre Membranglykoprotein-Rezeptoren, den Integrinen, gesteuert und resultiert in Formveränderung, Thrombozytenaktivierung und Freisetzung der Inhaltsstoffe aus den Speichergranula (BAUMGARTNER 1977; GAWAZ 1999).

Die Plättchenadhäsion, die unter arteriellen Strömungsbedingungen und somit unter hohen Scherkräften stattfindet, wird vermittelt über den von-Willebrand-Faktor (vWF), der zum Teil von Endothel und Megakaryozyten (ANDREWS et al. 1997) sezerniert wird, zum Teil aus thrombozytären Speichergranula stammt und an freiliegendem Kollagen bindet (RUGGERI 1997). Über Interaktion des thrombozytären Rezeptors für vWF (Glykoprotein Ib-V-IX) mit kollagenimmobilisiertem vWF wird der erste Kontakt zirkulierender Blutplättchen mit der Zellwandläsion hergestellt (Abb.1 B) (ROTH 1991; RUGGERI 1997; ANDRÉ et al. 2000; RUGGERI 2002).

Zwei weitere thrombozytäre Glykoproteine (GPIa-IIa = Integrin $\alpha_2\beta_1$ und GPVI) interagieren zugleich direkt mit dem freiliegenden Kollagen und stabilisieren die Bindung (STAAZ et al. 1989; WATSON und GIBBINS 1998; RUGGERI 2002). Diese Bindung kann auch bei ruhigem Blutfluss stattfinden. Im Gegensatz zur Bindung über den vWF ermöglicht die direkte Bindung über Kollagen eine stabile Adhäsion und das Wachstum des Thrombus (JACKSON et al. 2003).

So ermöglicht GPVI als der wichtigste Kollagenrezeptor (KEHREL et al. 1998) nicht nur eine festere Bindung direkt an Kollagen (Abb.1 C), sondern vermittelt auch die Aktivierung anderer zur Adhäsion notwendiger Rezeptoren, wie Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ und $\alpha_2\beta_1$ (NIESWANDT et al. 2001 a; CHEN und KAHN 2003; NIESWANDT und WATSON 2003).

Nach dem vereinfachten “two-step, two-site model” ist der erste Kollagenrezeptor



Glykoprotein Ia-IIa (Integrin $\alpha_2\beta_1$) verantwortlich für die Adhäsion des Blutplättchens am Kollagen, ein zweiter Kollagenrezeptor, Glykoprotein VI (GPVI) sorgt für die Aktivierung der am Kollagen bereits gebundenen Thrombozyten und für die Sekretion der Granulainhaltsstoffe (SANTORO et al. 1991; MOROI et al. 1996; SIXMA et al. 1997). Diese Reaktionen müssen laut WATSON et al. (2000) jedoch unbedingt weiter differenziert werden.

Abb.3 Santoro et al. 1991 “two-step, two-site model”
Ein Rezeptor ist für Adhäsion, der zweite für Aktivierung der Thrombozyten verantwortlich

WATSON et al. (2000) modifizieren das “two-step, two-site model”. Einer der Rezeptoren bindet initial an Kollagen, die Bindung des zweiten Rezeptors verstärkt die Interaktion. Signale von GPVI steigern die Affinität von Integrin $\alpha_2\beta_1$ für Kollagen, das Signal zur Aktivierung der Phospholipase $C\gamma_2$ verstärkt sich. CHEN und KAHN beschreiben 2003 ein Two-receptor-Modell zur kollageninduzierten Plättchenaktivierung. Hier sorgt der Non-Integrin-Rezeptor GPVI für das initiale Kollagensignal, das den Integrinrezeptor $\alpha_2\beta_1$ aktiviert und an die Oberfläche rekrutiert, der dann das Kollagensignal amplifiziert und die Thrombozytenaktivierung über eine ähnliche Signalkaskade wie GPVI (s. u.) vervollständigt (CHEN und KAHN 2003). Außerdem tragen beide Rezeptoren zum Shape-change bei (JARVIS et al. 2002).

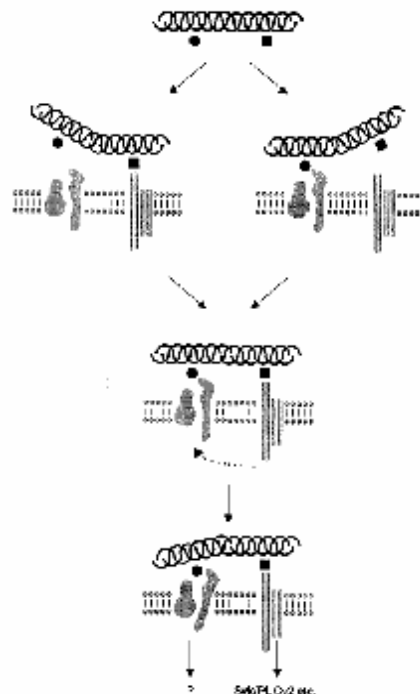


Abb.4 Watson et al. 2000 modifiziertes “two-step, two-site model”: ein Rezeptor bindet an Kollagen, aktiviert den zweiten, beide zusammen leiten die Thrombozytenaktivierung ein

2.3.2 Aktivierung und Sekretion

Auf die Adhäsion folgt die Thrombozytenaktivierung. Sie wird durch Kollagen und Thrombin initiiert, zwei der potentesten Thrombozytenagonisten (WILNER et al. 1968; BAUMGARTNER 1977; VALETTAS und HERRMANN 2003). Zusätzlich sind als Agonisten folgende Stoffe beteiligt: ADP, freigesetzt aus Gefäßzellen und aktivierten Thrombozyten, Adrenalin, Thrombin, Thromboxan A₂ (vasokonstriktorisches) aus aktivierten Plättchen (RUGGERI 2002; VALETTAS und HERRMANN 2003).

Jeder der Agonisten bindet an seinen Rezeptor auf der Plättchenoberfläche und agiert über komplexe Second-messenger-Systeme, wobei meist G-Proteine als Übermittler fungieren (BRASS und MOLINO 1997). So wird auch die Kalziumkonzentration über Kalziumfreisetzung aus den Speichergranula, reguliert von Phospholipase C, im Zytosol der Blutplättchen deutlich erhöht. Die Kalziumkonzentration im Zytosol beträgt 0,05 bis 0,1 µM und steigt während der Aktivierung auf Werte über 1 µM an, wodurch die Aktivität der kalziumabhängigen Enzyme entscheidend verändert wird (BRASS et al. 1993).

Der intrazelluläre Kalziumanstieg führt letztendlich zur Plättchenaggregation sowie zur Phosphorylierung weiterer Membranproteine über Proteinkinase C, die die Sekretion der Granula und die Aktivierung des Fibrinogenrezeptors GPIIb-IIIa steuern (Abb.1 D) (KNIGHT et al. 1984; DAVIES et al. 1989).

Insbesondere durch die Bindung der thrombozytären Kollagenrezeptoren und durch Erhöhung des zytoplasmatischen Kalziumspiegels kommt es während der Aktivierung zum shape-change, einer Formveränderung der Thrombozyten, wobei diese Pseudopodien ausbilden. Diese Reaktion wird auch durch die Bindung von Thromboxan A₂ an die Rezeptoren auf der Plättchenoberfläche (G-Protein-vermittelt) ausgelöst (GALLET et al. 1999).

Ein weiterer Weg, die intrazelluläre Signalübermittlung, die auch G-protein-gekoppelt zur Aktivierung durch Thrombin führt, beginnt mit der Aktivierung der Phospholipase C β (PLC- β) (BRASS und MOLINO 1997; OFFERMANN et al. 1997). Diese ermöglicht die Bildung von Inositoltriphosphat und Diacylglycerol, das wiederum Kalzium aus den Granula freisetzt und die Proteinkinase C aktiviert. Die Thrombozytenaktivierung durch Thrombin resultiert in der Formation von Filopodien und Zellspreizung durch Ausspannen von Lamellen (HARTWIG 1992). Ausgelöst wird die Pseudopodienbildung durch einen kalziuminduzierten Übergang von globulärem Aktin in langgestrecktes, fibrilläres Aktin. In den Pseudopodien reichern sich Mikrotubuli an, die Plasmamembran wird durch Aktin-Filamente stabilisiert. Dynamische Formveränderung wird durch einen kontraktilem Apparat aus Aktomyosin

ermöglicht. Begleitet wird diese Formveränderung von der Sekretion des Inhaltes der Granula (KROLL und SCHAFER 1989).

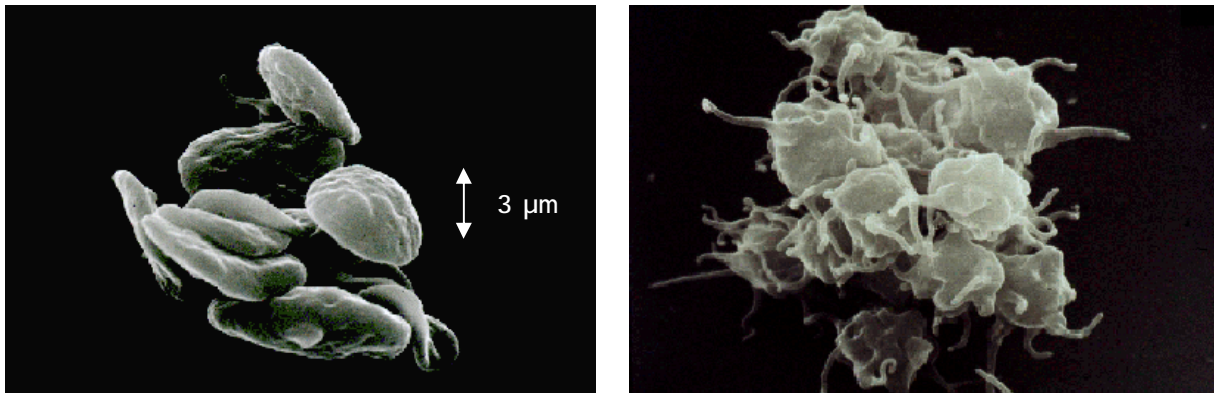


Abb.5 nicht aktivierter Zustand: diskoide Form, aktivierter Zustand: Echinosphärozyten
(in GAWAZ 1999 Das Blutplättchen: [http://www.platelet page](http://www.platelet.page))

2.3.3 Aggregation

Aggregation ist der nächste Schritt in der Hämostase, der zu einer Anhäufung von Thrombozyten im Thrombus führt (RUGGERI 2002).

Übermittelt wird die Aggregation, die Vernetzung verschiedener Thrombozyten über Fibrinogenbrücken, durch den GPIIb-IIIa-Rezeptor (Abb.1 E) (PEERSCHKE 1985; GEORGE 2000). Durch kalziumabhängige Signaltransduktion (der Kalziumspiegel steigt durch die Sekretion an) des aktivierten Thrombozyten wird der Aggregationsrezeptor GPIIb-IIIa stimuliert und expositioniert. Auf ruhenden Plättchen liegt dieser Fibrinogenrezeptor inaktiv vor, d.h. bei Aktivierung bildet er „Fibrinogenbindungstaschen“ aus, zusätzlich wird bei Aktivierung die Zahl der Rezeptoren auf der Oberfläche erhöht (PIDARD et al. 1991; GAWAZ 2004).

So wird im Zuge der primären Hämostase ein plättchenreicher, fragiler Thrombus gebildet. Während der Plättchenaggregation setzen aktivierte Thrombozyten potente Plättchenagonisten frei, wie Thrombin, ADP und Thromboxan A₂, die die Aufnahme neuer Thrombozyten in das wachsende Aggregat ermöglichen (RUGGERI 2002).

Außerdem scheiden aktivierte Thrombozyten kleine Mikropartikel mit hoher prokoagulatorischer Aktivität von ihrer Membranoberfläche ab. Diese Mikropartikel katalysieren die Bildung von Thrombin um das Plättchenaggregat herum, damit die Fibrinbildung und Konsolidierung des Thrombus induziert wird (Abb.1 F) (HOLME et al. 1997; GAWAZ 2004).

2.4 Ischämie und Reperfusion

Abgeleitet vom griechischen Ursprung bedeutet Ischämie „eingeschränkter Blutfluss“ (ἰσχεῖν zurückhalten, abhalten, hindern; αἷμα Blut). In den meisten Studien wird Ischämie als Zustand der Imbalance zwischen Sauerstoff- bzw. Substratangebot und Bedarf für die Aufrechterhaltung physiologischer Funktionen definiert (REIMER und JENNINGS 1992; HEARSE 1994). Wenn die Unterversorgung des Gewebes durch Ischämie lange genug anhält, werden die Myozyten irreversibel geschädigt. Es kommt zum Absterben der Zellen durch Apoptose und Nekrose. Myozytennekrose bedingt durch myokardiale Ischämie definiert den Myokardinfarkt (REIMER und JENNINGS 1992).

Sowie der Blutfluss in einem Koronargefäß vermindert wird, treten irreversible Schäden an den Myozyten auf, die den Funktionsstoffwechsel im Myokard zum Stillstand bringen, es kommt letztendlich zum Zelluntergang durch Nekrose und Apoptose. Durch die Minderversorgung mit Sauerstoff wird der Stoffwechsel von aerober Glykolyse für die adäquate oxidative Phosphorylierung auf anaerobe Glykolyse umgestellt (dabei werden aus einem Mol Glukose 38 Mol ATP gebildet). Es entstehen aus einem Mol Glukose nur noch zwei Mol ATP und Laktat. Durch den Zusammenbruch der ATP-Produktion kommt es, vermittelt über verschiedene Mechanismen, zur Bildung von freien Radikalen (SIMPSON und LUCCHESI 1987). Da auch der Abtransport der Metaboliten nicht mehr gewährleistet ist, akkumuliert gleichzeitig das Laktat, und es kommt zu einem intrazellulären und interstitiellen Abfall des pH-Wertes. Die so resultierende Ansäuerung und der Verlust an energiereichen Phosphaten, durch den Zusammenbruch der oxidativen Phosphorylierung, führen dazu, dass intra- und transzelluläre Transportprozesse zum Erliegen kommen (LAZDUNSKI et al. 1985; PIWNICA-WORMS et al. 1985). Ein unkontrollierter Natriumeinstrom und eine daraus folgende Depolarisation der Zellmembran mit konsekutivem Kalziumeinstrom sind die Folge (FIOLET et al. 1984; STEENBERGEN et al. 1987; MARBAN et al. 1989; MATTHEW 1989; STONE et al. 1989).

Durch die Laktatazidose und den Verlust der Pufferungskapazität des Zytoplasmas durch den Elektrolyteinstrom kommt es außerdem zur Zellmembranschädigung. Die Folgen sind ein Ödem des Gefäßendothels sowie der Myozyten mit Zerreißen des myofibrillären Apparates und damit eine weitere Durchblutungsstörung in der Umgebung. Der Kalziumanstieg während der Ischämie bewirkt eine Relaxation der Myofibrillen, es kommt zu kontraktile Dysfunktionen (FERRARI et al. 1985; MARBAN et al. 1989) und letztendlich zur hypoxischen Herzdilatation.

SCHRIFTTUM

Im weiteren Verlauf führen diese Mechanismen schließlich zum Absterben der Kardiomyozyten durch Nekrose und Apoptose. Die aktivierte Phospholipase bewirkt die Bildung von Inflammationsmediatoren wie Prostaglandinen und Leukotrienen, wodurch sowohl Leukozytenadhäsion als auch Endothelschädigung während der Reperfusion begünstigt werden (ADAMS und SHAW 1994).

Bei Reperfusion des ehemals durch einen Gefäßverschluss ischämischen Bereiches wird dieser wieder mit oxigeniertem Blut versorgt. Dadurch wird der Zellschaden zum einen begrenzt, da Versorgung und Abtransport wieder gewährleistet werden und sich auch die Kalziumkonzentration normalisiert (JENNINGS et al. 1985). Paradoxe Weise ist dieser Prozess jedoch mit einer weiterführenden Myokardschädigung verbunden, es kommt zum sogenannten Reperfusionsschaden: Die Bildung der antikoagulativen Substanzen wie EDRF und Prostazyklin des Endothels wird vermindert, es kommt zur vermehrten Adhäsion von Thrombozyten und Granulozyten am geschädigten Endothel, wodurch die Mikrozirkulation weiterhin eingeschränkt bleibt (SMITH 1993; MASSBERG et al. 1998, 1999). Eine weitere bedeutende Komponente des sogenannten Reperfusionsschadens ist die gesteigerte Inflammationsreaktion: durch die myokardiale Ischämie wird ebenso das Komplementsystem aktiviert, dies wiederum trägt zur Einwanderung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten bei. Der Anstieg der freien Radikale, die während der Ischämie/Reperfusion gebildet werden, besitzt das Potential Myozyten und Endothelzellen direkt zu schädigen und triggert den Entzündungsprozess durch die Induktion von Zytokinen (DHALLA et al. 2000). Auch aktivierte Thrombozyten vermitteln chemotaktisch Reaktionen von Leukozyten und Endothel, und tragen so erheblich zum sogenannten Reperfusionsschaden bei. Aus den dichten Granula der Thrombozyten wird unter anderem Serotonin freigesetzt, Leukozyten, Monozyten und Lymphozyten werden so in den Entzündungsprozess integriert (GAWAZ 2004).

Einfluss der Thrombozyten auf die Ischämie

Thrombozyten tragen also, wie schon beschrieben, durch verschiedene Interventionen zur Entstehung, Aufrechterhaltung und Ausweitung der Ischämie bei (GAWAZ 2004):

- Ø mechanischer Verschluss einer Koronararterie durch einen Thrombus an einer Plaqueruptur
- Ø Mikroembolisation durch abgespülte atherothrombotische plättchenreiche Aggregate
- Ø plättchenvermittelte Vasokonstriktion durch Freisetzung von Serotonin, Thromboxan und Bildung freier Radikale
- Ø verstärkte intravasale Thrombusbildung in der Mikrozirkulation durch aktivierte Thrombozyten
- Ø plättchenvermittelte Entzündungsreaktion im ischämischen Myokard (lokal und systemisch)

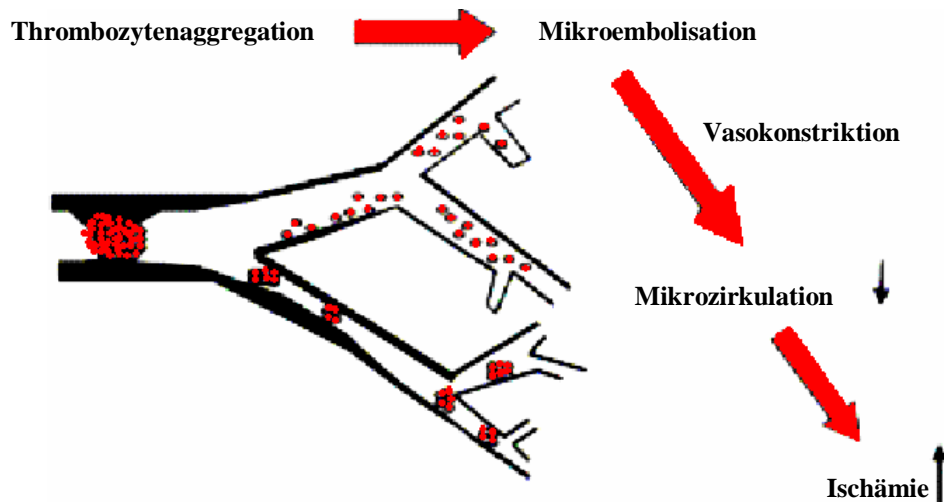


Abb.6 Einfluss der Thrombozyten auf die Ischämie: Plättchenaggregation und Aktivierung führt zu Mikroembolisation in der Peripherie; Vasokonstriktion; Verminderung der Mikrozirkulation und Verstärkung der Ischämie (nach GAWAZ 2004)

Die Kombination dieser Vorgänge bestimmt das Ausmaß der myokardialen Ischämie und die Beeinflussung der kardialen Kontraktilität. Das Ausmaß der durch gesteigerte Thrombozytenaktivität eingeschränkten Mikrozirkulation kann für die Beurteilung der Prognose eingesetzt werden (GAWAZ 2004).

2.5 Thrombozytäre Kollagenrezeptoren

Die verschiedenen Kollagene sind wichtige Plättchenaktivatoren der Gefäßwand (BAUMGARTNER 1977). Da die Regulation der Thrombozytenaktivierung ein bedeutender Schritt in der Abgrenzung der physiologischen Hämostase zur pathologischen Thrombose ist, stellen die Plättchen-Kollagen-Interaktionen wichtige Ziele für die pharmakologische Intervention dar (CLEMETSON 1999; CLEMETSON und CLEMETSON 2001).

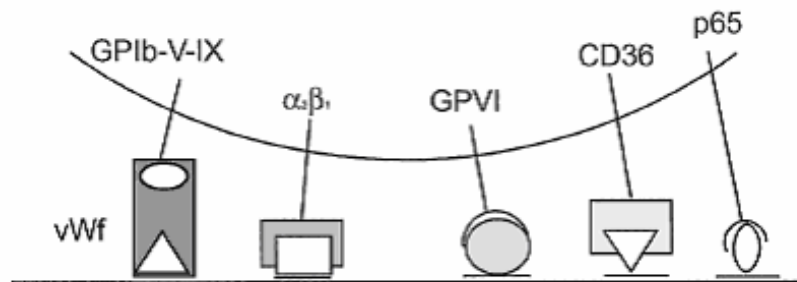


Abb.7 Kollagenrezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche:
Der Rezeptor GPIb-V-IX bindet indirekt über vWF (von-Willebrand-Faktor) an Kollagen, Integrin $\alpha_2\beta_1$, GPVI, CD36, p65 binden direkt an Kollagen (nach CLEMETSON 1999)

Es gibt zwei Hauptrezeptoren für Kollagen, für die SANTORO et al. (1991) das sogenannte „two-step, two-site-model“ aufstellten: Hier bindet zuerst Integrin $\alpha_2\beta_1$ an Kollagen, dann aktiviert, wie bereits beschrieben, ein weiterer Rezeptor, nämlich GPVI, das Blutplättchen.

GPVI (P62 oder GPIIb)

Der wichtigste Rezeptor für Kollagen ist GPVI (KEHREL et al.1998). Dieser Rezeptor ist auch an der Aktivierung der Thrombozyten maßgeblich beteiligt. GPVI ermöglicht die Aggregation, Sekretion, Formveränderung und Aktivierung der Blutplättchen. Die Auswirkungen dieses Kollagenrezeptors auf die Größe des Myokardinfarktes werden in vorliegender Arbeit untersucht. (zu Aufbau und Funktion siehe 2.6).

Integrin $\alpha_2\beta_1$ oder GPIa-IIa

1985 beschrieben NIEUWENHUIS et al. einen Patienten, dessen Thrombozyten keine Reaktion auf Kollagen zeigten, GPIa war hier auf 15 bis 25 % des normalen Expressionsgrades reduziert. Etwa zur gleichen Zeit wurde GPIa von SANTORO (1986) als Kollagenrezeptor bestimmt. Später stellte man fest, dass GPIaIIa im Komplex vorliegt und

mit Integrin $\alpha_2\beta_1$ identisch ist. Integrin $\alpha_2\beta_1$ ist auch auf der Oberfläche von Lymphozyten zu finden (STAATZ et al. 1989). Als der als erstes agierende Kollagenrezeptor spielt es eine große Rolle in der Thrombozytenadhäsion und Verankerung am Kollagen. Im Gegensatz zu vWF-vermittelter Adhäsion über GP Ib-V-IX binden weder Integrin $\alpha_2\beta_1$ noch GPVI unter hohen Scherkräften der schnellen Strömungsbedingungen. Wenn also GPIb über vWF bindet, entsteht über die sehr instabile Verbindung das sogenannte Rollen der Thrombozyten über das Endothel. Jetzt wird Integrin $\alpha_2\beta_1$ aktiviert, die Bindung an Kollagen verfestigt sich (CLEMETSON und CLEMETSON 2001). Außerdem ist Integrin $\alpha_2\beta_1$, wie KAMIGUTI et al. (1996) zeigen konnten, auch in geringem Maße an der Thrombozytenaktivierung beteiligt. Die Abspaltung von β_1 durch eine spezifische Metalloprotease Jararhagin aus Schlangengift (*Bothrops jararaca*) verhindert auch die kollageninduzierte Aktivierung. Es zeigte sich, dass Integrin $\alpha_2\beta_1$ als Co-Rezeptor für kollageninduzierte Aktivierung von Syk, einer Tyrosinkinase, und der darauffolgenden Phosphorylierung von Phospholipase C γ 2 notwendig ist (KEELY und PARISE 1996). So verstärkt das durch GPVI in seiner Wirkung potenzierte Integrin $\alpha_2\beta_1$ die Aktivierung der Thrombozyten durch ähnliche Signaltransduktionsmechanismen wie das Glykoprotein VI selbst (s.u.) (CHEN und KAHN 2003).

GPIV (CD36)

Ein weiterer Kollagenrezeptor GPIV bindet an Typ V Kollagen, spielt aber keine große Rolle bei der Thrombozytenaktivierung (KEHREL et al. 1993; MOROI und JUNG 1997; JARVIS et al. 2002). 3 bis 11% der japanischen Bevölkerung weisen einen Mangel an diesem Protein auf, jedoch besteht bei keiner dieser Personen eine Blutungsneigung (TANDON et al. 1989).

GPIb-V-IX

Wie bereits erwähnt, gibt es noch den indirekten Kollagenrezeptor GPIb-V-IX, der über Kollagen-gebundenen-vWF an Kollagen bindet (ANDREWS 1999). Diese Bindung findet unter großen Strömungsbedingungen, d.h. unter hohen Scherkräften statt, ist instabil und bewirkt das „Rollen“ der Thrombozyten am Endothel. Dadurch, d.h. über den intensiveren Kontakt mit Kollagen, wird die Adhäsion über die anderen Kollagenrezeptoren wie Integrin $\alpha_2\beta_1$ und GPVI ermöglicht (RUGGERI 2003; JACKSON et al. 2001).

2.6 Kollagenrezeptor Glykoprotein VI (GPVI)

Der Thrombozytenoberflächenrezeptor für Kollagen (Typ I) Glykoprotein VI (GPVI), der eine entscheidende Rolle in der kollageninduzierten Plättchenaktivierung und Aggregation spielt (WATSON und GIBBINS 1998; NIESWANDT und WATSON 2003), wurde vor über 20 Jahren zum ersten Mal durch die Gel-Elektrophorese identifiziert (CLEMETSON et al. 1982). Der erste Hinweis darauf, dass GPVI ein wichtiger Rezeptor für Kollagen ist, stammt aus einer Studie an einem Patienten mit einer autoimmunbedingten Thrombozytopenie, verursacht durch ein 65-kDa-Protein, das bei gesunden Menschen auftritt, nicht aber bei diesem Patienten (SUGIYAMA et al. 1987). Bei Patienten mit GPVI-Mangel fällt eine geringgradig verzögerte Blutungszeit auf, die aber nicht als Gerinnungsstörung zu bezeichnen ist (SUGIYAMA et al. 1987; MOROI et al. 1989; RYO et al. 1992). Sowohl bei GPVI-negativen Thrombozyten von Mäusen als auch von Menschen kann die kollagen-induzierte Plättchenaktivierung durch physiologische Kollagenkonzentrationen nicht ausgelöst werden (NIESWANDT et al. 2001 b; GOTO et al. 2002). Dagegen wird ein Polymorphismus des GPVI (T13254C) durch den Austausch nur einer Aminosäure (Serin mit Prolin) mit einem erhöhten Risiko für koronare Thrombose und Myokardinfarkt bei Männern mittleren Alters assoziiert (CROFT et al. 2001; OLLIKAINEN et al. 2004). Ebenso kann durch das Gift verschiedener Schlangen, wie die Toxine Alborhagin oder Alboaggregin-A (von der Viper *Trimeresurus albolabris*) oder Convulxin (das Gift der tropischen Klapper-Schlange *Crotalus durissus terrificus*), Thrombozytenaktivierung über GPVI mit Thrombenbildung ausgelöst werden (JANDROT-PERRUS et al. 1997; POLGAR et al. 1997; ANDREWS et al. 2001; ASAZUMA et al. 2001; DÖRMANN et al. 2001).

