

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I - Großhadern  
der Ludwig-Maximilians-Universität  
Direktor: Prof. Dr. med. G. Steinbeck

**Adhäsionsmechanismen und zelluläre Therapien  
nach akuter und chronischer myokardialer Ischämie  
und Reperfusion am Mausmodell**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Jan C. Horstkotte  
aus Bremen

2008

Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät  
der Universität München

1. Berichterstatter: PD Dr. med. Christian Kupatt  
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Markus Sperandio

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Volker Klauss  
Prof. Dr. med. Eugen Faist

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser, FACR

Tag der mündlichen Prüfung: 27. November 2008

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung und Zielsetzung</b>	<b>6</b>
1.1 Akuter Myokardinfarkt .....	6
1.2 Der myokardiale Reperfusionsschaden .....	6
1.3 Adhäsionsmechanismen nach akuter myokardialer Ischämie und Reperfusion.....	8
1.3.1 Leukozyten in der postischämischen Reperfusion .....	8
1.3.1.1 Leukozytäres Rolling .....	8
1.3.1.2 Leukozytäres Sticking .....	9
1.3.1.3 Transmigration.....	10
1.3.2 Rolle der Thrombozyten.....	11
1.3.3 Interaktion von Thrombozyten und Leukozyten.....	12
1.4 Zelluläre Therapien der myokardialen Ischämie und Reperfusion .....	13
1.4.1 Endotheliale Progenitorzellen.....	13
1.4.1.1 EPCs verbessern die Neovaskulogenese.....	14
1.4.2 Embryonale endotheliale Progenitorzellen.....	15
1.4.3 Mobilisation autologer EPCs des Knochenmarks.....	15
1.5 Zielsetzung:.....	16
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>17</b>
2.1 Versuchstiere .....	17
2.2 Akutes Ischämie/Reperfusionsmodell .....	17
2.2.1 Infarktinduzierung.....	18
2.2.2 Leukozyten- und Plättchenadhäsion in der akuten Reperfusion .....	21
2.2.2.1 Thrombozytenentnahme und Präparation.....	21
2.2.3 Konzentrationsbestimmung des GPIIb/IIIa-Antagonisten.....	22
2.2.4 Fluoreszenzmikroskopie .....	22
2.2.5 Funktionsanalyse nach Ischämie und Reperfusion am isolierten Herzen .....	24
2.2.5.1 Präparation der isolierten Herzen .....	24
2.2.5.2 Langendorff/Working-Heart.....	25
2.3 Chronisches Ischämie/Reperfusionsmodell .....	26
2.3.1 Infarktinduzierung.....	27

2.3.2	Isolation embryonaler endothelialer Progenitorzellen.....	27
2.3.3	Applikation der eEPCs .....	28
2.3.4	Applikation von GM-CSF.....	28
2.3.5	Hämodynamische Messungen.....	29
2.3.6	Histologie .....	30
2.3.6.1	Zellnachweis .....	30
2.3.7	Operationszubehör.....	30
2.4	Statistik.....	31
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>32</b>
3.1	Adhäsionsmechanismen im akuten Ischämie/Reper-fusionsmodell.....	32
3.1.1	Leukozytenrekrutierung und Co-Aggregatbildung .....	32
3.1.2	Plättchenrekrutierung nach Ischämie/Reperfusion.....	33
3.1.3	Die Rolle der Thrombozyten auf die postischämische Leukozytenadhäsion .....	34
3.1.3.1	Leukozytenrekrutierung und Co-Aggregatbildung nach GPIIb/IIIa- Co-Applikation .....	35
3.1.3.2	Thrombozytenrekrutierung unter Tirofiban.....	37
3.1.4	Beitrag der Leukozyten und Thrombozyten zum postischämischen Reperfusionsschaden .....	38
3.1.4.1	Postischämische linksventrikuläre Funktion nach Ischämie und Reperfusion .....	38
3.1.5	Thrombozytäres P-Selektin vermittelt postischämische Leukozytenrekrutierung.....	40
3.1.5.1	Postischämische Plättchenrekrutierung unter ICAM-1/P-Selektin- Defizienz.....	40
3.1.5.2	Leukozytenrekrutierung in ICAM-1/P-Selektin-defizienten Herzen	41
3.1.6	Leukozytenadhäsion korreliert mit dem Ausmaß des postischämischen Funktionsverlustes .....	42
3.1.7	Plättchenadhäsion ist unabhängig vom postischämischen Reperfusionsschaden. ....	43
3.2	Zelluläre Therapien der myokardialen I/R im chronischen Modell.....	45
3.2.1	Postischämische Applikation embryonaler EPCs und ICAM-1-Defizienz reduzieren den postischämischen Reperfusionsschaden .....	45
3.2.2	Präischämische Behandlung mit GM-CSF ist kardioprotektiv. ....	47

3.2.3	Zellnachweis .....	49
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>51</b>
4.1	Myokardiale Ischämie und Reperfusion am akuten und chronischen Mausmodell.....	51
4.1.1	Fluoreszenzmikroskopie am Herzen .....	52
4.1.2	Einfluss der chirurgische Präparation.....	52
4.2	Leukozyten/Thrombozyten-Interaktion am Modell akuter myokardialer Ischämie und Reperfusion.....	53
4.2.1	Funktionelle Bedeutung von Leukozyten/Thrombozyten- Co-Aggregaten.....	53
4.2.2	Thrombozytäres P-Selektin vermittelt thrombozytenmedierte Leukozytenrekrutierung.....	56
4.3	Zelluläre Therapien der myokardialen I/R im chronischen Modell.....	58
4.3.1	Die Defizienz von ICAM-1 reduziert den postischämischen Reperfusionsschaden nach 14 d.....	58
4.3.2	Postischämische Applikation von eEPCs verbessert die linksventrikuläre Myokardfunktion .....	59
4.3.2.1	Protektive Mechanismen embryonaler EPCs.....	60
4.3.3	Adhäsion von eEPCs ist unabhängig von der ICAM-1-Expression .....	61
4.3.4	Die präischämische Applikation von GM-CSF verbessert die myokardiale linksventrikuläre Funktion .....	62
4.3.5	Knochenmarksstimulierende Zytokine nach Myokardischämie in klinischen Studien .....	64
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>66</b>
<b>6.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>69</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>70</b>
<b>8.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>90</b>
<b>9.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>91</b>

# 1. Einleitung und Zielsetzung

## 1.1 Akuter Myokardinfarkt

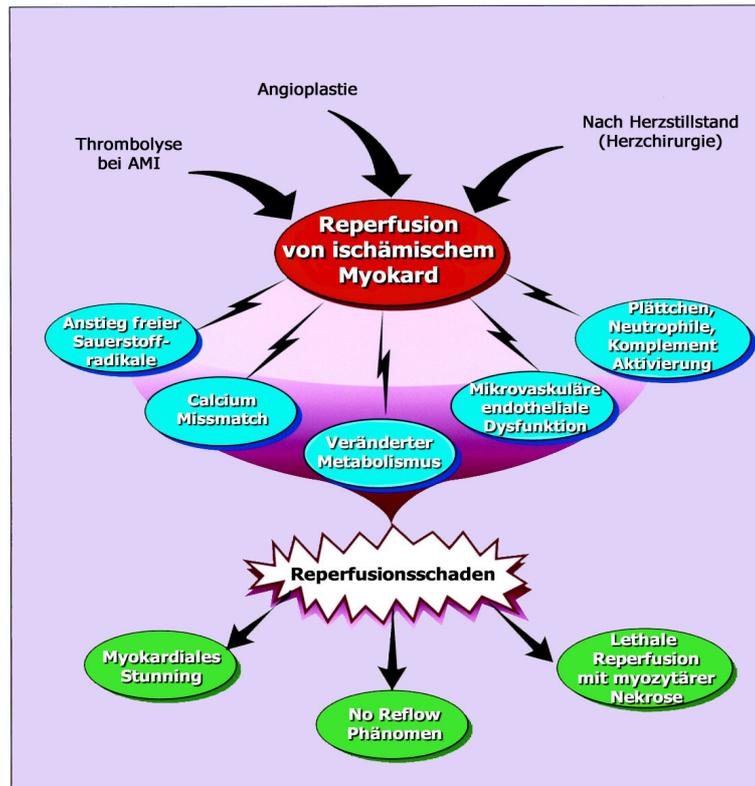
Der akute Myokardinfarkt (AMI) ist eine der häufigsten Diagnosen von hospitalisierten Patienten in den industrialisierten Ländern. In den USA erleiden jedes Jahr annähernd 1,1 Millionen Menschen einen akuten Myokardinfarkt<sup>35, 204</sup>, in Europa liegt die Inzidenz des Myokardinfarktes bei 1:10.000 pro Jahr.

