

Myokardiale Ischämie und Reperfusion am Beispiel des thrombozytenspezifischen *Knockouts* des CXCR7 Chemokinrezeptors

von Jessica Sudmann

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

**Myokardiale Ischämie und Reperfusion am Beispiel des
thrombozytenspezifischen *Knockouts* des CXCR7
Chemokinrezeptors**

von Jessica Sudmann

aus Bergheim

München 2019

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Lehrstuhl für Anatomie, Histologie und Embryologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Priv.-Doz. Dr. Sven Reese

Angefertigt in der Medizinischen Klinik III für Kardiologie und
Kreislauferkrankungen
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

Mentor: Prof. Dr. med. Meinrad Gawaz

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

Dekan: **Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.**

Berichterstatter: **Priv.-Doz. Dr. Sven Reese**

Korreferent/en: **Prof. Dr. Gerhard Wess**

Univ.-Prof. Dr. Bernd Kaspers

Univ.-Prof. Dr. Heidrun Potschka

Univ.-Prof. Dr. Cornelia A. Deeg

Tag der Promotion: 27. Juli 2019

Widmung

Meiner Familie, meinem Baby und dem besten Mann der Welt.

Vielen Dank für Eure Unterstützung, aufbauenden Worte und ruhenden Gelassenheit.

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis	I
1 Einleitung	1
2 Schrifttum	3
2.1 Der akute Myokardinfarkt.....	3
2.1.1 Entstehung des akuten Myokardinfarktes	3
2.1.2 Diagnose und Einteilung des akuten Myokardinfarktes.....	5
2.1.3 Pathophysiologie im Myokard nach akutem Myokardinfarkt.....	7
2.1.4 Myokardialer Ischämie/Reperfusions-Schaden (IRI = ischemia/reperfusion injury, myocardial reperfusion injury)	11
2.1.5 Therapie des akuten Myokardinfarktes	13
2.2 Myokardiale Ischämie und Reperfusion im Mausmodell	15
2.2.1 Pathophysiologie der Ischämie und Reperfusion im murinen Modell	15
2.3 Thrombozyten und ihre Funktion bei der Hämostase	17
2.4 Thrombozyten und ihre Rolle beim Geschehen der myokardialen Ischämie und Reperfusion.....	21
2.5 Thrombozytäre Chemokinrezeptoren und Chemokine	24
2.6 Der thrombozytäre CXCR7 Rezeptor	26
3 Eigene Untersuchungen	29
3.1 Ziele der Arbeit	29
3.2 Material	31
3.2.1 Geräte	31
3.2.2 Gebrauchsgegenstände	32
3.2.3 Reagenzien und Chemikalien.....	35
3.2.4 Rezepte: Lösungen und Puffer	37
3.2.5 Färbelösungen	39

INHALTSVERZEICHNIS

3.2.6	Antikörper und rekombinante Proteine	39
3.2.7	Medikamente und Infusionslösungen.....	42
3.2.8	Software.....	43
3.3	Methoden	44
3.3.1	Versuchstiere und Haltungsbedingungen	44
3.3.2	Myokardiale Ischämie und Reperfusion – Etablierung eines Protokolls zur Induktion der myokardialen Ischämie im Mausmodell.....	45
3.3.2.1	Anwendung des 3R Prinzips auf die bestehende Methodik.....	45
3.3.2.2	Darstellung des Operationsablaufes (nach den 3R Prinzipien).....	52
3.3.2.3	Evaluierung der Ischämie nach 24 Stunden Reperfusion	55
3.3.3	Myokardiale Ischämie und Reperfusion im <i>Knockout</i> Modell	59
3.3.3.1	Durchführung der Versuche	59
3.3.3.2	Histologische Untersuchungen.....	60
3.3.3.3	Durchflusszytometrische Messung von Thrombozyten- Leukozyten-Aggregaten nach Ischämie und Reperfusion	64
3.3.4	Phänotypisierung der Pf4-Cre CXCR7 <i>Knockout</i> -Tiere und Charakterisierung der Thrombozytenfunktion	66
3.3.4.1	Generierung des thrombozytenspezifischen Knockouts von CXCR7 und Validierung des Zuchterfolges	66
3.3.4.2	Allgemeines Protokoll zur Isolation von murinen Thrombozyten....	68
3.3.4.3	Validierung des thrombozytenspezifischen Knockouts mittels Western Blot.....	69
3.3.4.4	Bestimmung der Thrombozytenzahl und des Platelet Large Cell Ratio	70
3.3.4.5	Bestimmung der Blutungszeit	70
3.3.4.6	Ex vivo Thrombusformation mit murinem Vollblut.....	71

INHALTSVERZEICHNIS

3.3.4.7	Rezeptorenbesatz und Aktivierbarkeit der Thrombozyten in der Durchflusszytometrie	71
3.3.5	Versuche mit Thrombozytenüberständen.....	73
3.3.5.1	Monozytenmigration mit Thrombozytenüberständen.....	73
3.3.5.2	Multipanel Analyse (Legendplex) von Thrombozytenüberständen.....	75
3.4	Statistische Messverfahren.....	75
4	Ergebnisse	76
4.1	Evaluierung der myokardialen Ischämie und Reperfusion im Mausmodell nach Anwendung der 3R Prinzipien	76
4.2	Myokardiale Ischämie und Reperfusion im <i>Knockout</i> Modell	84
4.2.1	Auswertung des Infarktes	84
4.2.2	Auswertung der Herzultraschalldaten	86
4.2.3	Auswertung der Histologie: Hämatoxylin Eosin Färbung	87
4.2.4	Auswertung der Immunhistologie	89
4.2.5	Auswertung der Plasmaproben.....	95
4.2.5.1	Ergebnisse des cTroponin I ELISA.....	95
4.2.5.2	Ergebnisse der LEGENDplex Messung	96
4.2.6	Auswertung des Aktivierungsgrades der Thrombozyten 24 h post Ischämie.....	96
4.2.7	Auswertung der Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate 24 h post Ischämie.....	97
4.3	Der Pf4-Cre <i>Knockout</i> von CXCR7 hat keinen Einfluss auf die Zuchtleistung.....	99
4.4	Phänotypisierung des Pf4-Cre CXCR7 <i>Knockouts</i> und Charakterisierung der Thrombozytenfunktion	100
4.4.1	Der Pf4-Cre <i>Knockout</i> von CXCR7 hat keine Auswirkungen auf Größe und Gewicht der Tiere	100

4.4.2 Isolierte Thrombozyten Pf4-Cre positiver CXCR7 Mäuse zeigen im Western Blot kein detektierbares CXCR7.....	100
4.4.3 Thrombozytenzahl und -größe der Pf4-Cre CXCR7 <i>Knockout</i> -Tiere sind unverändert	101
4.4.4 Die Blutungszeit der Pf4-Cre CXCR7 <i>Knockout</i> -Tiere ist unverändert ...	102
4.4.5 Der Pf4-Cre CXCR7 <i>Knockout</i> zeigt eine vermehrte Thrombusbildung in der <i>ex vivo</i> Thrombusformation.....	102
4.4.6 CXCR7 defiziente Thrombozyten besitzen einen normalen Rezeptorenbesatz.....	103
4.4.7 CXCR7 defiziente Thrombozyten zeigen eine erhöhte Aktivierbarkeit ...	104
4.5 Analyse der Thrombozytenüberstände CXCR7 defizienter Thrombozyten	107
4.5.1 Chemotaktischer Effekt der Thrombozytenüberstände	107
4.5.2 Aktivierte Thrombozytenüberstände von Pf4-Cre CXCR7 <i>Knockout</i> -Tieren zeigen ein proinflammatorisches Chemokin- und Zytokinprofil...	109
5 Diskussion.....	110
5.1 Mausmodell und Fragestellung	110
5.2 Myokardiale Ischämie und Reperfusion und Charakterisierung der postischämischen Immunantwort im <i>Knockout</i> Modell.....	111
5.2.1 Größerer myokardialer Schaden nach I/R bei Pf4-Cre CXCR7 ^{-/-}	114
5.2.2 Lokale Inflammation im infarzierten Myokard bei Pf4-Cre CXCR7 ^{-/-}	116
5.2.3 Verstärkte CD62P vermittelte Zellinteraktion nach myokardialer Ischämie und Reperfusion und systemische Inflammation bei Pf4-Cre CXCR7 ^{-/-}	120
5.3 Phänotypisierung der Pf4-Cre CXCR7 <i>Knockout</i> -Tiere und Charakterisierung der Thrombozytenfunktion	124
5.4 Schwierigkeiten bei der Phänotypisierung der Pf4-Cre CXCR7 <i>Knockout</i> -Tiere und Charakterisierung der Thrombozytenfunktion.....	129

INHALTSVERZEICHNIS

5.5	Schlussfolgerung und Ausblick	131
6	Zusammenfassung.....	133
7	Summary	135
8	Tabellenverzeichnis	137
9	Abbildungsverzeichnis	139
10	Literaturverzeichnis	143
11	Anhang	157
12	Danksagung.....	163

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

4 x	4-fach
10 x	10-fach
20 x	20-fach
40 x	40-fach
A.	Arteria
Aar	area at risk; gefährdeter, infarzierter Bereich
ACD	Acid-Citrate-Dextrose
ADP	Adenosindiphosphat
ACKR3	Atypical Chemokine Receptor 3, Synonym für CXCR7
Akt	Protein Kinase B
Anh.	Anhang
APC	Allophycocyanin
ApoE	Apolipoprotein E
APS	Activated platelet supernatant
ATP	Adenosintriphosphat
Aqua dest.	Aqua destillata, destilliertes Wasser
B-Mode	Brightness modulation
BSA	Bovines Serum Albumin
β-TG	β-Thromboglobulin
Ca	Calcium
CD	Cluster of differentiation
CK(-MB)	Creatinkinase (-Isoenzym MB, Creatinkinase-Myokardtyp)
Cmkor1	Chemokin orphan receptor 1, Synonym CXCR7
Cre	Cyclization recombination oder causes recombination

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

CRP	Collagen Related Peptide
cTnI	kardiales Troponins I
CXCR7	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 7
DAB	3,3-Diaminobenzidin-tetra-hydrochlorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EF	Ejection Fraction, Ejektionsfraktion, Auswurfffraktion
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid, Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzym-linked Immuno Sorbent Assay
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FS	Fractional Shortening, Fraktionelle Verkürzung, Verkürzungsfraktion
GP	Glykoprotein
GPR159	G-protein coupled receptor 159, Synonym CXCR7
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
HSC	Hematopoetic stem cells
ICR	Intercostalraum
IL	Interleukin
Inf	Infarkt
i.p.	Intra peritoneal
I-TAC	Interferon-inducible T cell α -chemoattractant, Synonym CXCL11
IVSd/s	Interventricular septum in diastole/systole
K	Kalium
KGW	Kilogram weight, Kilogramm Körpergewicht
LAD	Left anterior coronary artery

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

LoxP	Locus of X-over P1
LV	Left ventricle, linker Ventrikel
LVAWd/s	Left ventricular anterior wall in diastole/systole
LVEDD/LVEDV	Left ventricular end-diastolic dimension/volume, linksventrikulärer enddiastolischer/es Durchmesser/Volumen
LVESD/LVESV	Left ventricular end-systolic dimension/volume, linksventrikulärer endsystolischer/es Durchmesser/Volumen
LVIDd/s	Left ventricular internal dimension in diastole/systole
LVPWd/s	Left ventricular posterior wall in diastole/systole
M	Molar
MAP	Mitogen-activated protein
MCP-1	Monozyten-chemotaktisches Protein 1
MFI	Mean fluorescence intensity
MHC II	Major histocompatibility complex II
MI	Myokardinfarkt
M-Mode	M- oder TM-Mode = motion oder time motion-Mode
MPV	Mean platelet volume
Na	Natrium
NET	Neutrophil extracellular traps
NSTEMI	non-ST elevation myocardial infarction, Nicht ST-Strecken-Hebungs-Myokardinfarkt
OP	Operation
PBS	Phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBST	Phosphate buffered saline with Tween, Phosphat-gepufferte Salzlösung mit Tween
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

PE	Phycoerythrin
PEEP	Positive end expiratory pressure
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
Pf4	Platelet factor-4, Plättchen-Faktor-4
PLA	Platelet leukocyte aggregates, Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate
PPCI	Primäre perkutane koronare Intervention
PRP	Platelet rich plasma
PSLAX	Parasternal long axis
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rdc1	G-protein coupled receptor RDC1 homolog, Synonym CXCR7
RPS	Resting platelet supernatant
RT	Raumtemperatur
SAX	Short axis
s.c.	Sub cutis, sub cutan
SDF-1	Stromal-cell derived factor, Synonym CXCL12
SEM	standard error of the mean, Standardfehler
STAT3/Stat3	Signal transducers and activators of transcription 3
STEMI	ST-elevation myocardial infarction, ST-Strecken-Hebungs-Myokardinfarkt
SV	Schlagvolumen
TNF-α	Tumor Necrosis Factor-alpha, Tumornekrosefaktor-α
TTC	Triphenyltetrazoliumchlorid
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VWF	Von-Willebrand-Faktor

1 EINLEITUNG

Derzeit leiden in der EU etwa 49 Millionen an einer Erkrankung des Herz-Kreislauf-Systems und verursachen damit Kosten in Höhe von 210 Milliarden Euro jährlich (Wilkins E, 2017). Jedes Jahr sterben 1,8 Millionen Menschen an den Folgen von kardiovaskulären Erkrankungen, was 37% aller Todesfälle in der EU entspricht (Wilkins E, 2017). Der Tod aufgrund von kardiovaskulären Erkrankungen ist damit die häufigste Todesursache in Europa. Die Hauptformen der kardiovaskulären Erkrankungen sind die ischämische Herzerkrankung (IHD, ischaemic heart disease oder KHK, koronare Herzkrankheit) und der Schlaganfall (Stroke).

Im Allgemeinen spricht man bei der koronaren Herzkrankheit (KHK) von einer Manifestation der Atherosklerose an den Herzkranzgefäßen (Koronararterien). Die Verkalkung der inneren Schicht der Arterienwände der Koronararterien ist ein chronischer Prozess, der durch verschiedene Risikofaktoren wie genetische Faktoren, Bluthochdruck, Adipositas, Störungen des Fettstoffwechsels, Rauchen und/oder Diabetes beeinflusst wird. Als häufigste Komplikation und damit häufigste Todesursache einer KHK ist der akute Myokardinfarkt (ischämische Herzerkrankung) zu nennen. Mit 862.000 Todesfällen beim Mann (19%) und 877.000 Todesfällen bei den Frauen (20%) führt die ischämische Herzerkrankung die Liste der Todesursachen in Europa an (Wilkins E, 2017).

Aus der aktuellen Datenlage ergibt sich demnach eine große Relevanz der kardiovaskulären Forschung. Durch die Verwendung genetisch veränderter Tiermodelle für die Grundlagenforschung ist es in den letzten Jahrzehnten zunehmend möglich geworden, neue Erkenntnisse bezüglich der Entstehung der koronaren Herzkrankheit zu gewinnen. Einen großen Anteil im Verständnis der Atherosklerose hat dabei die Generierung der Apo E *Knockout* Maus geliefert (Getz & Reardon, 2016). Diese wurde 1992 von zwei Laboren (Breslow und Maeda) erstmals beschrieben (Piedrahita, Zhang, Hagaman, Oliver, & Maeda, 1992; Plump et al., 1992; Zhang, Reddick, Piedrahita, & Maeda, 1992).

Doch nicht nur die Erforschung der Entstehung der koronaren Herzkrankheit ist von wissenschaftlichem Interesse, auch die mögliche Behandlung einer vorhandenen Erkrankung sowie die Therapie nach stattgefundenem Myokardinfarkt sind von großer

Bedeutung. Um die pathologischen Vorgänge des akuten Myokardinfarktes besser zu verstehen und mögliche Therapien zu entwickeln wurde bereits 1954 ein Modell zur Induktion der myokardialen Ischämie beschrieben (Johns & Olson, 1954). Dieses wurde über die letzten Jahrzehnte vielfach verändert (Oliver Borst et al., 2011; Curaj, Simsekylmaz, Staudt, & Liehn, 2015; Salto-Tellez et al., 2004; Q. Sun et al., 2018; J. Wang et al., 2006).

In der vorliegenden Arbeit wird sowohl auf ein genetisches *Knockout* Modell als auch auf die Methodik der Induktion der myokardialen Ischämie zurückgegriffen. Mittels der Charakterisierung eines genetischen *Knockout* Modells und der Erkenntnisse aus den Ergebnissen des akuten Myokardinfarktes erwarten wir uns ein grundlagenbasiertes Verständnis der Mechanismen des thrombozytären CXCR7 Chemokinrezeptors und seine Rolle bei der akuten Entzündungsreaktion nach Ischämie und Reperfusion.

2 SCHRIFTTUM

2.1 Der akute Myokardinfarkt

2.1.1 Entstehung des akuten Myokardinfarktes

Beim Menschen tritt der akute Myokardinfarkt (MI) meist infolge eines thrombotischen Verschlusses der Koronarterien auf, dessen Ursache arteriosklerotische Veränderungen der Koronargefäße sind (Gawaz, 2004). Die Thrombose entsteht in der Regel im Verlauf der fortgeschrittenen Arteriosklerose durch eine Ruptur eines arteriosklerotischen Plaques (Gelfand & Cannon, 2007).

Die Ursache des plötzlich auftretenden Infarktes ist demnach die Arteriosklerose, in deren Folge der akute Myokardinfarkt die häufigste Komplikation einer koronaren Herzkrankheit (KHK, IHD = ischaemic heart disease) darstellt (Moran et al., 2012). Die Arteriosklerose ist eine chronische Erkrankung der Herzkranzgefäße (Koronararterien), bei der es zu Einlagerungen innerhalb der Intima der Gefäße mit Cholesterinestern, anderen Fetten und Entzündungszellen kommt. Die Gefäßwand durchfährt dadurch eine massive Umgestaltung. Folge des chronischen Verlaufs ist eine Rigidität des Gefäßes und ein arteriosklerotischer Plaque, der lumenwärts zu einer Engstelle (Stenose) bis hin zu einem vollständigen Verschluss (Okklusion) führen kann (Chilton, 2004; Otsuka, Yasuda, Noguchi, & Ishibashi-Ueda, 2016). Bei Ruptur des Plaques wird dieser mit dem Blutstrom in das arterielle Versorgungsgebiet der Koronararterie gespült und es kommt zum akuten Myokardinfarkt. Insgesamt sind dreiviertel der Herzinfarkte auf eine Plaqueruptur zurückzuführen (von Scheidt et al., 2017).

Meistens betrifft der akute Myokardinfarkt den linken Ventrikel (LV), wobei je nach Umfang des Infarktes eine Ausdehnung bis hin zum rechten Ventrikel (RV) und die Vorhöfe erfolgen kann. Bei einer Obstruktion der linken Koronararterie (bzw. des Ramus interventricularis anterior = RIVA, engl.: LAD = left anterior descending artery) spricht man von einem Vorderwandinfarkt (Moore et al., 2019). Große linksventrikuläre Infarkte können ebenfalls eine Beeinträchtigung der Funktion des rechten Ventrikels bewirken, was wiederum mit einer höheren Komplikationsrate und erhöhtem Sterblichkeitsrisiko einhergeht (Ørn, Cleland, Romo, Kjekshus, & Dickstein, 2005). Ein rechtsventrikulärer Infarkt (Hinterwandinfarkt) liegt vor, wenn die rechte Koronararterie oder der Ramus

circumflexus der linken Koronararterie (RCX) obstruiert sind (Kakouros & V Cokkinos, 2010; Ondrus et al., 2013).

Die Ausdehnung des Infarktes kann sich auf alle Wandschichten des Myokards vom Epikard bis zum Endokard (transmuraler Infarkt) oder lediglich auf das innere Drittel des Myokards (nicht-transmuraler/subendokardialer Infarkt) erstrecken (Freifeld, Schuster, & Bulkley, 1983). Da beim transmuralen Infarkt eine große Fläche des Myokards betroffen ist, ergibt sich ein typisches Elektrokardiogramm (EKG) mit einer ST-Streckenhebung und teilweise veränderter Q-Zacke (Lavie & Gersh, 1990; Thygesen et al., 2012). Nicht transmurale Infarkte zeigen in der Regel weniger Veränderungen der ST-Strecke und eine teilweise veränderte T-Welle und bedürfen keiner so raschen Intervention wie es bei den „großen“ transmuralen Infarkten erforderlich ist. Durch Bestimmung der Creatinkinase (CK oder der myokardialen Isoform MB-CK) im Blut lässt sich das Ausmaß des geschädigten Myokards und die Dauer der kardialen Ischämie abschätzen, was wiederum eine Aussage über Verlauf und Prognose des Infarktes ermöglicht. Ein direkter Biomarker für den kardialen Schaden ist das kardiale Troponin (cTropnin I und/oder T), welches routinemäßig beim Verdacht eines Infarktes im Blut gemessen wird und wesentlich präzisere Aussagen zur Diagnose, Therapie und Prognose ermöglicht (Collinson, 1998; Kemp, Donovan, Higham, & Hooper, 2004).

Die Folgen eines akuten Myokardinfarktes sind in Akut- und Spätfolgen unterteilbar. In der Akutphase kann es zu einer Ruptur des Ventrikels, Herzrhythmusstörungen und zum Pumpversagen kommen. Während der Reperfusionsphase können weitere Infarkte (meist kleinere) und/oder Herzrhythmusstörungen auftreten (Bajaj, Sethi, Rathor, Suppogi, & Sethi, 2015). Weitere akute Komplikationen eines Myokardinfarktes stellen die ischämisch bedingte Mitralklappeninsuffizienz oder ein Ventrikelseptumdefekt dar. Spätfolgen des Myokardinfarktes treten vor allem durch die veränderte Morphologie des Myokards auf. Nach Heilung des Infarktes mit Bildung einer fibrotischen Narbe entsteht in der Regel eine Dilatation (Erweiterung) des betroffenen Ventrikels (Firth & Dunnmon, 1990; Zornoff, Paiva, Duarte, & Spadaro, 2009). Infolgedessen kommt es zu einer veränderten Biodynamik des Herzens und kompensatorisch zu einem Umbau anderer Herzabschnitte (Remodeling) (Azevedo, Polegato, Minicucci, Paiva, & Zornoff, 2016; Cohn, Ferrari, & Sharpe, 2000).

2.1.2 Diagnose und Einteilung des akuten Myokardinfarktes

Unter dem akuten Koronarsyndrom (AKS, engl. ACS = acute coronary syndrome) werden die Phasen der koronaren Herzerkrankung zusammengefasst, die unmittelbar lebensbedrohlich sind. In der klinischen Praxis sind dies die instabile Angina, der akute Myokardinfarkt und der plötzliche Herztod (European Society of Cardiology (ESC), 2017). Eine akute Obstruktion der Koronararterien äußert sich in Unwohlsein im Brustbereich (Brustenge = Angina pectoris) mit oder ohne Atemnot (Dyspnoe), Übelkeit und Schweißausbruch, welcher zum Teil als Kaltschweiß wahrgenommen wird. Erstes Symptom eines akuten Infarktgeschehens ist häufig ein tiefer, retrosternaler viszeraler Schmerz, der von den Patienten oft als Druck oder Brennen beschrieben wird (Taghipour et al., 2018). Bei Frauen äußern sich eher atypische Beschwerden im Brustbereich (James Wayne Warnica, 2019).

Weitere Diagnostik (Elektrokardiogramm und Messung kardialer Marker) führt zur klinischen Diagnosestellung, um welche Form des akuten Myokardinfarktes es sich handelt. Die instabile Angina pectoris äußert sich klinisch wie ein akuter Myokardinfarkt, zeigt diagnostisch aber keine Veränderungen im EKG und keine Erhöhung kardialer Marker. Stabilisiert sich die Angina pectoris jedoch nicht, wird therapeutisch wie beim STEMI vorgegangen (S. 58 (Arastéh, 2009)). Mittels der Aufzeichnung eines Elektrokardiogramms erfolgt die klinische Einteilung des akuten Myokardinfarktes in ST-Strecken-Hebungs-Myokardinfarkt (STEMI, ST elevation MI) oder Nicht ST-Strecken-Hebungs-Myokardinfarkt (NSTEMI, non-ST elevation MI; siehe Abbildung 1). Viele Patienten entwickeln einen MI mit zusätzlichen Q-Wellen (Q wave MI). Bei Patienten ohne diese Auffälligkeit erfolgt die Einteilung in MI ohne Q-Wellen Veränderung (non-Q MI) (Lavie & Gersh, 1990; Thygesen et al., 2012). Eine Diagnosestellung mittels EKG sollte unmittelbar nach Feststellung des Verdachtes eines Myokardinfarktes erfolgen (Thygesen et al., 2007). Häufig ist es notwendig mehrere EKG Aufzeichnungen anzufertigen, da sich in der Initialphase des akuten Myokardinfarkts in der Regel kein pathologischer EKG Befund zeigt (Thygesen et al., 2012; Thygesen et al., 2007). Zusätzlich zum Elektrokardiogramm werden verschiedene Blutparameter bei den vorstelligen Patienten bestimmt (kardiale Marker). Bei einem Myokardinfarkt werden durch die geschädigten Herzmuskelzellen vermehrt Enzyme (Creatinkinase = CK und herzmuskelspezifische Creatinkinase = CK-MB) oder Zellbestandteile (Myoglobin,

kardiales Troponin I und T) ins Blut abgegeben und liefern eine Aussage über das Ausmaß und die Dauer des Schadens (Collinson, 1998; Kemp et al., 2004).

Die Unterscheidung zwischen STEMI und NSTEMI ist richtungsweisend für die Einleitung der therapeutischen Maßnahmen (siehe Therapie 2.1.5).

ST-Strecken-Hebungs-Myokardinfarkt (STEMI = ST elevation MI; transmuraler Myokardinfarkt)

Der STEMI gilt als akuter Infarkt. Seine Diagnose bedarf der unmittelbaren Intervention mit Revaskularisierung und kann bereits durch den ersten EKG Befund gestellt werden (siehe Abbildung 1). Bei Vorliegen von ST-Strecken-Hebungen von mindestens 2 mV in den Ableitungen V1–V6 oder von mehr als 1 mV in den übrigen Ableitungen kann der STEMI vom akuten Koronarsyndrom ohne ST-Strecken-Hebung (NSTEMI) abgegrenzt werden (S.60 (Arastéh, 2009)).

Durch das EKG kann zusätzlich eine Aussage bezüglich der Größe und Lokalisation des betroffenen Ischämiegebiets getroffen werden. Da jedoch auch andere kardiale Ursachen eine ST-Hebung bewirken können, ist eine labormedizinische Diagnostik von Blutparametern (kardialen Markern) unumgänglich für die gesicherte Diagnose eines STEMI (Thygesen et al., 2012; K. Wang, Asinger, & Marriott, 2003). Im Blut der Patienten finden sich erhöhte Werte von Creatinkinase und cTroponin (I und T), die mit Fortschreiten der Ischämiezeit deutlich ansteigen. Differentialdiagnostisch sei beim STEMI auf die akute Perikarditis oder Perimyokarditis verwiesen (S.62 (Arastéh, 2009)), welche sich jedoch als Folge ihrer generalisierten myokardialen Ausprägung nicht immer eindeutig als ST-Streckenhebung im EKG darstellen.

EKG Veränderungen nach Myokardinfarkt

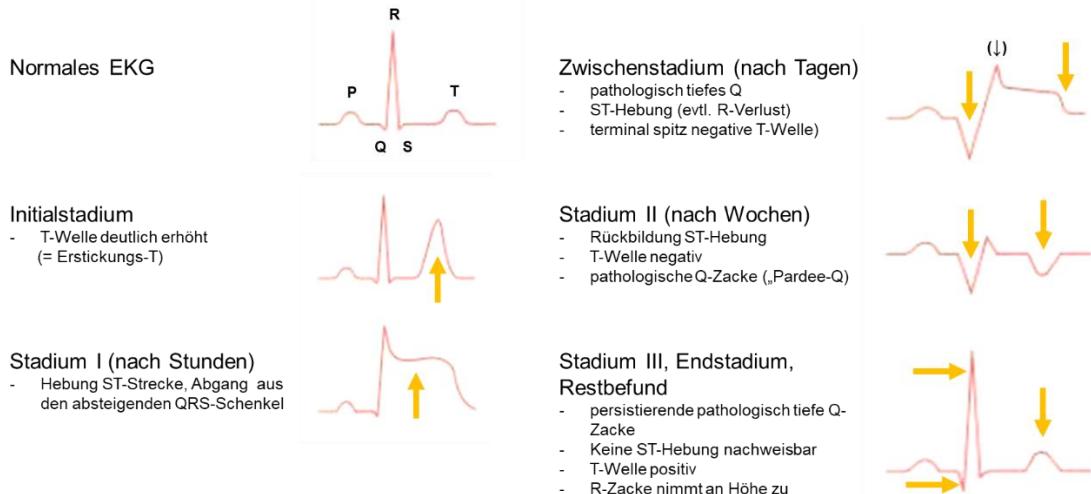


Abbildung 1. EKG-Veränderungen nach Herzinfarkt modifiziert nach Gerlach (Ulrich Gerlach, 2015). Vereinfachte Darstellung der EKG-Veränderungen nach akutem Myokardinfarkt in der Extremitätenableitung

Nicht ST-Strecken-Hebungs-Myokardinfarkt (NSTEMI = non-ST elevation MI; subendokardialer Myokardinfarkt)

Die Diagnose eines NSTEMI erfolgt in erster Linie über die labormedizinische Diagnostik. So sind kardiale Parameter im Blut erhöht (kardiales Troponin T und I = cTnT, cTnI sowie Creatinkinase und herzmuskel spezifische Creatinkinase = CK-MB) ohne Vorliegen einer akuten ST-Strecken-Hebung im Elektrokardiogramm. Zum Teil treten im EKG dennoch Anomalien wie eine Senkung der ST-Strecke und eine Inversion der T-Welle auf (Auftreten in Kombination möglich). Folglich ist der EKG Befund beim NSTEMI weniger spezifisch. Wichtig sei anzumerken, dass der Anstieg der kardialen Parameter im Blut erst nach einer gewissen Zeit (4 bis 6 Stunden nach Beginn einer myokardialen Ischämie) erfolgt und STEMI/NSTEMI in der Akutphase demnach häufig unauffällige Laborbefunde liefern (S.63 (Arastéh, 2009)). Demnach sollten beim NSTEMI Verdacht in definierten zeitlichen Abständen weitere Blut- und EKG Untersuchungen durchgeführt werden.

2.1.3 Pathophysiologie im Myokard nach akutem Myokardinfarkt

Der Ablauf des Myokardinfarkts lässt sich in verschiedene Phasen einteilen, die zeitlich durch das Auftreten verschiedener Zellpopulationen sowie dem Ablauf unterschiedlicher biochemischer Prozesse am Ort des Geschehens charakterisiert sind (Frangogiannis,

2006). Da im Rahmen dieser Arbeit grundsätzlich nicht vom vollständig abgelaufenen Infarktgeschehen (ohne Wiederherstellung des Blutstroms) die Rede ist, wird an dieser Stelle vor allem auf die pathophysiologischen Grundlagen nach zeitlich begrenzter Ischämie mit anschließender Reperfusion eingegangen.

Allgemein sei zusätzlich darauf verwiesen, dass nicht immer ein vollständiger Verschluss der Koronararterien auftritt. Es existieren darüber hinaus durchaus mildere Formen des akuten Myokardinfarktes (in der Regel ohne ST-Hebung) die durch embolierte atherothrombotische Zelldebris und/oder Thrombozytenmikroaggregate in der Mikrozirkulation verursacht werden (Gawaz, 2004; Heusch, Schulz, Baumgart, Haude, & Erbel, 2001).

1. Akute, ischämische Phase

Vom Myokardinfarkt ist per definitionem die Rede, wenn myokardialer Zelltod durch eine anhaltende Ischämie stattgefunden hat (Thygesen et al., 2007). Die Okklusion einer oder mehrerer Koronararterien führt zu einem Versiegen des Blutflusses in den nachgeschalteten Versorgungsgebieten. Es kommt daraufhin zu einer Unterversorgung des betroffenen Myokardgewebes mit Sauerstoff und Nährstoffen, was wiederum zu einer anaeroben Stoffwechselsituation der Zellen und final zum Zelltod (Nekrose) durch Sauerstoffmangel führt (Infarkt) (Chang, Nair, Luk, & Butany, 2013). Aufgrund des Erliegens der sauerstoffabhängigen oxidativen Phosphorylierung in den ischämischen Arealen kommt es zur Depolarisierung der Mitochondrienmembran, ATP (Adenosintriphosphat) Mangel und folglich zu einem Kontraktionsverlust der Kardiomyozyten (Akinesie) (Hausenloy & Yellon, 2013; Maxwell & Lip, 1997). Ein Anstieg toxischer Abfallprodukte (v.a. ROS, reactive oxygene species), bedingt durch deren stagnierten Abtransport, führt zu zusätzlichem Zelltod im Bereich der Ischämie. Das Ausmaß der stattfindenden Nekrose ist von der Versorgung des Ischämiegebietes mit Kolateralgefäßen, dem Bedarf der Zellen an Sauerstoff und der Anfälligkeit der Myozyten für Sauerstoffmangel abhängig (Thygesen et al., 2012). Von einer sichtbaren, weitgehenden kardialen Nekrose ist auszugehen, wenn die Ischämie 2 - 4 Stunden oder länger anhält (Pasotti, Prati, & Arbustini, 2006). Es kommt zum Erliegen von Transportvorgängen an den Zellmembranen ($3\text{Na}^+ \cdot 2\text{K}^+$ ATPase) und folglich zum Einstrom von Natrium in die Kardiomyozyten. Durch Verlust des osmotischen

Gleichgewichtet strömt vermehrt Wasser in die Zellen und es entstehen Ödeme, welche auch mikroskopisch sichtbar werden (Holmes, Borg, & Covell, 2005). Durch die erhöhte Natriumkonzentration wird vermehrt Calcium (Aktivierung $2\text{Na}^+ \text{-Ca}^{2+}$ -Ionenpumpe) in die Zellen transportiert, was zu einem intrazellulären Calcium-Overload und zur Hyperkontraktion von Myozyten führt (Hausenloy & Yellon, 2013)

2. Inflammatorische Phase

Durch die Freisetzung danger-associated molecules (DAMP'S; danger associated molecule patterns) aus nekrotischen Zellen kommt es über die Aktivierung von Toll-like-Rezeptoren zur Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und zur Einwanderung von Monozyten aus dem Blut (Fang, Moore, Dart, & Wang, 2015; Frodermann & Nahrendorf, 2017). Neutrophile Granulozyten sind in der Frühphase der Inflammation die vorherrschende Leukozytenpopulation (Carbone, Nencioni, Mach, Vuilleumier, & Montecucco, 2013; Frodermann & Nahrendorf, 2017; Pasotti et al., 2006). Im Gewebe differenzieren die Neutrophilen und Monozyten teilweise zu Gewebsmakrophagen. Als Monozyten-Makrophagensystem (MMS) erfüllen alle drei Zellpopulationen über die Freisetzung inflammatorischer Zytokine, Proteasen und ROS (reactive oxygen species) die Aufgabe, tote Zellen abzubauen und weitere inflammatorische Zellen an den Ort des Geschehens zu rekrutieren. Die Entzündungsreaktion soll somit dafür sorgen, dass nekrotische Zellen entfernt werden und anschließend eine Reorganisation des infarzierten Gewebes stattfinden kann.

3. Fibrotisch, proliferative Phase

Die fibrotische, proliferative Phase ist durch eine Abnahme der Entzündungsreaktion (Abnahme inflammatorischer Zellen) und eine Zunahme an Fibroblasten und Endothelzellen gekennzeichnet (Holmes et al., 2005). Apoptotische neutrophile Granulozyten werden von Makrophagen phagozytiert und es kommt zur Freisetzung von antiinflammatorischen Zytokinen wie Transforming Growth Factor (TGF)- β und Interleukin (IL)-10 (Sanjabi, Zenewicz, Kamanaka, & Flavell, 2009).

Die myokardialen Fibroblasten sind zum Großteil eingebettet im Interstitium und der perivaskulären extrazellulären Matrix des Myokards und wandern in geringer Zahl auch übers Blut aus dem Knochenmark ein (Sanjabi et al., 2009; Shinde & Frangogiannis,

2014). Aufgrund des Strukturverlustes im Myokard, der Anwesenheit von Hormonen, Wachstumsfaktoren und Zytokinen findet eine starke Proliferation der Fibroblasten statt, welche zum Teil zu Myofibroblasten transdifferenzieren (Shinde & Frangogiannis, 2014; van den Borne et al., 2009). Myofibroblasten, die im gesunden Myokard nicht zu finden sind, besitzen Charakteristika von Fibroblasten und glatten Muskelzellen (Talman & Ruskoaho, 2016). Sie sind im Rahmen der Wundheilung in der Lage, hohe Mengen an Kollagen zu produzieren, darüber hinaus verfügen sie über kontraktile Aktin- und Myosin-Filamente. Durch ihre besondere Fähigkeit zur glattmuskulären Kontraktion führen sie gegen Ende der Proliferationsphase zu einer Narbenkontraktion (S.137 (Lüllmann-Rauch & Paulsen, 2012)). Beide Zelltypen (Fibro- und Myofibroblasten) sorgen in der proliferativen Phase nach Infarkt für die Produktion von Kollagen Typ III (retikuläre Fasern), welches nachfolgend in Kollagen Typ I und schließlich zur fibrotischen Narbe umgebaut wird (Shinde & Frangogiannis, 2014; van den Borne et al., 2009)).

4. Ausreifungsphase, Ausheilungsphase, Langzeit-Remodeling Phase

Das Resultat der Ausreifungsphase ist die Bildung einer durch Fibroblasten und Myofibroblasten gebildeten fibrotischen Narbe (Talman & Ruskoaho, 2016). Da vermehrt Fibroblasten, Myofibroblasten und Endothelzellen in Apoptose gehen, nimmt ihr Zellgehalt deutlich ab und es kommt zu einer Reduzierung der Größe der Narbe. Die Narbe besteht letztlich aus zellfreiem Bindegewebe, welche sich auf molekularer Ebene als parallel angeordnete, nicht mehr komplex vernetzte Kollagenstruktur darstellt.

Von einer Heilung des Infarktes ist je nach Literatur innerhalb von 5 bis 8 Wochen auszugehen (Holmes et al., 2005; Thygesen et al., 2012), welche jedoch keine 100 prozentige Wiederherstellung der Myokardstruktur darstellt. Der vom Infarkt betroffene Ventrikel zeigt nach Ausreifung der Infarktnarbe eine deutliche Erweiterung (Dilatation) seines Lumens. Das gesunde Myokard ist in der Lage, diese biomechanischen Veränderungen des infarzierten Ventrikels zu kompensieren. So entstehen nach Infarkt im Bereich des nicht von der Ischämie betroffenen Myokards strukturelle Langzeitveränderungen (Remodeling wie Hypertrophie und Fibrose), die zusätzlich zur Infarktnarbe zu funktionellen Veränderungen des Myokards führen und die Herzfunktion beeinflussen (Sutton & Sharpe, 2000). Eine Spätfolge des Herzinfarktgeschehens bedingt

durch das Fortschreiten des Remodelings ist die chronische Herzinsuffizienz, bei dem die Pumpfunktion des Herzens nicht mehr ausreicht, um den Organismus ausreichend mit Blut zu versorgen.

2.1.4 Myokardialer Ischämie/Reperfusions-Schaden (IRI = ischemia/reperfusion injury, myocardial reperfusion injury)

Durch die Reperfusion verändert sich das mikro- und makroskopische Aussehen der Pathologie (Thygesen et al., 2012). Essentiell für eine gelungene Reperfusion ist zunächst, ob das ischämische Areal vollständig reperfundierte wird. Aufgrund des endothelialen Schadens kommt es nicht selten zum „no-reflow“ Phänomen, bei dem keine ausreichende Revaskularisierung stattfindet (Engler, Dahlgren, Morris, Peterson, & Schmid-Schonbein, 1986; Maxwell & Lip, 1997). Paradoxe Weise führt die Wiederherstellung des Blutflusses zur Induktion zusätzlichen Zelltodes und damit zu einer Vergrößerung des myokardialen Schadens (Ong et al., 2018). Dieser durch die Reperfusion bedingte Zelluntergang mit Auswirkungen auf die Infarktgröße wird als Ischämie/Reperfusions-Schaden oder kurz Reperfusionsschaden beschrieben.

Yellon et al. gehen davon aus, dass der durch die Reperfusion bedingte Schaden bis zu 50% der finalen Infarktfläche bedingen kann (Yellon & Hausenloy, 2007). Die Reperfusion nach myokardialer Ischämie führt zu einer akuten inflammatorischen Immunantwort, die durch Zytokinsekretion, Expression von zellulären Adhäsionsmolekülen, neutrophiler Infiltration und einer erhöhten Permeabilität der Gefäße gekennzeichnet ist und damit alle Charakteristika einer akuten Entzündung umfasst (Hansen, 1998). So ist die Wiederherstellung des Blutflusses für eine Reihe pathophysiologischer Prozesse verantwortlich, die das Myokard weiter schädigen können (Yellon & Hausenloy, 2007).

Im Myokard führt die Reperfusion zur plötzlichen Verfügbarkeit von Sauerstoff. Die geschädigten Zellen sind jedoch nicht in der Lage, der Entstehung von freien Sauerstoffradikalen durch deren Reduzierung effektiv entgegenzuwirken, was dazu führt, dass das Gewebe zusätzlich geschädigt wird (Sauerstoff-Paradox, Hypothese freier Radikale) (Maxwell & Lip, 1997; Yellon & Hausenloy, 2007). Mit dem wiedereinsetzenden Blutstrom wird im Ischämiegebiet angereichertes Lactat aus dem Gewebe geschwemmt. Diese rasche Änderung des pH-Wertes bewirkt die Öffnung von MPTP (mitochondrial permeability transition pore) in der inneren

Mitochondrienmembran und resultiert letztlich in weiterem Zelltod (Hausenloy & Yellon, 2013; Yellon & Hausenloy, 2007). Ein grundlegender Mechanismus des stattfindenden Zelltodes beruht auf dem intrazellulären Calcium-Overload der Zellen und Mitochondrien. Bereits während der Ischämie findet eine Akkumulation von Calciumionen im Zellinneren statt (siehe 2.1.3), die durch die Reperfusion und die wiedereinsetzenden Transportvorgänge nochmals gesteigert wird (Piper, Meuter, & Schäfer, 2003).

Einen wesentlichen Einfluss auf das Ausmaß des Reperfusionschadens haben Endothelzellen und Thrombozyten (A Barrabés et al., 2010; Kingma, Plante, & Bogaty, 2000). Geschädigte Endothelzellen beeinflussen die Aggregation und Aktivierung von Thrombozyten (Massberg et al., 1998). Aufgrund der reduzierten endothelialen Freisetzung vasodilatatorischer Substanzen und einer erhöhten Permeabilität entstehen Veränderungen der Mikrozirkulation mit gesteigerter Invasion aktivierter inflammatorischer Zellen (Forman, Puett, & Virmani, 1989). Neutrophile Granulozyten infiltrieren das infarzierte Myokard und können durch die Freisetzung von MMPs (Matrixmetalloproteasen) und ROS (reactive oxygen species) zusätzlich zu einer Ausweitung des myokardialen Schadens führen (neutrophil-mediated-tissue damage) (Carbone et al., 2013).

Als Resultat der Reperfusion ergeben sich behandelbare bzw. reversible Folgen wie Arrhythmien oder eine vorübergehende postischämische kontraktile Dysfunktion (myocardial stunning). Schwerwiegende Komplikationen stellen mikrovaskuläre Obstruktionen (MVO = microvascular obstruction) oder der zusätzliche myokardiale Zelltod (lethal myocardial reperfusion injury) dar, die mit einer vergrößerten Infarktfläche, kardialer Dysfunktion und ungünstigem Remodeling einhergehen (Hausenloy & Yellon, 2013). Demnach erscheint es sinnvoll Therapien zu entwickeln, die ohne Beeinflussung der Hämostase, die Perfusion des Myokards nach MI verbessern und das Auftreten von Reperfusionschäden reduzieren. Eine Vermeidung einer exzessiven Immunantwort scheint hierbei ebenso wichtig, um zusätzlichen Zellschaden zu minimieren. Thrombozyten, die bereits im Rahmen der antithrombozytären und antikoagulatorischen Therapie nach MI moduliert werden, stellen aufgrund ihrer vielfältigen Beteiligung im Rahmen der Reperfusion eine gute Zielstruktur dar.

2.1.5 Therapie des akuten Myokardinfarktes

Die Therapie des akuten Myokardinfarktes besteht aus der Kombination von intensivmedizinischen Maßnahmen (angioplastischer Eingriff) zur Revaskularisierung des okkludierten Gefäßes und einer unterstützenden medikamentösen Therapie. Ziel der Therapie beim akuten Verschluss einer oder mehrerer Koronararterien ist es, den Thrombus innerhalb der Koronararterie entweder durch die Verabreichung von Fibrinolytika (fibrinspezifische Substanzen wie z. B. Alteplase, Reteplase) aufzulösen oder durch die direkte perkutane koronare Intervention (PPCI, primäre perkutane koronare Intervention) für eine Revaskularisierung zu sorgen (Gawaz, 2004; Gelfand & Cannon, 2007; James Wayne Warnica, 2019). Durch eine effektive Behandlung des akuten Myokardinfarktes durch die PPCI soll eine Reduktion der Infarktfläche und eine Minimierung des Ischämie/Reperfusions-Schadens (engl. IRI = ischemia/reperfusion injury) erreicht werden (Ong et al., 2018). Die Reperfusion kann zusätzlich mittels koronarer-Bypass-Operation erzielt werden, welche bei ST-Strecken-Hebungs-Myokardinfarkten (STEMI) jedoch nur gelegentlich zum Einsatz kommt (James Wayne Warnica, 2019).

Therapie des ST-Strecken-Hebungs-Myokardinfarktes (STEMI)

Die Diagnose eines STEMI ist der Beweis für einen großen transmuralen Schaden des Myokards und bedarf der sofortigen Einleitung therapeutischer Maßnahmen. Neben der Verabreichung von Fibrinolytika (Thrombolyse) wird die sofortige Koronarangiographie und Durchführung der primären perkutanen koronaren Intervention (PPCI) als Mittel der Wahl zur Behebung der Okklusion verwendet. Aufgrund der geringeren Erfolgsrate der Thrombolyse (60 – 70%) wird die PPCI jedoch deutlich häufiger angewendet (S.68 (Arastéh, 2009)). Zusätzlich zur PPCI erhalten STEMI Patienten eine medikamentöse Therapie mit Thrombozytenaggregationshemmern (siehe Therapie NSTEMI).

Therapie des nicht ST-Strecken-Hebungs-Myokardinfarktes (NSTEMI)

Im Falle der Diagnose NSTEMI bedarf es in der Regel keiner unmittelbaren koronaren Angiographie. Bei Patienten mit einem erhöhten Risiko einen STEMI zu entwickeln, erfolgt eine medikamentöse Therapie mit Thrombozytenaggregationshemmern als Kombination aus Cyclooxygenasehemmer (z.B. Aspisol), Glykoprotein-II-b/III-a-Antagonisten (z.B. Abciximab, Tirofiban, Eptifibatide) und Adenosindiphosphat

Rezeptor-Antagonisten (z.B. Clopidogrel). Innerhalb von 24 bis 72 h wird eine Koronarangiographie durchgeführt und die PPCI zur Beseitigung von Stenosen vorgenommen. Die Thrombozytenaggregationshemmer vermitteln unterschiedliche Wirkungen. So blockieren Cyclooxygenasehemmer irreversibel die Synthese von Thromboxan A2 aus Arachidonsäure und reduzieren damit die Aggregation von Thrombozyten. Glykoprotein-II-b/III-a-Antagonisten hemmen die fibrinogenvermittelte Aggregation aktiverter Thrombozyten und wirken so effektiv der Entstehung von Thromben im Koronargefäß entgegen oder unterstützen deren Auflösung (S.70 (Arastéh, 2009)). Adenosindiphosphat Rezeptor-Antagonisten hemmen die ADP-induzierte Thrombozytenaktivierung.

Bei Patienten mit einem geringen Risiko einen STEMI zu entwickeln führt die Therapie mit Thrombozytenaggregationshemmern in der Regel zur Beschwerdefreiheit. Ihr EKG Befund ist normal und die Blutuntersuchungen ergeben keine Troponinerhöhung.

Dauertherapie von Herzinfarktpatienten

Nach einem Myokardinfarkt erfolgt in der Regel eine Dauertherapie der Patienten mit antianginösen (Nitrate, b-Rezeptoren-Blocker) und antithrombozytären Substanzen (S.68 (Arastéh, 2009)). Letztere sind zumeist Cyclooxygenase-1 (COX-1) Hemmer wie Acetylsalicylsäure (ASS, Handelsname Aspirin). Durch eine irreversible Hemmung der COX-1 ist die Synthese von Thromboxan A2 aus Arachidonsäure blockiert und die Aggregation von Thrombozyten reduziert. Ebenfalls antithrombotisch wirksam sind Adenosindiphosphat Rezeptor-Antagonisten (= P2Y₁₂ Inhibitor, z.B. Clopidogrel, Prasugrel, Ticagrelor), welche in Kombination mit ASS bei der dualen antithrombozytären Therapie bis zu 12 Monate post Infarkt verabreicht werden (Rath & Gawaz, 2016). Die Wirkung der Adenosindiphosphat Rezeptor-Antagonisten wird durch eine Hemmung der ADP-induzierten Thrombozytenaktivierung vermittelt. Die Indikation zu einer dualen antithrombozytären Therapie (DAPT = Dual Antiplatelet Therapy) erfolgt in der Regel nach Koronar-Interventionen oder Myokardinfarkt (MI) und richtet sich in ihrer Dauer vor allem nach dem Blutungsrisiko der Patienten (European Society of Cardiology (ESC), 2017).

2.2 Myokardiale Ischämie und Reperfusion im Mausmodell

Bei der Induktion der myokardialen Ischämie im Mausmodell unterscheidet man zwischen permanentem und temporärem Infarkt. Bei dem permanenten Infarkt wird der Ramus interventricularis anterior (= RIVA, engl.: LAD, left anterior descending artery) der linken Koronararterie dauerhaft ligiert und es kommt zu weitreichenden Nekrosen des nun nicht mehr perfundierten Gewebes. Dieses Modell entspricht somit dem vollständig abgelaufenem Infarktgeschehen des Menschen, bei dem keine Revaskularisierung der okkludierten Koronararterie erfolgt ist. Der dauerhafte Verschluss des Gefäßes kann mittels permanenter Fadenligatur oder durch die Kryoverödung erfolgen. Letztere hat jedoch den Nachteil, dass neben dem ischämischen Schaden ein zusätzlicher thermischer Schaden verursacht wird (van den Bos, Mees, de Waard, de Crom, & Duncker, 2005).

Bei dem temporären Verschluss der LAD handelt es sich hingegen um ein Ischämie- und Reperfusionsmodell, welches pathophysiologisch dem revaskularisierten Myokardinfarkt des Menschen nach intensivmedizinischer Intervention entspricht. Hier wird die LAD nur für eine bestimmte Dauer ligiert und anschließend wird der Verschluss wieder geöffnet, was zu einer Reperfusion des Gewebes führt. Der myokardiale Schaden ist bei dieser Methodik wesentlich geringer als bei dem permanenten Myokardinfarktmodell. Die Induktion der Ischämie erfolgt bei der Maus in der Regel mittels eines Ligaturfadens. Nicht-invasive Verfahren wie die perkutane intrakoronare Embolisation, die Ballonkatheterisierung oder die Verwendung eines Ameroid-Konstriktors zum Verschluss der Koronararterie sind bei der Maus aufgrund ihrer geringen Körpergröße nicht anwendbar (Syarifah Aisyah Syed Abd Halim, 2018). Erst 2018 ist es Sun et al. gelungen, durch ein minimalinvasives Verfahren mittels Ultraschallkontrolle die LAD zu identifizieren und eine Ligatur durchzuführen (Q. Sun et al., 2018). Die traditionelle Methodik, welche auch in dieser Arbeit Verwendung findet, bedarf weiterhin der Intubation und Thorakotomie der Tiere.

2.2.1 Pathophysiologie der Ischämie und Reperfusion im murinen Modell

Die Maus (*Mus musculus*) ist als Modell für den Menschen fest in der Forschung etabliert. Bei allen Säugetierzellen finden sich ähnliche molekulare Mechanismen für Wachstum, Vervielfältigung von Zellen, Zelldifferenzierung und -tod. Mäuse und Menschen sind ein gutes Beispiel für diese metabolische Homogenität, sie besitzen die gleichen Organe und

Physiologie und zeigen ebenfalls große Gemeinsamkeiten in der Pathogenese von Erkrankungen (Demetrius, 2005). Im Gegensatz zum Menschen besitzt die Maus jedoch eine wesentlich höhere Stoffwechselrate, welche sich im unterschiedlichen zeitlichen Ablauf der Entzündungsreaktion und Heilung nach Ischämie und Reperfusion im Myokard darstellen lässt (Holmes et al., 2005). So findet der Ablauf der Infarktphasen (Akute ischämische, Inflammatorische, Proliferative und Ausreifungsphase (Frangogiannis, 2012)) deutlich schneller statt. Dewald et al. konnten beim Vergleich des Infarktablaufes von Hund und Maus deutliche Unterschiede im zeitlichen Auftreten an der Inflammation und Heilung beteiligten Zellpopulationen und der Expression von Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen zeigen (Dewald et al., 2004).

Die Akutphase des Infarktes mit massiven Nekrosen ist zunächst bei allen Spezies gleich und beginnt ab einer Ischämiezeit von 20 min (Jennings & Ganote, 1974). Bei Hund, Maus und Mensch folgt die Infiltration mit neutrophilen Granulozyten und Blutmonozyten in den Bereich der Ischämie und ist bei allen Spezies in den ersten 24 h nach Infarkt ein deutlicher Beleg für die stattfindende inflammatorische Reaktion. Ein deutlicher Unterschied ergibt sich im folgenden Zeitverlauf der Leukozyteninfiltration bei der Maus. Diese nimmt nach Erreichen eines Peaks nach 24 h Reperfusion innerhalb von 7 Tagen deutlich ab. Bereits an Tag 7 zeigt sich eine Abnahme der Dicke des infarzierten Myokardes mit deutlichem Verlust an Zellen (Ende Proliferative Phase, Übergang Ausreifungsphase). Ein deutlicher Unterschied zeigt sich ebenfalls beim Auftreten von Myofibroblasten (α -smooth muscle actin positive Zellen). Treten diese beim Menschen erst nach einer Reduktion der Leukozytenpopulation in Erscheinung, findet bei der Maus bereits 72 h nach der Reperfusion eine Akkumulation der Myofibroblasten statt (Dewald et al., 2004). Die Narbenbildung (Ausreifungsphase) zeigt sich durch eine Abnahme der Zelldichte und eine Reduktion der Kapillaren und ist bei der Maus innerhalb von 14 Tagen abgeschlossen.

Zusammenfassend entspricht die Pathophysiologie der Ischämie und Reperfusion im murinen Modell im Wesentlichen der des Menschen, mit dem großen Unterschied, dass die Maus insgesamt einen wesentlich schnelleren Heilungsverlauf durchläuft (siehe 2.1.3).

2.3 Thrombozyten und ihre Funktion bei der Hämostase

Thrombozyten von Säugetieren sind kernlose 2 - 4 µm große Zellen. Ihre Zahl variiert tierartlich sehr stark von $2,5 \times 10^4$ (Huhn), 2×10^5 (Pferd) bis 1×10^6 (Ratte) pro µl Blut (Kapitel 10.4 Kaspers, 2010). Physiologische Werte beim Erwachsenen liegen zwischen 1,5 bis 4×10^4 pro µl Blut. Bei der Maus finden sich Werte von 9,5 bis $10,4 \times 10^3$ pro µl Blut (Fukuda, Asou, Nogi, & Goto, 2017). Die Bildung der Thrombozyten findet ausgehend von der Zellreihe der myeloiden Stammzellen im Knochenmark statt. Beim Auswandern der thrombozytären Vorläuferzellen (Megakaryozyten) aus dem Knochenmark zerfallen diese in bis zu 1000 Thrombozyten. Zum Teil finden sich jedoch auch reife Megakaryozyten im Blut, die erst bei der Passage der Lungenarterien in Thrombozyten zerfallen (Kapitel 10.4 Kaspers, 2010). Die Lebensdauer der Thrombozyten beträgt 3 bis 12 Tage (Bolling & Murphy, 1978; Kapitel 10.4 Kaspers, 2010). Gealterte Thrombozyten werden anhand ihrer veränderten Oberflächenstruktur (Expressionszunahme von Phosphatidylserin, Deglykosylierung von membranständigen Glykoproteinen insbesondere GPIba des VWF-Rezeptors sowie Ig Bindung) von Zellen des mononukleären Phagozytose-Systems (MPS) in Milz und Leber erkannt, phagozytiert und abgebaut (Italiano & Hartwig, 2015; Kapitel 10.4 Kaspers, 2010).