2.6.1 Aufbau des GPVI

Die Genstruktur von GPVI ist seit 2000 im Rahmen des Human-Genom-Projekts entschlüsselt: die DNA-Sequenzen im humanen Genom entsprechen zu ca. 67,3% der Sequenz im murinen Genom, auch die Aminosäuresequenz von humanem GPVI (das in dieser Studie zum Einsatz kommt) stimmt zu 64,4% mit der von murinem GPVI überein (JANDROT-PERRUS et al. 2000). GPVI ist ein Glykoprotein aus 319 Aminosäuren (AS) mit einer Signalsequenz von 30 AS (EZUMI et al. 2000). Die einzigen Zellen, in welchen eine signifikante Menge an für GPVI kodierender RNA nachgewiesen wurde, sind Megakaryozyten und Blutplättchen. (JANDROT-PERRUS et al. 2000).

Glykoprotein VI (GPVI), ein 60 bis 65 kDa Typ-I-Thrombozytenmembranprotein, gehört zur Familie der Immunglobuline (CLEMETSON et al. 1999; JANDROT-PERRUS et al. 2000). Sowohl in humanen Thrombozyten als auch in murinen bildet GPVI in der Thrombozytenmembran einen Komplex mit der FcR γ -chain (Untereinheiten), der wesentlich an der Signalübermittlung des Kollagenrezeptors beteiligt ist (GIBBINS et al. 1997; POOLE et al. 1997; CLEMETSON et al. 1999; NIESWANDT et al. 2000; ZHENG et al. 2001).

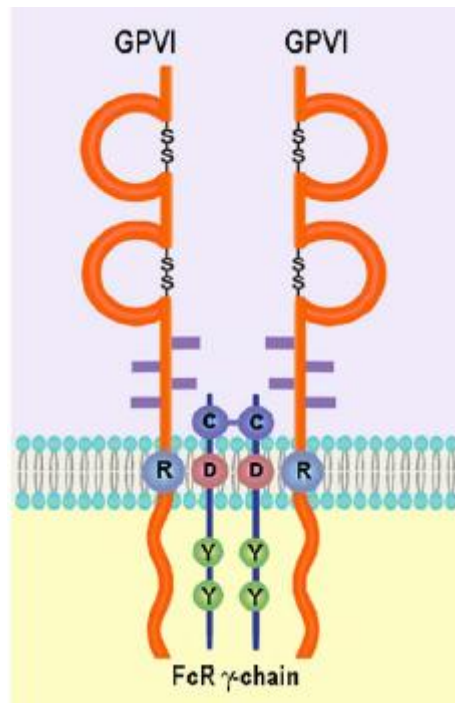


Abb.8 Aufbau des GlykoproteinVI-FcR γ -chain-Komplexes
(nach MOROI und JUNG 2004)

Während der letzten Jahre wurde GPVI als der wesentliche Rezeptor für Kollagen genannt. (KEHREL et al.1998). NIESWAND und WATSON beschrieben 2003 GPVI als essentiell für Plättchenadhäsion und Aggregation auf immobilisiertem Kollagen in vitro. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass die direkte GPVI-Kollagen-Interaktion entscheidend für die erste Plättchenbindung (platelet tethering) ist und anschließend Plättchenadhäsion und Aggregation am geschädigten Endothel ermöglicht (MASSBERG et al. 2003 a). Außerdem trägt GPVI-FcR γ -chain entscheidend zum Shape-change bei. GPVI-negative Thrombozyten zeigen diese Formveränderung nicht (JARVIS et al. 2002). In einem Mausmodell für Endothelverletzung an der A. carotis heben die Inhibition oder das Fehlen von GPVI fast völlig die Endothel-Plättchen-Adhäsion auf, die normalerweise auf eine Endothelfreilegung folgt. Dies konnte sowohl durch Intravital-Fluoreszenz-Mikroskopie, aber auch elektronenmikroskopisch gezeigt werden (MASSBERG et al. 2003 a und b).

2.6.2 Signalübermittlung durch GPVI

Der Kollagenrezeptor GPVI induziert Plättchenaktivierung durch einen ähnlichen tyrosinkinase-abhängigen Mechanismus, wie er auch bei Immunrezeptoren zu finden ist (POOLE et al. 1997; WATSON und GIBBINS 1998).

Durch die Bindung von GPVI an Kollagen der Gefäßwand wird die Zusammenlagerung der angeschlossenen FcR γ -chain-Untereinheiten veranlasst. Darauf folgt die Phosphorylierung der ITAM-Domäne (immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ähnlich dem Rezeptor für IgG) am zytoplasmatischen Ende der FcR γ -chain unter Beteiligung verschiedener Tyrosin-Kinasen (Src-Kinase, Fyn und Lyn) (GIBBINS et al. 1996; EZUMI et al. 1998; QUEK et al. 2000; SUZUKI-INOUE et al. 2002).

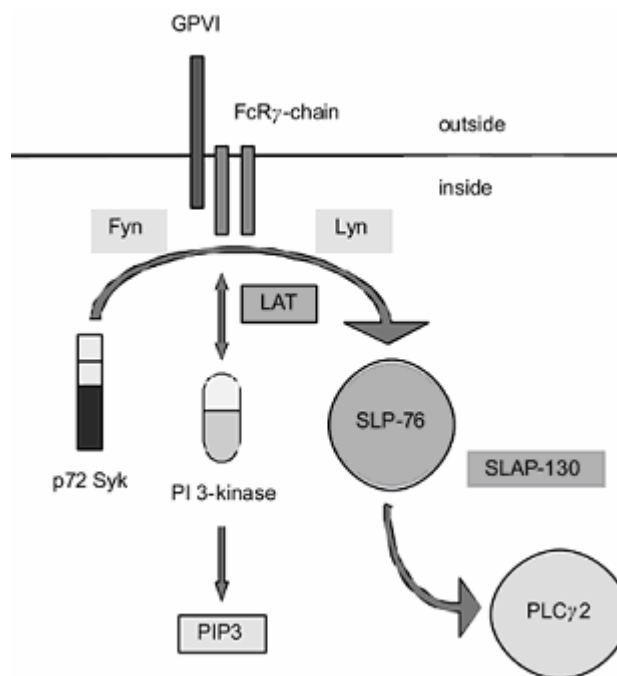


Abb.9 Signalkaskade der GPVI-FcR γ -chain-Komplex-Aktivierung: nach Zusammenlagerung der FcR γ -chain-Komplex-Untereinheiten nach GPVI-Aktivierung durch Kollagen wird die ITAM-Domäne am FcR γ -chain-Komplex durch Fyn phosphoryliert. Über eine Kette verschiedener Schritte werden letztendlich PIP3 und Phospholipase C aktiviert, es kommt zum Kalziumanstieg (nach ALBERIO und DALE 1999)

Dieses führt so zur Aktivierung der Tyrosin-Kinase Syk. Gleichzeitig rekrutieren das phosphorylierte SLP 76, ein Adaptorprotein und Substrat für Syk, wie auch LAT, ein Transmembranprotein (linker for activation of T cells), die Phospholipase C (PLC γ 2) zur Plasmamembran, wo sie durch Syk phosphoryliert und aktiviert wird (ASSELIN et al. 1997; POOLE et al. 1997; CLEMETSON et al. 1999; GROSS et al. 1999; PASQUET et al. 1999 b). Die aktive Phospholipase C (PLC γ 2) veranlasst ein starkes Signal zur Plättchenaktivierung: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) wird zu dem Second-Messenger Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) und 1,2-Diacylglycerol (DAG) hydrolysiert.

IP₃ mobilisiert Kalzium aus den dense Granula (WATSON und GIBBINS 1998), außerdem entsteht ein Kalziuminflux ins Zytosol: Der Kalziumspiegel im Zytoplasma steigt (RINK und SAGE 1990). Auch die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI 3-Kinase) trägt in der Signalübermittlung durch GPVI und Aktivierung von PLC γ 2 in diesem Zusammenhang bei (PASQUET et al. 1999 a). Der Kalziumanstieg im Zytosol, Kollagen- aber auch G-Protein-vermittelt, hat verschiedene Auswirkungen wie Aggregation, Sekretion und Shape-change (KROLL und SCHAFER 1989).

Die intrazelluläre Signalübermittlung durch den Kalziumspiegel wird potentiell durch das Zusammenspiel von vier Adhäsionsrezeptoren (GPIb-V-IX, Integrin α _{IIb} β ₃ und Integrin α ₂ β ₁ sowie GPVI) geregelt (JACKSON et al. 2003).

Außerdem ist GPVI an der Thromboxan-A₂-Bildung beteiligt. Dazu wird über Phospholipase A₂ (aktiviert durch den Kalziumanstieg) Arachidonsäure freigesetzt, die dann mit Hilfe von Cyclooxygenasen zu Thromboxan A₂ metabolisiert wird (NAKAMURA et al. 1998; WATSON 1999). Thromboxan A₂ wirkt zum einen vasokonstriktorisch, zum anderen ist es ein starker Plättchenaktivator: Es bindet wiederum an Oberflächenrezeptoren anderer Thrombozyten und führt über G-Protein-vermittelte Wege zum Shape-change (GALLET et al. 1999).

Zusätzlich kann durch GPVI-FcR γ -chain-Vermittlung nach der Aktivierung der Tyrosin-Kinase Syk die Umformung des Zytoskeletts und damit der Shape-change der Thrombozyten, also der Übergang in die Form der aktiven Echinosphärozyten, reguliert werden (WATSON 1999). Dies wird durch die Aktivierung von PI 3-Kinase vermittelt. PI 3-Kinase ist nötig für das Öffnen der Filamente und die Bereitstellung von Aktin, was dann zur Spreizung der Lamellen während des Shape-change führt (FALET et al. 2000).

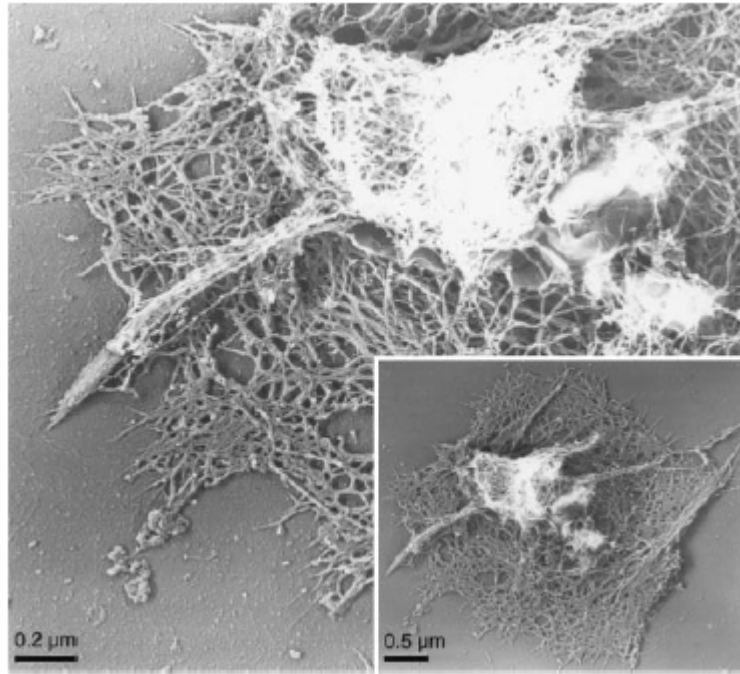


Abb.10 Aktin-Zytoskelett eines aktivierten Blutplättchens (FALET et al. 2000)

Außerdem vermittelt GPVI die Aktivierung verschiedener Adhäsionsrezeptoren, z.B. Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ und $\alpha_2\beta_1$ (GIBBINS et al. 1997; NIESWANDT und WATSON 2003).

Durch den Anstieg der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration wird auch der Aggregationsrezeptor GPIIb-IIIa stimuliert. So wird durch GPVI die Aktivierung von GPIIb-IIIa induziert (NAKAMURA et al. 1999). Auf ruhenden Plättchen liegt dieser Fibrinogenrezeptor inaktiv vor, d.h. bei Aktivierung bildet er „Fibrinogenbindungstaschen“ aus, zusätzlich wird bei Aktivierung die Zahl der Rezeptoren auf der Oberfläche erhöht (PIDARD et al. 1991; GAWAZ 2004).

Thrombozyten mit einem GPVI-Defizit zeigen eine verminderte kollageninduzierte Adhäsion und Aggregation in vivo und in vitro (SUGIYAMA et al. 1987; MOROI et al. 1989). Sowohl bei GPVI-negativen Thrombozyten von Mäusen als auch von Menschen kann die kollageninduzierte Plättchenaktivierung nicht ausgelöst werden (NIESWANDT et al. 2001 b; GOTO et al. 2002). Trotzdem zeigen Tail-bleeding-time-Messungen bei GPVI-negativen Mäusen keine vermehrte Blutungstendenz (KATO et al. 2003). Bei Mäusen, die mit einem Antikörper gegen GPVI (JAQ1) behandelt wurden, ist ebenfalls die Kollagen-induzierte Aggregation und Aktivierung der Thrombozyten vermindert. Dies führt zu einem antithrombotischen Langzeitschutz für ca. zwei Wochen (NIESWAND et al. 2001 b).

2.6.3 Soluble GPVI: Möglichkeit zur pharmakologischen Intervention

MIURA et al. (2002) konnten GPVI klonieren und nachweisen, dass lösliches GPVI nur als dimere Form, im Verbund mit der Immunglobulin-Fc-Domäne, Affinität zu Kollagen zeigt. Unabhängig davon entwickelten auch MASSBERG et al. (2003 b) eine lösliche Form von GPVI. Dazu wurde der extrazelluläre Anteil des humanen GPVI kloniert und mit der humanen Immunglobulin Fc-Domäne verbunden. Dieses GPVI-Fc-Protein (im Folgenden soluble GPVI-Fc genannt, es kommt auch in vorliegender Studie zum Einsatz) und Fc-Protein als Kontrolle wurden mit Hilfe von Adenoviren über eine humane HeLa-Zell-Linie exprimiert (MASSBERG et al. 2003 b).

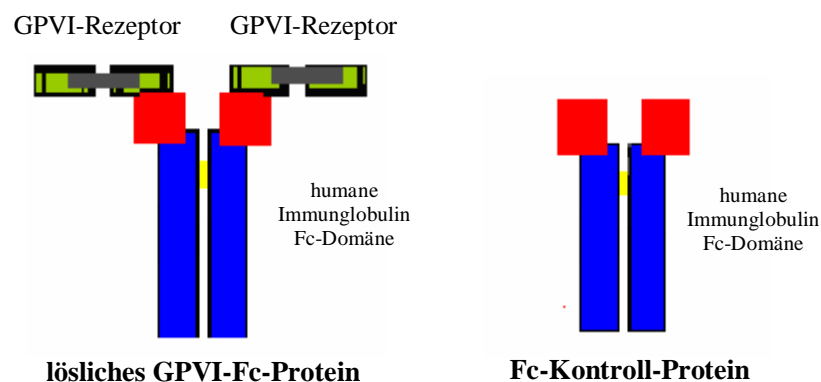


Abb. 11 Struktur von löslichem GPVI-Fc-Protein und Fc-Kontrollprotein (nach WEIG unveröffentlicht)

Hier konnte sowohl in vitro als auch in vivo die Adhäsion von löslichem GPVI-Fc an Kollagen nachgewiesen werden (MASSBERG et al. 2003 b).

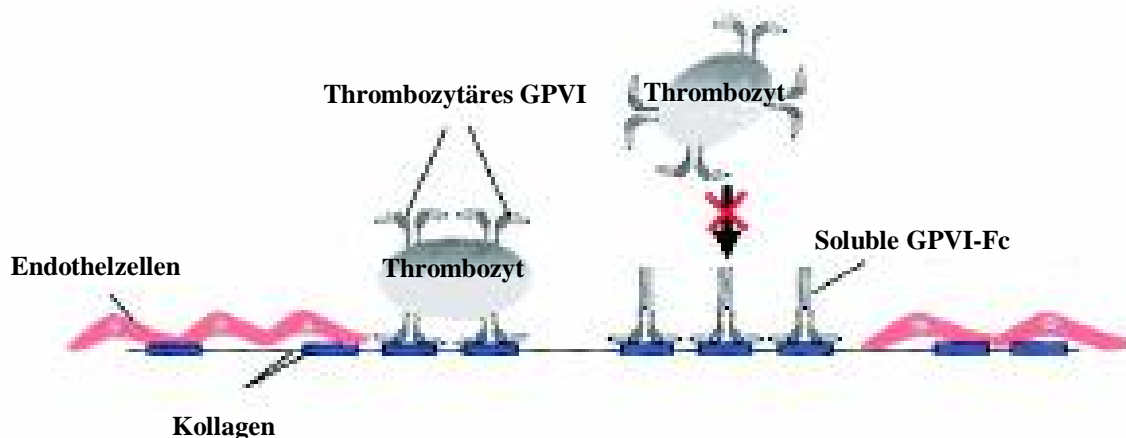


Abb.12 Lösliches GPVI-Fc bindet an freiliegendes Kollagen, Adhäsion und Plättchenaktivierung unterbleiben (nach MASSBERG et al. 2003 b)

Das Ziel dieser Studie bestand darin, die Effekte von soluble GPVI-Fc auf die Thrombozytenfunktionen der Maus *in vivo* zu testen (MASSBERG et al. 2003 b).

Zum einen stellte sich heraus, dass die Tail-bleeding-time bei Tieren, die mit soluble GPVI-Fc behandelt wurden, um 11 % (1mg/kg soluble GPVI-Fc *i.v.*) bzw. 21 % (2 mg/kg soluble GPVI-Fc) gegenüber mit Kontroll-Fc behandelten Tieren erhöht war (MASSBERG et al. 2003 b). Auch bei mit GPVI-Antikörpern behandelten Mäusen kann eine leichte Verlängerung der Tail-bleeding-time festgestellt werden (NIESWAND et al. 2001 b). Im Gegensatz dazu zeigen Tail-bleeding-time-Messungen bei GPVI-negativen Mäusen keine vermehrte Blutungstendenz (KATO et al. 2003)

Zum anderen zeigten MASSBERG et al. (2003 b), dass durch einen Endothelschaden der Gefäßwand freigelegtes Kollagen durch die Bindung von soluble GPVI-Fc in Bezug auf die Thrombozytenbindung über GPVI inaktiviert werden kann, indem soluble GPVI-Fc anstelle der Blutplättchen (über den Kollagenrezeptor GPVI) an Kollagen bindet. So können Thrombozyten nicht mehr adhären und werden auch nicht aktiviert, Adhäsion, Aggregation und Aktivierung unterbleiben (MASSBERG et al. 2003 b).

Dazu wurde an einem Mausmodell für Endothelverletzung durch Ligation der Arteria carotis *in vivo* mit Intravital-Fluoreszenz-Mikroskopie die Wirkung von soluble GPVI-Fc nachgewiesen: die Mäuse wurden mit 1 oder 2 mg/kg soluble GPVI-Fc bzw. Kontroll-Fc intravenös behandelt. Nach Denudation der A. carotis durch 5minütige Ligatur nahe der Bifurkation wurden die in der Reperfusionphase adhärenen fluoreszierenden Thrombozyten mittels Fluoreszenz-Mikroskopie nachgewiesen und quantifiziert. Die Thrombozytenadhäsion bei den mit soluble GPVI-Fc-vorbehandelten Tieren war gegenüber den Fc-Kontroll-Tieren um 49 % bzw. 65 % reduziert, Aggregation fand nicht statt. Mit Hilfe dieser Daten gelang es MASSBERG et al. (2003 b) zu zeigen, dass soluble GPVI-Fc an freiliegendem Kollagen bindet und so die Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten über das Glykoprotein VI verhindert werden kann.

Diese Theorie wird allerdings durch eine Studie von GRÜNER et al. (2005) nicht unterstützt. Hier wurde soluble GPVI-Fc mit Antikörpern gegen den Kollagenrezeptor GPVI in seiner antithrombotischen Wirkung verglichen: hier konnte durch Intravital-Fluoreszenz-Mikroskopie bei Endothelverletzungen an Arterien im Mausmodell kaum ein Effekt von soluble GPVI-Fc auf die Thrombozytenadhäsion und Thrombusformation nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu hemmen Antikörper gegen GPVI diese Vorgänge deutlicher (GRÜNER et al. 2005).

2.7 Therapieformen des akuten Myokardinfarktes

Die Akuttherapie des Myokardinfarktes setzt sich aus verschiedenen Interventionen zusammen, die in Kombination alle auf das gleiche Ziel hinarbeiten, nämlich die möglichst schnelle Wiedereröffnung des okkludierten Gefäßes, und damit die obligatorische Reperfusion des ischämischen Gewebes. Die myokardiale Sauerstoffbilanz soll so durch schnellstmögliche Reperfusion verbessert werden, um den durch Nekrose geschädigten Gewebereich einzugrenzen (STRAUER 2001):

- Ø Interventionelle Therapieverfahren, wie perkutane transluminale koronare Angioplastie (PTCA); koronare Stentimplantation; Rotationsangioplastie; Laserablationsangioplastie; aortokoronarvenöse Bypassoperation

- Ø Medikamentöse antithrombotische Therapie, wie Thrombolyse und Fibrinolyse

Pharmakologische Intervention mit Einfluss auf Thrombozyten

Der ideale antithrombozytäre Wirkstoff sollte die plättchenabhängigen Mechanismen der Thrombenbildung spezifisch blockieren, ohne allzu sehr mit der physiologischen Funktion der Thrombozyten im Bezug auf die Hämostase und Wundheilung zu interferieren (CLEMETSON 1999).

Acetylsalicylsäure (ASS)

ASS bewirkt eine Acetylierung des aktiven Zentrums der Cyklooxygenase 1 und 2 und damit eine irreversible Inaktivierung der Synthese von Thromboxan A₂, der Vorstufe der Prostaglandine (MEHTA 2002). Durch den Einsatz von ASS versucht man sowohl die Mortalität als auch die Rezidivrate erheblich zu reduzieren. So kann bei einer Dosierung von 325 mg pro Tag das Risiko für einen erneuten Herzinfarkt um 25 % gesenkt werden (ANTIPLATELET TRIALISTS COLLABORATION 1994). Allerdings ist der Einsatz von ASS mit einem Anstieg des Risikos für gastrointestinale Beschwerden mit Blutungen, Nephropathie, Gerinnungsstörungen und arterieller Hypertension begleitet (HIRSH et al. 1995; CAPRIE 1996).

ADP-Antagonisten

Die Thienopyridine Ticlopidin und Clopidogrel hemmen die primäre und sekundäre Plättchenaggregation durch irreversible Blockade des thrombozytären ADP-Rezeptors. Die volle Wirkung setzt allerdings erst nach 3 bis 5 Tagen ein (RUAN et al. 1989). In einer Dosierung von 75 mg täglich ist Clopidogrel in der Lage, das relative Risiko eines Herzinfarktes auf 5,32 %, verglichen mit Aspirin (5,83 %), zu senken (CAPRIE 1996). Als Nebenwirkungen sind ebenso gastrointestinale Blutungen, Neutropenie und Gerinnungsstörungen, sowie Neutropenie bekannt (CAPRIE 1996).

Glykoprotein IIb-IIIa-Rezeptor-Antagonisten

GPIIb-IIIa-Rezeptor-Antagonisten (z.B. Abciximab, ein Antikörper, der irreversibel an GPIIb-IIIa bindet; i. v. Verabreichung) verhindern nicht die Adhäsion der Blutplättchen an der geschädigten Gefäßwand, sondern blockieren die Bindungsstelle der GPIIb-IIIa-Rezeptoren für Fibrinogen, so dass sich aktivierte Thrombozyten nicht mehr über Fibrinogenbrücken zu einem Plättchenaggregat zusammenfügen können. Die Thrombenbildung unterbleibt (COLLER et al. 1991). Weiterhin kann durch GPIIb-IIIa-Rezeptor-Antagonisten eine distale Mikroembolisierung und ein daraus resultierendes „No-reflow-Phänomen“ in der koronaren Endstrombahn reduziert bzw. verhindert werden (LEMOS et al. 2000). Durch den Einsatz von GPIIb-IIIa-Blockern kommt es zu einer relativen Infarktreaktion um 34 % gegenüber Placeboanwendung (BOERSMA et al. 1999). Allerdings kommt es zugleich auch zu einer erhöhten Blutungsneigung, außerdem wurde unter fast allen GPIIb-IIIa-Rezeptor-Antagonisten die Entwicklung einer Thrombozytopenie beschrieben (VORCHHEIMER und FUSTER 1998).

Neue Möglichkeiten der pharmakologischen Intervention

Die Chance, die initiale Adhäsion und Aktivierung der Thrombozyten über die Bindung an Kollagenrezeptoren zu untergraben, stellt sich als neue Interventionsmöglichkeit im pharmakologischen Bereich dar, ohne die Thrombozytenfunktion im Allgemeinen zu verhindern (CLEMETSON 1999). So könnte sich der Einsatz einer löslichen Form des GPVI-Rezeptors, der anstelle der Thrombozyten an freiliegendes Kollagen am geschädigten Endothel bindet und die initiale Adhäsion und Aktivierung blockiert, oder der Einsatz von Antikörpern gegen GPVI, als brauchbares Werkzeug in der antithrombozytären Medizin erweisen (MASSBERG et al. 2003 b; GRÜNER et al. 2005).

2.8 Myokardiale Ischämie im Tiermodell

Ergebnisse aus experimentellen Studien über myokardiale Ischämie sind außerordentlich wichtig für das Verständnis der Biochemie und (Patho-) Physiologie des Herzens. Trotz allem darf bei der Planung tierexperimenteller Studien weder Ethik noch Gesetzeslage außer Acht gelassen werden (YTREHUS 2000).

Verschiedene myokardiale Ischämie-Modelle sind möglich:

- Ø Gesamtorganismus bzw. Tiermodelle
- Ø Isolierte Herzen: Langendorff-Herz, isolated working heart, zur Messung kontraktiler Funktionen (ZIMMER 1998)
- Ø Multizellenpräparation: multicellular tissue models
- Ø Isolierte Herzmuskelzellen, vor allem für elektrophysiologische und biochemische Experimente (STEMMER et al. 1992; YTREHUS 2000)

Tiermodelle für kardiale Ischämie mit Okklusion einer Koronararterie mit oder ohne anschließende Reperfusion sind als brauchbare Modelle für die Bewertung pathophysiologischer Prozesse oder pharmakologischer Interventionen am Herzen zu sehen. Sie sind weit verbreitet und werden für verschiedene Spezies wie Hunde, Schweine, Kaninchen, Ratten und Mäuse beschrieben (ZOLOTAVERA und KOGAN 1978; HARKEN et al. 1981; KASS et al. 1988; MASAKI et al. 1993; EISING et al. 1994; MICHAEL et al. 1995).