In der Regel kommt es zu einem Herzinfarkt, wenn der Koronarblutfluss abrupt nach dem thrombotischen Verschluss einer Koronararterie versiegt. Der Umfang der Herzmuskelstörung hängt ab u. a. von dem Versorgungsgebiet des betroffenen Gefäßes, der Dauer des Verschlusses, dem Sauerstoffbedarf des betroffenen Myokards und von der Durchblutung des Infarktgebietes nach Wiederherstellung des Blutflusses<sup>35</sup>. Die rasche Revaskularisierung und die dadurch erhoffte Reduktion des infarzierten Arealis ist die wichtigste therapeutische Maßnahme. Die Methode der Wahl stellt derzeit die möglichst rasch durchgeführte interventionelle Therapie mittels perkutaner transluminaler Koronarangioplastie (PTCA) dar<sup>2, 41, 98</sup>. Als medikamentöse Begleittherapie werden heute u. a. Heparine und GPIIb/IIIa-Antagonisten zur anti-thrombotischen Therapie, sowie  $\beta$ -Blocker und ACE-Hemmer oder AT<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten zur Verbesserung des postischämischen Remodellings verwendet<sup>2, 95, 100</sup>.

## 1.2 Der myokardiale Reperfusionsschaden

Die schnelle Revaskularisierung des Koronargefäßes ist notwendig zur Rettung des ischämischen oder hypoxischen Myokards und zur Senkung der Morbidität und Mortalität nach akutem Infarkt. Jedoch kann es nach der Reperfusion des ischämischen Gewebes zu paradoxer myozytärer Dysfunktion kommen, dem so genannten „Reperfusionsschaden“. Am Herzen tritt die Situation der akuten Reperfusion nach Thrombolyse oder PTCA einer verschlossenen Koronararterie sowie in der Bypass-, Klappen- und Transplantationschirurgie im Rahmen der extrakorporalen Zirkulation auf<sup>215</sup>. Mit zunehmenden Dauer und Ausmaß der Ischämie vergrößert sich der myozytäre Zellschaden mit einer Prädisposition zu weiteren reperfusionssassoziierten, pathologischen Prozessen<sup>224</sup>. Zu diesen Prozessen zählen die reversible Einschränkung der Herzmuskelfunktion („myocardial stunning“)<sup>20, 22</sup>, der mikrovaskuläre und endotheliale

Schaden<sup>132, 178</sup> sowie die Vergrößerung des irreversiblen Zellschadens und der Nekrose<sup>8, 88</sup>.



**Abb. 1:** Der myokardiale Ischämie/Reperfusionsschaden, schematisch, Verma et al., Circulation 2002

Die inflammatorische Antwort ist integraler Anteil der Reaktion auf die Gewebeschädigung und spielt eine aktive Rolle nach myokardialer Ischämie. Zytokine wie zum Beispiel Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- $\alpha$ ) oder Interleukin-6 (IL-6) werden vom geschädigten Myokard freigesetzt. Diese können myozytäres Überleben und Apoptose beeinflussen und zusätzlich die akute zelluläre inflammatorische Antwort verstärken<sup>51, 152</sup>. Im Rahmen dieser ischämisch getriggerten Inflammation wandern verstärkt neutrophile Granulozyten (PMN) in das Infarkttrandgebiet, um die entstandene Nekrose abzuräumen. Diese Reaktion ist ein notwendiger Reparaturvorgang und trägt zur Narbenbildung bei. Wird Leukozytenimmigration gehemmt, so wird die Narbenbildung unterbunden und es kommt zur Dysfunktion des gesamten Herzens<sup>78</sup>. Die Revaskularisierung des verschlossenen Gefäßes und die Wiederherstellung der Sauerstoffversorgung des ischämischen Gewebes führt zur Aktivierung des postischämischen Endothels, zur Freisetzung proinflammatorischer Substanzen und zur erhöhten Expression von Adhäsionsmolekülen (Selektine, ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1 s. u.)<sup>55, 76, 90, 109, 125, 143, 180, 225</sup>

Dadurch kommt es zu erhöhter Leukozytenadhäsion im postischämischen Areal und damit zur gesteigerten Freisetzung kardiotoxischer Substanzen, z. B. Sauerstoffradikalen wie Wasserstoffperoxid. Außerdem werden weitere proinflammatorische Zytokine wie z. B. Leukotrien- $\beta_4$  und Plättchen-Aktivierender Faktor freigesetzt<sup>72</sup>.

In tierexperimentellen Studien konnte durch die Gabe eines Antikörpers gegen MAC-1 (CD11b/CD18), eines leukozytären Adhäsionsmoleküls, der Reperfusionsschaden reduziert werden. Dies wies auf die schädigende Rolle der Leukozyten im postischämischen Myokard hin<sup>90, 125, 130, 158, 186, 225</sup>.

In neueren Studien wurde gezeigt, dass Thrombozyten ebenfalls eine Rolle in diesem Adhäsionsprozess spielen. Zusätzlich zur Aktivierung des Endothels<sup>63</sup> und der Leukozyten<sup>151</sup> interagieren Plättchen direkt mit neutrophilen Granulozyten<sup>188, 217</sup> und tragen so zu einer weiteren Schädigung nach Ischämie und Reperfusion bei<sup>110, 120</sup>. Inwieweit Thrombozyten den postischämischen leukozytären Reperfusionsschaden beeinflussen, war in diesen Studien noch nicht vollständig geklärt.

## **1.3 Adhäsionsmechanismen nach akuter myokardialer Ischämie und Reperfusion**

### **1.3.1 Leukozyten in der postischämischen Reperfusion**

Die myokardiale Ischämie und Reperfusion führt zu erhöhter Leukozytenadhäsion im postischämischen Areal. Diese erfolgt in mehreren Stufen. Die drei wichtigsten Stufen sind das „Rolling“, das „Sticking“ und die „Transmigration“<sup>125</sup>.

#### **1.3.1.1 Leukozytäres Rolling**

Die Interaktion zwischen Leukozyten und aktiviertem Endothel findet hauptsächlich in den postkapillären Venolen des postischämischen Gewebes statt<sup>70, 112, 124</sup>. Der erste Adhäsionsschritt ist das „Rolling“. Selektine und ihre Liganden sind hauptsächlich verantwortlich für die Dezeleration der vorbeiströmenden Leukozyten und erste schwache, reversible Bindung an das Endothel. Es gibt bislang drei Vertreter der Selektin-Gruppen, die auf unterschiedlichen Zelltypen nachgewiesen wurden und nach dem Ort ihrer Erstbeschreibung benannt sind: Leukozytäres Selektin (L-Selektin), thrombozytäres Selektin (P-Selektin) und endotheliales Selektin (E-Selektin). P- und L-Selektine vermitteln die Dezeleration bei hohen Strömungsge-

schwindigkeiten, E-Selektin dient der Geschwindigkeitsreduktion bereits rollender Leukozyten<sup>18, 18, 27, 93, 166</sup>.

P-Selektin (PADGEM, GMP-140, CD62P) ist ein zentrales Adhäsionsmolekül für die Initiation des Rollings. Es wird vorgebildet und in den Granula von Thrombozyten oder den Weibel-Palade-Körperchen von Endothelzellen gespeichert. Es kann durch unterschiedliche Stimuli (Thrombi, Komplementfaktoren, Endotoxine, TNF- $\alpha$  und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) aktiviert werden und wird innerhalb von Sekunden an die Zelloberfläche befördert.

L-Selektin (LECAM-1, CD62L) kommt auf Leukozyten vor und wird dort konstitutiv exprimiert. E-Selektin (ELAM-1, CD62E) wird ausschließlich von Endothelzellen nach der Aktivierung durch Zytokine wie Interleukin-1 (IL-1) oder TNF- $\alpha$  gebildet<sup>18, 40</sup>.

Als unspezifische Liganden finden sich bei allen Vertretern der Selektine Kohlenhydrate wie Sialyl-Lewis X-(sLex-) verwandte Strukturen<sup>18</sup>, sulfatisierte Polysaccharide (Heparin, Fucoidan) und Mannose-6-Phosphat<sup>166</sup>. Für P- und E-Selektin sind darüber hinaus spezifische Liganden wie P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1 (PSGL-1)<sup>173</sup> und E-Selektin-Ligand-1 (ESL-1)<sup>195</sup> beschrieben worden. Nach der Interaktion mit ihren Liganden tragen Selektine zur Aktivierung von Leukozyten bei<sup>23, 127</sup>.

Die Hauptaufgabe der Selektine besteht für L-Selektin auf leukozytärer Seite und P- und E-Selektin auf endothelialer Seite in der Vermittlung einer schwachen, reversiblen Bindung von Leukozyten an die Gefäßwand<sup>65</sup>.