Im Gegensatz zu anderen eukaryotischen Zellen besitzen Thrombozyten keinen Zellkern. Dennoch verfügen sie über Zellorganellen wie den Golgi-Apparat, der sie zur Proteinsynthese befähigt. Darüber hinaus besitzen Thrombozyten Mitochondrien zur Erzeugung von Energie. Zusätzlich verfügen Thrombozyten über eine spezielle Form des rauen endoplasmatischen Retikulums, welches die Funktion eines intrazellulären Calciumionen-Speichers hat und für die Thrombozytenaggregation im Rahmen der Hämostase essentiell ist. Anhand der Elektronenmikroskopie lassen sich zahlreiche Granula identifizieren, die elektronendichten δ-(Dichte) Granula, α-Granula und Lysosomen (Kapitel 10.4 Kaspers, 2010; Thon & Italiano, 2012).

Die Aufgaben der Granula hängen im Wesentlichen von den in ihnen gespeicherten Molekülen ab. So enthalten die Lysosomen vor allem saure Hydrolasen (Proteasen), Glykosidasen und kationische Proteine, die bei Abbauvorgängen eine Rolle spielen (Yun, Sim, Goh, Park, & Han, 2016). Die Dichte-Granula speichern unter anderem Nucleotide (Adeninnucleotide: ATP, ADP; Guaninnucleotide: GTP, GDP) sowie andere nicht

proteinogene Moleküle wie Serotonin, Histamin, anorganische Phosphate und Calcium. In den α -Granula werden vor allem zahlreiche Proteine (u.a. Chemokine, P-Selektin, Plättchenfaktor 4, beta-Thromboglobulin, Wachstumsfaktoren wie VEGF, Fibrinogen, Faktor V und VIII, Fibronectin, VWF und Thrombospondin) gespeichert (Harrison & Cramer, 1993; Rendu & Brohard-Bohn, 2001). Insgesamt verfügt jeder Thrombozyt über 50 bis 80 α -Granula, die Funktionen im Rahmen der Hämostase wahrnehmen und darüber hinaus im Wesentlichen zur angeborenen Immunantwort durch die Interaktionen mit Leukozyten beitragen (Yun et al., 2016). Die Freisetzung der Dichte- und α -Granula ist entscheidend bei der Aktivierung der Thrombozyten und beeinflusst ihr Verhalten im Rahmen der Blutgerinnung.

Bereits 1882 beschrieb Giulio Bizzozero als Entdecker der Thrombozyten die Fähigkeit der Blutplättchen zur Adhäsion, Aggregation und Fibrinbildung und damit die Grundlagen ihrer Funktion bei der Blutstillung (Ribatti & Crivellato, 2007). Die wichtigste Aufgabe der Thrombozyten ist die Hämostase (griechisch haem = Blut und stasis = Stillstand). Als komplexer Vorgang aus streng regulierten Abläufen findet nach einer Verletzung des Gefäßendothels ein Verschluss der Läsion mit anschließender Reparatur statt. Der Ablauf der Hämostase kann in 4 Phasen (Vasokonstriktion, primäre Hämostase, sekundäre Hämostase, Bildung von Bindegewebe) unterteilt werden, zu deren Beginn zunächst die Läsion des Endothels steht (Kapitel 10.4 Kaspers, 2010). Je nach Art und Umfang der Verletzung findet eine Vasokonstriktion des betroffenen Gefäßes statt. Dadurch wird der Blutfluss verlangsamt, wodurch es zu einer geringeren Einblutung in das umliegende Gewebe kommt. Des Weiteren können die zirkulierenden Thrombozyten, plasmatischen Gerinnungsfaktoren und die Endothelzellen aufgrund des verlangsamten Blutstroms besser miteinander interagieren.

In Phase 2 (primäre Hämostase, Blutstillung) kommt es zur Anlagerung (Adhäsion) von Thrombozyten im Bereich der Läsion (siehe schematische Darstellung in Abbildung 43). Diese adhäsiven Vorgänge werden vor allem durch das Plasmaprotein Von-Willebrand-Faktor (VWF) vermittelt, welcher sowohl von Megakaryozyten wie auch vom Gefäßendothel gebildet wird und in geringen Konzentrationen im Plasma enthalten ist. Die Läsion des Endothels führt zur Freilegung der subendothelialen Matrix. An die freigelegten Kollagenstrukturen bindet der VWF, der daraufhin eine Konformitätsänderung durchfährt und eine Bindung mit dem membranständigen

GPIb/IX-Komplex der Thrombozyten bildet. Die erste, noch nicht recht stabile Verbindung der Thrombozyten mit dem Subendothel findet mittels der thrombozytären Adhäsionsrezeptoren GPIbα and GPVI statt (Massberg et al., 2003; Nieswandt & Watson, 2003). Diese initiale Adhäsion führt zur Plättchenaktivierung und einer Konformitätsänderung der Integrinrezeptoren $\alpha_{IIb}\beta_3$ (= GPIIb/IIIa, Fibrinogenrezeptor) und $\alpha_2\beta_1$ (Kollagen Rezeptor), aufgrund deren Bindung mit Proteinen der extrazellulären Matrix die Plättchenadhäsion stabilisiert wird (Gawaz, 2004).

Die aktivierte Thrombozyten setzen Granula aus dem Zellinneren frei (Degranulation). Durch die Freisetzung von Thrombin, ADP, Serotonin und Thromboxan A₂ werden weitere Thrombozyten rekrutiert und aktiviert (Ruggeri, 2002). Es kommt zu einer Konformationsänderung des GPIIb/IIIa (Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$)-Komplexes auf der Thrombozytenoberfläche und zur Bindung von Fibrinogen und VWF. Die Ausbildung von Fibrinogenbrücken zwischen den aktivierte und adhärenten Thrombozyten führt letztlich zur Ausbildung eines Thrombozytenaggregates (weißer Abscheidungsthrombus), das in der Lage ist, einfache Gefäßläsionen ohne die Aktivierung der plasmatischen Gerinnung zu verschließen. Es kann somit ein temporärer Gefäßverschluss erfolgen (Barthels, 2013; Jackson, 2007). Der weiße Abscheidungsthrombus ist demnach das Endprodukt der primären Hämostase und kann im weiteren Verlauf mit Einsetzen der Blutgerinnung (Bildung von Fibrin, sekundäre Hämostase) und Vernetzung des Thrombozytenaggregates stabilisiert werden.

Die dritte Phase der Hämostase ist der Prozess der Blutgerinnung (sekundäre Hämostase). Vermittelt durch Gerinnungsfaktoren findet die Bildung und Quervernetzung von Fibrin statt, was zu einer endgültigen Stabilisierung des Thrombozytenaggregates führt, aus dem sich in der vierten Phase der Hämostase Bindegewebe bilden kann (S.295 (Müller-Berghaus & Pötzsch, 2013)).

Die sekundäre Hämostase, sprich die Bildung des Fibrinnetzwerkes zum Zweck des stabilen Wundverschlusses, wird durch eine Gerinnungskaskade vermittelt (Gale, 2011). Die Gerinnungsfaktoren, die diese Gerinnungskaskade vermitteln werden durch proteolytische Spaltung aus inaktiven Vorstufen aktiviert. Die Faktoren sind in der Regel Proteasen, die häufig nachgeschaltete Faktoren aktivieren. Was mit jeder Stufe der

Gerinnungskaskade wiederrum zu einer Amplifizierung der Reaktion führt (Palta, Saroa, & Palta, 2014).

Ablauf der Gerinnungskaskade:

Die Gefäßläsion führt neben der Bindung von VWF an Kollagenstrukturen auch zur Freisetzung und Aktivierung von Gewebsthromboplastin (Gerinnungsfaktor III, TF = tissue factor). Dieser bindet den im Blut zirkulierenden Faktor VIIa. Nachfolgend wird Faktor X aktiviert (zu Xa) und bildet mit Cofaktor Va einen Komplex (Prothrombinaktivator). Dieser Komplex führt zur Spaltung von Prothrombin (Faktor II) zu Thrombin (Faktor IIa). Im Thrombozytenaggregat befindliches Fibrinogen wird nun durch Thrombin zu Fibrin gespalten. Die Proteolyse in 4 kleinere Fibrinpeptide legt Bindungsstellen für die Polymerisierung der Fibrinmonomere zu Fibrinfäden frei (Weisel & Litvinov, 2013). Durch den Faktor XIII findet die Quervernetzung des Fibringerüstes statt. Neben diesem Weg des extrinsischen Gerinnungssystems existiert auch ein intrinsisches System. Bei diesem kommt es zu einer autokatalytischen Aktivierung des Faktors XII zu XIIa, welcher wiederrum die proteolytische Spaltung des Faktor XI zu XIa bewirkt. Der nun aktivierte Faktor IXa bildet daraufhin einen aktvierten Komplex mit dem Cofaktor VIIIa. Hier treffen sich nun intrinsischer und extrinsischer Weg der Gerinnungskaskade, da der IXa-VIIIa Komplex zur proteolytischen Spaltung von Faktor X zu Xa führt. Die Bindung der Gerinnungsfaktoren an den Phospholipidmembranen der Thrombozyten und Endothelzellen ist essenziell für die sekundäre Hämostase. Diese Bindung ist für die Proenzyme IX, X, II und VII calciumabhängig, was Calciumionen (Ca^{2+}) essenziell für das Funktionieren des Gerinnungsgeschehens macht (Palta et al., 2014; Triplett, 2000).

Insgesamt bleibt festzuhalten, dass Thrombin (Faktor IIa) das Schlüsselenzym der Gerinnungskaskade ist. Es bewirkt die Aktivierung von Faktor VII zu VIIa sowie die proteolytische Spaltung der Cofaktoren VIII zu VIIIa und V zu Va (Kapitel 10.4 Kaspers, 2010).

2.4 Thrombozyten und ihre Rolle beim Geschehen der myokardialen Ischämie und Reperfusion

Der aktuelle Kenntnisstand weist darauf hin, dass Thrombozyten eine wichtige Rolle bei der Inflammation und Immunantwort spielen (Thomas & Storey, 2015). Durch die Freisetzung proinflammatorischer Faktoren, wie Zytoskeletten und Chemokinen, sind Thrombozyten aktiv an Entzündungsreaktionen beteiligt. Darüber hinaus bilden zirkulierende Thrombozyten Aggregate mit Leukozyten (PLA, platelet leukocyte aggregates) und fördern die Adhäsion zwischen Leukozyten und Endothelzellen über P-Selektin (CD62P) bzw. PSGL-1 (P-Selektin Glykoprotein Ligand 1) (C Furie, 1997; Chatterjee, von Ungern-Sternberg, et al., 2015; S. Massberg et al., 2003; Nkambule, Davison, & Ipp, 2015; Wirtz et al., 2015a). Somit sind Thrombozyten durch ihre vielfältigen Wechselwirkungen mit Entzündungs- und Endothelzellen wesentliche Regulatoren der Inflammation.

Beim Modell des akuten Myokardinfarktes findet durch Öffnen der Ligatur der LAD eine Reperfusion der vorher ischämischen Bereiche des linken Ventrikels statt. Im Bereich der Ligaturstelle entstandene Mikrothromben, die sich aufgrund des stagnierten Blutflusses und im Rahmen der physiologischen Hämostase gebildet haben, werden in die Mikrozirkulation des linken Ventrikels gespült. Durch geschädigte Endothelzellen im Ischämiegebiet kommt es zur Aktivierung der Thrombozyten und folglich zur Aktivierung der Blutgerinnung mit einer vermehrten Bildung von Mikrothromben in den infarzierten Arealen des Myokards (Nabil El-Maraghi, 1980; W. Herem, 1974).

Schon ein geringer Grad an myokardialer Ischämie führt zur Akkumulation von aktivierten (Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3 =$ GPIIb/IIIa positiver) Thrombozyten im Myokard. Anschaulich konnten dies Ziegler et al. mittels non-invasivem PET Imaging demonstrieren (Ziegler et al., 2016). Auch immunhistologisch konnte die Akkumulation von Thrombozyten (CD41 positive Zellen) nach Ischämie und Reperfusion bewiesen werden (Ziegler et al., 2016). Zusätzlich zur Einwanderung von Thrombozyten in das reperfundierte Myokard, findet eine vermehrte Infiltration und Ko-Lokalisation mit inflammatorischen Zellen (Leukozyten) statt (Kunkel, 1985; Liu et al., 2011).

Durch den Sauerstoffmangel zugrunde gegangene Kardiomyozyten führen durch ihre Nekrose zu einer Aktivierung inflammatorischer Prozesse, die dem Entzündungstyp einer

sterilen Entzündung entspricht (Nahrendorf & Swirski, 2013). Es kommt zur Freisetzung von DAMP's (Damage-associated molecular patterns) und daraufhin zu einer umfassenden Aktivierung des Komplementsystems und Toll-like Rezeptoren (TLRs)/Interleukin-1 (IL-1). Dies führt wiederum zu einer Aktivierung des nukleären Faktor-κB (NF-κB) Systems und zur Induktion der Freisetzung von Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen (Fang et al., 2015). Aktivierte Thrombozyten sind ebenfalls in der Lage die Expression des NF-κB Systems zu stimulieren und induzieren (Gawaz, 2001). Die Freisetzung proinflammatorischer Zyro- und Chemokine sorgt für eine fortschreitende Rekrutierung inflammatorischer Zellen, die vor allem am Rande des Infarktes (Übergangszone) zu einer Vergrößerung des Infarktschadens beitragen können (Ong et al., 2018).

Vielfach wurde beschrieben, dass nach akutem Myokardinfarkt eine Größenzunahme der Thrombozyten (MPV, mean platelet volume) sowie eine Zunahme der Thrombozytentanzahl erfolgt (Cameron, Phillips, Ibbotson, & Carson, 1983; Gao et al., 2016; Giles, Smith, & Martin, 1994). Diese "größeren", aktiveren Thrombozyten stammen zum Großteil aus der Milz und werden nach akutem Myokardinfarkt vermehrt ins Blut sezerniert (Gao et al., 2016). Im Blutstrom kommt es aufgrund des höheren Aktivierungsgrades der Thrombozyten zur vermehrten Bildung von Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten (PLA, platelet leukocyte aggregates) (Cerletti, Tamburrelli, Izzi, Gianfagna, & de Gaetano, 2012; Ed Rainger et al., 2015; Gao et al., 2016; Nkambule et al., 2015). Die vermehrte Bildung dieser Aggregate in der Frühphase des Infarktgeschehens wird vor allem durch die Interaktion des thrombozytären P-Selektin (CD62P) und dem P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 (PSGL-1) auf den Leukozyten vermittelt (Liu et al., 2011). CD62P (P-Selektin, PADGEM, GMP-140) ist ein in den α-Granula enthaltenes Protein, welches nach Aktivierung via Exozytose an der Thrombozytenoberfläche exprimiert und freigesetzt wird und die Wechselwirkungen zwischen Endothel und Leukozyten vermittelt (Yun et al., 2016).

Zusammenfassend tragen Thrombozyten nach Ischämie und Reperfusion demnach zu einer Entzündungsreaktion sowohl systemisch als auch im Myokard bei, deren Ziel es sein soll, den entstandenen myokardialen Schaden zu reparieren. Der Einstrom inflammatorischer Zellen wird grundsätzlich sowohl durch den entstandenen Zellschaden wie auch durch die mit dem Blutstrom einwandernden Leukozyten und aktivierten

Thrombozyten reguliert. Eine veränderte Regulation der Inflammation beispielsweise durch eine veränderte Thrombozytenfunktion, kann zu einer exzessiven Entzündungsreaktion führen und somit das Auftreten von Reperfusionschäden und chronischem Herzversagen begünstigen. Antithrombozytäre Therapien reduzieren die Schwere der Entzündungsreaktion und minimieren so das Risiko post-myokardialer Komplikationen (Liu et al., 2011).

2.5 Thrombozytäre Chemokinrezeptoren und Chemokine

Chemokine sind eine Gruppe chemotaktischer Zytokine mit einem Molekulargewicht von 8 bis 12 kDa (C. Wang, Chen, & Shen, 2018). Sie binden an und aktivieren Chemokinrezeptoren. Thrombozytäre CXC (alpha-) Chemokine konnte insbesondere ein Einfluss auf neutrophile Granulozyten nachgewiesen werden, wohingegen die CCL (beta-) Chemokine vor allem Monozyten und Lymphozyten zu beeinflussen scheinen (Gear & Camerini, 2003).

Chemokinrezeptoren können anhand der Position konservierter Cysteinreste in vier Subfamilien (CXC-, CC-, CX3C und C-) unterteilt werden (C. Wang et al., 2018). Der typische Aufbau eines Chemokinrezeptors besteht aus einem G-Protein gekoppelten 7-Transmembran-Rezeptor, drei intra- und extrazellulären Schleifen mit einem C-Terminus im Zytoplasma und einem N-Terminus an der Zelloberfläche. Die typischen Chemokinrezeptoren sind durch ihre G-Protein assoziierte Signaltransduktion charakterisiert, welche durch die Koppelung des Chemokinrezeptors an heterotrimere G-Proteine vermittelt wird. Zahlreiche Chemokinrezeptoren verfügen über mehrere Liganden, die zu deren Aktivierung führen (Chatterjee & Geisler, 2016). Auf Thrombozyten sind derzeit eine ganze Reihe von Chemokinrezeptoren bekannt, die durch freigesetzte Chemokine eine Veränderung der Thrombozytenfunktion vermitteln können (siehe Tabelle 1).

Thrombozyten haben neben ihrer zentralen Rolle bei der Hämostase weitere Funktionen im Rahmen systemischer und vaskulärer Inflammation sowie der angeborenen Immunabwehr und Regeneration (Chatterjee & Geisler, 2016; Gear & Camerini, 2003). Sie verfügen über Chemokinrezeptoren, sind in der Lage aktiv Chemokine freizusetzen und damit befähigt Leukozyten anzulocken und inflammatorische Prozesse zu modulieren. Essentiell für diese Mechanismen ist die Aktivierung der Thrombozyten, die durch primäre Agonisten wie ADP (Adenosindiphosphat), Thrombin und Kollagen stattfindet (Gear & Camerini, 2003). In Kombination mit niedrigen Leveln von primären Agonisten konnte gezeigt werden, dass auch Chemokine eine Aktivierung von Thrombozyten, ihre Aggregation und Adhäsion vermitteln (insbesondere CXCL12, CCL17 und CCL22 (C. Wang et al., 2018)). Thrombozyten-Chemokine wie CCL3, CCL5, CCL7, CCL17, CXCL1, CXCL5 und CXCL8, die die Funktionen von Leukozyten

und Endothelzellen beeinflussen sowie autokrin zur weiteren Aktivierung von Thrombozyten führen, werden nach Aktivierung aus den alpha-Granula freigesetzt (Brandt, Ludwig, Petersen, & Flad, 2000).

Tabelle 1: Thrombozytäre Chemokinrezeptoren und ihre Chemokinliganden modifiziert nach Chatterjee und Gear (Chatterjee & Geisler, 2016; Gear & Camerini, 2003).

Chemokin-rezeptor	Chemokinligand	Funktionelle Relevanz	Referenz
CCR1	CCL3 (MIP-1 α), CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP-3)	Nichtkompetitive Hemmung von CXCL12 Effekten, synergistischer Effekt mit PGE1, Chemotaxis	(Clemetson et al., 2000; Gear & Camerini, 2003; Golebiewska & Poole, 2015)
CCR3	CCL5, 7	Siehe CCR1	(Clemetson et al., 2000; Gear & Camerini, 2003; Golebiewska & Poole, 2015)
CCR4	CCL17 (TARC), CCL22 (MDC)	Thrombozytenaktivierung, Aggregation, synergistische Effekte bei geringen Konzentrationen ADP und Thrombin	(Clemetson et al., 2000; Gear & Camerini, 2003; Gear et al., 2001)
CXCR1	CXCL8 (IL-8)	Beeinflussung Megakaryozytenfunktion	(Gear & Camerini, 2003)
CXCR2	CXCL8, CXCL1 (GRO- α), CXCL5 (ENA-78), CXCL7 (NAP-2), MIF	Beeinflussung der Megakaryozyten- und Monozytenfunktion, Chemotaxis innerhalb der Thrombusformation, MIF Effekt noch nicht vollständig geklärt	(Gear & Camerini, 2003; Golebiewska & Poole, 2015)
CXCR4	CXCL12, MIF	Rezeptor Internalisierung, Aktivierung, Aggregation, Thrombusformation und Adhäsion, Migratorische Effekte auf Thrombozyten	(Chatterjee & Geisler, 2016; Chatterjee, Rath, & Gawaz, 2015; Clemetson et al., 2000; Golebiewska & Poole, 2015)
CXCR6	CXCL16	Degranulation, Aktivierung, Adhäsion von Thrombozyten, Interaktion mit Leukozyten	(O. Borst et al., 2012; Collado et al., 2018)
CXCR7	CXCL11, CXCL12, MIF	Rezeptor Ex- und Internalisierung,	(Chatterjee, Rath, et al., 2015)

		Survivalfaktor Thrombozyten	für
GAG	CXCL4 (PF4)	Synergistische Effekte bei geringen Konzentrationen ADP, Arachidonsäure und Thrombin	(Gear & Camerini, 2003; Golebiewska & Poole, 2015; Lord, Cheng, Farrugia, McCarthy, & Whitelock, 2017)

ADP = Adenosindiphosphat, ENA = epithelial-derived neutrophil-activating protein, GAG = Glykosaminoglykane, GRO- α = growth-regulated oncogene- α , IL = Interleukin, NAP = neutrophil-activating peptide, MCP = monocyte chemotactic protein, MDC = macrophage-derived chemokine, MIF = migration inhibitory factor, MIP = macrophage inflammatory protein, PGE1 = Prostaglandin E1, TARC = thymus and activation-regulated chemokine

2.6 Der thrombozytäre CXCR7 Rezeptor

Der CXCR7 Rezeptor, welcher auch den Namen ACKR3 trägt (ACKR = atypical chemokine receptors), ist ein nicht-klassischer 7-Transmembran-Rezeptor (Chatterjee, Rath, et al., 2015). Den meisten atypischen Chemokinrezeptoren mangelt es an funktionellen Domänen zur Gi Protein gesteuerten Signaltransduktion (C. Wang et al., 2018). Wie der CXCR7 Rezeptor intrazelluläres Zellsignaling vermittelt, konnten bisherige Studien nicht eindeutig belegen. Derzeit wird davon ausgegangen, dass der CXCR7 Rezeptor je nach Zelltyp und -differenzierung verschiedene Wege zur Signaltransduktion nutzt (C. Wang et al., 2018). Seine Funktion als Scavenger- oder Decoyrezeptor, der extrazelluläre Chemokinliganden (CXCL12 und CXCL11) bindet, konnte hingegen vielfach beschrieben werden (Betterman & Harvey, 2014; Klein et al., 2014; Naumann et al., 2010). Darüber hinaus ist der CXCR7 Rezeptor in der Lage, durch die Bildung von Heterodimeren mit dem CXCR4 Rezeptor ein CXCR4 vermitteltes Zellsignaling zu induzieren (Levoye, Balabanian, Baleux, Bachelerie, & Lagane, 2009; C. Wang et al., 2018). Die Expression von CXCR7 ist essenziell für die Entwicklung des kardiovaskulären Systems und muskuläre Differenzierung (Melchionna et al., 2010). Ein *Knockout* des CXCR7 Gens manifestiert sich in pränataler Letalität mit Defekten des Ventrikelseptums, kardialer Hypertrophie und Verdickung der Pulmonar- und Aortenklappen und teilweise überreitender Aorta (Sierro et al., 2007; Yu, Crawford, Tsuchihashi, Behrens, & Srivastava, 2011).

Auf Thrombozyten fand der CXCR7 Rezeptor Beachtung durch die Entdeckung, dass das vielerforschte Chemokin CXCL12 neben CXCR4 an CXCR7 bindet und zum Scavenging von CXCL12 und zur Aktivierung von MAP Kinasen führt (Guyon, 2014). Im Gegensatz

zu CXCR4 wird CXCR7 deutlich geringer auf der Oberfläche von Thrombozyten exprimiert (Chatterjee et al., 2014). Je nach Verfügbarkeit der Liganden CXCL12, CXCL11 und MIF zeigt sich eine veränderte Dynamik in der Expression des CXCR7 Rezeptors. CXCR4 wird in Anwesenheit von CXCL12 und MIF internalisiert, wohingegen CXCR7 durch CXCL12 an der Oberfläche der Thrombozyten externalisiert wird (Chatterjee & Geisler, 2016). Die besondere Bedeutung der Wechselwirkungen von CXCR4, CXCR7 und dem Liganden CXCL12 auf die Funktionsweise der Thrombozyten scheint auch im Rahmen von kardiovaskulären Erkrankungen eine besondere Rolle zu zukommen. So zeigen laut Rath et al. die Thrombozyten von Patienten mit akutem Koronarsyndrom im Vergleich zu Patienten mit stabiler koronarer Herzerkrankung eine erhöhte Oberflächenexpression von CXCR7 mit erhöhten Leveln von CXCL12, wohingegen die CXCR4 Expression unverändert ist (Rath et al., 2014). Erhöhte CXCR7-Expressionslevel auf Thrombozyten sind darüber hinaus mit einer funktionell verbesserten Herzfunktion (verbesserte linksventrikuläre Ejektionsfraktion) nach myokardialer Ischämie assoziiert (Rath et al., 2018)

Nach heutigem Stand verfügt der CXCR7 Rezeptor über fünf natürlich vorkommende Liganden (C. Wang et al., 2018), wovon die meisten Studien vor allem die CXCR7 vermittelten Funktionen von CXCL12 (SDF-1), CXCL11 (I-TAC) und MIF evaluieren. CXCL12 bindet im Vergleich zu CXCR4 mit 10-fach höherer Affinität an CXCR7 (Balabanian et al., 2005). Der CXCL12 vermittelte Effekt von CXCR7 auf endotheliale Progenitorzellen hinsichtlich ihres Überlebens ließ sich auch bei Thrombozyten feststellen (Chatterjee et al., 2014; Dai et al., 2011; Yan et al., 2012).

Die Bindung von CXCL11 an CXCR7, fördert im Allgemeinen die Zellproliferation (Gear & Camerini, 2003). Ausgehend von Versuchen mit humanen Thrombozyten ist davon auszugehen, dass sowohl CXCL12 als auch CXCL11 und MIF wesentliche Funktionen beim Überleben der Thrombozyten mittels ihrer Bindung an den CXCR7 Rezeptor vermitteln (Chatterjee, Rath, et al., 2015). MIF ist ein proinflammatorisches Zytokin mit Chemokin-ähnlicher Funktion. Produziert von Endothelzellen, Epithelzellen, eosinophilen Granulozyten und Makrophagen im Rahmen inflammatorischer Prozesse, ist es in der Lage, Thrombozyten via CXCR7 AKT signaling zu aktivieren und deren Apoptose zu limitieren (Alampour-Rajabi et al., 2015; Chatterjee, von Ungern-Sternberg, et al., 2015; Wirtz et al., 2015b).

Eine genaue Charakterisierung der Funktion des CXCR7 Rezeptors auf den Thrombozyten vor allem im Rahmen pathologischer Bedingungen ist jedoch weitestgehend unerforscht. Bei Hypoxieversuchen ist eine Zunahme der CXCR7 Expression auf Endothelzellen und Glioma Zelllinien beschrieben (Esencay, Sarfraz, & Zagzag, 2013). Darüber hinaus wird dem CXCR7 Rezeptor eine große Bedeutung beim Tumorwachstum, tumorassoziierten Angiogenese und Metastasierung zugeschrieben, da auch hier eine deutliche Veränderung der Expression des Rezeptors nachgewiesen werden konnte (Fan, Wang, Yan, Xiao, & Yang, 2018; Qian et al., 2018; X. Sun et al., 2010). Durch die Beeinflussung der Migration von hämatopoetischen Stammzellen (HSC, hematopoetic stem cells) wird der CXCR7 Rezeptor als potentieller regulatorischer Angriffspunkt für gezielte Stammzelltherapien weiter erforscht (Asri, Sabour, Atashi, & Soleimani, 2016; Dai et al., 2011; Melo, Ferro, Duarte, & Olalla Saad, 2018). In der kardiovaskulären Forschung konnten Hao et al. zeigen, dass der endothiale *Knockout* von CXCR7 zu einer Verschlechterung der Herzfunktion und kardialem Remodeling nach Myokardinfarkt führt und damit ein potenzielles Ziel therapeutischer Strategien darstellt (Hao et al., 2017).

Es ist anzunehmen, dass der thrombozytäre CXCR7 Rezeptor einen Einfluss auf die Thrombozytenfunktion hat und sein Verlust Auswirkungen auf die inflammatorischen Prozesse nach Myokardinfarkt zeigt. Im Rahmen dieser Arbeit wird es möglich, durch die Generierung eines megakaryozyten- bzw. thrombozytenspezifischen *Knockout* Modells (Deletion des CXCR7 Gens mittels Pf4-Cre Promoter) die Funktion des CXCR7 Rezeptors auf Thrombozyten *in vivo* und *in vitro* genauer zu verstehen und die Auswirkungen dieser Deletion auf die Pathogenese nach akutem Myokardinfarkt zu charakterisieren.

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Ziele der Arbeit

Die Expression des CXCR7 Rezeptor auf zirkulierenden Thrombozyten ist laut Rath et al. bei Patienten mit akutem koronarem Syndrom signifikant erhöht (Rath et al., 2014). Bei Patienten mit ST-Strecken-Hebungs-Myokardinfarkt (STEMI = ST-elevation myocardial infarction) korreliert die relative Überlebensrate mit der Expression von CXCR4 und CXCR7 auf den Thrombozyten und sie zeigen darüber hinaus eine verbesserte Funktion des linken Ventrikels (LVEF, linksventrikuläre Ejektionsfraktion) (Rath et al., 2014; Rath et al., 2018). Im murinen Modell liefern erstmals Hao et al. Belege für ein schlechteres Outcome nach Myokardinfarkt beim Verlust von endothelialen CXCR7 (Hao et al., 2017).

Die genauen Wirkmechanismen des thrombozytären CXCR7 Rezeptors beim Geschehen des akuten Myokardinfarktes sind jedoch weitestgehend unerforscht. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich damit, den konditionellen *Knockout* von CXCR7 auf Thrombozyten zu charakterisieren und die Mechanismen im Rahmen der pathologischen Situation des akuten Myokardinfarktes zu verstehen. Mit der grundlagenbasierten Charakterisierung des CXCR7 Rezeptors auf Thrombozyten ist es möglich, die regulatorischen Mechanismen des CXCR7 Rezeptors auf Thrombozyten besser zu verstehen und spezifische Therapien zu entwickeln.

Der erste Teil der Arbeit dient vor allem der Sicherstellung einer validen Methodik zur Induktion der myokardialen Ischämie und Reperfusion im Mausmodell. Eine erste Beschreibung dieser Methodik existiert bereits seit 1954 (Johns & Olson, 1954). Seitdem wird das Verfahren zur Induktion der myokardialen Ischämie kontinuierlich weiterentwickelt und verändert. Für diese Arbeit wurde die in unserem Labor gängige Methodik (Oliver Borst et al., 2011) unter Anwendung der 3R Prinzipien (Russell & Burch, 1959) verändert und evaluiert.

Welche Auswirkungen die Deletion des Thrombozyten-assoziierten *Knockouts* von CXCR7 im pathologischen Geschehen hat, wird im zweiten Teil dieser Arbeit betrachtet. Unter Anwendung des evaluierten Modells zur Induktion der myokardialen Ischämie wird die Phase der akuten Inflammation nach 24 h Reperfusion am *Knockout* Modell beschrieben.

Im letzten Teil wird auf das murine Modell des konditionellen *Knockouts* von CXCR7 auf Thrombozyten eingegangen und die Veränderungen der Funktion der Thrombozyten genauer charakterisiert. Dazu wird ein großes Spektrum an *in vitro* und *in vivo* Modellen verwendet, um eine möglichst umfassende Charakterisierung des Phänotyps der CXCR7 defizienten Thrombozyten darzustellen.

Da Thrombozyten eine bedeutende Rolle im Krankheitsgeschehen des akuten Myokardinfarktes spielen (Fang et al., 2015; Gawaz, 2004; Nikolaos, 2006), kommt ihnen sowohl bei der akuten als auch bei der langfristigen Therapie eine übergeordnete Rolle zu. Eines der Hauptziele der antithrombotischen Therapie nach akutem Infarkt ist die Suche nach pharmakologisch wirksamen Substanzen, die das Auftreten von thrombotischen Ereignissen verhindern, ohne den physiologischen Vorgang der Hämostase zu gefährden (Kikkert & Damman, 2018). Zusätzlich zielen neuere Therapien darauf ab, den nach Revaskularisierung des Infarktes entstehenden Reperfusionsschaden möglichst zu minimieren und für eine gute Heilung des Infarktes zu sorgen (Hausenloy & Yellon, 2013). Durch ihre Beteiligung an Hämostase und Inflammation sind Thrombozyten ein optimales Ziel therapeutischer Strategien nach akutem Myokardinfarkt.

Durch die Charakterisierung des Verlustes des CXCR7 Rezeptors auf Thrombozyten im murinen *Knockout* Modell ist es möglich, die Effekte dieses Rezeptors genauer zu verstehen. Die Erkenntnisse aus der Charakterisierung der Thrombozytenfunktion und ihre Auswirkungen auf das Outcome nach Myokardinfarkt können dazu beitragen, Therapieansätze zu entwickeln, die einen modulatorischen Effekt auf die Thrombozytenfunktion haben, die Hämostase jedoch nicht beeinflussen und sich günstig auf die Immunantwort nach Infarkt auswirken. Der CXCR7 Rezeptor auf Thrombozyten könnte demnach ein mögliches Ziel dieser spezifischen Therapien werden.

3.2 Material

3.2.1 Geräte

Beatmungsgerät	Physiosuite for Mice & Rats, Kent Scientific Corporation, Torrington, USA
Boyden Chamber	48-Well Micro Chemotaxis Chamber, Neuro Probe, Maryland, USA
Durchflusszytometer	BD Facs Calibur, Becton Dickinson, San Jose, California, USA
ELISA Microplate Reader	Modell 595nm BioRad ELISA-Reader, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, California, USA
Flusskammer	Weite 5 mm, Tiefe 50 µm, Maastricht Instruments, Maastricht, Niederlande
Infrarot Bild System (Infrared Imaging System)	Odyssey, LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg, Deutschland
Inkubator	CO2 Incubator MCO-18AIC, SANYO Electric Co. Ltd., Moriguchi, Japan
Mikrowelle	Bosch, Deutschland
Mikrotom	Jung Multicut 2045, Leica Instruments, Nussloch, Deutschland
Narkosegerät	Völker GmbH, Kaltenkirchen, Deutschland
pH Meter	HI 9025 microcomputer, Hanna Instruments Deutschland GmbH, Vöhringen, Deutschland
Schüttler	KS 260 basic, IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Sysmex Hämatologieanalysator	KX-21N, Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt
Ultraschallgerät	VevoStrain 2100, VisualSonics, Toronto, Kanada
Waage	Kern CM 150-IN Pocket Balance, KERN & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland

Mikroskope

Polarizing Transmitted Light Mikroskop	Optiphot-2 inklusive Kamera Nikon Digital Sight DS-U1, Nikon, Düsseldorf, Deutschland
Stereomikroskop	ZEISS Stemi 2000-C, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland

Western Blot Zubehör

Blotkammer	Semi-Dry-Blotter, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Laufkammer	Invitrogen™ Novex™ XCell SureLock™, Invitrogen AG, Carlsbad, Kalifornien, USA
Spannungsgerät	Gibco BRL PS 304 Electrophoresis Power Supply, Life Technologies Corporation, Carlsbad, Kalifornien, USA

Zentrifugen

Eppendorf Microcentrifuge	Modell 5415C, Eppendorf Deutschland, Hamburg, Deutschland
Hettich Zentrifugen	Modell Rotina 420R, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Heraeus Multifuge	Modell 1s, Thermo Scientific Heraeus centrifuges, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

3.2.2 Gebrauchsgegenstände

Braunüle zur Intubation	Vasofix Braunüle 0,90 x 25 mm G 22 blau, FEP, B. Braun, Melsungen, Deutschland
Deckgläser in verschiedenen Größen	R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland
EDTA Mikro-Probengefäß	1,3 ml, Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Einmalkapillaren	Einmal-Kapillarpipetten, Hirschmann minicaps end to end Natrium Heparin, Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland

Elektrokauter	Bovie Aaron Medical, Change-A-Tip High Temperature Power Handle, St. Petersburg, Florida, USA
Eppendorf Reaktionsgefäße in verschiedene Größen	Safe-Lock Tubes, Eppendorf Deutschland, Hamburg, Deutschland
Fettstift	Super PAP Pen Liquid Blocker, Invitrogen AG, Carlsbad, Kalifornien, USA
Gewebeeinbettung	Tissue-Tek O.C.T. TM Compound, Sakura Finetek USA, Inc., Torrance, California, USA
Gewebekulturschaden in verschiedenen Größen	35x10mm, 15x60mm, 20x100mm, Cell Culture Dishes, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Gewebematrix	Mouse Heart Slicer Matrix HSMS001-1, Zivic Instruments, Pittsburgh, Pennsylvania, USA
Insulinspritzen	30G 0,3 x 8 mm BD-Microfine TM U-40 Insulin, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey, USA 27G 0,4 x 12 mm Myjector U-100 Insulin, Terumo Europe N.V., Leuven, Belgien
Kanülen	BD Microlance TM 3, verschiedene Größen: 27G 0,4 x 19 mm, Becton Dickinson and Company Limited, Drogheda, Irland B. Braun Sterican 30G 0,3 x 12 mm, B. Braun, Melsungen, Deutschland
Kryotomklingen	Mikrotomklinge S35, PFM medical AG, Nonnweiler, Deutschland
Membran für Boyden Chamber	Pore size 3 µm, Polycarbonate membranes, 25x80mm, (100 filters), Neuro Probe, Maryland, USA
Nahtmaterial / Ligaturfaden	Perma Hand (7-0); Prolene (6-0); Vicryl (6-0), Ethicon, Norderstedt/Glashütte, Deutschland

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Neubauer-Zählkammer	C-Chip, Neubauer Improved Einweg-Zählkammer, ehemals Biochrom GmbH nun Merck, Darmstadt, Deutschland
Operationsbesteck	Arretierender Nadelhalter gebogene stumpfe Pinzetten Kleine Präparierschere große Präparierschere kleine Gefäßklemme Klemmenhalter
Objektträger	Super FrostPlus, R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Polyethylentube	Fine Bore Polythene Tubing 0.28mm ID 0.61mm OD, Portex™, Smiths Medical International Ltd., Kent, Vereinigtes Königreich
Polystyrolröhrchen für die Durchflusszytometrie	5ml Rundbodenröhrchen, Polystyrol, Falcon Corning Inc., Corning, New York, USA
PVDF Membran	Polyvinylidenfluorid Membran, Immobilan-FL, Transfer Membranes, Pore size 0,45 µm, Merck, Darmstadt, Deutschland
Spritzen in verschiedenen Größen	Firma B. Braun, Melsungen, Deutschland
Schaber (Zellkultur)	Corning cell lifter Polyethylene, sterile, Corning Inc., Corning, New York, USA
Tupfer	Mikrochirurgische Tupfer Ethikeil, Ethicon, Norderstedt/Glashütte, Deutschland
Ultraschallgel	Sonogel Vertriebs GmbH, Bad Camberg, Deutschland
Wattestäbchen	Bel premium, CMC Consumer Medical Care GmbH, Sontheim/Brenz, Deutschland

Whatman™ Blotting Paper	Grade GB 005, Gel Blotting Paper, GE Healthcare Life Sciences UK Ltd., Amersham Place, Vereinigtes Königreich
Zellsieb	Verschiedene Porengrößen 40 und 70 µm, Zellsiebe Falcon, Corning Inc., Corning, New York, USA
96-Well Platten	96-Well Thermo Fast Detection Plate, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

3.2.3 Reagenzien und Chemikalien

Albumin Fraction V (pH 7,0)	BSA (Bovines Serum Albumin); PanReac, AppliChem, MW = approx. 68000 g/mol
Ampuwa	Steriles Wasser, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d.H., Deutschland
Apyrase	from potatoes, ATPase ≥200 units/mg protein, lyophilized powder, Sigma Aldrich, Co., St. Louis, Missouri, USA
Bromphenolblau	Sigma Aldrich, Co., St. Louis, Missouri, USA
β-Mercaptoethanol	2-Mercaptoethanol, Sigma Aldrich, Co., St. Louis, Missouri, USA
Citric Acid	Zitronensäure; ACS reagent, ≥ 99,5%, Sigma Aldrich, Co., St. Louis, Missouri, USA, MW = 192,12 g/mol
DAB Kit	#DS9800, Bond Polymer Refine Detektion, Leica Biosystems Richmond, Illinois, USA
D - (+) -Glucose	BioXtra ≥ 99,5%, Sigma Aldrich, Co., St. Louis, Missouri, USA, MW = 180,16 g/mol
Eisessig	Acetic acid glacial ≥99.7% ACS, VWR Life Science, Darmstadt, Deutschland
Enthaarungscreme	Veet Enthaarungscreme Sensitive, Reckitt Benckiser, Slough, Vereinigtes Königreich

Ficoll-Paque Plus	Endotoxin tested < 0,12 EU/ml, Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden
Formaldehydlösung	4%, neutral gepuffert, Otto Fischar GmbH & Co KG, Saarbrücken, Deutschland
HEPES	Pufferan ≥ 99,5% f.d. Gewebezucht, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Kollagen Reagens	HORM Suspension, Collagen Reagens HORM Suspension (KRH), Stocklösung 1 mg/ml, Takeda Austria GmbH, Linz, Österreich
Methanol	zur Analyse EMSURE ACS, ISO, Reag. Ph Eur, Merck KG Merck KG, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt, Deutschland, MW = 84,01 g/mol
Paraplast Plus	Tissue Infiltration/Embedding Medium, Leica Biosystems Richmond, Illinois, USA
PBS mit und ohne Calcium	Dulbeccos Phosphate Buffered Saline modified without calcium chloride and magnesium chloride
	Dulbeccos Phosphate Buffered Saline with MgCl ₂ and CaCl ₂ , Sigma Aldrich, Co., St. Louis, Missouri, USA
PBS Tabletten	Phosphate Buffered Saline Tablets, gibco, Life Technologies Corporation, Carlsbad, Kalifornien, USA
Prostaglandin	I ₂ , Sodium Salt 1mg, Merck, Darmstadt, Deutschland
Protease Inhibitor	Cocktail (100 x), 5871S, Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA
Proteinblocklösung	f.d. Immunhistochemie, Protein Block Serum-Free, Ready-to-use, Dako, Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Roti -Block	Blockierungsreagenz für Western Blot und ELISA, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland

Roti-Histokitt	Synthetisches Einschlusmittel f.d. Histologie, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Roti-Histol	f.d. Histologie, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
D (+) Saccharose	$\geq 99,5\%$, RNase/DNase-frei, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland, MW = 342,3 g/mol
SDS	ultra pure $\geq 99,5\%$ f.d. Elektrophorese, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland, MW = 288,38 g/mol
Sodium chloride	Natriumchlorid; Molecular biology grade, AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland, MW = 55,44 g/mol
tri – Natriumcitrat – Dihydrat	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland, MW = 294,10 g/mol
Tris – Hydrochlorid	Pufferan $\geq 99\%$, p.a., Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland, MW = 157,6 g/mol
Tween 20	for synthesis, 50 g/l, Merck, Darmstadt, Deutschland
Wasserstoffperoxid	30%, ROTI PURAN p.a., Iso, stabilisiert, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland, MW = 34,01 g/mol

3.2.4 Rezepte: Lösungen und Puffer

ACD Puffer	12,5 g Na ₃ -Citrat 294,1 g/mol 6,82 g Zitronensäure 10 g D-Glucose ad 500 ml Aqua dest. Mit NaOH 1 N pH 4,69 einstellen, steril filtrieren, Lagerung 4 °C
Blotpuffer 10-fach	30 g Tris 25 mM 112,6 g Glycin 150 mM ad 1 l Aqua dest.
Citrat Puffer	41 ml tri-Natriumcitrat-Dihydrat 0,1 M (2,94 g in 100 ml Aqua dest.)

	9 ml Citronensäure 0,1 M (1,92 g in 100 ml Aqua dest.) 450 ml Aqua dest., pH-Wert 6
Evans-Blue Färbelösung (3%)	1,5 g Evans-Blue 200 µl (1000 U) Heparin gelöst in 50 ml PBS
Kaliumchloridlösung (1 M Lösung, zur intrakardialen Injektion)	0,74 g auf 10 ml PBS
Laufpuffer 10-fach	30 g Tris 25 mM 144 g Glycin 193 mM 10 g SDS ad 1 l Aqua dest.
5 x Loading Puffer für Western Blot	6,5 ml 1M Tris HCl pH 6,8 2 ml 10% SDS 1 ml Glycerin 1 Spatelspitze Bromphenolblau, Alliquots zu 475 µl herstellen, vor Gebrauch Zugabe von 25 µl β-Mercaptoethanol
Lyse Puffer	Cell Lysis Buffer, BD Pharmingen, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey, USA
	Cell Lysis Buffer (10x), Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA
Triphenyltetrazoliumchlorid-Lösung (1%)	0,5 g TTC gelöst in 50 ml PBS
Tyrodespuffer 10-fach	80 g NaCl 10,15 g NaHCO ₃ 1,95 g KCl ad 1000 ml Aqua dest., steril filtrieren, bei 4 °C aufbewahren
Tyrodespuffer 1-fach (1 x)	10 ml 10-fach Tyrodespuffer 90 ml Aqua dest.

0,1 g BSA (Albumin Fraction V)
0,1 g D-(+)-Glucose; pH-Wert einstellen mit HEPES

+ Calcium 2mM: 1ml Calciumchlorid [0,1M] ad 50ml
Tyrodes (1 x)
+ Calcium 1mM: 0,5ml Calciumchlorid [0,1M] ad 50ml
Tyrodes (1 x)

3.2.5 Färbelösungen

Eosin G	C.I. 45380, Pulver, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland, 1%ige Lösung, Lösen in Aqua dest. und Zugabe 1 Tropfen Eisessig
Evans Blue	Dye content \geq 75%, Synonym Direct Blue 53, Sigma Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA
Giemsa	Stammlösung für die Mikroskopie, Azur-Eosin-Lösung, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Hämatoxylinlösung A	nach Weigert f. d. Mikroskopie, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Mayers Hämalaunlösung	f. d. Mikroskopie, Merck, Darmstadt, Deutschland, für die Herstellung der Färbelösung für die H.E. Färbung 1:5 verdünnt mit Aqua dest.
May Grünwald	Lösung f. d. Mikroskopie, Eosin-Methylenblau-Lösung, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Triphenyltetrazoliumchlorid	2,3,5- TTC \geq 98% (HPLC), Synonym Tetrazolium Red, Sigma Aldrich, Co., St. Louis, Missouri, USA
Trypanblau	Trypan Blue solution 0.4%, for microscopy, Sigma Aldrich, Co., St. Louis, Missouri, USA

3.2.6 Antikörper und rekombinante Proteine

Western Blot Antikörper:

CXCR4 Antikörper	NB100-74396, CXCR4 Antibody, Novus Biologicals USA, Littleton, CO, USA
------------------	--

CXCR7 Antikörper	NBP1-31309, CXCR7/RDC-1 Antibody, Novus Biologicals USA, Littleton, CO, USA
α -Tubulin	α -Tubulin (DM1A) Mouse mAb, Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA
Sekundärantikörper	IRDye 800CW Goat anti-Mouse IgG (H + L), 0.1 mg, [P/N 925-32210],
	IRDye 680LT Goat anti-Rabbit IgG (H + L), 0.1 mg, [P/N 925-68021], LI-COR Biosciences GmbH, Lincoln, Nebraska, USA

Antikörper für die Durchflusszytometrie:

Rat anti mouse GPIba/CD42b-FITC	Emfret Analytics GmbH & Co. KG, Eibelstadt, Deutschland
Rat anti mouse GPIba/CD42b-Dylight 649	Emfret Analytics GmbH & Co. KG, Eibelstadt, Deutschland
Rat anti mouse CD62P-FITC	Emfret Analytics GmbH & Co. KG, Eibelstadt, Deutschland
Rat anti mouse Integrin $\alpha_{IIb}\beta_{III}$ -PE	Emfret Analytics GmbH & Co. KG, Eibelstadt, Deutschland
Rat IgG Dylight 649	Emfret Analytics GmbH & Co. KG, Eibelstadt, Deutschland
Rat IgG FITC	Emfret Analytics GmbH & Co. KG, Eibelstadt, Deutschland
APC anti mouse CD45	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
APC anti-mouse CD3	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
APC anti mouse CD14	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
PE anti mouse Ly6G	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
Anti mouse CD11b APC	eBioscience, San Diego, Kalifornien, USA

Anti mouse LY6C APC	eBioscience, San Diego, Kalifornien, USA
APC Rat IgG2b	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
APC Rat IgG2a	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
PE Rat IgG2a	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
Rat IgG2b APC	eBioscience, San Diego, Kalifornien, USA
LEGENDplex	Multi-Analyte Flow Assay Kit, Custom Mouse Panel, BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA

Antikörper für die Immunhistologie:

B220	CD45R/B220, rat, #553084, BD Pharmingen, Franklin Lakes, New Jersey, USA
CD3	rabbit, #RBK024, Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland
CD42b	rabbit, #ab183345, Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Cleaved Caspase-3	rabbit, #9661, Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA
Ki-67	rabbit, #RM-9106-S1, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Ly6G	rat, #551459, BD Pharmingen, Franklin Lakes, New Jersey, USA
MHCII	rat, #NBP1-43312, Novus Biologicals USA, Littleton, CO, USA
Phospho-STAT3 (pStat3)	rabbit, #ADI-905-242-100, Enzo Life Sciences, Inc., Farmingdale, New York, USA
AffiniPure Rabbit Anti-Rat IgG (H+L)	#312-005-045, Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Cambridgeshire, Vereinigtes Königreich

Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Rabbit #111-035-144, Jackson ImmunoResearch IgG (H+L) Europe Ltd., Cambridgeshire, Vereinigtes Königreich

Rekombinante Proteine:

CXCL12	Recombinant CXCL12/SDF-1a, #350-NS-010/CF, R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA
CXCL14	Recombinant Human CXCL14 (BRAK), #589602, BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
MCP-1	Recombinant Human CCL2/MCP-1 Protein, #279-MC-010, R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA

3.2.7 Medikamente und Infusionslösungen

Atipamezolhydrochlorid	Antisedan, 5 mg/ml, Vetoquinol Ismaning, Deutschland
Augensalbe	Bepanthen Augen- und Nasensalbe, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland
Buprenorphinhydrochlorid	Buprenovet, 0,3 mg/ml, Bayer, Animalcare Limited, York, Vereiniges Königreich
Enrofloxacin	Baytril 2,5% orale Lösung, Firma Bayer, Leverkusen, Deutschland
Fentanylcitrat	Fentadon, 50 µg/ml, Eurovet Animal Health, Bladel, Niederlande
Flumazenil	Flumazenil HEXAL, 0,1 mg/ml, HEXAL AG, Holzkirchen
Glucose 5%	Injektionslösung, B.Braun, Melsungen, Deutschland
Isofluran CP	1 ml/ml, cp-pharma, Burgdorf; Deutschland

Medetomidinhydrochlorid	Sedator, 1 mg/ml, Eurovet Animal Health, Bladel, Niederlande
Midazolam	Midazolam-hameln 1 mg/ml, hameln pharma plus GmbH, Hameln, Deutschland
Natriumchlorid 0,9%	Isotonische Kochsalzlösung, Fresenius Infusionslösung, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland
Ringerlactat	Ringer-Injektionslösung, B.Braun, Melsungen, Deutschland

3.2.8 Software

Bildverarbeitung und Auswertung	AxioVision, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland, Image J, public domain, Open Source, National Institutes of Health
FACS-Auswertung	FlowJo, LLC LEGENDplex v 8.0
Literaturverwaltung	Endnote X8, Clarivate Analytics, Boston, Massachusetts; USA
Mikroskopierprogramm	NIS-Elements, Nikon, Düsseldorf, Deutschland
Statistikprogramm	PRISM, GraphPad Software 7.03, La Jolla, California, USA
Tabellenkalkulation	Excel 2016, Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
Textverarbeitung	Word 2016, Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
Ultraschallauswertung	VevoLAB und VevoStrain; Vevo2100, FUJIFILM VisualSonics, Toronto, Kanada

3.3 Methoden

3.3.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Für diese Arbeit wurden hauptsächlich CXCR7 homozygot gefloxtete Tiere mit einer Pf4-Cre Rekombinase verwendet (Bezeichnung der Linie: B6.Cg-Thy1a-(Ackr)Cxcr7tm2Yzo -Tg(Pf4-cre)Q3Rsko/J). Die LoxP sites befinden sich um Exon 2 des Ackr3 Gens und so sorgt bei Cre-positiven, homozygot geflochtenen Tieren die Cre Aktivität am plättchenspezifischen Promotor (platelet factor 4 = Pf4-Cre) für einen megakaryozytären bzw. thrombozytären *Knockout* des CXCR7 Rezeptors. Zum Verständnis der Legenden und Deklaration wurden in dieser Arbeit die Pf4-Cre positiven Tiere als *Knockouts* (-/-) und die Pf4-Cre negativen Tiere als Wildtypen (fl/fl) definiert.

Die Tiere stammen aus Eigenzucht. Die Verpaarung erfolgte mit Pf4-Cre positiven männlichen und ausschließlich Pf4-Cre negativen weiblichen Tieren. Für die Versuche wurden Pf4-Cre positive Tiere als *Knockouts* (-/-) und Pf4-Cre-negative Wurfgeschwister als Wildtyp-Kontrollen (fl/fl) verwendet.

Der Vergleich der Zuchtparameter (siehe 4.2) erfolgte anhand von Eigenzuchten der Linien Pf4-Cre CXCR7 und C57Bl/6. Die Etablierung des Protokolls zur Erzeugung einer myokardialen Ischämie durch Ligatur der LAD erfolgte mittels C57Bl/6 Tieren aus Eigenzucht (siehe 3.3.2, 4.1).

Die Tiere wurden grundsätzlich in Gruppenhaltung mit bis zu 5 Tieren in Makrolon Typ II long Käfigen gehalten. Einzelhaltung fand lediglich bei männlichen Tieren statt, die aufgrund von Territorialverhaltens und Rangkämpfen getrennt wurden. Einzeln gehaltene Tiere erhielten immer ein Häuschen und wurden in Sicht-, Hör- und Geruchsweite zu ihren Artgenossen gehalten. Den Tieren wurde ausreichend Nistmaterial in Form von sterilisiertem Zellstoff sowie Häuschen oder Röhren als Enrichment (nicht bei in Gruppen gehaltenen Männchen) angeboten. Die Haltung in der Tierhaltung erfolgte bei einer konstanten Temperatur von 20-23 °C und einer Luftfeuchte von 50 bis maximal 60%. Der Luftaustausch wurde kontinuierlich geregelt und die Tiere wurden in Räumen mit einem konstanten Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden gehalten. Die Beleuchtungsintensität betrug während der Tagphase maximal 50 Lux. Die Fütterung erfolgte ad libitum mit Haltungsfutter (Ssniff, Soest), die der Zuchttiere mit energiereicherem Zuchtfutter (Ssniff, Soest). Wasser stand immer ad libitum zur

Verfügung. Die Einstreu bestand aus autoklaviertem und entstaubtem Weichholzgranulat, welches einmal wöchentlich gewechselt wurde.

Die Tierversuche im Rahmen dieser Arbeit wurden durch das Regierungspräsidium Tübingen unter den Nummern M8/14, M18/14 sowie M20/15 und M5/17 nach §8 des Tierschutzgesetzes in der Fassung vom 18.05.2006 (Änderung vom 04.06.2013) und der Anzeige nach §4 Abs. 3 vom 05.10.2017 genehmigt.