Das Ausmaß der myokardialen Ischämie ist in beträchtlichem Masse von der Kollateralversorgung des Herzens abhängig. Diese kann in den verschiedenen Säugerspezies erheblich variieren. So ist die Kollateralversorgung im Hundeherzen sehr gut ausgeprägt, bei Herzen von Schweinen oder Primaten dagegen ist ein kollateraler Blutfluss kaum auszumachen (SCHAPER 1971; GAO et al. 1999). Aus anderen Studien ist bekannt, dass sowohl Maus (AHN et al. 2004) als auch Ratte nur eine spärliche Kollateralversorgung haben und Kaninchen viele intraspezies-spezifische Unterschiede aufweisen. Meerschweinchen haben so optimal ausgeprägte Kollateralgefäße, dass die Perfusion auch nach Okklusion der Koronararterie erhalten bleibt und kein Infarkt entsteht. Auch Katzen besitzen ein gut ausgebildetes Kollateralnetz, das aber nicht in der Lage ist, einen Infarkt zu verhindern (GAO et al. 1999).

2.9 Die Maus als Modell für myokardiale Ischämie

2.9.1 Die Maus als Modell für kardiale Erkrankungen

Die großen Möglichkeiten, die die Gentechnik bietet, prädestinieren die Maus als Versuchstier für das Studium molekularer Mechanismen. Die Kreation genetisch veränderter Knockout-Tiere vereinfacht experimentelle Studien über physiologische Vorgänge erheblich. Das Mausgenom ist gut beschrieben und kann leicht manipuliert werden, außerdem sind Mäuse durch ihre kurze Generationenfolge und ihre niedrigen Ansprüche leicht zu züchten (PAIGEN 1995).

Die Möglichkeit, die enorme Menge an Mediatoren der Inflammationsreaktion zu untersuchen, wird durch Ischämie-Reperfusionen-Modelle am Myokard von Wildtyp-, Knockout- und transgenen Tieren (meistens Mäuse) realisierbar (STEINHELPER et al. 1990; KURRELMEYER et al. 2000).

Ein detaillierteres Verständnis dieser Mechanismen kann die Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten fördern und so die Überlebenschancen von Patienten mit Herzerkrankungen verbessern. Die Möglichkeit, Modelle humaner Erkrankungen mithilfe genetisch veränderter Tiere (Mäuse) zu erstellen, hat sich als hervorragende Strategie molekulare Mechanismen im pathophysiologischen Prozess zu beleuchten bewährt (LIN et al. 1995; PAIGEN 1995; BECKER et al. 1996).

ZOLOTAREVA und KOGAN (1978) beschrieben die ersten In-vivo-Versuche „zum Hervorbringen von experimentellem okklusivem Myokardinfarkt bei Mäusen“. Die dort dargestellte Methode besitzt für die Autoren die folgenden Vorteile, die auch heute noch Gültigkeit besitzen: Die Möglichkeit, sämtliche Operationsetappen von einem einzigen Operateur durchführen zu lassen, eine niedrige postoperative Mortalität der Versuchstiere und deren bescheidene Ansprüche auf postoperative Pflege, ein niedriger Verbrauch von Isotopen und von kostbaren Reagenzien (ZOLOTAREVA und KOGAN 1978).

1995 etablierten MICHAEL et al. ein Ischämie-Reperfusionenmodell der Maus, das auch in der eigenen Studie leicht modifiziert zur Anwendung kommt. Mit Hilfe dieser Modelle kann nach einer künstlich hervorgerufenen Ischämie mit anschließender Reperfusion die Infarktgröße für verschiedene Fragestellungen bestimmt werden (MICHAEL et al. 1995).

2.9.2 Die Anatomie des Mäuseherzens

Das Herz der Säugetiere und des Menschen zeigt im Aufbau im Allgemeinen, wie auch im Verlauf der Koronararterien weitgehende Übereinstimmung (SCHUMMER 1984).

Die linke und rechte Koronararterie der Maus entspringen aus dem Bulbus aortae und ziehen entlang der Ventrikelgrenzen zur Herzspitze. Auf ihrem Weg dorthin geben sie kleine Verzweigungen ab, die den Ventrikel umgeben und die Blutversorgung gewährleisten. Die linke A. coronaria versorgt den linken Ventrikel (linkskoronarer Versorgungstyp). Das Septum wird von der Septumarterie, die als Ast der rechten Koronararterie entspringt, versorgt (ICARDO und COLVEE 2001). Unterschiedliche Bifurkationstypen der linken Koronararterie werden beschrieben (MICHAEL et al. 1995).

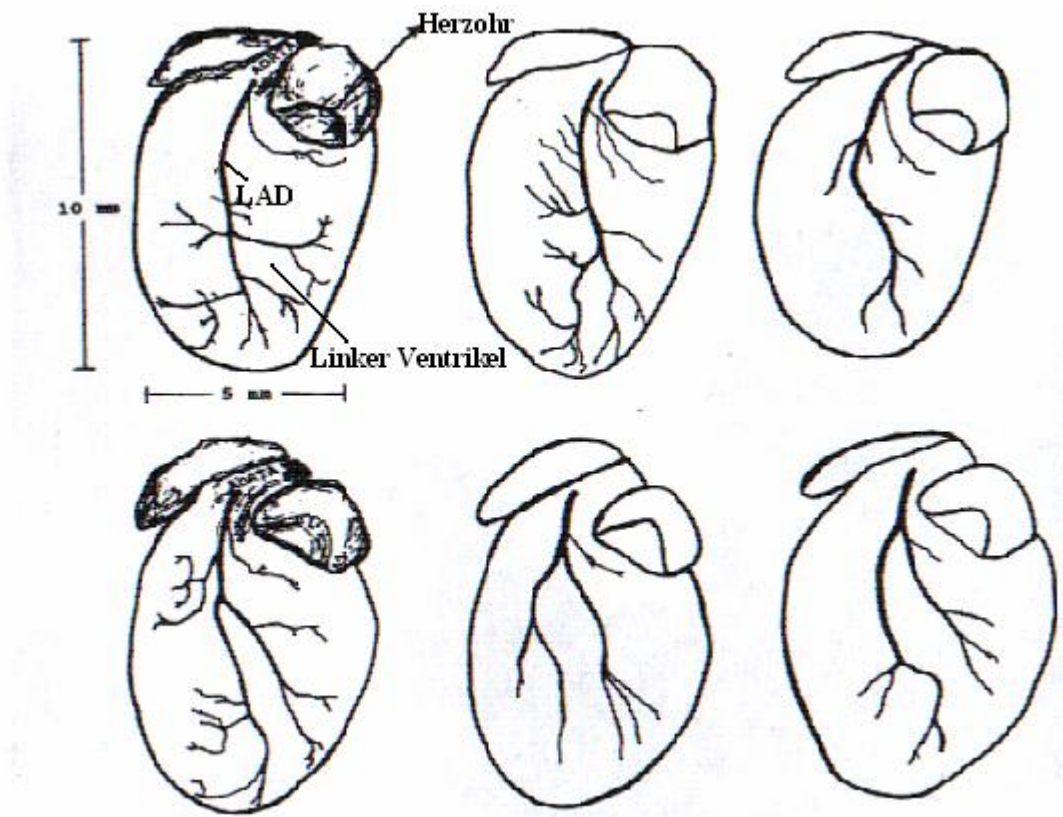


Abb.13 Verlauf der linken Koronararterie (LAD) mit unterschiedlichen Bifurkationstypen am Mäuseherzen, Aufsicht aus chirurgischer Sicht auf den linken Ventrikel mit Herzohren (nach MICHAEL et al. 1995)

Die linke Koronararterie des Menschen dagegen teilt sich in den Ramus interventricularis anterior (left anterior descending (coronary artery) = LAD) und in den Ramus circumflexus (left circumflex (coronary artery) = LCX). Der Ramus interventricularis anterior verläuft im gleichnamigen Sulcus als prominentes Gefäß zur Herzspitze und versorgt die tiefen

Muskelschichten beider Ventrikel, sowie die Papillarmuskeln und die apikalen Teile des Septums. Der Ramus circumflexus gibt bei seinem Verlauf im Sulcus coronarius Äste an den linken Vorhof und den linken Ventrikel ab (MC ALPINE 1975; TÖNDURI 1981). Beim Menschen kann zwischen Trifurkation (60 %), Bifurkation (28 %) und Quadrifurkation (2 %) der A. coronaria sinistra unterschieden werden (BAPTISTA et al. 1991).

Im Gegensatz zur Maus zeigen sich beim Menschen bei der Versorgung des linken Ventrikels größere Variabilitäten: 85 % der Herzen weisen den sogenannten rechtskoronaren Versorgungstyp auf, d.h. der linke Ventrikel wird anteilig vom Ramus interventricularis posterior, der hier der A. coronaria dextra entspringt, versorgt. Beim linkskoronaren Versorgungstyp, der zu 8 % vertreten ist, gibt die A. circumflexa den Ramus interventricularis posterior ab. Die restlichen 7 % zeigen den ausgeglichenen Typ, hier geben die A. coronaria dextra den Ramus interventricularis und die A. circumflexa einen zusätzlichen Ramus interventricularis posterior ab (RIEDE und SCHAEFER 1993).

Die Kollateralversorgung der Maus ist abhängig vom Stamm, aber wenig ausgeprägt, so dass die Ligatur der linken Koronararterie auch eine Ischämie des linken Ventrikels bedingt. Die Möglichkeit durch Ligatur der linken Koronararterie eine Ischämie des linken Ventrikels zu erzeugen, wurde auch an Mäusen des Stammes C57Bl/6 gezeigt (AHN et al. 2004). Auch SALTO-TELLEZ et al. beschreiben 2004 die C57Bl/6 Maus aufgrund ihres Gefäßverlaufes als geeignetes Modell für Ischämie und Reperfusion am Herzen.

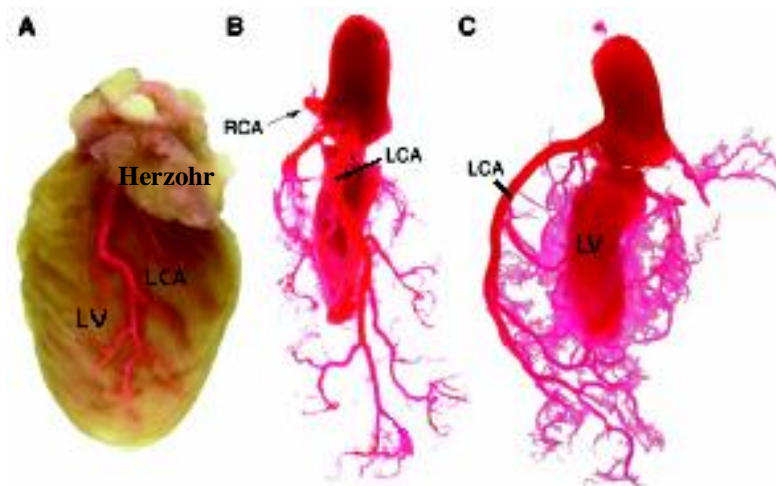


Abb.14

- A) Aufsicht aus chirurgischer Sicht auf die linke Koronararterie (LCA) des linken Ventrikels (LV)
- B) Ausgusspräparat der li. Koronararterie, chirurgische Sicht (RCA = rechte Koronararterie)
- C) Ausgusspräparat der li. Koronararterie (LCA), Aufsicht seitlich auf den linken Ventrikel (LV)
(nach AHN et al. 2004)

2.9.3 Thrombozyten von Maus und Mensch

Die Thrombozyten von Mensch und Maus zeigen bedeutende, aber gut untersuchte morphologische Unterschiede. Die Blutplättchen der Mäuse sind kleiner und langgestreckter, aber zahlreicher als die des Menschen und weisen heterogenere Granula auf (SCHMITT et al. 2001).

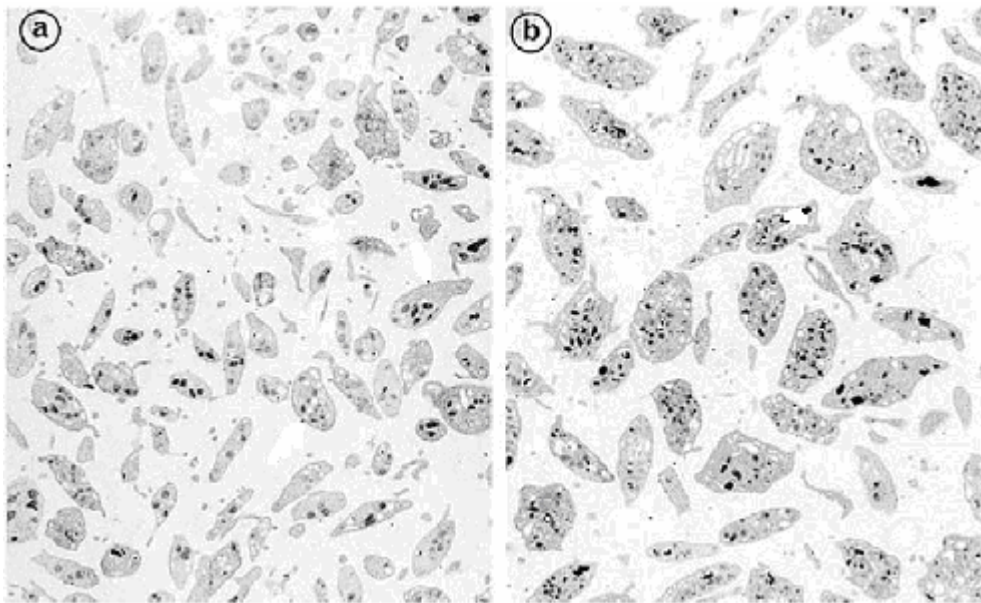


Abb.15 a) Maus-Thrombozyten b) Thrombozyten vom Menschen (nach SCHMITT et al. 2001)

Die Thrombozytenzahl der Maus ist mit 1000 bis $1500 \times 10^9/l$ im Vergleich zu 150 bis $400 \times 10^9/l$ beim Menschen um einiges höher. Auch sind humane Thrombozyten größer als murine: Der Durchmesser der Mausthrombozyten beträgt nur $0,5 \mu\text{m}$, bei humanen Thrombozyten dagegen 1 bis $2 \mu\text{m}$. Ebenso verhält es sich mit dem Volumen der Blutplättchen: bei murinen Thrombozyten beträgt es nur $3-4 \text{ Fl}$, bei humanen dagegen $8-9 \text{ Fl}$ (SCHMITT et al. 2001). Auch die Überlebenszeit ist unterschiedlich: Humane Thrombozyten überleben 8 bis 12 Tage, die der Mäuse dagegen nur 4 Tage (BAKER et al. 1997; MANNING und McDONALD 1997).

Tab. 1 Thrombozytenwerte Mensch und Maus (nach SCHMITT et al. 2001)

<i>Mittelwerte</i>	<i>Einheit</i>	<i>Mensch</i>	<i>Maus</i>
Thrombozytenzahl	x 10 ⁹ /l	150-400	1000-1500
Thrombozytendurchmesser	µm	1-2	0,5
Volumen	Fl	8-9	3-4
Überlebenszeit	Tage	8-12	3-4
α-Granula/Ausschnitt	Anzahl	5-6	3-4
Densgranula/Ausschnitt	Anzahl	1	0,5

Trotz der deutlichen Unterschiede in Anzahl und Morphologie der Thrombozyten bei Mensch und Maus wird durch die große Übereinstimmung im Aufbau humaner und muriner Proteine der Einsatz humaner Antikörper zur Untersuchung thrombozytärer Funktionen auch bei der Maus möglich (SCHMITT et al. 2001).

Die Aminosäuresequenz von humanem und murinem GPVI der Thrombozyten beispielsweise stimmt zu 64,4 % überein, die Nukleotidsequenz von humaner und muriner GPVI-cDNA ist zu 67,3 % identisch (JANDROT-PERRUS et al. 2000). So kann also bei GPVI-negativen Thrombozyten von Mäusen als auch von Menschen die kollageninduzierte initiale Plättchenaktivierung nicht ausgelöst werden (NIESWANDT et al. 2001 b; GOTO et al. 2002). Ebenso kann durch Antikörper gegen GPVI die Plättchenadhäsion und Aktivierung der Thrombozyten blockiert werden (GRÜNER et al. 2004).

2.9.4 Echokardiographie bei der Maus

Die Ligierung der linken Koronararterie ist eine der gebräuchlichsten Methoden, einen myokardialen Infarkt im Mäuseherzen zu erzeugen und die Echokardiographie wird dabei genutzt, um die Herzfunktionen zu bewerten. Die Dynamik einer kardiovaskulären Erkrankung mit Perioden von Kompensation und Dekompensation des Herzens macht minimalinvasive analytische Methoden (wie die Echokardiographie), die auch über längere

Zeit wiederholt angewendet werden können, zur Bedingung einer exakten Datenerhebung über den Verlauf des Krankheitsprozesses hinweg (JAMES et al. 1998, TAKUMA et al. 2001). Die Echokardiographie stellt also eine akkurate, aber trotzdem nichtinvasive Untersuchungsmöglichkeit für die Beurteilung von Infarktgröße und quantitativer Charakterisierung auch des Remodelings nach myokardialem Infarkt bei der Maus dar (GARDIN et al. 1995; TANAKA et al. 1996; SCHERRER-CROSBIE et al. 1999; GAO et al. 2000; KANNO et al. 2002; BROBERG et al. 2003).

Allerdings stoßen diese Untersuchungen mit der Größe des Mauserzens an die technischen Grenzen der Echokardiographie (SUEHIRO et al. 2001). Aufgrund der geringen Größe der Maus und ihrer Herzfrequenz ist der kardiale Ultraschall bei dieser Tierart eine nicht zu unterschätzende methodische Herausforderung sowohl für den Untersucher als auch für die medizintechnische Ausrüstung (TAFFET et al. 1996, KASS et al. 1998, PATTEN et al. 2002, COLLINS et al. 2003). Da die durch jede Form einer Sedation oder Immobilisation durch Anästhetika gewonnenen Werte von den physiologischen Messwerten im Wachzustand abweichen, untersuchten YANG et al. (1999) und TAKUMA et al. (2001) wache Mäusen, die an die Manipulationen gewöhnt wurden, echokardiographisch, um eine bessere physiologische Bewertung der kardialen Funktion zu erheben. Tatsächlich können echokardiographische Serienmessungen kardialer Funktion, Dimension und Masse mit hoher Reproduktivität auch an wachen Mäusen durchgeführt werden (ROTTMANN et al. 2003). Allerdings treten hier Variationen im sympathischen und parasympathischen Tonus während der Manipulation und Fixation der Tiere auf, sowie aufregungsbedingt relativ hohe Herzfrequenzen. Diese Hindernisse erschweren die Beurteilung echokardiographisch erhobener Daten bei der Untersuchung wacher Mäuse (ROTH et al. 2002).

Also wird die echokardiographische Untersuchung meist unter Anästhesie durchgeführt (TAN et al. 2003). Hier sorgt die Narkose für Sedation und Immobilisation des Tieres, was die Datenerhebungen deutlich erleichtert, zuverlässiger und reproduzierbarer macht (TANAKA et al. 1996). Allerdings kann der bekannte Einfluss von Anästhetika auf die kardiovaskuläre Funktion zu falschen Interpretationen der echokardiographischen Daten führen, die nur dann, wenn sie unter gleichen Bedingungen erhoben worden waren, vergleichbar sind (GARDIN et al. 1995, HOIT et al. 1995, POLLICK et al. 1995, TANAKA et al. 1996, YANG et al. 1999).

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Zielvorstellung

Die vorliegende Studie beschäftigt sich mit dem Einfluss des thrombozytären Oberflächen-Rezeptors für Kollagen Glykoprotein VI (GPVI), bzw. einer löslichen Form davon (soluble GPVI-Fc), auf die Infarktgröße in einem Ischämie-Reperfusionmodell bei der C57Bl/6 Maus.

Wie in der Literatur ausführlich beschrieben, haben Thrombozyten einen erheblichen Einfluss auf die Entstehung eines Myokardinfarktes (GAWAZ 1999). Sie adhären an freiliegendes Kollagen nach Ablösung einer atherosklerotischen Plaque (LIAO 1998, JANDROT-PERRUS et al. 2000), beeinflussen außerdem durch Mikrothrombenbildung aktivierter Thrombozyten die Mikrozirkulation und tragen so zur Aufrechterhaltung der Ischämie bei (GAWAZ 2004).

Das GPVI-Protein, ein thrombozytärer Oberflächenrezeptor für Kollagen, spielt eine entscheidende Rolle sowohl bei der Adhäsion der Thrombozyten an freiliegendes Kollagen, als auch bei der Thrombozytenaktivierung. Bisher konnte die Adhäsion von soluble GPVI-Fc an geschädigtes Endothel in vivo nachgewiesen werden (MASSBERG et al. 1999; GRÜNER et al. 2005).

Das Ziel der vorliegenden Studie ist es, zu klären, ob eine Verhinderung der Thrombozytenadhäsion an Kollagen als erster Schritt der Thrombozytenaktivierung einen Effekt auf die Myokardfunktion in vivo und die Infarktgröße zeigt. Um dieser Fragestellung näher zu kommen, soll in einem standardisierten Ischämie-Reperfusionmodell der Maus der Einfluss des thrombozytären Kollagenrezeptors GPVI untersucht werden.

Dafür wird während einer Thorakotomie bei zwei Gruppen von C57Bl/6J Mäusen die linke Koronararterie für 30 Minuten ligiert und eine Reperusionsphase für 24 Stunden angeschlossen. Eine Stunde prae OP und 12 Stunden post OP wird der einen Gruppe soluble GPVI-Fc appliziert, das als lösliche Form des Kollagenrezeptors GPVI anstelle der Thrombozyten am durch die Ischämie geschädigten Endothel binden und damit die initiale Adhäsion und folgende Aktivierung der Thrombozyten verhindern soll. Die Kontrollgruppe erhält Kontroll-Fc. Die so erhaltenen Myokardinfarkte werden nach Euthanasie der Tiere gefärbt und planimetrisch vermessen.

Die tierexperimentelle Studie wurde gemäß § 8 des deutschen Tierschutzgesetzes durch die Regierung von Oberbayern genehmigt.

3.2 Material und Methoden

3.2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Die Untersuchungen werden an insgesamt 20 männlichen Mäusen des Stammes C57Bl/6J (Charles River, Sulzfeld) mit einem Körpergewicht von 20 bis 30 g durchgeführt.

In der prae- und postoperativen Phase werden die Mäuse im Institut für Experimentelle Onkologie gehalten. Standardisierte Tierhaltung ist durch die lange Erfahrung im Umgang mit diesen Tieren gewährleistet. Die Haltung der Tiere erfolgt in speziellen Käfigen zur Haltung von Mäusen (Makrolon, Typ 3). Futter (autoklaviertes Mäusefutter, Fa. Altromin) und Wasser (autoklaviertes Trinkwasser, Wechsel der Tränkeflaschen 2x wöchentlich) erhalten die Tiere ad libitum. Spezielle Holzfaser (Fa. Altromin) und Zellstoff dient als Einstreu bei zweimaligem Wechsel pro Woche. Die Räume sind speziell als Tierhaltungsräume konzipiert (Personenlimitierte Zutrittskontrolle, Pflege durch ausgebildete Versuchstierpfleger, Klimatisierung, Hell-Dunkel-Rhythmus von je 12 Stunden).

3.2.2 Übersicht Versuchsplan

Die Gesamtdauer des Versuches beträgt 5 Tage.

Am Tag 1 werden die Tiere einer ersten echokardiographischen Untersuchung unterzogen. Hier wird unter Isofluran-Inhalationsnarkose der Basalwert zur Herzkontraktilität (M1) erhoben.

Nach einer kurzen Rekonvaleszenz erfolgen am Tag 4 die intravenöse Applikation des GPVI-Fc oder des Fc-Proteins (Kontrolle) und gleich darauf unter Allgemeinanästhesie mit Thorakotomie die 30minütige Ischämie des linken Ventrikels mit anschließender Reperfusionphase für 24 Stunden.

Am Tag 5 wird die echokardiographische Untersuchung wiederholt (M2) und anschließend, nach Euthanasie der Tiere, das Herz für weitere Ex-vivo-Untersuchungen, insbesondere die Infarktgrößenbestimmung vorbereitet.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Tab. 2 Übersicht Versuchsplan

<i>TAG 1</i>	<i>TAG 4</i>		<i>TAG 5</i>
Gesamt	Gruppe 1 n=10	Gruppe 2 N=10	Gesamt
Echokardiographie M I	Applikation von <i>soluble</i> <i>GPVI-Fc</i> intravenös, 60 min prae OP	Applikation von <i>Fc-Kontrolle</i> intravenös, 60 min prae OP	Echokardiographie M II
	OP mit 30 min Ischämie und 24 h Reperfusion		Euthanasie
	Applikation von <i>soluble</i> <i>GPVI-Fc</i> , intraperitoneal, 12 h post OP	Applikation von <i>Fc-Kontrolle</i> , intraperitoneal, 12 h post OP	Färbung und Präparation der Proben

Geplante Datenerhebung:

in vivo

Ø Echokardiographische Untersuchung

- am Tag 1 zur Erhebung des Basalwertes, prae operationem
- am Tag 5 zur Beurteilung des erzeugten myokardialen Infarktes,
post operationem

ex vivo

- ##### Ø Bestimmung der Infarktgröße durch planimetrische Messung am geschnittenen Herzen

3.2.3 Gruppeneinteilung

In der folgenden Untersuchung werden die Mäuse randomisiert in 2 Gruppen eingeteilt. Es werden Mäuse, die mit soluble GPVI-Fc behandelt werden (Gruppe 1) mit Kontrolltieren, die nur das Fc-Fragment ohne das GPVI-Protein (Gruppe 2) erhalten, verglichen. Beide Gruppen werden dem gleichen standardisierten Versuchsaufbau unterzogen. Sie erhalten die Thorakotomie einschließlich Ligatur mit anschließender Reperfusion. Auf eine Sham-Gruppe (Thorakotomie ohne Ligatur) wurde hier verzichtet, da Daten dazu aus vorausgegangenen Untersuchungen vorliegen, die den Einfluss des Eingriffes an sich auf die Infarktgröße zeigen (WEIG et al. unveröffentlichte Daten).

Beide Gruppen bestehen aus je 10 männlichen Tieren (Stamm C57Bl/6) von 20 bis 30 g Körpergewicht. Die Einteilung der Tiere in Gruppe 1 oder 2 erfolgt randomisiert vor Versuchsbeginn. Die Applikation von soluble GPVI-Fc bzw. Fc-Kontrolle, die Operation und die planimetrische Auswertung der Infarkte erfolgt für die Untersucher geblindet.