Es resultiert ein langsames Entlangrollen der Leukozyten auf dem Endothel, welches das Anhaften der frei fließenden Leukozyten an die Gefäßwand mit normaler Strömungsgeschwindigkeit ermöglicht.

### 1.3.1.2 Leukozytäres Sticking

Der zweite Adhäsionsschritt ist das feste Anhaften des Leukozyten an der Endothelzelle, das so genannte Sticking. Die Bindungen sind fester als die der Selektine, der Aufbau dieser Bindungen benötigt jedoch eine längere Kontaktzeit<sup>91, 108</sup>. An diesem Schritt sind auf der endothelialen Seite Mitglieder der Ig-Superfamilie, die interzellulären Adhäsionsmoleküle 1 und 2 (ICAM-1, ICAM-2) und VCAM-1 beteiligt.

Von besonderer Bedeutung ist das ICAM-1 (CD54). Es wird in erster Linie auf Endothelzellen, aber auch auf Epithel, Fibroblasten, Leukozyten und vielen Tumorzellen, exprimiert<sup>65</sup>. Liganden sind  $\beta_2$ -Integrine (LFA-1, MAC-1, CD18/CD11c) auf Leukozyten<sup>169, 194</sup>. Darüber hinaus zeigte Altieri, dass ICAM-1 direkt Fibrinogen binden kann<sup>6</sup>

und dadurch zur Adhäsion von Thrombozyten beiträgt<sup>135</sup>. Auf Endothelzellen wird es in geringen Mengen konstitutiv exprimiert, aber nach Stimulation mit Entzündungsmediatoren wie z.B. TNF- $\alpha$ , Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und IL-1 verstärkt exprimiert<sup>37, 168</sup>. Durch Antikörper-Blockade läßt sich in vitro die ICAM-1 vermittelte Adhäsion von neutrophilen Granulozyten inhibieren<sup>60</sup>. Liganden der endothelialen Adhäsionsmoleküle sind die CD18-Integrine wie der Monozyten-Adhäsions-Complex-1 (MAC-1 oder CD11b/CD18), das Lymphozyten-Funktionsassoziierte Antigen-1 (LFA-1 oder CD11a/CD18), die Untereinheit CD11c/CD18 und das Very-Late-Antigen-4 (VLA-4 oder CD49d)<sup>216</sup>.

Die CD18-Integrine LFA-1 und MAC-1 können beide an die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und ICAM-2 binden<sup>38, 194, 221</sup>, wobei beide Moleküle miteinander konkurrieren<sup>128</sup>. Intravitalmikroskopische Studien erbrachten Hinweise, das LFA-1 das wichtigste  $\beta_2$ -Integrin für feste Leukozytenbindung ist<sup>176</sup> und eine höhere Affinität gegenüber ICAM-1 besitzt als MAC-1<sup>128</sup>.

VLA-4 ist überwiegend auf Monozyten, eosinophilen Leukozyten und auf Lymphozyten exprimiert<sup>82</sup>. Auf neutrophilen Leukozyten ist es nur in geringem Maße exprimiert und spielt daher nur eine untergeordnete Rolle in der postischämischen Adhäsionskaskade<sup>104</sup>. In Abwesenheit von anderen Adhäsionsmolekülen jedoch kann VLA-4 leukozytäres „Rolling“ initiieren<sup>5, 193</sup> und auch feste Bindungen über endotheliales VCAM-1 eingehen<sup>129</sup>.

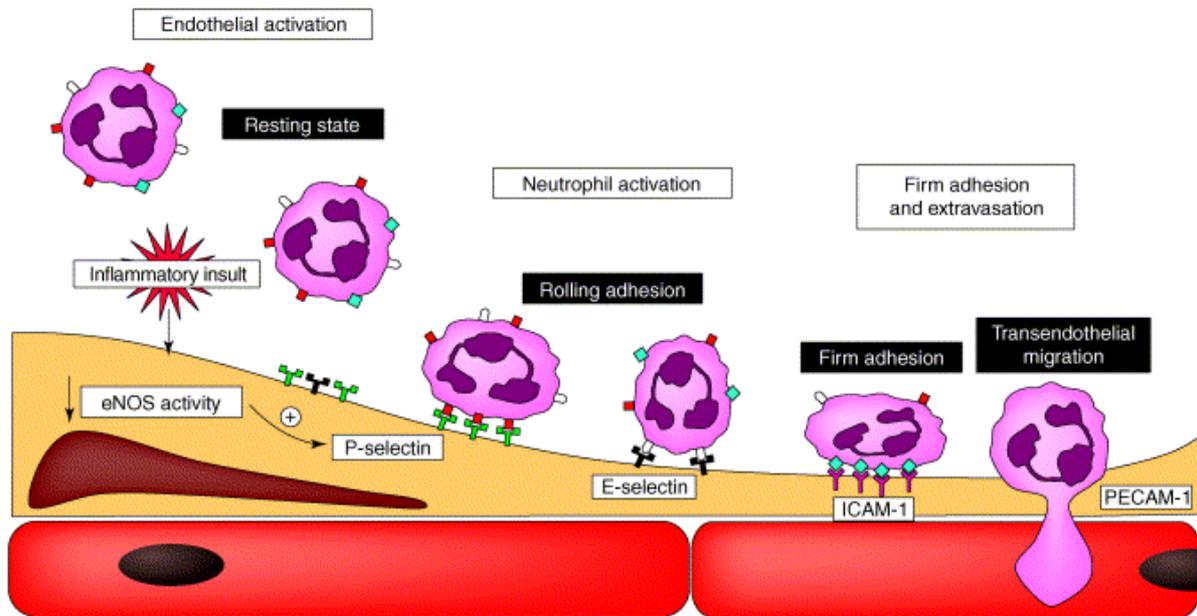
Das Vaskuläre Adhäsionsmolekül-1 (VCAM-1, CD106) kommt ebenfalls auf Endothelzellen, aber auch auf epithelialen und dendritischen Zellen sowie auf Makrophagen vor<sup>65</sup>. Die endotheliale VCAM-1 Expression wird ebenfalls durch verschiedene Zytokine (IL-1, TNF- $\alpha$ , Interleukin-4)<sup>83, 84, 148</sup> induziert und bindet vor allem an Monozyten und Lymphozyten<sup>134 202 142</sup>.

Neben den genannten Molekülen existieren verschiedene, nicht miteinander verwandte Oberflächenmoleküle mit adhäsiven Fähigkeiten, z. B. Cadherine. Sie waren nicht Gegenstand unserer Untersuchungen.

### 1.3.1.3 Transmigration

Nach fester Adhäsion transmigrieren Leukozyten in perivaskuläres Gewebe, wenn entsprechende chemotaktische Botenstoffe vorhanden sind wie z.B. Interleukin-8<sup>59</sup>.<sup>60</sup> Bei der Transmigration der Leukozyten wird Endothel aktiviert, Proteine werden synthetisiert und die Expression von Adhäsionsmolekülen hochreguliert. Proinflamm-

matorische Mediatoren werden produziert. Das Endothel sezerniert chemotaktische Botenstoffe, die die Transmigration der Leukozyten fördert. Die Adhäsionsmoleküle PECAM-1, ICAM-1, VE-Cadherin, LFA-1 und VLA-1 und die junctionalen Adhäsionsmoleküle (JAMs) sind unter anderem an der Transmigration beteiligt<sup>60, 210, 218</sup>.



**Abb. 2:** Schematische Darstellung der Leukozyten-Endothel-Interaktion nach Ischämie und Reperfusion. Kakkar et al. 2004

### 1.3.2 Rolle der Thrombozyten

Es gibt zunehmend Hinweise darauf, dass Thrombozyten eine Rolle in der Pathogenese des postischämischen Reperfusionsschadens spielen. Die postischämische Reperfusion bewirkt eine Aktivierung und Akkumulation von Thrombozyten innerhalb des Gefäßbettes.<sup>48, 116, 154</sup> Diese exprimieren zahlreiche Glykoproteine (GP) auf ihrer Zelloberfläche, welche die Adhäsion an die verletzte Gefäßwand vermitteln. Im Zellinneren finden sich Speichergranula und Mitochondrien. In diesen Glykorganula liegen z. B. von-Willebrand-Faktor (vWF) und P-Selektin in gespeicherter Form vor. Thrombozyten exprimieren eine Reihe von Adhäsionsmolekülen, die zur Zell-Zell-Interaktion beitragen, wie z.B. P-Selektin, des Platelet-Endothelial-Zell-Adhesion-Molecule-1 (PECAM-1) und mehrere Integrine, wie z.B. Glykoprotein IIb/IIIa und das leuzinreiche Glykoprotein Ib (GPIb)<sup>25, 58, 157</sup>. Darüber hinaus setzen Thrombozyten Sauerstoffradikale und proinflammatorische Mediatoren wie Thromboxan A<sub>2</sub>, Leukotriene, Plättchenfaktor 4, Serotonin, und den Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) frei<sup>49, 67, 123, 133</sup>. Die Adhäsion von Leukozyten an immobilisierten Thrombozyten kann unter physiologischen Bedingungen durch P-Selektin mediiert werden<sup>117</sup>.