3.3.2 Myokardiale Ischämie und Reperfusion – Etablierung eines Protokolls zur Induktion der myokardialen Ischämie im Mausmodell

Die bisher gängige Methodik zur Induktion und Evaluierung des akuten Myokardinfarktes im Mausmodell wurde 2011 von Borst et al. beschrieben und in unserem Labor etabliert (Oliver Borst et al., 2011). Das 3R Prinzip der Labortierkunde, welches den Ersatz (Replacement = Vermeidung: Ersatz des Tierversuchs durch eine andere Methode), die Reduktion von Tierzahlen (Reduction = Verringerung: Anstreben der minimal notwendigen Zahl von Versuchstieren) und die Verringerung der Belastung der Versuchstiere (Refinement = Verbesserung: z.B. durch Reduktion von Schmerzen) fordert, wurde im ersten Teil dieser Arbeit als Grundlage zur Etablierung eines standardisierten Protokolls zur Induktion der myokardialen Ischämie im Mausmodell verwendet.

3.3.2.1 Anwendung des 3R Prinzips auf die bestehende Methodik

Der Versuchsablauf der Induktion der myokardialen Ischämie lässt sich in folgende Versuchsteile gliedern:

1. Baseline Ultraschall am Tag 0
2. Vertiefung der Anästhesie mittels Injektionsnarkose
3. Intubation
4. Eröffnung des Thorax
5. Darstellung der LAD
6. Induktion der Ischämie mittels Ligatur der LAD
7. Ischämiephase
8. Bei Reperfusionsversuchen: Beenden der Ischämiephase mittels Öffnens der Ligatur
9. Verschluss des Thorax

10. Verschluss Muskulatur und Hautnaht
11. Aufwachphase
12. Regenerationsphase

Abweichend von dem von Borst et al. beschriebenen Versuchsaufbau wurde ein Protokoll entwickelt, welches in den entsprechenden Versuchsteilen durch verschiedene Maßnahmen vor allem zu einem Refinement der Methodik führte und somit die Belastung der Tiere reduzierte. In Tabelle 2 wird die Methodik zur Induktion der myokardialen Ischämie im Mausmodell unter Verwendung von Maßnahmen nach dem 3R Prinzip beschrieben.

Tabelle 2: Methodik zur Induktion der myokardialen Ischämie im Mausmodell mit Anwendung von Maßnahmen nach dem 3R Prinzip.

Beschreibung der Methodik	Anwendung der 3R Prinzipien
<p>1. Baseline Ultraschall am Tag 0: Der Ultraschall des Herzens an Tag 0, unmittelbar vor der Operation, dient der Erfassung der kardialen Herzfunktion der Tiere. Die Aufzeichnung des Ultraschalls erfolgte stets unter Isoflurannarkose (1,5 - 2,5% bei einem Sauerstoffflow von 0,8 - 1 l/min) an Tag 0 (OP-Tag, baseline) sowie 1 Tag post OP (nach 24 h Reperfusion). Zur Ableitung des Elektrokardiogramms wurden die Pfoten der Tiere auf mit Kontaktgel versehene Elektroden fixiert. Die innere Körpertemperatur wurde mittels einer rektalen Sonde über die gesamte Dauer überprüft und möglichst konstant gehalten ($37 \pm 0,5^\circ\text{C}$). Die linke Brustwand wurde rasiert und anschließend enthaart (Veet Enthaarungscreme Sensitive, Reckitt Benckiser). Geschallt wurde das Herz</p>	

<p>sowohl in der parasternalen Langachse (PSLAX, parasternal long axis view) als auch in der Kurzachse (SAX, short axis view) jeweils in B- und M-Mode. Nach Beendigung der Aufnahmen wurden die Tiere vom Ultraschallgel befreit.</p>	
<p>2. Vertiefung der Anästhesie mittels Injektionsnarkose: Nach der Anfertigung der Ultraschallaufnahmen erhielten die Tiere zur Vertiefung der Anästhesie eine gewichtsadaptierte intraperitoneal applizierte Triple Narkose (Fentanyl 0,05 mg/kg, Medetomidin 0,5 mg/kg, Midazolam 5 mg/kg KGW).</p>	<p>Zur Sicherstellung der ausreichenden Hydrierung der Tiere während des Versuchs, wurde die gewichtsadaptierte Triple Narkose mit Natriumchlorid 0,9% verdünnt. Somit erfolgte eine Flüssigkeitssubstitution gemäß der Empfehlungen der GV-SOLAS zur Applikation von Substanzen (GV-SOLAS, Dr. André Dülsner, Dr. Marina Pils, Dr. Matthias Schmidt, & (TVT), 2017). Ein Volumen von 10 ml/kg KGW für subkutan applizierte Substanzen wurde dabei eingehalten.</p>
<p>3. Intubation: Es erfolgte eine oropharyngeale Intubation mittels einer 22G Braunüle (Vasofix Braunüle, B. Braun). Die Beatmung der intubierten Tiere erfolgte gewichtsadaptiert mit einem Beatmungsgerät (Physiosuite for Mice & Rats, Kent Scientific Corporation).</p>	<p>Die nichtinvasive Durchführung der oropharyngealen Intubation (Abbildung 3) wurde neu etabliert und ersetzt damit die endotracheale Intubation mittels Tracheotomie. Den Tieren blieb folglich eine zweite OP Wunde an der ventralen Halsseite erspart. Insgesamt ist somit nicht nur eine Reduktion der Belastung (durch Minimierung von Schmerzen und möglichen Wundkomplikationen), sondern auch eine Reduktion der Tierzahlen möglich gewesen. Durch die gewichtsadaptierte Überdruckbeatmung wurde bereits während der OP auf eine vollständige Entfaltung der Lunge geachtet. Die gewichtsadaptierte Beatmung</p>

	<p>mit dem Physiosuite Beatmungsgerät for Mice & Rats (Kent Scientific Corporation) hat einen wesentlichen Vorteil gegenüber der ursprünglich verwendeten Beatmung mit Kolbenpumpen, bei denen die Voreinstellungen der Lungenvolumina nicht so exakt bestimmt werden. Sich im linken Lungenflügel bildende Atelektasen wurden durch einen positiven endexspiratorischen Druck (PEEP, positive end expiratory pressure) vermieden. Bis zum Verschluss des Thorax war vor allem durch die Sichtkontrolle des linken Lungenlappens (der gegebenenfalls von einem Pneumothorax betroffen wäre) eine gute Kontrolle der Lunge möglich.</p>
4. Eröffnung des Thorax: Der Hautschnitt auf der linken Thoraxseite erfolgte von kaudal nach kranial circa im 45° Winkel in Richtung Sternum. Die nun sichtbare A. epigastrica superficialis cranialis wurde mit einem Elektrokauter (Bovie Aaron Medical, Change-A-Tip High Temperature Power Handle) verödet. Die Durchtrennung der Muskulatur (M. pectoralis profundus, M. pectoralis transversus, M. serratus ventralis thoracis) wurde stumpf mit der Pinzette vorgenommen. Die Inzision der Interkostalmuskulatur erfolgte ebenfalls stumpf im vierten Interkostalraum (Abbildung 4 B-E).	
5. Darstellung der LAD	Zur Darstellung der LAD wurde auf die Verwendung eines Rippenretraktors oder auf

	<p>das Setzen von Haltefäden, die die Rippen auseinanderziehen, verzichtet. Durch die besondere Lagerung der Tiere (Abbildung 4 A) konnte die zu ligierende Arterie unmittelbar unter dem linken Herzohr in der circa 1 cm großen Interkostalinzision visualisiert werden (Abbildung 5). Die Größe der Wunde wurde somit reduziert und eine Reduktion des Traumas erreicht.</p>
<p>6. Induktion der Ischämie mittels Ligatur der LAD: Als Ligaturfaden diente ein nicht-resorbierbarer, polyfilier 7-0 Seidenfaden (Perma Hand (7-0); Ethicon). Die Unterstechung des Ramus interventricularis anterior (= RIVA, Ramus interventricularis anterior, engl.: LAD, left anterior descending artery) erfolgte unterhalb des linken Herzohrs (circa 1 - 2 mm). Um den Knoten nach 30 min Ligatur wieder öffnen zu können und eine Reperfusion des ischämischen Areals wiederherzustellen, wurde ein Polyethylenschlauch (Fine Bore Polythene Tubing 0.28mm ID 0.61mm OD, Portex, Smiths Medical International Ltd., Kent) als Platzhalter in den Knoten gelegt.</p>	<p>Es erfolgte die Verwendung eines 7-0 Seidenfadens zur Induktion der Ischämie. Dieser ersetzte den größeren und etwas invasiveren 6-0 Seidenfaden und hatte zur Folge, dass die Umstechung der LAD präziser erfolgen konnte (Abbildung 5 B-F).</p>
<p>7. Ischämiephase: Die Ischämiephase betrug in allen Versuchen stets 30 Minuten.</p>	<p>Während dieser Phase wurde der Thorax durch eine Einzelknopfnaht mit Bildung einer Schlaufe verschlossen und mit einem sterilen Tupfer bedeckt. Dadurch wurde ein Auskühlen der Tiere durch die offene OP Wunde vermieden.</p>

<p>8. Bei Reperfusionsversuchen: Beenden der Ischämiephase mittels Öffnens der Ligatur: Durch Lösen des Ligaturfadens und Entfernung des Polyethylenschlauches wurde die Reperfusionsphase eingeleitet. Die Visualisierung der stattfindenden Reperfusion (zuvor ischämisches, blasses Myokard unterhalb der Ligatur wurde wieder rosa-rötlich) diente als Kontrolle der korrekten Ligatur (Abbildung 6 A-B).</p>	
<p>9. Verschluss des Thorax: Durch zwei bis drei Einzelknöpfe wurde der Thorax mit 6-0 Vicryl (Ethicon) verschlossen (Abbildung 6 C).</p>	<p>Durch die Reduktion der Größe der Thoraxwunde (siehe Tabellenpunkt 5.) genügten 2 bis 3 Einzelknöpfe, um den Thorax vollständig zu verschließen. Eine spezielle Technik zur Reduktion des Auftretens eines Pneumothorax wurde etabliert und routinemäßig bei jedem Tier durchgeführt. So wurden beim Verschluss des Thorax durch die Einzelknopfhefte die letzten sich im dorsalen Wundwinkel befindlichen Hefte zunächst nur locker mit einem nicht fixierten chirurgischen Knoten vorgelegt. Damit konnte sichergestellt werden, dass die Lunge im dorsalen Bereich bei der Naht nicht punktiert wurde. Erst nachdem alle Nähte lagen, wurden die zwei letzten Hefte fest verknotet, wobei ein leichter Druck auf den Thorax ausgeübt wurde. Zusätzlich wurde der Schlauch des Beatmungsgerätes zur Expiration kurz zugehalten, was zu einem Aufblähen der</p>

	<p>Lunge führte und restliche Luft aus dem Thorax verdrängte.</p> <p>Bestand an dieser Stelle der Verdacht einer gewissen Restmenge an Luft im Thorax, erfolgte eine Evakuierung des Thorax. Mittels einer sterilen 30G Insulinspritze (30G 0,3 x 8 mm BD-Microfine U-40 Insulin, Becton Dickinson and Company) mit abgeknickter Nadel wurde in einem flachen 30° Winkel hinter dem 5. ICR eingegangen (circa 3 mm tief) und die Luft im Thorax aspiriert. Dieser Fall trat jedoch äußerst selten ein und diente im Verdacht eines Pneumothorax zu dessen Behebung.</p>
10. <u>Verschluss Muskulatur und Hautnaht:</u> Die fortlaufende Muskelnahrt erfolgte mit 6-0 Vicryl (Ethicon). Die Haut wurde mit liegenden U-Heften mit 6-0 Prolene (Ethicon) verschlossen (Abbildung 6 D).	
11. <u>Aufwachphase:</u> Nach dem Wundverschluss erhielten die Tiere eine intraperitoneale Injektion mit den Antagonisten (Atipamezol 2,5 mg/kg, Flumazenil 0,5 mg/kg KGW). Nach Einsetzen der Spontanatmung und Extubation wurde den Tieren subkutan ein Schmerzmittel (Buprenorphin 0,1 mg/kg KGW) zur Analgesie verabreicht.	Als unterstützende Maßnahme erhielten die Tiere eine Volumensubstitution aus Glucose 5% und Ringerlactat (Dosierung 10 ml/kg KGW). Die Zeit bis zur wiedereintretenden Flüssigkeits- und Nahrungsaufnahme wurde dadurch überbrückt.
12. <u>Regenerationsphase:</u> Anschließend wurden die Tiere in einem auf einer Wärmematte befindlichen Aufwachkäfig verbracht. Die Tiere wurden sobald sie	Den Tieren wurde zusätzlich aufgeweichtes Futter ad libitum zur Verfügung gestellt, welches alle 12 Stunden gewechselt wurde.

normale Stellreflexe und Verhalten zeigten wieder in ihren Herkunftskäfig gesetzt und erhielten alle 8 Stunden wiederholte Buprenorphin Injektionen (0,1 mg/kg KGW).	
--	--

Ausschlusskriterien: Nach Verbringen der Tiere in ihren Herkunftskäfig erfolgte bei der Gabe der Analgesie die visuelle Kontrolle in Bezug auf Ernährungs- und Hydratationszustand, Bewegungsfähigkeit, Aktivität, Isolation, Haltung, Haarkleid, Atmung und Kotabsatz. Zur Beurteilung der Tiere wurde ein Score Sheet herangezogen, welches konkrete Maßnahmen bei Verschlechterung des Allgemeinbefindens der Tiere veranlasste (z.B. häufigere Kontrollen und ggf. Unterstützung mit zusätzlichen Flüssigkeitsgaben, Infrarotwärmelampen oder Wärmematten).

Bei Verschlechterung des Allgemeinzustandes (Gewichtsverlust bis maximal 20% des Gesamtkörpergewichtes bezogen auf das Ausgangsgewicht und korrigiert um die Gewichtszunahme von unbelasteten, gleichaltrigen und gleichgeschlechtlichen Mäusen derselben Linie, struppiges Fell, kauernde Körperhaltung, starker Lethargie) wurde eine Tötung mittels Isofluran vollzogen.

Kam es während des Eingriffs zu einem der folgenden Ereignisse, wurde der Versuch abgebrochen und die Maus euthanasiert: Kammerflimmern, unbeherrschbare Blutungen oder Lungenkollaps/-atelektasen nach Beendigung der kontrollierten Beatmung.

3.3.2.2 Darstellung des Operationsablaufes (nach den 3R Prinzipien)

Das Schema in Abbildung 2 zeigt den zeitlichen Ablauf der Induktion der myokardialen Ischämie und Reperfusion. Nachfolgend wird in bebildeter Form der Operationsablauf dargestellt.

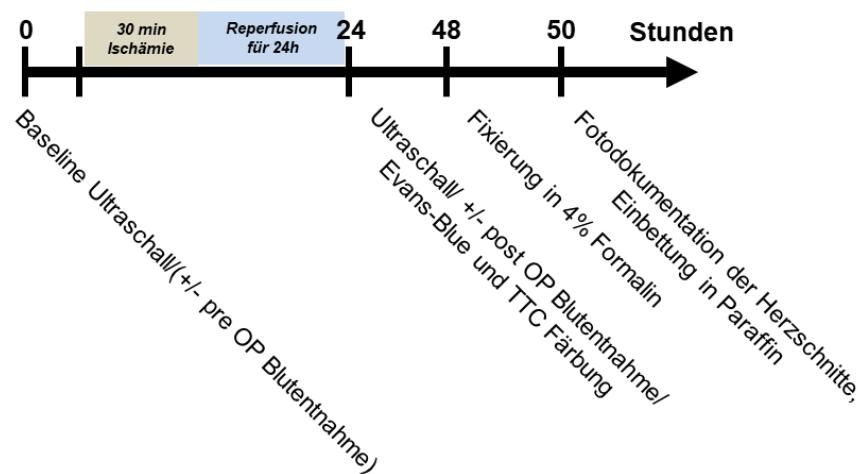


Abbildung 2. Schematische Darstellung des Operationsablaufs der Induktion myokardialer Ischämie und Reperfusions.

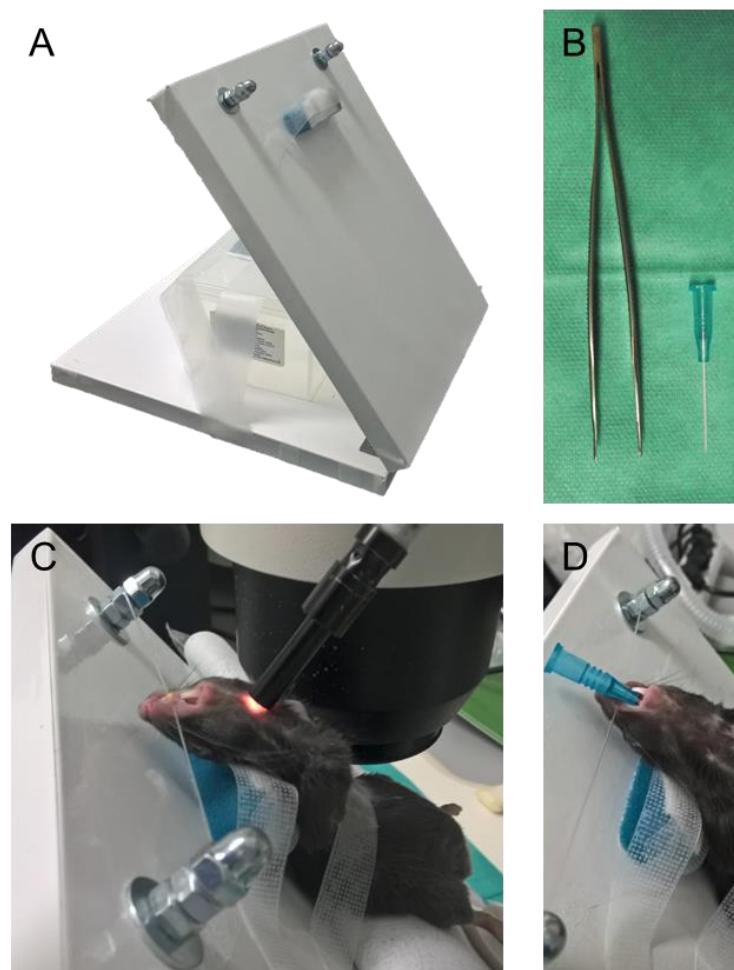


Abbildung 3. Oropharyngeale Intubation. (A) Eigenkonstruktion Intubationsplattform (B) Chirurgische Pinzette zum Vorverlagern der Zunge, 22G Braunüle (Vasofix Braunüle 0,90 x 25 mm G 22 blau, B. Braun) zur Verwendung als Endotrachealtubus (C) Fixierung der narkotisierten Maus in überstreckter Haltung, Durchleuchten des Larynxbereiches mit einer Kaltlichtquelle (D) Intubierte Maus

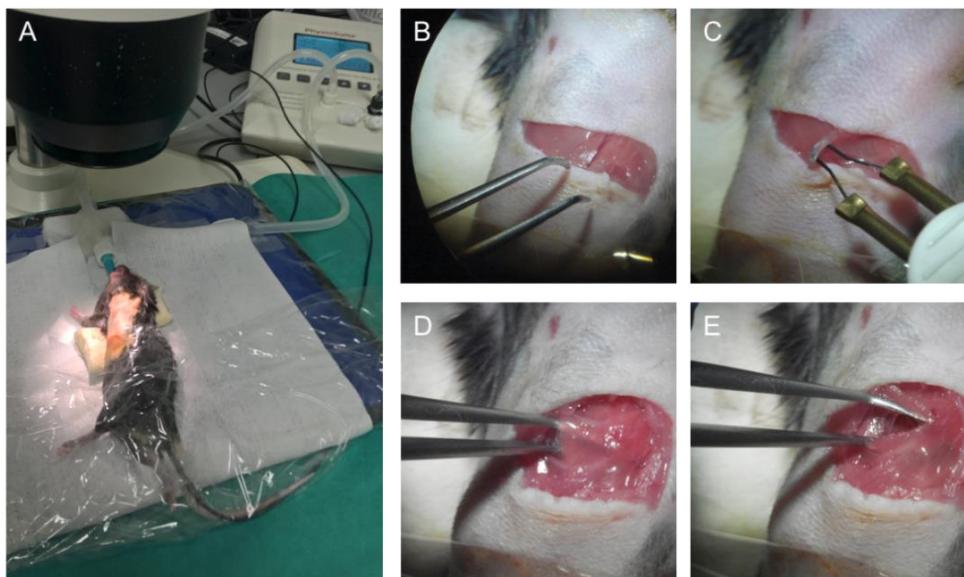


Abbildung 4. Induktion myokardialer Ischämie Lagerung und Eröffnung des Thorax. (A) Korrekte Lagerung zur verbesserten Darstellung der linken Herzseite. Durch Überstrecken der linken Hintergliedmaße verlagert sich die linke Lunge nach dorsal wodurch die linke Seite des Herzens unmittelbar unter der Interkostalmuskulatur des 4. ICR liegt (B – E) Aufnahmen durch 12-fach Vergrößerung des Stereomikroskops: links ventral, rechts dorsal **B** Blick auf oberflächliche A. epigastrica superficialis cranialis (C) Veröden des Blutgefäßes mit einem Elektroauter (D) stumpfe Inzision im 4. ICR (E) Vergrößerung des Thoraxzugangs mittels stumpfer Pinzette

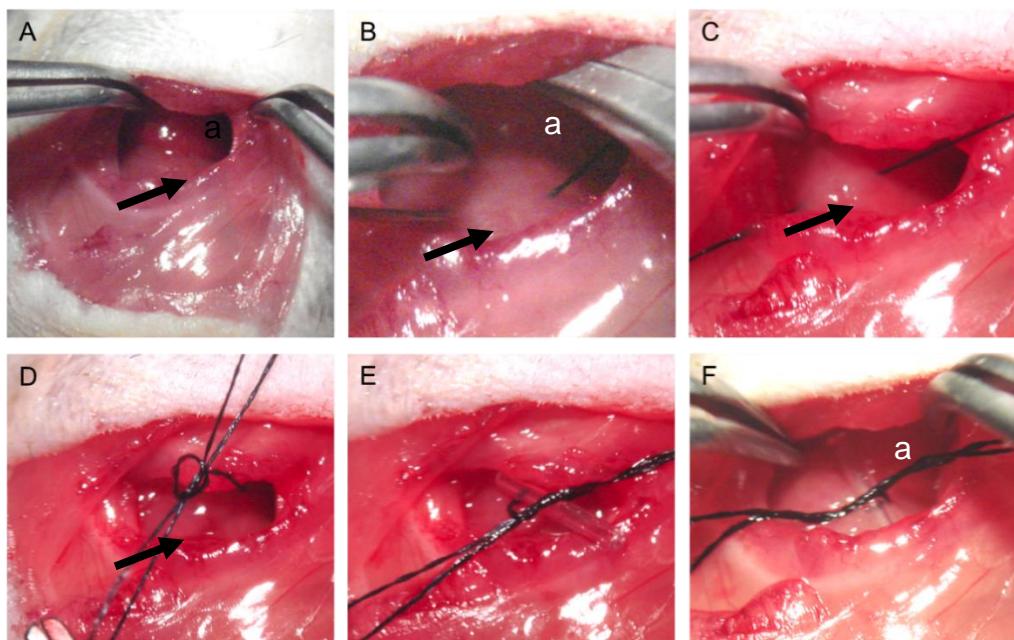


Abbildung 5. Induktion myokardialer Ischämie mit Darstellung der LAD. Aufnahmen durch 12-fach Vergrößerung des Stereomikroskops (A) Blick auf das linke Herzohr und die unmittelbar unterhalb des Herzohrs verlaufende LAD (Pfeile) (B) Unterstechung der LAD mittels 7-0 Seidenfaden (Perma Hand (7-0); Ethicon) (C) Blick auf unterstochene LAD (D) Vorlegen des Ligaturknotens mit Schlaufe (E) Einlegen eines an beiden Enden abgerundeten Polyethylenschlauchs (Fine Bore Polythene Tubing 0.28mm ID 0.61mm OD, Portex, Smiths Medical International Ltd., Kent) (F) Induktion der Ischämie mittels Fixierung der Ligatur auf dem Polyethylenschlauch. Das Myokard unterhalb der Ligatur zeigt nun eine Entfärbung (Blässe, Ischämie) (**a** = linkes Herzohr, Pfeil = LAD)

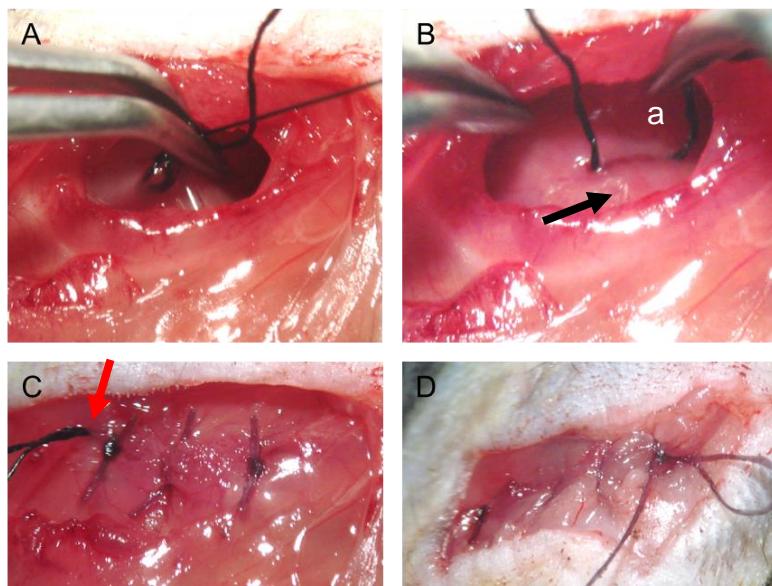


Abbildung 6. Induktion myokardialer Ischämie Verschluss des Thorax und Muskelaht. (A) Öffnen der Ligatur und Entfernung des Polyethylenschlauches (B) Kontrolle der stattfindenden Reperfusion durch Sichtbarwerden der LAD (schwarzer Pfeil). Das Myokard wird durch die Revaskularisierung wieder rosig (C) Thoraxverschluss durch 3 Einzelknopfhefte mittels 6-0 Vicrylfaden (Ethicon). Der Ligaturfaden (roter Pfeil) verbleibt in der Maus (Wiederverwendung bei der Opferung, erneutes Setzen der Ligatur zur Infarktvalidierung) (D) Verschluss der Muskulatur mittels fortlaufender Naht (6-0 Vicryl, Ethicon) (a = linkes Herzohr, schwarzer Pfeil = LAD, roter Pfeil = Ligaturfaden)

3.3.2.3 Evaluierung der Ischämie nach 24 Stunden Reperfusion

Beim Modell des akuten Myokardinfarktes wurden die Tiere zur Evaluierung der stattgefundenen myokardialen Ischämie nach 24 Stunden Reperfusion geopfert.

Opferung der Tiere, Probengewinnung und Organentnahme: Zur Gewinnung von Plasma wurde den Tieren unter Isoflurannarkose retroorbital Blut entnommen (in ACD 1:4). Anschließend wurde ein Ultraschall durchgeführt und das EKG aufgezeichnet. Wie am OP Tag erfolgte eine Vertiefung der Anästhesie mittels gewichtsadaptierter intraperitoneal injizierter Triple Narkose (Fentanyl 0,05 mg/kg, Medetomidin 0,5 mg/kg, Midazolam 5 mg/kg KGW). Die Tiere wurden abermals intubiert und gewichtsadaptiert, kontrolliert beatmet. Der unter der Pectoralmuskulatur befindliche Ligaturfaden wurde freigelegt. Der thorakale Zugang erfolgte auf der linken Seite des Tieres parasternal vom Abdomen gen kranial bis zur Höhe des vierten Interkostalraumes. Die linke Thoraxwand wurde nach dorsal verlagert. Die LAD wurde erneut ligiert. Zur späteren Evaluierung des Infarktareals erfolgte nun eine intrakardiale Injektion in den linken Ventrikel mit 0,5 ml 3% Evans-Blue (Direct Blue 53, Sigma Aldrich Co.). Die Abbildung 7 B zeigt die Visualisierung der korrekten Färbung des Herzens mit Evans-Blue, wobei das

Ischämiegebiet weiß/blass bleibt. Um den Tod herbeizuführen und die Herzkontraktion rasch zu beenden wurde anschließend 0,2 ml KCl 1M intrakardial injiziert und mit PBS perfundiert. Das Herz wurde entnommen und mit physiologischer 0,9% Natriumchloridlösung (Isotonische Kochsalzlösung, Fresenius Infusionslösung, Fresenius Kabi Deutschland GmbH) gespült. Zur Herstellung der 1 mm dicken Herzschnitte wurde das Herz in OTC-Medium (Tissue-Tek O.C.T. Compound, Sakura Finetek USA, Inc.) bei -20 °C eingefroren.

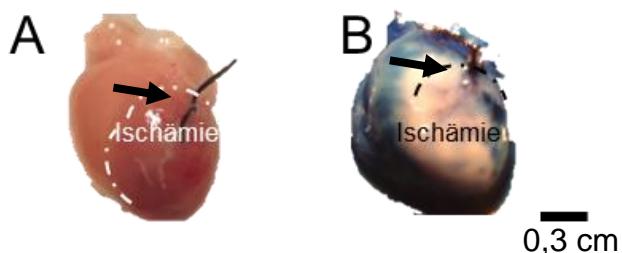


Abbildung 7. Induktion myokardialer Ischämie In situ Aufnahmen des Herzens nach 24 h Reperfusion. (A) Vor Evans-Blue Färbung nach erneutem Setzen der Ligatur (B) Nach Färbung mit Evans-Blue (Pfeil = Ligatur)

Auswertung der Infarktflächen mittels Triphenyl-Tetrazoliumchlorid (TTC)

Färbung zur Bestimmung der Infarktgröße und Area at risk: Nach Verbleib der Herzen für mindestens 30 min in OTC Medium bei -20 °C wurden diese mittels einer Herz Matrix (Mouse Heart Slicer Matrix, Zivic Instruments) in 1 mm dicke Scheiben (Herzsegmente) geschnitten. Die einzelnen Scheiben wurden vom anhaftenden OTC Medium mittels 0,9% Natriumchlorid-Spülung befreit und in vorgelegtes Triphenyltetrazoliumchlorid (1%) bei 37 °C für 15 min inkubiert. Die Fixierung der einzelnen Segmente erfolgte in 4% Formaldehyd unter Lichtabschluss bei Raumtemperatur über Nacht.

Die Verwendung von TTC als Vitalfarbstoff wurde bereits 1952 von Ried beschrieben (Ried, 1952). TTC wird durch oxidative Phosphorylierung mitochondrialer Dehydrogenasen zu dem roten Farbstoff 1,3,5 Triphenylformazan umgewandelt. Diese Umwandlung findet nur in vitalem Gewebe statt. Die rot angefärbten Anteile des Herzens stellen den entzündlichen/stoffwechselaktiven ischämischen Bereich (Aar, Area at risk) dar. Hier findet sobald der Verschluss der LAD wieder geöffnet wird eine verstärkte Invasion inflammatorischer Zellen statt. Somit ist die Aar deutlich als Übergangszone

von dem zugrunde gegangenen, blassen Ischämiegebiet des Infarktes (Inf, Infarkt) abgrenzbar.

Nach 24 Stunden in 4% Formaldehyd wurde jedes Segment von Vorder- und Rückseite unter einem Stereomikroskop bei 12-facher Vergrößerung fotografiert. Die Auswertung der Infarktfläche, der Area at risk und ihr flächenmäßiger Anteil am linken Ventrikel wurden mittels einer Bildverarbeitungssoftware (AxioVision, Carl Zeiss AG) ermittelt. Pro Maus ergaben sich so mindestens 4 Scheiben mit Vorder- und Rückseite und daraus wiederum die gebildeten Mittelwerte für die Flächen vom rechten Ventrikel, linken Ventrikel, Infarktfläche und Area at risk.

Histologische Untersuchungen: Auf die weitere Verwendung der Herzschnitte für histologische und immunhistologische Auswertungen wird unter 3.3.3 genauer eingegangen.

Ultraschallauswertung: Die Auswertung der Ultraschallsequenzen erfolgte mit der Software Vevo 2100 (VevoLAB und VevoStrain; Vevo2100, FUJIFILM VisualSonics Version 3.1.).

Die Ejektionsfraktion (EF, Ejection Fraction, Auswurfffraktion) beschreibt das Blutvolumen (in Prozent) welches während einer Herzaktion im Vergleich zum Gesamtvolumen des Ventrikels ausgeworfen wird (La Rosée & Deutsch, 2000).

Es wird mittels der Formel

$$EF [\%] = \frac{SV}{EDV}, \text{ also } LVEF = \frac{LVEDV - LVESV}{LVEDV} * 100$$

berechnet.

Beim Fractional Shortening (FS, Fraktionelle Verkürzung, Verkürzungsfraktion) handelt es sich um einen Parameter, der die Kontraktionsfähigkeit des linken basalen anterioren Septums sowie der basalen Posterolateralwand angibt (La Rosée & Deutsch, 2000). Allgemein wird damit jedoch das Kontraktionsverhalten des gesamten linken Ventrikels verstanden. Regionale Unterschiede wie sie bei manchen Herzerkrankungen in anderen Wandbereichen auftreten können, werden mittels der einfachen Angabe des Fractional Shortenings in % somit nicht erfasst.

Der Wert für die fraktionelle Verkürzung errechnet sich gemäß der folgenden Formel:

$$FS [\%] = \frac{LVEDD - LVESD}{LVEDD} * 100$$

Die Ejektionsfraktion und die Fraktionelle Verkürzung stellen eine erste nicht-invasive Auswertungsform für den stattgefundenen Infarkt und die dadurch beeinflusste Herzfunktion dar. Weitere kardiale (Funktions-)Parameter wurden beim Vergleich von Wildtyp (fl/fl) und Pf4-Cre CXCR7 *Knockout*-Tieren (-/-) anhand der Ultraschallaufnahmen ausgewertet (siehe 3.3.3.1).

3.3.3 Myokardiale Ischämie und Reperfusion im *Knockout* Modell

Um die Pathophysiologie des akuten Myokardinfarktes mit anschließender Revaskularisierung (Ischämie und Reperfusion) am Tiermodell der Maus durchzuführen, wurde die unter 3.3.2 etablierte Methodik am Beispiel des Pf4-Cre CXCR7 *Knockout* Modells angewendet. Die Dauer der Ligatur betrug in dieser Arbeit stets 30 Minuten. Zur Beantwortung der Frage, welchen Einfluss der *Knockout* insbesondere auf das inflammatorische Geschehen hat, überlebten die Tiere 24 Stunden nach der Ligatur (24 Stunden Reperfusion). Verglichen wurden im Rahmen dieser Arbeit stets Pf4-Cre negative CXCR7^{fl/fl} Wildtypen (nachfolgend als fl/fl bezeichnet) mit Pf4-Cre positiven CXCR7^{fl/fl} *Knockout*-Tieren (nachfolgend als -/- bezeichnet).

3.3.3.1 Durchführung der Versuche

Die Tabelle 3 zeigt die Gruppeneinteilung, der für diesen Versuchsteil verwendeten Tiere. Da sich anhand einer Versuchsgruppe nicht alle Auswertungen durchführen ließen, wurde für die Immunhistologie, die Messung der Koaggregate und die Bestimmung des kardialen Troponin I eine zweite Kohorte Tiere operiert (Gruppe I/R fl/fl und I/R -/-).

Tabelle 3: Gruppeneinteilung myokardiale Ischämie und Reperfusion im *Knockout* Modell.

Versuch	Myokardiale Ischämie und Reperfusion (30 min, 24 h)			
Bezeichnung der Gruppe	fl/fl	-/-	I/R fl/fl	I/R -/-
Tierstamm	Pf4-Cre negative CXCR7 ^{fl/fl}	Pf4-Cre positive CXCR7 ^{fl/fl}	Pf4-Cre negative CXCR7 ^{fl/fl}	Pf4-Cre positive CXCR7 ^{fl/fl}
Alter [Wochen]	12,3	11,2	12,9	10,2
Anzahl der Tiere	6	6	8	6
Auswertung	Infarktflächen Ultraschall Histologie (H.E.) Durchflusszytometrie zur Bestimmung des Aktivierungsgrades der Thrombozyten Legendplex-Assay	Immunhistologie Durchflusszytometrie zur Messung von Thrombozyten-Leukozyten Aggregaten cTnI Legendplex-Assay		

cTnI = kardiales Troponin I; H.E. = Hämatoxylin Eosin, I/R = Ischämie/Reperfusion; fl/fl = Pf4-Cre negative CXCR7^{fl/fl} Wildtypiere; -/- = Pf4-Cre positive CXCR7^{fl/fl} *Knockout*-Tiere

Vorbereitungen: Alle Tiere erhielten zu Beginn der Versuche bereits 3 Tage vor OP Antibiotikum über das Trinkwasser (Enrofloxacin, Baytril 2,5% orale Lösung, Firma Bayer). Am OP-Tag wurden die Tiere zunächst gewogen. Eine Kontrolle des Gewichts erfolgte zusätzlich 24 h post Ischämie.

Umsetzung der Methodik zur Induktion der myokardialen Ischämie: Das genaue Protokoll zur Induktion der myokardialen Ischämie wird detailliert unter 3.3.2.1 beschrieben.

Ultraschall: Die Aufzeichnung des Ultraschalls und des Elektrokardiogramms erfolgten an Tag 0 (OP-Tag, Basal) und 1 Tag post OP (24 h Reperfusion). Geschallt wurde das Herz sowohl in der parasternalen Längsachse (PSLAX, parasternal long axis view) als auch in der Kurzachse (SAX, short axis view) jeweils in B- und M-Mode. Insgesamt wurden pro Schallkopfeinstellung mindestens eine Sequenz (mit 300 Frames) im B-Mode und eine Filmsequenz im M-Mode aufgezeichnet. Die Auswertung erfolgte mittels der Software Vevo 2100 (VevoLAB und VevoStrain; Vevo2100, FUJIFILM VisualSonics Version 3.1.). Die Ergebnisse der B-Mode Sequenzen ergeben sich aus den Mittelwerten dreier LV Trace Messungen (umfassen mindestens 3 Systolen und 3 Diastolen). Bei den M-Mode Messungen wurden neben der LV Trace Analyse zusätzlich die Ergebnisse der Längenmessungen der Wandabschnitte des linken Ventrikels über 4 Herzphasen gemittelt (IVSd/s = Interventricular septum in diastole/systole, LVIDd/s = Left ventricular internal dimension in diastole/systole, LVPWd/s = Left ventricular posterior wall in diastole/systole, LVAWd/s = Left ventricular anterior wall in diastole/systole).

Opferung der Tiere, Probengewinnung und Organentnahme: Unter 3.3.2.3 findet sich das Protokoll zur Organentnahme und Probengewinnung sowie die weitere Verarbeitung der Herzen nach 24 Stunden Reperfusion. Abweichend von dem dort beschriebenen Protokoll wurde einigen Tieren (Gruppeneinteilung siehe Tabelle 3) zusätzlich vor der Intubation für die Messung der Aktivierbarkeit der Thrombozyten (Ergebnisse siehe 4.2.6) 50 µl Vollblut retroorbital entnommen.

3.3.3.2 Histologische Untersuchungen

Nach der Evaluierung der Ischämie gemäß dem unter 3.3.2.3 beschriebenen Protokoll zur Auswertung der Infarktflächen wurden die Herzsegmente für die Anfertigung von

Paraffinschnitten weiterverarbeitet. Die Gewebeaufbereitung für die Herstellung von Paraffinpräparaten ist in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Protokoll zur Gewebeaufbereitung für die Herstellung von Paraffinpräparaten.

Durchführung	Einwirkzeit
Fixierung in Formaldehyd 4%	8 - 18 (-24) h je nach Größe des Gewebes
Spülen der Gewebe in PBS	24 (-48) h
Aufsteigende Alkoholreihe: Entwässerung	
50% Isopropanol	45 – 60 min
60% Isopropanol	45 – 60 min
70% Isopropanol	45 – 60 min (OVN möglich)
80% Isopropanol	45 – 60 min
96% Isopropanol	45 – 60 min
100% Isopropanol Nr. 1	45 – 60 min
100% Isopropanol Nr. 2	45 – 60 min
Roti-Histol Nr. 1	1 h
Roti-Histol Nr. 2	1 h
Paraffinierung 55 – 65 °C	
Paraffinbad Nr. 1	4 h
Paraffinbad Nr. 2	8 – 16 h
Paraffinbad Nr. 3	4 h
Einbetten in heißem Paraffin (55 – 65 °C)	

Zur weiteren Verarbeitung der in Paraffin eingebetteten Herzen wurden mit einem Mikrotom (Jung Multicut 2045, Leica Instruments) 5-7 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger (Super FrostPlus, R. Langenbrinck) aufgebracht. Nach dem Trocknen der Schnitte wurden diese gemäß des in Tabelle 5 aufgeführten Protokolls entparaffiniert. Anschließend konnte die Verwendung der Schnitte für die Hämatoxylin Eosin Färbung oder die immunhistochemische Verarbeitung der Proben erfolgen.

Tabelle 5: Protokoll zur Entparaffinierung von Paraffinschnitten.

Durchführung	Einwirkzeit
Roti-Histol Nr. 1	10 min
Roti-Histol Nr. 2	10 min
100% Isopropanol Nr. 1	5 min
100% Isopropanol Nr. 2	5 min
96% Isopropanol	5 min
80% Isopropanol	5 min
70% Isopropanol	5 min
Aqua dest.	30 s

Hämatoxylin Eosin (H.E.) Färbung und Auswertung: Die H.E. Färbung dient zur einfachen Differenzierung der Zellkerne (blau, Hämalaun) vom umliegenden Gewebe (rot, Eosin) und ermöglicht die Darstellung der zellulären Strukturen des Myokards. Nach 70% Isopropanol erfolgte die Wässerung in Aqua dest. für 5 min. Anschließend färbten die Präparate für 5 min in Hämalaun Lösung (Mayers Hämalaun f.d. Mikroskopie, Merck). Das Bläuen der Präparate erfolgte für 15 min in lauwarmem Leitungswasser. Anschließend wurden die gebläuteten Präparate für 3 min in 1%iges Eosin (Eosin G, C.I. 45380, Pulver, Carl Roth GmbH & Co KG) gegeben. Da Eosin wasserlöslich ist, erfolgten die nächsten Schritte unter kurzem Ein- und Austauchen der Präparate (max. 10 s) in der aufsteigenden Alkoholreihe (70 – 80 – 96% Isopropanol). Die Fixierung der Färbung erfolgte bei 2 x 5 min 100% Isopropanol und 5 min Roti-Histol. Mittels einiger Tropfen Roti-Histokitt (Carl Roth GmbH & Co KG) und einem Deckglas wurden die Präparate eingedeckt.

Die Auswertung der H.E. gefärbten Paraffinschnitte erfolgte verblindet. Dazu wurden pro Tier 2 Objektträger (a 3 Herzschnitte) unter dem Mikroskop in der 20 bis 40-fachen Vergrößerung fotografiert. Die Lokalisationen der entstandenen Bilder richteten sich nach dem Schema 3 Bilder pro Schnitt anzufertigen und zu dokumentieren (Infarkt, Übergangszone, gesundes Myokard). Mit der Bildverarbeitungssoftware Image J (public domain, Open Source, National Institutes of Health) wurden die Zellkerne gezählt und die Gesamtzellkernzahl pro mm² Gewebe bestimmt. Anhand der Infiltration der Zellen (vermehrte Zellkerndichte, Differenzierung von Lymphozyten, Plasmazellen und

Makrophagen) lässt sich somit eine Aussage über das inflammatorische Geschehen im Myokard nach Infarkt und Reperfusion treffen.

Immunhistochemie: Zur genaueren Charakterisierung der Entzündungsreaktion wurden zusätzlich immunhistochemische Färbungen vorgenommen. Durch die Bindung spezifischer Antikörper lassen sich Antigene (z.B. Zelltypen, Marker für Zellstoffwechselvorgänge) im Gewebe differenzieren und quantifizieren. Zur Herstellung der gefärbten Paraffinschnitte wurden die entparaffinierten und rehydrierten Objektträger mittels thermischer Antigenmaskierung je nach verwendetem Antikörper für 10-30 min in Citratpuffer oder EDTA im Schnellkochtopf gekocht. Die durch die Formaldehydfixierung entstandenen Quervernetzungen, welche die Antigene im Gewebe demaskierten, wurden durch den Kochvorgang wieder freigelegt.

Das verwendete Protokoll zur Anfertigung der immunhistochemischen Präparate ist der Tabelle 6 zu entnehmen. Verwendet wurden eine Reihe von Primärantikörpern (Spezifikationen der Antikörper siehe in Materialteil unter 3.2.6: MHCII rat 1:300, B220 rat 1:3000, Ly6G rat 1:800, CD3 rabbit 1:250 und CD42b rabbit 1:200, Caspase3 rabbit 1:200, pStat3 rabbit 1:100, ki67 rabbit 1:200) auf die im Ergebnisteil (siehe 4.2.4) und bei der Diskussion (siehe 5.2.2) genauer eingegangen wird.

Tabelle 6: Protokoll für die Herstellung von immunhistochemischen Präparaten.

Durchführung	Einwirkzeit
Waschen der Gewebe in PBS Tween 0,05%	3 x 2 min
Reduktion/Inaktivierung vorhandener Gewebeperoxidaseaktivität	10 min in 3%iger Wasserstoffperoxidlösung
Waschen der Gewebe in PBS Tween 0,05%	3 x 2 min
Markierung der einzelnen Schnitte durch einen Fettstift (Super PAP Pen Liquid Blocker, Invitrogen AG)	
Blockieren unspezifischer Bindungen mit Serum 5% oder Protein Block Serum-Free (Dako, Denmark A/S)	30 min
Inkubation mit Primärantikörper, PBS bzw. Isotyp-Kontrolle	1 h

Waschen der Gewebe in PBS Tween 0,05%	5 x 2 min
Inkubation mit biotinyliertem Sekundärantikörper (gekoppelt mit HRP, horseradish-peroxidase)	30 min
Waschen der Gewebe in PBS Tween 0,05%	5 x 2 min
Inkubation mit Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplex	30 min
Waschen der Gewebe in PBS Tween 0,05%	5 x 2 min
Inkubation mit DAB-Kit Substrat #DS9800 (Bildung stabiler Farbkomplexe mit HRP)	1- 3 min
Waschen der Gewebe in PBS Tween 0,05%	5 x 2 min
Gegenfärbung des Gewebes und Anfärben der Zellkerne mit Hämalaun Lösung (Mayers Hämalaun f.d. Mikroskopie, Merck)	3 min und 10 min bläuen unter Leitungswasser
Aufsteigende Alkoholreihe und Eideckeln mit Roti-Histokitt (Carl Roth GmbH & Co KG)	70 – 80 – 96% Isopropanol ca. 3 min 2 x 5 min 100% Isopropanol 5 min Roti-Histol

Die Auswertung der immunhistochemischen Präparate erfolgte wie bereits bei der H.E. Färbung detailliert beschrieben mit der Bildverarbeitungssoftware Image J (public domain, Open Source, National Institutes of Health). Die Auswertung der positiven Events/Zellen erfolgte pro mm² Gewebe. Für pStat3 wurde ein Score aus den Mittelwerten der ausgewerteten Bilder angewendet (Score 0: unter 100, Score 1: bis 150, Score 2: 100 – 200, Score 3: 200 – 300, Score 4: ab 300 Events pro Bild).

3.3.3.3 Durchflusszytometrische Messung von Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten nach Ischämie und Reperfusion

Zur Evaluierung der systemischen Entzündungsreaktion wurde die Entstehung von Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten (PLA, platelet leukocyte aggregates) nach Myokardinfarkt und 24 stündiger Reperfusion mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Zur Gewinnung des Blutes für die Messungen von PLA im Vollblut wurde den Tieren nach dem Ultraschall und vor der Intubation 800 µl Blut retroorbital entnommen (in ACD 1:4). Die Tiere befanden sich dabei in tiefer Vollnarkose. Die Proben der einzelnen Tiere wurden gemäß folgendem Pipettierschema für 30 Minuten mit Antikörpern inkubiert, die

Antikörperkonzentrationen entsprachen den Empfehlungen der Datenblätter der Hersteller:

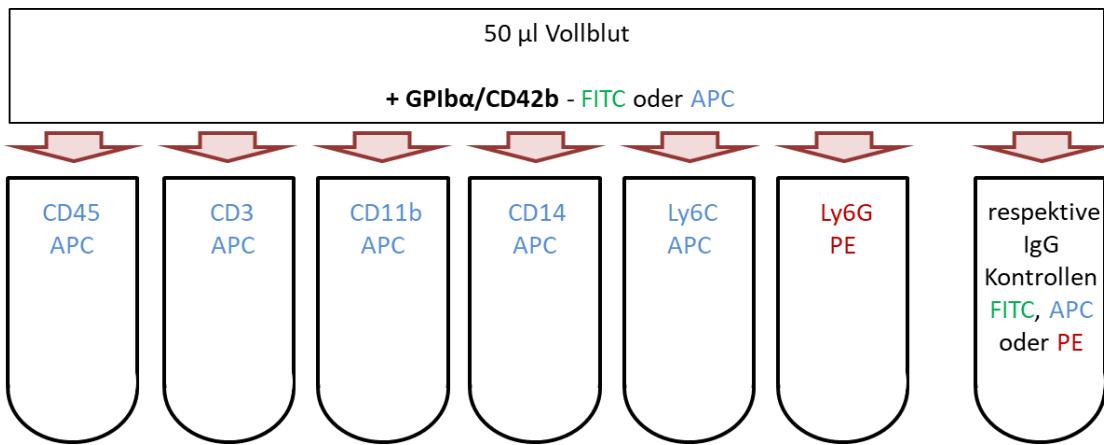


Abbildung 8. Pipettierschema für die durchflusszytometrische Messung von Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten nach Ischämie und Reperfusion.

Für die Lyse der Erythrozyten wurde nach der Inkubationszeit 1 ml eines 1:10 verdünnten Lyse Puffers (Cell Lysis Buffer, BD Pharmingen, Becton Dickinson and Company) zu den Proben hinzugegeben. Die Proben wurden vorsichtig gemixt und die Lyse mittels der Zugabe von 300 µl PBS gestoppt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt (535 xg, 10 min, RT, mit Bremse). Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in 300 µl PBS resuspendiert. Die Analyse der Proben erfolgte im direkten Anschluss mittels Durchflusszytometrie.

3.3.4 Phänotypisierung der Pf4-Cre CXCR7 Knockout-Tiere und Charakterisierung der Thrombozytenfunktion

3.3.4.1 Generierung des thrombozytenspezifischen Knockouts von CXCR7 und Validierung des Zuchterfolges

Für die Zucht des megakaryozytären bzw. thrombozytären *Knockouts* vom CXCR7-Rezeptor wurden Pf4-Cre positive, homozygot gefloxe Männchen mit Pf4-Cre negativen, homozygot geflochtenen Weibchen verpaart. Der konditionelle *Knockout* wurde mittels Cre-lox System generiert und wird in Abbildung 10 dargestellt. Die Tiere wurden im Rahmen der Abschlussbeurteilung genetisch veränderter Zuchlinien 24 Wochen beobachtet und dabei regelmäßig hinsichtlich ihres Gesundheitsstatus untersucht. Nach dem Absetzen mit etwa 21 Tagen nach der Geburt erhielt jedes Tier eine individuelle Ohrmarkierung nach dem Rechts-Links Schema. Die Ohrstanzenproben wurden zur DNA-Extraktion und Genotypisierung verwendet.

Die Abbildung 9 zeigt repräsentative Bilder für die Ergebnisse der Gelelektrophorese der PCR für CXCR7 und Pf4-Cre.

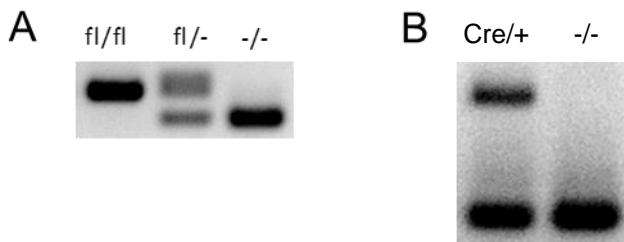


Abbildung 9. Ergebnisse der Genotypisierung. (A) Ergebnis Gelelektrophorese CXCR7 PCR (B) Ergebnis Gelelektrophorese Pf4-Cre PCR

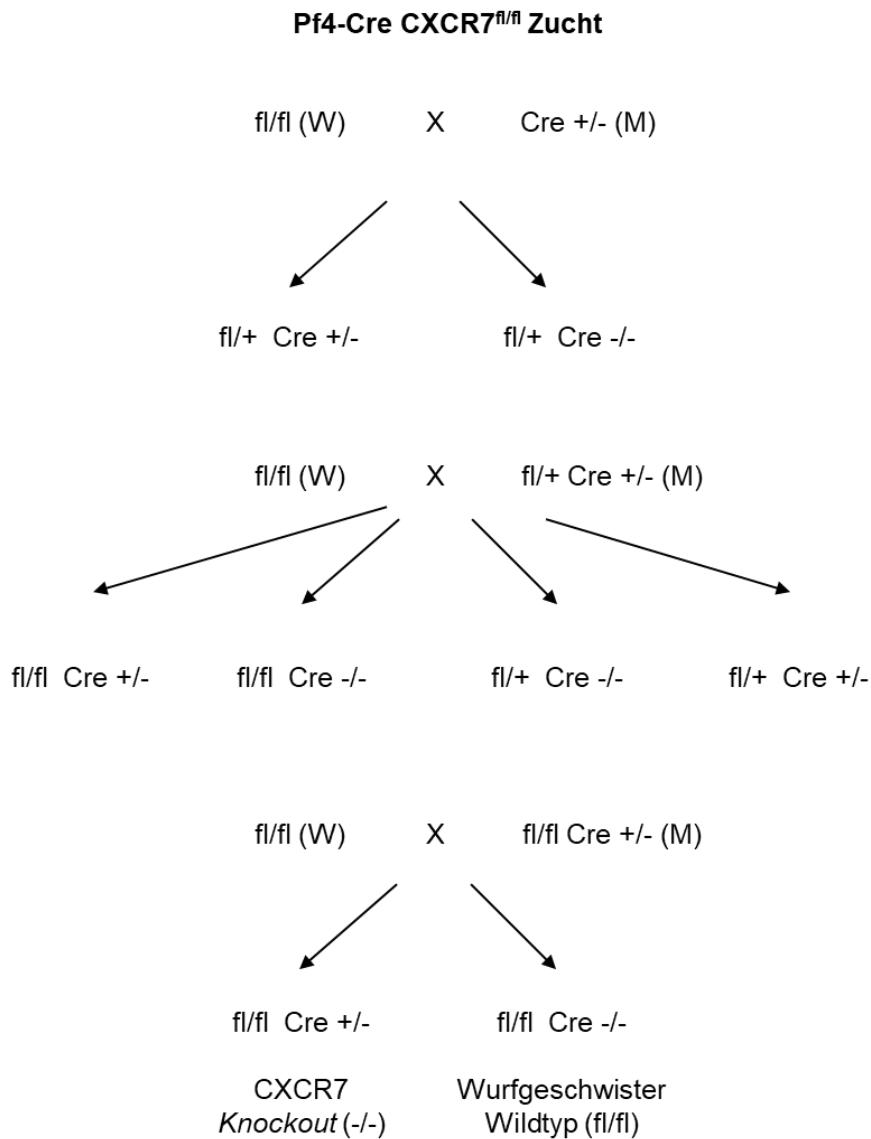


Abbildung 10. Zuchtschemata zur Generierung des thrombozytären *Knockouts* von CXCR7.

Aufzeichnungen von Zuchtparametern, Größe und Gewicht: Die Anzahl der Verpaarungen, die durchschnittliche Wurfgröße und Aufzuchtverluste der Pf4-Cre CXCR7 Linie wurden anhand von 16 Zuchtkäfigen (1:2 Verpaarung) ermittelt und mit den Werten von 36 C57Bl/6 Zuchten verglichen.

Die weitere Phänotypisierung erfolgte durch Bestimmung des Gewichts und der Körperlänge im Alter von 3 bis 60 Wochen. Es erfolgte der Vergleich zwischen gleichaltrigen *Knockout*-Tieren (-/-) und Wildtypen (fl/fl).

3.3.4.2 Allgemeines Protokoll zur Isolation von murinen Thrombozyten

Einige Versuche dieser Arbeit mit murinen Thrombozyten wurden mit isolierten und gewaschenen Thrombozyten durchgeführt. An dieser Stelle erfolgt die Beschreibung des allgemeinen Protokolls zur Isolation der murinen Thrombozyten aus Vollblut. Die versuchsabhängige Variation der Isolation wird entsprechend bei den einzelnen Methodiken abgehandelt.