3.2.4 Sonographische Messung

Die Tiere beider Gruppen werden jeweils an den Tagen 1 und 5 echokardiographisch untersucht. Die Echokardiographie erfolgt unter Inhalationsnarkose. Dazu wird die Maus in eine speziell angefertigte Inhalationsröhre aus Plexiglas gesetzt. In diese Röhre wird über einen Verdampfer (Ohmeda Isotec 3, Eickemeyer, Tuttlingen) Isofluran (Forene®, Abbott) in einer Konzentration von 5 % bei 0,5 Liter 100prozentiger Sauerstoffzufuhr pro Minute über den Durchflussmesser (UNO, Zevenaar, Holland) eingeleitet. Nach Verlust des Stellreflexes wird die Anästhesie auf den Erhaltungsbedarf von 1,8 % bis 2,0 % Isofluran abgesenkt und über eine Inhalationsmaske fortgeführt. Unter ständiger Temperaturkontrolle durch eine automatisch geregelte elektrische Heizmatte (Temperature Control, FHC, Browdoingham, ME, USA) ist die rektal ermittelte Körpertemperatur ständig im physiologischen Bereich auf $37^{\circ}\text{C} \pm 0,3^{\circ}\text{C}$ zu halten.

Nach Entfernen der Haare an rechts- und linkslateraler Thoraxwand mit Enthaarungscreme (Pilca®, GlaxoSmithKline, Bühl) legt man die Maus in Bauchlage auf ein speziell dafür angefertigtes Plexiglasgestell, das eine Aussparung für den Schallkopf hat, auf eine Vorlaufstrecke von 10 mm (Sonopad, Sonotec, Halle) gelagert. Auf die Vorlaufstrecke unter die Maus sowie auf den Schallkopf muss vorher Ultraschallkontaktgel aufgetragen werden.

Die Inhalationsnarkose wird über eine Maske fortgesetzt, die Körpertemperatur wird mit Hilfe einer Wärmelampe manuell auf $37^{\circ}\text{C} \pm 0,3^{\circ}\text{C}$ gehalten. Die Augen werden für die Dauer der Untersuchung mit Augensalbe (Bebanthen® Augen- und Nasensalbe, Roche, Grenzach) vor dem Austrocknen geschützt.



Abb. 16 Lagerung zur Echokardiographie auf einer Vorlaufstrecke, Inhalationsnarkose mit Isofluran über eine Kopfkammer

Für die sonographische Untersuchung steht ein Ultraschallgerät (GE, Vingmed, Horten, Norwegen) mit einem 10 MHz Schallkopf (GE, Vingmed, Horten, Norwegen) zu Verfügung. Von rechts parasternal mit einer Eindringtiefe von 3 cm wird der linke Ventrikel in einem Kurzachsenschnitt zwischen den Papillarmuskeln im B-Mode dargestellt. Anschließend bestimmt man im M-Mode (Motion-Mode) auf dieser Bildebene den enddiastolischen (LV EDD) und endsystolischen (LV ESD) Durchmesser des linken Ventrikels über 10 Herzzyklen pro Untersuchung. Aus den so ermittelten Werten des enddiastolischen und endsystolischen Durchmessers des linken Ventrikels in cm können einerseits die Ischämie-bedingten Wandbewegungsstörungen des linken Ventrikels beurteilt werden, andererseits kann man die linksventrikuläre Verkürzungsfraction (fractional shortening = FS; %) errechnen.

Als FS bezeichnet man die fraktionelle Querdurchmesserverkürzung des linken Ventrikels. Dieser in Prozent angegebene Wert ergibt sich aus dem Verhältnis von endsystolischem und enddiastolischem Durchmesser des linken Ventrikels und ist ein Maß für die Kontraktilität von Kammerwand und Septum. Die FS stellt einen wichtigen Parameter der Funktionsbestimmung des linken Ventrikels dar.

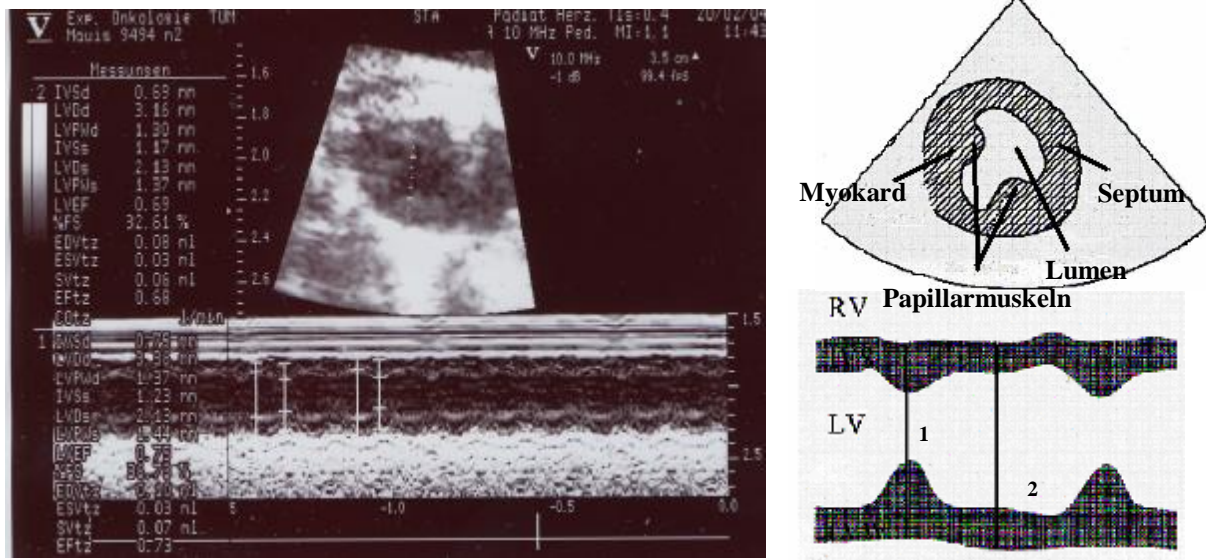


Abb.17 links: Sonographische Darstellung des linken Ventrikels eines Mäuseherzens: Kurzachsenschnitt; B-Mode in Höhe der Papillarmuskeln und M-Mode
rechts: nach POULSEN NAUTRUP und TOBIAS (1998) modifizierte schematische Darstellung des Kurzachsenschnittes im B-Mode und M-Mode für Messung der systolischen und diastolischen Werte
RV = rechter Ventrikel; LV = linker Ventrikel;
1 = endsystolischer Durchmesser des linken Ventrikels
2 = enddiastolischer Durchmesser des linken Ventrikels

a) Die FS wird nach folgender Formel berechnet:

$$FS (\%) = (LV EDD - LV ESD) \times 100 / LV EDD$$

LV EDD = enddiastolischer Durchmesser des linken Ventrikels

LV ESD = endsystolischer Durchmesser des linken Ventrikels

3.2.5 Durchführung der Operation

3.2.5.1 Vorbereitung und Anästhesie

Herstellung und Vorbereitung des applikationsfähigen GPVI-Fc- bzw. Fc-Kontroll-Proteins:

Die Substanz wird im Labor der Firma Procorde (Martinsried) nach dem Protokoll von MASSBERG et al. (2003 b) wie in 2.6.3 beschrieben hergestellt und in dankenswerter Weise für das hier beschriebene Versuchsvorhaben zur Verfügung gestellt.

Applikation des GPVI-Fc/Fc

30 Minuten vor OP-Beginn erhalten die Tiere je nach Gruppe entweder das GPVI-Fc-Protein (Gruppe 1) oder als Kontrolle das Fc-Fragment (Gruppe 2) in einer Konzentration von je 100 µg in 100 µl pro Maus über eine intravenöse Injektion in die Schwanzvene. Dazu werden sie wie beschrieben mit einer Isoflurannarkose immobilisiert.

12 Stunden post operationem erhalten die Tiere eine zweite Injektion der jeweiligen Substanz, soluble GPVI-Fc (Gruppe 1) oder Kontroll-Fc (Gruppe 2) wieder in der Konzentration von je 100 µg in 100 µl pro Maus intraperitoneal.

Vorbereitung und Operation

Nach 30 Minuten werden die Tiere für die Operation erneut in Narkose gelegt. Dazu erhalten sie eine intraperitoneale Injektion einer Kombination aus Midazolam (DORMICUM®, Hoffmann-La Roche AG) in einer Dosierung von 0,5 mg/kg KM, Medetomidin (DOMITOR®, Pfizer GmbH) in einer Dosierung von 0,05 mg/kg KM und Fentanyl (FENTANYL-JANSSEN®, Janssen GmbH) in einer Dosierung von 0,05 mg/kg KM (MMF), die die Narkose einleitet (HENKE und ERHARDT 2004).

Nach Verlust des Stellreflexes wird die Maus, wie vorher beschrieben, mit Enthaarungscreme (Pilca®, GlaxoSmithKline, Bühl) an der linken Thoraxwand für die Thorakotomie sowie an

der Halsunterseite für die Tracheotomie enthaart und zur Operation vorbereitet. Die Augen werden durch Auftragen von Augensalbe (Bebanthen® Augen- und Nasensalbe, Roche, Grenzach) auf die Kornea vor dem Austrocknen geschützt. Schon während der Vorbereitung erhält die Maus 100prozentigen Sauerstoff, 0,5 Liter pro Minute, wie schon beschrieben über eine Maske. Nachdem die Haut von der Enthaarungscreme gereinigt ist, wird die Maus in Rückenlage durch Klebestreifen auf dem OP-Feld fixiert. Durch die Narkoseeinleitung mit MMF kann die zusätzlich notwendige Menge an Isofluran im Sinne einer balancierten Anästhesie auf eine Erhaltungsdosis von 0,8 Prozent abgesenkt werden.

3.2.5.2 Tracheotomie

Die folgenden Operationen werden unter einem stufenlos, bis zu vierfacher Vergrößerung einstellbaren Dissektionsmikroskop (Fibermatic JKH® Edward Weck, North Carolina, USA) durchgeführt.

Um die Versorgung der Maus mit Sauerstoff auch während der Thorakotomie zu gewährleisten, wird die Maus tracheotomiert und mit einer Kolbenhubpumpe Minivent (Type 845, Hugo Sachs, March-Hugstetten) beatmet.



Abb.18 Lagerung zur Tracheotomie

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Dazu wird an der, wie in 3.2.5.1 vorbereiteten und anästhesierten Maus an der Halsunterseite ein Hautschnitt in der Medianen vorgenommen, in Höhe des Larynx in einer Länge von 5 mm. Nach stumpfem Trennen der paarigen Glandula mandibularis werden die Bäuche der direkt der Trachea aufliegenden paarigen Mm. sternohyoidei stumpf getrennt und mit Haltefäden 5-0 monofil (Prolene®, Ethicon, Norderstedt, D) so fixiert, dass der kraniale Teil der Luftröhre freiliegt.

Unter Schonung der parallel zur Trachea verlaufenden Vena thyroidea caudalis sowie dem senkrecht dazu stehenden Arcus laryngeus caudalis wird die Trachea caudal des Cartilago cricoidea in der 2. bis 3. Trachealspange eröffnet. Um die folgende Intubation zu erleichtern, wird die 3. Trachealspange caudal der Öffnung wiederum mit einem Haltefaden, monofil, 6-0 Maxon (Braun-Dexon, Melsungen) fixiert. Jetzt kann ein Metalltubus, Innendurchmesser von 1,0 mm oder 1,3 mm, je nach Größe der Maus, in die Trachea eingeführt werden.

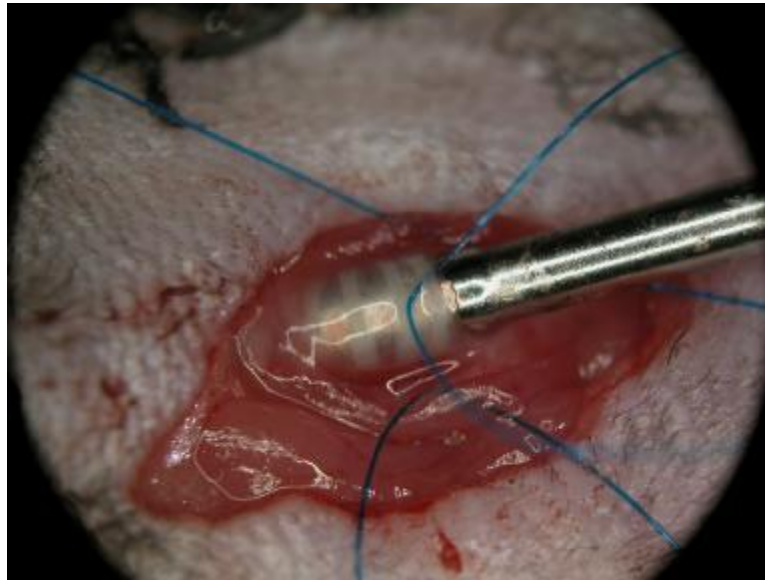


Abb. 19 Beatmung über einen Trachealtubus

Für die Dauer der nun folgenden Thorakotomie wird die Maus mit dem oben beschriebenen Beatmer mit 120 Atemzügen pro Minute bei einem Tidalvolumen von 180 μ l beatmet.

3.2.5.3 Thorakotomie mit Ischämie

Sobald die Maus intubiert ist, kann man die Narkose mit 0,8 % Isofluran und 100 % Sauerstoff, 0,5 Liter pro Minute, wie beschrieben, vertiefen. Zur nun folgenden lateralen interkostalen Thorakotomie lagert man die Maus auf die rechte Seite um. Dabei darf die Lage des Trachealtubus nicht verändert werden, um ein Herausrutschen zu verhindern. Die Maus wird mit Klebestreifen in dieser Lage fixiert, wobei die Vorderbeine nach kranial gestreckt sein müssen.

Nach Hautschnitt auf Höhe des 4. Interkostalraumes im Übergang zweites und drittes Thoraxdrittel und nach Trennen des *M. cutaneus trunci*, unter Schonung des *M. latissimus dorsi*, trennt man auch die *Mm. serratus dorsales* und *ventrales* entlang der Faserrichtung. Kapilläre Blutungen werden durch Kompression mit Saugtupfern (Ethikeil®, Ethicon, Norderstedt) gestillt, anhaltende Blutungen werden mit einem Mikrokoagulator (small vessel cauterizer, FST, Heidelberg) verödet.

Jetzt eröffnet man den Thorax durch das Auftrennen des *M. pectoralis profundus* im vierten Interkostalraum. Dieser lässt sich mit Hilfe eines modifizierten Rippenspreizers offen halten.

Das nun freiliegende Perikard wird, unter Schonung der Lunge, vom Herzen abgehoben und gefenstert. Um die für das Anbringen der Ligatur notwendige Darstellung der *Arteria coronaria sinistra* zu erleichtern, muss man das linke Herzohr mit einem auf 1mm Seitenlänge zugeschnittenen Saugtupfer (Ethikeil®, Ethicon, Norderstedt) unterlegen.

Die Arterie wird 1mm apikal des linken Vorhofes umstoichen und mit Vicryl® (8-0, Ethicon, Norderstedt) ligiert. Um das für die Reperfusion notwendige Wiedereröffnen der Ligatur nach 30 Minuten zu ermöglichen, kann man ein 1mm langes Polyethylen-Schlauchstück (SIMS, Portex, UK) dem Knoten unterlegen. Hellblasse Verfärbung des ligierten Bereiches, Tachykardie oder Arrhythmie bestätigen den festen Sitz der Ligatur, der auch durch Ziehen am Schlauchstück überprüft werden kann.

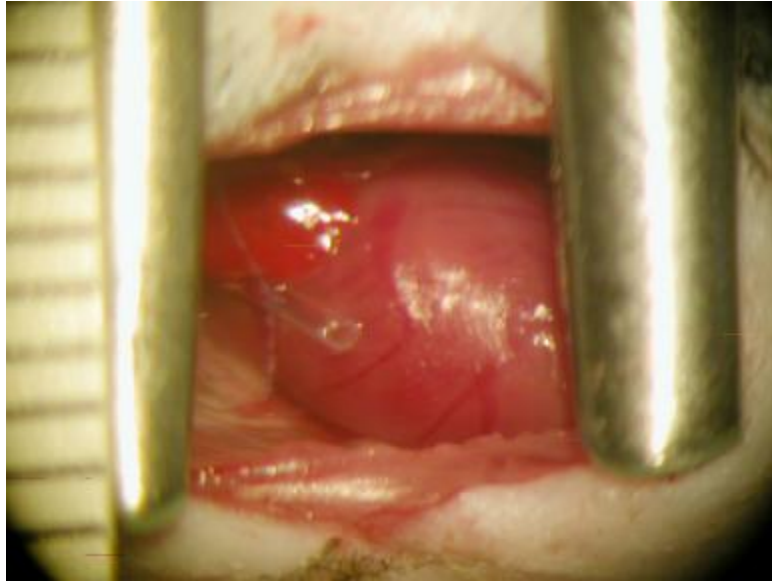


Abb. 20 Ligatur der linken Koronararterie, unterlegt mit einem Polyethylen-Schlauch

Auch während der 30minütigen Ischämie wird die Körpertemperatur wie vorher beschrieben auf physiologische $37\text{ °C} \pm 0,3\text{ °C}$ gehalten. Die freiliegende Thoraxwunde wird mit Ringer-Lösung (DeltaSelect®, Pfullingen) am Austrocknen gehindert.

Nach 30 Minuten wird die Ligatur geöffnet und der Faden sowie das unterlegte Polyethylenschlauchstück entfernt. Die erneute Blutfüllung der Arterie und auch die Durchblutung des vorher ischämischen Bereiches zeigen die Reperfusion des Gewebes durch Farbveränderung an.

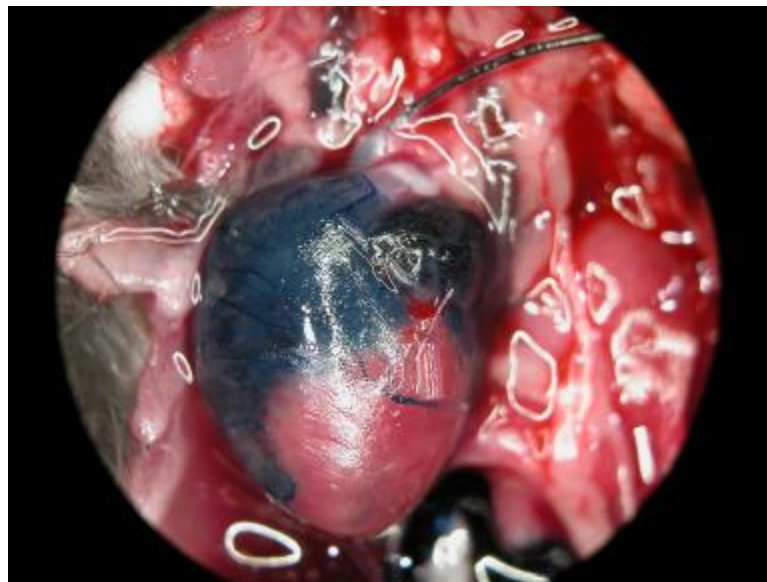


Abb. 21 Darstellung des ligierten ischämischen Bereiches (AAR, hell) durch Perfusion des durchbluteten Bereiches mit Evans blue (AnAR blau)

Der Thoraxverschluss durch Adaptation der Rippen erfolgt mit Einzelheften (6-0, Vicryl®, Ethicon, Norderstedt). Jetzt kann durch Absaugen der Luft und Gewebeflüssigkeit, mithilfe eines eingelegten Polyethylenschlauches, der Unterdruck im Thorax wiederhergestellt werden. Durch fortlaufende Naht (6-0, Vicryl®, Ethicon, Norderstedt) werden die Muskelschichten und die oberflächliche Faszie adaptiert. Die Haut wird durch U-Hefte mit monofilem Faden (6-0, Prolene® blau, Ethicon, Norderstedt) verschlossen. 40 Minuten vor OP-Ende erhalten die Tiere zur postoperativen Analgesie Buprenorphin (Temgesic®, ESSEX PHARMA, München) in einer Dosierung von 0,1 mg/kg KM und Carprofen (RIMADYL®, Pfizer, Karlsruhe) 5 mg/kg KM subkutan. Die Isoflurankonzentration wird auf 0,5 % gesenkt und nach vollständigem Verschluss der Haut völlig abgesetzt, der Maus wird weiterhin Sauerstoff über die Atemmaske zugeführt.

Nach Einsetzen der Spontanatmung wird die Maus extubiert und die Tracheaöffnung spannungsfrei mit einem Einzelheft (8-0, Vicryl®, Ethicon, Norderstedt) verschlossen. Während dieser Manipulation erhält die Maus 100 % Sauerstoff, 0,5 Liter pro Minute über die vorher beschriebene Maske. Auch der Hautschnitt im Kehlkopfbereich wird wie vorher mit U-Heften verschlossen. Nach der letzten Hautnaht wird durch subkutane Applikation der Kombination von Flumazenil (ANEXATE®, Hoffmann-LaRoche AG) in einer Dosierung von 0,5mg/kg KM und Atipamezol (ANTISEDAN®, Pfizer GmbH) in einer Dosierung von 2,5 mg/kg KM die Narkose antagonisiert (HENKE und ERHARDT 2004).

3.2.5.4 Postoperative Versorgung und Analgesie

Sobald die Maus aus der Narkose aufgewacht ist, wird sie in einen Käfig gesetzt, der zur Hälfte mit einer Wärmelampe bestrahlt wird, um einem Auskühlen des Tieres vorzubeugen. Für die 24 Stunden der Reperfusion erhalten die Tiere Wasser und Futter ad libitum.

Zur postoperativen Analgesie erhalten die Tiere bis zur Tötung 24 h nach Ischämie alle 6 bis 8 Stunden nach Operationsende durch eine subkutane Injektion Buprenorphin (Temgesic®, ESSEX PHARMA, München) in der Dosierung von 0,1 mg/kg KM.

3.2.5.5 Infarktfärbung und Probengewinnung

Nach 24stündiger Reperfusion führen wir, wie unter 3.2.4 beschrieben, die postoperative sonographische Untersuchung unter Inhalationsanästhesie mit Isofluran durch.

Anschließend folgt eine erneute Trachotomie der Maus unter MMF-Narkose. Sodann wird das Tier unter 3prozentiger Isoflurannarkose beatmet und thorakotomiert und durch Blutentzug getötet. Dazu muss man die Aorta mit einer Insulinspritze, 0,1ml Heparinvorlage, punktieren.

Weiter proximal wird die Aorta descendens kanüliert und ein Polyethylenschlauch (SIMS, Portex, Innendurchmesser 0,28 mm, UK) eingelegt. Dadurch kann man das Herz bei eröffneter Vena cava caudalis mit ca. 4 ml Ringerlösung (DeltaSelect, Pfullingen, D) spülen. Anschließend wird das Herz über den gleichen Schlauch, der über eine Spritzenpumpenleitung (Cliniko, Bad Hersfeld, D) mit einer Spritzenpumpe (8IVAC 770, San Diego, Kalifornien, USA) verbunden ist, mit 50 ml 1prozentigem 2,3,5-Triphenyltetrazolium-Chlorid (TTC) (SIGMA, Taufkirchen, D) bei einer Durchflussrate von 100 ml pro Minute unter Lichtabschluss perfundiert.

TTC verwendet man, um ischämisch geschädigte Zellen darzustellen: In gesundem Gewebe wandelt sich TTC durch oxidative Phosphorylierung durch mitochondriale Dehydrogenase in einen roten unlöslichen Farbstoff (1,3,5-Triphenylformazan) um. Demzufolge wird vitales Gewebe rot gefärbt, während bereits abgestorbenes Gewebe weiß bleibt.

Die Temperatur sollte man auch hier konstant auf 37 °C halten. Nach dieser Behandlung mit TTC wird das Herz entnommen und die Aorta erneut katheterisiert. Die A. coronaria sinistra wird in gleicher Höhe wie schon beschrieben erneut ligiert. Die anschließende Perfusion mit 0,2 ml 1prozentigem Evansblue (SIGMA, Taufkirchen, D) ermöglicht die Abgrenzung des vorher ischämischen Bereiches (AAR = area at risk) vom normal durchbluteten Bereich (AnAR = area not at risk), indem, retrograd zum physiologischen Blutfluss, über die Aorta und die Koronararterien das proximal der Ligatur gelegene Herzgewebe mit Evansblue blau eingefärbt wird. Abschließend lagern wir das Herz bei -70 °C bis zur Probenaufarbeitung und Auswertung.

3.2.5.6 Probenaufarbeitung und Auswertung

Mit einem speziell angefertigten Gewebeschneider wird das Herz so geschnitten, dass man drei bis vier 1 mm dicke Scheiben apikal der Ligatur, je nach Größe des Herzens, erhält. Anschließend werden von den Scheiben auf einer Millimeterskala mit einer Kamera (Nikon® coolpix 5000, Tokyo, Japan) digitale Aufnahmen angefertigt. Die Scheiben werden dann mit einer elektronischen Waage (Analytic AC 210P, Sartorius, Göttingen) einzeln gewogen.