Im Intestinum werden Thrombozyten durch „Tethering“ mit endotheliale P-Selektin rekrutiert<sup>135</sup>. In vitro konnte gezeigt werden, dass thrombozytäres PSGL-1 die Interaktion zwischen P-Selektin und Thrombozyten medieren kann<sup>56</sup>.

Weiterhin wird die postischämische Adhäsion über Fibrin und Fibrinogen vermittelt, welches zwischen dem konstitutiv exprimierten ICAM-1 der Endothelzelle und dem entsprechenden GPIIb/IIIa-Liganden der Thrombozyten eine feste Bindung bewirkt<sup>136</sup>. Nach Zerstörung der endothelialen Integrität kann vWF mit Gewebethromboplastin aus der subendothelialen Matrix reagieren und über den thrombozytären GPIb-Liganden eine permanente Adhäsion von Thrombozyten vermitteln. VWF ist ein komplexes multimeres Glykoprotein, welches eine zentrale Rolle für die thrombozytäre Funktion spielt. Es wird von Endothelzellen und Megakaryozyten gebildet, intrazellulär prozessiert und in den Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen und den Alphagranula der Thrombozyten gespeichert. Die Interaktion zwischen vWF und GPIb spielt eine wichtige Rolle für die Thrombozytenadhäsion, insbesondere in Arterien und postkapillaren Venolen<sup>171</sup>.

### **1.3.3 Interaktion von Thrombozyten und Leukozyten**

Plättchen haben die Fähigkeit, die Funktion von Leukozyten zu modulieren<sup>170</sup>, indem sie zur Aktivierung des Endothels<sup>63</sup> und der Leukozyten beitragen<sup>151</sup>. Bei Patienten mit instabiler Angina pectoris und mit akutem Myokardinfarkt ist die Leukozyten/Thrombozyten-Interaktion erhöht<sup>156</sup>. Sie interagieren mit neutrophilen Granulozyten<sup>188, 217</sup> und verstärken so die Schädigung nach Ischämie und Reperfusion<sup>110, 120</sup>.

In isolierten Herzen wurde gezeigt, dass P-Selektin während der Reperfusion zur Interaktion zwischen Leukozyten und Thrombozyten beiträgt<sup>120</sup>. Bei akutem postischämischen Nierenversagen spielt das thrombozytäre P-Selektin eine wichtige Rolle<sup>187</sup>.

Die Rolle der Thrombozyten für die postischämische Leukozytenrekrutierung und myokardiale Dysfunktion in vivo wurde bisher noch nicht untersucht.

## 1.4 Zelluläre Therapien der myokardialen Ischämie und Reperfusion

In den letzten Jahren eröffneten sich zunehmend neue Therapieansätze zur Behandlung des Ischämie/Reperfusionsschadens. In experimentellen und klinischen Ansätzen wurde versucht, durch Applikation ex vivo expandierter endothelialer Progenitorzellen (EPC) oder durch Stimulation von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark Infarktgrößen zu verringern sowie Perfusion und Funktion nach Ischämie zu verbessern<sup>4, 13, 97, 167, 197, 208</sup>.

### 1.4.1 Endotheliale Progenitorzellen

1997 schlugen T. Asahara, J. Isner und Mitarbeiter erstmals die Existenz humaner, hämatopoetischer CD34-positiver Progenitorzellen vor, die sich ex vivo zu einem endothelialen Phänotyp differenzieren ließen<sup>12</sup>. Diese Zellen wurden endotheliale Progenitorzellen benannt, exprimierten verschiedene endotheliale Marker wie z. B. von-Willebrand-Faktor und inkorporierten in neu geformte Gefäße im Ischämiegebiet. Auch Rafii et al. berichteten über adulte zirkulierende EPCs, die aus dem Knochenmark stammten<sup>183</sup>. Nach diesen initialen Entdeckungen wurden EPCs als Zellen definiert, die positiv für hämatopoetische Stammzellmarker wie CD34 sind sowie endotheliale Marker wie den Vascular-Endothelial-Growth-Factor-Receptor-2 (VEGFR-2) exprimieren. Da CD34 nicht exklusiv auf hämatopoetischen Zellen exprimiert wird, wurden weitere Marker für EPCs beschrieben, z. B. CD133. CD133 wird auf Zellen exprimiert, die noch früher in der Hämatopoese entstehen und in vitro in Endothelzellen differenzieren können<sup>66</sup>. Auf murenen Endothelzellen und Monozyten wird CD133 nicht exprimiert<sup>71</sup>.

Das Stammzell-Antigen-1 (SCA-1) ist der wichtigste Stammzellmarker für murine hämatopoetische Vorläuferzellen<sup>163</sup>. Anti-SCA-1-Antikörper werden häufig verwendet in Kombination mit negativer Selektion für eine Reihe von Markern zur Isolation von murinen hämatopoetischen Stammzellen, typisch für hämatolymphoide Zelllinien (c-Kit negativ). SCA-1-positive Zellen finden sich in adultem Knochenmark, fetaler Leber und mobilisierten peripheren Blutzellen<sup>146, 191, 192, 222</sup>.

### 1.4.1.1 EPCs verbessern die Neovaskulogenese

Als einer der ersten Arbeitsgruppen zeigten Kocher et al. an einem experimentellen Ratten-Modell, dass humane Angioblasten des Knochenmarks 48 Stunden nach Infarkt intravenös transfundiert, die Neovaskularisation des Infarktgebietes verstärken, Apoptose und Remodelling reduzierten und zu einer Verbesserung der Myokardfunktion beitragen<sup>103</sup>. Im gleichen experimentellen Modell führte die Transfusion adulter EPCs des Menschen drei Stunden nach Verschluss LAD (Left Ascending Artery) zu einer Verbesserung der LV-Funktion nach 28 Tagen<sup>97</sup>. Am Hinterlaufischämiemodell verbesserte die Infusion von EPCs, die aus dem Knochenmark isoliert worden waren, die Neovaskulogenese und Perfusion<sup>92, 209</sup>.

In ersten klinischen Studien verbesserte die autologe Implantation von mononukleären Knochenmarkszellen bei Patienten mit peripherer Verschlusskrankheit den „Ankle-Brachial-Index“ und reduzierte die Beschwerden in Ruhe<sup>200</sup>. Die Transplantation ex vivo expandierter EPCs konnte in einer Studie von Assmus et al. die Flussreserve und die linksventrikuläre Funktion nach Myokardinfarkt verbessern<sup>14, 24, 175</sup>.

Die Mechanismen, mit denen EPCs zur verbesserten Angiogenese beitragen, sind Gegenstand aktueller wissenschaftlicher Diskussionen. Der ischämische Reiz scheint ein wichtiger Stimulus für das „Homing“ und die Inkorporation von EPCs in ischämisches Gewebe zu sein<sup>29</sup>. Die Rekrutierungs- und Adhäsionsmechanismen sind noch unklar und variieren in den unterschiedlichen verwendeten Populationen. Selektine<sup>57, 211</sup> und  $\beta_2$ -Integrine<sup>141, 208</sup> scheinen jedoch eine essentielle Rolle zu spielen.

Die Integration von EPCs in neue Gefäße variiert sehr stark in unterschiedlichen Studien<sup>3, 209, 228</sup>. Die absolute Anzahl inkorporierter EPCs in ischämischem Gewebe ist allerdings in allen Studien eher klein. Es wird daher vermutet, dass die Integration von EPCs in neue Gefäße nicht der wichtigste Mechanismus für die benefiziellen Effekte und die gesteigerte Neovaskularisation ist, sondern die parakrine Sekretion proangiogenetischer Faktoren eine wichtige Rolle spielt<sup>16, 161, 207</sup>.

Zusammengefasst exprimieren EPCs charakteristische Merkmale für frühe endotheliale Marker wie VEGFR2 sowie die Oberflächenmarker CD34, CD133 oder SCA-1. Sie haben ein großes proangiogenetisches Potential und verbessern nach Applikation in ischämische Areale die Neovaskulogenese<sup>16, 161, 208</sup>.

Mehrere Studien deuten darauf hin, dass auch andere Zellpopulationen in der Lage sind, einen endothelialen Phänotyp anzunehmen<sup>80, 87, 162</sup>. Dies trifft insbesondere auf

Progenitorzellen des embryonalen Organismus zu, in dem Vaskulogenese und Angiogenese in dichter Abfolge für Gefäß- und Organbildung mitverantwortlich sind.