Den Tieren wurde in tiefer Isoflurannarkose retroorbital Blut entnommen. Die Entnahme erfolgte mit Natrium-Heparin Einmalkapillaren (Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG). Geblutet wurde in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß (Eppendorf Deutschland) die entweder mit ACD (1:4) oder PBS-Heparin 20 U/ml (1:5) gefüllt waren. Insgesamt wurden nun fünf Zentrifugationsschritte benötigt, um am Ende ein Zellpellet zu erhalten, welches gemäß anschließender Verwendung der Thrombozyten mit Tyrodespuffer oder PBS-Calcium resuspendiert wurde. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei Raumtemperatur und ohne Bremse.

Zu dem gewonnenen Blut wurden 100 µl Tyrodespuffer 1-fach pH 7,4 dazugegeben und es folgte die Zentrifugation bei 264 xg für 5 min (**1. Zentrifugationsschritt**). Der Überstand wurde grob abgenommen, inklusive der Leukozyten-reichen Intermediärschicht und in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Es erfolgte eine erneute Zugabe von 200 µl Tyrodespuffer 1-fach pH 7,4 und eine zweite Zentrifugation bei 52 xg für 6 min (**2. Zentrifugationsschritt**). Der nun erhaltene Thrombozyten-reiche Überstand (PRP, platelet rich plasma) wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Das restliche Blut wurde abermals mit 200 µl Tyrodespuffer 1-fach pH 7,4 vermischt und erneut bei 52 xg für 6 min zentrifugiert (**3. Zentrifugationsschritt**). Das PRP wurde anschließend vereint und zu einem Zellpellet zentrifugiert 640 xg, 5 min (**4. Zentrifugationsschritt**). Nun folgte ein Waschschritt indem der Überstand verworfen wurde und das Zellpellet mit 200 µl Tyrodespuffer 1-fach pH 7,4 resuspendiert wurde. Im **5. Zentrifugationsschritt** wurden die Thrombozyten erneut zu einem Pellet herunterzentrifugiert (640 xg, 5 min) und anschließend je nach weiterer Verwendung in Tyrodespuffer 1-fach mit Calcium [1 o. 2 mM] oder PBS-Calcium resuspendiert.

3.3.4.3 Validierung des thrombozytenspezifischen Knockouts mittels Western Blot

Herstellung von Lysaten aus isolierten, gewaschenen Thrombozyten: Zur Isolation der murinen Thrombozyten wurde Wildtyp- und *Knockout*-Tieren in tiefer Isoflurannarkose retrobulbär circa 900 µl Blut entnommen (in ACD 300 µl). Da es sich bei der Abnahme von so großen Mengen Blut um einen Terminalversuch handelte, erwachten die Tiere nicht aus der Narkose und es erfolgte somit keine Wiederherstellung der Lebensfunktion. Aus dem gewonnenen Blut wurden nun die Thrombozyten gemäß des unter 3.3.4.2 beschriebenen Protokolls isoliert.

Das am Ende der Isolation gewonnene Zellpellet wurde mit Lysepuffer (Cell Lysis Buffer (1x) plus 1:100 Protease Inhibitor Cocktail (100 x), 5871S; Cell Signaling Technology) resuspendiert, um Thrombozytenlysat zu erhalten. Die Lyse der Thrombozyten fand über Nacht bei 4 °C statt. Unlösliche Zellbestandteile (z.B. DNA), die als Schlieren im Lysat erkennbar sind, wurden mittels Zentrifugation entfernt (535 xg, 5 min, 4 °C, mit Bremse).

Semi-Dry Western Blot:

Die bei -20 °C gelagerten Thrombozytenlysate wurden bei 4 °C aufgetaut und mehrmals gevortext. Der Versuchsaufbau des Western Blot besteht aus mehreren Teilen, welche sich gliedern in:

- Bestimmung der Proteinkonzentration
- Gelelektrophorese: Auftrennung der Proteine
- Blotting mittels Semi-Dry Western Blot
- Immundetektion: Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörper
- Scannen der PVDF (Polyvinylidenfluorid) Membran

Die **Bestimmung der Proteinkonzentration** wurde mittels Bradford-Assay durchgeführt. Sowohl für die Detektion von CXCR7 (NBP1-31309, Novus Biologicals, USA) wie auch CXCR4 (NB100-74396, Novus Biologicals, USA) wurde eine Proteinkonzentration von 40 µg verwendet. In die Taschen des SDS-Polyacrylamide-Gels wurde 6 µl Marker und 30 µl Probenvolumen (6,6 µl 5-fach Loading Puffer für Western Blot plus Aqua dest. und Thrombozytenlysat) aufgetragen. Bis die Proben das Sammelgel verließen, lag eine Spannung von 80 V an. Anschließend erfolgte die **Auftrennung der**

Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes im Trenngel bei einer Spannung von 140 V für 1,5 bis 2 Stunden. Das **Blotting** der im Gel aufgetrennten Proteine wurde mit dem Semi-Dry Verfahren durchgeführt, wobei die Proteine mittels Elektronentransfer auf eine PVDF Membran übertragen wurden. Für ein Gel wurde für 75 Minuten eine Stromspannung von 10 V und Stromstärke von 70 mA verwendet (bei zwei Gelen 10 V, 140 mA, 75 min). Anschließend wurden unspezifische Bindungen durch Inkubation der Membran in 1:10 verdünntem Roti-Blocklösung (Roti-Block, Carl Roth GmbH) blockiert. Die Zielproteine wurden durch Inkubation mit den Primärantikörpern (verdünnt in Roti-Blocklösung) detektiert (**Immundetektion**). Die Membran wurde mehrfach mit PBS-Tween 0,1% gewaschen. Der Sekundärantikörper richtet sich gegen die Spezies des Primärantikörpers und dient der Markierung des detektierten Proteins mit einem Fluorochrom (IRDye 680LT Goat anti-Rabbit IgG (H + L), 0,1 mg oder IRDye 800CW Goat anti-Mouse IgG (H + L), 0,1 mg, LI-COR Biosciences GmbH). Die Membran wurde auf einem Schüttler (KS 260 basic, IKA-Werke GmbH & Co. K) für 2 h bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper (1:15000 verdünnt in Roti-Blocklösung) inkubiert. Es folgten drei Waschschritte mit PBS-Tween 0,1% und die Trocknung der Membran in einer Trockenmappe. Der **Scan der PVDF Membran** erfolgte mit einem Infrarot Bild System (Odyssey, LI-COR Biosciences GmbH). Als Ladekontrolle der Gele diente α -Tubulin (α -Tubulin (DM1A) Mouse mAb, Cell Signaling Technology), welches eine Größe von 52-55 kDa hat und mittels anti-mouse Sekundärantikörper (IRDye 800CW Goat anti-Mouse IgG (H + L), 0,1 mg, LI-COR Biosciences GmbH) detektiert wurde.

3.3.4.4 Bestimmung der Thrombozytenzahl und des Platelet Large Cell Ratio

Um die Thrombozytenzahl und das Platelet Large Cell Ratio bei Wildtyp- und *Knockout*-Tieren zu bestimmen, wurden 100 µl retrobulbär gewonnenes Vollblut in ein EDTA Mikro-Probengefäß (1,3 ml, Sarstedt AG & Co. KG) gegeben und unmittelbar mit dem Hämatologieanalysator (Sysmex KX-21N, Sysmex Deutschland GmbH) gemessen.

3.3.4.5 Bestimmung der Blutungszeit

Zur Bestimmung der Blutungszeit wurde den narkotisierten Tieren (Triple Narkose: Fentanyl 0,05 mg/kg, Medetomidin 0,5 mg/kg, Midazolam 5 mg/kg KGW) circa 3 mm der Schwanzspitze mit einem Skalpell entfernt. Die an der Schwanzspitze austretenden Bluttropfen wurden in einem Abstand von 20 Sekunden mit einem Tupfer (Whatman

GB005, Gel blotting Paper, GE Healthcare Life Sciences UK Ltd.) entfernt, bis es zum Stillstand der Blutung kam. Der Messzeitraum betrug maximal 15 min, in denen es zu einer Blutstillung kommen sollte. Die Tiere dieses Versuchsteiles wurden anschließend in tiefer Narkose mittels cervikaler Dislokation getötet.

3.3.4.6 Ex vivo Thrombusformation mit murinem Vollblut

Vorbereitung der Flusskammer: Die Flusskammer (Weite 5 mm, Tiefe 50 µm, Maastricht Instruments) wurde vor jeder Messung gereinigt und mit einem neuen Kollagen-beschichteten Deckglas zusammengebaut. Die Deckgläser (24 x 60 mm) wurden über Nacht bei 4 °C mit 200 µl 100 µg/ml HORM Collagen (HORM Suspension, Collagen Reagens HORM Suspension (KRH), Takeda Austria GmbH) beschichtet und vor dem Versuch mindestens 1 h bei Raumtemperatur mit 1% BSA blockiert. Die zusammengebaute Kammer wurde auf dem Objekttisch des Mikroskops platziert und zur Beseitigung von Luftblasen im System ausreichend mit Tyrodespuffer pH 7.4, 2 mM Calcium gespült.

Messung und Auswertung: Der Versuch begann mit der retrobulären Blutentnahme von 600 µl murinem Vollblut in 200 µl PBS-Heparin 20 U/ml. Anschließend wurden 200 µl Tyrodespuffer pH 7.4, 2 mM Calcium hinzugefügt. Das Blut wurde mit einer 1 ml Spritze (Firma B. Braun) aufgenommen, Luftblasen vorsichtig entfernt und in die vorbereitete Apparatur eingesetzt, damit die Perfusion der Kammer beginnen konnte. Nach Durchlaufen der Kammer mit dem Blut, wurde mit der gleichen Fließgeschwindigkeit mit 1 ml Tyrodespuffer pH 7.4, 2 mM Calcium nachgespült und zeitnah wurden in mindestens 5 verschiedenen Einstellungen in der 20-fachen Vergrößerung Bilder angefertigt. Die mit Thromben bedeckte Fläche (thrombus coverage) wurde pro Bild ausgewertet (Bildbearbeitungssoftware Axio Vision, Carl Zeiss AG), um anschließend für jedes Tier den Mittelwert zu bilden und die Gruppen miteinander zu vergleichen.

3.3.4.7 Rezeptorenbesatz und Aktivierbarkeit der Thrombozyten in der Durchflusszytometrie

Die durchflusszytometrischen Messungen der murinen Thrombozyten von Wildtyp- und Knockout-Tieren wurden mit entheparinisiertem Vollblut durchgeführt. Die retrobuläre Blutentnahme erfolgte in tiefer Isoflurannarkose und in 100 µl PBS-Heparin (20 U/ml). Pro Maus wurde 50 µl Vollblut verwendet. Um das Blut von dem Gerinnungshemmer

Heparin zu befreien, folgten nun mehrere Waschschritte. Nach Zugabe von 200 µl Tyrodespuffer 1-fach pH 7,4 wurde das Blut bei 640 xg für 5 min zentrifugiert (ohne Bremse, bei Raumtemperatur). Der Überstand wurde verworfen. Die zellulären Bestandteile des Blutes wurden mit 500 µl Tyrodespuffer 1-fach pH 7,4 resuspendiert und erneut zentrifugiert (s.o.). Nach Entfernen des Überstandes erfolgte die Resuspendierung in 900 µl Tyrodespuffer 1-fach mit Calcium 1 mM.

Die Polystyrolrörchen für die Durchflusszytometrie (5 ml Rundbodenrörchen, Polystyrol, Falcon Corning Inc.) wurden nach dem folgendem Pipettierschema vorbereitet:

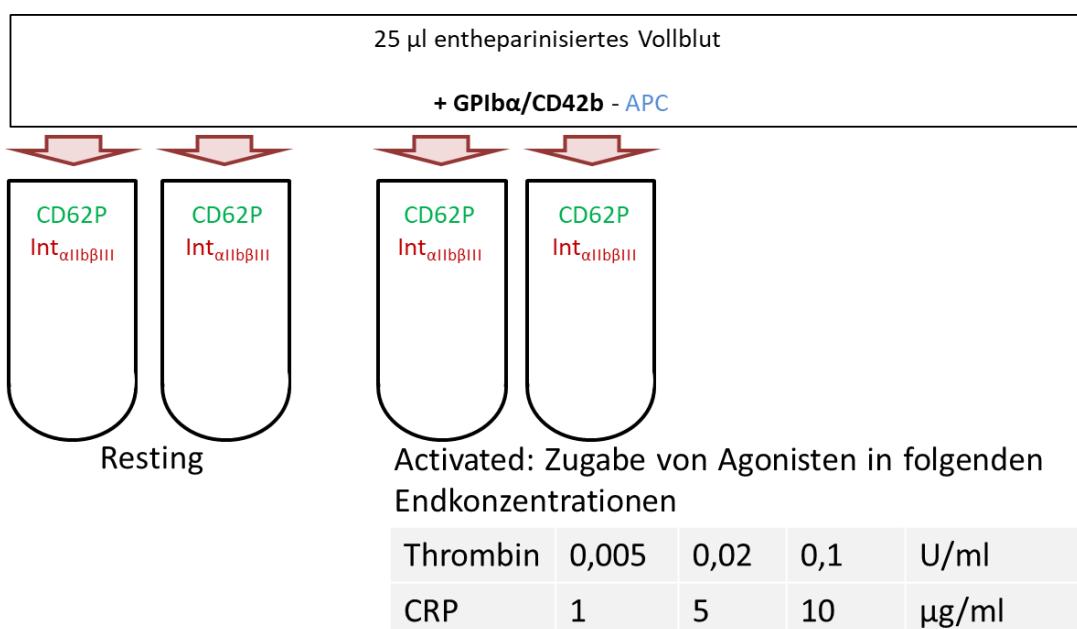


Abbildung 11. Pipettierschema für die durchflusszytometrische Messung der Thrombozytenaktivierung. CD62P = P-Seliktin = Maß für die α -Degranulation; CRP = collagen related peptide; Int α _{IIb} β ₃ = Integrin α _{IIb} β ₃ = GPIIb/IIIa = Fibrinogenrezeptorexpression

Nach Zugabe von 25 µl entheparinisiertem Vollblut pro Reaktionsgefäß wurden die frisch hergestellten Agonisten zugegeben. Nach vorsichtigem Mischen erfolgte unter Lichtabschluss die Inkubation der Proben für 30 min bei Raumtemperatur. Die Analyse am Durchflusszytometer wurde unmittelbar nach der Zugabe von 300 µl PBS vorgenommen.

3.3.5 Versuche mit Thrombozytenüberständen

3.3.5.1 Monozytenmigration mit Thrombozytenüberständen

Isolation von murinen Monozyten aus der Milz: Zur Isolation von Wildtypmonozyten wurde pro Ansatz (eine Kammer) eine Milz eines Wildtyptieres benötigt. Zur Isolation der Monozyten wurde den Tieren post mortem die Milz entnommen. Unter der Sterilbank erfolgte nun die weitere Verarbeitung der Milz. Zunächst wurde die Milz durch ein Zellsieb mit einer Porengröße von 40 µm (Zellsieb Falcon, Corning Inc.) gedrückt. Anschließend wurde das Sieb mit 15 ml PBS durchgespült. Die 15 ml der homogenisierten Milz wurden vorsichtig mit einer Stangenpipette auf vorgelegte 25 ml Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer (Ficoll-Paque Plus, GE Healthcare Bio-Sciences) in ein 50 ml Falcon gegeben. Um eine gute Ausbeute an Monozyten zu erhalten, ist es wichtig, dass zwei getrennte Phasen entstehen. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 922 xg für 18 min bei Raumtemperatur und ohne Bremse. Nach der Zentrifugation sollte eine weiße, leukozytenreiche Intermediärschicht sichtbar sein, die mittels einer Transferpipette in einen neuen 50 ml Falcon überführt wurde. Dieser wurde nach Überführung der Intermediärschicht auf 50 ml mit PBS aufgefüllt. Die Zentrifugation zu einem Zellpellet erfolgte bei 535 xg für 10 min bei Raumtemperatur mit Bremse. Mittels Resuspendierung in 1-4 ml steriles Wasser (Ampuwa, Fresenius Kabi Deutschland GmbH) für 30 s wurden im Zellpellet enthaltene Erythrozyten lysiert. Zum Stoppen der Lyse wurde der Falcon schnellstmöglich wieder auf 50 ml mit PBS aufgefüllt. Das Zellpellet wurde erneut durch Zentrifugation (535 xg, 10 min, RT, mit Bremse) hergestellt. Anschließend wurde das Pellet in Medium (RPMI 1640, 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin) resuspendiert. In einer Gewebekulturschale (20x100 mm, Cell Culture Dishes, Greiner Bio-One GmbH) wurden die resuspendierten Zellen mit circa 10 ml Medium für 24 h bei 37 °C im Inkubator kultiviert. Nach 24 h erfolgte die weitere Verarbeitung der Monozytenpopulation. Mit einem Spatel wurden die adhärenten Zellen gelöst. Das Medium wurde in einen 50 ml Falcon gegeben und die Petrischale mehrmals mit PBS gespült und diese Spülflüssigkeit wurde ebenfalls in den Falcon überführt. Der Falcon wurde mit PBS erneut auf 50 ml aufgefüllt und die Monozyten wurden zu einem Zellpellet runterzentrifugiert (535 xg, 10 min, RT, mit Bremse). Mit 1 ml PBS 1% FCS wurde das Monozytenpellet resuspendiert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels Neubauer-Zählkammer (C-Chip, Neubauer Improved Einweg-Zählkammer, Merck).

Anschließend wurde die Zellzahl auf 20.000 Monozyten in 50 µl PBS Calcium 1% FCS eingestellt.

Isolation der Thrombozyten und Herstellung der Thrombozytenüberstände: Die Isolation der Thrombozyten wurde wie unter 3.3.4.2 durchgeführt, wobei die Zellpellets in PBS Calcium 1% FCS resuspendiert wurden. Nach Bestimmung der Zellzahl wurde pro Ansatz eine Thrombozytenzahl von 10^9 Thrombozyten in 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf Deutschland) pipettiert. Die Aktivierung der Thrombozyten erfolgte durch die Inkubation mit CRP (collagen related peptide) 5 µg/ml. Anschließend wurden die Thrombozyten zentrifugiert und pro Ansatz 30 µl Überstand (RPS, resting platelet supernatant oder APS, activated platelet supernatant) in den unteren Teil der Boyden Chamber (48-Well Micro Chemotaxis Chamber, Neuro Probe) pipettiert. Nach Auflegen einer Membran mit einer Porengröße von 3 µm (Polycarbonate membranes, 25x80mm, Neuro Probe) wurde der obere Teil der Boyden Chamber mit Schrauben fixiert und die Monozyten zugegeben. Als Kontrollen dienten PBS Calcium 1% FCS (Negativkontrolle) und SDF-1 (= CXCL12) 50 µg/ml, MCP-1 50 µg/ml sowie CXCL14 1 µg/ml (Positivkontrollen).

Migration und Anfärben der Membran: Nach 3 stündiger Migrationsphase bei 37 °C im Inkubator wurde die Flüssigkeit aus der oberen Kammer abpipettiert und die Boyden Chamber auseinandergebaut. Die Membran wurde vorsichtig entnommen und für 10 min in Methanol (EMSURE ACS, ISO, Reag. Ph Eur, Merck KG) fixiert. Es folgte die Färbung der in der Membran befindlichen Monozyten mittels May-Grünwald und Giemsa Färbung (Carl Roth GmbH & Co KG). Nach mehrmaligem Waschen unter destilliertem Wasser wurde die Membran mittig auf einem Objektträger (Super FrostPlus, R. Langenbrinck) platziert und mit Roti-Histokitt (Carl Roth GmbH & Co KG) und einem Deckglas eingedeckt.

Auswertung der Membran: Die Auswertung der Membranen erfolgte unter einem Lichtmikroskop bei 10-facher Vergrößerung. Es wurden pro Ansatz 5 Bilder aufgenommen und anschließend wurde mittels Bildverarbeitungssoftware (Image J, public domain, Open Source, National Institutes of Health) die Zellzahl der Monozyten pro Bild erhoben. Insgesamt wurden pro Probe somit 3 (Ansätze) x 5 (Bilder) ausgewertet und der Mittelwert aus diesen Ergebnissen berechnet.

3.3.5.2 Multipanel Analyse (Legendplex) von Thrombozytenüberständen

Zur Evaluierung der von den Thrombozyten sezernierten Zytoskelettketten und Chemokine wurde eine Multipanel Durchfluszytometrie von Thrombozytenüberständen von Wildtyp- und *Knockout*-Tieren durchgeführt. Die Probenacquisition erfolgte gemäß dem Schema zur Isolation von Thrombozyten und Herstellung von Überständen, welches bei der Monozytenmigration unter 3.3.5.1 detailliert beschrieben wird. Die eingesetzte Menge der Thrombozyten betrug wie oben beschrieben 10^9 Thrombozyten pro Ansatz. Die Aktivierung mit CRP 5 µg/ml fand für 30 min bei Raumtemperatur statt. Die anschließend durch Zentrifugation gewonnenen Überstände wurden aliquotiert und bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert.

Die weitere Verarbeitung der Überstände erfolgte gemäß dem mitgelieferten Protokoll des Legendplex Multi-Analyte Flow Assay Kit Custom Mouse Panels. Gemessen wurden stets Duplikate der vorbereiteten Proben. Die Auswertung erfolgte mittels der Software Legendplex v 8.0 von der Firma Biolegend.

3.4 Statistische Messverfahren

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt in Textform, durch Diagramme und in Tabellen. Die statistischen Analysen wurden mit der Software GraphPad Prism 7.03 durchgeführt. Die Ergebnisse wurden stets als Mittelwert ± Standardfehler (SEM, standard error of the mean) angegeben. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte nach Erstellung der Collum Statistiken und Prüfung auf parametrische oder nicht-parametrische Verteilung. Die Ermittlung der Signifikanz zweier Populationen erfolgte mittels two-tailed unpaired t-test. Ergebnisse einer Population zu verschiedenen Zeitpunkten oder nach Behandlung/Aktivierung wurden mit dem paired t-test auf Signifikanz überprüft. Beim Vergleich von mehr als zwei Gruppen (Populationen) wurde die Signifikanz mit ordinary one-way ANOVA berechnet. Statistisch signifikant sind p-Werte kleiner 0.05 (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001, **** p < 0.0001).

4 ERGEBNISSE

4.1 Evaluierung der myokardialen Ischämie und Reperfusion im Mausmodell nach Anwendung der 3R Prinzipien

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde durch Anwendung der 3R Prinzipien der Labortierkunde ein Protokoll zur Induktion der myokardialen Ischämie und Reperfusion standardisiert und evaluiert. Die 3R Prinzipien beschreiben detailliert wie die Belastung und der Einsatz von Versuchstieren bei Tierversuchen reduziert werden kann (Russell & Burch, 1959). In dem hier evaluierten Versuchsaufbau, der methodisch detailliert unter 3.3.2.1 beschrieben wird, führen vor allem Maßnahmen zur Verfeinerung der Methodik zu einer deutlichen Reduktion der Belastung der Tiere. So ist der Eingriff insgesamt deutlich weniger invasiv (Verwendung der oropharyngealen anstatt der trachealen Intubation, Verzicht auf einen Rippenretraktor dadurch Minimierung der Wunde und des Fadenmaterials, Verwendung eines dünneren Ligaturfadens). Durch Wegfall der invasiven Intubation (Tracheotomie) konnte die Operationsdauer verkürzt werden und es entfiel eine weitere Operationswunde im Bereich der ventralen Halsseite. Eine ausreichende Flüssigkeitssubstitution, die volumengesteuerte Überdruckbeatmung und die Gewährleistung einer konstanten Körpertemperatur während des Eingriffes sorgten für eine schnelle Regeneration der Tiere. Den Tieren stand darüber hinaus frisches angefeuchtetes Futter *ad libitum* zur Verfügung. Des Weiteren führte die Reduktion der Größe der Thoraxwunde zu einer geringeren Belastung der Tiere. Die Managementmaßnahmen zur Verhinderung eines Pneumothorax (3.3.2.1 Punkt 9) haben dazu geführt, dass kein Tier während oder nach der Operation aufgrund eines Pneumothorax getötet werden musste.

Die Evaluierung der beschriebenen Methodik erfolgte anhand der in Tabelle 7 eingeteilten Gruppen. Verwendet wurden C57Bl/6 Mäuse aus Eigenzucht. Neben einer Sham operierten Gruppe (Sham) wurde eine Gruppe junger C57Bl/6 (I/R C57Bl/6 (y = young, jung)) und eine Gruppe alter C57Bl/6 Tiere (I/R C57Bl/6 (o = old, alt)) operiert. Ältere (geriatrische) Tiere erfordern bei Behandlungen und Operationen höhere Vorsichtsmaßnahmen aufgrund altersbedingter körperlicher Veränderungen (Vorhandensein altersbedingter Organveränderungen, veränderte Pharmakodynamik und -kinetik). Zur Validierung, ob die veränderte Methodik der Induktion der myokardialen Ischämie und Reperfusion den Ansprüchen älterer Tiere an die Durchführung eines so

invasiven Eingriffes gerecht wird, wurde die Gruppe alter Tiere (I/R C57Bl/6 (o), Durchschnittsalter 58 Wochen) in die Etablierung und Evaluierung miteinbezogen.

Tabelle 7: Versuchsgruppen Evaluierung der Methodik zur Induktion myokardialer Ischämie und Reperfusion.

Versuch	Myokardiale Ischämie und Reperfusion (30 min, 24 h)		Sham OP (Unterstechung LAD ohne Ligatur)
Bezeichnung der Gruppe	I/R C57Bl/6 (y = young, jung) [12-16]	I/R C57Bl/6 (o = old, alt) [54-60]	Sham [15]
Tierstamm	C57Bl/6	C57Bl/6	C57Bl/6
Anzahl der Tiere	n = 8	n = 6	n = 4
Auswertung	Infarktflächen Ultraschall (EF, FS) Histologie (H.E.)	Ultraschall (EF, FS) Histologie (H.E.) Immunhistologie	

EF = Ejektionsfraktion; FS = Fraktionelle Verkürzung; H.E. = Hämatoxylin Eosin; I/R = Ischämie/Reperfusion; LAD = left anterior descending artery

Auswertung des Operationsverlaufes: Exemplarisch sind hier die Ergebnisse der Vorversuche dargestellt, wobei C57Bl/6 Tiere im Alter von 14,5 (C57Bl/6 y = young, jung) bzw. 58 Wochen (C57Bl/6 o = old, alt) operiert und miteinander verglichen wurden. Zusätzlich wurden 4 Tiere (C57Bl/6 im Alter von 15,4 Wochen) Sham-operiert (Unterstechung der LAD ohne Ligatur).

Die Durchführung der Vorversuche diente der Etablierung der unter 3.3.2 beschriebenen Methodik. Der Versuchsablauf wurde standardisiert und anhand der Auswertungen der Vorversuche wurde ein solides Protokoll etabliert, mit dem es möglich war, verschiedene Gruppen nach der Induktion der myokardialen Ischämie und Reperfusion miteinander zu vergleichen (siehe 4.2).

Die Auswertung der Vitalparameter Temperatur und Gewicht (Abbildung 12) zeigt, dass die Tiere aller Gruppen keine Auffälligkeiten nach erfolgter Operation und 24 stündiger Reperfusion zeigen. Der Temperaturverlauf zeigt, dass die Durchführung der Operation und die 24 h Reperfusion zu keiner wesentlichen Beeinflussung der Körpertemperatur

führt [C57Bl/6 (y), n = 8 vs. C57Bl/6 (o), n = 6: Baseline $36,6 \pm 0,27$ vs. $35,7 \pm 0,12$; Intra OP $36,5 \pm 0,28$ vs. $36,4 \pm 0,1$; Post OP $36,8 \pm 0,27$ vs. $36,2 \pm 0,34$; 24 h $36,2 \pm 0,25$ vs. $36 \pm 0,35$ °C; Sham, n = 4: $36,1 \pm 0,1$; $36,6 \pm 0,4$; $36,4 \pm 0,3$; $36,7 \pm 0,2$ °C; one-way ANOVA, SEM]. Ein Gewichtsverlust (siehe Abbildung 12 B) ist bei allen Gruppen feststellbar [Sham n = 4 vs. C57Bl/6 (y) n = 8 vs. C57Bl/6 (o) n = 6: $3,0 \pm 0,9$ vs. $5,3 \pm 0,8$ vs. $4,2 \pm 1\%$ KGW, one-way ANOVA, SEM]. Insgesamt waren die Tiere nach 24 h Reperfusion jedoch unauffällig im Allgemeinbefinden. Sie zeigten normales Verhalten mit einem Pain Scale von 1,1 C57Bl/6 (y) bzw. 1,7 C57Bl/6 (o) auf einer Skala von 0 = keine Schmerzsymptomatik bis 5 = starke Schmerzen, aufgekrümmter Rücken, eingeschränkte Bewegung, Zusammenkauern.

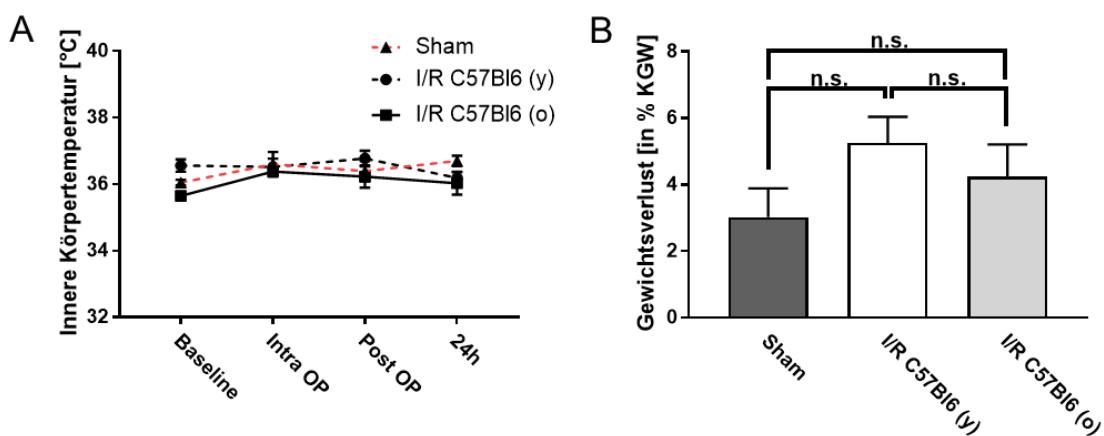


Abbildung 12. Evaluierung myokardialer Ischämie und Reperfusionsverletzung anhand des Vergleiches unterschiedlich alter Wildtyp-Gruppen Sham, n = 4; I/R C57Bl/6 (y = young, jung), n = 8; I/R C57Bl/6 (o = old, alt), n = 6, one-way ANOVA, SEM. (A) Temperaturverlaufskurve (B) Gewichtsverlust nach 24 h Reperfusionszeit.

Auswertung des Infarktes/Bestimmung Infarktfläche und Area at risk: Bei der Standardisierung des Protokolls zur Induktion der myokardialen Ischämie ist das wichtigste Qualitätskriterium der stattgefundenen Ischämie die Ermittlung der Area at risk. Sie sollte innerhalb der operierten Gruppen stets gleich, ohne einen signifikanten Unterschied sein. Die Methodik ist nur dann valide reproduzierbar, wenn die Höhe der Ligatur der LAD gleich ist. Somit ist das von der Ischämie betroffene Myokard in seiner Ausdehnung gleich und die Versuchsgruppen unterscheiden sich in der Fläche ihrer Area at risk nicht. Abbildung 13 zeigt beispielhaft ein in 6 Segmente geschnittenes Herz, wie es zur Auswertung der Infarktfläche und Area at risk verwendet wurde.

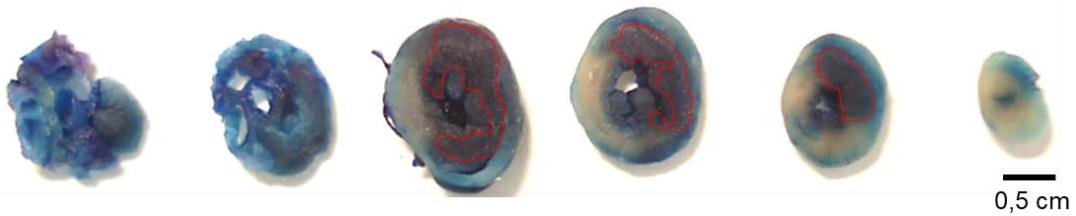


Abbildung 13. Induktion myokardialer Ischämie Evaluierung der Ischämie. Darstellung der mit Evans-Blue und TTC gefärbten Herzschnitte nach 24 h in 4% Formaldehyd. Die Infarktfläche stellt sich weiß dar, die Area at risk ist rot (hier rot umrandet). Nicht von der Ischämie betroffenes Myokard ist bläulich gefärbt.

Nach 24 h Reperfusion zeigen beide Gruppen eine einheitliche Verteilung der Area at risk bezogen auf den linken Ventrikel [Aar/LV: C57Bl/6 (y), n = 8 vs. C57Bl/6 (o), n = 6: $42,8 \pm 2,6$ vs. $41,4 \pm 1,6\%$, t-test, SEM]. Die Infarktfläche unterscheidet sich bei beiden Gruppen ebenfalls nicht signifikant [Inf/LV: C57Bl/6 (y), n = 8 vs. C57Bl/6 (o), n = 6: $19,1 \pm 1,7$ vs. $20,4 \pm 1,9\%$; Inf/Aar: $46,7 \pm 2,4$ vs. $51,4 \pm 5,2\%$, t-test, SEM]. Das Alter der Tiere hat demnach keine Auswirkungen auf die Größe des Infarktes nach 30-minütiger Ligatur der LAD und 24 stündiger Reperfusion.

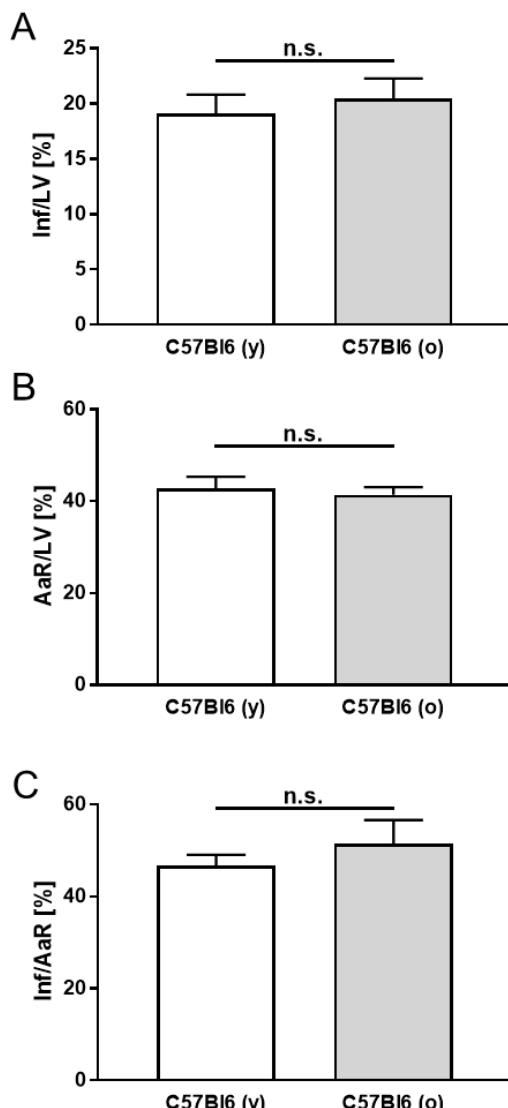


Abbildung 14. Evaluierung myokardialer Ischämie und Reperfusion anhand des Vergleiches unterschiedlich alter Wildtyp-Gruppen I/R C57Bl/6 (y = young, jung), n = 8; I/R C57Bl/6 (o = old, alt), n = 6, t-test, SEM. (A) Auswertung der Infarktfläche bezogen auf den linken Ventrikel (LV) (B) Auswertung Area at risk bezogen auf den linken Ventrikel (C) Infarktfläche bezogen auf die Area at risk

Auswertung der Herzultraschallaufnahmen: Die Auswertung der Ultraschallaufnahmen vor der Ligatur der LAD (baseline) und nach 24 h Reperfusion ist in Abbildung 16 dargestellt. Die Abbildung 15 zeigt repräsentative Bilder der Ultraschallaufnahmen. Zur Verifizierung des Infarktes diente zusätzlich das aufgezeichnete Elektrokardiogramm, welches im unteren Bereich der Ultraschallaufnahmen in Abbildung 15 dargestellt ist. Die kardialen Funktionsparameter Ejektionsfraktion (EF) und fraktionelle Verkürzung (FS) zeigen bei beiden I/R Gruppen nach 24 h Reperfusion eine signifikante Reduktion [EF baseline vs. 24 h: C57Bl/6 (y),

$73,6 \pm 2,2$ vs. $42,3 \pm 2,6\%$, n = 8, p < 0.0001; C57Bl/6 (o) 81 ± 2 vs. $50,1 \pm 5,2\%$, n = 6, p < 0.0001; FS baseline vs. 24h: C57Bl/6 (y) $37,7 \pm 2,4$ vs. $20,6 \pm 1,4\%$, n = 8, p < 0.0001; C57Bl/6 (o) $41,5 \pm 3,2$ vs. $22,5 \pm 2,4\%$, n = 6, p < 0.0001, paired t-test, SEM]. Die Sham operierten Tiere zeigen keine signifikante Abnahme der kardialen Funktionsparameter EF und FS im Ultraschall nach 24 h [Sham EF: baseline $70,5 \pm 1,2$ vs. 24 h $64,6 \pm 4,4\%$, n = 4, p = 0.8903; Sham FS: baseline $35,4 \pm 0,8$ vs. 24 h $34,8 \pm 3,2\%$, n = 4, p > 0.9999, paired t-test, SEM].

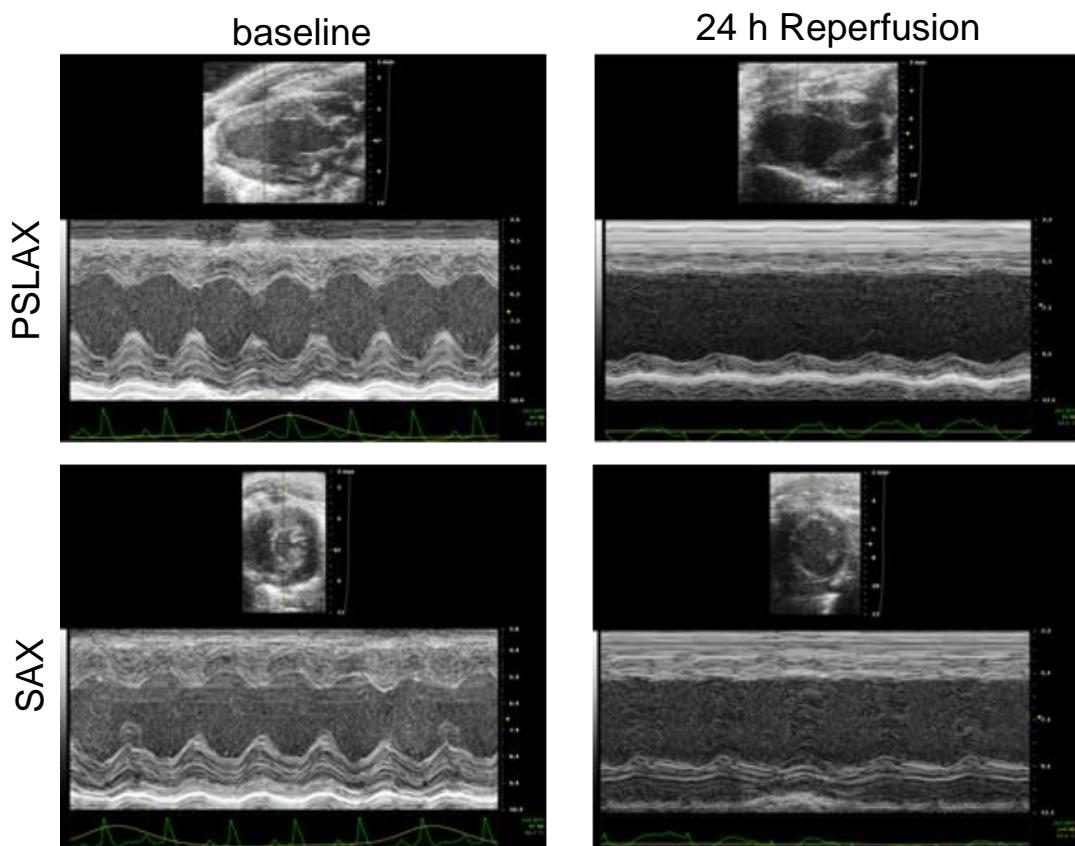


Abbildung 15. Beispielhafte Darstellung des stattgefundenen Myokardinfarktes mittels Ultraschallaufnahmen im M-Mode und Elektrokardiogramm. PSLAX = parasternal long axis view; SAX = short axis view

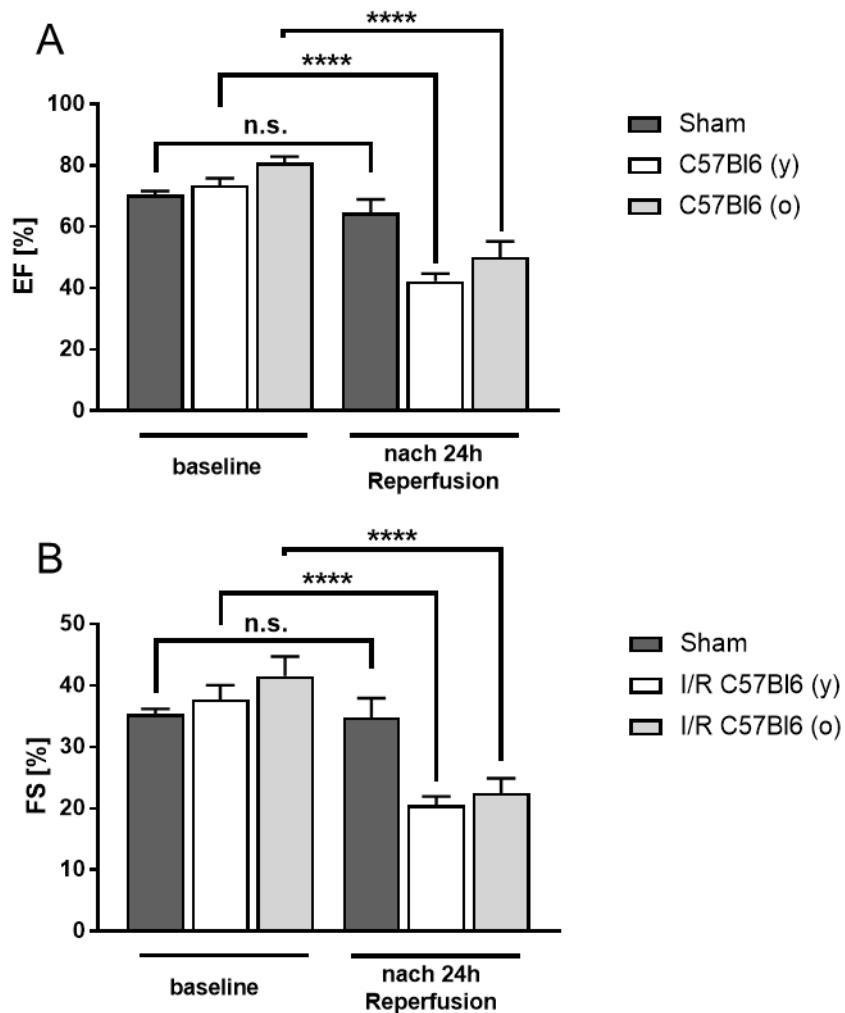


Abbildung 16. Evaluierung des Infarktes anhand kardialer Funktionsparameter von Sham und I/R operierten C57Bl/6 Tieren. (A) Ejektionsfraktion (EF) baseline vs. 24 h: C57Bl/6 (y), $73,6 \pm 2,2$ vs. $42,3 \pm 2,6\%$, n = 8, p < 0.0001; C57Bl/6 (o) 81 ± 2 vs. $50,1 \pm 5,2\%$, n = 6, p < 0.0001; Sham $70,5 \pm 1,2$ vs. $64,6 \pm 4,4\%$, n = 4, p = 0.8903, paired t-test, SEM (B) Fractional Shortening (FS, Fraktionelle Verkürzung, Verkürzungsfraktion) baseline vs. 24h: C57Bl/6 (y) $37,7 \pm 2,4$ vs. $20,6 \pm 1,4\%$, n = 8, p < 0.0001; C57Bl/6 (o) $41,5 \pm 3,2$ vs. $22,5 \pm 2,4\%$, n = 6, p < 0.0001; Sham $35,4 \pm 0,8$ vs. $34,8 \pm 3,2\%$, n = 4, p > 0.9999, paired t-test, SEM

Histologische Untersuchungen: Die Auswertung der Hämatoxylin Eosin gefärbten Paraffinschnitte zeigt eine deutliche Infiltration von Zellen nach 24 h Reperfusion. Im Vergleich zu den Sham operierten Tieren zeigt sich eine signifikante Zunahme der Gesamtzellkernzahl pro mm² (Abbildung 17).

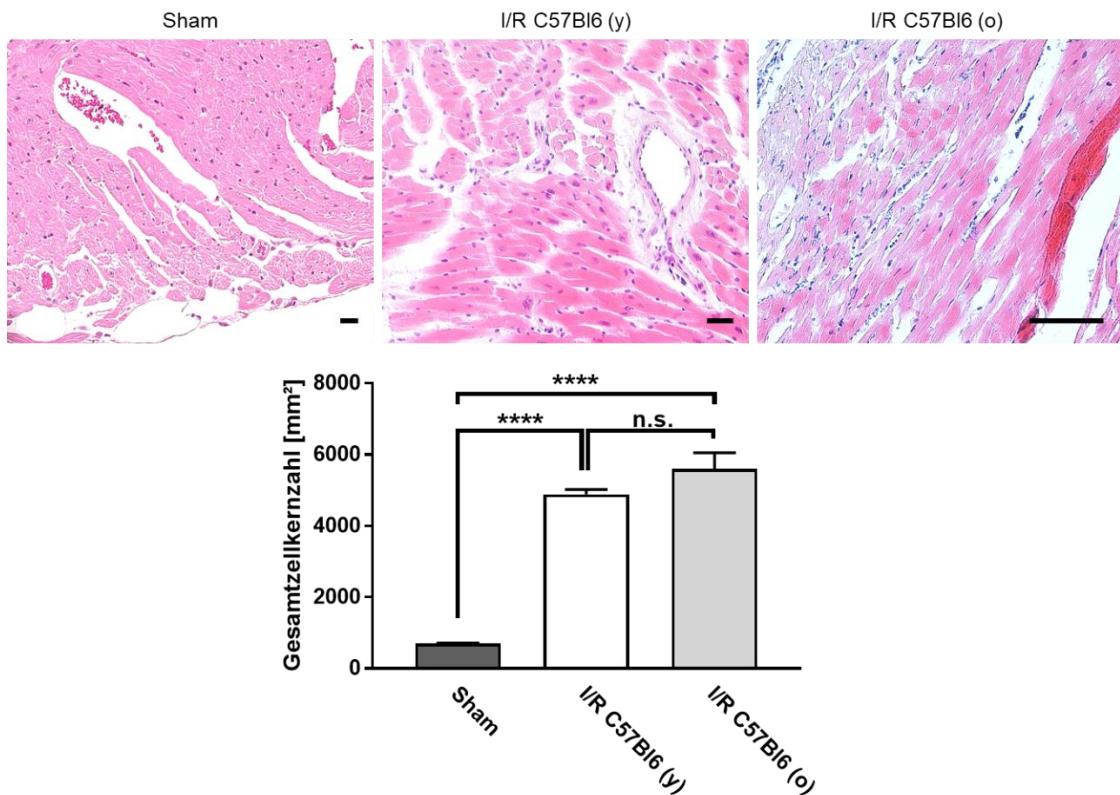


Abbildung 17. Histologischer Vergleich der Gesamtzellkernzahl nach Induktion myokardialer Ischämie und 24 h Reperfusion bei C57Bl/6 Tieren Sham, n = 4; I/R C57Bl/6 (y = young, jung), n = 8; I/R C57Bl/6 (o = old, alt), n = 6, one-way ANOVA, SEM. Sham n = 4, $704,6 \pm 9,7$ vs. I/R C57Bl/6 (y = young, jung) n = 8, $4892 \pm 132,2$ Zellkerne/ mm^2 , p < 0,0001; Sham vs. I/R C57Bl/6 (o = old, alt) n = 6, $5600 \pm 454,1$ Zellkerne/ mm^2 , p < 0,0001 (Maßstab = 20 μm)

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass die Umsetzung der Methodik zur Induktion myokardialer Ischämie und Reperfusion im Mausmodell zu reproduzierbaren Ergebnissen führt. Im Versuchsablauf der hier evaluierten Versuchsgruppen (Sham, I/R C57Bl/6 (y = young, jung) und I/R C57Bl/6 (o = old, alt)) ist es zu keinerlei operationsbedingten Auffälligkeiten und Ausfällen gekommen. Alle Tiere zeigten nach 24 h Reperfusion arttypisches Verhalten mit unauffälligen Vitalparametern. Die Auswertung der Infarktfläche, des Ultraschalls und der Histologie zeigen eine gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse und demonstrieren die sichere Induktion der myokardialen Ischämie.

4.2 Myokardiale Ischämie und Reperfusion im *Knockout* Modell

Die Auswirkungen des Pf4-Cre CXCR7 *Knockouts* auf das Outcome nach Infarkt wurde durch die Anwendung der unter 4.1 evaluierten Methodik genauer untersucht. Zur Beantwortung der Frage, welchen Einfluss der *Knockout* insbesondere auf das inflammatorische Geschehen hat, überlebten die Tiere 24 Stunden nach der Ligatur (24 Stunden Reperfusion). Verglichen wurden im Rahmen dieser Arbeit stets Pf4-Cre negative CXCR7^{fl/fl} Wildtypen (nachfolgend als fl/fl bezeichnet) mit Pf4-Cre positiven CXCR7^{fl/fl} *Knockout*-Tieren (nachfolgend als -/- bezeichnet).

4.2.1 Auswertung des Infarktes

Der Knockout von CXCR7 auf Thrombozyten führt zu einer signifikant größeren Infarktfläche nach Ischämie und Reperfusion: In der Abbildung 18 ist die Auswertung der Infarktflächen und Area at risk und ihr flächenmäßiger Anteil an der Gesamtfläche des linken Ventrikels (LV) dargestellt. Die Area at risk, entspricht der von der Ligatur betroffenen Fläche. Diese soll sich zwischen den Versuchsgruppen nicht signifikant voneinander unterscheiden, siehe dazu Abbildung 18 C [(fl/fl) 59,4 ± 2,4% vs. (-/-) 54,2 ± 1,1%, n = 6, p = 0,0752, t-test, SEM]. Die *Knockout*-Tieren zeigen signifikant größere Infarkte bezogen auf die Area at risk [(fl/fl) 31,1 ± 1,3% vs. (-/-) 39,2 ± 2,6%, n = 6, p = 0,0187, t-test, SEM].

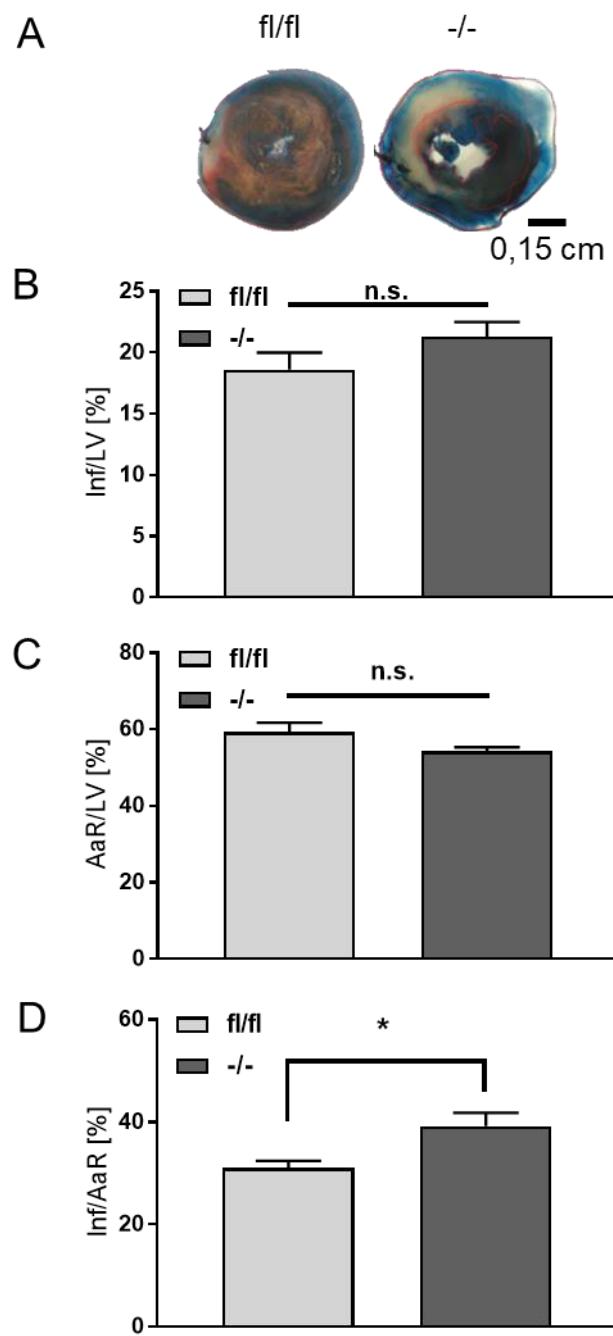


Abbildung 18. Myokardiale Ischämie und Reperfusion im Knockout Modell fl/fl = Wildtyp = Pf4-Cre negative CXCR7^{fl/fl}; -/- = Knockout = Pf4-Cre positive CXCR7^{fl/fl}; n = 6, t-test, SEM. Auswertung der Infarktfläche und Area at risk nach 30-minütiger Ischämie und 24 stündiger Reperfusion (**A**) Repräsentative Darstellung infarzierter Herzsegmente von Wildtyp- und Knockout-Tieren nach Evans-Blue und TTC-Färbung (**B**) Infarktgröße bezogen auf den linken Ventrikel (LV) (fl/fl) 18,6 ± 1,4% vs. (-/-) 21,3 ± 1,2%, n = 6, p = 0,1713 (**C**) Area at risk bezogen auf den linken Ventrikel (fl/fl) 59,4 ± 2,4% vs. (-/-) 54,2 ± 1,1%, n = 6, p = 0,0752 (**D**) Infarktgröße bezogen auf die Area at risk (fl/fl) 31,1 ± 1,3% vs. (-/-) 39,2 ± 2,6%, n = 6, p = 0,0187

4.2.2 Auswertung der Herzultraschalldaten

Die Auswertung der kardialen Funktionsparameter Ejektionsfraktion (EF) und Fractional Shortening (FS, Fraktionelle Verkürzung) ergeben keinen Unterschied zwischen Wildtyp- und *Knockout*-Tieren nach 30-minütiger Ischämie und 24 stündiger Reperfusion. Bei allen Tieren zeigt sich eine signifikante Verschlechterung der Ejektionsfraktion sowie der fraktionellen Verkürzung nach 24 h im Vergleich zu den vor Induktion der Ischämie ermittelten baseline Werten (Abbildung 19).