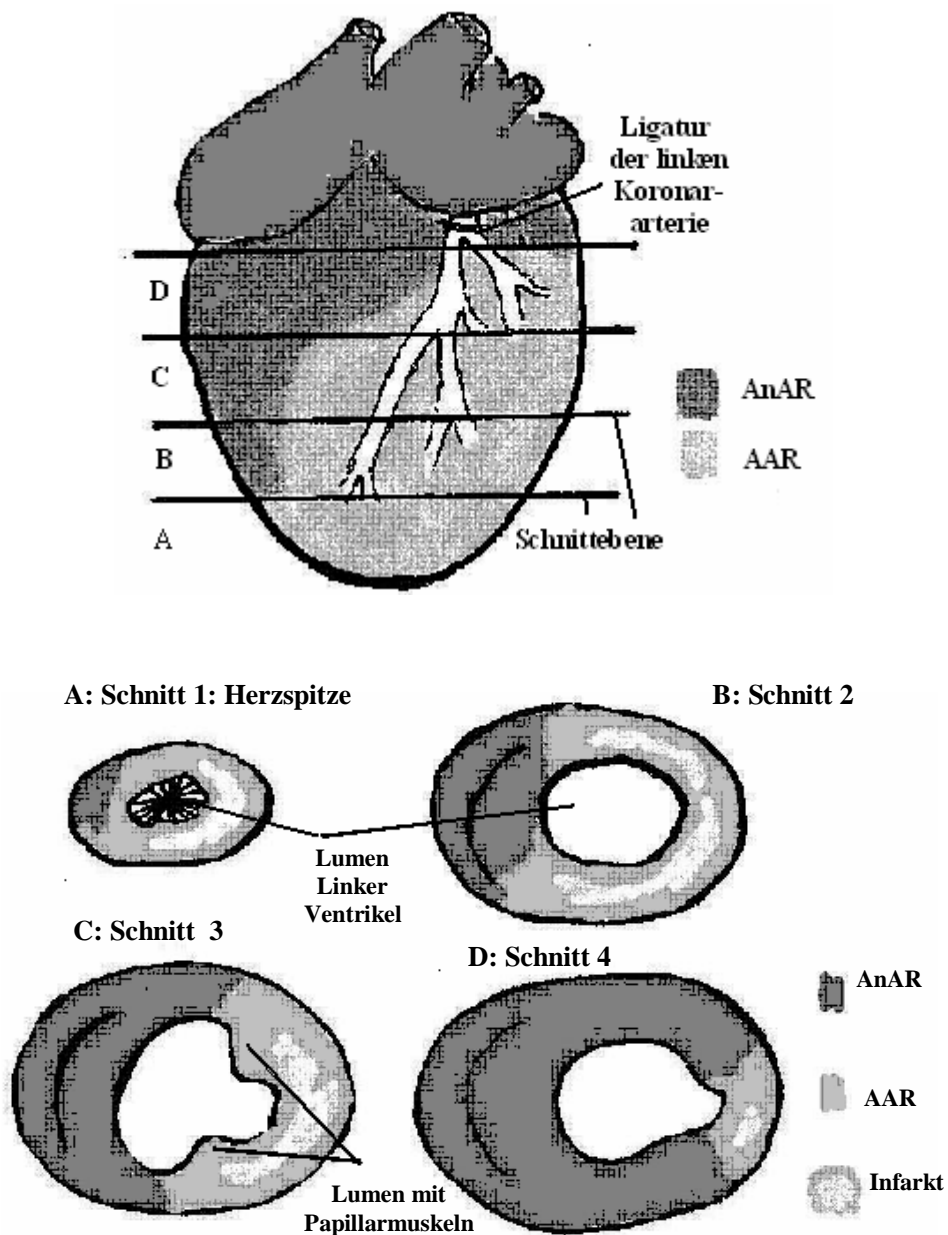


Abb. 22 schematische Darstellung der Schnittebenen A bis D: Aufsicht auf linken Ventrikel mit Ligaturstelle der linken Koronararterie (oben). AAR (Area at risk), AnAR (Area not at risk) und Infarkt in den einzelnen Schnitten: A, 1. Schnitt (Herzspitze) bis D, 4. Schnitt (apikal der Ligatur) (unten)

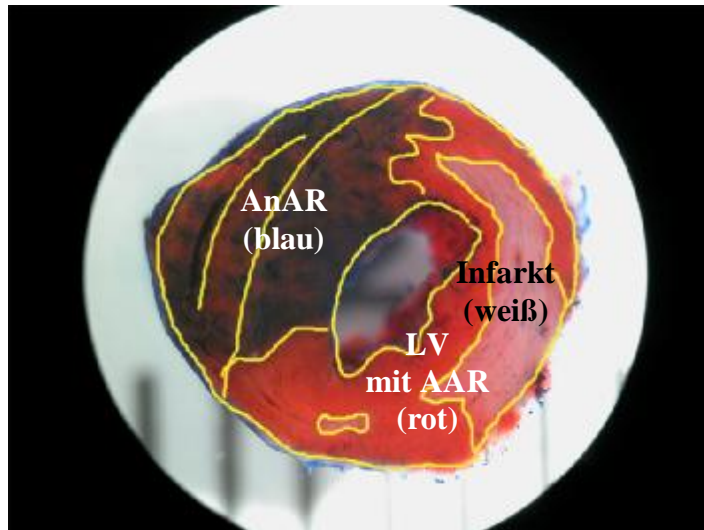


Abb. 23 Herzschnitt mit linkem Ventrikel (LV) mit Area at risk (AAR) rot, Infarkt weiß TTC und Evansblau (Area not at risk (AnAR) blau) gefärbt, mit Scion Image planimetriert

Mit dem Bildverarbeitungsprogramm Scion Image (Version 4.0.2., Frederick, Maryland, USA) können die Flächengrößen von folgenden Parametern durch manuelles Umfahren der Konturen anhand der mitfotografierten Millimeterskala bestimmt werden:

Ischämie (I); Area at risk (AAR); linker Ventrikel (LV); Area not a risk (AnAR) in mm²

Aus diesen Daten können nun die relativen Infarktgrößen I/AAR und I/LV ermittelt werden. Die Ergebnisse werden in eine Excel-Tabelle (Microsoft Office 2000, Excel) übertragen. Jetzt wird das Verhältnis der Ischämiefläche zur Area at risk (AAR) sowie zur Gesamtfläche des linken Ventrikels (LV) nach folgender Formel bestimmt:

$$\frac{I}{AAR} = \frac{\frac{I_1}{A_{ges1}} \cdot G_1 + \frac{I_2}{A_{ges2}} \cdot G_2 + \frac{I_3}{A_{ges3}} \cdot G_3 + \frac{I_4}{A_{ges4}} \cdot G_4}{\frac{AAR_1}{A_{ges1}} \cdot G_1 + \frac{AAR_2}{A_{ges2}} \cdot G_2 + \frac{AAR_3}{A_{ges3}} \cdot G_3 + \frac{AAR_4}{A_{ges4}} \cdot G_4}$$

Um das Gewicht und die Größe der einzelnen Schnitte zu berücksichtigen, wird die jeweilige Fläche von Infarkt (I₁-I₄), AAR (AAR₁-AAR₄), linkem Ventrikel (LV₁-LV₄) in Bezug zur Gesamtfläche (A_{ges1}-A_{ges4}) des Schnittes gesetzt und dieser Wert mit dem Gewicht (G₁-G₄) des jeweiligen Schnittes multipliziert. Auf diese Weise wird der Gesamtinfarkt des Herzens durch Addition der Werte der einzelnen Schnitte bestimmt, ebenso wird die Größe der linken Ventrikelwand (LV) und der AAR bestimmt.

3.2.5.7 Statistische Auswertungen

Die statistische Auswertung erfolgt für beide Gruppen mit SPSS 11,5 (SPSS Inc., Chicago, USA) und befasst sich mit folgenden Daten:

I/AAR

I/LV

AAR/LV

LV/GES

FS: M1/M2

Für die geplanten Gruppenvergleiche werden aus den Einzelwerten der Mittelwert (MW, arithmetisches Mittel), die Standardabweichung (SD) und der Standardfehler (SE) berechnet. Als statistischer Test wurde der Mann-Whitney-U-Test für unverbundene Stichproben angewandt. Für die Berechnung der Irrtumswahrscheinlichkeit (p) wird ein Wert von $p < 0,05$ als statistisch signifikant beurteilt.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.3 Ergebnisse

Tab. 3 Übersicht der Ergebnisse der Gruppen I (soluble GPVI-Fc) und II (Fc-Kontrolle):

<i>GRUPPE</i>	<i>KG</i> <i>in g</i>	<i>HG</i> <i>in g</i>	<i>TL</i> <i>in cm</i>	<i>I/</i> <i>AAR</i> <i>in %</i>	<i>I/LV</i> <i>in %</i>	<i>AAR</i> <i>/LV</i> <i>in %</i>	<i>LV/</i> <i>GES</i> <i>in %</i>	<i>FS</i> <i>M1</i> <i>in %</i>	<i>FS</i> <i>M2</i> <i>in %</i>	<i>Diff.</i> <i>FS</i> <i>in %</i>
<i>I</i> <i>GPVI-Fc</i>										
Maus 1	21,40	0,12	17,21	3,90	2,01	51,56	72,32	44,95	37,82	7,13
Maus 2	24,60	0,11	18,72	2,03	1,11	54,61	73,59	44,34	35,95	8,39
Maus 3	24	0,12	17,90	3,92	1,68	42,97	70,34	45,32	36,81	8,51
Maus 4	26	0,14	17,81	14,15	6,36	44,96	74,00	44,41	35,90	8,51
Maus 5	24,70	0,08	18,80	9,13	5,73	62,75	77,08	46,31	38,42	7,89
Maus 6	26,20	0,12	18,47	35,94	16,80	46,74	72,30	43,78	32,44	11,34
Maus 7	26,10	0,10	18,90	30,16	20,79	68,93	75,10	41,76	27,04	14,72
Maus 8	30	0,17	19,52	14,21	10,12	71,21	73,14	42,85	35,04	7,81
Maus 9	27,70	0,16	19,10	26,13	14,48	55,41	76,45	41,55	30,47	11,08
Maus 10	27,80	0,14	19,22	22,10	13,42	60,72	93,12	52,00	40,00	12,00
<i>MW</i>	25,85	0,13	18,57	16,17	9,25	55,98	75,74	44,73	34,99	9,74
<i>SD</i>	2,25	0,03	0,68	11,31	6,58	9,31	6,10	2,82	3,74	2,30
<i>II</i> <i>Fc-Kontr.</i>										
Maus 1	22,40	0,13	17,20	24,63	11,20	45,30	78,23	40,19	34,74	5,45
Maus 2	23,40	0,14	17,80	15,85	8,40	53,20	77,57	42,48	36,09	6,39
Maus 3	24,20	0,11	18,40	5,70	3,80	66,40	71,83	43,03	33,74	9,29
Maus 4	26,60	0,15	19,60	49,17	26,50	53,80	70,48	39,33	31,40	7,93
Maus 5	28,90	0,11	18,70	25,67	12	46,80	70,40	44,86	35,93	8,93
Maus 6	26,20	0,08	18,10	35,95	22,10	61,50	79,86	42,27	35,40	6,87
Maus 7	27,70	0,09	18,50	33,43	21,30	63,90	79,34	41,77	32,02	9,75
Maus 8	27	0,14	19,30	36,44	22,80	62,50	75,74	41,50	29,32	12,18
Maus 9	24,90	0,09	17,84	34,75	14,80	42,70	69,69	43,41	36,90	6,51
Maus 10	25,70	0,14	18,98	49,61	29,10	58,60	72,07	44,57	37,08	7,49
<i>MW</i>	25,70	0,12	18,44	31,12	17,20	55,47	74,52	42,34	34,26	8,08
<i>SD</i>	1,90	0,02	0,70	13,00	7,91	7,97	3,82	1,66	2,46	1,89
Signifikanz	0,971	0,579	0,631	0,019	0,035	0,971	0,853	0,052	0,481	0,165

KG: Körpergewicht; HG: Herzgewicht; TL: Tibialänge; I: Infarkt; AAR: Area at risk; LV: linker Ventrikel;
 GES: Gesamtherz; FS: fractional shortening; M: Messung; Diff: Differenz;
 MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung

3.3.1 Echokardiographie

Der Ausgangswert (M1) der prozentualen Durchmesserverkürzung (fractional shortening, FS) des linken Ventrikels beträgt für die GPVI-Fc-Gruppe im Mittel $44,73 \pm 2,82$ %, für die Fc-Kontrollgruppe $42,43 \pm 1,66$ %.

Der Wert 24 Stunden nach Ischämie (M2) der FS des linken Ventrikels beträgt für die GPVI-Fc-Gruppe im Mittel $34,99 \pm 3,74$ %, für die Fc-Kontroll-Gruppe $34,26 \pm 2,46$ %.

Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen kann nicht gezeigt werden.

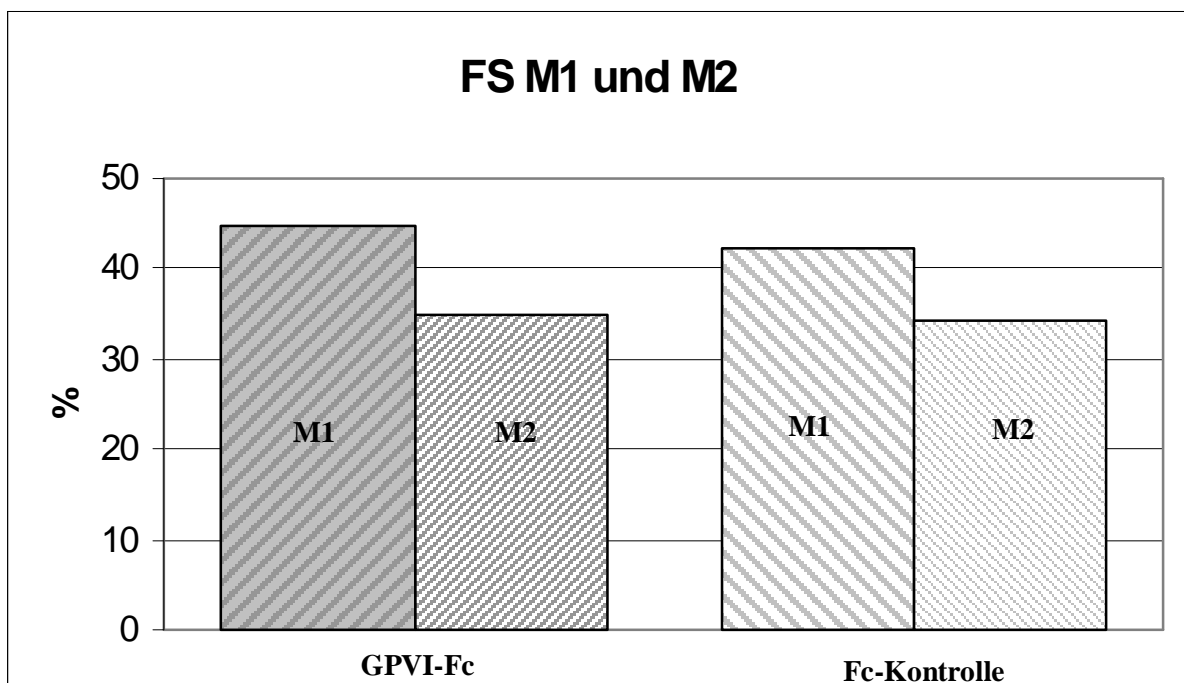


Abb. 29 Mittelwerte der Differenz der echokardiographischen Messung M1 (vor OP) und M2 (nach OP) der soluble GPVI-Fc Gruppe und der Fc-Kontrollgruppe in %

3.3.2 Überlebensrate

Von den insgesamt 29 untersuchten Tieren versterben 6 Tiere während des Versuchszeitraumes, 3 Herzen sind nicht auswertbar. 2 Tiere sterben während der Operation an zu hohem Blutverlust. Bei 4 Tieren treten nach der Operation Probleme im Zusammenhang mit den Atemwegen auf, diese Tiere sterben sofort nach Extubation oder innerhalb von wenigen Stunden danach an Dyspnoe. Bei 3 Herzen ist die Färbung fehlerhaft, so dass diese Herzen nicht ausgewertet werden können.

3.3.3 Infarktgröße

Die Infarktgröße (I) wird in Prozent der „Area at risk“ (AAR), also des während der Ischämie aufgrund der Ligierung der linken Koronararterie nicht durchbluteten Bereiches, und des linken Ventrikels (LV) dargestellt. Zwischen den beiden Gruppen ist ein signifikanter Unterschied in der Infarktgröße erkennbar:

Bei den Tieren mit GPVI-Fc behandelten Tieren beträgt die berechnete Infarktgröße zur „Area at risk“ im Mittel $16,17 \pm 11,31 \%$, bei den Fc-Kontroll-Tieren dagegen $31,12 \pm 13 \%$.

GPVI-Fc: $I/AAR = 16,17 \pm 11,31 \%$;

Fc-Kontrolle: $I/AAR = 31,12 \pm 13 \%$

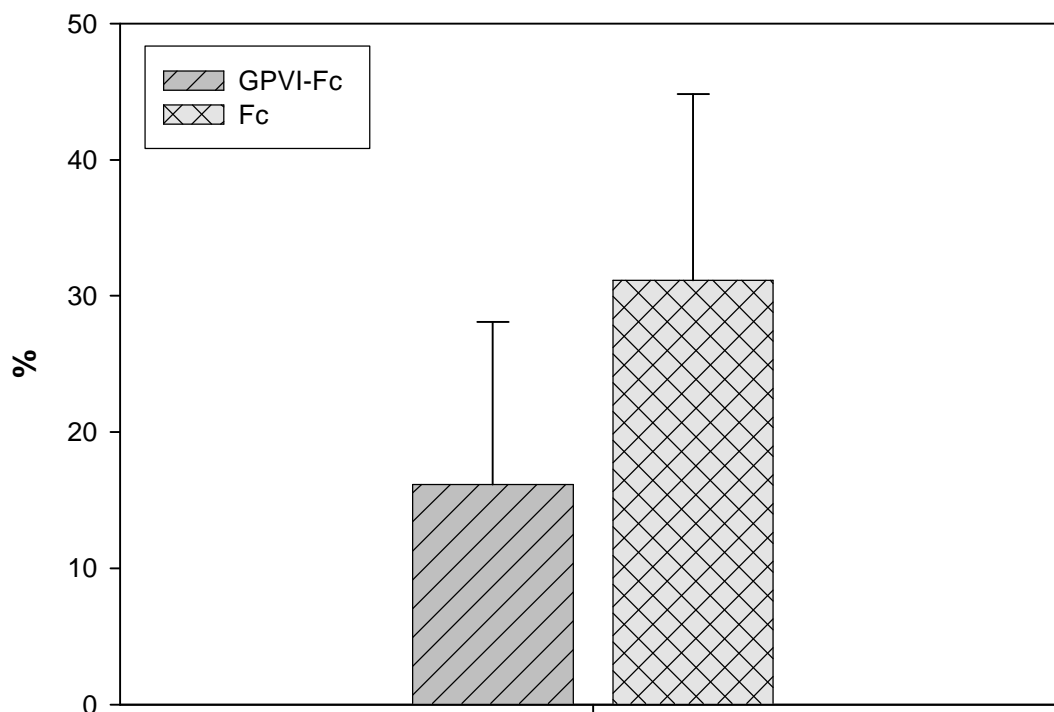


Abb. 24 Mittelwerte Infarkt zu AAR in %

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Auch die Infarktgröße in Prozent zum linken Ventrikel ist bei der GPVI-Fc-Gruppe signifikant erniedrigt. Sie beträgt in der GPVI-Fc-Gruppe $9,25 \pm 6,58 \%$, in der Fc-Kontroll-Gruppe $17,20 \pm 7,91 \%$.

GPVI-Fc: I/LV = $9,25 \pm 6,58 \%$;

Fc-Kontrolle: I/LV = $17,20 \pm 7,91 \%$

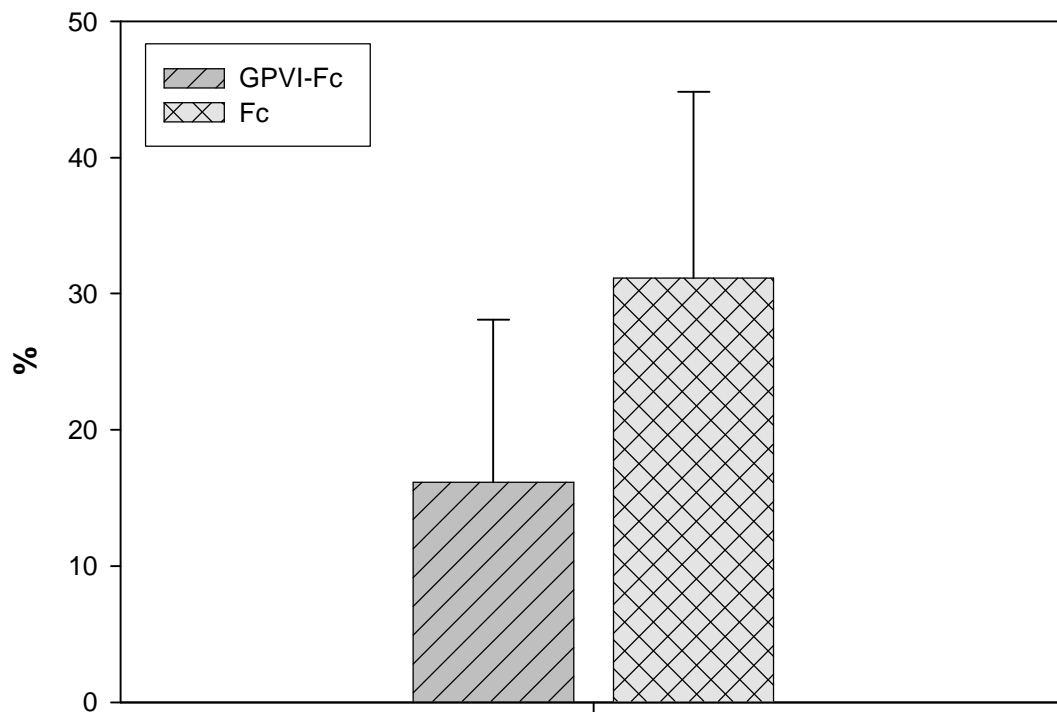


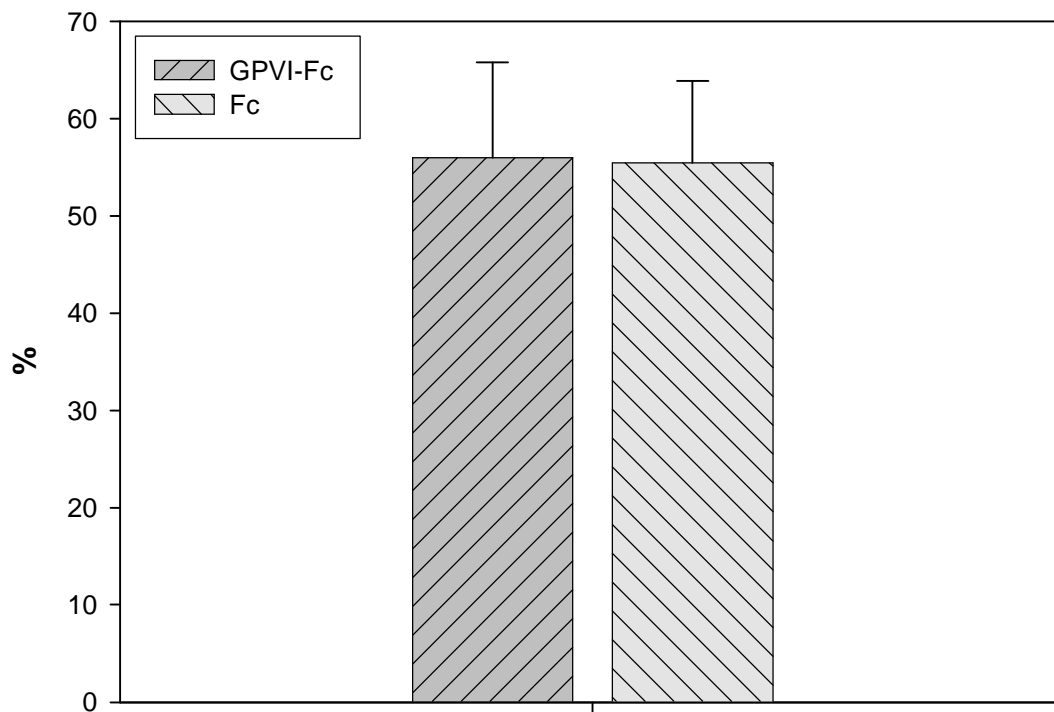
Abb. 25 Mittelwerte Infarkt zu linkem Ventrikel in %

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

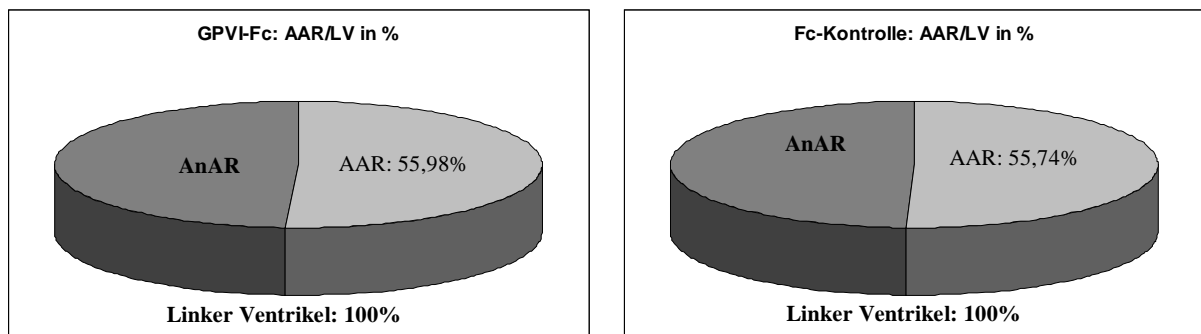
Bei Vergleich der planimetrisch ermittelten Größe der „Area at risk“ (AAR) an sich kann gezeigt werden, dass zwischen den beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied besteht. Die AAR der GPVI-Fc-Gruppe beträgt $55,98 \% \pm 9,31\%$ des linken Ventrikels, die AAR der Fc-Kontrollgruppe $55,74 \% \pm 7,97\%$.

GPVI-Fc: AAR/LV = $55,98 \% \pm 9,31 \%;$

Fc-Kontrolle: AAR/LV = $55,74 \% \pm 7,97 \%$



A



B

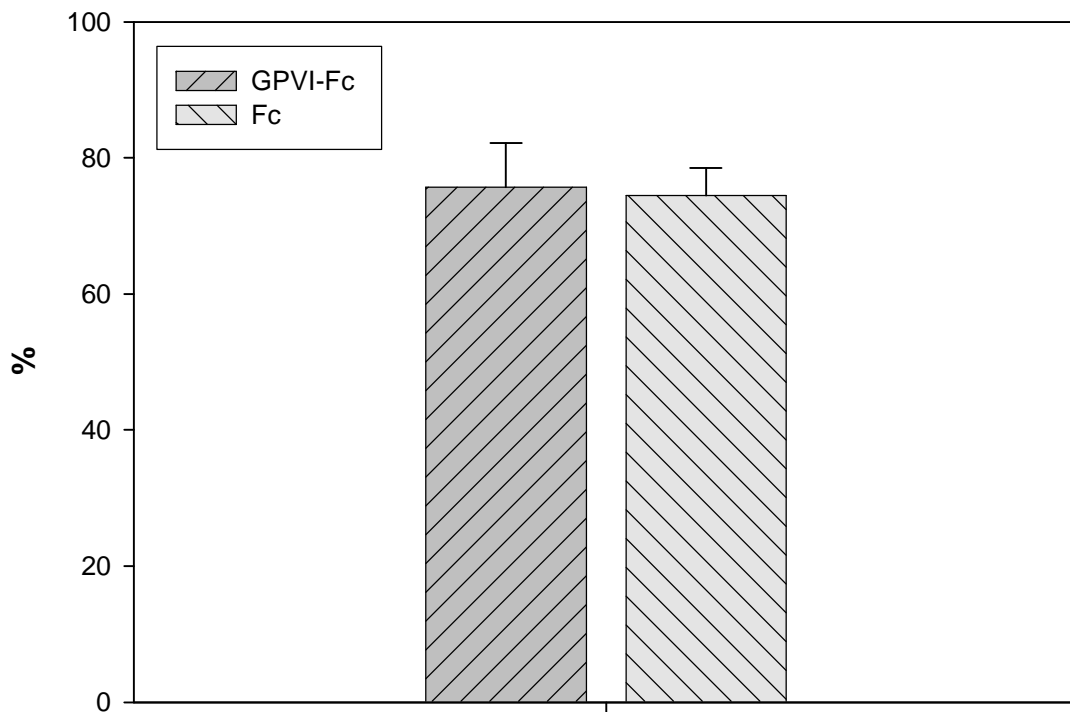
Abb. 26 Mittelwerte beider Gruppen AAR zu linkem Ventrikel in %

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

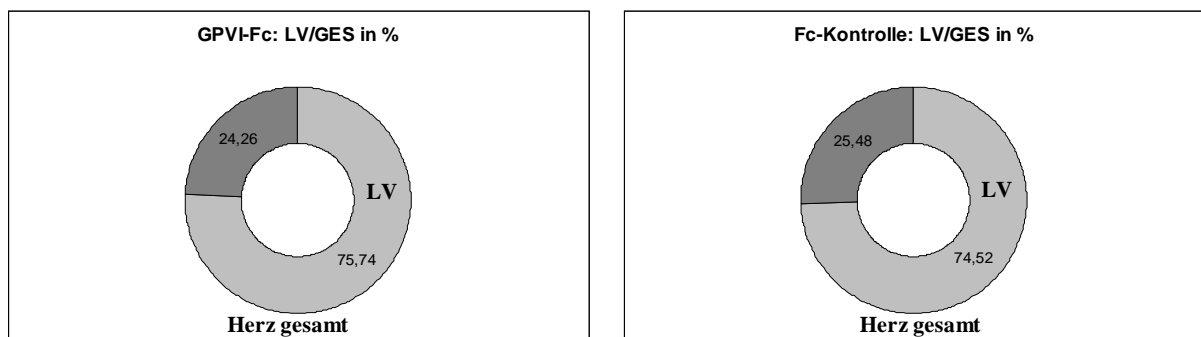
Auch die Größe des linken Ventrikels ist in beiden Gruppen nahezu gleich. Die linksventrikuläre Fläche der GPVI-Fc-Gruppe beträgt $75,74 \% \pm 6,1 \%$ im Mittel, die der Fc-Kontrollgruppe $74,52 \% \pm 3,82 \%$.