### **1.4.2 Embryonale endotheliale Progenitorzellen**

In den oben genannten Arbeiten wurden überwiegend adulte EPCs verwendet. Vor einer Dekade konnte Hatzopoulos et al. erstmals murine EPCs embryonalen Ursprungs isolieren (eEPCs). Diese eEPCs wurden am Tag 7,5 aus der embryonalen Aorta entnommen und nach Kultivierung zu einer primären Zelllinie isoliert. Embryonale EPCs zeigen ein unbegrenztes stammzellartiges Wachstumspotential und einen stabilen Phänotyp in Kultur. Sie exprimieren die endothelspezifischen Gene wie Tie-2 und Thrombomodulin<sup>147</sup> sowie Stammzellmarker wie SCA-1 und andere embryonale und frühe endotheliale Marker<sup>74</sup>. Die in vitro Differenzierung mit Retinolsäure und cAMP führte zu 5 bis 10-facher Induktion von Flk-1, vWF, TM, Gata-4 und Gata-6 sowie weiteren embryonalen und endothelialen Expressionsmolekülen<sup>99, 119, 147</sup>. Da unstimulierte eEPCs kein MHC-1-Protein exprimieren, sind sie immunprivilegiert und zunächst resistent gegen zellvermittelte Zytolyse durch natürliche Killerzellen<sup>219</sup>. In einem Tumormodell wurden eEPCs nach intravenöser Injektion bevorzugt in hypoxische Lungenmetastasen rekrutiert. Dieses spezifische Homing war direkt abhängig vom lokalen Hypoxie- und VEGF-Level und reziprok zum Grad der Perfusion und der Gefäßdichte. Diese zirkulierenden eEPCs werden in Mikrogefäßen von Tumoren in speziellen Arealen verlangsamt, adhären und emigrieren in das Interstitium, wo sie multizelluläre Haufen formen oder sich in funktionale Gefäßnetze integrieren. Dabei sind E-Selektin, P-Selektin und PSGL-1 von funktioneller Relevanz für die Rekrutierung<sup>211</sup>. Die Rolle von ICAM-1, welches für die Adhäsion von Leukozyten essentiell ist, ist bisher in eEPCs noch nicht untersucht worden.

### **1.4.3 Mobilisation autologer EPCs des Knochenmarks**

Als alternative Behandlungsstrategie zur Applikation ex vivo expandierter EPCs wird zurzeit die Mobilisation autologer Knochenmarkszellen durch Applikation von Zytokinen experimentell und in klinischen Studien untersucht. Bei der Behandlung von hämatologischen Krankheitsbildern und bei Knochenmarkstransplantationen, aber auch begleitend zur Chemotherapie, spielen Kolonie-stimulierende Faktoren schon seit Jahren eine wichtige Rolle. Die Applikation von Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierendem Faktor (GM-CSF) und von Granulozyten Kolonie-

stimulierendem Faktor (G-CSF) bewirkt eine effektive Mobilisation der peripheren Blutvorläuferzellen<sup>28, 94</sup>. Neben Granulozyten und Monozyten werden auch CD34-positive endotheliale Progenitorzellen vermehrt gebildet und aus dem Knochenmark ausgeschwemmt<sup>182, 214</sup>.

1999 zeigte die Arbeitsgruppe von Asahara und Isner erstmals, dass die Vorbehandlung mit GM-CSF zu einer Mobilisation endothelialer Progenitorzellen aus dem Knochenmark führt und die Neovaskulogenese in ischämischen Arealen verbessert<sup>197</sup>. Andere Gruppen konnten in tierexperimentellen Studien mittels Applikation von G-CSF eine geringere Mortalität, geringere Infarktgröße und verbesserte Funktion beobachten<sup>96, 155, 184</sup>. Auch in klinischen Studien wurde bereits die Applikation von G-CSF nach Herzinfarkt erprobt, allerdings ohne eindeutigen Erfolg<sup>85, 86, 229</sup>. In den o. g. Studien wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten verschiedene Mengen an Zytokinen gegeben. Eine einheitliche Strategie zur Behandlung ist bisher noch nicht gefunden worden.

## **1.5 Zielsetzung:**

Auf Grund der oben beschriebenen Erkenntnisse sollten in dieser Arbeit folgende Fragestellungen untersucht werden:

1. In wieweit beeinflussen Thrombozyten den leukozyten-assoziierten myokardialen Ischämie/Reperfusionsschaden?
2. Welche Adhäsionsmoleküle spielen bei der Thrombozyten/Leukozyten-Interaktion eine signifikante Rolle?
3. Ist die Reduktion der Leukozytenadhäsion für den chronischen Ischämie/Reperfusionsschaden relevant?
4. Welche funktionelle Relevanz hat die Therapie embryonaler EPCs auf den chronischen Ischämie/Reperfusionsschaden?
5. Ist die Mobilisation von adulter Knochenmarkszellen mittels GM-CSF vergleichbar mit der Behandlung durch embryonale EPCs für die postischämische linksventrikuläre Funktion?

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Versuchstiere

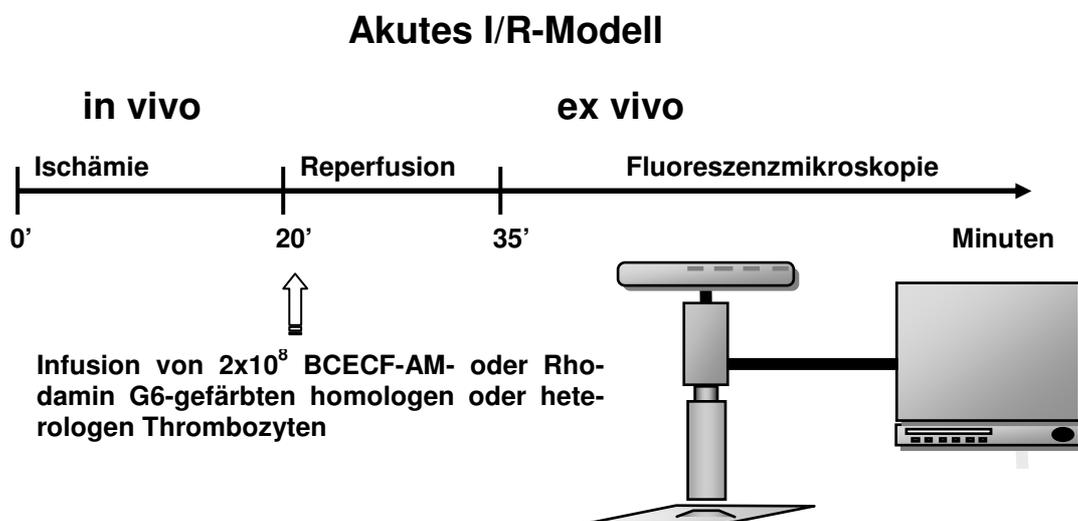
Für die tierexperimentellen Versuche wurden Mäuse mit C57/B6 Hintergrund (Charles River WIGA (Deutschland) GmbH, Sulzfeld) verwendet. Neben Wildtyp-Tieren wurden P-Selektin-, ICAM-1- und ICAM-1/P-Selektin-defiziente Tiere des selben Hintergrundes verwendet (Jackson Lab, Bar Harbor, Maine, USA, nach Angaben von Jackson Labs wurden die Tiere mit dem C57/B6-Hintergrund der entsprechenden 10. Generation zurückgekreuzt.).

P-Selektin-Defizienz auf den Plättchen, sowie die ICAM-1-Defizienz wurden mittels FACS-Analyse verifiziert.

Die Mäuse wurden bei kontrolliertem Tag-/Nachtzyklus in Gruppen von 3 bis 5 Tieren in Makrolon- Käfigen gehalten und hatten freien Zugang zu Wasser und einem Standardfutter (Ssniff Spezialdiäten, Soest, Deutschland).

### 2.2 Akutes Ischämie/Reperfusionmodell

Zur Analyse der Rekrutierungsmechanismen von Leukozyten und Thrombozyten wurde ein Modell der akuten *in vivo* Ischämie und Reperfusion gewählt, in dem Wildtyp und transgene Tiere einer 20-minütigen myokardialen Ischämie und anschließend einer 15-minütigen Reperfusion ausgesetzt wurden. Nach Beendigung der Reperfusion wurden die Herzen mit saliner Lösung für 2 Minuten retrograd perfundiert,



**Abb. 3:** Versuchsschema der akuten Ischämie und Reperfusion. Nach 15 Minuten Reperfusion wurde das Herz explantiert und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert.

um nicht-adhärenente Leukozyten und Thrombozyten auszuwaschen. Anschließend wurde das Herz explantiert, auf einen speziellen Objektträger gebettet und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Diese Analysen wurden auf Videoband aufgezeichnet und später offline, geblindet ausgewertet.