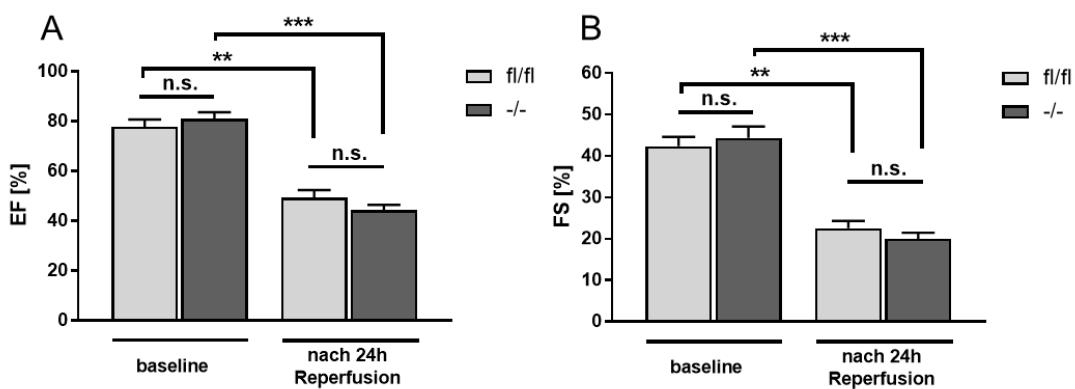


Abbildung 19. Ultraschallauswertung nach Induktion myokardialer Ischämie und Reperfusion Vergleich von Wildtyp- (fl/fl) und Pf4-Cre positiven CXCR7 Knockout-Tieren (-/-); n = 6, paired t-test, SEM. (A) Ejektionsfraktion (EF) (fl/fl) baseline: 77,8 ± 2,9% vs. 24 h: 49,3 ± 3,1%, n = 6, p = 0,002; (-/-) baseline: 81 ± 2,7% vs. 24 h: 44,2 ± 2,3%, n = 6, p = 0,0002 (B) Fraktionelle Verkürzung (FS) (fl/fl) baseline: 42,4 ± 2,3% vs. 24 h: 22,6 ± 1,8%, n = 6, p = 0,0019; (-/-) baseline: 44,4 ± 2,7% vs. 24 h: 20 ± 1,5%, n = 6, p = 0,0007

Die Tabellen im Anhang (Anh. Tabelle 10 und Anh. Tabelle 11) zeigen die vollständige Analyse, der mittels Echokardiographie ermittelten kardialen Parameter. Festzustellen ist, dass sich die Herzfunktion von Wildtyp- und *Knockout*-Tieren nicht unterscheidet (baseline ermittelte Werte). Post Infarkt und nach 24 stündiger Reperfusion zeigen beide Versuchsgruppen eine hochgradige Verschlechterung der Herzfunktion (Anh. Tabelle 12 und Anh. Tabelle 13), die sich zwischen beiden Gruppen lediglich in der Dicke der posterioren linken Ventrikelwand in der Diastole (Anh. Tabelle 11) (LVPW, d) signifikant voneinander unterscheiden [LVPW, d: (fl/fl) 1,0 ± 0,1 vs. (-/-) 1,6 ± 0,3 mm, n = 6, p = 0,0473, t-test, SEM]. Nach Infarkt und 24 h Reperfusion führt der CXCR7 Rezeptor *Knockout* auf Thrombozyten im Vergleich zum Wildtyp demnach zu keiner wesentlichen Beeinflussung der Herzfunktion.

4.2.3 Auswertung der Histologie: Hämatoxylin Eosin Färbung

Die Abbildung 20 zeigt beispielhaft die Verteilung der infiltrierten Zellen im Myokard. Die Bilder veranschaulichen die Differenzierung des Myokards in verschiedene Zonen/Bereiche nach Ischämie und Reperfusion. Deutlich blass mit teilweise nekrotischen Bereichen stellt sich der Infarktbereich im Myokard dar (Infarkt). Stellenweise kann es hier zu einem Strukturverlust des Myokards kommen, welcher auch als mechanischer Schaden zu beschreiben ist. Der Infarktbereich strahlt in die Übergangszone aus, die durch eine deutliche Infiltration von Zellen und erhöhte Ab- und Umbauvorgänge gekennzeichnet ist. Vollkommen unverändert und damit der Struktur des gesunden Myokards entsprechend, stellt sich das restliche, vom Infarkt nicht betroffene Gewebe dar (unverändertes Myokard). Jedoch sind auch in diesen Bereichen mitunter vermehrt inflammatorische Zellen auffindbar, die rekrutiert durch die stattfindende Inflammation und Nekrose auf ihrem Weg zum pathologisch veränderten Bereich des Myokards sind.

Die *Knockout*-Tiere zeigen in der Auswertung der Hämatoxylin Eosin Färbung (siehe Abbildung 21) eine deutliche Infiltration nukleärer Zellen im Myokard [(fl/fl) $4914 \pm 435,5$ vs. (-/-) 6678 ± 295 Gesamtzellkernzahl/mm², n = 6, p = 0.0073, t-test, SEM].

ERGEBNISSE

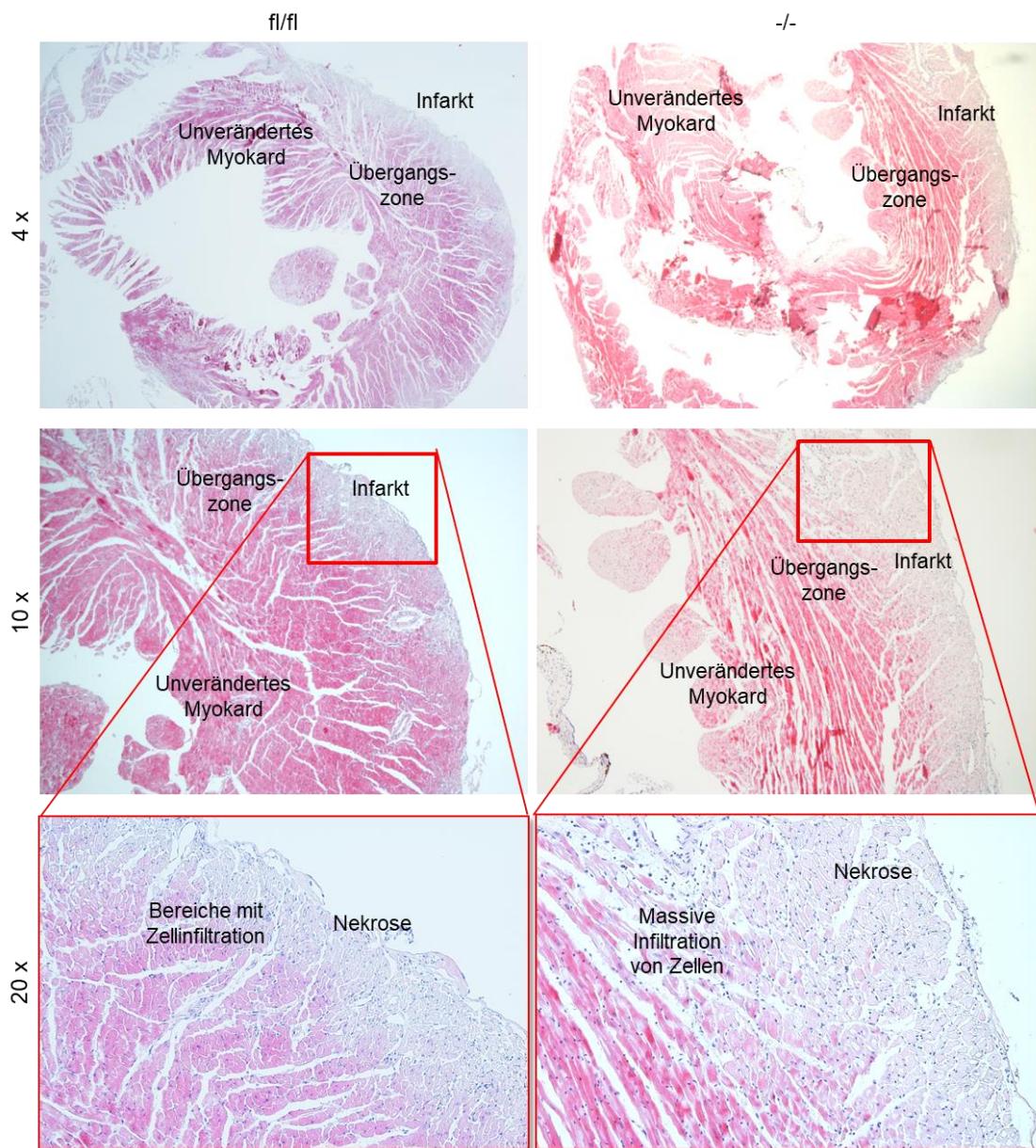


Abbildung 20. Histologischer Vergleich Hämatoxylin Eosin gefärbten Myokards von Wildtyp- (fl/fl) und Knockout-Tieren (-/-) nach Ischämie und Reperfusion.

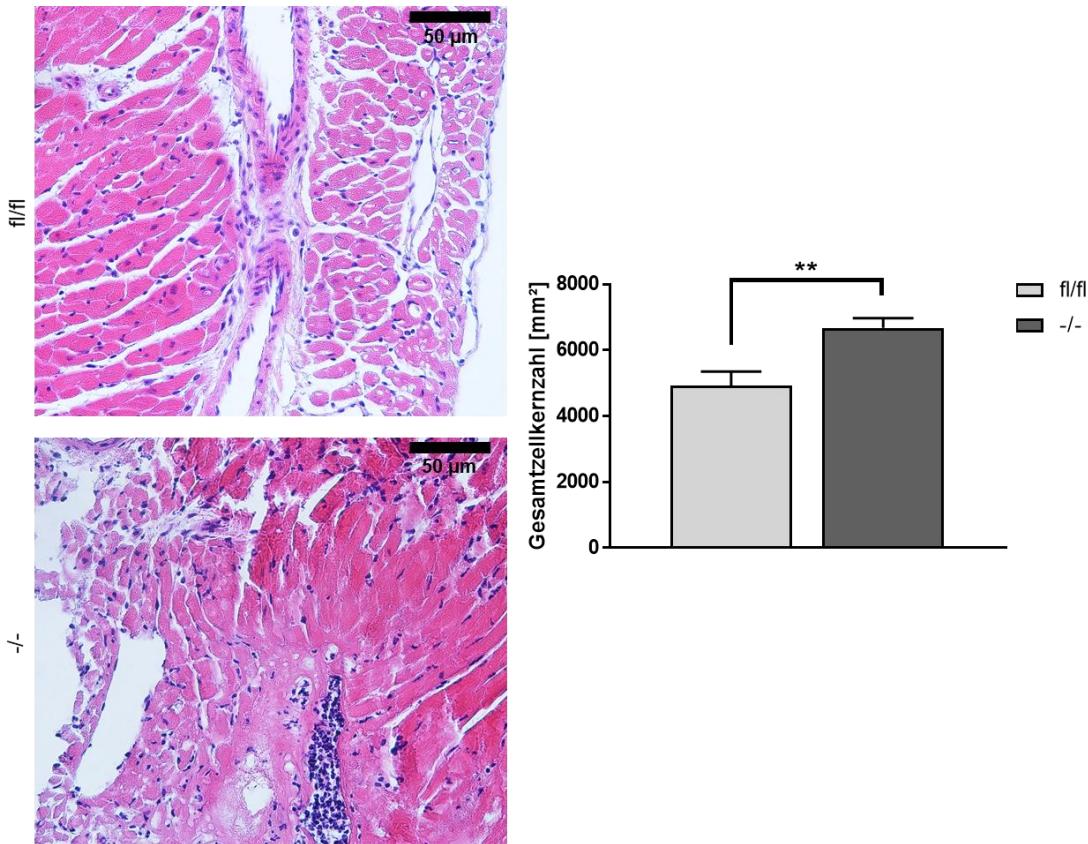


Abbildung 21. Repräsentative Darstellung Hämatoxylin Eosin Färbung von Myokardschnitten mit Auswertung der Gesamtzellkernzahl pro mm² von Wildtyp- (fl/fl) und Knockout-Tieren (-/-) nach Ischämie und Reperfusion. (fl/fl) $4914 \pm 435,5$ vs. (-/-) 6678 ± 295 Gesamtzellkernzahl/mm², n = 6, p = 0.0073, t-test, SEM

4.2.4 Auswertung der Immunhistologie

Die immunhistochemische Auswertung zeigt eine vermehrte inflammatorische Immunantwort, die Akkumulation von Thrombozyten sowie eine Reduktion der Mitoserate beim Pf4-Cre CXCR7 Knockout: Zur Sicherstellung, dass ein Vergleich der Proben hinsichtlich ihrer immunhistochemischen Differenzierung gegeben ist, wurden in diesem Versuchsaufbau zusätzlich zu den acht Wildtypen (I/R fl/fl) und sechs Pf4-Cre CXCR7 Knockout-Tieren (I/R -/-) vier Sham Tiere operiert (Unterstechung der LAD ohne Ligatur).

MHCII, major histocompatibility complex II: Im Vergleich zum Wildtyp zeigen die Knockout-Tiere kein vermehrtes Auftreten von MHC II positiven Zellen nach Ischämie und Reperfusion (Abbildung 22). Bezogen auf die Kontrollgruppe der Sham Tiere, ist jedoch eine signifikante Akkumulation MHC II positiver Zellen im Myokard der

Knockout-Tiere festzustellen [MHC II pos. Zellen/mm²: Sham n = 4, 37,2 ± 6,3 vs. (-/-) n = 6, 73,3 ± 8, p = 0,0117, one-way ANOVA, SEM].

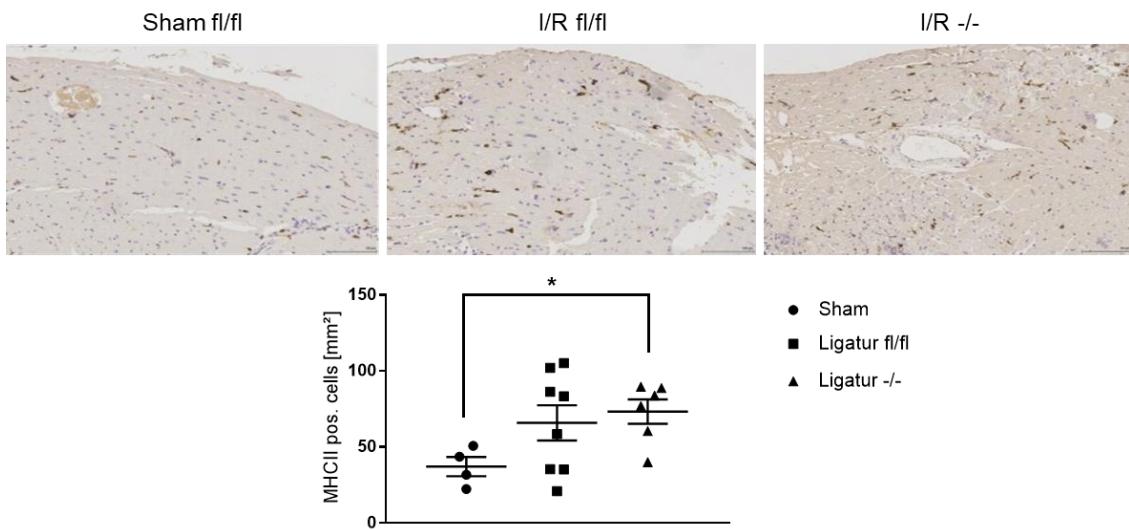


Abbildung 22. MHC II positive Zellen/mm² im Myokard von Sham operierten (n = 4) und I/R operierten Tieren Wildtyp fl/fl (n = 8) und Pf4-Cre CXCR7 Knockout -/- (n = 6), one-way ANOVA, SEM. Sham n = 4, 37,2 ± 6,3 vs. (-/-) n = 6, 73,3 ± 8, p = 0,0117 (Maßstab = 100 µm)

Ly6G, neutrophile Granulozyten: Zur Detektion und Auswertung der infiltrierten neutrophilen Granulozyten wurden immunhistochemische Färbungen mit einem Ly6G Antikörper durchgeführt (Abbildung 23). Die Auswertung zeigt eine deutliche Infiltration mit Ly6G positiven Zellen beim *Knockout* im Vergleich zu der Sham operierten Gruppe. Insgesamt findet sogar eine signifikant stärkere Infiltration Ly6G positiven Zellen bei den *Knockout*-Tieren im Vergleich zum Wildtyp statt [Ly6G pos. Zellen/mm²: Sham n = 4, 34,4 ± 3,9 vs. (-/-) n = 6, 222,1 ± 33,2, p = 0,0008; (fl/fl) n = 8, 107,4 ± 20,6 vs. (-/-) n = 6, 222,1 ± 33,2, p = 0,0094, one-way ANOVA, SEM].

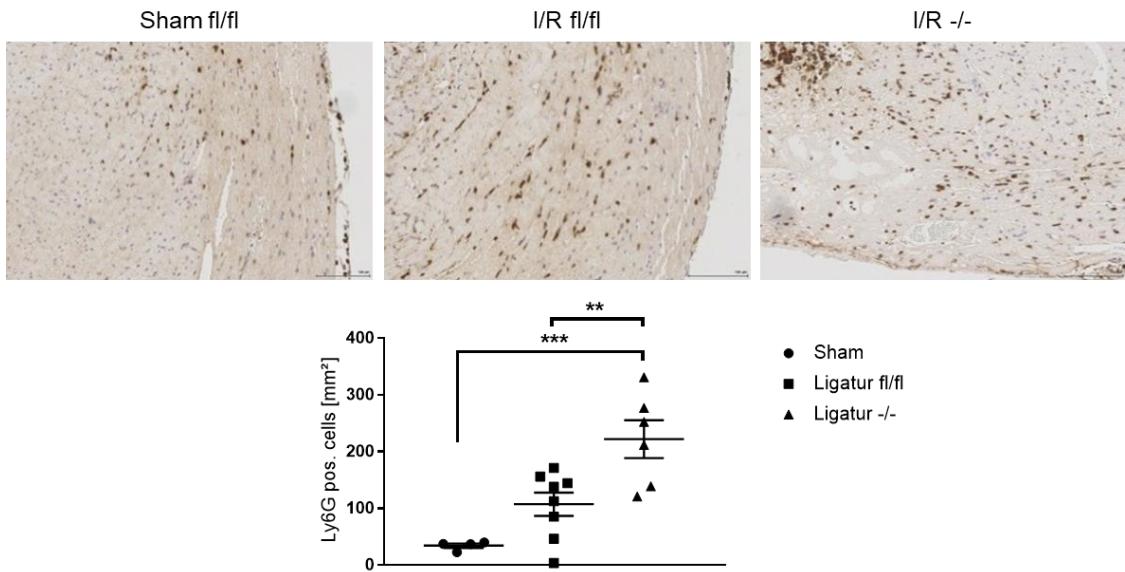


Abbildung 23. Ly6G positive Zellen/mm² im Myokard von Sham operierten (n = 4) und I/R operierten Tieren Wildtyp fl/fl (n = 8) und Pf4-Cre CXCR7 Knockout -/- (n = 6), one-way ANOVA, SEM. Sham n = 4, 34,4 ± 3,9 vs. (-/-) n = 6, 222,1 ± 33,2, p = 0,0008; (fl/fl) n = 8, 107,4 ± 20,6 vs. (-/-) n = 6, 222,1 ± 33,2, p = 0,0094 (Maßstab = 100 µm)

B220, B-Zellen: Die Abbildung 24 zeigt die Infiltration B220 positiver Zellen in infarziertes Myokard, welche signifikant verstärkt ist beim Vergleich von Sham und Knockout-Tieren [B220 pos. Zellen/mm²: Sham n = 4, 7 ± 1,5 vs. (-/-) n = 6, 24,3 ± 2,2, p = 0,0117, one-way ANOVA, SEM].

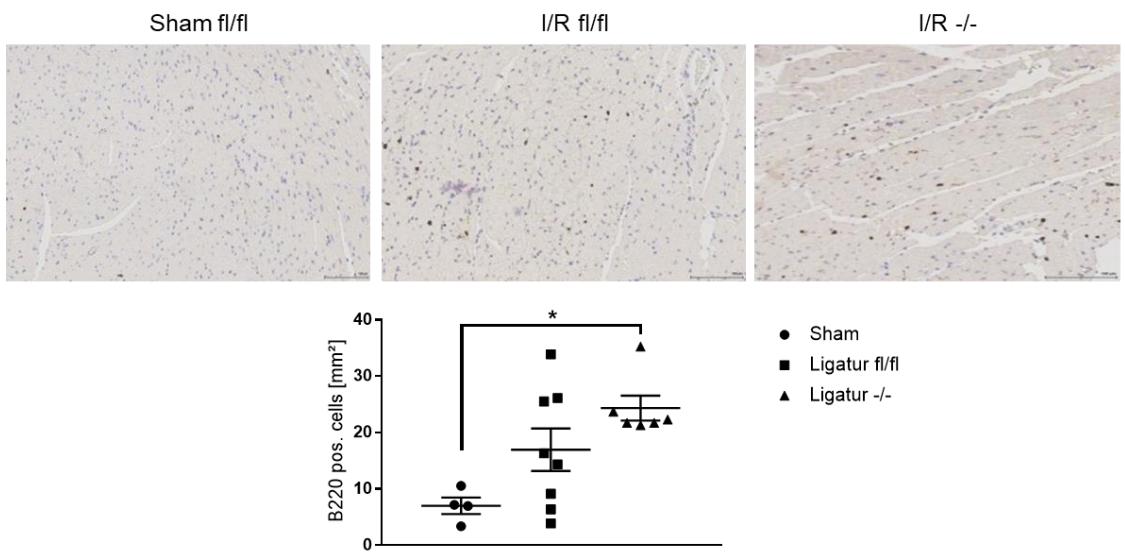


Abbildung 24. B220 positive Zellen/mm² im Myokard von Sham operierten (n = 4) und I/R operierten Tieren Wildtyp fl/fl (n = 8) und Pf4-Cre CXCR7 Knockout -/- (n = 6), one-way ANOVA, SEM. Sham n = 4, 7 ± 1,5 vs. (-/-) n = 6, 24,3 ± 2,2 Zellen/mm², p = 0,0117 (Maßstab = 100 µm)

CD3, T-Zellen: Der Abbildung 25 ist zu entnehmen, dass zwar eine steigende Zahl CD3 positiver Zellen im Myokard nach Ischämie und Reperfusion im Vergleich zur Sham operierten Gruppe feststellbar ist, jedoch ergaben sich keinerlei Signifikanzen [CD3 pos. Zellen/mm²: Sham n = 4, 3,1 ± 0,2, (fl/fl) n = 7, 4,4 ± 0,9, (-/-) n = 6, 4,1 ± 0,2, one-way ANOVA, SEM].

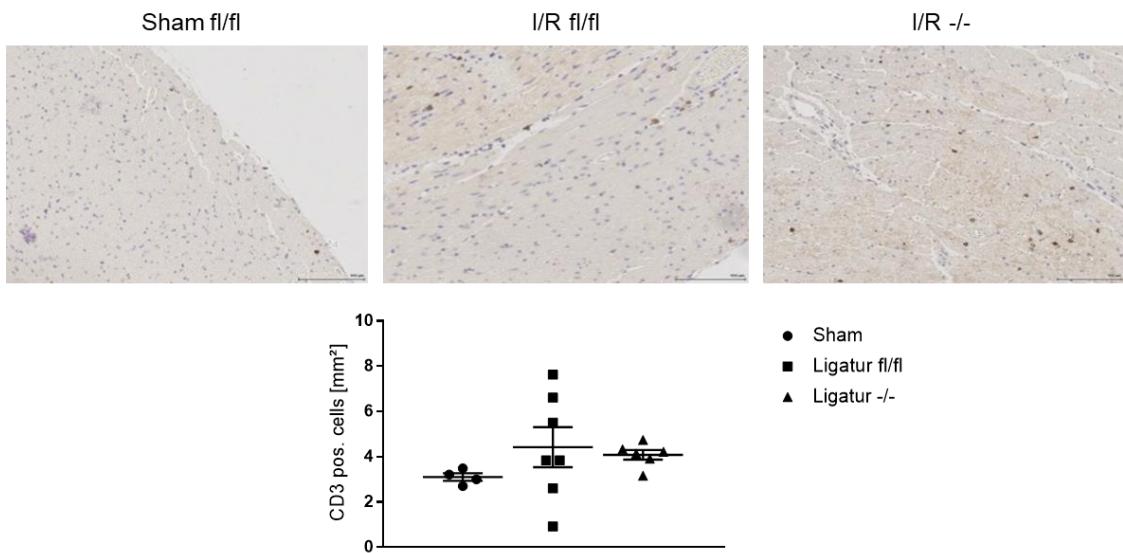


Abbildung 25. CD3 positive Zellen/mm² im Myokard von Sham operierten (n = 4) und I/R operierten Tieren Wildtyp fl/fl (n = 7) und Pf4-Cre CXCR7 Knockout -/- (n = 6), one-way ANOVA, SEM. (Maßstab = 100 µm)

CD42b, Thrombozyten: In Abbildung 26 ist deutlich ersichtlich, dass nach Ischämie und 24 stündiger Reperfusion eine Akkumulation von Thrombozyten (CD42b positive Zellen) stattfindet. Während die Auswertung der Sham operierten Tiere (n = 4) einen Basalwert von $66,7 \pm 9$ CD42b positiver Zellen pro mm² ergibt, zeigt sich sowohl für den Wildtyp [n = 8, $221,4 \pm 39,1$ Zellen/mm²] und mit Signifikanz auch für den *Knockout* [n = 6, $290 \pm 46,8$ Zellen/mm² vs. Sham, p = 0.0098, one-way ANOVA, SEM] eine deutliche Akkumulation von Thrombozyten nach Ischämie und Reperfusion.

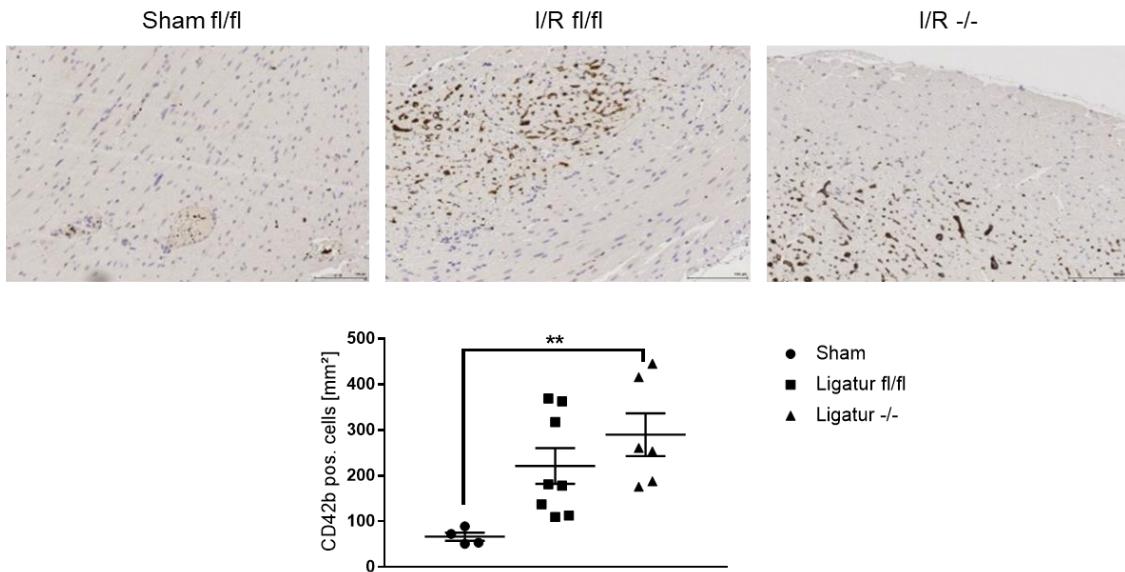


Abbildung 26. CD42b positive Zellen/mm² im Myokard von Sham operierten (n = 4) und I/R operierten Tieren Wildtyp fl/fl (n = 8) und Pf4-Cre CXCR7 Knockout -/- (n = 6), one-way ANOVA, SEM. Sham n = 4, 66,7 ± 9 vs. (-/-) n = 6, 290 ± 46,8 Zellen/mm², p = 0,0098 (Maßstab = 100 µm)

Zur Differenzierung einiger Stoffwechselaktivitäten im Rahmen der Inflammation wurden immunhistochemische Analysen des Myokards mit den Antikörpern Caspase3 (Marker für Apoptose, Proteolyse), pStat3 (Marker für die Regulation von Wachstum, Transduktionsmarker) sowie ki67 (Mitosemarker) durchgeführt (Abbildung 27). Die Caspase3 Aktivität ist unauffällig beim Vergleich der drei Gruppen (Abbildung 27 A). Beim Scoring von pStat3 ergeben sich signifikante Werte für die Wildtypen und Knockout-Tiere im Vergleich zu den Sham operierten Tieren (siehe Abbildung 27 B) [pStat3 Score: Sham n = 4, 1 ± 0,5 vs. (fl/fl) n = 8, 3,9 ± 0,1, p < 0,0001; Sham n = 4, 1 ± 0,5 vs. (-/-) n = 6, 3,5 ± 0,2, p < 0,0001, one-way ANOVA, SEM]. Signifikante Unterschiede zwischen der Wildtyp- und Knockout-Gruppe ergeben sich bei den Kinase 67 (ki67) positiven Zellen pro mm² (siehe Abbildung 27 C) [ki67 pos. Zellen/mm²: (fl/fl) n = 6, 60,3 ± 11,1 vs. (-/-) n = 5, 20,6 ± 7,1, p = 0,0215, one-way ANOVA, SEM]. Der Wildtyp weist insgesamt eine deutliche, signifikante Erhöhung ki67 positiver Zellen auf [ki67 pos. Zellen/mm²: Sham n = 4, 22,6 ± 6,7 vs. (fl/fl) n = 6, 60,3 ± 11,1, p = 0,0348, one-way ANOVA, SEM].

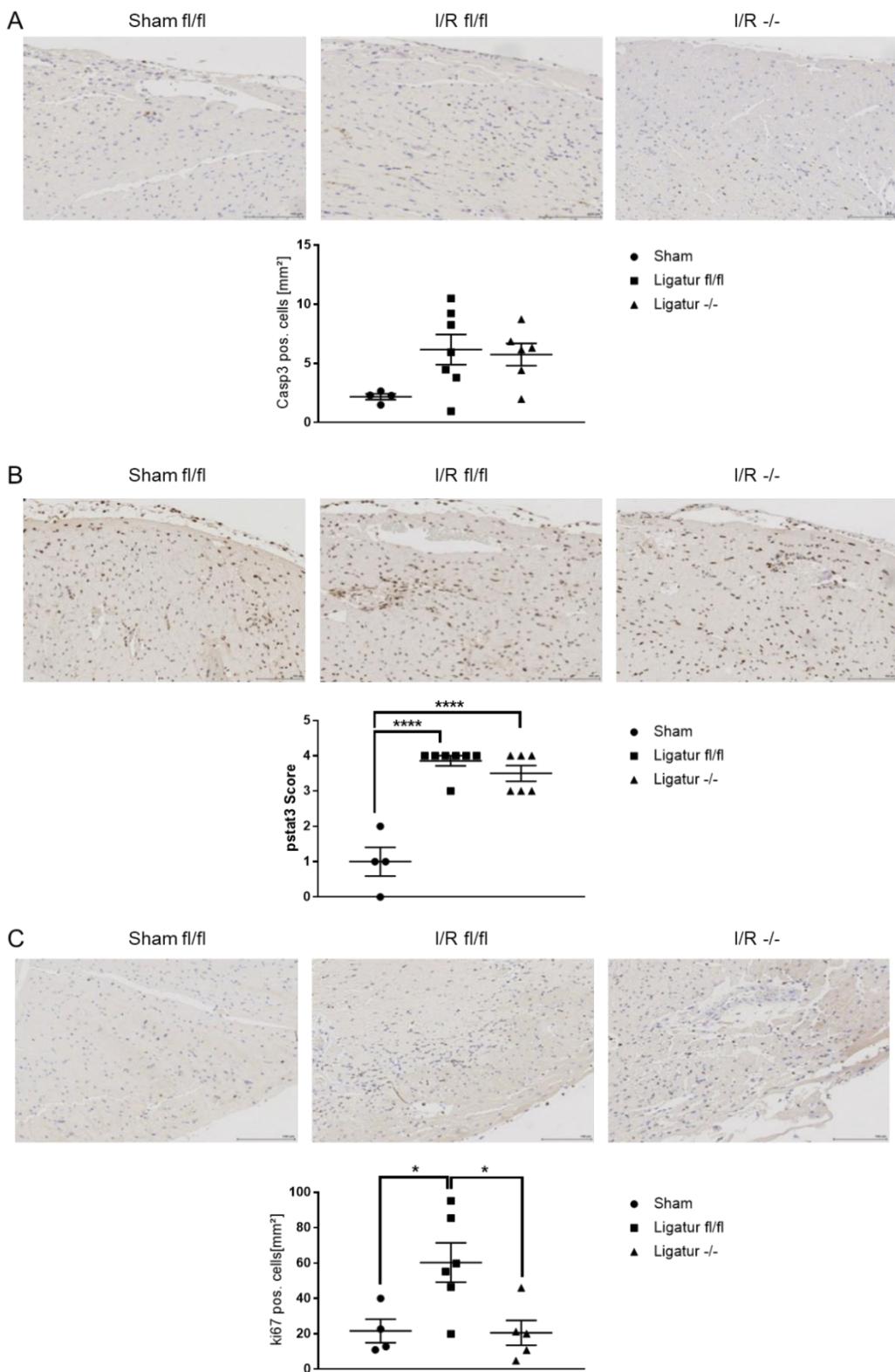


Abbildung 27. Immunhistochemische Marker für den Zellstoffwechsel im Myokard nach Ischämie und Reperfusion, one-way ANOVA, SEM. (A) Caspase3 Sham n = 4, (fl/fl) n = 7, (-/-) n = 6 **(B) pStat3 score** Sham n = 4, 1 ± 0,5 vs. (fl/fl) n = 8, 3,9 ± 0,1, p < 0,0001; Sham n = 4, 1 ± 0,5 vs. (-/-) n = 6, 3,5 ± 0,2, p < 0,0001 **(C) Kinase 67** (fl/fl) n = 6, 60,3 ± 11,1 vs. (-/-) n = 5, 20,6 ± 7,1, p = 0,0215; Sham n = 4, 22,6 ± 6,7 vs. (fl/fl) n = 6, 60,3 ± 11,1, p = 0,0348 (Maßstab = 100 µm)

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der Pf4-Cre CXCR7 *Knockout* anhand der Auswertung der Histologie eine gesteigerte Inflammation nach Ischämie und Reperfusion zeigt. Charakterisiert ist diese Entzündungsreaktion durch die vermehrte Infiltration mit nukleären Zellen (Gesamtzellkernzahl). Deren weitere Differenzierung mittels Immunhistologie eine vermehrt inflammatorische Immunantwort zeigt (signifikante Infiltration mit Ly6G positiven Zellen, Zunahme antigenpräsentierender Zellen (MHC II) und B-Zellen (B220)). Zusätzlich findet eine deutliche Akkumulation mit Thrombozyten (CD42b positive Zellen) und Reduktion der Mitose beim *Knockout* statt (ki67 positive Zellen).

4.2.5 Auswertung der Plasmaproben

4.2.5.1 Ergebnisse des cTroponin I ELISA

Die Messung des kardialen Troponin I (cTroponin I oder cTnI) gilt als Goldstandard zum Nachweis einer Schädigung des Myokards nach akutem Myokardinfarkt. Die Messung erfolgte im Plasma, nach den Angaben des Herstellers des ELISA. Die Auswertung ergibt einen Anstieg über Norm (im Vergleich zu nicht operierten Tieren; Daten nicht abgebildet) des kardialen Troponin I sowohl bei Wildtyp- wie auch bei *Knockout*-Tieren nach Ischämie und 24 stündiger Reperfusion. Somit ist von einem myokardialen Schaden bei beiden Versuchsgruppen auszugehen. Der Unterschied zwischen Wildtyp und *Knockout* ist signifikant, was das Ergebnis des größeren Infarktgeschehens bei den *Knockout*-Tieren (4.2.1) zusätzlich untermauert.

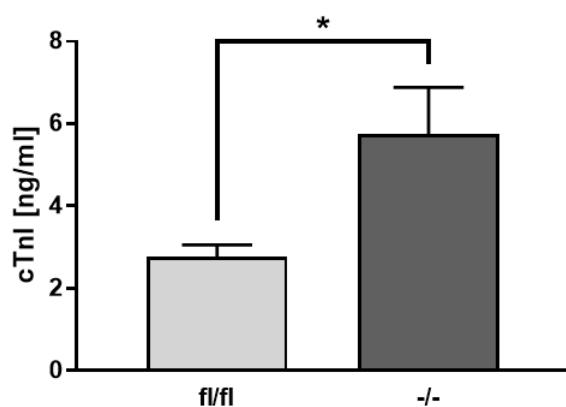


Abbildung 28. Ergebnisse der Messung des kardialen Troponin I (cTnI) von Wildtyp- (fl/fl) und Knockout-Tieren (-/-) nach Ischämie und Reperfusions. (fl/fl) $2,78 \pm 0,28$ vs. (-/-) $5,74 \pm 1,14$ ng/ml, $n = 6$, $p = 0,0304$, t-test, SEM

4.2.5.2 Ergebnisse der LEGENDplex Messung

Nach Induktion einer 30-minütigen myokardialen Ischämie und 24 stündiger Reperfusion weist der Pf4-Cre CXCR7 *Knockout* ein verändertes Chemo- und Zytokinprofil im Plasma auf (Abbildung 29). Von den gemessenen Chemokinen ergeben sich für CXCL5, bei den Zytokinen für IL6 signifikante Unterschiede [CXCL5: (fl/fl) $142,7 \pm 27,2$ vs. (-/-) $426,8 \pm 74,5$ pg/ml, n = 10, p = 0.0021; IL 6: (fl/fl) $2,8 \pm 0,6$ vs. (-/-) $14,9 \pm 5,2$ pg/ml, n = 7, p = 0.0382, t-test, SEM]. Weitere Werte für die Chemokinkonzentrationen sind der Anh. Tabelle 14 im Anhang zu entnehmen.

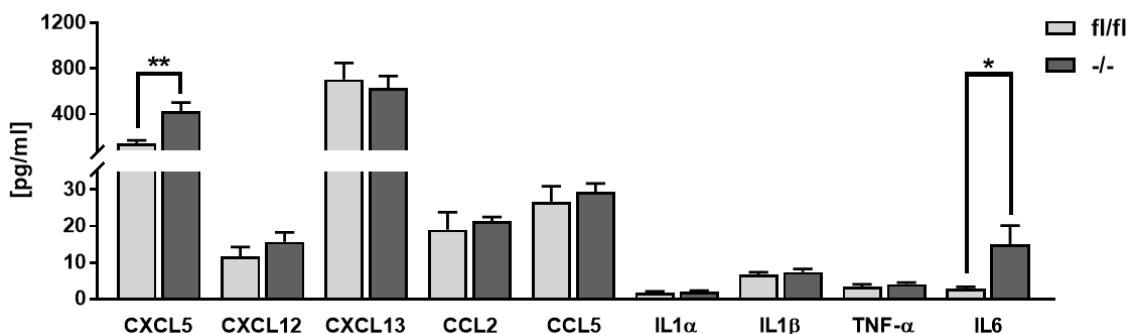


Abbildung 29. Chemo- und Zytokinprofil der Plasmaproben von Wildtyp- (fl/fl) und Knockout-Tieren (-/-) nach 30-minütiger Ischämie und 24 h Reperfusions. CXCL5: (fl/fl) $142,7 \pm 27,2$ vs. (-/-) $426,8 \pm 74,5$ pg/ml, n = 10, p = 0.0021; IL 6: (fl/fl) $2,8 \pm 0,6$ vs. (-/-) $14,9 \pm 5,2$ pg/ml, n = 7, p = 0.0382, t-test, SEM. Weitere Werte und statistische Berechnung sind Anh. Tabelle 14 im Anhang zu entnehmen

4.2.6 Auswertung des Aktivierungsgrades der Thrombozyten 24 h post Ischämie

Der Aktivierungsgrad von Thrombozyten lässt sich wie unter 3.3.4.7 beschrieben mittels durchfluszytometrischer Messung von CD62P (P-Selektin; Maß für die α -Degranulation) ermitteln. Zur Messung, ob eine Veränderung im Aktivierungsgrad der Thrombozyten durch die Induktion der myokardialen Ischämie mit Reperfusions stattgefunden hat, wurden die Messungen an Tag 0 (baseline = vor Myokardinfarkt) und 24 Stunden nach Myokardinfarkt durchgeführt. Der Abbildung 30 ist zu entnehmen, dass sowohl die Thrombozyten der Wild- wie auch der Knockout-Tiere eine vermehrte Expression von CD62P nach 24 h Reperfusions zeigen [(fl/fl) baseline $8,4 \pm 1,5$ vs. 24 h $21,3 \pm 1,2$ MFI, n = 5, p = 0.0013, paired t-test; (-/-) baseline $6,8 \pm 0,6$ vs. 24 h $22,9 \pm 1,6$ MFI, n = 6, p = 0.0016, paired t-test; SEM].

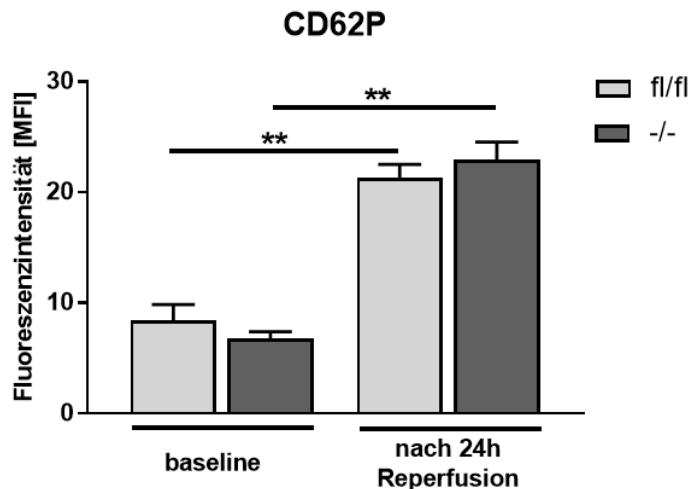


Abbildung 30. Aktivierungsgrad muriner Thrombozyten von Wildtyp- (fl/fl) und *Knockout*-Tieren (-/-) baseline und nach 24 h Reperfusions [MFI, mean fluorescence intensity]. Fluoreszenzintensität von CD62P (P-Selktein): [(fl/fl) baseline $8,4 \pm 1,5$ vs. 24 h $21,3 \pm 1,2$ MFI, n = 5, p = 0,0013, paired t-test; (-/-) baseline $6,8 \pm 0,6$ vs. 24 h $22,9 \pm 1,6$ MFI, n = 6, p = 0,0016, paired t-test; SEM]

4.2.7 Auswertung der Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate 24 h post Ischämie

Die durchflusszytometrische Messung von murinem Vollblut nach Ischämie und 24 h Reperfusions ergibt für den *Knockout* einen signifikant größeren Anteil an Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten vom Typ CD42b-positiv/CD14-positiv [CD42b/CD14 doppelt-positive Aggregate: (fl/fl) n = 6, $44,1 \pm 1,8$ vs. (-/-) n = 5, $61,3 \pm 6,9\%$, p = 0,0272, t-test, SEM]. CD14 ist ein Oberflächenprotein, welches auf Monozyten und Makrophagen zu finden ist. Diese Zelltypen sind vor allem in der Akutphase nach Infarkt aktiv. Das Auftreten von Aggregaten dieses Typs (CD42b/CD14) spricht demnach für eine vermehrte Wechselwirkung der CXCR7 defizienten Thrombozyten mit den inflammatorischen Zellen der Frühphase des Infarktgeschehens.

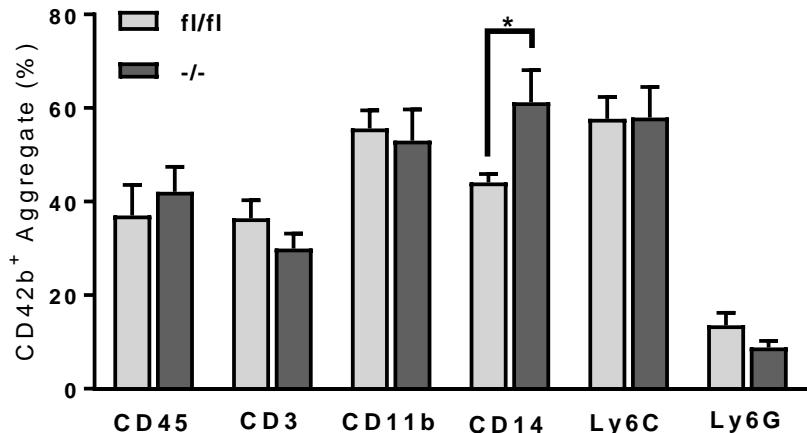


Abbildung 31. Auswertung der Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate 24 h post Ischämie von Wildtyp- (fl/fl) und Knockout-Tieren (-/-), t-test, SEM. CD42b/CD14 doppelt-positive Aggregate: (fl/fl) n = 6, 44,1 ± 1,8 vs. (-/-) n = 5, 61,3 ± 6,9%, p = 0,0272, t-test, SEM

Zusammenfassung der Ergebnisse:

Der Pf4-Cre CXCR7 *Knockout* führt zu einer größeren Infarktfläche mit einem vergrößerten kardialen Schaden (erhöhtes kardiales Troponin I) nach 30-minütiger Ischämie und 24 h Reperfusion. Die kardiale Herzfunktion zeigt im Vergleich zur Kontrolle keinen wesentlichen Unterschied zwischen Wildtyp- und *Knockout*-Tieren. Das Infarktgeschehen beim Pf4-Cre CXCR7 *Knockout* ist gekennzeichnet durch eine vermehrte inflammatorische Immunantwort, die sich histologisch und immunhistologisch darstellen ließ (Zunahme Gesamtkernzahl, Akkumulation inflammatorischer Zellen, geringere Mitoserate). Zusätzlich ist eine veränderte systemische Reaktion des *Knockouts* auf das Infarktgeschehen feststellbar. So zeigen sich mittels der Analyse von Blut- und Plasmaproben Veränderungen im Chemo- und Zytokinprofil sowie eine vermehrte Bildung von Thrombozyten-Leukozyten Aggregaten (Typ CD42b/CD14) beim *Knockout*.

4.3 Der Pf4-Cre Knockout von CXCR7 hat keinen Einfluss auf die Zuchtleistung

Die durchschnittliche Wurfgröße und Aufzuchtverluste wurden anhand von 36 Verpaarungen (1:2 Verpaarung: 1 Männchen und 2 Weibchen) ermittelt und mit den Werten von C57Bl/6 Eigenzuchten verglichen. Es wurden 16 Verpaarungen der C57Bl/6 Linie beurteilt.

Sowohl für die Größe der Würfe als auch für die Aufzuchtverluste ergaben sich keinerlei signifikante Unterschiede im Vergleich von Pf4-Cre-CXCR7^{fl/fl} und C57Bl/6 Zuchten. Die Mittelwerte und dazugehörige Standardabweichung sind Tabelle 8 zu entnehmen.

Tabelle 8: Zusammenfassung der Zuchtparameter C57Bl/6 und Pf4-Cre CXCR7 Zuchten, t-test, SD.

	C57Bl/6 n = 16	Pf4-Cre-CXCR7 ^{fl/fl} n = 36	p Wert (t-test)
Wurfgröße	7,1 ± 2,3	7 ± 1,6	0.5777
Aufzuchtverluste [%]	12,8 ± 11,3	19,1 ± 20,6	0.6593

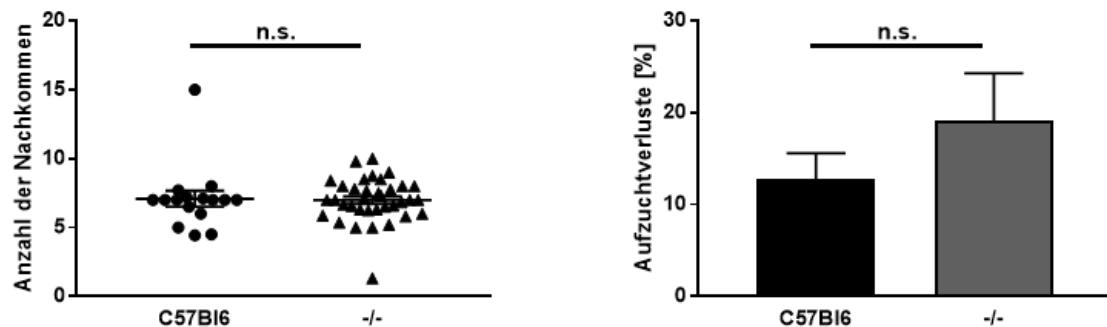


Abbildung 32. Auswertung der Zuchtparameter Pf4-Cre CXCR7 Zuchten im Vergleich zu C57Bl/6 Zuchten. (C57Bl/6 n = 16; (-/-) n = 36, t-test, SEM) Die genauen Werte und statistische Berechnung sind Tabelle 8 zu entnehmen

4.4 Phänotypisierung des Pf4-Cre CXCR7 Knockouts und Charakterisierung der Thrombozytenfunktion

4.4.1 Der Pf4-Cre Knockout von CXCR7 hat keine Auswirkungen auf Größe und Gewicht der Tiere

Zur weiteren Phänotypisierung erfolgte stets der Vergleich zwischen gleichaltrigen *Knockout*-Tieren (Pf4-Cre positive CXCR7^{fl/fl}, nachfolgend bezeichnet als *-/-*) und Wildtypen (Pf4-Cre negative CXCR7^{fl/fl}, nachfolgend bezeichnet als fl/fl). Die Bestimmung von Gewicht und Körperlänge der Tiere erfolgte im Rahmen von anderen Versuchszwecken (vorherige Blutentnahme oder nachfolgende Verwendung für Versuche wie Myokardinfarkt). Die Tiere waren 3 bis 60 Wochen alt.

Abbildung 33 zeigt die Auswertungen für das Gewicht und die Körperlänge. Der sichtbare Phänotyp der *Knockout*-Tiere (*-/-*) ist demnach unverändert.

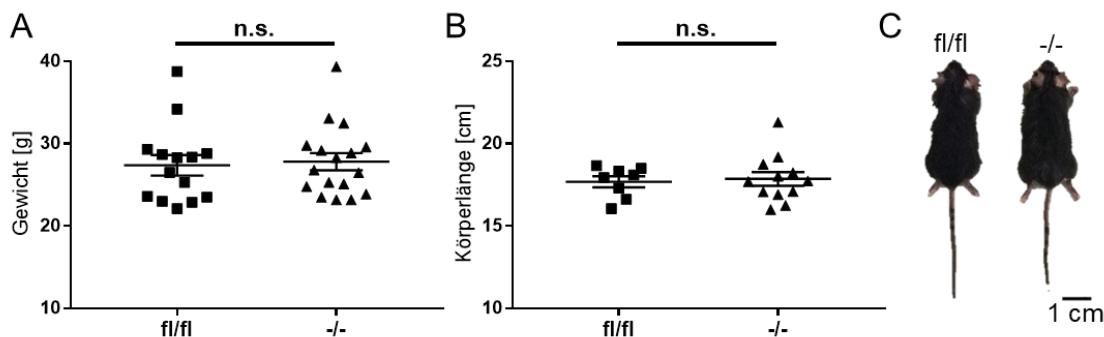


Abbildung 33. Auswertung von Gewicht und Körperlänge von Wildtyp- (fl/fl) und Knockout-Tieren (*-/-*). (A) Gewicht (fl/fl) n = 14, 27,4 ± 1,3 g vs. (*-/-*) n = 17, 27,8 ± 1,0 g, p = 0,7864, t-test, SEM (B) Körperlänge (fl/fl) n = 8, 17,7 ± 0,3 cm vs. (*-/-*), n = 12, 17,9 ± 0,4 cm, p = 0,7712, t-test, SEM (C) Beispielhafte Darstellung der Phänotypen

4.4.2 Isolierte Thrombozyten Pf4-Cre positiver CXCR7 Mäuse zeigen im Western Blot kein detektierbares CXCR7

Zur Validierung des Pf4-Cre assoziierten *Knockouts* und damit dem Verlust des CXCR7 Rezeptors auf den Thrombozyten der *Knockout*-Tiere wurden Western Blots mit Thrombozytenlysaten angefertigt. Das repräsentative Ergebnis ist in Abbildung 34 zu sehen. Die Western Blots mit isolierten und lysierten Thrombozyten von Wildtyp- und *Knockout*-Tieren zeigen die spezifische Deletion des CXCR7 Rezeptors beim *Knockout*. Die Detektion von CXCR4 erfolgte als Kontrolle. α -Tubulin diente in beiden Fällen als Ladekontrolle.

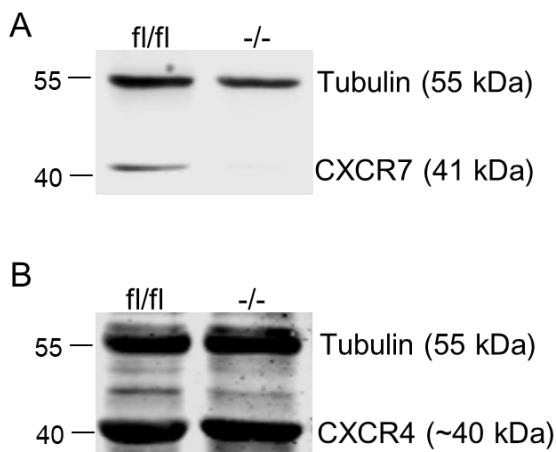


Abbildung 34. Repräsentative Western Blots zur Validierung des thrombozytenspezifischen Knockouts von CXCR7. Thrombozytenlysate von Wildtyp- (fl/fl) und Knockout-Tieren (-/-) **(A)** CXCR7 Antikörper (NBP1-31309, CXCR7/RDC-1 Antibody, Novus Biologicals USA) **(B)** CXCR4 Antikörper (NB100-74396, CXCR4 Antibody, Novus Biologicals USA)

4.4.3 Thrombozytenzahl und -größe der Pf4-Cre CXCR7 Knockout-Tiere sind unverändert

Um die Thrombozytenfunktion beginnend zu erforschen wurden zunächst die Parameter Thrombozytenzahl und das Platelet Large Cell Ratio gemessen. Das PLCR gibt an wieviel Prozent der gemessenen Thrombozyten ein vergrößertes Volumen zeigen. Eine Erhöhung des Wertes über Norm kann hinweisend sein für Thrombozytenaggregate, Mikroerythrozyten und Riesenthrombozyten (SysmexDigitanaAG, 2010).

Die Abbildung 35 zeigt die Ergebnisse der Zellzählzählung mittels Hämatologieanalysator (KX-21N, Sysmex Deutschland GmbH) von 100 µl murinem Vollblut in EDTA. Die beiden Gruppen zeigen keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl ihrer Thrombozyten. Beide Gruppen weisen physiologische Werte auf [Plateletcount: (fl/fl) $758,9 \pm 62,0 \times 10^3/\text{ml}$ vs. (-/-) $905,8 \pm 64,6 \times 10^3/\text{ml}$, n = 12, p = 0.115, t-test, SEM]. Auch der prozentuelle Anteil der Thrombozyten, die in ihrem Volumen vergrößerter sind, zeigt keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen [PLCR: (fl/fl) $2,4 \pm 0,2\%$ vs. (-/-) $3,1 \pm 0,4\%$, n = 9, p = 0.1244, t-test, SEM].

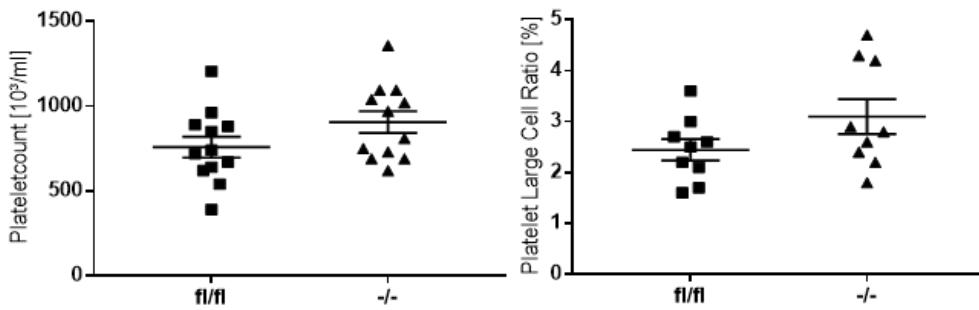


Abbildung 35. Thrombozytenzahl (Plateletcount) n = 12 und -größe (Platelet Large Cell Ratio) n = 9 von Wildtyp- (fl/fl) und Knockout-Tieren (-/-), t-test, SEM.

4.4.4 Die Blutungszeit der Pf4-Cre CXCR7 Knockout-Tiere ist unverändert

Im Schaubild (Abbildung 36) sind die Blutungszeiten in Sekunden für die beiden Gruppen dargestellt. So zeigt sich für den Knockout (-/-) zwar eine Tendenz zur schnelleren Gerinnung, jedoch ohne signifikanten Unterschied [(fl/fl) n = 10, 560 ± 87 s vs. (-/-) n = 9, 444 ± 52 s, p = 0.2822, t-test, SEM].