GPVI-Fc: LV/GES = $75,74 \% \pm 6,1 \%$;

Fc-Kontrolle: LV/GES = $74,52 \% \pm 3,82 \%$



A



B

Abb. 27 Mittelwerte linker Ventrikel zu Gesamtfläche in %



Bild A: Schnitt 1: Herzspitze, GPVI-Fc

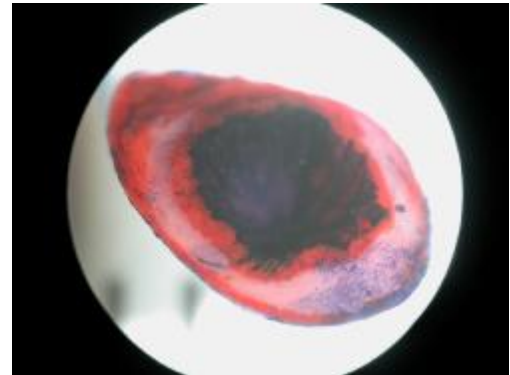


Bild B: Schnitt 1: Herzspitze, Fc-Kontrolle

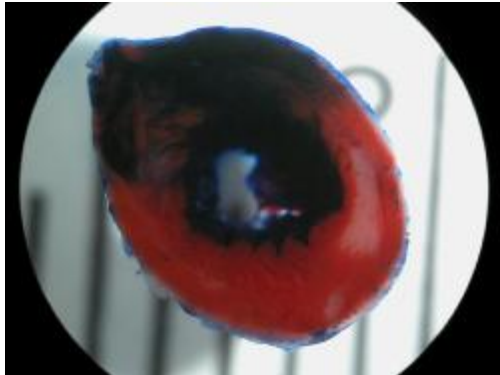


Bild C: Schnitt 2, GPVI-Fc

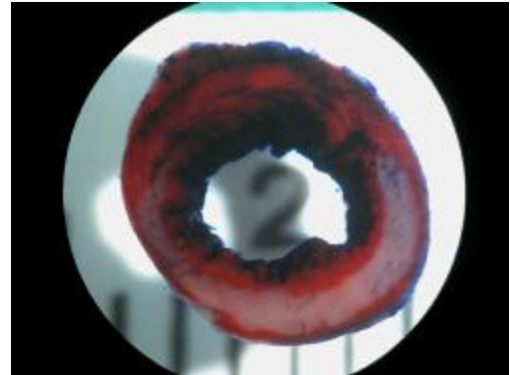


Bild D: Schnitt 2, Fc-Kontrolle

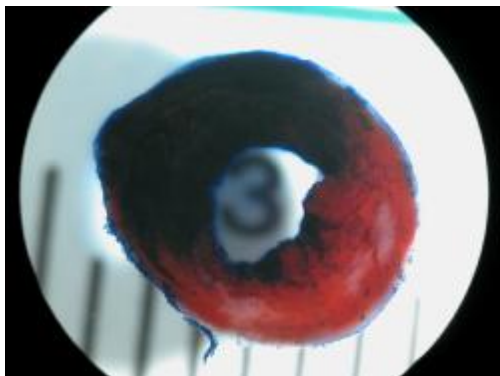


Bild E: Schnitt 3: apikal der Ligatur, GPVI-Fc

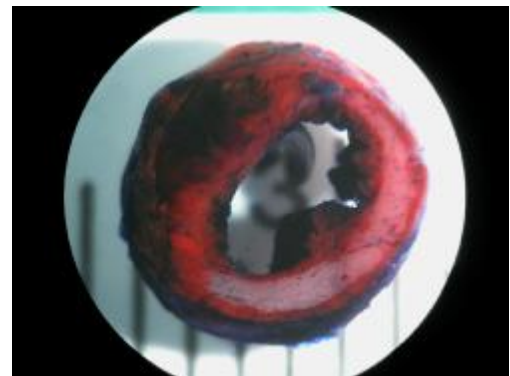


Bild F: Schnitt 3: apikal der Ligatur, Fc-Ko.

Abb. 28 Vergleich der Infarktgrößen im linken Ventrikel in TTC (weiß) und Evans Blue (blau, Area not at risk) gefärbten Herzquerschnitten von GPVI-Fc (links) und Fc-Kontrolle (rechts), jeweils Schnitt 1 bis 3

4 DISKUSSION

4.1 Diskussion der Versuchsdurchführung

Tierversuche geben in der Öffentlichkeit immer wieder Anlass für Diskussionen und bereiten ethische und moralische Schwierigkeiten. So wird stets gefordert, auf In-vitro-Modelle zurückzugreifen. Da die Ursachen und Folgen eines ischämischen Myokardinfarkts beim Menschen allerdings sehr variabel sind und Untersuchungen an einzelnen Zellen, isolierten Langendorff-Herzen oder ischämischen Gewebeschnitten die Komplexität eines ischämischen Geschehens nicht widerspiegeln können, ist es unerlässlich, in Studien zur Pathophysiologie der akuten myokardialen Ischämie auf Tiermodelle zurückzugreifen. Tierversuche erfüllen durch die Möglichkeit der Überwachung und Kontrolle verschiedener physiologischer Parameter, vor und während einer ernstzunehmenden Studie, die dafür geforderte Reproduzierbarkeit ablaufender pathophysiologischer Prozesse. Ein weiterer Vorteil eines Tierversuches ist darin zu sehen, umfassende histologische, biologische und pathologische Untersuchungen intra- und postoperativ an gewonnenen Proben durchführen zu können.

Die Übertragbarkeit tierexperimentell gewonnener Ergebnisse auf den Menschen ist abhängig von der Fragestellung und der Eignung des gewählten Tiermodells. Die Möglichkeit Modelle humaner Erkrankungen mithilfe genetisch veränderter Tiere (v.a. Mäuse) zu erstellen, ist eine hervorragende Strategie, molekulare Mechanismen im pathophysiologischen Prozess genau zu beleuchten (LIN et al.1995; PAIGEN 1995; BECKER et al. 1996). Es existieren eine Reihe experimenteller Tiermodelle zur Erforschung myokardialer Ischämie, so wurde auch die Maus als Modell für myokardiale Ischämie etabliert (ZOLOTAREVA und KOGAN 1978; MICHAEL et al.1995). Als beträchtlicher Vorteil zeigt sich auch hier die Wahl der Maus als Versuchstier: Zum einen besteht bei diesem Tier die Möglichkeit der genetischen Manipulation zur Generierung verschiedener Knockout-Modelle, zum anderen ist der Kostenaufwand aufgrund der geringen Körpergröße der Maus, der relativ schnellen Zuchtfolge und der platzsparenden relativ einfachen Haltungsbedingungen geringer als bei größeren Säugetieren. Aber auch die Möglichkeit mit geringerem personellem Aufwand als bei großen Versuchstieren zu arbeiten und deren bescheidenere Ansprüche auf postoperative Pflege sowie ein niedriger Verbrauch an Diagnostika und Therapeutika ist nicht zu vernachlässigen (ZOLOTAREVA und KOGAN 1978). Dazu kommt eine auf die Versuche folgende einfachere und kostengünstigere Probengewinnung und Lagerung als bei größeren Versuchstieren.

DISKUSSION

Durch die große Übereinstimmung im Aufbau humaner und muriner Proteine wird oftmals der Einsatz humaner Antikörper auch bei der Maus möglich (SCHMITT et al. 2001). So entspricht auch die Aminosäuresequenz von humanem GPVI-Protein, das in dieser Studie zum Einsatz kommt, zu 64,4% der von murinem GPVI-Protein, die Nukleotidsequenz von humaner und muriner GPVI-cDNA sind zu 67,3% identisch (JANDROT-PERRUS et al. 2000). Die zytoplasmatische Region von murinem thrombozytären Kollagenrezeptor GPVI zeigt zwar nur 27 AS im Vergleich zur humanen zytoplasmatischen Region und eine Region von 24 AS der C-terminalen Sequenz fehlt bei Mäusen völlig, dies hat jedoch, zumindest nach bisherigem Kenntnisstand, keinerlei Einfluss auf die Funktion des GPVI-Proteins (MOROI und JUNG 2004). So kann beispielsweise sowohl bei GPVI-negativen Thrombozyten von Mäusen als auch von Menschen die kollageninduzierte Plättchenaktivierung nicht ausgelöst werden (NIESWANDT et al. 2001 b; GOTO et al. 2002). Somit steht der experimentellen Forschung mit der Maus ein geeignetes Modell für das Studium der physiologischen Vorgänge im Bezug auf die Thrombozytenadhäsion und Aktivierung über den thrombozytären Kollagenrezeptor GPVI auch für die vorliegende Studie zur Verfügung.

Allerdings kann mit dem in dieser Studie genutzten Modell nicht die klinische Situation einer koronaren Okklusion mit nachfolgendem Myokardinfarkt exakt reproduziert werden. Die myokardiale Ischämie wird in dem hier angewandten Modell durch plötzliche Okklusion einer sonst physiologisch unauffälligen Koronararterie erzeugt. Dabei kann natürlich nicht auf die beim Menschen dem Myokardinfarkt vorausgehenden pathophysiologischen Mechanismen, wie langsam fortschreitende atherosklerotische Verengung des Koronararterienlumens an einer oder mehreren Stellen eingegangen werden. Trotzdem ist dieses Modell für die in dieser Arbeit gestellte Frage nach der Erprobung einer neuen therapeutischen Intervention zur Limitierung der Infarktgröße sehr gut geeignet: durch experimentelle Inhibition der Thrombozyten über die Blockade des Kollagenrezeptors GPVI können so andere, möglicherweise auch die Infarktgröße beeinflussende Faktoren ausgeschlossen werden. Dies würde eine Reduktion des multifaktoriellen Geschehens bei der humanen Koronaren Herzkrankheit auf die Funktion der Thrombozyten bedeuten.

In unserem Modell wird die intravenöse Applikation von soluble GPVI-Fc bzw. Fc-Kontrolle eine Stunde vor Setzen der Ischämie gewählt, um die dafür notwendige Umlagerung des Tieres während der Operation zu vermeiden. Durch eine Umlagerung wäre die Gefahr z.B. einer Extubation, aber auch das Risiko der Operation an sich unnötig erhöht. Auch simuliert die prae-interventionelle Applikation von soluble GPVI-Fc die Situation bei Verhinderung eines Rezidives eines Myokardinfarktes. So kann der Einfluss des thrombozytären

Kollagenrezeptors GPVI, bzw. einer löslichen Form von GPVI (soluble GPVI-Fc), ohne andere Einflüsse, auf den Myokardinfarkt untersucht werden. Dazu müssen weiter versuchsbedingte Parameter wie Ischämiedauer (JENNINGS et al. 1960), Körpertemperatur (MIKI et al. 1998), Geschlecht (WU et al. 2003), Alter (AZHAR et al. 1999) und Gewicht der Versuchstiere, Okklusionsstelle der Arterie (AHN et al. 2004) und eingesetzte Arzneimittel wie Analgetika oder Anästhetika (so gilt z.B. Isofluran als kardioprotektiv) (CASON et al. 1997; TANAKA et al. 2004), die auch einen Einfluss auf die Größe des induzierten Infarktes aufweisen, klar definiert und standardisiert werden. Das hier gewählte Tiermodell ermöglicht also nur unter exakter Einhaltung eines standardisierten Protokolls die von einem Tierversuch geforderten reproduzierbaren Werte und Ergebnisse.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Allgemeines

Die an einer geschädigten Gefäßwand aus der Ruptur einer atherosklerotischen Plaque folgende subendotheliale Kollagenexposition führt über initiale Thrombozytenadhäsion, Aktivierung der Blutplättchen und konsekutiver Thrombozytenaggregation zu arterieller Thrombosierung und Mikrothrombenbildung mit daraus resultierender Ischämie distaler Gewebereiche. Ziel dieser Studie ist es, die initiale Adhäsion und Aktivierung der Thrombozyten durch die Blockade des thrombozytären Kollagenrezeptors GPVI zu hemmen und seine Auswirkungen auf die Größe des Myokardinfarktes der Maus erstmalig zu untersuchen. Dazu wird ein myokardiales Ischämie-Reperusionsmodell eingesetzt. Die Beteiligung der Thrombozyten im Infarktgeschehen konnte bereits deutlich hervorgehoben werden (GAWAZ 2004), ebenso die gesteigerte Adhäsion der Thrombozyten an die geschädigte Endothelwand während der Ischämie und Reperfusion (MASSBERG et al. 1999). Auch der Einfluss des Kollagenrezeptors GPVI auf die Adhäsion der Thrombozyten, die darauffolgende Aktivierung und die so ermöglichte Thrombusbildung wurde in der Literatur ausführlich beschrieben (MOROI et al. 1989; CHEN et al. 2002; MASSBERG et al. 2003 a).

4.2.2 Infarkte

Die Ergebnisse der planimetrisch ermittelten Infarktgrößen am Myokard zeigen, dass es auch bei der Maus möglich ist, durch Ligatur der linken Koronararterie an definierter Stelle, eine myokardiale Ischämie des linken Ventrikels von homogener Größe zu erzeugen. Aufgrund der Ergebnisse, wie AAR/LV und LV/GES, kann man davon ausgehen, dass mit dem hier standardisiert angewendeten Versuchsmodell eine AAR (durch die Ligatur der linken Koronararterie ischämischer Bereich) von nahezu gleicher Größe im Bezug zum linken Ventrikel produziert werden kann. Auch die aus der Ischämie resultierende Größe des Myokardinfarkts beider Gruppen wird so standardisiert.

In dieser Studie konnte erstmals an der Maus mit einem In-vivo-Modell für Ischämie und Reperfusion demonstriert werden, dass durch eine prae-interventionelle Applikation einer löslichen Form des thrombozytären Kollagenrezeptors GPVI (soluble GPVI-Fc) die Ausdehnung des durch die Ischämie letal geschädigten Bereiches am Myokard signifikant reduziert werden kann. Diese Ergebnisse der Infarktgrößenreduktion von 31% I/AAR der Kontrollgruppe auf 16% I/AAR der GPVI-Fc-Gruppe verdeutlichen den herausragenden Einfluss der Thrombozyten an der Entstehung des Infarktes, der in der Literatur ausführlich beschrieben wird (GAWAZ 2004). Es kann so postuliert werden, dass es möglich ist, über die Blockade des thrombozytären Kollagenrezeptors GPVI die initiale Thrombozytenadhäsion an durch die Ischämie geschädigtes Endothel sowie die anschließende Aktivierung der Blutplättchen zu vermindern. Dies schlägt sich letztendlich in der signifikant reduzierten Infarktgröße der Soluble-GPVI-Fc-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe nieder. Diese Theorie sollte jedoch durch weiterführende immunohistochemische und histologische Untersuchungen zur Darstellung der reduzierten Thrombozytenadhäsion im ischämischen Gewebereich sowie der erwarteten dezimierten Mikrothrombenbildung verifiziert werden.

Die Ligatur der linken Koronararterie an definierter Stelle des Mäuseherzens wurde schon 1978 etabliert und stellt seitdem ein häufig eingesetztes Modell zur Erzeugung eines artifiziellen Myokardinfarktes zur Untersuchung pathophysiologischer aber auch pharmakologischer Einflüsse dar (ZOLOTAREVA und KOGAN 1978; MICHAEL et al. 1995). Die geringgradigen Abweichungen der in der vorliegenden Studie erreichten Infarktgröße von den Ergebnissen anderen Versuchsgruppen lassen sich durch die unterschiedlichen Protokolle erklären: MICHAEL et al. (1995) erreichten AAR-Größen von ca. 42 % bei permanenter Ligatur und bis zu 45 % bei 30 min Ischämie und 24 h Reperfusion. Unsere AAR dagegen wurde mit 55 % des linken Ventrikels gemessen (30 min Ischämie und

24 h Reperfusion). MICHAEL et al. (1995) geben die erzeugten Infarktgrößen I/LV bei 30 min Ischämie und 24 h Reperfusion mit ca. 14 % an, I/AAR mit 34 %, wir erhalten Werte von I/LV von 17 % und I/AAR von 31 %. Diese Abweichungen v.a. in der Größe der AAR könnten auch auf minimale Unterschiede v.a. der Ligaturstellen der verschiedenen Operateure zurückgeführt werden. Die Bedeutung der genauen Positionierung der Ligatur beschreiben AHN et al. (2004) als essentiell, um einen genau definierten Infarktbereich zu erhalten. Auch die bereits angesprochenen Unterschiede im Narkoseregime (Pentobarbital intraperitoneal bei MICHAEL et al. (1995), MMF intraperitoneal kombiniert mit Isofluran-Inhalationsnarkose in vorliegender Studie) und der eingesetzten pharmakologischen Substanzen sind in der Lage die Infarktgröße zu beeinflussen.

4.2.3 Echokardiographie

In der vorliegenden Studie konnte kein signifikanter Unterschied in der echokardiographischen Messung der fractional shortening (FS) beider Gruppen vor (M1) und nach (M2) der induzierten Ischämie erzielt werden. Zum einen könnten während dieses frühen Stadiums (24 Stunden nach Infarkt) funktionelle Defizite der infarzierten Wand des linken Ventrikels durch die Hyperkontraktilität der gegenüberliegenden Wand ausgeglichen werden, zum anderen liegen die Myokardinfarkte aufgrund der geringen Größe nicht zwingend im Bereich der vorgegebenen standardisierten Schnittebene. Diese Vermutungen müssen durch spätere Messzeitpunkte nach der Ischämie/Reperfusion oder genauere Messmethoden belegt werden. Andere Untersuchungsparameter, wie z.B. die Messung der Ejektionsfraktion (EF) könnten in weiterführenden Versuchen verbesserte Ergebnisse liefern. Ebenso sollten in weiterführenden Studien Langzeitergebnisse der Kontraktionskraft und Funktionsfähigkeit des Herzens durchgeführt werden. Zum anderen stoßen diese Untersuchungen der FS wegen der Größe des Mäuseherzens an die technischen Grenzen der Echokardiographie. So geben SUEHIRO et al. (2001) die Erhebung der fractional area change (FAC), gemessen mit 2-D-Kontrast-Echokardiographie für brauchbarer an, als die Bestimmung der FS mit M-Mode-Echokardiographie, um die Funktion infarzierter Mäuseherzen nichtinvasiv zu bestimmen. Um die hier erhaltenen Ergebnisse weiter verifizieren zu können, sind also tiefergehende Untersuchungen mit anderen bildgebenden Verfahren, wie z.B. CT oder Kernspintomographie angebracht. Ebenso könnten hämodynamische Messungen, auf die hier aufgrund ihrer Invasivität verzichtet wurde, weitere Erkenntnisse liefern.

4.3 Schlussfolgerung und Ausblick

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, in einem Ischämie-Reperfuisionsmodell einen myokardialen Infarkt am murinen Herzen zu generieren. Weiter wurde demonstriert, dass durch intravenöse Applikation einer löslichen Form des thrombozytären Kollagenrezeptors GPVI (soluble GPVI-Fc) die Infarktgröße, im Vergleich zu Kontrolltieren, signifikant reduziert werden kann. Ursächlich für die Reduktion der Infarktgrößen gilt die Blockade der Kollagenbindungsstellen für GPVI durch soluble GPVI-Fc. Die der Adhäsion und Aktivierung der Thrombozyten an einer Endothelverletzung folgende Thrombus- und Mikrothrombenbildung distal des okkludierten Bereiches würde so unterbleiben. So würde das Ausmaß der auf die Ischämie folgenden Reperfusion soweit verbessert werden, dass eine deutliche Reduktion des durch Nekrose oder Apoptose untergegangenen Gewebes erreicht werden kann. Dieses Ergebnis verdeutlicht die bedeutende Rolle, die dem Thrombozyten im Infarktgeschehen im Allgemeinen und dem thrombozytären Kollagenrezeptor GPVI im Speziellen zukommt. Dies sollte jedoch durch weiterführende Untersuchungen, wie durch den histologischen Nachweis der verminderten Thrombozytenadhäsion, aber auch der Thromben bzw. Mikrothrombenbildung in distalen Gewebereichen verifiziert werden. Durch den Einsatz von soluble GPVI-Fc zeigt sich eine zusätzliche Möglichkeit für die antithrombotische Therapie: durch soluble GPVI-Fc kann die einer Ruptur der atherosklerotischen Plaque folgende Thrombusbildung reduziert werden. GRÜNER et al. (2005) konnten zeigen, dass sowohl soluble GPVI-Fc als auch Antikörper gegen GPVI eine Reduktion der Thrombozytenadhäsion und Aktivierung bewirken. Allerdings geht aus dieser Studie hervor, dass der antithrombotische Effekt des Antikörpers gegen GPVI signifikant höher ist als der von soluble GPVI-Fc. Jedoch wird hier der antithrombotische Effekt des Antikörpers gegen GPVI auch durch die ebenfalls erhöhte Blutungsneigung erkauft (GRÜNER et al. 2005). Allerdings unterlag das GPVI-Fc in der Studie von GRÜNER et al. (2005) einer anderen Klonierung, als das in vorliegender Studie verwendete GPVI-Fc-Protein. Aufgrund dieser Tatsache kann auch die Affinität der unterschiedlichen GPVI-Klone zu Kollagen differieren. Um die in vorliegender Studie am Mausmodell (30 Minuten Ischämie und 24 Stunden Reperfusion) gewonnenen Daten genauer verifizieren zu können, sind weiterführende immunohistochemische und histologische Untersuchungen der gewonnenen Proben sowie zusätzliche Ischämie-Reperfuisions-Modelle mit höheren Tierzahlen, an größeren Säugetieren, sowie Langzeitversuche notwendig, bevor an einen therapeutischen Einsatz des soluble GPVI-Fc am Menschen gedacht werden kann.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen des Wissenszuwachses der molekularen Pathophysiologie des Myokardinfarktes konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen Thrombozytenadhäsion an freiliegendes Kollagen der Gefäßwand, Thrombozytenaktivierung mit daraus resultierender Thrombembolisierung und schließlich Ausdehnung des durch die Ischämie geschädigten Bereiches besteht. GPVI wird in der aktuellen Literatur als der wesentliche thrombozytäre Oberflächenrezeptor für Kollagen beschrieben: durch die initiale Adhäsion über GPVI kommt es zur Thrombozytenaktivierung und zur Thrombusbildung.

Das Ziel dieser Studie war es zum einen, erstmals in einem murinen Ischämie-Reperfusionmodell den Einfluss des GPVI auf das Infarktgeschehen am Myokard zu untersuchen. Weiterhin sollte der therapeutische Nutzen des löslichen GPVI-Fc, einer löslichen klonierten Form des GPVI-Rezeptors, für die Therapie und Prophylaxe eines Myokardinfarktes im Tiermodell geprüft werden. Dazu wurde je einer Gruppe von 10 männlichen Mäusen des Stammes C57Bl/6J mit einem Körpergewicht von 20 bis 30 g eine Stunde prae-interventionell (intravenös) und 12 h (intraperitoneal) nach der künstlich hervorgerufenen Ischämie 100 µg lösliches GPVI-Fc bzw. Kontroll-Fc appliziert. Sodann wurden die Tiere mit MMF und zur Erhaltung mit Isofluran anästhesiert. Nach intratrachealer Intubation und lateraler interkostaler Thorakotomie im 4. Interkostalraum erhielten beide Gruppen für 30 Minuten eine partielle Myokardischämie durch vollständige Ligatur der linken Koronararterie. Nach 24 Stunden anschließender Reperusionsphase wurden die Tiere erneut anästhesiert, euthanasiert und die Herzen entnommen. Diese wurden mit 2,3,5-Triphenyltetrazolium-Chlorid (TTC) und Evansblue so gefärbt, dass Area at risk (AAR), Infarkt (I) und Area not at risk (AnAR) unterschieden werden können. Anschließend wurden die Herzen geschnitten und die ca. 1mm starken Schnitte photographiert, um die Infarktgröße planimetrisch zu bestimmen. Außerdem wurde die Herzfunktion beider Gruppen prae- und postoperativ echokardiographisch untersucht. Trotz gleichgroßer Area at risk beider Gruppen konnte in der Soluble-GPVI-Fc-Gruppe die planimetrisch ermittelte Infarktgröße I/AAR ($16,17 \pm 11,31\%$) gegenüber der Fc-Kontrollgruppe ($31,12 \pm 13\%$) signifikant (Signifikanzniveau $p=0,019$) reduziert werden. Bei der Echokardiographie war allerdings kein signifikanter Unterschied in der Herzfunktion beider Gruppen festzustellen. Die in dieser Studie erreichte Reduktion der Infarktgröße durch die beschriebene Intervention zeigt erstmals die Möglichkeit eines therapeutischen Nutzens für lösliches GPVI-Fc durch Blockade der initialen Thrombozytenadhäsion und Aktivierung der Thrombozyten für die Prävention und Behandlung des Myokardinfarktes auf.

6 SUMMARY

The influence of the collagen receptor GPVI on infarctsize in a myocardial ischemia-reperfusion-modell in mice

Research results of the molecular pathophysiology of myocardial infarction in the past show that there are pathophysiologic relations between platelet adhesion to free collagen of the vessel wall, platelet activation with resulting thrombembolism and finally the extension of ischemic areas.

In recent literature GPVI is described as the main thrombocytal receptor for collagen: the initial adhesion to GPVI leads to platelet activation and finally forming of a blood clot. One goal of this study was to evaluate the influence of GPVI on the development of myocardial infarction in a murine ischemic reperfusion model. Another goal was to test the therapeutical benefits of soluble GPVI-Fc, a soluble cloned type of the GPVI- receptor, for its use in therapy and prophylaxis of myocardial infarction based on an animal model.