<b>Gruppe A</b>		Tiere [n]
Empfängerhintergrund	Thrombozytenhintergrund	
Sham	+ homolog	6
I/R WT	+ homolog	6
I/R P-Sel -/-	+ homolog	6
I/R ICAM-1/P-Sel -/-	+ homolog	6
I/R WT	+ homologe Thrombozyten + Tirofiban	6
I/R ICAM-1/P-Sel -/-	+ homologe Thrombozyten + Tirofiban	6

**Tabelle 1:** Versuchsgruppen zur Untersuchung der Leukozyten, Thrombozyten und Leukozyten/Thrombozyten-Co-Aggregate. In zwei Versuchsreihen wurden die infundierten Thrombozyten vor Applikation in Tirofiban inkubiert (siehe Punkt 2.2.2.1).

<b>Gruppe B</b>		Tiere [n]
Empfängerhintergrund	Thrombozytenhintergrund	
ICAM-1/P-Sel -/-	WT	6
ICAM-1/P-Sel -/-	P-Sel -/-	6
ICAM-1/P-Sel -/-	ICAM-1/P-Sel -/-	6
ICAM-1/P-Sel -/-	WT + Tirofiban	6

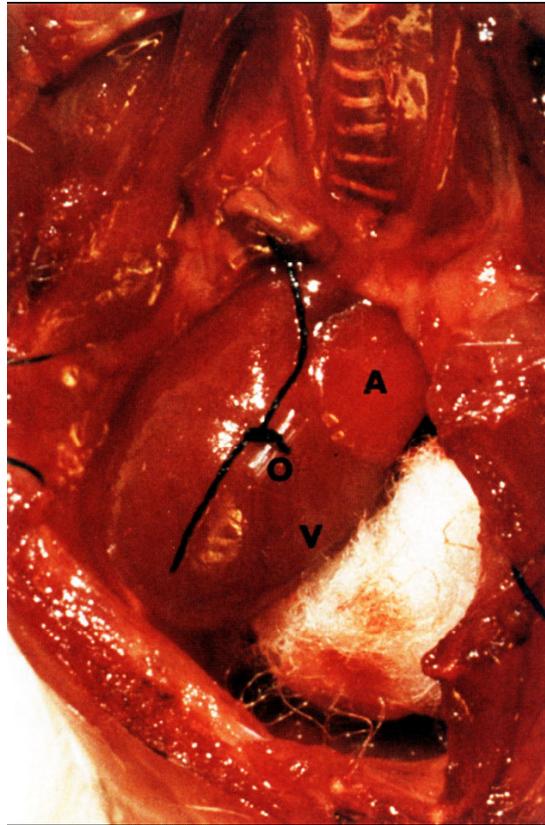
**Tabelle 2:** Versuchsgruppen zur Untersuchung der thrombozyten-medierten Leukozytenrekrutierung. In ICAM-1/P-Selektin-defiziente Empfänger wurden heterologe Thrombozyten mit unterschiedlichem Genotyp infundiert. In einer Gruppe wurden die Thrombozyten vor Applikation in Tirofiban inkubiert (siehe Punkt 2.2.2.1).

## 2.2.1 Infarktinduzierung

Die Narkose wurde durch eine intraperitoneale Kombinationsinjektion, bestehend aus 0,1mg/g Körpergewicht Ketaminhydrochlorid (Ketavet® 100mg/ml, Pharmacia GmbH Erlangen, Deutschland) und 0,02 mg/g Körpergewicht 5.6-dihydro-2-(2.6-xylidino)-4H-1.3-Thiazinehydrochlorid bzw. Xylazinhydrochlorid (Rompun® 2%, Bayer, Leverkusen, Deutschland) eingeleitet. Die Phase der chirurgischen Toleranz trat nach ungefähr 5 Minuten ein und hielt etwa 45 Minuten an. Bei längerer Versuchsdauer wurde jeweils nach Bedarf nachdosiert. Die Operationstechnik wurde bereits 1995 von

Michael et. al beschrieben<sup>144</sup>. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen fanden jedoch geringe Modifizierungen statt. Nach Wirkungseintritt der Narkose wurde die linke Thoraxhälfte der Maus rasiert, dann wurde das Tier mit dem Rücken auf eine Wärmeplatte gelegt (Eigenbau), die Arme und Beine der Maus mit Klebestreifen auf der Wärmeplatte fixiert und der Oberkiefer mit einem 5-0er Faden rekliniert. Zur Kontrolle der Körpertemperatur wurde eine Temperatursonde rektal eingeführt und die Körperkerntemperatur konstant auf 36,8°C gehalten. Die Tiere wurden tracheotomiert (19 Gauge Trachealkanüle, Hugo-Sachs-Elektronik, March-Hugsstetten, Deutschland (HSE)) und das kraniale Ende der Kanüle wurde über einen Plastikschlauch mit einem volumengesteuerten Beatmungsgerät (Minivent, Type 845, HSE) verbunden. Je nach Größe des Tieres wurde die Maus initial mit einem Volumen von ungefähr 150-175µl und einer Frequenz von 150 Zügen pro Minute beatmet. Im Anschluss hieran wurde ein Katheter in der rechten Vena jugularis platziert. Dazu wurde die rechte Vena jugularis freipräpariert und ein leicht schräg angeschnittener PE-Katheter (ID 0,4 mm; OD 0,8 mm) eingeführt. Am distalen Ende des Katheters befand sich eine Kanüle (27G Microlance™, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg Deutschland (BD GmbH)) und eine 1ml Spritze (Plastipak™, BD GmbH) zur Injektion der benötigten Substanzen. Nach erfolgreicher Anlage des Katheters wurde die Maus leicht nach rechts verlagert um besseren Zugang für die laterale Thorakotomie zu haben. Danach wurde die über dem linken Thorax liegende Haut im Bereich des dritten Interkostalraumes mit einer Hautschere eröffnet. Die darunter liegende Muskulatur wurde auseinander präpariert und gegebenenfalls durchtrennt. Im Bereich des dritten Interkostalraumes wurde die Zwischenrippenmuskulatur eröffnet. Um einen freien Zugang zum Herzen zu ermöglichen, wurde ein Thoraxretraktor eingespannt. Die linke Koronararterie wurde ca. 1 mm unterhalb des Herzohres mit einer 8-0 Prolene Fadenkombination einer CC 9,3mm 3/8c Nadel (Ethicon, Johnson & Johnson Intl, St-Stevens-Woluwe, Belgien (J&J Intl.)) umstoßen. Um eine spätere Reperfusion zu ermöglichen, wurde ein ungefähr 1,5 mm großes Stück Polyethylen-Plastikschlauch (PE-10; ID 0,61 mm; OD 0,92 mm) auf die zu okkludierende Arterie aufgelegt und hiernach die Arterie durch Ligatur verschlossen. Um eine Austrocknung des Gewebes zu vermeiden, wurden das Schwämmchen, der Retraktor und die Muskulaturfäden entfernt, die Muskulatur mit einem mit NaCl-benetzten Tupfer befeuchtet und wieder übereinander gelegt. Während der gesamten Operationszeit wurde in regelmäßigen Abständen die Muskulatur immer wieder mit NaCl-Lösung befeuchtet. Nach 20-minütiger Ischämie wurde das PE-Röhrchen entnommen und es

folgte eine 15-minütige Reperfusionphase. Zu Beginn der Reperfusion wurden je nach Protokoll die isolierten Thrombozyten ( $2 \times 10^8$ ) langsam über den zuvor angelegten Katheter in die Vena jugularis injiziert. Gegebenenfalls wurden kurz vor der Reperfusion zur Färbung der Leukozyten 50µl 0,05%-iges Rhodamin G6 (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) über den Jugulariskatheter appliziert.



**Abb. 4:** Fotografie einer Maus mit eröffnetem Thorax und Okklusion der linken Koronararterie. **A:** Linkes Atrium; **V:** freie Wand des linken Ventrikels; **O:** Okklusion. Quelle: L.H. Michael et al. AJP 1995

Nach 15 Minuten Reperfusion wurde zum Auswaschen nicht adhärenter Blutbestandteile noch in vivo die Aorta oberhalb des Abganges des Truncus brachiocephalicus eingeschnitten und eine stumpfe 22G Kanüle eingeführt. Diese wurde mit einem zuvor vorgelegtem Faden fixiert und saline Lösung wurde über zwei Minuten retrograd über eine Perfusorleitung infundiert. Dabei wurde der systolische Druck von 80mmHg nicht überschritten.