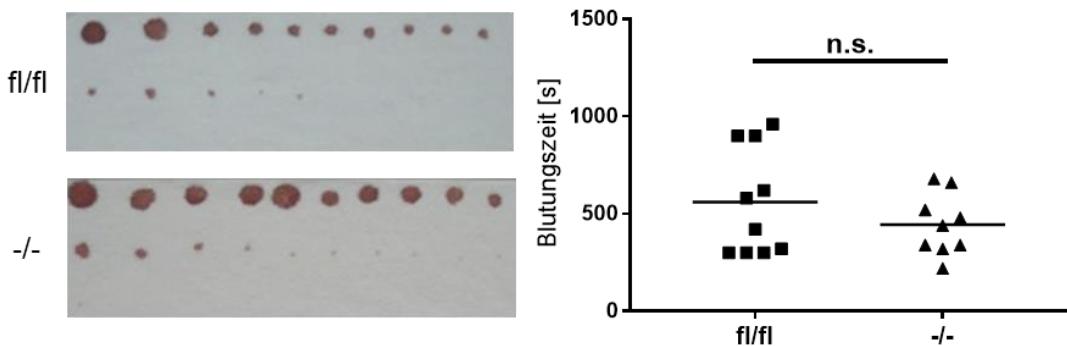


Abbildung 36. Ermittlung der *in vivo* Blutungszeit. Repräsentative Bilder der Whatman Membranen von Wildtyp- (fl/fl) n = 10 und Knockout-Tieren (-/-) n = 9 mit Auswertung der Blutungszeit, p = 0.2822, t-test, SEM

4.4.5 Der Pf4-Cre CXCR7 Knockout zeigt eine vermehrte Thrombusbildung in der ex vivo Thrombusformation

Eine unveränderte Blutungszeit spricht zwar grundsätzlich für keine gravierende Beeinflussung der Hämostase, jedoch kann durch den Knockout von CXCR7 die Funktion der Thrombozyten anderweitig beeinflusst sein und damit marginalere Auswirkungen auf physiologische Prozesse der Thrombozyten haben. Mit der *ex vivo* Thrombusformation wurde die Thrombusbildung und -stabilität und damit die Aktivierbarkeit der Thrombozyten unter Flussbedingungen untersucht. Dieses artifizielle System zur Charakterisierung der Hämostase, kann hinweisend sein für eine veränderte

Thrombozytenfunktion. Primäre Zielgröße für den Gruppenvergleich ist die mit Thromben bedeckte Fläche (thrombus coverage) in Relation zur Gesamtfläche mehrerer in 20-facher Vergrößerung aufgenommener Bilder. In diesem Versuch wurde die mittlere Flussgeschwindigkeit von 7,53 ml/h (1000-s) verwendet. Diese entspricht in etwa den physiologischen Bedingungen einer mittelgroßen Arterie.

Ausgewertet wurde die mit Thromben bedeckte Fläche pro Bild, um anschließend für jedes Tier den Mittelwert zu bilden und die Gruppen miteinander zu vergleichen. Die Abbildung 37 zeigt die Auswertung der *ex vivo* Thrombusformation. Die mit Thromben bedeckte Fläche ist bei den *Knockout*-Tieren signifikant vergrößert [(fl/fl) $38,9 \pm 5,0$ vs. (-/-) $61,6 \pm 6,3\%$, n = 6, p = 0.0183, t-test, SEM].

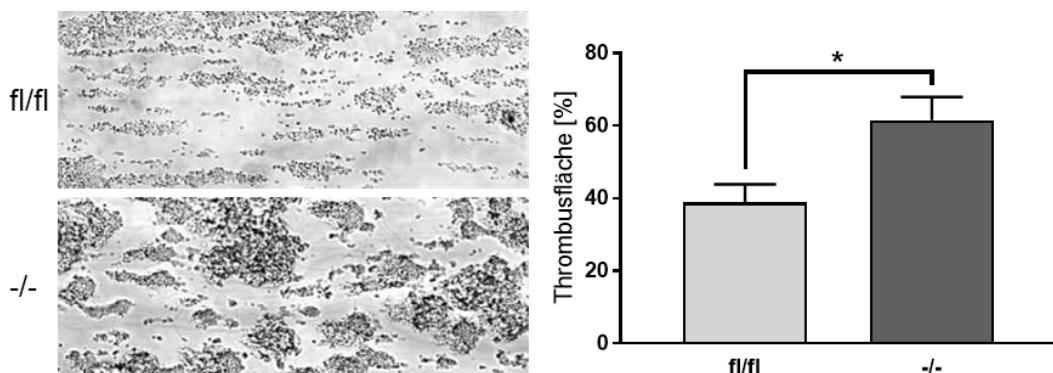


Abbildung 37. *Ex vivo* Thrombusformation von murinem Vollblut von Wildtyp- (fl/fl) und *Knockout*-Tieren (-/-) bei mittlerer Flussrate (1000/s). Repräsentative Bilder und Auswertung der Thrombusfläche (fl/fl) $38,9 \pm 5,0$ vs. (-/-) $61,6 \pm 6,3\%$, n = 6, p = 0.0183, t-test, SEM

4.4.6 CXCR7 defiziente Thrombozyten besitzen einen normalen Rezeptorenbesatz

Die Rezeptoren GPV, GPVI, GPIX, Integrin $\alpha 5$ und Integrin $\beta 3$ auf Thrombozyten erfüllen vor allem Funktionen in der Hämostase. Eine Änderung des Rezeptorenbesatzes kann zu funktionellen Veränderungen der Thrombozyten führen. In diesem Versuch wurde die Expression der Rezeptoren auf der Oberfläche der Thrombozyten von Wildtyp- und *Knockout*-Tieren mittels der Durchflusszytometrie miteinander verglichen. Die Auswertung (Abbildung 38, sowie im Anhang befindliche Anh. Tabelle 15) zeigt keinerlei Unterschiede im Rezeptorenbesatz von Wildtyp- und *Knockout*-Thrombozyten.

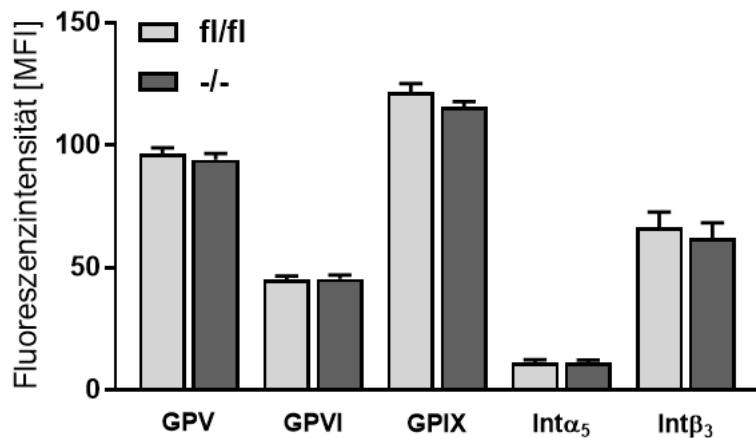


Abbildung 38. Darstellung der Fluoreszenzintensität [MFI mean fluorescence intensity] verschiedener Oberflächenrezeptoren auf murinen Thrombozyten. (fl/fl = Wildtyp; -/- = Knockout, n = 6, t-test, SEM) Werte und statistische Auswertung siehe im Anhang Anh. Tabelle 15

4.4.7 CXCR7 defiziente Thrombozyten zeigen eine erhöhte Aktivierbarkeit

Die funktionellen Veränderungen der Thrombozyten bezüglich ihrer Aktivierbarkeit lassen sich *ex vivo* mittels durchflusszytometrischer Messung von CD62P (P-Selektin; Maß für die α -Degranulation) und GPIIb/IIIa (Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$; Fibrinogenrezeptorexpression) evaluieren.

Der Abbildung 39 sowie der dazugehörigen Wertetabelle (im Anhang Anh. Tabelle 16) sind zu entnehmen, dass die Knockout-Thrombozyten eine signifikant stärkere Fluoreszenzintensität des Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Signals nach Aktivierung mit CRP [5 µg/ml] aufweisen und damit eine erhöhte Aktivierbarkeit unter Stimulation mit CRP zeigen.

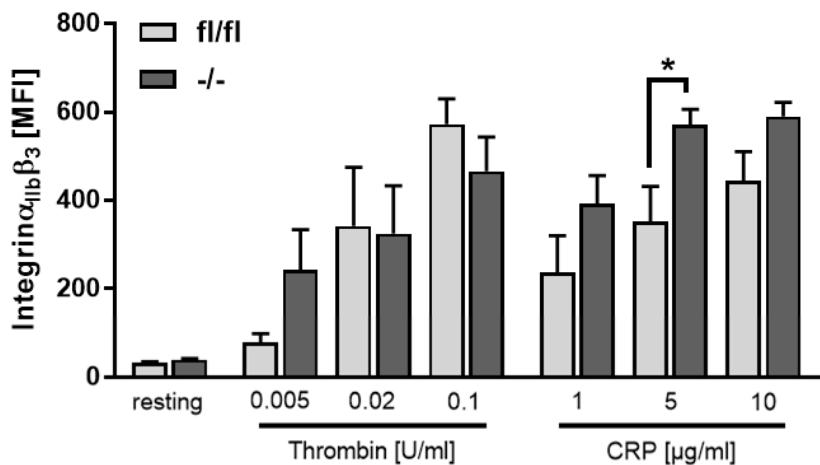


Abbildung 39. Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messung der Fluoreszenzintensität [MFI, mean fluorescence intensity] von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa) im unaktivierten (resting) Zustand und nach Aktivierung mittels der Agonisten Thrombin und CRP (collagen related peptide). CRP 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$: (fl/fl) n = 7, $353 \pm 78,3$ vs. (-/-) n = 6, $572,1 \pm 33,5$ MFI, p = 0,034, t-test, SEM. Werte und statistische Auswertung siehe im Anhang Anh. Tabelle 16

Nach Aktivierung der *Knockout*-Thrombozyten mit CRP 5 [$\mu\text{g}/\text{ml}$] zeigt sich ebenfalls eine signifikante Zunahme des CD62P-Signals (siehe Abbildung 40 und die dazugehörige Wertetabelle im Anhang Anh. Tabelle 17).

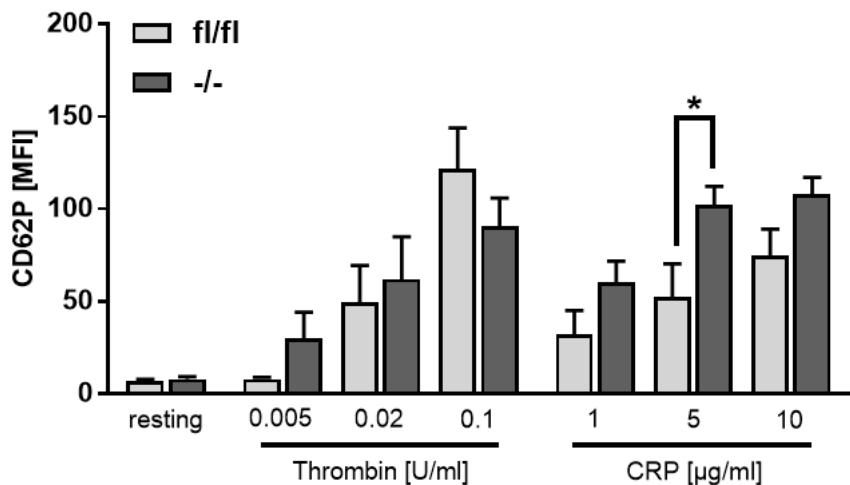


Abbildung 40. Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messung der Fluoreszenzintensität [MFI, mean fluorescence intensity] von CD62P (P-Seliktin) im unaktivierten (resting) Zustand und nach Aktivierung mittels der Agonisten Thrombin und CRP (collagen related peptide). CRP 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$: (fl/fl) n = 5, $52,1 \pm 18,1$ vs. (-/-) n = 5, $102 \pm 10,2$ MFI, p = 0,043, t-test, SEM. Werte und statistische Auswertung siehe im Anhang Anh. Tabelle 17

Zusammenfassung der Ergebnisse:

Die Ergebnisse der *in vivo* Versuche zur Charakterisierung der Hämostasefunktion der Thrombozyten zeigen, dass der *Knockout* von CXCR7 auf Thrombozyten zu keinerlei Beeinflussung der physiologischen Hämostase führt (Blutungszeit ist unverändert im Vergleich zum Wildtyp). Die Flusskammerversuche mit dem Ergebnis einer vermehrten Thrombusbildung weisen jedoch auf eine veränderte Thrombozytenfunktion hin, die mittels der durchflusszytometrischen Messung von CD62P und Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ weiter charakterisiert werden konnte. Vor allem auf die Stimulation mit dem Agonisten CRP [5 µg/ml] findet bei den *Knockout*-Thrombozyten eine vermehrte Aktivierung statt.

4.5 Analyse der Thrombozytenüberstände CXCR7 defizienter Thrombozyten

4.5.1 Chemotaktischer Effekt der Thrombozytenüberstände

Infolge der Aktivierung von Thrombozyten kommt es zur Freisetzung verschiedener Granula aus dem Zellinneren der Thrombozyten. Freigesetzt werden mitunter zahlreiche Chemo- und Zytokine, die Thrombozyten befähigen, aktiv an inflammatorischen Prozessen teilzunehmen und diese zu modulieren (siehe dazu 2.4). Im Infarktmodell zeigte der *Knockout* neben einer größeren Infarktfläche und größerem kardialem Schaden eine deutliche proinflammatorische Immunantwort (Ergebnisse Histologie, Immunhistologie). Systemisch zeigten sich darüber hinaus vermehrte Thrombozytenaggregate (vom Typ Thrombozyten-Monozyten-Makrophagen), ein höherer Aktivierungsgrad der Thrombozyten und eine Zunahme von IL6 und CXCL5 im Plasma nach 24 h Reperfusion. Die Veränderung der Aktivierbarkeit der CXCR7 defizienten Thrombozyten (insbesondere die durchflusszytometrische Messung von CD62P, Maß für die α -Degranulation) spricht dafür, dass ebenfalls die Freisetzung chemotaktisch wirksamer Proteine aus den Thrombozyten verändert ist. In diesem Versuchsteil wurde mittels der Monozytenmigration der chemotaktische Effekt der Chemo- und Zytokinfreisetzung aus aktivierte Thrombozyten beurteilt.

Es findet eine vermehrte Migration von Wildtypmonozyten gen aktiviertem Thrombozytenüberstand (APS, activated platelet supernatant) von CXCR7 defizienten Thrombozyten statt. Die Abbildung 41 zeigt repräsentative Bilder der Auswertung der angefärbten Membranen, in die die Monozyten nach 3 stündiger Inkubation bei 37 °C migriert sind. Der aktivierte Thrombozytenüberstand von Pf4-Cre CXCR7 defizienten Mäusen (Aktivierung mit CRP 5 µg/ml über 30 min bei Raumtemperatur) hat demnach einen signifikant stärkeren chemotaktischen Effekt auf die Migration von Monozyten (Abbildung 42).

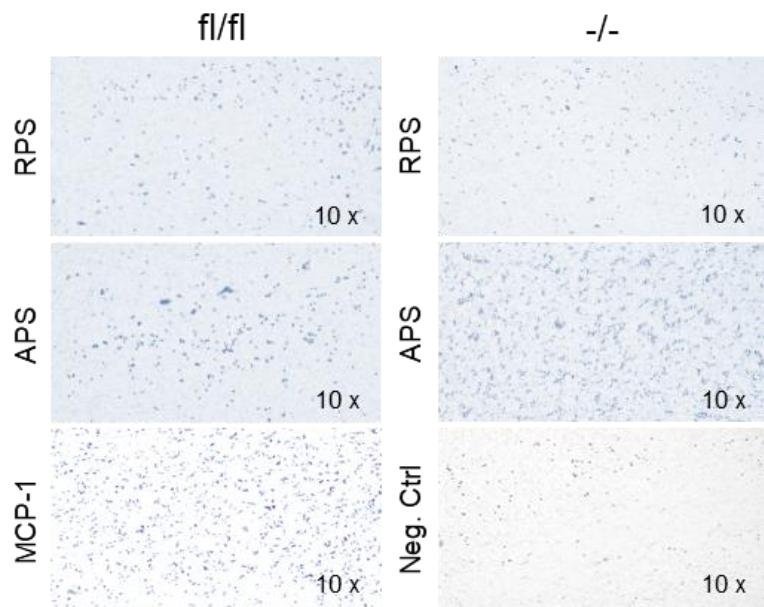


Abbildung 41. Repräsentative Bilder der angefärbten und fixierten Porenfilter (3 μ m) in 10-facher Vergrößerung nach Migration von Wildtypmonozyten zu Thrombozytenüberständen von Wildtyp-(fl/fl) und Knockout-Tieren (-/-). RPS = resting platelet supernatant, APS = activated platelet supernatant, MCP-1 = Monozyten-chemotaktisches Protein 1 [50 ng/ml], Neg. Ctrl = Negativkontrolle = PBS-Ca²⁺ + 1% FCS

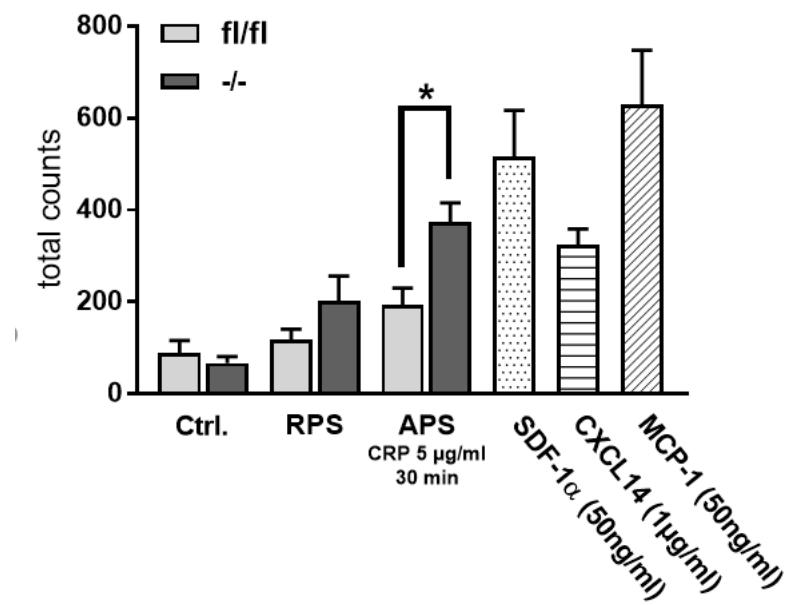


Abbildung 42. Auswertung der Monozytenmigration mit Thrombozytenüberständen von Wildtyp-(fl/fl) und Knockout-Thrombozyten (-/-). (fl/fl) n = 6, $194,5 \pm 35,6$ vs. (-/-) n = 5, $372,5 \pm 43,1$, p = 0.0105, t-test, SEM; Ctrl. = Negativkontrolle, RPS = resting platelet supernatant, APS = activated platelet supernatant, MCP-1 = Monozyten-chemotaktisches Protein 1; SDF-1 α = CXCL12

4.5.2 Aktivierte Thrombozytenüberstände von Pf4-Cre CXCR7 Knockout-Tieren zeigen ein proinflammatorisches Chemokin- und Zytokinprofil

Aufgrund der Ergebnisse aus den Boyden Chamber Migrations Assays mit Monozyten und Thrombozytenüberständen, wurde eine Multipanel Durchflusszytometrie (Legendplex, Multi-Analyte Flow Assay Kit, Custom Mouse Panel, BioLegend) zur Evaluierung der von den Thrombozyten sezernierten Chemo- und Zytokine durchgeführt. Der Vergleich des Chemo- und Zytokinprofils der aktivierte Thrombozytenüberstände (Aktivierung mit CRP 5 µg/ml über 30 min bei Raumtemperatur) von Wildtyp- und Knockout-Tieren zeigt signifikante Unterschiede für die CXC-Chemokine CXCL5 und CXCL12 sowie die zwei CCL-Chemokine CCL17 und CCL22. Die Messung von inflammatorischen Zytokinen (IL1α, IL1β und TNFα) ergab für IL1α signifikant höhere Konzentrationen im aktivierte Thrombozytenüberstand der Knockout-Tiere. Die Ergebnisse sind in Anh. Abbildung 44 im Anhang dargestellt. Die genauen Werte und statistische Berechnung sind der Tabelle 9 zu entnehmen.

Tabelle 9: Wertetabelle Chemo- und Zytokine im Überstand aktiverter Thrombozyten von Wildtyp-(fl/fl) und Knockout-Tieren (-/-), t-test, SEM.

Angaben in pg/ml	fl/fl	-/-	p-Wert (t-test)
CXC-Chemokine			
CXCL1 (KC, GROα)	$9,5 \pm 1,4, n = 6$	$17,6 \pm 3,7, n = 7$	0.0768
CXCL5 (LIX, ENA-78)	$2423 \pm 207,9, n = 7$	$6257 \pm 273,2, n = 7$	< 0.0001
CXCL12 (SDF1α)	$726,8 \pm 32,3, n = 7$	$608,6 \pm 40,5, n = 7$	0.0415
CCL-Chemokine			
CCL17 (TARC)	$67 \pm 8,4, n = 7$	$110,6 \pm 11,4, n = 7$	0.0095
CCL22 (MDC)	$19,22 \pm 2,7, n = 7$	$34 \pm 4,9, n = 7$	0.0218
Zytokine			
IL1α	$37,2 \pm 1,9, n = 5$	$58,9 \pm 7,5, n = 6$	0.0298
IL1β	$34,22 \pm 10,5, n = 3$	$43,54 \pm 4,3, n = 5$	0.3667
TNFα	$2,0 \pm 0,5, n = 3$	$2,6 \pm 0,4, n = 5$	0.3510

5 DISKUSSION

5.1 Mausmodell und Fragestellung

Der wesentliche Vorteil in der Verwendung der Maus als Versuchstier im Rahmen dieser Arbeit, besteht in der Möglichkeit der genetischen Manipulation dieser Tierart zur Generierung des *Knockouts* des CXCR7 Chemokinrezeptors auf den Thrombozyten. Durch den Pf4-Cre Promoter ist es möglich, CXCR7 homozygot geflochte Tiere, durch Deletion des CXCR7 Gens, zu züchten und damit in der Zelllinie der Megakaryozyten und Thrombozyten für den Verlust des Chemokinrezeptors zu sorgen. Zwar existieren bereits CXCR7 blockierende Antikörper, jedoch keine die selektiv an den thrombozytären CXCR7 Rezeptor binden. Die Beantwortung der Fragestellung, ob der Verlust von CXCR7 auf den Thrombozyten einen Einfluss auf die Funktion dieser Zellen und auf die Pathogenese nach akutem Myokardinfarkt hat, ist demnach nur mittels des genetisch veränderten Mausmodells zu beantworten.

Die Methodik zur Induktion der myokardialen Ischämie und Reperfusion ist grundsätzlich auch an der Ratte durchführbar, ein *Knockout* Modell steht aber nicht zur Verfügung. Weitere Vorteile der Nutzung von Mäusen als Versuchstier bieten die relativ kurze Generationsdauer und folglich die schnelle Zucht der Tiere, die kostengünstige Haltung und der wesentlich geringere Einsatz von Narkotika und Analgetika, aufgrund der geringen Größe der Tiere.

Seit Jahrzehnten steht die Erforschung der Genese und Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen im Zentrum der Arbeitsgruppe Gawaz. Thrombozyten stellen dabei die Zielzellen unserer experimentellen Arbeit dar, da sie sowohl an der Arteriosklerose wie auch am Auftreten akuter lebensbedrohlicher Ereignisse im Rahmen der koronaren Herzerkrankung beteiligt sind. Diese Arbeit beschäftigt sich insbesondere mit dem murinem Modell der Ischämie und Reperfusion am Zielorgan Herz. Die Entwicklung einer soliden Methodik zur Induktion der myokardialen Ischämie ist die Grundlage für diese Arbeit und führt nach deren Evaluierung zu gesicherten Erkenntnissen bezüglich des thrombozytenspezifischen *Knockouts* des CXCR7 Chemokinrezeptors im Rahmen der Inflammation nach akutem Myokardinfarkt.

5.2 Myokardiale Ischämie und Reperfusion und Charakterisierung der postischämischen Immunantwort im *Knockout* Modell

Mittels der Versuche zur Induktion myokardialer Ischämie und Reperfusion wird im Tiermodell der akute Myokardinfarkt des Menschen simuliert. Entsprechend der Revaskularisierung des akuten Myokardinfarktes beim Menschen, wird durch die Öffnung der Ligatur der LAD die Reperfusion des vorher ischämischen Areals erreicht. Die pathologischen Prozesse bei Maus und Mensch nach akutem Infarkt sind annähernd gleich. Mit dem deutlichen Unterschied, dass die vier Phasen nach Infarkt (Akute, Inflammatorische, Fibrotische und Ausreifungsphase) bei der Maus deutlich schneller ablaufen (Dewald et al., 2004; Nikolaos, 2006). Eine große Verbreitung in der kardiovaskulären Forschung findet die Methodik zur Induktion der myokardialen Ischämie und Reperfusion am Versuchstier Maus vor allem deshalb, weil sie es ermöglicht alle vier Phasen nach Infarkt innerhalb einer Versuchsdauer von vier Wochen zu charakterisieren. Die Maus als gut geeignetes Versuchstier zeigt nach der Durchführung des operativen Eingriffes eine schnelle Regeneration, einen geringen Gewichtsverlust und stabile Vitalparametern nach 24 Stunden (Ergebnisse siehe 4.1). Es kam zu keinerlei operationsbedingten Ausfällen während des Eingriffes (Mortalitätsrate während und nach der durchgeführten Operation 0%). Borst et al. geben eine Mortalitätsrate von 5,1% an, die vor allem durch Todesfälle während der Operation und Okklusion der LAD zustande kam. In dem evaluierten Modell wurde ein Tier aufgrund der mangelnden Anfärbung des Ischämiegebietes (6,25%) exkludiert. Bei Borst et al. trat dieses Problem bei 2 Mäusen auf, darüber hinaus starben weitere 2 Tiere aufgrund von ventrikulären Tachyarrhythmien oder Blutungen nach der Operation und insgesamt nochmals 11,1% der Tiere zeigten Auffälligkeiten wie Aszites (7,7%), respiratorische Symptome (1,7%) sowie Hämaturie (1,7%) (Oliver Borst et al., 2011). Die im Rahmen dieser Arbeit evaluierte und angewandte Methodik zur Induktion myokardialer Ischämie und Reperfusion wird folglich dem Anspruch gerecht, eine größtmögliche Reduzierung der Belastung der Tiere zu gewährleisten und damit dem Auftreten von operationsbedingten Ausfällen entgegenzuwirken.

Da ausschließlich durch eine sicher reproduzierbare Methodik das Infarktgeschehen verschiedener Gruppen miteinander verglichen werden kann, wurde durch Anwendung der 3R Prinzipien nach Russel und Burch (Russell & Burch, 1959) auf die bestehende

Methodik (Oliver Borst et al., 2011) zur Induktion myokardialer Ischämie und Reperfusion ein veränderter Versuchsablauf erarbeitet und evaluiert. Trotz zahlreicher Verbesserungen im operativen Ablauf (wie z.B. der Verzicht auf die invasive tracheale Intubation, Verzicht auf Rippenretraktor) handelt es sich um eine sehr komplexe Methodik, die über eine Vielzahl von Fehlerquellen verfügt.

Der definitive Ausschluss von Tieren fand statt, wenn die Ligatur der LAD nicht sicher stattgefunden hat. Dies war zumeist direkt nach der Ligatur erkennbar, wenn eine Entfärbung (Blässe) des Ischämiegebietes unterhalb der Ligatur ausblieb. Unvollständige Infarkte stellen sich in der Regel erst im Ultraschall und Elektrokardiogramm nach 24 h Reperfusion, durch das Fehlen infarkttypischer Ultraschallbefunde und einem unauffälligen EKG dar. Der sichere Beweis für die korrekte Ligatur sind vergleichbare Flächen der Ischämie (Aar, Area at risk), die post mortem ermittelt wurden. So wurden nur Tiere mit in diese Arbeit aufgenommen und miteinander verglichen, die einen sicher induzierten Infarkt aufwiesen.

Da im Rahmen dieser Arbeit tiefergehend auf inflammatorische Prozesse eingegangen wird, galt es insbesondere Fehlerquellen zu minimieren, die Auswirkungen auf die lokale und systemische Entzündungsreaktion haben. Durch die Verabreichung von Antibiotikum bereits ab 3 Tagen vor dem Eingriff, wurde Infektionen vorgebeugt. Die Tiere stammten aus spezifisch-pathogenfreien Haltungsbedingungen und wurden zur Vermeidung von Stress, stets in ihren Herkunftskäfigen transportiert und auch nach der Aufwachphase dorthin verbracht. Der Eingriff am offenen Thorax, fand unter sterilen Bedingungen und Verwendung sterilisierten Operationsbestecks statt. Zur Unterstechung der LAD wurde nur ein einzelner Stich vorgenommen, sodass eine mehrfache Penetrierung des Myokards mit einem größeren myokardialen Schaden ausgeschlossen werden konnte. Durch den Vergleich mit Sham operierten Tieren, wurde die Reaktion des Ligaturfadens auf das Myokard ermittelt und führte dadurch zu einer Vergleichbarkeit mit ischämischem und reperfundiertem Myokard.

Der größte nicht myokardinfarktbedingte Einfluss auf die systemische Entzündungsreaktion erfolgt durch das induzierte Trauma der Operationswunde (Finnerty, Mabvuure, Ali, Kozar, & Herndon, 2013). Da zu Beginn dieser Arbeit noch keine Möglichkeit zur minimalinvasiven Ligatur der LAD zur Verfügung stand, die erst

2018 durch Sun et al. beschrieben wurde, war ein Verzicht auf die offene Thorakotomie nicht möglich (Q. Sun et al., 2018). Da jedoch bei allen operierten Tieren die Operationswunde und insbesondere die Größe der Thorakotomiewunde so klein wie möglich gehalten wurde (Verzicht auf Rippenretraktor, spezielle Lagerung der Tiere), ist ein Vergleich der Versuchsgruppen hinsichtlich ihrer systemischen Immunreaktion möglich gewesen. Beim Auftreten von Wundkomplikationen oder erhöhter innerer Körpertemperatur wurden die Tiere exkludiert. Es wurden nur Tiere mit in die Auswertungen einbezogen, die nach 24 Stunden ein unauffälliges Allgemeinbefinden mit arttypischem Verhalten zeigten und bei denen ein vermehrtes inflammatorisches Geschehen, aufgrund anderer als infarktbedingter Ursachen, ausgeschlossen werden konnte.

Im Rahmen dieser Arbeit liegt das Augenmerk vor allem in der Charakterisierung der postischämischen Phase des Infarktgeschehens (inflammatorische Phase). Die inflammatorische Phase ist assoziiert mit der Induktion von Chemo- und Zytokinen, diese führen wiederum zur Infiltration von Leukozyten (Nikolaos, 2006). Thrombozyten mit ihrer Fähigkeit aktiv an inflammatorischen Prozessen teilzunehmen, sind in dieser Phase besonders aktiv und modulieren durch thrombozytäre Chemokinrezeptoren und Chemokine Entzündungsreaktionen (Chatterjee & Geisler, 2016). Durch die Gewinnung neuer Erkenntnisse über die Funktionsweisen thrombozytärer Chemokinrezeptoren kommt den Thrombozyten eine immer größere Bedeutung bei inflammatorischen und regenerativen Prozessen zu (Bakogiannis, Sachse, Stamatelopoulos, & Stellos, 2017; Chatterjee & Geisler, 2016). Thrombozyten gelten durch die Interaktion mit Entzündungszellen als aktive Modulatoren von Entzündungen sowohl über direkte Zellinteraktionen wie auch durch die Freisetzung inflammatorischer Zytoskelettkinase und Chemokine. Unsere Arbeitsgruppe erforscht neben der Beteiligung der Thrombozyten an der Thrombose zunehmend auch die Funktionsweisen der Thrombozyten im Rahmen inflammatorischer Prozesse (Thromboinflammation). Der 7-Transmembran-Rezeptor CXCR7 wird im Gegensatz zum CXCR4 Rezeptor wesentlich geringer auf Thrombozyten exprimiert (Rath et al., 2014). Es scheint darüber hinaus ein differenziertes Expressionsmuster von CXCR7 auf verschiedenen Zellpopulationen je nach Vorhandensein der Liganden CXCL12, MIF und CXCL11 vorzuliegen (Chatterjee, Rath, et al., 2015).

Vor allem humanmedizinische Studien weisen darauf hin, dass thrombozytäres CXCR7 eine besondere Rolle im Geschehen des akuten Koronarsyndroms und Auswirkungen auf die funktionelle Wiederherstellung der Herzfunktion nach Infarkt hat. Bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom und STEMI im Vergleich zu Patienten mit stabilem Koronarsyndrom ist die Expression von CXCR7 und CXCL12 auf den Thrombozyten erhöht, wohingegen für CXCR4 keine Unterschiede vorhanden sind (Rath et al., 2016; Rath et al., 2015; Rath et al., 2018; Wurster et al., 2013). Gleichzeitig konnte bei hohen Plasmakonzentrationen bzw. einer vermehrten Expression von thrombozytärem CXCL12 eine verbesserte Herzfunktion (LVEF) und eine Mobilisierung regenerativer aus dem Knochenmarks stammender CD34⁺ Progenitorzellen festgestellt werden (Jorbenadze, Schleicher, Bigalke, Stellos, & Gawaz, 2014; Mollmann et al., 2006). Bekannt ist, dass die Blockade von CXCR7 die CXCL12 induzierte Akt Aktivierung inhibiert und die Anzahl CD34 positiver Zellen in der Zirkulation, ihr Überleben sowie deren Differenzierung in endothiale Vorläuferzellen reduziert ist (Melo et al., 2018; Torossian et al., 2014). Eine Induktion regenerativer Prozesse nach vaskulären oder ischämischen Verletzungen könnte folglich durch die Interaktion von CXCL12 und dem CXCR7 Rezeptor vermittelt werden und als therapeutischer Ansatz für Stammzelltherapien fungieren. Die genauen Mechanismen der thrombozytären CXCL12-CXCR7 Achse und ihr Einfluss auf die Inflammation nach Ischämie und Reperfusion sind jedoch weitestgehend unbekannt. Im murinen Modell konnte zwar gezeigt werden, dass der Verlust von endothelialem CXCR7 zu einer verringerten Herzfunktion und zu einem prognostisch schlechten kardialem Remodeling nach Myokardinfarkt führt, welche Bedeutung aber der thrombozytäre CXCR7 Rezeptor nach akutem Myokardinfarkt spielt ist weiterhin unklar (Hao et al., 2017).

5.2.1 Größerer myokardialer Schaden nach I/R bei Pf4-Cre CXCR7^{-/-}

In dieser Arbeit konnte erstmals die differenzielle Rolle des thrombozytären Chemokinrezeptors CXCR7 im Rahmen der Inflammation nach Ischämie und Reperfusion und seine Bedeutung für die Funktionsweise der Thrombozyten erläutert werden. Anhand der Charakterisierung der inflammatorischen Phase nach myokardialer Ischämie und Reperfusion wird gezeigt, dass der thrombozytäre CXCR7 Chemokinrezeptor einen Einfluss auf die Entzündungsreaktionen hat.

Eine Beurteilung des Infarktgeschehens im Mausmodell findet zunächst durch die Validierung des stattgefundenen Infarktes statt. Am noch lebenden Tier wird nach 24 h Reperfusion mittels Ultraschalls des linken Ventrikels und Ableitung eines Elektrokardiogramms der Infarkt *in vivo* dargestellt. Eine Reduktion der kardialen Funktionsparameter Ejektionsfraktion (EF) und Fraktionelle Verkürzung (FS) sowie die Hypo- bis Akinesie im Bereich der Vorderwand des linken Ventrikels und Hyperkinesie im Interventrikularseptum weisen, wie beim humanen Patienten, deutlich auf einen Infarkt hin (siehe exemplarische Darstellung Ultraschallaufnahmen vor und nach Infarkt in Abbildung 15). Die nachfolgende Anfärbung des Ischämiegebietes und Auswertung der Flächenanteile am linken Ventrikel ermöglichen eine Darstellung der Infarktflächen. Der myokardiale Schaden wird sowohl durch die direkte Darstellung der Infarktflächen wie auch durch die Messung des kardialen Troponins I (cTnI) im Plasma der Mäuse verifiziert. Anhand der Abbildung 18 wird ersichtlich, dass die Pf4-Cre CXCR7 Knockout-Tiere einen größeren Infarkt nach 30-minütiger Ischämie und 24 stündiger Reperfusion aufweisen. Der Nachweis höherer Plasmakonzentrationen von kardialem Troponin I (cTnI) bei den Knockout-Tieren, welche der Abbildung 28 zu entnehmen ist, beweist ebenfalls den größeren myokardialen Schaden innerhalb der Gruppe der Knockout-Tiere.

Nach 24 h zeigt sich keine Auswirkung dieses massiven myokardialen Schadens auf die kardialen Funktionsparameter Ejektionsfraktion und Fraktionelle Verkürzung beim Vergleich der Herzultraschalldaten von Wildtyp- und Knockout-Tieren (Abbildung 19). Bei beiden Gruppen konnte das Infarktgeschehen 24 h post Ischämie durch die deutliche Verschlechterung der kardialen Funktionsparameter belegt werden (Anh. Tabelle 12, Anh. Tabelle 13). Die Knockout-Tiere zeigen eine signifikante Zunahme der Wanddicke der linksventrikulären posterioren Wand in der Diastole (LVPW; d), welche beim Wildtyp unverändert bleibt (Anh. Tabelle 11). Da im Rahmen dieser Arbeit, die Tötung der Tiere nach einem Tag Reperfusion erfolgte, konnte die genaue Ursache dieser Hypertrophie bei den Knockout-Tieren nicht weitergehend untersucht werden. Durch Versuche mit längeren Reperfusionszeiträumen (7 und 28 Tage) könnte diesem Aspekt und seine Auswirkungen auf das Remodeling weiter nachgegangen werden. Eine Verschlechterung der Herzfunktion bei den Knockout-Tieren aufgrund der Hypertrophie

der posterioren linken Ventrikelwand und des größeren myokardialen Schadens ist sehr wahrscheinlich.

5.2.2 Lokale Inflammation im infarzierten Myokard bei Pf4-Cre CXCR7^{-/-}

Zur Beurteilung der lokalen inflammatorischen Reaktion dient die histologische und immunhistologische Aufbereitung der Herzen, mittels derer sowohl quantitativ die stattgefundene Infiltration mit Zellen und als auch deren Differenzierung im Myokard charakterisiert werden konnte. Besonderes Interesse galt hier der Akkumulation von Thrombozyten (CD42b positiven Zellen) im infarzierten Bereich des Myokards, wie sie schon Ziegler et al. beschrieben haben (Ziegler et al., 2016; Ziegler et al., 2017). Dass der CXCR7 Verlust zu einer Änderung des migratorischen Geschehens von Thrombozyten beiträgt, konnte anhand der Immunhistochemie gezeigt werden. Bei den *Knockout*-Tieren mit I/R findet im Vergleich zu den Sham operierten Tieren eine vermehrte Infiltration mit Thrombozyten (CD42b positive Zellen, Abbildung 26) statt. Vor dem Hintergrund, dass die Akkumulation von Thrombozyten zu einer Thrombozyten-vermittelten Zellrekrutierung führt und somit zu mehr Schaden innerhalb des betroffenen Organs beiträgt (Z. Li, Yang, Dunn, Gross, & Smyth, 2011), bestätigt dieser Befund den Zusammenhang zwischen Thrombozytenakkumulation, Infiltration von inflammatorischen Zellen und größerem myokardialen Schaden bei den CXCR7 defizienten *Knockout*-Tieren. Die Auswertung der Thrombozytenakkumulation beschränkt sich jedoch lediglich auf den Zeitpunkt nach 24 h Reperfusion. Mittels weiterer Versuche sollte geklärt werden, ob in dem Zeitraum unmittelbar nach Öffnen der Ligatur bis zu den 24 h mehr aktivierte Thrombozyten beim CXCR7 *Knockout* im Myokard zu finden sind.

Die Abbildung 21 zeigt die massive Infiltration von zellkernhaltigen Zellen in das Myokard der *Knockout*-Tiere mit I/R und spiegelt quantitativ die vermehrte inflammatorische Immunantwort wider. Die Differenzierung der Inflammation mittels Immunhistologie zeigt eine deutlich proinflammatorische Immunantwort bei den Tieren der *Knockout*-Gruppe im Vergleich zu den Wildtypen und den Sham operierten Tieren. Durch die Verwendung einer ganzen Reihe Primärantikörper konnten die inflammatorischen Zellen charakterisiert werden.

Der verwendete MHCII Antikörper reagiert mit dem murinen major histocompatibility complex der Klasse II und detektiert eine polymorphe Determinante auf B-Zellen, Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und aktivierten T-Lymphozyten. Die MHCII positiven Zellen im Myokard spiegeln die Akkumulation Antigen-präsentierender Zellen wieder, wobei Monozyten und Makrophagen in der Frühphase des inflammatorischen Geschehens die größte Population darstellen (Ma, Mouton, & Lindsey, 2018). Im Myokard der *Knockout*-Tiere findet nach I/R eine gesteigerte Infiltration mit MHCII positiven Zellen statt (Abbildung 22). Der CXCR7 *Knockout* auf Thrombozyten führt demnach zu einer stärkeren monozytären und makrozytären Immunantwort in der Frühphase der Inflammation. Die weitere Charakterisierung dieser Zellpopulation durch die Verwendung eines CCR2 Antikörpers (Rezeptor für MCP-1/CCL2) wurde nicht vorgenommen. Dieser Rezeptortyp findet sich vor allem auf Makrophagen, die erst kürzlich als zirkulierende Monozyten in das Gewebe eingewandert sind (Weinberger & Schulz, 2015). Lavine et al. konnten für aus dem Blut eingewanderte CCR2⁺ Makrophagen einen negativen Effekt auf das kardiale Remodeling nach Infarkt feststellen (Lavine et al., 2014). Ob die stattfindende Infiltration mit MHCII positiven Zellen einen positiven oder negativen Effekt auf das kardiale Remodeling hat, muss in weiteren Versuchen oder durch die Detektion weiterer makrophagenspezifischer Antikörper folglich tiefergehend untersucht werden.

Im großen Maße an der inflammatorischen Immunantwort im ischämischen und reperfundierte Myokard beteiligt sind Granulozyten, wovon neutrophile Granulozyten anteilmäßig die größte Population darstellen (Dewald et al., 2004; Nikolaos, 2006). Durch die Verwendung eines Ly6G Antikörpers konnte die massive Infiltration mit Neutrophilen in das Myokard der *Knockout*-Tiere differenziert sowie quantifiziert werden (Abbildung 23). Gerade im Hinblick darauf Therapiekonzepte zu entwickeln, die die durch neutrophile Granulozyten vermittelten myokardialen Verletzungen limitieren und die positiven Effekte der Neutrophilen auf regenerative Prozesse der Makrophagen verstärken (Horckmans et al., 2017), ermöglicht die Differenzierung dieser Zellpopulation eine Aussage in wie weit der thrombozytäre CXCR7 Rezeptor ein mögliches Target sein kann. Um jedoch direkte Wechselwirkungen der infiltrierenden Neutrophilen und Thrombozyten zu evaluieren, müssten zusätzliche Analysen dieser Interaktion durchgeführt werden. (z.B. die durch Thrombozyten vermittelte Formation

von NET Strukturen oder Darstellung der Ko-Lokalisation von CD42b/Ly6G positiven Zellen).

Neben Zellen des angeborenen Immunsystems sind T- und insbesondere B-Lymphozyten als Zellen der erworbenen Immunität an den inflammatorischen Prozessen innerhalb des Myokards beteiligt (Cordero-Reyes, Youker, & Torre-Amione, 2013; Hofmann & Frantz, 2016). So tragen reife B-Lymphozyten laut Zouggari et al. zur Rekrutierung von Monozyten und zu vermehrten Gewebeschäden nach Myokardinfarkt bei (Zouggari et al., 2013). Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb die Akkumulation B220 positiver Zellen durch einen Antikörper, der an eine extrazelluläre Domäne des transmembranen CD45 Glykoprotein bindet und auf B-Lymphozyten aller Stadien (pro-, reife und aktivierte B-Lymphozyten) zu finden ist, genauer untersucht. Im Vergleich zu Sham operierten Tieren zeigen die *Knockout*-Tiere mit I/R eine vermehrte Infiltration mit B220 positiven Zellen (Abbildung 24). T-Zellen (insbesondere T-Helferzellen) sind nach Aktivierung durch B-Zellen vor allem durch die massive Freisetzung von Chemo- und Zytokinen (IL1, IL6, TNF- α) an der Inflammation beteiligt (Cordero-Reyes et al., 2013). Zur Differenzierung der T-Zellen wurde ein universeller CD3 Marker verwendet, der an die interne Domäne des CD3 Antigens der T-Zellen bindet. In Abbildung 25 zeigt sich bei Tieren mit I/R zwar tendenziell ein vermehrtes Auftreten von T-Zellen (CD3 positive Zellen), jedoch ist keine Signifikanz feststellbar. Dieser Befund deckt sich mit der Tatsache, dass die T-Zell vermittelte Immunantwort erst im weiteren Verlauf der Inflammation stattfindet (Hofmann & Frantz, 2016).

Zusätzlich zur zellulären Differenzierung der Inflammation im Myokard wurden drei Marker für den Zellstoffwechsel verwendet, die nähere Informationen hinsichtlich der Apoptose (Caspase-3), der Regulation von Wachstum und Apoptose (pStat3) und über die Zellproliferation und Mitose (ki67) liefern. Caspase-3 positive Zellen sind Zellen, die sich in Apoptose befinden und erhöhte Level endogener Fragmente der aktivierten Caspase-3 besitzen (Communal et al., 2002). Eine Zunahme apoptotischer Myozyten im Myokard ist kennzeichnend für den stattgefundenen myokardialen Schaden nach Ischämie und ist im reperfundierte Myokard deutlich stärker ausgeprägt als im nicht Reperfundierte (Zidar, Dolenc-Strazar, Jeruc, & Stajer, 2006). Der Grad der Apoptose im Myokard (Caspase3, Abbildung 27 A) nimmt zwar sowohl bei Wildtyp- als auch bei *Knockout*-Tieren post I/R zu, jedoch ist nach 24 h Reperfusion noch kein signifikanter

Unterschied feststellbar. Eine Beurteilung der Apoptose nach längeren Reperfusionszeiträumen oder durch die Verwendung eines Markers (TUNEL) der zusätzlich den kardialen Zelltod (Nekrose) darstellt, könnte vermutlich Unterschiede zwischen den Gruppen herausarbeiten (Edston, Grontoft, & Johnsson, 2002).

Die Regulation des Wachstums kann anhand des Gehalts des phosphorylierten Stat3 (pStat3) innerhalb der Zellen untersucht werden. Stat3 gehört zur Familie der STAT-Proteine (signal transducers and activators of transduction), welche nach Phosphorylierung durch rezeptorabhängige Kinasen zum Zellkern translozieren und dort als Transkriptionsfaktoren fungieren. Hohe zelluläre Level von phosphoryliertem Stat3 finden sich als Antwort auf Zytokine und Wachstumsfaktoren (z.B. Interferon- α , Interferon- γ , EGF, PDGF oder IL6), die auch im Rahmen der Ischämie in hohen Konzentrationen im Myokard zu finden sind (Omura et al., 2001). Darüber hinaus kann die Aktivierung der Signaltransduktion durch pStat3 zu einem kardioprotektiven Effekt nach Ischämie führen (O'Sullivan, Breen, Gallagher, Buggy, & Hurley, 2016; Zgheib, Zouein, Kurdi, & Booz, 2012). Die Immunhistologie zeigt, dass sich die pStat3 Expression und damit die Regulation von Wachstum und Apoptose (Abbildung 27 B) im Myokard von Wildtyp- und *Knockout*-Tieren nach Ischämie und 24 stündiger Reperfusion nicht unterscheiden, wobei eine deutliche Steigerung der Expression des Transkriptionsmarkers stattfindet, was insgesamt für eine erhöhte Stoffwechselaktivität nach I/R spricht. Ob im Verlauf der Reperfusion kardioprotektive Effekte durch die Signaltransduktion vermittelt werden, kann nur durch weitere Versuche geklärt werden.

Kinase 67 (ki67) wird als Mitosemarker und Indikator zellulärer Proliferation verwendet (Y. Li et al., 2013). Es handelt sich um ein Kernprotein, welches in proliferierenden Zellen und vermehrt in den späten G1-, S-, M-, und G2-Phasen des Zellzyklus exprimiert wird (Scholzen & Gerdes, 2000). Zellen, die sich in der Ruhephase (G0-Phase) befinden, sind für dieses Protein negativ. Demnach ermöglicht die Auswertung der ki67 positiven Zellen eine Aussage hinsichtlich des Zellwachstums im Myokard. Der Abbildung 27 C ist zu entnehmen, dass die lokale Inflammation im Myokard der *Knockout*-Tiere nach I/R im Gegensatz zu den Wildtypieren eine geringe Mitoserate und verminderte Zellproliferation aufweist (signifikant weniger ki67 positive Zellen pro mm²). Eine verringerte Proliferation und Mitoserate im infarzierten Myokard der *Knockout*-Tiere spricht für eine reduzierte kardiale Regeneration und hat möglicherweise Auswirkungen

auf die Heilung der infarktbedingten Verletzungen des Myokards (Y. Li et al., 2013; Malliaras et al., 2013).

5.2.3 Verstärkte CD62P vermittelte Zellinteraktion nach myokardialer Ischämie und Reperfusion und systemische Inflammation bei Pf4-Cre CXCR7^{-/-}

Auch systemisch findet eine Immunreaktion des Organismus nach akutem Myokardinfarkt statt (Fang et al., 2015). Im Rahmen von Entzündungen bilden zirkulierende Thrombozyten Aggregate mit Leukozyten (PLA, platelet-leukocyte aggregates), die mittels der Durchflusszytometrie gemessen werden konnten (Klinkhardt & Harder, 2005). Durch Bestimmung der CD42b positiven Leukozyten Aggregate kann auf direkte Wechselwirkungen zwischen den Thrombozyten und inflammatorischen Zellen des Blutes geschlossen werden (Irving et al., 2004; Nkambule et al., 2015; Thomas & Storey, 2015). Belegt ist zudem, dass eine vermehrte Aktivierung der Thrombozyten nach Infarkt/Hypoxie bzw. durch die darauffolgenden inflammatorischen Prozesse stattfindet (Langford, Wainwright, & Martin, 1996; Marquardt et al., 2002; Yun et al., 2016). Der Aktivierungsgrad der Thrombozyten wurde deshalb durch die Messung von CD62P (P-Selektin; Maß für die α -Degranulation) auf Thrombozyten mittels Durchflusszytometrie vor und nach Infarkt bestimmt. Die Bindung zwischen Thrombozyten und anderen Zelltypen wird vorwiegend durch P-Selektin (CD62P) vermittelt. Während der Thrombozytenaktivierung werden große Mengen P-Selektin aus den α -Granula mobilisiert und an der Thrombozytenoberfläche exprimiert (Yun et al., 2016). Durch den Liganden PSGL-1 (P-Selektin Ligand 1) kommt es zur Interaktion zwischen Thrombozyten, Endothelzellen und Leukozyten. CD62P ist damit Hauptvermittler der Wechselwirkungen zwischen Thrombozyten und Leukozyten und führt zur Bildung von Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten, was wiederum zur vermehrten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, Chemokine und endothelialen Adhäsionsmolekülen beiträgt (Cerletti et al., 2012). Bei den Versuchen der Induktion myokardialer Ischämie und Reperfusion im *Knockout* Modell zeigen sich sowohl für den Wildtyp (fl/fl) wie für den thrombozytären *Knockout* von CXCR7 (-/-) erhöhte Expressionsmuster von CD62P auf den Thrombozyten nach 24 stündiger Reperfusion (siehe 4.2.6, Abbildung 30). Der Abbildung 30 ist zu entnehmen, dass es bei beiden Versuchsgruppen zu einer Aktivierung der Thrombozyten mit Freisetzung thrombozytärer α -Granula kommt (Zunahme des CD62P Signals). Der Aktivierungsgrad

der Thrombozyten von Wildtyp- und *Knockout*-Tieren unterscheidet sich nach 24 h jedoch nicht signifikant. Es ist anzunehmen, dass Blutentnahmen zu früheren Zeitpunkten ein verändertes Bild der Aktivierung geliefert hätten, da der *Knockout* eine vermehrte Bildung von Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten (PLA, platelet leukocyte aggregates) zeigt und die Bildung von Aggregaten aufgrund der längeren Persistenz im Blut einen sensitiveren Nachweis der Thrombozytenaktivierung darstellt (Yun et al., 2016). Es sei an dieser Stelle darauf verwiesen, dass insbesondere die Messung des Aktivierungsgrades der Thrombozyten mittels thrombozytärer Oberflächenrezeptoren nur eine Momentaufnahme darstellt (Marquardt et al., 2002), da das Expressionsmuster auf den Thrombozyten innerhalb kürzester Zeit Veränderungen unterliegen kann.

Das Ergebnis der vermehrten Bildung von PLA vom Typ CD42b/CD14 (Thrombozyten/Monozyten) bei den *Knockout*-Tieren (Abbildung 31) spricht insgesamt für eine stärkere durch Thrombozyten vermittelte inflammatorische Immunantwort. Diese könnte durch die vermehrte Expression von CD62P auf den Thrombozyten der *Knockout*-Tiere begründet sein, welche jedoch nach 24 h nicht ermittelt werden konnte (Abbildung 30). Zirkulierende Aggregate aus Mono- und Thrombozyten formieren sich insbesondere in der Frühphase des akuten Myokardinfarktes nach Aktivierung der Thrombozyten (Furman et al., 2001). Die vermehrte Bildung dieses Typus der Aggregate beim *Knockout* unterstützt die Befunde der stärkeren lokalen Infiltration mit inflammatorischen Zellen im Myokard der *Knockout*-Tiere. So verweisen Page et al. insbesondere auf die durch die Bildung von Thrombozyten-Monozyten-Aggregaten vermittelten Effekte auf die Funktion von neutrophilen Granulozyten. Bei vermehrter Bildung wird ein proinflammatorisches Signaling vermittelt, das sich in vermehrter Adhäsion und Transmigration von Neutrophilen mit einer gesteigerten Produktion von ROS äußert. Zusätzlich induzieren die stimulierten Neutrophilen die Induktion des transzellulären Arachidonsäuremetabolismus (Page & Pitchford, 2013). Aus humanmedizinischen Studien ist bekannt, dass erhöhte Level von CD14⁺ Monozyten mit dem Ausmaß des myokardialen Schadens einhergehen und zu einer schlechteren funktionellen Wiederherstellung der linksventrikulären Herzfunktion nach Myokardinfarkt führen (Tsujioka et al., 2009). Die Auswirkungen der vermehrten Aggregatbildung von Thrombozyten und Monozyten bei den *Knockout*-Tieren auf das

kardiale Remodeling sollten deshalb durch weitere Reperfusionszeiträume (7 und 28 Tage) weiter untersucht werden.

Einen Beleg für die These, dass die proinflammatorische Reaktion der CXCR7-*Knockout*-Tiere nach Ischämie und Reperfusion durch die vermehrte Aktivierbarkeit der Thrombozyten bedingt ist, liefern darüber hinaus die Ergebnisse aus der Charakterisierung der Funktion CXCR7 defizienter Thrombozyten (siehe 4.4.7). Eine vermehrte Aktivierbarkeit der CXCR7 defizienten Thrombozyten, dargestellt durch die deutlich höhere Expression von CD62P und Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ auf der Thrombozytenoberfläche nach Stimulation mit CRP (collagen related peptide) sprechen insgesamt für einen hyperreaktiven Thrombozytenphänotyp der *Knockout*-Tiere (Abbildung 39 und Abbildung 40, dazugehörige Wertetabellen Anh. Tabelle 16 und Anh. Tabelle 17). Zusätzlich zeigen die Ergebnisse aus der Immunhistologie deutlich die Akkumulation von Thrombozyten (CD42b positive Zellen) im infarzierten Myokard beim *Knockout* (Abbildung 26). Ausgehend davon, dass die Ischämie und nachfolgende Inflammation zur Aktivierung von Thrombozyten führen, unterstützt die vermehrte Invasion von CXCR7 defizienten Thrombozyten die These, dass die vermehrte Aktivierbarkeit der *Knockout*-Thrombozyten zum proinflammatorischen Geschehen im Myokard beiträgt und zur Rekrutierung sowie Akkumulation inflammatorischer Zellen führt (Ergebnisse Immunhistologie 4.2.4).