Therefore a group of 10 male mice (C57BI/6J) weighing 20-30g was given soluble GPVI-Fc and a control-Fc in each case an hour preinterventional (intravenously) and 12 hours (intraperitoneal) after artificially caused ischemia. Anesthesia was induced in these animals with MMF and for maintenance we used Isofluran. After intratracheal intubation and lateral intercostal thoracotomy (between the 4th and the 5th costal bone) both groups underwent a partial myocardial ischemia through a complete ligation of the left coronary artery for 30 minutes . For the following 24 hours the hearts of the animals were reperfused. Then the animals were anaesthetized again, euthanized and their hearts taken. The organs were dyed with 2,3,5-Triphenyltetrazolium-chloride (TTC) and Evansblue, so that area at risk (AAR), site of infarction (I) and area not at risk (AnAR) could be differentiated. Afterwards the hearts were cut and photographs were taken of the 1mm thick pieces to determine the size of infarction. Additionally we examined the heart function in both groups echocardiographically before and after surgery. Despite the area at risk was the same size in both groups, the size of infarction I/AAR could be significantly ($p=0,019$) reduced in the soluble-GPVI-Fc group ($16,17\pm 11,31\%$) compared to the control-Fc group ($31,12 \pm 13 \%$). On the echocardiogram there was no significant difference in heartfunction of both groups. The reduction of the infarction size achieved in this study with the described interventional method shows for the first time possible therapeutical benefits in using soluble GPVI-Fc for blocking the initial platelet adhesion and activation to prevent and treat myocardial infarctions.

7 LITERATURVERZEICHNIS

ADAMS DH, SHAW S (1994)

Leukocyt-endothelial interactions and regulation of leukocyte migration

Lancet; 343: 831-836

AHN D, CHENG L, MOON C, SPURGEON H, LAKATTA EG, TALAN MI (2004)

Induction of myocardial infarcts of a predictable size and location by branch pattern probability-assisted coronary ligation in C57Bl/6 mice

Am J Physiol Heart Circ Physiol; 286: H1201-H1207

ALBERIO L, DALE GL (1999)

Platelet-collagen interactions: membrane receptors and intracellular signaling pathways

Eur J Clin Invest; 29; 1066-1076

MC ALPINE WA (1975)

The branches of coronary arteries

In: MC ALPINE WA (Ed) Heart and coronary arteries

Springer Verlag, Berlin, Heidelberg: 163-178

ANDRÉ P, DENIS CV, WARE J, SAFFARIPOUR S, HYNES RO, RUGGERI ZM, WAGNER DD (2000)

Platelets adhere to and translocate on von Willebrand factor presented by endothelium in stimulated veins

Blood; 96: 3322-3328

ANDREWS RK, GARDINER EE, ASAZUMA N, BERLANGA O, TULASNE D, NIESWAND B, SMITH AI, BERNDT MC, WATSON SP (2001)

A novel viper venom metalloprotease, Alborhagin, is an agonist at the platelet collagen receptor GPVI

J Biol Chem; 276: 28092-28097

ANDREWS RK (1999)

The glycoprotein Ib-IX-V complex in platelet adhesion and signaling

Thromb Haemost; 82: 357-364

ANDREWS RK, LÓPES JA, BERNDT MC (1997)

Molekular mechanisms of platelet adhesion and activation

Int J Biochem Cell Biol; 29: 91-105

ANTIPLATELET TRIALISTS COLLABORATION (1994)

Collaborative overview of randomized trials of antiplatelet therapy, I: prevention of death, myocardial infarction and stroke by prolonged antiplatelet therapy in various categories of patients

BMJ; 308: 81-106

LITERATURVERZEICHNIS

ASAZUMA N, MARSHALL SJ, BERLANGA O, SNELL D, POOLE AW, BERNDT MC, ANDREWS RK, WATSON SP (2001)

The snake venom toxin alboaggregin-A activates glycoprotein VI
Blood; 97: 3989-3991

ASSELIN J, GIBBINS JM, ACHISON M, HAN LEE Y, MORTON LF, FARNDAL R, BARNES MJ, WATSON SP (1997)

A Collagen-Like Peptide Stimulates Tyrosine Phosphorylation of syk and Phospholipase C γ 2 in Platelets Independent of the Integrin α 2 β 1
Blood; 89: 1235-1242

AZHAR G, GAO W, LIU L, WEI JY (1999)

Ischemia-reperfusion in the adult mouse heart. Influence of age
Exp Geront; 34: 699-714

BAKER GR, SULLAM PM, LEVIN J (1997)

A simple, fluorescent method to internally label platelets suitable for physiological measurement
Am J Hematol; 56: 17-25

BAPTISTA CAC, DIDIO LJA, PRATES JC (1991)

Types of the division of the left coronary artery and the ramus diagonalis of the human heart
Jpn Heart J; 32: 323-335

BAUMGARTNER HR (1977)

Platelet interaction with collagen fibrils in flowing blood. I. Reaction of human platelets with alpha chymotrypsin-digested subendothelium
Thromb Haemost; 37: 1-16

BECKER KD, GOTTSCHALL KR, CHIEN KR (1996)

Strategies for studying cardiovascular phenotypes in genetically manipulated mice
Hypertension; 27: 495-501

BEHNKE O (1970)

A comparative study of microtubules of disk shaped blood cells
J Ultrastruct Res; 3: 61-75

BEHNKE O, FORER A (1998)

From megakaryocytes to platelets. Platelet morphogenesis takes place in the bloodstream
Eur J Haematol; 60: 3-24

BERGER G, MASSÉ JM, CRAMER EM (1996)

Alpha-granule membrane mirrors the platelet plasma membrane and contains the glycoproteins I b I X and V
Blood; 87: 1385-1395

LITERATURVERZEICHNIS

BOERSMA E, AKKERHUIS KM, THÉROUX P, CALIFF RM, TOPOL EJ, SIMOONS ML (1999)

Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor inhibition in non-ST-elevation acute coronary syndromes

Circulation; 100: 2045-2048

BRASS LF, HOXIE JA, MANNING DR (1993)

Signaling through G-proteins and G-protein-coupled receptors during platelet activation

Thromb Haemost; 70: 217-223

BRASS LF, MOLINO M (1997)

Protease activated G-protein-coupled receptors on human platelets and endothelial cells

Thromb Haemost; 78: 234-241

BROBERG CS, PANTELY GA, BARBER BJ, MACK GK, LEE K, THIGPEN T, DAVIS LE, SAHN D, HOHIMER AR (2003)

Validation of the myocardial performance index by echocardiography in mice: a noninvasive measure of left ventricular function

J Am Soc Echocardiogr; 16: 814-823

CAPRIE Steering Committee (1996)

A randomized, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischemic events (CAPRIE)

Lancet; 384: 1329-1339

CASON BA, GAMBERL AK, SLOCUM RE, HICKEY RF (1997)

Anesthetic-induced preconditioning: previous administration of isoflurane decreases myocardial infarct size in rabbits

Anesthesiology; 87: 1182-1190

CHEN H, LOCKE D, LIU Y, LIU C, KAHN ML (2002)

The platelet receptor GPVI mediates both adhesion and signaling responses to collagen in a receptor density-dependent fashion

J Biol Chem; 277: 3011-3019

CHEN H, KAHN ML (2003)

Reciprocal signaling by integrin and nonintegrin receptors during collagen activation of platelets

Mol Cell Biol; 23: 4764-4777

CLEMETSON KJ (1999)

Platelet collagen receptors: a new target for inhibition?

Haemostasis; 29: 16-26

CLEMETSON KJ, CLEMETSON JM (2001)

Platelet collagen receptors

Thromb Haemost; 86: 189-197

LITERATURVERZEICHNIS

CLEMETSON KJ, Mc GREGOR JL, JAMES E, DECHAVANNE M, LUSCHER EF (1982)
Charakterization of the platelet membrane glycoprotein abnormalities in Bernard-Soulier syndrome and comparison with normal by surface-labeling techniques and high-resolution two-dimensional gel electrophoresis
J Clin Invest; 70: 304-311

CLEMETSON JM, POLGAR J, MAGNENAT E, WELLS T, CLEMETSON KJ (1999)
The platelet collagen receptor Glycoprotein VI is a member of the immunoglobulin superfamily closely related to FC α R and the natural killer receptors
J Biol Chem; 274: 29019-29024

COLLER BS, SCUDDER LE, BEER J, GOLD HK, FOLTS JD, CAVAGNARO J, JORDAN R, WAGNER C, IULIUCCI J, KNIGHT D (1991)
Monoclonal antibodies to platelet glycoproteinIIb/IIIa as antithrombotic agents.
Ann NY Acad Sci; 614:193-213

COLLINS KA, KORCARZ CE, LANG RM (2003)
Use of echocardiography for the phenotypic assessment of genetically altered mice
Physiol Genomics; 13: 227-239

CONTI CR, MEHTA JL (1987)
Acute myocardial ischemia: role of arteriosklerosis, thrombosis, platelet activation, coronary vasospasm and altered arachidonic acid metabolism
Circulation; 75: V84-V95

CROFT SA, SAMANI NJ, TEARE MD, HAMPTON KK, STEEDS RP, CHANNER KS, DALY ME (2001)
Novel platelet membrane glycoprotein VI dimorphism is a risk factor for myocardial infarktion.
Circulation; 104: 1459-1463

DAVIES MJ, THOMAS AC (1985)
Plaque fissuring – the cause of acute myocardial infarktion, sudden ischaemic death and crescendo angina
Br Heart J; 53: 363-373

DAVIES TA, DROTTS DL, WEIL GJ, SIMOMS ER (1989)
Cytoplasmatic ca²⁺ is necessary for thrombin-induced platelet activation
J Biol Chem; 264: 19600-19606

DHALLA NS, ELMOSELHI AB, HATA T, MAKINO N (2000)
Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injuri
Cardiovasc Res; 3: 446-456

LITERATURVERZEICHNIS

DÖRMANN D, CLEMETSON JM, NAVDAEV A, KEHREL BE, CLEMETSON KJ (2001)
Alboaggregin A activates platelets by a mechanism involving glycoprotein VI as well as glycoprotein Ib
Blood; 97: 929-936

EISING GP, HAMMOND HK, HELMER GA, GILPIN E, ROSS J Jr. (1994)
Force-frequency relation during heart failure in pigs
Am J Physiol; 267: H2516-H2522

EZUMI Y, UCHIYAMA T, TAKAYAMA H (2000)
Molecular cloning, genomic structure, chromosomal localisation, and alternativ splice forms of the platelet collagen receptor glycoprotein VI
Biochem Biophys Res Commun; 277; 27-36

EZUMI Y, SHINDOH K, TSUJI M (1998)
Physical and functional association of the Src family kinases Fyn and Lyn with the collagen receptor glycoprotein VI-Fc receptor gamma chain complex on human platelets
J Exp Med; 188: 267-276

FALET H, BARKALOW KL, PIVNIOK VI, BARNES MJ, GEHA RS, HARTWIG JH (2000)
Roles of SLP-76 phosphoinositide 3-kinase and gelsolin in the platelet shape changes initiated by the collagen receptor GPVI/FcRy-chain complex
Blood; 96: 3786-3792

FALK E (1983)
Plaque rupture with severe pre-existing stenosis precipitating coronary thrombosis. Characteristics of coronary atherosclerotic plaques underlying fatal occlusiv thrombi
Br Heart J; 50: 127-134

FERRARI R, CECONI C, CURELLO S, GUARNIERI C (1985)
Oxygen-mediated myocardial damage during ischemia and reperfusion: Role of the cellular defences against oxygen toxicity
J Mol Cell Cardiol; 17: 937-945

FIOLET JW, BAARTSCHEER A, SCHUMACHER CA, CORONEL R, WELLE FH (1984)
The change of the free energy of ATP hydrolysis during global ischemia and anoxia in the rat heart: Its possible role in thr regulation of transsarcolemmal sodium and potassium gradients
J Mol Cell Cardiol; 16: 1023-1036

FUSTER V, BADIMON L, BADIMON JJ, CHESEBRO JH (1992)
The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndroms
N Engl J Med; 326: 242-250

FUSTER V, FAYAD ZA, BADIMON JJ (1999)
Acute coronary syndroms: biology
Lancet; 353 Suppl. 2: SII5-SII9

LITERATURVERZEICHNIS

- GALLET C, ROSA JP, HABIB A, LEBRET M, LÉVY-TOLÉDANOS S, MACLOUF J (1999)
Tyrosine phosphorylation of cortactin associated with syk accompanies thromboxane analogue-induced platelet shape change
J Biol Chem; 274: 23610-23616
- GAO XM, DART AM, DEWAR E, JENNINGS G, DU XJ (1999)
Serial echocardiographic assessment of left ventricular dimensions and functions after myocardial infarction in mice
Cardiovasc Res; 45: 330-338
- GARDIN JM, SIRI FM, KITSIS RN, EDWARDS JG, LEINWAND LA (1995)
Echocardiographic assessment of left ventricular mass and systolic funktion in mice
Circulation; 76:907-914
- GAWAZ M (1999)
Das Blutplättchen: Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Wirkstoffe und antithrombozytäre Therapie bei koronarer Herzerkrankung
G. Thieme-Verlag, Stuttgart; New York
- GAWAZ M (2004)
Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium
Cardiovasc Res; 61: 498-511
- GEORGE JN (2000)
Platelets
Lancet; 355: 1531-1539
- GIBBINS JM, ASSELIN J, FARNDALES R, BARNES M, LAW CL, WATSON SP (1996)
Tyrosine phosphorylation of the Fc receptor γ -chain in collagen-stimulated platelets
J Biol Chem; 271: 18095-18099
- GIBBINS JM, OKUMA M, FARNDALE R, BARNES M, WATSON SP (1997)
Glycoprotein VI is the collagenrezeptor in platelets which underlies tyrosine phosphorylation of the Fc receptor γ -chain
FEBS Lett.; 413: 255-259
- GOTO S, TAMURA N, HANDA S, ARAI M, KODAMA K, TAKAYAMA H (2002)
Involvement of glycoprotein VI on both collagen and von willebrand factor surfaces under flow conditions
Circulation; 106: 266-272
- GROSS BS, MELFORD SK, WATSON SP (1999)
Evidence that phospholipase C- γ 2 interacts with SLP-76 LAT and the Fc receptor γ -chain after stimulation of the collagen receptor glycoprotein VI in human platelets
Eur J Biochem; 263: 612-623

LITERATURVERZEICHNIS

GRÜNER S, PROSTREDNA M, KOCH M, MIURA Y, SCHULTE V, JUNG SM, MOROI M, NIESWANDT B (2005)

Relative antithrombotic effect of soluble GPVI dimer versus anti-GPVI antibodies in mice
Blood; 105: 492-1499

HARKEN AH, SIMSON MB, HASELGROVE J, WETSTEIN L, HARDEN III WR, BARLOW CH (1981)

Early ischemia after complete coronary ligation in the rabbit, dog, pig and monkey
Am J Physiol; 241: H 202-210

HARTWIG JH (1992)

Mechanisms of actin rearrangements mediating platelet activation
J Cell Biol; 118: 1421-1442

HEARSE DJ (1994)

Myocardial ischemia: can we agree on a definition for the 21st century?
Cardiovasc Res; 28: 1737-1744

HENKE J, ERHARDT W (2004)

Nager

In: ERHARDT W, HENKE J, HABERSTROH J (Hrsg)

Anästhesie und Analgesie bei Klein- und Heimtieren

Schattauer: Stuttgart, New York: 642-663

HIRSH J, DALEN JE, FUSTER V, HARKER L, PATRONO C, ROTH GJ (1995)

Aspirin and other platelet-active drugs: the relationship between dose, effectiveness and side-effects

Chest; 108 (suppl): S247-S257

HOIT BD, KHOURY SF, KRANIAS EG, BALL N, WALSH RA (1995)

In vivo echocardiographic detection of enhanced left ventricular function in gene-targeted mice with phospholamban deficiency

Circ Res; 77: 632-637

HOLME PA, ØRVIM U, GINSBERG JS, HAMERS MJ, SOLUM NO, BROSSTAD FR, BARSTAD RM, SAKARIASSEN KS (1997)

Shear-induced platelet activation and platelet microparticle formation at blood flow conditions as in arteries with a severe stenosis

Arterioscler Thromb Vasc Biol; 17: 646-653

HORT W (2001)

Pathologie des akuten Herzinfarktes

Internist; 42: 631-640

ICARDO JM, COLVEE E (2001)

Origin and course of the coronary arteries in normal mice and iv/iv mice

J Anat; 199: 473-482

LITERATURVERZEICHNIS

JACKSON SP, MISTRY N, YUAN Y (2001)

Platelets and the injured vessel wall: rolling into action, focus on glycoprotein Ib-V-IX and the platelet cytoskeleton

Trends Cardiovasc Med; 10: 192-197

JACKSON SP, NESBITT WS, KULKARNI S (2003)

Signaling events underlying thrombus formation

Thromb Haemost; 1: 1602-1612

JAMES JF, HEWETT ET, ROBBINS J (1998)

Cardiac physiology in transgenic mice

Circ Res; 82: 407-415

JANDROT-PERRUS M, BUSFIELD S, LAGRUE AH, XIONG X, DEBILI N, CHICKERING T, LE COUEDIC JP, GOODEARL A, DUSSAULT B, FRASER C, VAINCHENKER W, VILLEVAL JL (2000)

Cloning, characterization and functional studies of human and mouse glycoprotein VI: a platelet-specific collagen receptor from the immunoglobulin superfamily

Blood; 96: 1798-1807

JANDROT-PERRUS M, LAGRUE AH, OKUMA M, BON C (1997)

Adhesion and activation of human platelets induced by convulxin involve glycoprotein VI and integrin $\alpha_2\beta_1$

J Biol Chem; 272: 27035-27041

JARVIS GE, ATKINSON BT, SNELL DC, WATSON SP (2002)

Distinct roles of GPVI and integrin $\alpha_2\beta_1$ in platelet shape change and aggregation induced by different collagens

Br J Pharmacol; 137: 107-117

JENNINGS RB, SCHAPER J, HILL HM, STEENBERGER CJr, REIMER KA (1985)

Effect of reperfusion late in the phase of reversible ischemic injury. Changes in cell volume, electrolytes metabolites and ultrastructure

Circ Res; 56(2): 262-278

JENNINGS RB, SOMMERS HM, SMYTH GA, FLACK HH, LINN H (1960)

Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog

Arch Pathol; 70: 68-78

KAMIGUTI AS, HAY CRM, ZUZEL M (1996)

Inhibition of collagen-induced platelet aggregation as the result of cleavage of $\alpha_2\beta_1$ -integrin by the snake venom metalloproteinase jararhagin

Biochem J; 320: 635-641

LITERATURVERZEICHNIS

KANNO S, LERNER DL, SCHUESSLER RB, BETSUYAKU T, YAMADA KA, SAFFITZ JE, KOVACS A (2002)

Echocardiographic evaluation of ventricular remodeling in a mouse model of myocardial infarction

J Am Soc Echocardiogr; 15; 601-609

KASS DA, MAUGHAN WL, CIUFFO A, GRAVES W, HEALY B, WEISFELDT ML (1988)

Disproportionate epicardial dilatation after transmural infarction of the canine left ventricle: acute and chronic differences

Am Coll Cardiol; 11: 177-185

KATO K, KANAJI T, RUSSEL S, KUNICKI T, FURIHATA K, KANAJI S, MARCHESE P, REININGER A, RUGGERI ZM, WARE J (2003)

The contribution of glycoprotein VI to stable platelet adhesion and thrombus formation illustrated by targeted gene deletion

Blood; 102; 1701-1707

KEELY PJ, PARISE LV (1996)

The $\alpha 2\beta 1$ integrin is a necessary co-receptor for collagen-induced activation of $\alpha 2\beta 1$ and the subsequent phosphorylation of phospholipase $C\gamma 2$ in platelets

Biol Chem; 271: 26668-26676

KEHREL B, KRONENBERG A, RAUTERBERG J, NIESING-BRESCH D, NIEHUIS U, KARDOEUS J, SCHWIPPERT B, TSCHOPE D, VAN DE LOO J, CLEMETSON KJ (1993)

Platelets deficient in glycoprotein IIIb aggregate normally to collagen typ I and II not to collagen typ V

Blood; 82: 3364-3370

KEHREL B, WIERWILLE S, CLEMETSON KJ, ANDERS O, STEINER M, KNIGHT CG, FARNDAL RW, OKUMA M, BARNES MJ (1998)

Glycoprotein VI is a major collagen receptor for platelet activation it recognizes the platelet-activating quaternary structure of collagen whereas CD36 glycoprotein IIb/IIIa and von Willebrand factor do not

Blood; 91: 491-499

KNIHGHT DE, NIGGLI V, SCRUTTON MC (1984)

Thrombin and activators of protein kinase C modulate secretory responses of permeabilised human platelets induced by Ca^{2+}

Eur J Biochem: 143; 437-446

KROLL MH, HELLUMS JD, McINTIRE LV, SCHAFFER AI, MOAKE JL (1996)

Platelets and shear stress

Blood; 88: 1525-1541

LITERATURVERZEICHNIS

KROLL MH, SCHAFFER AI (1989)

Biochemical mechanisms of platelet activation
Blood; 74: 1181-1195

KURRELMEYER KM, MICHAEL LH, BAUMGARTEN G, TAFFET GE, PESCHON JJ, SIVASUBRAMANIAN N, ENTMAN ML, MANN DL (2000)

Endogenous tumor necrosis factor protects the adult cardiac myocyte against ischemic-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction
PNAS; 97: 5456-5461

LADUNSKI M, FRELIN C, VIGNE P (1985)

The sodium / hydrogen exchange system in cardiac cells: its biochemical and pharmacological properties and its role in regulating internal concentrations of sodium and internal pH
J Mol Cell Cardiol; 17: 1029-1042

LEMOS JA de, ANTMAN EM, GIBSON M, McCABE CH, GIUGLIANO RP, MURPHY SA, COULTER SA, ANDERSON K, SCHERER J, FREY MJ, VAN DER WIEKEN R, VAN DE WERF F, BRAUNWALD (2000)

Abciximab improves both epicardial flow and myocardial reperfusion in ST-elevation myocardial infarction. Observations from the TIMI 14 trial
Circulation; 101: 239-243

LIAO JK (1998)

Endothelium and acute coronary syndroms
Clin Chem; 44:8 B 1799-1808

LIN MC, ROCKMAN HA, CHIEN KR (1995)

Heart and lung disease in engineered mice
Nat Med; 1: 749-751

MANN KG, KRISHNASWAMY S, LAWSON JH (1992)

Surface dependent hemostasis
Semin Hematol; 29: 213-226

MANNING KL, MC DONALD TP (1997)

C3H mice have larger spleens lower platelet counts and shorter platelet lifespans than C57BL mice. An animal model for the study of hypersplenism
Exp Hematol; 25: 1019-1024

MARBAN E, KORETSUME Y, CORETTI M, CHACKO VP, KUSUOKA H (1989)

Calcium and its role in myocardial cell injury during ischemia and reperfusion
Circulation; 80: Suppl IV17-IV22

LITERATURVERZEICHNIS

MASAKI H, IMAIZUMI T, ANDO S, HIROOKA Y, HARADA S, MOMOHARA M, NAGANO M, TAKESHITA A (1993)

Production of chronic congestive heart failure by rapid ventricular pacing in the rabbit
Cardiovasc Res; 27: 828-831

MASSBERG S, ENDERS G, LEIDERER R, EISENMENGER S, VESTWEBER D, KROMBACH F, MESSMER K (1998)

Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of p-selektin
Blood; 92: 507-515

MASSBERG S, ENDERS G, DE MELO MATOS FC, DOMSCHKE TOMIC LI, LEIDERER R, EISENMENGER S, MESSMER K, KROMBACH F (1999)

Fibrinogen deposition at the postischemic vessel wall promotes platelet adhesion during ischemia-reperfusion in vivo
Blood; 94: 3829-3838

MASSBERG S, GAWAZ M, GRÜNER S, SCHULTE V, KONRAD I, ZOLNHOFER D, HEINZMANN U, NIESWANDT B (2003 a)

A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo
J Exp Med; 197: 41-49

MASSBERG S, KONRAD I, BÜLTMANN A, SCHULZ C, MÜNCH G, PELUSO M, LORENZ M, SCHNEIDER S, BESTA F, MÜLLER I, HU B, LANGER H, KREMMER E, RUDELIUS M, HEINZMANN U, UNGERER M, GAWAZ M (2003 b)

Soluble glycoprotein VI dimer inhibits platelet adhesion and aggregation to the injured vessel wall in vivo
FASEB J express article; 10.1096/fj.03.0464.fje

MATTHEW NL (1989)

Role of calcium in arrhythmogenesis
Circulation; 80 Suppl IV: IV23-IV30

MEHTA P (2002)

Aspirin in the prophylaxis of coronary artery disease.
Curr Opin Cardiol; 17: 552-558

MICHAEL LH, ENTMAN ML, HARTLEY CJ, YOUKER KA, ZHU J, HALL SR, HAWKINS HK, BERENS K, BALLANTYNE CM (1995)

Myocardial ischemia and reperfusion a murine model
J Physiol; 269: H2147-H2154

MIKI T, LIU GS, COHEN MV, DOWNEY JM (1998)

Mild hyperthermia reduces infarkt size in the rabbit heart: a practical intervention for acute myocardial infarction?
Basic Res Cardiol; 93: 372-383

LITERATURVERZEICHNIS

- MIURA Y, TAKAHASHI T, JUNG SM, MOROI M (2002)
Analysis of the interaction of platelet collagen receptor glycoprotein VI (GPVI) with collagen. A dimeric form of GPVI, but not the monomeric form, shows affinity to fibrous collagen
J Biol Chem; 277: 46197-46204
- MOROI M, JUNG SM (1997)
Platelet receptors for collagen
Thromb Haemost; 78: 439-444
- MOROI M, JUNG SM (2004)
Platelet glycoprotein VI: its structure and function
Thromb Res; 114: 221-233
- MOROI M, JUNG SM, OKUMA M, SHINMYOZU K (1989)
A patient with platelets deficient in glycoprotein VI that lack both collagen-induced aggregation and adhesion
J Clin Invest; 84: 1440-1445
- MOROI M, JUNG SM, SHINMYOZU K, TOMIYAMA Y, ORDINAS A, DIAZ-RICART M (1996)
Analysis of platelet adhesion to a collagen-coated surface under flow conditions: the involvement of glycoprotein VI in the platelet adhesion
Blood; 88: 2081-2092
- NAKAMURA T, JAMIESON GA, OKUMA M, KAMBAYASHI J, TANDON NN (1998)
Platelet adhesion to native collagen fibrils. Role of GPVI in divalent cation-dependent and -independent adhesion and thromboxane A₂ generation
J Biol Chem; 273: 4338-4344
- NAKAMURA T, KAMBAYASHI J, OKUMA M, TANDON NN (1999)
Activation of the GP IIb-IIIa complex induced by platelet adhesion to collagen is mediated by both $\alpha 2\beta 1$ integrin and GP VI
J Biol Chem; 274: 11897-11903
- NIESWANDT B, BERGMEIER W, SCHULTE V, RACKEBRANDT K, GESSNER J E, ZIRNGIBEL H (2000)
Expression and function of the mouse collagen receptor glycoprotein VI is strictly dependent on its association with the FcR γ chain
J Biol Chem; 275: 23998-24002
- NIESWANDT B, BRAKEBUSCH C, BERGMEIER W, SCHULTE V, BOUVARD D, MOKHTARI-NEJAD R, LINDHOU T, HEEMSKERK JWM, ZIRNGIBEL H, FÄSSLER R (2001 a)
Glycoprotein VI but not $\alpha 2\beta 1$ integrin is essential for platelet interaction with collagen
EMBO J; 20: 2120-2130

LITERATURVERZEICHNIS

NIESWANDT B, SCHULTE V, BERGMEIER W, MOKHTARI-NEJAD R, RACKEBRANDT K, CAZENAVE J P, OHLMANN P, GACHET C, ZIRNGIBEL H (2001 b)

Long-term antithrombotic protection by in vivo depletion of platelet glycoprotein VI in mice
J Exp Med; 193: 459-469

NIESWANDT B, WATSON S P (2003)

Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor?