Anschließend wurde das Herz explantiert, auf einen speziellen Objektträger gebettet und die Oberfläche des linken Ventrikels (LV) unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die Oberfläche des LV wurde mittels angeschlossener Kamera visualisiert und per SVHS-Video aufgenommen. Dabei wurden distel der Einstichstelle neun Ge-

sichtsfelder aus dem ischämischen Areal analysiert und später offline ausgezählt (siehe Punkt 2.2.4).

## **2.2.2 Leukozyten- und Plättchenadhäsion in der akuten Reperfusion**

Fluoreszenzmarkierte Leukozyten- und Thrombozytenadhäsion wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie in den epikardialen Gefäßen nachgewiesen. Zur Analyse der Leukozyten wurde kurz vor Beginn der Reperfusion Rhodamin G6, das sofort von Leukozyten aufgenommen wird, in die V. Jugularis injiziert. Durch die Injektion von Rhodamin G6 können über 99% aller zirkulierenden Leukozyten in vivo angefärbt werden<sup>105, 137</sup>.

Im Unterschied zu den Leukozyten, die in vivo durch i. v. Injektion von Rhodamin G6 anfärbt werden können, mussten die Thrombozyten isoliert und ex vivo markiert werden<sup>137</sup>. Durch die ex vivo Präparation konnten wir eine ausreichende Beladung der Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff erzielen.

Thrombozyten wurden vor dem Versuch Spendertieren wie unten beschrieben entnommen, ex vivo mit BCECF-AM markiert und reinjiziert. Zur Darstellung einzelner Thrombozyten wurden Rhodamin G6 markierte Plättchen injiziert.

### **2.2.2.1 Thrombozytenentnahme und Präparation**

Die Spendertiere wurden wie unter Punkt 2.2.1 beschrieben mittels i.p. Narkose betäubt, fixiert und das Blut mit einer 1ml Spritze, die jeweils 100µl Citrat (Merck Pharma GmbH, Darmstadt) enthielt, entnommen. Dabei wurde mit einer 25G Kanüle der linke Ventrikel direkt durch den vierten oder fünften Interkostalraum punktiert. Insgesamt konnten so ca. 1ml Blut gewonnen werden. Das Blut wurde dann zentrifugiert (800g, 5 Minuten) und das plättchenreiche Plasma abpipettiert. Dieses wurde mit calciumfreien PBS gewaschen und erneut zentrifugiert (2000g, 5 Minuten). Anschließend wurde der Überstand erneut abpipettiert und das Plättchen-Pellet mit 100µl calciumfreien PBS resuspendiert. Zur Darstellung der Thrombozyten/Leukozyten-Co-Aggregate wurde die Suspension für 10 Minuten mit 25µl BCECF-AM und zur Einzeldarstellung der Thrombozyten mit 50µl Rhodamin G6 (0,05%) inkubiert. In den entsprechenden Gruppen wurden die Thrombozyten mit 50µl Tirofiban (entsprechend 12,5µg) für 10 Minuten inkubiert.

Anschließend wurden die Plättchen erneut gewaschen, mit 200µl calciumfreien PBS resuspendiert und mit einem Coulter A<sup>C</sup>T Counter (Coulter Corp., Miami, FL, USA)

gezählt. Dann wurde ein entsprechendes Volumen der Suspension, welches ca.  $2 \times 10^8$  Thrombozyten enthielt, wie unter Punkt 2.3.1 beschrieben, infundiert.

Bei Mäusen liegt die physiologische Plättchenanzahl bei ca.  $6 \times 10^5$   $\mu$ l Vollblut. Bei einem Blutvolumen von ca. 0,75 ml/10g lag der Anteil markierter Thrombozyten an der Gesamtpopulation zirkulierender Thrombozyten damit bei ca. 15-20%<sup>135</sup>.

### **2.2.3 Konzentrationsbestimmung des GPIIb/IIIa-Antagonisten**

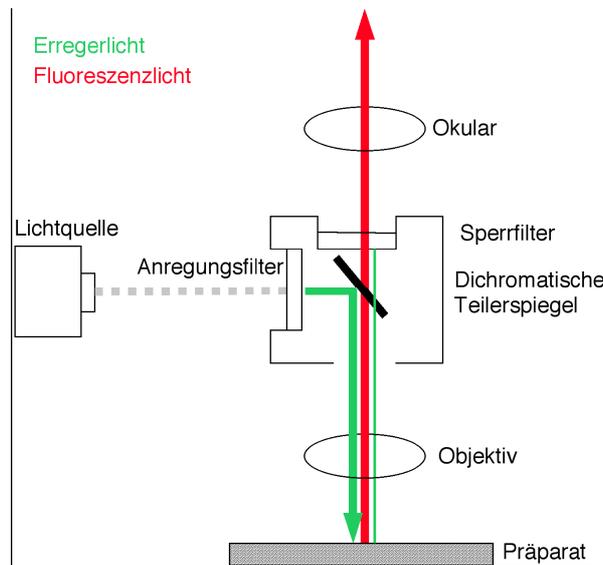
Zur funktionellen Prüfung und zur Bestimmung der Konzentration des GPIIb/IIIa-Antagonisten Tirofiban (Aggrastat<sup>®</sup>, MSD, Sharp & Dohme GmbH, Haar, Deutschland), wurden Thrombozyten aus WT-Mäusen isoliert und mit unterschiedlichen Tirofiban-Konzentrationen inkubiert. Microtiter-wells, beschichtet mit Maus-Fibrinogen, wurden mit diesen Rhodamin-gefärbten Thrombozyten inkubiert. Nach 5 Minuten Zentrifugation wurden nicht-adhärenente Plättchen entfernt und adhärenente Plättchen mittels Fluoreszenzmikroskopie gezählt. Tirofiban wurde je nach Protokoll systemisch infundiert oder mit den Spender-Thrombozyten inkubiert. Bei der systemischen Infusion wurden 0,36 $\mu$ g/g Körpergewicht infundiert (vergleiche Punkt 3.1.3 und Abb. 14). Die Präparation und Inkubation der Thrombozyten ist unter Punkt 2.2.2.1 im Detail beschrieben.

### **2.2.4 Fluoreszenzmikroskopie**

Mit dieser Methode ist es möglich Adhäsion, Rekrutierung und Bildung von Co-Aggregaten im epikardialen Myokard zu untersuchen. Zur Analyse der Leukozyten wurde Rhodamin G6 (50 $\mu$ l, 0,05%-ig) kurz vor Beginn der Reperfusion über den Jugulariskatheter infundiert. Zur Co-Aggregat Darstellung wurden BCECF-AM gefärbte Thrombozyten zu Beginn der Reperfusion verabreicht. Um einzelne Thrombozyten darzustellen wurden in parallelen Experimenten Rhodamin G6 gefärbte Thrombozyten injiziert.

Es wurde ein modifiziertes Leitz-Orthoplan Mikroskop mit einer 100 Watt Quecksilberlampe, verbunden mit einem „Ploemo-Pack Illuminator“ (Leitz, Wetzlar, Deutschland), verwendet. Mit einem 10-fach Objektiv (W10/0.6; Leitz, Wetzlar, Deutschland) wurden die Bilder auf einem Videoscreen vergrößert (PVM-1442 QM, diagonal 33 cm; Sony, München, Deutschland). Zur Aufnahme wurde eine “charge-coupled device” (CCD) Videokamera (FK 6990, Cohu, Prospective Measurements, San Diego,

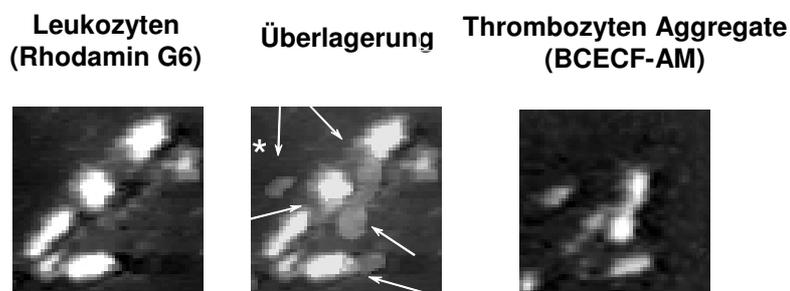
CA, USA) verwendet und die Bilder zu einem Videorekorder-System transferiert (S-VHS Panasonic AG 7330; Matsushita Electric, Tokio, Japan).



**Abb.: 5:** Schematische Darstellung der Fluoreszenzmikroskopie

Für die Darstellung der Rhodamin G6 markierten Zellen wurde ein N2 Filter Block (Excitation: 530 bis 560 nm; Emission, >580nm, Leitz) verwendet. Die Thrombozyten/Leukozyten-Co-Aggregate wurden mittels I2,3 Filter Block (Excitation: 450 bis 490nm; Emission >515 nm, Leitz) für die BCECF-AM markierten Thrombozyten dargestellt. Nach Platzierung des Herzens unter dem Mikroskop wurden neun Gesichtsfelder im ischämischen Areal dargestellt und mit der angeschlossenen Kamera für je 5-10 Sekunden aufgezeichnet. Durch Umschalten des Filterblocks während der Messung konnten Co-Aggregate detektiert werden. Die Auszählung erfolgte offline durch einen geblindeten Untersucher.