Anhand inflammatorischer Marker im Blut (akute Phase Proteine wie z.B. TNF- α , IL1- β , IL6 und weiterer freigesetzter Zytoskelettkomplexe und Chemokine) wurde die systemische Entzündungsreaktion im Plasma ermittelt. Die durchflusszytometrische Messung einiger CCL-, CXC-Chemokine und Zytokine verdeutlicht, dass der Verlust des thrombozytären CXCR7 Rezeptors zu einer Veränderung der Zytoskelettkomplexe und Chemokinzusammensetzung führt. Die Auswertung der Plasmaproben nach Ischämie und Reperfusion verweisen auf eine deutliche Beteiligung freigesetzter Zytoskelettkomplexe und Chemokine an der stattfindenden Immunreaktion (Abbildung 29, Anh. Tabelle 14). Die *Knockout*-Tiere zeigen signifikant höhere Plasmakonzentrationen des proinflammatorischen Zytokins Interleukin 6 (IL6) und chemotaktisch wirksamen Chemokins CXCL5. Es ist bekannt, dass hohe Level von IL6 mit dem Grad der Entzündung und myokardialen Nekrose korrelieren (Gabriel, Martinsson, Wretlind, & Ahnve, 2004; Ritschel et al., 2013). Die signifikant höheren Level von IL6 bei den *Knockout*-Tieren nach myokardialer Ischämie und Reperfusion

spiegeln somit die deutliche Inflammation mit myokardialer Nekrose im Plasma wider. CXCL5 wird vor allem aus zirkulierenden Thrombozyten freigesetzt und führt unter inflammatorischen Bedingungen zur Invasion von Neutrophilen (Koltsova & Ley, 2010; Mei et al., 2010). Diese Eigenschaft zur Beeinflussung der chemotaktischen Aktivität von Entzündungszellen fügt sich in das Bild der vermehrten Inflammation im Myokard der *Knockout*-Tiere, die gleichermaßen deutlich erhöhte Plasmakonzentrationen von CXCL5 aufweisen.

5.3 Phänotypisierung der Pf4-Cre CXCR7 Knockout-Tiere und Charakterisierung der Thrombozytenfunktion

Sierro et al. beschreiben für den globalen CXCR7 *Knockout* schwerwiegende kardiale Missbildungen, die bereits pränatal letal sind. Für die Differenzierung muskulärer Zellen sowie die Entwicklung der Herzklappen sind CXCR7 Rezeptor vermittelte Signalwege essenziell (Melchionna et al., 2010; Sierro et al., 2007; Yu et al., 2011). Durch die Generierung des Pf4-Cre spezifischen konditionellen *Knockout* von CXCR7 erhielt unsere Arbeitsgruppe die Möglichkeit, vitale Tiere und deren CXCR7 defiziente Thrombozyten genauer zu erforschen.

Die Feststellung der Zuchtleistung (Wurfgröße und Aufzuchtverluste) diente dazu, den Phänotyp der Tiere hinsichtlich pathologischer Auffälligkeiten in ihrer Entwicklung zu beurteilen (Doetschman, 1999; Murray & Brown, 2006). Hinweisend für einen veränderten Phänotyp, wäre eine verzögerte Entwicklung in Gewicht und Größe der Tiere, weswegen Tiere unterschiedlichen Alters gewogen und vermessen wurden. Die Diagramme in Abbildung 32 mit den dazugehörigen Werten in Tabelle 8 zeigen, dass die Deletion des CXCR7 Rezeptors auf den Megakaryozyten bzw. Thrombozyten keinen Einfluss auf die Zuchtleistung der Tiere hat. Aufzeichnungen über die Gewichtsentwicklung (Daten nicht abgebildet) sowie die Auswertungen des Gewichts und der Körperlänge im Alter von 3 bis 60 Wochen (siehe Abbildung 33) verdeutlichen, dass die Tiere sich normal entwickeln und es zu keinerlei Genotyp-bedingten kardiovaskulären Missbildungen kommt, wie sie für den vollständigen *Knockout* von CXCR7 beschrieben sind (Sierro et al., 2007; Yu et al., 2011).

Da sich diese Arbeit insbesondere mit der Wirkung des CXCR7 Chemokinrezeptors auf den Thrombozyten (weniger auf der Zelllinie der Megakaryozyten) beschäftigt, wurden zur Validierung des stattgefundenen *Knockouts* Western Blots lysierter Thrombozyten angefertigt und CXCR7 detektiert. Beweisend für den stattgefundenen *Knockout* von CXCR7 auf den Thrombozyten gelang es den Verlust dieses Proteins mittels Western Blot in Abbildung 34 darzustellen.

Hauptfunktion der Thrombozyten ist die Hämostase. Unerlässlich für eine funktionierende Blutstillung ist in erster Linie eine ausreichende Thrombozytenzahl und normale Thrombozytengröße (Gulati, Kumar, Sheth, & Dey, 2017). Die

Thrombozytenzahl und die Größe der Thrombozyten wurden mittels Differentialblutbilder bestimmt und zeigen keine Unterscheide zwischen Wildtyp- und *Knockout*-Tieren (Abbildung 35).

Ob der Verlust des CXCR7 Rezeptors auf den Thrombozyten zu einer Beeinflussung der Hämostase führt, wurde mittels des *in vivo* Modells zur Ermittlung der Blutungszeit genauer untersucht. Bei diesem Modell wird eine Verletzung von Gefäßen (Resektion der Schwanzspitze) induziert, bei der es zur Aktivierung der Thrombozyten und nachfolgend zur Blutstillung mit anschließender Blutgerinnung kommt. Das Modell zur Bestimmung der Blutungszeit simuliert die physiologische Hämostase, wohingegen das Modell der Eisen-3-Chlorid induzierten Verletzung der A. carotis den Ablauf der Hämostase aufgrund einer chemischen Noxe unter physiologischen Scherkräften und die *in vivo* Thrombusformation darstellt (W. Li, Nieman, & Sen Gupta, 2016; Westrick, Winn, & Eitzman, 2007). Der Abbildung 36 ist zu entnehmen, dass die Pf4-Cre CXCR7 *Knockout*-Tiere keine Veränderung des *in vivo* ermittelten hämostatischen Parameters der Blutungszeit zeigen. Die Hämostase scheint unbeeinflusst und spricht dafür, dass der Verlust von CXCR7 auf den Thrombozyten keine wesentliche Beeinflussung des Gefäßverschlusses verursacht.

Weitergehend wurden die Thrombozyten hinsichtlich ihrer Aktivierbarkeit nähergehend untersucht. Im artifiziellen Perfusionssystem der Flusskammer wurde die Bildung von Thromben und damit das thrombotische Potenzial des Pf4-Cre CXCR7 *Knockouts* validiert (Roest et al., 2011; Van Kruchten, Cosemans, & Heemskerk, 2012). Bei diesem Modell führt die mit fibrillären Kollagen-Typ I beschichtete Oberfläche des Deckglases zu einer GPVI und Integrin $\alpha_2\beta_1$ vermittelten Adhäsion von Thrombozyten (Schematische Darstellung siehe Abbildung 43). Die Bindung von Thrombozyten bei hohen Scherraten wird vorwiegend via GPIb-V-IX und Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa) an den VWF vermittelt. Die Stabilisierung der sich bildenden Thromben sowie die Ko-Aggregation der Thrombozyten findet nachfolgend vermittelt durch das thrombozytäre Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Fibrinogenrezeptor) statt (Van Kruchten et al., 2012). Durch die Aktivierung der Thrombozyten kommt es zu einem autokrinen Signaling (v.a. durch Freisetzung von ADP und Thromboxan), wodurch weitere Thrombozyten aktiviert werden. Da murines Vollblut verwendet wurde, konnten alle Phasen der Hämostase (Adhäsion, Extension und die durch plasmatische Gerinnungsfaktoren vermittelte Koagulation) beurteilt und so die

thrombogene Aktivität des CXCR7 *Knockouts* evaluiert werden. In der *ex vivo* durch Kollagen Typ I-vermittelten Thrombusformation zeigt sich bei den *Knockout*-Tieren in Abbildung 37 eine deutlich größere Thrombusfläche. Hiermit ergaben sich erste Hinweise für eine veränderte Funktionalität der Thrombozyten hinsichtlich ihrer Aktivierbarkeit, welche nachfolgend durch durchflusszytometrische Messungen *ex vivo* bestätigt werden konnte.

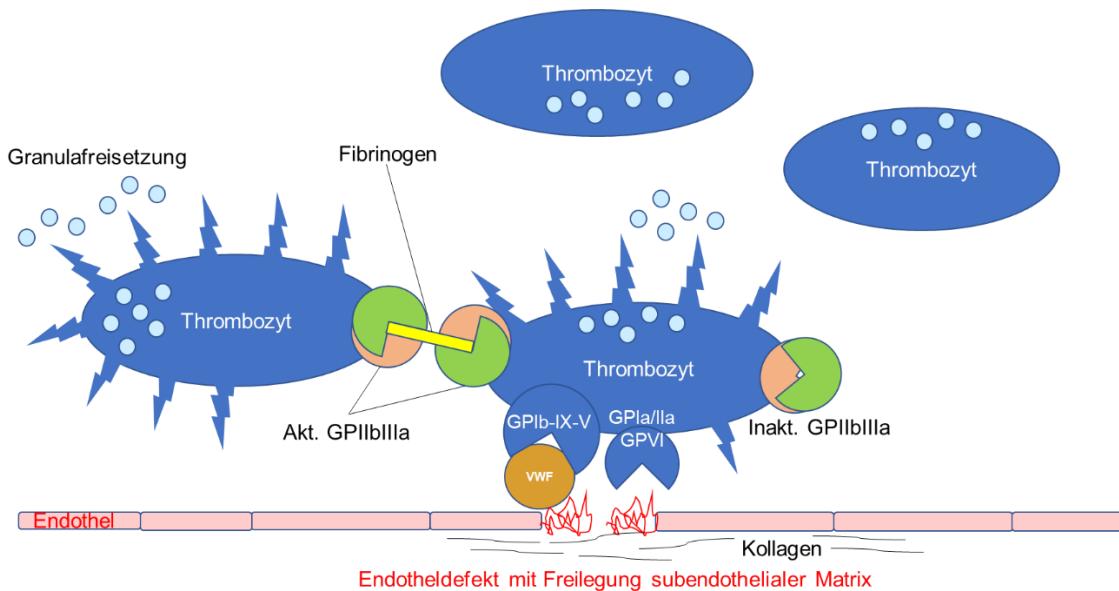


Abbildung 43: Schematische Darstellung der Thrombozytenadhäsion, -aggregation und -aktivierung modifiziert nach Voigt (Voigt, Schmidt, Riss, & Schmitz, 2016) Inakt. = Inaktiver Rezeptor; GPIa/IIa = Integrin $\alpha_2\beta_1$ = Rezeptor für Kollagen Typ I und IV; GPIIb/IIIa = Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ = Fibrinogenrezeptor; GPVI = Kollagenrezeptor; Rezeptorkomplex für initiale Thrombozytenadhäsion = GPIb-IX-V; VWF = Von-Willebrand-Faktor

Am Ablauf der Hämostase mit anschließender Thrombusbildung sind eine ganze Reihe Glykoproteine und Integrine auf der Thrombozytenoberfläche beteiligt (Abbildung 43). Ein veränderter Rezeptorenbesatz kann hinweisend sein für funktionelle Veränderungen der Thrombozyten, weswegen die durchflusszytometrische Messung einiger wichtiger thrombozytärer Oberflächenrezeptoren (GPV, GPVI, GPIX, Integrin α_5 und Integrin β_3) erfolgte. Abbildung 38 und Anh. Tabelle 15 veranschaulichen jedoch, dass die Oberflächenexpression der Thrombozytenaggregation und -aktivierung vermittelnden Rezeptoren unverändert ist. Das vermehrte thrombotische Potenzial der CXCR7 defizienten Thrombozyten kann folglich nicht durch einen unterschiedlichen Rezeptorenbesatz erklärt werden.

Dagegen konnte die vermehrte Aktivierbarkeit anhand der Durchflusszytometrie von murinem Vollblut nach Aktivierung durch die Agonisten Thrombin und CRP (collagen related peptide) beurteilt werden. Messgrößen sind die gebräuchlichen Biomarker für die Thrombozytenaktivierung CD62P und Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Yun et al., 2016). Beide Agonisten induzieren eine dosisabhängige Thrombozytenaktivierung via G-Protein gekoppelter Rezeptoren (GPCR, G-protein coupled receptor). Thrombin ist der stärkste Thrombozytenagonist der an Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR) bindet. Collagen-related peptide ist ein synthetisches Peptid, welches durch seine Triple Helix der Struktur von Kollagen entspricht (Polanowska-Grabowska, Gibbins, & Gear, 2003). Es ist ein selektiver Agonist für den thrombozytären GPVI Kollagen-Rezeptor und vermittelt durch ihn neben der Aktivierung von Tyrosinkinasen, die Thrombozytenaktivierung und -aggregation (Smethurst et al., 2007).

Die Charakterisierung der Aktivierbarkeit der Thrombozyten durch Verwendung der oben genannten Agonisten beschränkt sich demnach nur auf das GPCR-vermittelte Signaling der Thrombozyten. Ergebnisse der Aktivierungsassays dargestellt für Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ in Abbildung 39 und Anh. Tabelle 16 sowie für CD62P in Abbildung 40 und Anh. Tabelle 17 zeigen einen hyperreaktiven Thrombozytenphänotyp der *Knockout*-Tiere bei der Aktivierung mit 5 µg/ml CRP (collagen related peptide). Die Tatsache, dass vor allem der Agonist CRP zu einer starken Aktivierung der Thrombozyten mit Freisetzung eines veränderten Chemo- und Zytokinprofil in den Thrombozytenüberständen führt (Anh. Abbildung 44 und Tabelle 9), legt nahe, dass der Verlust von CXCR7 auf Thrombozyten ein verändertes Zellsignaling zur Folge hat, welches jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht weitergehend untersucht wurde und Thema weiterer Studien sein wird.

Die Wechselwirkungen zwischen Thrombozyten und inflammatorischen Zellen konnte im ersten Versuchsteil sowohl durch die Messung von Thrombozyten-Leukozyten Aggregaten sowie des Zyro-/Chemokinprofils als auch durch die vermehrt stattfindende lokale Inflammation (Histologie, Immunhistologie) gezeigt werden. Neben der direkten Wechselwirkung zwischen aktivierten Thrombozyten und Leukozyten spielen sekretorische Prozesse der Thrombozyten eine wichtige Rolle, die zur Rekrutierung und Chemotaxis von inflammatorischen Zellen führen (Gear & Camerini, 2003; Harrison & Cramer, 1993; Rendu & Brohard-Bohn, 2001). Durch Analysen der Thrombozytenüberstände wurde auf die chemotaktische Funktion und das Chemo- und

Zytokinprofil CXCR7 defizienter Thrombozyten nach Aktivierung genauer eingegangen. Zum einen wird mit *ex vivo* Migrationsversuchen der chemotaktische Effekt von Thrombozytenüberständen von Wildtyp- und *Knockout*-Tieren auf Wildtypmonozyten gezeigt (Maini et al., 2018). Darüber hinaus liefern die Messungen der Thrombozytenüberstände via Legendplex Assay den Gehalt freigesetzter Chemo- und Zytokine, welche einen chemotaktischen Effekt haben sowie zur weiteren autokrinen Aktivierung von Thrombozyten führen können (Abi-Younes, Si-Tahar, & Luster, 2001; Di Paolo & Shayakhmetov, 2016; Gilet et al., 2009; Mei et al., 2010; Sedlmayr, A., Wilders-Trusching, Tiran, & Dohr, 1995). Abbildung 41 und Abbildung 42 ist zu entnehmen, dass die Stimulation der Thrombozyten mit CRP 5 µg/ml einen chemotaktischen Einfluss auf Monozyten hat, welcher bei den *Knockout*-Tieren signifikant stärker ausfällt. Anhand der Chemokinzusammensetzung des Thrombozytenüberstandes abgebildet in Anh. Abbildung 44 und Tabelle 9, lässt sich feststellen, dass die Thrombozyten der *Knockout*-Tiere nach Aktivierung ein deutlich proinflammatorisches Signal mittels der freigesetzten Chemo- und Zytokine vermitteln. Insbesondere die chemotaktisch wirksamen Chemokine CXCL5, CCL17 und CCL22 sind in den aktivierte Thrombozytenüberständen der *Knockout*-Tiere signifikant erhöht (Di Paolo & Shayakhmetov, 2016; Gilet et al., 2009; Heiseke et al., 2012; Mei et al., 2010; Richter et al., 2014). Darüber hinaus wirken die beim *Knockout* signifikant erhöhten Chemokine CCL17, CCL22 und das Zytokin IL1 α aktivierend auf Thrombozyten, was wiederum zu einer gesteigerten autokrinen Thrombozytenaktivierung führen kann (Abi-Younes, Si-Tahar, & Luster, 2001; Sedlmayr et al., 1995).

Die signifikante Reduktion von CXCL12 in den aktivierte Thrombozytenüberständen der *Knockout*-Tiere, lassen vermuten, dass der fehlende CXCR7 Rezeptor eine veränderte Freisetzung und/oder Speicherung seines Liganden bewirkt. Durch weitere Analysen (z.B. Western Blot der Thrombozyten und Überstände zur Detektion des CXCL12 Gehaltes) sollte dieser Befund in nachfolgenden Arbeiten und die möglichen Auswirkungen durch die CXCL12-CXCR7 Achse vermittelten regenerativen Prozesse tiefergehend untersucht werden.

5.4 Schwierigkeiten bei der Phänotypisierung der Pf4-Cre CXCR7 Knockout-Tiere und Charakterisierung der Thrombozytenfunktion

Das grundsätzliche Verständnis der Funktion CXCR7 defizienter Thrombozyten wurde mittels verschiedener Methodiken nähergehend charakterisiert. Der Umfang der verwendeten Methodiken beschränkt sich jedoch der Übersichtlichkeit halber auf die Funktionsveränderungen im Rahmen der Hämostase, der Aktivierung von Thrombozyten sowie einiger nach Aktivierung vermittelter Effekte. Tiefergehende Erkenntnisse der genauen Mechanismen, die zur veränderten Funktion CXCR7 defizienter Thrombozyten führen, werden im Rahmen dieser Arbeit lediglich angerissen und bedürfen zu deren vollständigem Verständnis weiterer experimenteller Grundlagenforschung.

Die Hämostasefunktion der Thrombozyten lässt sich *in vivo* mittels der Bestimmung der Blutungszeit beschreiben. Bei beiden Modellen befinden sich die Tiere in Vollnarkose, was wiederum Auswirkungen auf die Hämostase der Thrombozyten haben kann. Narkosebedingte Nebenwirkungen, wie eine Veränderung der Kreislaufsituations, wurden durch Gabe einer gewichtsadaptierten Narkose Sorge getragen. Durch Wärmematten und Abdecken der Tiere während der Narkose konnte eine Unterkühlung vermieden werden.

Zur weiteren Charakterisierung der Funktionsveränderungen der Thrombozyten wurden murines Vollblut und isolierte murine Thrombozyten verwendet. Dazu wurde den Tieren in tiefer Narkose retroorbital Blut entnommen. Wichtig, um die Aktivierbarkeit messen zu können, ist eine Blutabnahmetechnik, die zu keiner Voraktivierung der Thrombozyten führt. Durch die Messung unaktivierter (resting) Proben, konnte sichergestellt werden, dass die Blutentnahme nicht zur Voraktivierung der Thrombozyten geführt hat und somit verwertbare Resultate durch die Aktivierung mit den Agonisten ermittelt werden konnten. Die Darstellung des durch verschiedene Agonisten (Thrombin und CRP) vermittelten Aktivierungsgrades der Thrombozyten mittels CD62P (P-Selektin) und Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ Expression (siehe 4.4.7) liefern jedoch nur ein artifizielles System zur Charakterisierung der Thrombozytenaktivierung, welches weitergehend durch Analysen der zugrundeliegenden Signalwege validiert werden sollte.

Um isolierte Thrombozyten aus murinem Vollblut zu erhalten und diese für weitere Versuche (wie die Herstellung von Lysaten oder Thrombozytenüberständen) zu

verwenden, ist eine Reinheit des Isolats das maßgebende Kriterium für aussagekräftige Ergebnisse. Verunreinigungen mit anderen zellulären Bestandteilen des Blutes (Erythrozyten, Leukozyten) wurden durch ein standardisiertes Isolationsprotokoll vermieden. Thrombozyten können im Gegensatz zur Herstellung von Monozytenisolaten nicht kultiviert werden, da sie bereits durch die Kultivierung eine Veränderung ihrer Funktion zeigen würden. Die Selektion CD42b positiver Zellen mittels eines Cellsorting Systems wäre zwar grundsätzlich möglich, die Vitalität der Thrombozyten wäre jedoch auch hier zweifelhaft und eine mögliche Voraktivierung könnte nicht ausgeschlossen werden. Folglich nutzt unsere Arbeitsgruppe vor allem die frisch isolierten Thrombozyten aus murinem Vollblut, die je nach Versuchsaufbau durch die Verwendung von Inhibitoren (Apyrase, PGI2) und Gerinnungshemmern (ACD, EDTA) im unaktivierten Zustand gehalten werden. Durch die Einhaltung kurzer Inkubationszeiten (i.d.R. nicht länger als 30 min) sowie den Verzicht auf eine Zellfixierung (mit Formaldehyd) wurden vitale, aktivierbare Thrombozyten zu Analysezwecken verwendet.

5.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Bei der Pathologie der myokardialen Ischämie und Reperfusion spielen Thrombozyten und die durch sie vermittelten inflammatorischen Prozesse eine essenzielle Rolle. Durch die Akkumulation in der Mikrovaskularisation und die Rekrutierung inflammatorischer Zellen tragen sie lokal zur Entzündungsreaktion nach Ischämie und Reperfusion bei. Systemisch fungieren aktivierte Thrombozyten durch die Freisetzung ihrer Granula und die Bildung von Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten als aktive inflammatorische Zellen, die dadurch effektiv zur Immunantwort beitragen. Um thrombosebedingten Komplikationen nach akutem Myokardinfarkt entgegenzuwirken, stellen Thrombozyten die wichtigsten Angriffspunkte medikamentöser Therapien dar. Darüber hinaus zielen neuere Strategien darauf ab, den myokardialen Schaden nach Ischämie und Reperfusion möglichst zu minimieren und für eine funktionelle Wiederherstellung des Myokards zu sorgen. Die Beteiligung der Thrombozyten, sowohl an der Inflammation wie an der Thrombogenese nach Myokardinfarkt, macht diese Zellen besonders interessant für neuartige Therapieansätze, die sowohl eine überschießende Immunantwort als auch die Thrombogenität reduzieren.

Zielstrukturen dieser Therapien können thrombozytäre Chemokinrezeptoren darstellen. Der CXCR7 Rezeptor auf Thrombozyten zeigt ein dynamisches Expressionsmuster im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen. Diese Arbeit zeigt erstmals, dass der thrombozytäre CXCR7 Rezeptor zur inflammatorischen Reaktion im lebenden Organismus nach myokardialer Ischämie und Reperfusion beiträgt. Sowohl lokal wie auch systemisch vermittelt der Verlust des thrombozytären CXCR7 Rezeptor eine proinflammatorische Immunreaktion. Durch histologische und immunhistologische Analysen konnte die Entzündungsreaktion auf zellulärer Ebene genauer charakterisiert werden. Darüber hinaus findet eine vermehrte systemische Reaktion des Organismus statt, die durch die Bildung von Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate (vom Typ CD42b/CD14) und erhöhte Plasmakonzentrationen des chemotaktisch wirksamen CXCL5 und akute Phase Protein IL6 gekennzeichnet ist. *Ex vivo* bestätigt sich das proinflammatorische Potenzial CXCR7 defizienter Thrombozyten durch deren vermehrte Aktivierbarkeit und stärkeren chemotaktischen Effekt auf Monozyten sowie der erhöhten Plasmalevel chemotaktisch wirksamer Chemokine CXCL5, CCL17 und CCL22 nach Aktivierung mit dem Agonist CRP (collagen related peptide).

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Befunde, zeigen folglich eine Beteiligung des thrombozytären Chemokinrezeptors CXCR7 in der Frühphase der Inflammation nach Myokardinfarkt und verweisen sowohl auf direkte (durch Bildung von Aggregaten mit Leukozyten) als auch indirekte Wechselwirkungen (durch Freisetzung proinflammatorischer Chemo- und Zytokine) von Thrombozyten mit inflammatorischen Zellen. Ziel weiterer Versuche soll sein, den thrombozytären *Knockout* von CXCR7 durch längere Reperfusionszeiträume (7 und 28 Tage) und somit die Auswirkungen auf das kardiale Remodeling zu untersuchen. Von besonderem Interesse für die Regeneration des myokardialen Schadens könnte hier der CXCL12-CXCR7 Achse gewidmet werden, da diese wichtig ist für das Überleben, die Adhäsion und die Differenzierung der am Heilungsverlauf beteiligten regenerativen endothelialen Progenitorzellen (Jorbenadze et al., 2014; Yan et al., 2012). Zusätzlich besteht großes Interesse an der Entwicklung eines spezifischen CXCR7 Agonisten, der eine antithrombogene und antiinflammatorische Wirkung nach Ischämie und Reperfusion vermitteln soll.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Beteiligung von Thrombozyten an der inflammatorischen Phase nach akutem Myokardinfarkt macht diese im Blut zirkulierenden Zellen besonders interessant für medikamentöse Therapieansätze, die sowohl die Thrombogenität wie auch die Inflammation nach Infarktgeschehen begrenzen. Die gegenwärtige Forschung beschäftigt sich zunehmend mit thrombozytären Chemokinrezeptoren und ihren Liganden, um aktiv in die Funktionsweise der Thrombozyten einzugreifen und damit regenerative und inflammatorische Prozesse zu modulieren. Aktuell wird der Chemokinrezeptor CXCR7 insbesondere hinsichtlich seiner Bedeutung im Bereich des Endothels erforscht, wo bisherige Erkenntnisse den Schluss zulassen, dass endotheliales CXCR7 sowohl bei der Regeneration nach myokardialer Ischämie wie auch bei der pulmonalen Immunantwort und der Migration von Zellen eine wichtige Rolle spielt (Hao et al., 2017; Konrad, Meichssner, Bury, Ngamsri, & Reutershan, 2017; Ngamsri et al., 2017; C. Wang et al., 2018).

Die Bedeutung des thrombozytären CXCR7 auf die Thrombozytenfunktion und die durch ihn vermittelte Immunantwort im Rahmen inflammatorischer Prozesse sind jedoch weitestgehend unerforscht. In dieser Arbeit konnte erstmals die differenzielle Rolle des thrombozytären CXCR7 Chemokinrezeptors auf die Inflammation nach Ischämie und Reperfusion im lebenden Organismus beschrieben werden. Durch die Generierung des thrombozytenspezifischen *Knockouts* von CXCR7 im Mausmodell erfolgte darüber hinaus die Charakterisierung CXCR7 defizienter Thrombozyten hinsichtlich der Hämostase, ihrer Aktivierbarkeit und ihres chemotaktischen Effektes.

Der Verlust des thrombozytären CXCR7 Chemokinrezeptor resultiert nach 30-minütiger myokardialer Ischämie und 24 Stunden Reperfusion in eine lokale und systemische proinflammatorische Immunreaktion. Der thrombozytäre *Knockout* von CXCR7 führt zu einer größeren Infarktfläche sowie einen durch cTnI Messungen validierten, signifikant größeren myokardialen Schaden. Im Myokard zeigt sich histologisch eine vermehrte Infiltration mit inflammatorischen Zellen (insbesondere neutrophile Granulozyten), Thrombozyten sowie eine reduzierte Zellproliferations- und Mitoserate (Histologie und Immunhistologie). Systemisch stellt sich nach 24 h Reperfusion eine vermehrte Bildung von Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten vom Typ Thrombozyten/Monozyten dar.

Des Weiteren finden sich erhöhte Plasmakonzentrationen des chemotaktisch wirksamen Chemokins CXCL5 und proinflammatorischen Zytokins IL6.

Bestätigung des hyperreaktiven Phänotyps CXCR7 defizienter Thrombozyten liefern die Versuche zur Charakterisierung der Thrombozytenfunktion. So führt der Verlust des CXCR7 Rezeptors auf den Thrombozyten zwar zu keiner wesentlichen Beeinflussung der Hämostasefunktion der Blutplättchen, jedoch zeigt sich eine erhöhte Thrombogenität in der Flusskammer sowie nach *ex vivo* CRP (collagen related peptide) Stimulation eine vermehrte Aktivierbarkeit, ein starker chemotaktischer Effekt auf Monozyten sowie ein vorwiegend proinflammatorisches Chemo- und Zytokinprofil der CXCR7 defizienten Thrombozyten.

Der thrombozytäre CXCR7 Chemokinrezeptor fungiert folglich als Modulator der akuten inflammatorischen Phase nach Ischämie und Reperfusion sowohl direkt durch die Interaktion mit inflammatorischen Zellen (lokal und systemisch) als auch indirekt über die Freisetzung proinflammatorischer Zytoskelettkomplexe und Chemokine. Im Hinblick darauf künftig Therapien zu entwickeln, die nach Myokardinfarkt die Thrombogenität reduzieren und zusätzlich einen modulierenden Effekt auf die Entzündungsreaktion im Herzen haben, stellt der CXCR7 Rezeptor auf Thrombozyten ein vielversprechendes Ziel dar.

7 SUMMARY

Myocardial Ischemia and Reperfusion using the example of the Platelet-Specific *Knockout* of the CXCR7 Chemokine Receptor

Platelets play a critical role in mediating the inflammatory response after acute myocardial infarction. Due to this they are excellent therapeutic targets to reduce thrombogenicity and inflammation after ischemic events. Current research deals with the rising influence of platelet-specific chemokine receptors and their ligands in mediating platelet functions and modulating regenerative and inflammatory responses. The chemokine receptor CXCR7 plays an important role in the field of endothelial cells effecting regeneration after myocardial infarction and inflammatory response in the lung (Hao et al., 2017; Konrad et al., 2017; Ngamsri et al., 2017; C. Wang et al., 2018).

However, the impact of the platelet-specific chemokine receptor CXCR7 on platelet function and its effect on inflammatory response remains unclear. This study reveals the differential role of platelet specific CXCR7 in the phase of inflammation after ischemia and reperfusion in a murine model. Through the generation of the platelet specific CXCR7 *knockout* mouse it was possible to characterize CXCR7 deficient platelets regarding their functions in the process of hemostasis, activation and chemotaxis.

After 30 minutes of ischemia and 24 hours reperfusion the loss of platelet specific CXCR7 leads to a systemic and local proinflammatory immune response. Mice with platelet specific CXCR7 *knockout* show an augmented infarct size with higher cTnI plasma levels, indicating an increased myocardial damage compared to wildtype mice. Local inflammation in the myocardium was visualized using histological and immunohistological analysis. Inflammatory response showed infiltrating cells, particularly neutrophils (Ly6G positive cells), accumulation of platelets and a decreased rate of mitosis and cell proliferation (ki67 positive cells). Increased formation of platelet leukocyte aggregates (type platelets/monocytes) as well as high plasma levels of the chemokine CXCL5 and proinflammatory cytokine IL6, represented the systemic response after 24 hours of reperfusion.

The hyperreactive platelet phenotype of CXCR7 deficient platelets was further validated by examinations of platelet function using *in* and *ex vivo* methods. Although the *in vivo*

SUMMARY

measurements of hemostasis did not show any effect of the platelet specific CXCR7 *knockout*, we investigated more thrombus formation in artificial flow chamber assays. Additionally, stimulated CXCR7 deficient platelets exhibit increased activation with a chemotactic effect on monocyte migration and release a predominant proinflammatory chemo- and cytokine profile.

In summary the CXCR7 chemokine receptor on platelets is an active modulator of the inflammatory phase after ischemia and reperfusion by mediating its effects direct via cell interaction and indirect via secretion of proinflammatory chemo- and cytokines. For the development of future therapeutic strategies to reduce thrombogenicity as well as modulate inflammatory response after myocardial infarction, the CXCR7 receptor on platelets might function as an optimal target.

8 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Thrombozytäre Chemokinrezeptoren und ihre Chemokinliganden <i>modifiziert nach Chatterjee und Gear</i> (Chatterjee & Geisler, 2016; Gear & Camerini, 2003).....	25
Tabelle 2: Methodik zur Induktion der myokardialen Ischämie im Mausmodell mit Anwendung von Maßnahmen nach dem 3R Prinzip.	46
Tabelle 3: Gruppeneinteilung myokardiale Ischämie und Reperfusion im <i>Knockout</i> Modell.....	59
Tabelle 4: Protokoll zur Gewebeaufbereitung für die Herstellung von Paraffinpräparaten.	61
Tabelle 5: Protokoll zur Entparaffinierung von Paraffinschnitten.	62
Tabelle 6: Protokoll für die Herstellung von immunhistochemischen Präparaten.....	63
Tabelle 7: Versuchsgruppen Evaluierung der Methodik zur Induktion myokardialer Ischämie und Reperfusion.	77
Tabelle 8: Zusammenfassung der Zuchtparameter C57Bl/6 und Pf4-Cre CXCR7 Zuchten, t-test, SD.	99
Tabelle 9: Wertetabelle Chemo- und Zytokine im Überstand aktivierter Thrombozyten von Wildtyp- (fl/fl) und <i>Knockout</i> -Tieren (-/-), t-test, SEM.	109
Anh. Tabelle 10. Kardiale Parameter von Wildtyp (fl/fl) und Pf4-Cre-CXCR7 <i>Knockout</i> (-/-) im baseline Ultraschall.	157
Anh. Tabelle 11. Kardiale Parameter von Wildtyp (fl/fl) und Pf4-Cre-CXCR7 <i>Knockout</i> (-/-) im Ultraschall nach myokardialer Ischämie und 24 h Reperfusion.	157
Anh. Tabelle 12. Kardiale Parameter vom Pf4-Cre-CXCR7 <i>Knockout</i> (-/-) baseline und nach myokardialer Ischämie und 24 h Reperfusion, n = 6.	158
Anh. Tabelle 13. Kardiale Parameter vom Wildtyp (fl/fl) baseline und nach myokardialer Ischämie und 24 h Reperfusion, n = 6.	159
Anh. Tabelle 14: Chemo- und Zytokinkonzentrationen im Plasma nach myokardialer Ischämie und 24 h Reperfusion von Wildtyp- (fl/fl) und <i>Knockout</i> -Tieren (-/-), SEM.	160
Anh. Tabelle 15: Fluoreszenzintensität [MFI, mean fluorescence intensity] verschiedener Oberflächenrezeptoren auf Wildtyp- (fl/fl) und <i>Knockout</i> -Thrombozyten (-/-), t-test, SEM.	160

TABELLENVERZEICHNIS

Anh. Tabelle 16: Wertetabelle der Fluoreszenzintensität [MFI, mean fluorescence intensity] von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa) auf Thrombozyten von Wildtyp- (fl/fl) und <i>Knockout</i> -Tieren (-/-), t-test, SEM.....	160
Anh. Tabelle 17: Wertetabelle der Fluoreszenzintensität [MFI] von CD62P (P-Selektin) auf Thrombozyten von Wildtyp- (fl/fl) und <i>Knockout</i> -Tieren (-/-), t-test, SEM.....	161

9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1. EKG-Veränderungen nach Herzinfarkt <i>modifiziert nach Gerlach</i> (Ulrich Gerlach, 2015)	7
Abbildung 2. Schematische Darstellung des Operationsablaufs der Induktion myokardialer Ischämie und Reperfusion.....	53
Abbildung 3. Oropharyngeale Intubation.....	53
Abbildung 4. Induktion myokardialer Ischämie Lagerung und Eröffnung des Thorax.	54
Abbildung 5. Induktion myokardialer Ischämie mit Darstellung der LAD.	54
Abbildung 6. Induktion myokardialer Ischämie Verschluss des Thorax und Muskelnaht.	55
Abbildung 7. Induktion myokardialer Ischämie In situ Aufnahmen des Herzens nach 24 h Reperfusion.....	56
Abbildung 8. Pipettierschema für die durchflusszytometrische Messung von Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten nach Ischämie und Reperfusion.....	65
Abbildung 9. Ergebnisse der Genotypisierung.....	66
Abbildung 10. Zuchtschemata zur Generierung des thrombozytären <i>Knockouts</i> von CXCR7.....	67
Abbildung 11. Pipettierschema für die durchflusszytometrische Messung der Thrombozytenaktivierung.	72
Abbildung 12. Evaluierung myokardialer Ischämie und Reperfusion anhand des Vergleiches unterschiedlich alter Wildtyp-Gruppen Sham, n = 4; I/R C57Bl/6 (y = young, jung), n = 8; I/R C57Bl/6 (o = old, alt), n = 6, one-way ANOVA, SEM.....	78
Abbildung 13. Induktion myokardialer Ischämie Evaluierung der Ischämie.....	79
Abbildung 14. Evaluierung myokardialer Ischämie und Reperfusion anhand des Vergleiches unterschiedlich alter Wildtyp-Gruppen I/R C57Bl/6 (y = young, jung), n = 8; I/R C57Bl/6 (o = old, alt), n = 6, t-test, SEM.....	80
Abbildung 15. Beispielhafte Darstellung des stattgefundenen Myokardinfarktes mittels Ultraschallaufnahmen im M-Mode und Elektrokardiogramm.	81
Abbildung 16. Evaluierung des Infarktes anhand kardialer Funktionsparameter von Sham und I/R operierten C57Bl/6 Tieren.....	82
Abbildung 17. Histologischer Vergleich der Gesamtzellkernzahl nach Induktion myokardialer Ischämie und 24 h Reperfusion bei C57Bl/6 Tieren Sham, n = 4; I/R	

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

C57Bl/6 (y = young, jung), n = 8; I/R C57Bl/6 (o = old, alt), n = 6, one-way ANOVA, SEM.....	83
Abbildung 18. Myokardiale Ischämie und Reperfusion im <i>Knockout</i> Modell fl/fl = Wildtyp = Pf4-Cre negative CXCR7 ^{fl/fl} ; -/- = <i>Knockout</i> = Pf4-Cre positive CXCR7 ^{fl/fl} ; n = 6, t-test, SEM.....	85
Abbildung 19. Ultraschallauswertung nach Induktion myokardialer Ischämie und Reperfusions Vergleich von Wildtyp- (fl/fl) und Pf4-Cre positiven CXCR7 <i>Knockout</i> -Tieren (-/-); n = 6, paired t-test, SEM.....	86
Abbildung 20. Histologischer Vergleich Hämatoxylin Eosin gefärbten Myokards von Wildtyp- (fl/fl) und <i>Knockout</i> -Tieren (-/-) nach Ischämie und Reperfusions.....	88
Abbildung 21. Repräsentative Darstellung Hämatoxylin Eosin Färbung von Myokardschnitten mit Auswertung der Gesamtzellkernzahl pro mm ² von Wildtyp- (fl/fl) und <i>Knockout</i> -Tieren (-/-) nach Ischämie und Reperfusions.....	89
Abbildung 22. MHC II positive Zellen/mm ² im Myokard von Sham operierten (n = 4) und I/R operierten Tieren Wildtyp fl/fl (n = 8) und Pf4-Cre CXCR7 <i>Knockout</i> -/- (n = 6), one-way ANOVA, SEM.....	90
Abbildung 23. Ly6G positive Zellen/mm ² im Myokard von Sham operierten (n = 4) und I/R operierten Tieren Wildtyp fl/fl (n = 8) und Pf4-Cre CXCR7 <i>Knockout</i> -/- (n = 6), one-way ANOVA, SEM.....	91
Abbildung 24. B220 positive Zellen/mm ² im Myokard von Sham operierten (n = 4) und I/R operierten Tieren Wildtyp fl/fl (n = 8) und Pf4-Cre CXCR7 <i>Knockout</i> -/- (n = 6), one-way ANOVA, SEM.....	91
Abbildung 25. CD3 positive Zellen/mm ² im Myokard von Sham operierten (n = 4) und I/R operierten Tieren Wildtyp fl/fl (n = 7) und Pf4-Cre CXCR7 <i>Knockout</i> -/- (n = 6), one-way ANOVA, SEM.....	92
Abbildung 26. CD42b positive Zellen/mm ² im Myokard von Sham operierten (n = 4) und I/R operierten Tieren Wildtyp fl/fl (n = 8) und Pf4-Cre CXCR7 <i>Knockout</i> -/- (n = 6), one-way ANOVA, SEM.....	93
Abbildung 27. Immunhistochemische Marker für den Zellstoffwechsel im Myokard nach Ischämie und Reperfusions, one-way ANOVA, SEM.....	94
Abbildung 28. Ergebnisse der Messung des kardialen Troponin I (cTnI) von Wildtyp- (fl/fl) und <i>Knockout</i> -Tieren (-/-) nach Ischämie und Reperfusions.....	95

Abbildung 29. Chemo- und Zytokinprofil der Plasmaproben von Wildtyp- (fl/fl) und <i>Knockout</i> -Tieren (-/-) nach 30-minütiger Ischämie und 24 h Reperfusion.	96
Abbildung 30. Aktivierungsgrad muriner Thrombozyten von Wildtyp- (fl/fl) und <i>Knockout</i> -Tieren (-/-) baseline und nach 24 h Reperfusion [MFI, mean fluorescence intensity].	97
Abbildung 31. Auswertung der Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate 24 h post Ischämie von Wildtyp- (fl/fl) und <i>Knockout</i> -Tieren (-/-), t-test, SEM.	98
Abbildung 32. Auswertung der Zuchtparameter Pf4-Cre CXCR7 Zuchten im Vergleich zu C57Bl/6 Zuchten. (C57Bl/6 n = 16; (-/-) n = 36, t-test, SEM)	99
Abbildung 33. Auswertung von Gewicht und Körperlänge von Wildtyp- (fl/fl) und <i>Knockout</i> -Tieren (-/-)	100
Abbildung 34. Repräsentative Western Blots zur Validierung des thrombozytenspezifischen <i>Knockouts</i> von CXCR7.	101
Abbildung 35. Thrombozytenzahl (Plateletcount) n = 12 und -größe (Platelet Large Cell Ratio) n = 9 von Wildtyp- (fl/fl) und <i>Knockout</i> -Tieren (-/-), t-test, SEM.	102
Abbildung 36. Ermittlung der <i>in vivo</i> Blutungszeit.....	102
Abbildung 37. <i>Ex vivo</i> Thrombusformation von murinem Vollblut von Wildtyp- (fl/fl) und <i>Knockout</i> -Tieren (-/-) bei mittlerer Flussrate (1000/s).	103
Abbildung 38. Darstellung der Fluoreszenzintensität [MFI mean fluorescence intensity] verschiedener Oberflächenrezeptoren auf murinen Thrombozyten. (fl/fl = Wildtyp; -/- = <i>Knockout</i> , n = 6, t-test, SEM)	104
Abbildung 39. Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messung der Fluoreszenzintensität [MFI, mean fluorescence intensity] von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa) im unaktivierten (resting) Zustand und nach Aktivierung mittels der Agonisten Thrombin und CRP (collagen related peptide).....	105
Abbildung 40. Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messung der Fluoreszenzintensität [MFI, mean fluorescence intensity] von CD62P (P-Selektin) im unaktivierten (resting) Zustand und nach Aktivierung mittels der Agonisten Thrombin und CRP (collagen related peptide).....	105
Abbildung 41. Repräsentative Bilder der angefärbten und fixierten Porenfilter (3 μm) in 10-facher Vergrößerung nach Migration von Wildtypmonozyten zu Thrombozytenüberständen von Wildtyp- (fl/fl) und <i>Knockout</i> -Tieren (-/-).....	108

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 42. Auswertung der Monozytenmigration mit Thrombozytenüberständen von Wildtyp- (fl/fl) und <i>Knockout</i> -Thrombozyten (-/-).	108
Abbildung 43: Schematische Darstellung der Thrombozytenadhäsion, -aggregation und -aktivierung <i>modifiziert nach Voigt</i> (Voigt, Schmidt, Riss, & Schmitz, 2016).....	126
Anh. Abbildung 44. Ergebnisse des LEGENDplex TM Assay zur Evaluierung der Chemo- und Zytokin Zusammensetzung von aktivierten Thrombozytenüberständen von Wildtyp- (fl/fl) und <i>Knockout</i> -Tieren (-/-), t-test, SEM.....	162

10 LITERATURVERZEICHNIS

- A Barrabés, J., Inserte, J., Mirabet, M., Quiroga, A., Hernando, V., Figueras, J., & Garcia-Dorado, D. (2010). *Antagonism of P2Y(12) or GPIIb/IIIa receptors reduces platelet-mediated myocardial injury after ischaemia and reperfusion in isolated rat hearts* (Vol. 104).
- Abi-Younes, S., Si-Tahar, M., & Luster, A. D. (2001). The CC chemokines MDC and TARC induce platelet activation via CCR4. *Thromb Res*, 101(4), 279-289.
- Alampour-Rajabi, S., El Bounkari, O., Rot, A., Muller-Newen, G., Bachelerie, F., Gawaz, M., . . . Bernhagen, J. (2015). MIF interacts with CXCR7 to promote receptor internalization, ERK1/2 and ZAP-70 signaling, and lymphocyte chemotaxis. *FASEB J*, 29(11), 4497-4511. doi:10.1096/fj.15-273904
- Arastéh, K. (Ed.) (2009). *Innere Medizin : 643 Tabellen* (2., vollst. überarb. und erw. Aufl. ed.). Stuttgart: Thieme.
- Asri, A., Sabour, J., Atashi, A., & Soleimani, M. (2016). *Homing in hematopoietic stem cells: focus on regulatory role of CXCR7 on SDF1a/CXCR4 axis* (Vol. 15).
- Azevedo, P. S., Polegato, B. F., Minicucci, M. F., Paiva, S. A. R., & Zornoff, L. A. M. (2016). Cardiac Remodeling: Concepts, Clinical Impact, Pathophysiological Mechanisms and Pharmacologic Treatment. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 106(1), 62-69. doi:10.5935/abc.20160005
- Bajaj, A., Sethi, A., Rathor, P., Suppogi, N., & Sethi, A. (2015). Acute Complications of Myocardial Infarction in the Current Era. *Diagnosis and Management*, 63(7), 844-855. doi:10.1097/jim.0000000000000232
- Bakogiannis, C., Sachse, M., Stamatelopoulos, K., & Stellos, K. (2017). Platelet-derived chemokines in inflammation and atherosclerosis. *Cytokine*. doi:10.1016/j.cyto.2017.09.013
- Balabanian, K., Lagane, B., Infantino, S., Chow, K. Y., Harriague, J., Moepps, B., . . . Bachelerie, F. (2005). The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J Biol Chem*, 280(42), 35760-35766. doi:10.1074/jbc.M508234200
- Barthels, M. (Ed.) (2013). *Das Gerinnungskompendium* (2., vollst. überarb. und erw. Aufl. ed.). Stuttgart [u.a.]: Thieme.
- Betterman, K. L., & Harvey, N. L. (2014). Decoys and cardiovascular development: CXCR7 and regulation of adrenomedullin signaling. *Dev Cell*, 30(5), 490-491. doi:10.1016/j.devcel.2014.08.021
- Bolling, D. R., & Murphy, E. A. (1978). The estimation of blood platelet survival. VI. Evaluation of the graphical method. *Johns Hopkins Med J*, 143(2), 25-31.
- Borst, O., Munzer, P., Gatidis, S., Schmidt, E. M., Schonberger, T., Schmid, E., . . . Gawaz, M. (2012). The inflammatory chemokine CXC motif ligand 16 triggers platelet activation and adhesion via CXC motif receptor 6-dependent phosphatidylinositide 3-kinase/Akt signaling. *Circ Res*, 111(10), 1297-1307. doi:10.1161/circresaha.112.276444
- Borst, O., Ochmann, C., Schönberger, T., Jacoby, C., Stellos, K., Seizer, P., . . . Gawaz, M. (2011). *Methods Employed for Induction and Analysis of Experimental Myocardial Infarction in Mice* (Vol. 28).

- Brandt, E., Ludwig, A., Petersen, F., & Flad, H.-D. (2000). Platelet-derived CXC chemokines: old players in new games. *Immunological Reviews*, 177(1), 204-216. doi:doi:10.1034/j.1600-065X.2000.17705.x
- C Furie, B. (1997). *Leukocyte Crosstalk at the Vascular Wall* (Vol. 78).
- Cameron, H. A., Phillips, R., Ibbotson, R. M., & Carson, P. H. (1983). Platelet size in myocardial infarction. *British medical journal (Clinical research ed.)*, 287(6390), 449-451.
- Carbone, F., Nencioni, A., Mach, F., Vuilleumier, N., & Montecucco, F. (2013). Pathophysiological role of neutrophils in acute myocardial infarction. *Thromb Haemost*, 110(09), 501-514. doi:10.1160/TH13-03-0211
- Cerletti, C., Tamburrelli, C., Izzi, B., Gianfagna, F., & de Gaetano, G. (2012). Platelet-leukocyte interactions in thrombosis. *Thromb Res*, 129(3), 263-266. doi:10.1016/j.thromres.2011.10.010
- Chang, J., Nair, V., Luk, A., & Butany, J. (2013). Pathology of myocardial infarction. *Diagnostic Histopathology*, 19(1), 7-12. doi:10.1016/j.mpdhp.2012.11.001
- Chatterjee, M., & Geisler, T. (2016). Inflammatory Contribution of Platelets Revisited: New Players in the Arena of Inflammation. *Semin Thromb Hemost*, 42(3), 205-214. doi:10.1055/s-0035-1570081
- Chatterjee, M., Rath, D., & Gawaz, M. (2015). Role of chemokine receptors CXCR4 and CXCR7 for platelet function. *Biochem Soc Trans*, 43(4), 720-726. doi:10.1042/BST20150113
- Chatterjee, M., Seizer, P., Borst, O., Schonberger, T., Mack, A., Geisler, T., . . . Gawaz, M. (2014). SDF-1alpha induces differential trafficking of CXCR4-CXCR7 involving cyclophilin A, CXCR7 ubiquitination and promotes platelet survival. *FASEB J*, 28(7), 2864-2878. doi:10.1096/fj.14-249730
- Chatterjee, M., von Ungern-Sternberg, S. N., Seizer, P., Schlegel, F., Buttcher, M., Sindhu, N. A., . . . Gawaz, M. (2015). Platelet-derived CXCL12 regulates monocyte function, survival, differentiation into macrophages and foam cells through differential involvement of CXCR4-CXCR7. *Cell Death Dis*, 6, e1989. doi:10.1038/cddis.2015.233
- Chilton, R. J. (2004). Pathophysiology of Coronary Heart Disease: A Brief Review. *The Journal of the American Osteopathic Association*, 104(9_suppl), 5S-8S.
- Clemetson, K. J., Clemetson, J. M., Proudfoot, A. E., Power, C. A., Baggolini, M., & Wells, T. N. (2000). Functional expression of CCR1, CCR3, CCR4, and CXCR4 chemokine receptors on human platelets. *Blood*, 96(13), 4046-4054.
- Cohn, J. N., Ferrari, R., & Sharpe, N. (2000). Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol*, 35(3), 569-582.
- Collado, A., Marques, P., Escudero, P., Rius, C., Domingo, E., Martinez-Hervas, S., . . . Sanz, M. J. (2018). Functional role of endothelial CXCL16/CXCR6-platelet-leucocyte axis in angiotensin II-associated metabolic disorders. *Cardiovasc Res*, 114(13), 1764-1775. doi:10.1093/cvr/cvy135
- Collinson, P. O. (1998). Troponin T or troponin I or CK-MB (or none?). *Eur Heart J*, 19 Suppl N, N16-24.
- Communal, C., Sumandea, M., de Tombe, P., Narula, J., Solaro, R. J., & Hajjar, R. J. (2002). Functional consequences of caspase activation in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(9), 6252-6256. doi:10.1073/pnas.092022999

- Cordero-Reyes, A. M., Youker, K. A., & Torre-Amione, G. (2013). The role of B-cells in heart failure. *Methodist DeBakey cardiovascular journal*, 9(1), 15-19.
- Curaj, A., Simsekylilmaz, S., Staudt, M., & Liehn, E. (2015). Minimal invasive surgical procedure of inducing myocardial infarction in mice. *Journal of visualized experiments : JoVE*(99), e52197-e52197. doi:10.3791/52197
- Dai, X., Tan, Y., Cai, S., Xiong, X., Wang, L., Ye, Q., . . . Cai, L. (2011). The role of CXCR7 on the adhesion, proliferation and angiogenesis of endothelial progenitor cells. *J Cell Mol Med*, 15(6), 1299-1309. doi:10.1111/j.1582-4934.2011.01301.x
- Demetrius, L. (2005). Of mice and men. When it comes to studying ageing and the means to slow it down, mice are not just small humans. *EMBO reports*, 6 Spec No(Suppl 1), S39-S44. doi:10.1038/sj.embo.7400422
- Dewald, O., Ren, G., Duerr, G. D., Zoerlein, M., Klemm, C., Gersch, C., . . . Frangogiannis, N. G. (2004). Of mice and dogs: species-specific differences in the inflammatory response following myocardial infarction. *Am J Pathol*, 164(2), 665-677. doi:10.1016/s0002-9440(10)63154-9
- Di Paolo, N. C., & Shayakhmetov, D. M. (2016). Interleukin 1 α and the inflammatory process. *Nature immunology*, 17(8), 906-913. doi:10.1038/ni.3503
- Doetschman, T. (1999). Interpretation of phenotype in genetically engineered mice. *Lab Anim Sci*, 49(2), 137-143.
- Ed Rainger, G., Chimen, M., Harrison, M. J., Yates, C. M., Harrison, P., Watson, S. P., . . . Nash, G. B. (2015). The role of platelets in the recruitment of leukocytes during vascular disease. *Platelets*, 26(6), 507-520. doi:10.3109/09537104.2015.1064881
- Edston, E., Grontoft, L., & Johnsson, J. (2002). TUNEL: a useful screening method in sudden cardiac death. *Int J Legal Med*, 116(1), 22-26.
- Engler, R. L., Dahlgren, M. D., Morris, D. D., Peterson, M. A., & Schmid-Schonbein, G. W. (1986). Role of leukocytes in response to acute myocardial ischemia and reflow in dogs. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 251(2), H314-H323. doi:10.1152/ajpheart.1986.251.2.H314
- Esencay, M., Sarfraz, Y., & Zagzag, D. (2013). CXCR7 is induced by hypoxia and mediates glioma cell migration towards SDF-1alpha. *BMC Cancer*, 13, 347. doi:10.1186/1471-2407-13-347
- European Society of Cardiology (ESC), D. G. f. K. D. (2017). Duale antithrombozytäre Therapie (DAPT) bei Koronarer Herzkrankheit. *ESC Pocket Guidelines*.
- Fan, H., Wang, W., Yan, J., Xiao, L., & Yang, L. (2018). Prognostic significance of CXCR7 in cancer patients: a meta-analysis. *Cancer Cell International*, 18(1), 212. doi:10.1186/s12935-018-0702-0
- Fang, L., Moore, X. L., Dart, A. M., & Wang, L. M. (2015). Systemic inflammatory response following acute myocardial infarction. *J Geriatr Cardiol*, 12(3), 305-312. doi:10.11909/j.issn.1671-5411.2015.03.020
- Finnerty, C. C., Mabvuure, N. T., Ali, A., Kozar, R. A., & Herndon, D. N. (2013). The surgically induced stress response. *JPEN. Journal of parenteral and enteral nutrition*, 37(5 Suppl), 21S-29S. doi:10.1177/0148607113496117
- Firth, B. G., & Dunnmon, P. M. (1990). Left ventricular dilatation and failure post-myocardial infarction: pathophysiology and possible pharmacologic interventions. *Cardiovasc Drugs Ther*, 4(5), 1363-1374.
- Forman, M. B., Puett, D. W., & Virmani, R. (1989). Endothelial and myocardial injury during ischemia and reperfusion: Pathogenesis and therapeutic implications.