Blood; 102: 449-461

NIEUWENHUIS HK, AKKERMAN JWN, HOUDIJK WPM, SIXMA JJ (1985)

Human blood platelets showing no response to collagen fail to express surface glycoprotein Ia

Nature; 318: 470-472

OFFERMANN S, TOOMBS CF, HU YH, SIMON ML (1997)

Defective platelet activation in Gaq-deficient mice

Nature; 389: 183-186

OLLIKAINEN E, MIKKELSON J, PEROLA M, PENTTILÄ A, KARHUNEN PJ (2004)

Platelet membrane collagen receptor glycoprotein VI polymorphism is associated with coronary thrombosis and fatal myocardial infarction in middle-aged men

Atherosclerosis; 176: 95-99

PACKHAM MA (1994)

Role of platelets in thrombosis and hemostasis

J Physiol Pharmacol; 72: 278-284

PAIGEN K (1995)

A miracle enough: the power of mice

Nat Med; 1: 215-220

PASQUET JM, BOBE R, GROSS B, GRATACAP MP, TOMLINSON MG, PAYRASTRE B, WATSON SP (1999 a)

A collagen-related peptide regulates phospholipase C γ 2 via phosphatidylinositol 3-kinase in human platelets

Biochem J; 342: 171-177

PASQUET JM, GROSS B, QUEK L, ASAZUMA N, ZHANG W, SOMMERS CL, SCHWEIGHOFER E, TYBULEWICZ V, JUDD B, LEE JR, KORETZKY G, LOVE PE, SAMELSON LE, WATSON SP (1999 b)

Lat is required for tyrosine phosphorylation of phospholipase C γ 2 and platelet activation by the collagen receptor GPVI

Mol Cell Biol; 19: 8326-8334

LITERATURVERZEICHNIS

PATTEN RD, ARONOVITZ MJ, BRIDGMAN P, PANDIAN NG (2002)
Use of pulse wave and color flow doppler echocardiography in mouse models of human disease
Am Soc Echocardiogr; 15: 708-714

PEERSCHKE EIB (1985)
The platelet fibrinogen receptor
Semin Hematol; 22: 241-259

PIDARD D, FRELINGER AL, BOUILLOT C, NURDEN AT (1991)
Activation of the fibrinogen receptor on human platelets exposed to alpha chymotrypsin. Relationship with a major proteolytic cleavage at the carboxyterminus of the membrane glycoprotein IIb heavy chain
Eur J Biochem; 200: 437-447

PIWNICA-WORMS D, JACOB R, HORRES CR, LIEBERMANN M (1985)
Na/H exchange in cultured chick heart cells: pH regulation
J Gen Physiol; 85: 43-64

POLGÁR J, CLEMETSON JM, KEHREL BE, WIEDEMANN M, MAGNENAT EM, WELLS TNC, CLEMETSON KJ (1997)
Platelet activation and signal transduction by convulxin, a c-type lectin from crotalus durissus terrificus (tropical rattlesnake) venom via the p62/GPVI receptor
J Biol Chem; 272: 13576-13583

POLLICK C, HALE SL, KLONER RA (1995)
Echocardiographic and cardiac doppler assessment of mice
J Am Soc Echocardiogr; 8: 602-610

POOLE A, GIBBINS JM, TURNER M, VUGT VAN MJ, WINKEL VAN DE JGJ, SAITO T, TYBULEWICZ WATSON SP (1997)
The Fc receptor γ -chain and the tyrosine kinase Syk are essential for activation of mouse platelet by collagen
EMBO; 16: 2333-2341

POULSEN-NAUTRUP C, TOBIAS R (1998)
Herz
In: POULSEN-NAUTRUP C, TOBIAS R, (Eds.), Atlas und Lehrbuch der
Ultraschalldiagnostik bei Hund und Katze
Schlütersche, Hannover; 127-164

QUEK LS, PASQUET JM, HERS I, CORNALL R, KNIGHT G, BARNES M, HIBBS ML, DUNN AR, LOWELL CA, WATSON S (2000)
Fyn and Lyn phosphorylate the Fc receptor γ chain downstream of glycoprotein VI in murine platelets, and Lyn regulates a novel feedback pathway
Blood; 96: 4247-4253

LITERATURVERZEICHNIS

REIMER KA, JENNINGS RB (1992)

Myocardial ischemia, hypoxia and infarction

In: FOZZARD HA, HABER E, JENNINGS RB, KATZ AM, MORGAN HE, editors. The heart and cardiovascular system. New York: Raven Press, 1992: 1875-1973

RIEDE UN, SCHAEFER HE (1993)

Arterien

In: RIEDE UN, SCHAEFER HE (Eds.), Allgemeine und spezielle Pathologie, 3. Aufl., G. Thieme-Verlag, Stuttgart, New York, 436-441

RINK TJ, SAGE SO (1990)

Calcium signaling in human platelets

Annu Rev Physiol; 52: 431-449

ROSS R (1993)

The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s

Nature; 362: 801-809

ROTH DM, SWANEY JS, DALTON ND, GILPIN EA, ROSS Jr. J (2002)

Impact of anesthesia on cardiac function during echocardiography in mice

Am J Physiol Heart Circ Physiol; 282: H2134-2140

ROTH GJ (1991)

Developing relationships: arterial platelet adhesion glycoprotein Ib and leukine-rich glycoproteins

Blood; 77: 5-19

ROTTMANN JN, NI G, KHOO M, WANG Z, ZHANG W, ANDERSON ME, MADU EC (2003)

Temporal changes in ventricular function assessed echocardiographically in conscious and anesthetized mice.

J Am Soc Echocardiogr; 16: 1150-1157

RUAN C, DESTELLE G, WANG Z, WAN H, HE Y, CHENG D, LI P, DUFFAS M (1989)

Ticlopidine in china: comparative study on the effect of two dose levels on bleeding time and platelet function in healthy volunteers

Haemostasis; 19: 94-99

RUFFER MA (1911)

On arterial lesions found in Egyptian mummies (1580 B.C.-525 A.D.)

J Pathol Bact; 15: 453-462

RUGGERI ZM (1997)

Mechanisms initiating platelet thrombus formation

Thromb Haemost; 78: 611-616

LITERATURVERZEICHNIS

RUGGERI ZM (2002)

Platelets in atherothrombosis

Nat Med; 8: 1227-1234

RUGGERI ZM (2003)

Von Willebrand factor platelets and endothelial cell interactions

Thromb Haemost; 1: 1335-1342

RYO R, YOSHIDA A, SUGANO W, YASUNAGA M, SAIGO K, ADACHI M,
YAMAGUCHI N, OKUMA M (1992)

Deficiency of P62 a putative collagen receptor in platelets from a patient with defective collagen-induced platelet aggregation

Hematol; 39: 25-31

SALTO-TELLEZ M, LIM SY, EL OAKLEY RM, TANG TPL, ALMSHERQI ZAM, LIM
SK (2004)

Myocardial infarction in the C57BL/6 mouse. A quantifiable and highly reproducible experimental model

Card Path; 13: 91-97

SANTORO SA (1986)

Identifikation of a 160 000 dalton platelet membran protein that mediates the initial divalent cation-dependent adhesion of platelets to collagen

Cell; 46: 913-920

SANTORO SA, WALSH JJ, STAAZT WD, BARANSKI KJ (1991)

Distinct determinations on collagen support $\alpha_2\beta_1$ integrin-mediated platelet adhesion and platelet activation

Cell Regul; 2: 905-913

SCHAPER W, DE BRABANDER M, LEWI P (1971)

DNA synthesis and mitoses in collateral vessels of the dog

Circ Res; 28: 671-679

SCHERRER-CROSBIE M, STEUDEL W, ULLRICH R, HUNZIKER PR, LIEL-COHEN N,
NEWELL J, ZAROFF J, ZAPOL WM, PICARD MH (1999)

Echocardiographic determination of risk area size in a murine model of myocardial ischemia

Am J Physiol; 277: H986-H992

SCHMITT A, GUICHARD J, MASSÉ JM, DEBILI N, CRAMER EM (2001)

Of mice and men comparison of the ultrastructure of megakaryocytes and platelets

Exp Hematol; 29: 1295-1302

SCHUMMER A (1984)

Organe des Kreislaufes, Herz

In: NICKEL R, SCHUMMER A, SEIFERLE E (Eds.), Lehrbuch der Anatomie der Haustiere
2. Aufl., Paul Parey, Berlin, 17-75

LITERATURVERZEICHNIS

SIMPSON PJ, LUCCHESI BR (1987)

Free radicals and myocardial ischemia and reperfusion injury
J Lab Clin Med; 110: 13-30

SIXMA JJ, ZANTEN VAN GH, HUIZINGA EG, PLAS VAN DER RM, VERKLEY M, WU YP, GROS P, GROOT DE PG (1997)

Platelet adhesion to collagen: an update
Thromb Haemost; 78: 434-438

SMITH CW (1993)

Leukocyte-endothelial cell interactions
Semin Hematol; 4 : Suppl 4: 45-53

STAATZ WD, RAJPARA SM, WAYNER EA, CARTER WG, SANTORO SA (1989)

The membrane glycoprotein Ia-I_b (VLA-2) complex mediates the Mg⁺⁺-dependent adhesion of platelets to collagen
Cell Biol; 108: 1917-1924

STARY HC, CHANDLER AB, GLAGOW S, GUYTON JR, INSULL W, ROSENFELD ME, SCHAFFER SA, SCHWARTZ CJ, WAGNER WD, WISSLER RW (1994)

A definition of initial, fatty streak and intermediate lesions of atherosclerosis
Circulation; 89: 2462-2478

STEENBERGEN C, MURPHY E, LEVY L, LONDON RE (1987)

Elevation in cytosolic free calcium concentration early in myocardial ischemia in perfused rat heart
Circ Res; 60: 700-707

STEINHELPER ME, COCHRANE KL, FIELD LJ (1990)

Hypotension in transgenic mice expressing atrial natriuretic factor fusion genes
Hypertension; 16: 301-307

STEMMER P, WISLER PL, WATANABE AM (1992)

Isolated myocytes in experimental cardiology
In FOZZARD HA, HABER E, JENNINGS RB, KATZ AM. editors. The heart and cardiovascular system. New York: Raven Press, 1992: 387-404

STENBERG PE, LEVIN J (1989)

Mechanisms of platelet production
Blood Cells; 15: 23-57

STONE D, DARLEY-USMAR V, SMITH DR, O'LEARY V (1989)

Hypoxia-reoxygenation induced increase in cellular Ca²⁺ in myocytes and perfused hearts: the role of mitochondria
J Mol Cell Cardiol; 21: 963-973

LITERATURVERZEICHNIS

STRAUER BE (2001)
Akuter Myokardinfarkt
Internist; 42: 629-630

SUEHIRO K, TAKUMA S, SHIMIZU J, HOZUMI T, YANO H, CARDINALE C,
DiTULLIO MR, WANG J, SMITH CR, BURKHOFF D, HOMMA S (2001)
Assessment of left ventricular systolic function using contrast two-dimensional
echocardiography with a high-frequency transducer in the awake murine model of myocardial
infarction
Jpn Circ J; 65: 979-83.

SUGIYAMA T, OKUMA M, USHIKUBI F, SENSAKI S, KANAJI K, UCHINO H (1987)
A novel platelet aggregating factor in a patient with defective collagen-induced platelet
aggregation and autoimmune thrombocytopenia
Blood; 69: 1712-1720

SUZUKI-INOUE K, TULASNE D, SHEN Y, BORI-SANZ T, INOUE B, JUNG SM,
MOROI M, ANDREWS RK, BERNDT MC, WATSON SP (2002)
Association of Fyn and Lyn with the proline-rich domain of glycoprotein VI regulates
intracellular signaling
J Biol Chem; 277: 21561-21566

TAFFET GE, HARTLEY CJ, WEN X, PHAM T, MICHAEL H, ENTMAN ML (1996)
Noninvasive indexes of cardiac systolic and diastolic function in hyperthyroid and senescent
mouse
Am J Physiol Heart Circ Physiol; 39: H2204-H2209

TAKUMA S, SUEHIRO K, CARDINALE C, HOZUMI T, YANO H, SHIMIZU S,
MULLIS-JANSSON S, SCIACCA R, WANG J, BURKHOFF D, DI TULLIO MR, HOMMA
S (2001)
Anesthetic inhibition in ischemic and nonischemic murine heart: comparison with conscious
echocardiographic approach
Am J Physiol Heart Circ Physiol; 280: H2364-H2370

TAN TP, GAO X, KRAWCZYSYN M, FENG X, KIRIAZIS H, DART AM, DU X (2003)
Assessment of cardiac function by echocardiography in conscious and anesthetized mice:
Importance of the autonomic nervous system and disease state
J Cardiovasc Pharmacol; 42: 182-190

TANAKA N, DALTON N, MAO L, ROCKMAN HA, PETERSON KL, GOTTSCHALL KR,
HUNTER JJ, CHIEN KR, ROSS J (1996)
Transthoracic echocardiography in models of cardiac disease in the mouse
Circulation; 94: 1109-1117

LITERATURVERZEICHNIS

TANAKA K, LUDWIG LM, KROLIKOWSKI JG, ALCINDOR D, PRATT PF, KERSTEN JR, PAGEL PS, WARLTIER DC (2004)

Isolfurane produces delayed preconditioning against myocardial ischemia and reperfusion injury: role of cyclooxygenase-2
Anaesthesiology; 100: 525-531

TANDON NN, KRALISZ U, JAMIESON GA (1989)

Identification of glycoprotein IV (CD36) as a primary receptor for platelet-collagen adhesion
J Biol Chem; 264: 7576-7583

TÖNDURI G (1981)

Angewandte und topographische Anatomie, 5. Aufl.,
Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 55-76

VALETTAS N, HERRMANN HC (2003)

The role of platelets and platelet inhibition in acute myocardial infarction
Coronary Artery Disease; 14: 357-363

VANE JR, ANGGARD EE, BOTTIN RM (1990)

Regulatory functions of the vascular endothelium
N Engl J Med; 323: 27-36

VORCHHEIMER DA, FUSTER V (1998)

Oral platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonists: the present challenge is safety
Circulation; 97: 312-314

VAN DER WAL AC, BECKER AE, VAN DER LOOS CM, DAS PK (1994)

Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterised by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology
Circulation; 89: 36-44

WATSON SP (1999)

Collagen receptor signaling in platelets and megakaryocytes
Thromb Haemost; 82: 365- 376

WATSON SP, BERLANGA O, BEST D, FRAMTON J (2000)

Update on a collagen receptor interactions in platelets: is the two-state model still valid?
Platelets; 11: 252-258

WATSON SP, GIBBINS J (1998)

Collagen receptor signalling in platelets extending the role of the ITAM
View Immunol Today; 19: 260-226

WEIG HJ, BOTT-FLÜGEL L, STÄDELE C, HEUER M, KNOTE K, GREWE D, LAUGWITZ KL, SEYFARTH M (unveröffentlicht)

Reduktion der Infarktgröße in vivo durch den Gαq-knock-out in der Maus

LITERATURVERZEICHNIS

WILNER GD, NOSSEL HL, LEROY EC (1968)
Aggregation of platelets induced by collagen
J Clin Invest; 47: 2616-2621

WU JC, NASSERI BA, BLOCH KD, PICARD MH, SCHERRER-CROSBIE M (2003)
Influence of sex on ventricular remodeling after myocardial infarction in mice
Echocardiogr; 16: 1158-1162

YANG XP, LIU YH, RHALEB NE, KURIHARA N, KIM HE, CARRETERO OA (1999)
Echocardiographic assessment of cardiac function in conscious and anesthetized mice
Am J Physiol; 277: H1967-H1974

YTHERHUS K (2000)
The ischemic heart experimental models
Pharmacol Res; 42: 193-203

ZHENG YM, LIU C, CHEN H, LOCKE D, RYAN JC, KAHN ML (2001)
Expression of the platelet receptor GPVI confers signaling via the Fc receptor γ -chain in response to the snake venom convulxin but not to collagen
J Biol Chem; 276: 12999-13006

ZIMMER HG (1998)
The isolated perfused heart and its pioneers
News Physiol Sci; 13: 203-210

ZOLOTAREVA AG, KOGAN ME (1978)
Production of experimental occlusive myocardial infarction in mice
Cor Vasa; 20: 308-314

8 TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Thrombozytenwerte Mensch und Maus
(nach SCHMITT et al. 2001).....31

Tab. 2: Übersicht Versuchsplan.....34

Tab. 3: Übersicht Ergebnisse.....49

9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Blutfluss bei intaktem Endothel und Hämostase bei Gefäßwandverletzung
(nach GAWAZ 2004).....4

Abb. 2: Form und Zellorganellen ruhender und aktivierter Thrombozyten
(GEORGE 2000).....6

Abb. 3: “two-step, two-site model”
(Santoro et al. 1991).....9

Abb. 4: modifiziertes “two-step, two-site model”
(Watson et al. 2000).....9

Abb. 5: Thrombozyten: nicht aktivierter Zustand: diskoide Form, aktivierter Zustand:
Echinosphärozyten
([http://www.platelet page](http://www.platelet.page)).....11

Abb. 6: Einfluss der Thrombozyten auf die Ischämie
(modifiziert nach GAWAZ 2004).....14

Abb. 7: Kollagenrezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche
(nach CLEMETSON 1999).....15

Abb. 8: Aufbau des GlykoproteinVI-FcR γ -chain-Komplexes
(nach NIESWANDT und WATSON 2003).....18

Abb. 9: Signalkaskade der GPVI-FcR γ -chain-Komplex-Aktivierung
(ALBERIO und DALE 1999).....19

Abb. 10: Aktin-Zytoskelett eines aktivierten Blutplättchens
(FALET et al. 2000).....21

Abb. 11: Struktur von soluble GPVI-Fc-Protein und Fc-Kontroll-Protein.....22

Abb. 12: soluble GPVI-Fc bindet an freiliegendes Kollagen
(MASSBERG 2003).....22

Abb. 13: Verlauf der linken Koronararterie mit unterschiedlichen Bifurkationstypen am
Mäuseherzen (MICHAEL et al. 1995).....28

Abb. 14: Aufsicht aus chirurgischer Sicht auf die linke Koronararterie der Maus
(Ahn et al. 2004).....29

Abb. 15: a) Maus-Thrombozyten b) Thrombozyten vom Mensch
(SCHMITT et al. 2001).....30

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 16: Lagerung zur Echokardiographie auf einer Vorlaufstrecke.....	36
Abb. 17: Sonographische und schematische Darstellung des linken Ventrikels eines Mäuseherzens, Kurzachsenschnitt (Schema modifiziert nach POULSEN NAUTRUP und TOBIAS (1998).....	37
Abb. 18: Lagerung zur Tracheotomie.....	39
Abb. 19: Beatmung über einen Trachealtubus.....	40
Abb. 20: Ligatur der linken Koronararterie, unterlegt mit einem Polyethylen-Schlauch.....	42
Abb. 21: Darstellung des ischämischen Bereiches durch Perfusion des durchbluteten Bereiches mit Evans blue.....	42
Abb. 22: Skizze der Herzschnitte.....	46
Abb. 23: TTC und Evans blue gefärbter, mit Scion Image planimetrierter Herzschnitt.....	47
Abb. 24: Mittelwerte Infarkt zu AAR.....	50
Abb. 25: Mittelwerte Infarkt zu linkem Ventrikel.....	51
Abb. 26: Mittelwerte AAR zu linkem Ventrikel.....	52
Abb. 27: Mittelwerte linker Ventrikel zu Gesamtfläche.....	53
Abb. 28: Vergleich der Infarktgrößen in TTC und Evans Blue gefärbten Herzquerschnitten von GPVI-Fc und Fc-Kontrolle, Schnitt 1 bis 3.....	54
Abb. 29: Mittelwerte der echokardiographischen Messung M1 (vor OP) und M2 (nach OP) der GPVI-Fc-Gruppe und der Fc-Kontroll-Gruppe.....	55

10 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

- °C	Grad Celsius
- µg	Mikrogramm
- µl	Mikroliter
- µm	Mikrometer
- µM	Mikromol
- %	Prozent
- A.	Arteria
- AAR	area at risk
-AAR/LV	Verhältnis area at risk zu linkem Ventrikel
- Abb.	Abbildung
- ADP	Adenosindiphosphat
- AnAR	area not at risk
- AS	Aminosäure
- ATP	Adenosintriphosphat
- bzw.	beziehungsweise
- ca.	circa
- cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
- cm	Zentimeter
- D	Deutschland
- DAG	1,2-Diacylglycerol
- d.h.	das heißt
- DNA	Desoxyribonukleinsäure
- EDRF	endothelium derived relaxing factor
- EF	Ejektionsfraktion
- et al.	et altera
- Fa.	Firma
- FAC	fractional area change
- fl	Femtoliter (µm ³)
- FS	fractional shortening
- g	Gramm
- GDP	Guanosindiphosphat
- GES	Herz gesamt

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

- GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
- GP	Glykoprotein
- GPVI	Glykoprotein VI
- GTP	Guanosintriphosphat
- h	Stunde (hour)
- HG	Herzgewicht
- I	Infarkt
- I/AAR	Verhältnis Infarkt zu area at risk
- I/LV	Verhältnis Infarkt zu linkem Ventrikel
- Ig	Immunglobulin
- IP	Inositol 1,4,5-trisphosphat (IP ₃)
- i.v.	intra venös
- kDa	Kilodalton
- kg	Kilogramm
- KG	Körpergewicht
- LAD	left anterior descending coronary artery
- LAT	linker for activation of T-cells
- LV	linker Ventrikel
- LV/GES	Verhältnis linker Ventrikel zum Gesamtherzen
- LV EDD	enddiastolischer Durchmesser des linken Ventrikels
- LV ESD	endsystolischer Durchmesser des linken Ventrikels
- M.	Musculus
- M1	Messung 1
- M2	Messung 2
- mg	Milligramm
- MHz	Megahertz
- Mio.	Million
- ml	Milliliter
- Mm.	Musculi
- mm	Millimeter
- MMF	antagonisierbare Narkose aus Midazolam Medetomidin und Fentanyl
- M-Mode	Motion-Mode
- MW	Mittelwert

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

- NaCl	Natriumchlorid
- NO	Stickstoffmonoxid
- p	Irrtumswahrscheinlichkeit
- pH	pH-Wert = negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
- PIP	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP ₂)
- PLC	Phospholipase C
- R.	Ramus
- RNA	Ribonukleinsäure
- SD	Standardabweichung (standard deviation)
- sin.	sinistra/sinister
- SLP76	SH2-domain-containing-leucocyte-protein-76
- Src-Kinase	rous sarcoma oncogen kinase (in rous sarcoma virus erstmalig entdeckt)
- s.u.	siehe unten
- Syk	spleen tyrosine kinase (Tyrosin: Y)
- Tab.	Tabelle
- TB	Tibiallänge
- TTC	2,3,5-Triphenyltetrazolium-Chlorid
- vWF	von-Willebrand-Faktor
- Y	Tyrosin
- z.B.	zum Beispiel

11 DANKSAGUNG

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. vet. B. Kaspers danke ich für die Übernahme der Arbeit an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwigs-Maximilians-Universität München, für seine Hilfsbereitschaft und die stets freundliche Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes gilt mein Dank Herrn Univ.-Prof. Dr. med. B. Gänsbacher, Direktor des Instituts für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der Technischen Universität München.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. M. Gawaz danke ich für die Überlassung des Themas und seine freundliche Unterstützung.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. med. vet. Dr. med. habil. W. Erhardt für seine jederzeit gewährte lebenswürdige Hilfe und Aufmunterung und für seine enorme Geduld bei der Durchsicht des Manuskriptes.

Der Arbeitsgruppe um Priv. Doz. Dr. med. M. Seyfart, Dr. med. H.J. Weig und Dr. med. L. Bottflügel sei herzlichst gedankt für die anregenden Diskussionen und die Hilfestellung während der Arbeit an dem gemeinsamen Projekt. Ganz besonders Herrn Dr. med. H.-J. Weig danke ich für die gute Zusammenarbeit und Geduld bei der Durchsicht des Manuskriptes, sowie Herrn Dr. med. L. Bottflügel für die Erstellung der Statistik.

Ganz besonders herzlich gedankt sei Herrn Dr. med. vet. C. Städele für die gelungene Zusammenarbeit, seine jederzeit geleistete freundliche Beratung und seine wertvolle Hilfestellung bei der Durchführung des gemeinsamen Projekts und nicht zuletzt für seine gewissenhafte Durchsicht des Manuskripts und seine konstruktive Kritik.

Herzlichen Dank auch an Frau D. Grewe und Herrn M. Heuer für die vielen Tipps und die nette und freundschaftliche Zusammenarbeit.

Ebenso möchte ich Frau B. Hjálmarsdóttir ganz herzlich für die gemeinsame Bewältigung diverser Computerprobleme und ihre unendlichen Motivationskünste danken.

Ein herzliches Dankeschön gilt auch allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung, insbesondere Frau Dr. med. vet. J. Henke, Frau Dr. med. vet. C. Michaelis, Frau G. Wexel, Frau Pichotka, Frau Hertel, Frau Pohlheimer, Frau Leuz, Jaqueline und Manuel, sowie allen Tierpflegern.

Frau Dr. med. vet. U. Stegemann, Frau K. Winter und Herrn E. v. Trauwitz danke ich für die Motivation, die verständnisvolle Unterstützung und liebevolle Betreuung während der Arbeit.

Dr. med. vet. A. Vogel danke ich ganz, ganz herzlich für die vielen schlaflosen Nächte und den gesteigerten Leidensdruck als Anstoß diese Arbeit zu übernehmen.

All meinen Freunden danke ich für den lebenswürdigen Beistand und die sehr große Geduld.

Meinen Eltern möchte ich speziell für die finanzielle Unterstützung danken. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

12 LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Name	Karen Knote
Geburtstag	24. November 1974
Geburtsort	München
Staatsangehörigkeit	deutsch

SCHULAUSBILDUNG

09/1981 – 08/1985	Grundschule Camerloherstrasse, München
09/1985 – 07/1994	Gymnasium Pullach, Pullach bei München
01. 07. 1994	Allgemeine Hochschulreife

BERUFSAUSBILDUNG

11/1994 – 07/1996	Ausbildung zur Arzthelferin Orthopädische Praxis Dr. Schmidt/Münch/Mayr
11/1996 – 08/2002	Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
12. 08. 2002	Abschluss des III. Staatsexamens
05. 09. 2002	Approbation zur Tierärztin
ab 01. 07. 2003	Experimentelle Promotionsarbeit im Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforchung der Technischen Universität München

BERUFLICHE TÄTIGKEIT

11/1994 – 07/1996	Azubi Arzthelferin Orthopädie-Praxis Dr. Schmidt/Münch/Mayr, München
08/1996 – 09/1999	Arzthelferin (Teilzeit, s. v.)
11/2002 – 06/2003	Assistenzärztin Tierärztliche Klinik Dr. Achim Vogel, Nürnberg
09/2004 – 03/2005	wissenschaftl. Mitarbeiterin des Instituts für Experimentelle Onkologie und Therapieforchung der Technischen Universität München