- Journal of the American College of Cardiology*, 13(2), 450-459.
doi:10.1016/0735-1097(89)90526-3
- Frangogiannis, N. G. (2006). The mechanistic basis of infarct healing. *Antioxid Redox Signal*, 8(11-12), 1907-1939. doi:10.1089/ars.2006.8.1907
- Frangogiannis, N. G. (2012). Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. *Circ Res*, 110(1), 159-173. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.243162
- Freifeld, A. G., Schuster, E. H., & Bulkley, B. H. (1983). Nontransmural versus transmural myocardial infarction: A morphologic study. *The American Journal of Medicine*, 75(3), 423-432. doi:10.1016/0002-9343(83)90343-1
- Frodermann, V., & Nahrendorf, M. (2017). Neutrophil-macrophage cross-talk in acute myocardial infarction. *Eur Heart J*, 38(3), 198-200. doi:10.1093/eurheartj/ehw085
- Fukuda, T., Asou, E., Nogi, K., & Goto, K. (2017). Evaluation of mouse red blood cell and platelet counting with an automated hematology analyzer. *The Journal of veterinary medical science*, 79(10), 1707-1711. doi:10.1292/jvms.17-0387
- Furman, M. I., Barnard, M. R., Krueger, L. A., Fox, M. L., Shilale, E. A., Lessard, D. M., . . . Michelson, A. D. (2001). Circulating monocyte-platelet aggregates are an early marker of acute myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*, 38(4), 1002-1006. doi:10.1016/s0735-1097(01)01485-1
- Gabriel, A. S., Martinsson, A., Wretlind, B., & Ahnve, S. (2004). IL-6 levels in acute and post myocardial infarction: their relation to CRP levels, infarction size, left ventricular systolic function, and heart failure. *Eur J Intern Med*, 15(8), 523-528. doi:10.1016/j.ejim.2004.07.013
- Gale, A. J. (2011). Current understanding of hemostasis. *Toxicologic pathology*, 39(1), 273-280. doi:10.1177/0192623310389474
- Gao, X.-M., Moore, X.-L., Liu, Y., Wang, X.-Y., Han, L.-P., Su, Y., . . . Du, X.-J. (2016). Splenic release of platelets contributes to increased circulating platelet size and inflammation after myocardial infarction. *Clinical Science*, 130(13), 1089-1104. doi:10.1042/cs20160234
- Gawaz, M. (2001). *Blood platelets : physiology, pathophysiology, membrane receptors, antiplatelet principles, and therapy for atherothrombotic diseases*. Stuttgart: Thieme.
- Gawaz, M. (2004). Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium. *Cardiovascular Research*, 61(3), 498-511. doi:10.1016/j.cardiores.2003.11.036
- Gear, A. R., & Camerini, D. (2003). Platelet chemokines and chemokine receptors: linking hemostasis, inflammation, and host defense. *Microcirculation*, 10(3-4), 335-350. doi:10.1038/sj.mn.7800198
- Gear, A. R., Suttitanamongkol, S., Viisoreanu, D., Polanowska-Grabowska, R. K., Raha, S., & Camerini, D. (2001). Adenosine diphosphate strongly potentiates the ability of the chemokines MDC, TARC, and SDF-1 to stimulate platelet function. *Blood*, 97(4), 937-945.
- Gelfand, E. V., & Cannon, C. P. (2007). Myocardial infarction: contemporary management strategies. *J Intern Med*, 262(1), 59-77. doi:10.1111/j.1365-2796.2007.01790.x
- Getz, G. S., & Reardon, C. A. (2016). ApoE knockout and knockin mice: the history of their contribution to the understanding of atherogenesis. *Journal of lipid research*, 57(5), 758-766. doi:10.1194/jlr.R067249

- Giles, H., Smith, R. E. A., & Martin, J. F. (1994). Platelet glycoprotein IIb-IIIa and size are increased in acute myocardial infarction. *European Journal of Clinical Investigation*, 24(1), 69-72. doi:doi:10.1111/j.1365-2362.1994.tb02062.x
- Gilet, J., Chang, Y., Chenivesse, C., Legendre, B., Vorng, H., Duez, C., . . . Tsicopoulos, A. (2009). Role of CCL17 in the Generation of Cutaneous Inflammatory Reactions in Hu-PBMC-SCID Mice Grafted with Human Skin. *Journal of Investigative Dermatology*, 129(4), 879-890. doi:10.1038/jid.2008.333
- Golebiewska, E. M., & Poole, A. W. (2015). Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. *Blood Rev*, 29(3), 153-162. doi:10.1016/j.blre.2014.10.003
- Gulati, I., Kumar, H., Sheth, J., & Dey, I. (2017). Diagnostic implication of mean platelet volume in thrombocytopenia. *Medical Journal of Dr. D.Y. Patil University*, 10(4), 370-375. doi:10.4103/mjdrdypu.mjdrdypu_306_16
- Guyon, A. (2014). CXCL12 chemokine and its receptors as major players in the interactions between immune and nervous systems. *Frontiers in cellular neuroscience*, 8, 65-65. doi:10.3389/fncel.2014.00065
- GV-SOLAS, A. f. T. u. T., Dr. André Dülsner, D. R. H., Dr. Christine Krüger, , Dr. Marina Pils, D. K. S., Dr. Barthel Schmelting,, Dr. Matthias Schmidt, H. W. G.-S., & (TVT), D. T. J. (2017). Empfehlung zur Substanzapplikation bei Versuchstieren. (Fachinformation Injektionsvolumina).
- Hansen, P. R. (1998). Inflammatory alterations in the myocardial microcirculation. *J Mol Cell Cardiol*, 30(12), 2555-2559. doi:10.1006/jmcc.1998.0827
- Hao, H., Hu, S., Chen, H., Bu, D., Zhu, L., Xu, C., . . . Wang, M. (2017). Loss of Endothelial CXCR7 Impairs Vascular Homeostasis and Cardiac Remodeling After Myocardial Infarction: Implications for Cardiovascular Drug Discovery. *Circulation*, 135(13), 1253-1264. doi:10.1161/circulationaha.116.023027
- Harrison, P., & Cramer, E. M. (1993). Platelet alpha-granules. *Blood Rev*, 7(1), 52-62.
- Hausernloy, D. J., & Yellon, D. M. (2013). Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *The Journal of clinical investigation*, 123(1), 92-100. doi:10.1172/JCI62874
- Heusch, G., Schulz, R., Baumgart, D., Haude, M., & Erbel, R. (2001). Coronary microembolization. *Prog Cardiovasc Dis*, 44(3), 217-230. doi:10.1053/pcad.2001.26968
- Hofmann, U., & Frantz, S. (2016). Role of T-cells in myocardial infarction. *Eur Heart J*, 37(11), 873-879. doi:10.1093/eurheartj/ehv639
- Holmes, J. W., Borg, T. K., & Covell, J. W. (2005). Structure and Mechanics of Healing Myocardial Infarcts. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 7(1), 223-253. doi:10.1146/annurev.bioeng.7.060804.100453
- Horckmans, M., Ring, L., Duchene, J., Santovito, D., Schloss, M. J., Drechsler, M., . . . Steffens, S. (2017). Neutrophils orchestrate post-myocardial infarction healing by polarizing macrophages towards a reparative phenotype. *Eur Heart J*, 38(3), 187-197. doi:10.1093/eurheartj/ehw002
- Irving, P. M., Macey, M. G., Shah, U., Webb, L., Langmead, L., & Rampton, D. S. (2004). Formation of platelet-leukocyte aggregates in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, 10(4), 361-372.
- Italiano, J., & Hartwig, J. (2015). Production and Destruction of Platelets. doi:10.5772/60678

- Jackson, S. P. (2007). The growing complexity of platelet aggregation. *Blood*, 109(12), 5087-5095. doi:10.1182/blood-2006-12-027698
- James Wayne Warnica, M., FRCPC , Professor Emeritus of Cardiac Sciences and Medicine, The University of Calgary. (2019, 16.01.2019). Akuter Myokardinfarkt (MI) - Herz-Kreislauf-Krankheiten - MSD Manual Profi-Ausgabe. Retrieved from <https://www.msmanuals.com/de/profi/herz-kreislauf-krankheiten/koronare-herzkrankheit/akuter-myokardinfarkt-mi>
- Jennings, R. B., & Ganote, C. E. (1974). Structural changes in myocardium during acute ischemia. *Circ Res*, 35 Suppl 3, 156-172.
- Johns, T. N. P., & Olson, B. J. (1954). Experimental myocardial infarction. I. A method of coronary occlusion in small animals. *Annals of surgery*, 140(5), 675-682.
- Jorbenadze, R., Schleicher, E., Bigalke, B., Stellos, K., & Gawaz, M. (2014). Expression of platelet-bound stromal-cell derived factor-1 (SDF-1) and number of CD34(+) progenitor cells in patients with congestive heart failure. *Platelets*, 25(6), 409-415. doi:10.3109/09537104.2013.829913
- Kakouros, N., & V Cokkinos, D. (2010). *Right ventricular myocardial infarction: Pathophysiology, diagnosis, and management* (Vol. 86).
- Kapitel 10.4 Kaspers, G. (2010). *Physiologie der Haustiere* (Vol. 3. Auflage): Wolfgang von Engelhardt.
- Kemp, M., Donovan, J., Higham, H., & Hooper, J. (2004). Biochemical markers of myocardial injury. *British Journal of Anaesthesia*, 93(1), 63-73. doi:10.1093/bja/aei148
- Kikkert, W. J., & Damman, P. (2018). Optimal duration of dual antiplatelet therapy for coronary artery disease. *Netherlands heart journal : monthly journal of the Netherlands Society of Cardiology and the Netherlands Heart Foundation*, 26(6), 321-333. doi:10.1007/s12471-018-1113-5
- Kingma, J. G., Jr., Plante, S., & Bogaty, P. (2000). Platelet GPIIb/IIIa receptor blockade reduces infarct size in a canine model of ischemia-reperfusion. *J Am Coll Cardiol*, 36(7), 2317-2324.
- Klein, K. R., Karpinich, N. O., Espenschied, S. T., Willcockson, H. H., Dunworth, W. P., Hoopes, S. L., . . . Caron, K. M. (2014). Decoy receptor CXCR7 modulates adrenomedullin-mediated cardiac and lymphatic vascular development. *Dev Cell*, 30(5), 528-540. doi:10.1016/j.devcel.2014.07.012
- Klinkhardt, U., & Harder, S. (2005). Flow cytometric measurement of platelet-leukocyte aggregates: a possible target to monitor platelet function? *Semin Thromb Hemost*, 31(4), 400-403. doi:10.1055/s-2005-916673
- Koltsova, E. K., & Ley, K. (2010). The mysterious ways of the chemokine CXCL5. *Immunity*, 33(1), 7-9. doi:10.1016/j.immuni.2010.07.012
- Konrad, F. M., Meichssner, N., Bury, A., Ngamsri, K. C., & Reutershan, J. (2017). Inhibition of SDF-1 receptors CXCR4 and CXCR7 attenuates acute pulmonary inflammation via the adenosine A2B-receptor on blood cells. *Cell Death Dis*, 8(5), e2832. doi:10.1038/cddis.2016.482
- Kunkel, S. L. L., Benedict Robert; Liddicoat, J.; Jolly, Stanley R.; Abrams, Gerald D.; Schumacher, William A. (1985). Platelet depletion in experimental myocardial infarction. *Basic Research in Cardiology* 80(3): 269-279. doi:10.1007/BF01907903

- La Rosée, K., & Deutsch, H. J. (2000). Echokardiographie. In E. Erdmann (Ed.), *Klinische Kardiologie: Krankheiten des Herzens, des Kreislaufs und der herznahen Gefäße* (pp. 81-121). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Langford, E. J., Wainwright, R. J., & Martin, J. F. (1996). Platelet activation in acute myocardial infarction and unstable angina is inhibited by nitric oxide donors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 16(1), 51-55.
- Lavie, C. J., & Gersh, B. J. (1990). Acute Myocardial Infarction: Initial Manifestations, Management, and Prognosis. *Mayo Clinic Proceedings*, 65(4), 531-548. doi:10.1016/S0025-6196(12)60954-9
- Lavine, K. J., Epelman, S., Uchida, K., Weber, K. J., Nichols, C. G., Schilling, J. D., . . . Mann, D. L. (2014). Distinct macrophage lineages contribute to disparate patterns of cardiac recovery and remodeling in the neonatal and adult heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(45), 16029-16034. doi:10.1073/pnas.1406508111
- Levoye, A., Balabanian, K., Baleux, F., Bachelerie, F., & Lagane, B. (2009). CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling. *Blood*, 113(24), 6085-6093. doi:10.1182/blood-2008-12-196618
- Li, W., Nieman, M., & Sen Gupta, A. (2016). Ferric Chloride-induced Murine Thrombosis Models. *J Vis Exp*(115). doi:10.3791/54479
- Li, Y., Hu, S., Ma, G., Yao, Y., Yan, G., Chen, J., . . . Zhang, Z. (2013). Acute myocardial infarction induced functional cardiomyocytes to re-enter the cell cycle. *American journal of translational research*, 5(3), 327-335.
- Li, Z., Yang, F., Dunn, S., Gross, A. K., & Smyth, S. S. (2011). Platelets as immune mediators: their role in host defense responses and sepsis. *Thromb Res*, 127(3), 184-188. doi:10.1016/j.thromres.2010.10.010
- Liu, Y., Gao, X. M., Fang, L., Jennings, N. L., Su, Y., Q, X., . . . Du, X. J. (2011). Novel role of platelets in mediating inflammatory responses and ventricular rupture or remodeling following myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 31(4), 834-841. doi:10.1161/ATVBAHA.110.220467
- Lord, M. S., Cheng, B., Farrugia, B. L., McCarthy, S., & Whitelock, J. M. (2017). Platelet Factor 4 Binds to Vascular Proteoglycans and Controls Both Growth Factor Activities and Platelet Activation. *J Biol Chem*, 292(10), 4054-4063. doi:10.1074/jbc.M116.760660
- Lüllmann-Rauch, R., & Paulsen, F. (2012). *Taschenlehrbuch Histologie*: Thieme.
- Ma, Y., Mouton, A. J., & Lindsey, M. L. (2018). Cardiac macrophage biology in the steady-state heart, the aging heart, and following myocardial infarction. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*, 191, 15-28. doi:10.1016/j.trsl.2017.10.001
- Maini, A., Foote, J. R., Hayhoe, R., Patel, A. A., O'Brien, A., Avraham-Davidi, I., & Yona, S. (2018). Monocyte and Neutrophil Isolation, Migration, and Phagocytosis Assays. *Current Protocols in Immunology*, 122(1), e53. doi:doi:10.1002/cpim.53
- Malliaras, K., Zhang, Y., Seinfeld, J., Galang, G., Tseliou, E., Cheng, K., . . . Marbán, E. (2013). Cardiomyocyte proliferation and progenitor cell recruitment underlie therapeutic regeneration after myocardial infarction in the adult mouse heart. *EMBO molecular medicine*, 5(2), 191-209. doi:10.1002/emmm.201201737
- Marquardt, L., Ruf, A., Mansmann, U., Winter, R., Schuler, M., Buggle, F., . . . Grau, A. J. (2002). Course of platelet activation markers after ischemic stroke. *Stroke*, 33(11), 2570-2574.

- Massberg, Gawaz, Grüner, Schulte, Konrad, Zohlnhöfer, . . . Nieswandt. (2003). A Crucial Role of Glycoprotein VI for Platelet Recruitment to the Injured Arterial Wall In Vivo. *The Journal of Experimental Medicine*, 197(1), 41-49. doi:10.1084/jem.20020945
- 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-selectin. *Blood*, 92(2), 507-515.
- Massberg, S., Vogt, F., Dickfeld, T., Brand, K., Page, S., & Gawaz, M. (2003). Activated platelets trigger an inflammatory response and enhance migration of aortic smooth muscle cells. *Thromb Res*, 110(4), 187-194.
- Maxwell, S. R., & Lip, G. Y. (1997). Reperfusion injury: a review of the pathophysiology, clinical manifestations and therapeutic options. *Int J Cardiol*, 58(2), 95-117.
- Mei, J., Liu, Y., Dai, N., Favara, M., Greene, T., Jeyaseelan, S., . . . Worthen, G. S. (2010). CXCL5 regulates chemokine scavenging and pulmonary host defense to bacterial infection. *Immunity*, 33(1), 106-117. doi:10.1016/j.immuni.2010.07.009
- Melchionna, R., Di Carlo, A., De Mori, R., Cappuzzello, C., Barberi, L., Musaro, A., . . . Germani, A. (2010). Induction of myogenic differentiation by SDF-1 via CXCR4 and CXCR7 receptors. *Muscle Nerve*, 41(6), 828-835. doi:10.1002/mus.21611
- Melo, R. C. C., Ferro, K. P. V., Duarte, A., & Olalla Saad, S. T. (2018). CXCR7 participates in CXCL12-mediated migration and homing of leukemic and normal hematopoietic cells. *Stem Cell Res Ther*, 9(1), 34. doi:10.1186/s13287-017-0765-1
- Mollmann, H., Nef, H. M., Kostin, S., von Kalle, C., Pilz, I., Weber, M., . . . Elsasser, A. (2006). Bone marrow-derived cells contribute to infarct remodelling. *Cardiovasc Res*, 71(4), 661-671. doi:10.1016/j.cardiores.2006.06.013
- Moore, A., Goerne, H., Rajiah, P., Tanabe, Y., Saboo, S., & Abbara, S. (2019). Acute Myocardial Infarct. *Radiol Clin North Am*, 57(1), 45-55. doi:10.1016/j.rcl.2018.08.006
- Moran, A. E., Oliver, J. T., Mirzaie, M., Forouzanfar, M. H., Chilov, M., Anderson, L., . . . Mensah, G. A. (2012). Assessing the Global Burden of Ischemic Heart Disease: Part 1: Methods for a Systematic Review of the Global Epidemiology of Ischemic Heart Disease in 1990 and 2010. *Global heart*, 7(4), 315-329. doi:10.1016/j.gheart.2012.10.004
- Müller-Berghaus, G., & Pötzsch, B. (2013). *Hämostaseologie: Molekulare und zelluläre Mechanismen, Pathophysiologie und Klinik*: Springer Berlin Heidelberg.
- Murray, K. A., & Brown, M. J. (2006). Phenotyping of Genetically Engineered Mice: Humane, Ethical, Environmental, and Husbandry Issues. *ILAR Journal*, 47(2), 118-123. doi:10.1093/ilar.47.2.118
- Nabil El-Maraghi, M., and Edward Genton, M.D. (1980). The Relevance of Platelet and Fibrin Thromboembolism of the Coronary Microcirculation, with Special Reference to Sudden Cardiac Death. *Circulation* 62, No. 5, 1980., No. 5.
- Nahrendorf, M., & Swirski, F. K. (2013). Monocyte and macrophage heterogeneity in the heart. *Circulation Research*, 112(12), 1624-1633. doi:10.1161/CIRCRESAHA.113.300890
- Naumann, U., Cameroni, E., Pruenster, M., Mahabaleshwar, H., Raz, E., Zerwes, H.-G., . . . Thelen, M. (2010). CXCR7 Functions as a Scavenger for CXCL12 and CXCL11. *PLoS One*, 5(2), e9175. doi:10.1371/journal.pone.0009175

- Ngamsri, K. C., Muller, A., Bosmuller, H., Gamper-Tsigaras, J., Reutershan, J., & Konrad, F. M. (2017). The Pivotal Role of CXCR7 in Stabilization of the Pulmonary Epithelial Barrier in Acute Pulmonary Inflammation. *J Immunol*, 198(6), 2403-2413. doi:10.4049/jimmunol.1601682
- Nieswandt, B., & Watson, S. P. (2003). Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood*, 102(2), 449-461. doi:10.1182/blood-2002-12-3882
- Nikolaos, G. F. (2006). Targeting the Inflammatory Response in Healing Myocardial Infarcts. *Current Medicinal Chemistry*, 13(16), 1877-1893. doi:10.2174/09298670677585086
- Nkambule, B. B., Davison, G., & Ipp, H. (2015). Platelet leukocyte aggregates and markers of platelet aggregation, immune activation and disease progression in HIV infected treatment naive asymptomatic individuals. *J Thromb Thrombolysis*, 40(4), 458-467. doi:10.1007/s11239-015-1212-8
- O'Sullivan, K. E., Breen, E. P., Gallagher, H. C., Buggy, D. J., & Hurley, J. P. (2016). Understanding STAT3 signaling in cardiac ischemia. *Basic Res Cardiol*, 111(3), 27. doi:10.1007/s00395-016-0543-8
- Omura, T., Yoshiyama, M., Ishikura, F., Kobayashi, H., Takeuchi, K., Beppu, S., & Yoshikawa, J. (2001). Myocardial ischemia activates the JAK-STAT pathway through angiotensin II signaling in vivo myocardium of rats. *J Mol Cell Cardiol*, 33(2), 307-316. doi:10.1006/jmcc.2000.1303
- Ondrus, T., Kanovsky, J., Novotny, T., Andrsova, I., Spinar, J., & Kala, P. (2013). Right ventricular myocardial infarction: From pathophysiology to prognosis. *Experimental and clinical cardiology*, 18(1), 27-30.
- Ong, S.-B., Hernández-Reséndiz, S., Crespo-Avilan, G. E., Mukhametshina, R. T., Kwek, X.-Y., Cabrera-Fuentes, H. A., & Hausenloy, D. J. (2018). Inflammation following acute myocardial infarction: Multiple players, dynamic roles, and novel therapeutic opportunities. *Pharmacology & therapeutics*, 186, 73-87. doi:10.1016/j.pharmthera.2018.01.001
- Ørn, S., Cleland, J. G. F., Romo, M., Kjekshus, J., & Dickstein, K. (2005). Recurrent infarction causes the most deaths following myocardial infarction with left ventricular dysfunction. *The American Journal of Medicine*, 118(7), 752-758. doi:10.1016/j.amjmed.2005.02.010
- Otsuka, F., Yasuda, S., Noguchi, T., & Ishibashi-Ueda, H. (2016). Pathology of coronary atherosclerosis and thrombosis. *Cardiovascular diagnosis and therapy*, 6(4), 396-408. doi:10.21037/cdt.2016.06.01
- Page, C., & Pitchford, S. (2013). Neutrophil and platelet complexes and their relevance to neutrophil recruitment and activation. *International Immunopharmacology*, 17(4), 1176-1184. doi:10.1016/j.intimp.2013.06.004
- Palta, S., Saroa, R., & Palta, A. (2014). Overview of the coagulation system. *Indian journal of anaesthesia*, 58(5), 515-523. doi:10.4103/0019-5049.144643
- Pasotti, M., Prati, F., & Arbustini, E. (2006). The pathology of myocardial infarction in the pre- and post-interventional era. *Heart (British Cardiac Society)*, 92(11), 1552-1556. doi:10.1136/hrt.2005.086934
- Piedrahita, J. A., Zhang, S. H., Hagaman, J. R., Oliver, P. M., & Maeda, N. (1992). Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(10), 4471-4475.

- Piper, H. M., Meuter, K., & Schäfer, C. (2003). Cellular mechanisms of ischemia-reperfusion injury. *The Annals of Thoracic Surgery*, 75(2), S644-S648. doi:10.1016/S0003-4975(02)04686-6
- Plump, A. S., Smith, J. D., Hayek, T., Aalto-Setälä, K., Walsh, A., Verstuyft, J. G., . . . Breslow, J. L. (1992). Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell*, 71(2), 343-353. doi:10.1016/0092-8674(92)90362-G
- Polanowska-Grabowska, R., Gibbins, J. M., & Gear, A. R. (2003). Platelet adhesion to collagen and collagen-related peptide under flow: roles of the [alpha]2[beta]1 integrin, GPVI, and Src tyrosine kinases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23(10), 1934-1940. doi:10.1161/01.ATV.0000086937.46974.70
- Qian, T., Liu, Y., Dong, Y., Zhang, L., Dong, Y., Sun, Y., & Sun, D. (2018). CXCR7 regulates breast tumor metastasis and angiogenesis in vivo and in vitro. *Molecular medicine reports*, 17(3), 3633-3639. doi:10.3892/mmr.2017.8286
- Rath, D., Chatterjee, M., Bongartz, A., Muller, K., Droppa, M., Stimpfle, F., . . . Geisler, T. (2016). Platelet surface expression of SDF-1 is associated with clinical outcomes in the patients with cardiovascular disease. *Platelets*, 1-6. doi:10.1080/09537104.2016.1203399
- Rath, D., Chatterjee, M., Borst, O., Muller, K., Langer, H., Mack, A. F., . . . Geisler, T. (2015). Platelet surface expression of stromal cell-derived factor-1 receptors CXCR4 and CXCR7 is associated with clinical outcomes in patients with coronary artery disease. *J Thromb Haemost*, 13(5), 719-728. doi:10.1111/jth.12870
- Rath, D., Chatterjee, M., Borst, O., Muller, K., Stellos, K., Mack, A. F., . . . Geisler, T. (2014). Expression of stromal cell-derived factor-1 receptors CXCR4 and CXCR7 on circulating platelets of patients with acute coronary syndrome and association with left ventricular functional recovery. *Eur Heart J*, 35(6), 386-394. doi:10.1093/euroheartj/eht448
- Rath, D., Chatterjee, M., Meyer, L., Tekath, N., Olma, C., Krumm, P., . . . Geisler, T. (2018). Relative survival potential of platelets is associated with platelet CXCR4/CXCR7 surface exposure and functional recovery following STEMI. *Atherosclerosis*, 278, 269-277. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2018.10.008
- Rath, D., & Gawaz, M. (2016). Dauer der dualen antithrombozytären Therapie bei koronaren Risikopatienten. *Kardio up*, 12(04), 359-369. doi:10.1055/s-0042-120218
- Rendu, F., & Brohard-Bohn, B. (2001). The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets*, 12(5), 261-273. doi:10.1080/09537100120068170
- Ribatti, D., & Crivellato, E. (2007). Giulio Bizzozero and the discovery of platelets. *Leuk Res*, 31(10), 1339-1341. doi:10.1016/j.leukres.2007.02.008
- Ried, W. (1952). Formazane und Tetrazoliumsalze, ihre Synthesen und ihre Bedeutung als Reduktionsindikatoren und Vitalfarbstoffe. *Angewandte Chemie*, 64(14), 391-396. doi:doi:10.1002/ange.19520641403
- Ritschel, V. N., Seljeflot, I., Arnesen, H., Halvorsen, S., Weiss, T., Ertsland, J., & Andersen, G. Ø. (2013). IL-6 signalling in patients with acute ST-elevation myocardial infarction. *Results in immunology*, 4, 8-13. doi:10.1016/j.rinim.2013.11.002

- Roest, M., Reininger, A., Zwaginga, J. J., King, M. R., Heemskerk, J. W., & Biorheology Subcommittee of the, S. S. C. o. t. I. (2011). Flow chamber-based assays to measure thrombus formation in vitro: requirements for standardization. *J Thromb Haemost*, 9(11), 2322-2324. doi:10.1111/j.1538-7836.2011.04492.x
- Ruggeri, Z. M. (2002). Platelets in atherothrombosis. *Nat Med*, 8(11), 1227-1234. doi:10.1038/nm1102-1227
- Russell, W. M. S., & Burch, R. L. (1959). The principles of humane experimental technique.
- Salto-Tellez, M., Yung Lim, S., El-Oakley, R. M., Tang, T. P., ZA, A. L., & Lim, S. K. (2004). Myocardial infarction in the C57BL/6J mouse: a quantifiable and highly reproducible experimental model. *Cardiovasc Pathol*, 13(2), 91-97. doi:10.1016/s1054-8807(03)00129-7
- Sanjabi, S., Zenewicz, L. A., Kamanaka, M., & Flavell, R. A. (2009). Anti-inflammatory and pro-inflammatory roles of TGF-beta, IL-10, and IL-22 in immunity and autoimmunity. *Current opinion in pharmacology*, 9(4), 447-453. doi:10.1016/j.coph.2009.04.008
- Scholzen, T., & Gerdes, J. (2000). The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*, 182(3), 311-322. doi:10.1002/(sici)1097-4652(200003)182:3<311::aid-jcp1>3.0.co;2-9
- Sedlmayr, P., A., B., Wilders-Trusching, M., Tirian, A., & Dohr, G. (1995). Platelets Contain Interleukin-1 Alpha and Beta which are Detectable on the Cell Surface After Activation. *Scandinavian Journal of Immunology*, 42(2), 209-214. doi:doi:10.1111/j.1365-3083.1995.tb03647.x
- Shinde, A. V., & Frangogiannis, N. G. (2014). Fibroblasts in myocardial infarction: a role in inflammation and repair. *J Mol Cell Cardiol*, 70, 74-82. doi:10.1016/j.yjmcc.2013.11.015
- Sierro, F., Biben, C., Martinez-Munoz, L., Mellado, M., Ransohoff, R. M., Li, M., . . . Mackay, F. (2007). Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(37), 14759-14764. doi:10.1073/pnas.0702229104
- Smethurst, P. A., Onley, D. J., Jarvis, G. E., O'Connor, M. N., Knight, C. G., Herr, A. B., . . . Farndale, R. W. (2007). Structural basis for the platelet-collagen interaction: the smallest motif within collagen that recognizes and activates platelet Glycoprotein VI contains two glycine-proline-hydroxyproline triplets. *J Biol Chem*, 282(2), 1296-1304. doi:10.1074/jbc.M606479200
- Sun, Q., Wang, K.-K., Pan, M., Zhou, J.-P., Qiu, X.-T., Wang, Z.-Y., . . . Bai, Y.-P. (2018). A minimally invasive approach to induce myocardial infarction in mice without thoracotomy. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 22(11), 5208-5219. doi:doi:10.1111/jcmm.13708
- Sun, X., Cheng, G., Hao, M., Zheng, J., Zhou, X., Zhang, J., . . . Wang, J. (2010). CXCL12 / CXCR4 / CXCR7 chemokine axis and cancer progression. *Cancer Metastasis Rev*, 29(4), 709-722. doi:10.1007/s10555-010-9256-x
- Sutton, M. G., & Sharpe, N. (2000). Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation*, 101(25), 2981-2988.
- Syarifah Aisyah Syed Abd Halim, N. A. G., Zakiah Jubri, Srijit Das. (2018). Induction of Myocardial Infarction in Experimental Animals: A Review. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, Vol-12(11): AE01-AE05 doi:10.7860/JCDR/2018/36997.12221

- SysmexDigitanaAG. (2010). Thrombozytenverteilungskurven: Interpretationen, Möglichkeiten und Grenzen. *Sysmex Xtra*, 11.
- Taghipour, B., Sivarajan Froelicher, E., Goudarzian, A. H., Huak Chan, Y., Sharif Nia, H., Yaghoobzadeh, A., & Akbar Haghdoost, A. (2018). Clinical Manifestation of Acute Myocardial Infarction: Classified by Age and Gender. *Crit Care Nurs J*, 11(1), e68676. doi:10.5812/ccn.68676
- Talman, V., & Ruskoaho, H. (2016). Cardiac fibrosis in myocardial infarction-from repair and remodeling to regeneration. *Cell and tissue research*, 365(3), 563-581. doi:10.1007/s00441-016-2431-9
- Thomas, M. R., & Storey, R. F. (2015). The role of platelets in inflammation. *Thromb Haemost*, 114(3), 449-458. doi:10.1160/th14-12-1067
- Thon, J. N., & Italiano, J. E. (2012). Platelets: production, morphology and ultrastructure. *Handb Exp Pharmacol*(210), 3-22. doi:10.1007/978-3-642-29423-5_1
- Thygesen, K., Alpert, J. S., Jaffe, A. S., Simoons, M. L., Chaitman, B. R., White, H. D., . . . Mendis, S. (2012). Third universal definition of myocardial infarction. *Circulation*, 126(16), 2020-2035. doi:10.1161/CIR.0b013e31826e1058
- Thygesen, K., Alpert, J. S., White, H. D., Joint, E. S. C. A. A. H. A. W. H. F. T. F. f. t. R. o. M. I., Jaffe, A. S., Apple, F. S., . . . Al-Attar, N. (2007). Universal definition of myocardial infarction. *Circulation*, 116(22), 2634-2653. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.187397
- Torossian, F., Anginot, A., Chabanon, A., Clay, D., Guerton, B., Desterke, C., . . . Le Bousse-Kerdiles, M. C. (2014). CXCR7 participates in CXCL12-induced CD34+ cell cycling through beta-arrestin-dependent Akt activation. *Blood*, 123(2), 191-202. doi:10.1182/blood-2013-05-500496
- Triplett, D. A. (2000). Coagulation and Bleeding Disorders: Review and Update. *Clinical Chemistry*, 46(8), 1260-1269.
- Tsujioka, H., Imanishi, T., Ikejima, H., Kuroi, A., Takarada, S., Tanimoto, T., . . . Akasaka, T. (2009). Impact of heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets on myocardial salvage in patients with primary acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 54(2), 130-138. doi:10.1016/j.jacc.2009.04.021
- Ulrich Gerlach, H. W., Wilhelm Wirth, unter Mitarbeit von Jan Heidemann, Torsten Kucharzik, Florian Neuhierl, Jürgen Ohms, Thorsten Pohle (Ed.) (2015). *Innere Medizin für Pflegeberufe* (8., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage ed.). Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- van den Borne, S. W. M., Diez, J., Blankesteijn, W. M., Verjans, J., Hofstra, L., & Narula, J. (2009). Myocardial remodeling after infarction: the role of myofibroblasts. *Nature Reviews Cardiology*, 7, 30. doi:10.1038/nrcardio.2009.199
- van den Bos, E. J., Mees, B. M., de Waard, M. C., de Crom, R., & Duncker, D. J. (2005). A novel model of cryoinjury-induced myocardial infarction in the mouse: a comparison with coronary artery ligation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 289(3), H1291-1300. doi:10.1152/ajpheart.00111.2005
- Van Kruchten, R., Cosemans, J. M., & Heemskerk, J. W. (2012). Measurement of whole blood thrombus formation using parallel-plate flow chambers - a practical guide. *Platelets*, 23(3), 229-242. doi:10.3109/09537104.2011.630848
- Voigt, J. A., Schmidt, J., Riss, R., & Schmitz, M. (2016). Physiologie und Pathophysiologie der Blutgerinnung. 15-24. doi:10.1007/978-3-662-48037-3_2
- von Scheidt, M., Zhao, Y., Kurt, Z., Pan, C., Zeng, L., Yang, X., . . . Lusis, A. J. (2017). Applications and Limitations of Mouse Models for Understanding Human

- Atherosclerosis. *Cell Metabolism*, 25(2), 248-261.
doi:10.1016/j.cmet.2016.11.001
- W. Herem, J. (1974). *Mural platelet microthrombi and major acute lesions of main epicardial arteries in sudden coronary death ** (Vol. 19).
- Wang, C., Chen, W., & Shen, J. (2018). CXCR7 Targeting and Its Major Disease Relevance. *Front Pharmacol*, 9, 641. doi:10.3389/fphar.2018.00641
- Wang, J., Bo, H., Meng, X., Wu, Y., Bao, Y., & Li, Y. (2006). A simple and fast experimental model of myocardial infarction in the mouse. *Texas Heart Institute journal*, 33(3), 290-293.
- Wang, K., Asinger, R. W., & Marriott, H. J. (2003). ST-segment elevation in conditions other than acute myocardial infarction. *N Engl J Med*, 349(22), 2128-2135. doi:10.1056/NEJMra022580
- Weinberger, T., & Schulz, C. (2015). Myocardial infarction: a critical role of macrophages in cardiac remodeling. *Frontiers in physiology*, 6, 107-107. doi:10.3389/fphys.2015.00107
- Weisel, J. W., & Litvinov, R. I. (2013). Mechanisms of fibrin polymerization and clinical implications. *Blood*, 121(10), 1712-1719. doi:10.1182/blood-2012-09-306639
- Westrick, R. J., Winn, M. E., & Eitzman, D. T. (2007). Murine models of vascular thrombosis (Eitzman series). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27(10), 2079-2093. doi:10.1161/ATVBAHA.107.142810
- Wilkins E, W. L., Wickramasinghe K, Bhatnagar P, Leal J, Luengo-Fernandez R, Burns R, Rayner M, Townsend N (2017). European Cardiovascular Disease Statistics 2017. *European Heart Network, Brussels*.
- Wirtz, T. H., Tillmann, S., Strussmann, T., Kraemer, S., Heemskerk, J. W., Grottke, O., . . . Bernhagen, J. (2015a). Platelet-derived MIF: a novel platelet chemokine with distinct recruitment properties. *Atherosclerosis*, 239(1), 1-10. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2014.12.039
- Wirtz, T. H., Tillmann, S., Strussmann, T., Kraemer, S., Heemskerk, J. W. M., Grottke, O., . . . Bernhagen, J. (2015b). Platelet-derived MIF: A novel platelet chemokine with distinct recruitment properties. *Atherosclerosis*, 239(1), 1-10. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2014.12.039
- Wurster, T., Stellos, K., Haap, M., Seizer, P., Geisler, T., Otton, J., . . . Bigalke, B. (2013). Platelet expression of stromal-cell-derived factor-1 (SDF-1): an indicator for ACS? *Int J Cardiol*, 164(1), 111-115. doi:10.1016/j.ijcard.2011.06.082
- Yan, X., Cai, S., Xiong, X., Sun, W., Dai, X., Chen, S., . . . Xu, Z. (2012). Chemokine receptor CXCR7 mediates human endothelial progenitor cells survival, angiogenesis, but not proliferation. *J Cell Biochem*, 113(4), 1437-1446. doi:10.1002/jcb.24015
- Yellon, D. M., & Hausenloy, D. J. (2007). Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med*, 357(11), 1121-1135. doi:10.1056/NEJMra071667
- Yu, S., Crawford, D., Tsuchihashi, T., Behrens, T. W., & Srivastava, D. (2011). The chemokine receptor CXCR7 functions to regulate cardiac valve remodeling. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 240(2), 384-393. doi:10.1002/dvdy.22549
- Yun, S. H., Sim, E. H., Goh, R. Y., Park, J. I., & Han, J. Y. (2016). Platelet Activation: The Mechanisms and Potential Biomarkers. *Biomed Res Int*, 2016, 9060143. doi:10.1155/2016/9060143

- Zgheib, C., Zouein, F. A., Kurdi, M., & Booz, G. W. (2012). Differential STAT3 signaling in the heart: Impact of concurrent signals and oxidative stress. *JAK-STAT*, 1(2), 101-110. doi:10.4161/jkst.19776
- Zhang, S. H., Reddick, R. L., Piedrahita, J. A., & Maeda, N. (1992). Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science*, 258(5081), 468-471.
- Zidar, N., Dolenc-Strazar, Z., Jeruc, J., & Stajer, D. (2006). Immunohistochemical expression of activated caspase-3 in human myocardial infarction. *Virchows Arch*, 448(1), 75-79. doi:10.1007/s00428-005-0073-5
- Ziegler, M., Alt, K., Paterson, B. M., Kanellakis, P., Bobik, A., Donnelly, P. S., . . . Peter, K. (2016). Highly Sensitive Detection of Minimal Cardiac Ischemia using Positron Emission Tomography Imaging of Activated Platelets. *Scientific Reports*, 6, 38161-38161. doi:10.1038/srep38161
- Ziegler, M., Wang, X., Lim, B., Leitner, E., Klingberg, F., Ching, V., . . . Peter, K. (2017). Platelet-Targeted Delivery of Peripheral Blood Mononuclear Cells to the Ischemic Heart Restores Cardiac Function after Ischemia-Reperfusion Injury. *Theranostics*, 7(13), 3192-3206. doi:10.7150/thno.19698
- Zornoff, L. A. M., Paiva, S. A. R., Duarte, D. R., & Spadaro, J. (2009). Ventricular remodeling after myocardial infarction: concepts and clinical implications. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 92, 157-164.
- Zouggari, Y., Ait-Oufella, H., Bonnin, P., Simon, T., Sage, A. P., Guérin, C., . . . Mallat, Z. (2013). B lymphocytes trigger monocyte mobilization and impair heart function after acute myocardial infarction. *Nature Medicine*, 19(10), 1273-1280. doi:10.1038/nm.3284

11 ANHANG

Anh. Tabelle 10. Kardiale Parameter von Wildtyp (fl/fl) und Pf4-Cre-CXCR7 Knockout (-/-) im baseline Ultraschall.

	fl/fl n = 6	SEM	-/- n = 6	SEM	p-Wert t-test
EF [%]	77,8	2,9	80,9	2,8	0.4502
FS [%]	42,4	2,3	44,4	2,7	0.5839
BPM	528,3	17,7	523,0	28,0	0.8775
LVAW; d [mm]	1,2	0,1	1,1	0,0	0.4371
LVAW; s [mm]	1,7	0,1	1,6	0,1	0.6585
LVID; d [mm]	3,1	0,3	3,3	0,2	0.5036
LVID; s [mm]	1,8	0,1	1,6	0,1	0.3665
LVPW; d [mm]	1,0	0,1	1,4	0,2	0.0651
LVPW; s [mm]	1,6	0,1	1,6	0,1	0.6647
CO (LV Trace) [ml/min]	18,6	2,2	18,6	2,8	0.9855
LV Mass [mg]	109,0	12,9	128,8	11,8	0.2808
LV Mass (Corrected) [mg]	87,2	10,3	103,1	9,4	0.2808
LV Vol; d [μl]	45,7	5,6	45,2	5,5	0.9530
LV Vol; s [μl]	9,4	1,8	8,5	1,8	0.7330
SV (LV Trace) [μl]	34,9	3,5	35,2	3,9	0.9594
V; d (LV Trace) [μl]	45,7	2,9	44,1	5,0	0.7836
V; s (LV Trace) [μl]	10,0	1,2	8,9	1,7	0.6179

Anh. Tabelle 11. Kardiale Parameter von Wildtyp (fl/fl) und Pf4-Cre-CXCR7 Knockout (-/-) im Ultraschall nach myokardialer Ischämie und 24 h Reperfusion.

	fl/fl n = 6	SEM	-/- n = 6	SEM	p-Wert t-test
EF [%]	49,3	3,1	44,2	2,3	0.2120
FS [%]	22,6	1,8	20,0	1,5	0.2884

ANHANG

BPM	347,7	39,7	419,0	16,7	0.1288
LVAW; d [mm]	1,1	0,2	1,0	0,1	0.4014
LVAW; s [mm]	1,2	0,1	1,2	0,1	0.7032
LVID; d [mm]	3,5	0,2	3,7	0,2	0.6586
LVID; s [mm]	2,8	0,1	2,8	0,1	0.8504
LVPW; d [mm]	1,0	0,1	1,6	0,3	0.0473
LVPW; s [mm]	1,3	0,0	1,2	0,1	0.7790
CO (LV Trace) [ml/min]	11,4	1,1	10,3	1,9	0.6117
LV Mass [mg]	126,0	19,7	130,0	10,3	0.8624
LV Mass (Corrected) [mg]	100,8	15,7	104,0	8,2	0.8624
LV Vol; d [µl]	46,9	3,8	57,2	6,5	0.2024
LV Vol; s [µl]	23,7	2,3	29,6	2,3	0.0971
SV (LV Trace) [µl]	26,9	2,0	24,4	4,0	0.5932
V; d (LV Trace) [µl]	57,5	5,1	56,8	6,4	0,9370
V; s (LV Trace) [µl]	30,6	3,8	32,4	2,5	0,6981

Anh. Tabelle 12. Kardiale Parameter vom Pf4-Cre-CXCR7 Knockout (-/-) baseline und nach myokardialer Ischämie und 24 h Reperfusion, n = 6.

	baseline	SEM	24 h after reperfusion	SEM	p-Wert paired t-test
EF [%]	80,9	2,8	44,2	2,3	0.0002
FS [%]	44,4	2,7	20,0	1,5	0.0007
BPM	523,0	28,0	419,0	16,7	0.0071
LVAW; d [mm]	1,1	0,0	1,0	0,1	0.0819
LVAW; s [mm]	1,6	0,1	1,2	0,1	0.0116
LVID; d [mm]	3,3	0,2	3,7	0,2	0.0167
LVID; s [mm]	1,6	0,1	2,8	0,1	0.0010
LVPW; d [mm]	1,4	0,2	1,6	0,3	0.4209
LVPW; s [mm]	1,6	0,1	1,2	0,1	0.0136

CO (LV Trace) [ml/min]	18,6	2,8	10,3	1,9	0.0008
LV Mass [mg]	128,8	11,8	130,0	10,3	0.7604
LV Mass (Corrected) [mg]	103,1	9,4	104,0	8,2	0.7604
LV Vol; d [μl]	45,2	5,5	57,2	6,5	0.0170
LV Vol; s [μl]	8,5	1,8	29,6	2,3	0.0007
SV (LV Trace) [μl]	35,2	3,9	24,4	4,0	< 0.0001
V; d (LV Trace) [μl]	44,1	5,0	56,8	6,4	0.0083
V; s (LV Trace) [μl]	8,9	1,7	32,4	2,5	0.0004

Anh. Tabelle 13. Kardiale Parameter vom Wildtyp (fl/fl) baseline und nach myokardialer Ischämie und 24 h Reperfusion, n = 6.

	baseline	SEM	24 h after reperfusion	SEM	p-Wert paired t-test
EF [%]	77,8	2,9	49,3	3,1	0.0020
FS [%]	42,4	2,3	22,6	1,8	0.0019
BPM	528,3	17,7	347,7	39,7	0.0222
LVAW; d [mm]	1,2	0,1	1,1	0,2	0.8257
LVAW; s [mm]	1,7	0,1	1,2	0,1	0.0092
LVID; d [mm]	3,1	0,3	3,5	0,2	0.2792
LVID; s [mm]	1,8	0,1	2,8	0,1	0.0020
LVPW; d [mm]	1,0	0,1	1,0	0,1	0.6515
LVPW; s [mm]	1,6	0,1	1,3	0,0	0.0156
CO (LV Trace) [ml/min]	18,6	2,2	11,4	1,1	0.0106
LV Mass [mg]	109,0	12,9	126,0	19,7	0.1715
LV Mass (Corrected) [mg]	87,2	10,3	100,8	15,7	0.1715
LV Vol; d [μl]	45,7	5,6	46,9	3,8	0.8451
LV Vol; s [μl]	9,4	1,8	23,7	2,3	0.0089
SV (LV Trace) [μl]	34,9	3,5	26,9	2,0	0.0225
V; d (LV Trace) [μl]	45,7	2,9	57,5	5,1	0.0413

V; s (LV Trace) [µl]	10,0	1,2	30,6	3,8	0.0089
---------------------------------	-------------	------------	-------------	------------	---------------

Anh. Tabelle 14: Chemo- und Zytokinkonzentrationen im Plasma nach myokardialer Ischämie und 24 h Reperfusion von Wildtyp- (fl/fl) und Knockout-Tieren (-/-), SEM.

Angaben in pg/ml	fl/fl	-/-	p-Wert (t-test)
CXCL5	142,7 ± 27; n = 10	426,8 ± 74; n = 10	0.0021
CXCL12	11,6 ± 2,7; n = 10	15,7 ± 2,6; n = 10	0.2824
CXCL13	702,4 ± 145; n = 9	630,8 ± 102; n = 9	0.6918
CCL2	19 ± 4,8; n = 8	21,4 ± 1,1; n = 8	0.6357
CCL5	26,5 ± 4,4; n = 7	29,4 ± 2,3; n = 10	0.5368
IL1α	1,8 ± 0,3; n = 8	2 ± 0,3; n = 8	0.6136
IL1β	6,6 ± 0,7; n = 7	7,4 ± 0,8; n = 10	0.5064
TNF-α	3,4 ± 0,6; n = 7	4,1 ± 0,5; n = 10	0.3471
IL6	2,8 ± 0,6; n = 7	14,9 ± 5,2; n = 7	0.0382

Anh. Tabelle 15: Fluoreszenzintensität [MFI, mean fluorescence intensity] verschiedener Oberflächenrezeptoren auf Wildtyp- (fl/fl) und Knockout-Thrombozyten (-/-), t-test, SEM.

Oberflächenrezeptor	fl/fl	-/-	p-Wert (t-test)
Angaben in MFI	n = 6	n = 6	
GPV	96,4 ± 2,5	94,1 ± 2,5	>0.9999
GPVI	45,1 ± 1,6	45,4 ± 1,7	>0.9999
GPIX	121,7 ± 3,6	115,5 ± 2,4	0.9505
Integrin α₅	11,5 ± 0,9	11,4 ± 0,9	>0.9999
Integrin β₃	66,4 ± 6,3	62,1 ± 6,2	0.9959

Anh. Tabelle 16: Wertetabelle der Fluoreszenzintensität [MFI, mean fluorescence intensity] von Integrin α_{IIb}β₃ (GPIIb/IIIa) auf Thrombozyten von Wildtyp- (fl/fl) und Knockout-Tieren (-/-), t-test, SEM.

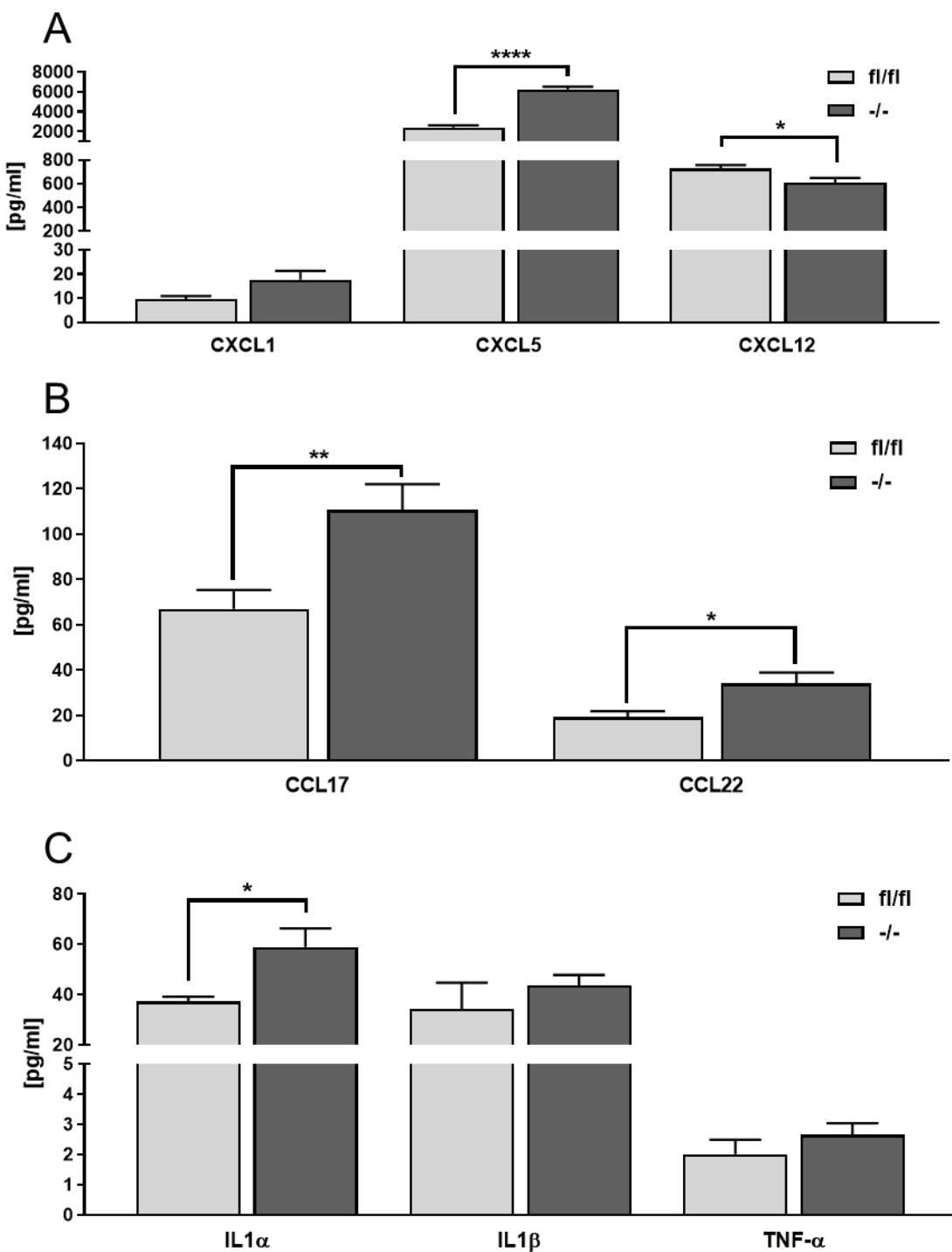
Angaben in MFI	fl/fl	-/-	p-Wert (t-test)
Resting	31,7 ± 3,7	39,7 ± 3,7	0.123
Thrombin 0,005 [U/ml]	78,8 ± 19,7, n = 6	241,8 ± 91,8, n = 7	0.136

ANHANG

Thrombin 0,02 [U/ml]	$342 \pm 132,7, n = 6$	$325 \pm 108,5, n = 7$	0.922
Thrombin 0,1 [U/ml]	$572,7 \pm 57,24, n = 6$	$465,5 \pm 78,16, n = 7$	0.306
CRP 1 [µg/ml]	$236,1 \pm 84, n = 7$	$391,8 \pm 64,6, n = 6$	0.181
CRP 5 [µg/ml]	$353 \pm 78,3, n = 7$	$572,1 \pm 33,5, n = 6$	0.034
CRP 10 [µg/ml]	$444,9 \pm 64,75, n=7$	$589,8 \pm 31,6, n=6$	0.084

Anh. Tabelle 17: Wertetabelle der Fluoreszenzintensität [MFI] von CD62P (P-Selektin) auf Thrombozyten von Wildtyp- (fl/fl) und Knockout-Tieren (-/-), t-test, SEM.

Angaben in MFI	fl/fl	-/-	p-Wert (t-test)
Resting	$6,8 \pm 1,0$	$8,1 \pm 1,3$	0.471
Thrombin 0,005 [U/ml]	$7,9 \pm 0,9, n = 6$	$30,1 \pm 14, n = 6$	0.144
Thrombin 0,02 [U/ml]	$49,5 \pm 19,9, n = 6$	$61,9 \pm 23,0, n = 6$	0.692
Thrombin 0,1 [U/ml]	$121,8 \pm 21,9, n = 6$	$90,4 \pm 15,4, n = 6$	0.267
CRP 1 [µg/ml]	$31,9 \pm 13, n = 5$	$60,1 \pm 11,6, n = 5$	0.143
CRP 5 [µg/ml]	$52,1 \pm 18,1, n = 5$	$102 \pm 10,2, n = 5$	0.043
CRP 10 [µg/ml]	$74,6 \pm 14,4, n = 5$	$107,7 \pm 9,4, n = 5$	0.091



Anh. Abbildung 44. Ergebnisse des LEGENDplex™ Assay zur Evaluierung der Chemo- und Zytokin Zusammensetzung von aktivierten Thrombozytenüberständen von Wildtyp- (fl/fl) und Knockout-Tieren (-/-), t-test, SEM. (A) CXC-Chemokine CXCL5: (fl/fl) $2423 \pm 207,9$ vs. (-/-) $6257 \pm 273,2$ pg/ml, n = 7, p < 0,0001; CXCL12: (fl/fl) $726,8 \pm 32,3$ vs. (-/-) $608,6 \pm 40,5$ pg/ml, n = 7, p = 0,0415 (B) CCL-Chemokine CCL17: (fl/fl) $67 \pm 8,4$ vs. (-/-) $110,6 \pm 11,4$ pg/ml, n = 7, p = 0,0095; CCL22: (fl/fl) $19,22 \pm 2,7$ vs. (-/-) $34 \pm 4,9$ pg/ml, n = 7, p = 0,0218 (C) Zytokine IL1 α : (fl/fl) n = 5, $37,2 \pm 1,9$ vs. (-/-) n = 6, $58,9 \pm 7,5$ pg/ml, p = 0,0298. Weitere Werte und statistische Auswertung sind Tabelle 9 zu entnehmen.

12 DANKSAGUNG

Ich danke ganz besonders Herrn PD. Dr. med. vet. Sven Reese für die Betreuung meiner Dissertation an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Meinrad Gawaz, Direktor der Medizinischen Klinik III für Kardiologie und Kreislauferkrankungen des Uniklinikums Tübingen, für die Vergabe des herausfordernden und interessanten Themas, die wissenschaftlichen Anregungen und Ratschläge bei der Betreuung meiner Arbeit.

Ein großes Dankeschön geht an meine Kollegen Dr. Tatsiana Castor, Klaudia Posavec und Alexander Witte, die auch in schwierigen Zeiten meine Motivation an dieser Arbeit mitgetragen haben.

Vielen Dank an Danijela Heide und Jenny Hetzer, Dr. rer. nat. Madhumita Chatterjee, Catharina Wahle und ganz besonders Alexander Witte für Eure bereitwillige Hilfe und Unterstützung im Rahmen dieser Arbeit.

Ein großes Dankeschön geht an alle Mitarbeiter des Labors der Arbeitsgruppe Gawaz für die gute Zusammenarbeit, Arbeitsatmosphäre und Unterstützung.

Vielen herzlichen Dank möchte ich auch an die Tierpfleger und Mitarbeiter der Tierhaltungen aussprechen, die durch die Versorgung und Pflege der Tiere stets wunderbare Arbeit leisteten. Zusätzlich danke ich allen Tieren, die in den letzten Jahren meiner Tätigkeit in der Forschung ihr Leben für die Wissenschaft lassen mussten.

Besonders danke ich meinem Vater für die Motivation selbstbewusst meinen Weg im Leben zu finden und wider jegliche Umstände zu gehen. Ich danke meiner Familie für die Unterstützung, aufbauenden Worte und ruhenden Gelassenheit.