### Leukozyten/Thrombozyten-Co-Aggregate



**Abb. 6:** Beispiel für Leukozyten-Thrombozyten-Co-Aggregatbildung. Links Rhodamin gefärbte Leukozyten, rechts BCECF-AM-gefärbte Thrombozyten. Im mittleren Bild die Überlagerung der beiden Bilder. Die Pfeile zeigen Thrombozytenaggregate, die an Leukozyten adhären. Der mit dem Sternchen markierte Pfeil zeigt Thrombozyten die nicht mit Leukozyten interagieren<sup>115</sup>.

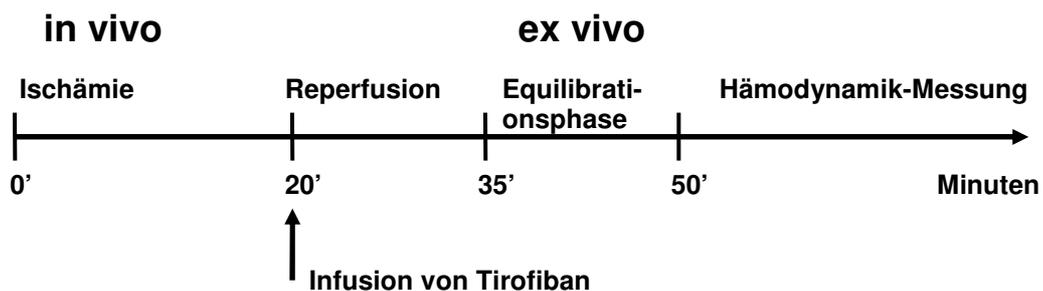
## 2.2.5 Funktionsanalyse nach Ischämie und Reperfusion am isolierten Herzen

Zur genaueren Analyse der funktionellen Relevanz wurden bei einigen Gruppen die Herzen nach Ischämie und Reperfusion explantiert und ex vivo retrograd im Langendorff-Modus perfundiert (s. u.). Gleichzeitig wurde ein Druckballon in den linken Ventrikel eingeführt und der entwickelte Druck sowie die globalen Parameter  $dP/dt_{max}$  und  $dP/dt_{min}$  analysiert.

### 2.2.5.1 Präparation der isolierten Herzen

Nach 15 Minuten Reperfusion wurde die Aorta freigelegt, zwischen dem Abgang des Truncus brachiocephalicus und Aorta ascendens eingeschnitten und eine modifizierte Kanüle in die Aorta eingeführt. Die Kanüle wurde mit einem vorgelegten Faden (6-0 Prolene, Ethicon, Johnson & Johnson Intl, St-Stevens-Woluwe, Belgien) fixiert, anschließend das Herz retrograd mit einer modifizierten Krebs-Henseleit-Lösung perfundiert ( $CaCl_2$  2,5mM,  $KH_2PO_4$  1,2mM, Pyruvat 2,0mM, KCl 3,8mM,  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  1,2mM,  $NaHCO_3$  15,5mM, Glukose 11,5mM, Mannitol 16mM, NaCl 121,5mM, EDTA 0,05mM). Sodann wurde das Herz schnell exzidiert und in eine Working Heart/Langendorff Apparatur eingespannt.

### Langendorff-Modell- Protokoll



**Abb. 7 (oben), Tabelle 3 (unten):** Experimentelles Protokoll zur Untersuchung des Einflusses der Leukozytenadhäsion auf die postischämische linksventrikuläre Funktion mittels Langendorff-Modell. Nach 20 Minuten Ischämie und 15 Minuten Reperfusion wurden die Herzen explantiert gefolgt von 15 Minuten Equilibrationsphase. Anschließend folgte die hämodynamische Messung. Zwei Gruppen erhielten zu Beginn der Reperfusion Tirofiban ( $0,36\mu g/g$  KG, vergleiche Punkt 3.1.3).

Gruppe C	Tiere [n]
Sham	8
I/R WT	8

I/R P-Sel -/-		8
I/R ICAM-1/P-Sel -/-		8
I/R WT	+ Tirofiban	8
I/R ICAM-1/P-Sel-/-	+ Tirofiban	8

---

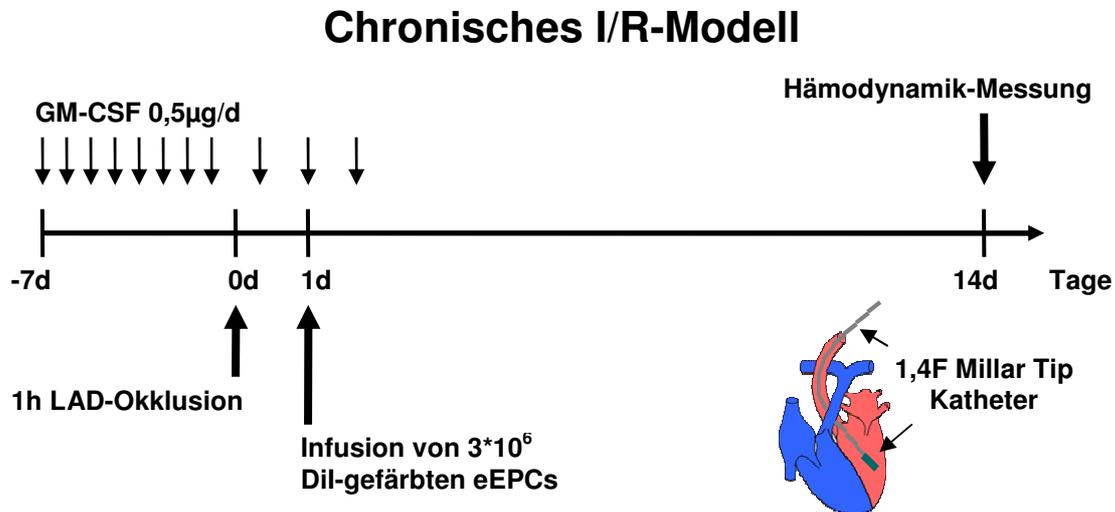
### 2.2.5.2 Langendorff/Working-Heart

Das Langendorff/Working-Heart ermöglicht es das Herz unter isolierten Bedingungen zu untersuchen. Dabei wird das Herz retrograd mit einer modifizierten Krebs-Henseleit-Lösung perfundiert. Es können so z. B. Adhäsionsmechanismen aber auch Funktionsparameter untersucht werden.

Das Perfusat wurde in einem Wasserbad auf 37°C erhitzt, mit Sauerstoff (2L/Minute  $pO_2 > 300\text{mmHg}$ ) und Kohlendioxid (0,04%,  $pCO_2$  35-45mmHg) angereichert und konstant ein pH von 7,4 aufrechterhalten. Mit einer Peristaltik-Pumpe (Reglo analog MS-2/6-160, HSE, Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten) wurde das Perfusat durch einen Mikrofilter (Millex GP-Filter 0,22 $\mu\text{m}$ , Millipore, Bedford, MA, USA) zu einer Heizspirale und weiter durch eine Luftfalle geleitet. Anschließend wurde das Perfusat zur modifizierten Kanüle in die Aorta des isolierten Herzen geleitet mit einem konstanten Druck von 80mmHg infundiert. Zur Überwachung des Druckes wurde zwischen Luftfalle und Kanüle eine Druckmess-Einheit (Statham Transducer, BD GmbH) angeschlossen. Der Fluss konnte über die Pumpe geregelt und druckreguliert gesteuert werden. Das isolierte Herz wurde mit der Spitze in einem Wasserbad mit einer Temperatur von 37°C gelagert. Zur Funktionsmessung wurde ein Ballon über den linken Vorhof in den linken Ventrikel eingeführt. Dieser Ballon bestand aus einem 22G Venenverweilkatheter, an dessen Spitze ein mit Flüssigkeit gefüllter Ballon montiert war, um den Übertragungsverlust möglichst gering zu halten. Dieser modifizierte Katheter wurde ebenfalls an eine Druckaufnahme-Einheit (Statham Transducer, BD GmbH) angeschlossen. Die Druckaufnahme-Einheiten wurden an einen Signalverstärker (DC Bridge Amplifier, Type 660, HSE) angeschlossen, von dem das Signal über einen BNC-Connectorblock (BNC Connector Block, HSE) und A/D-Wandler-Messkarte (DT301, Data Translation Inc., California, USA) auf einen Computer übertragen und aufgezeichnet werden konnte. Zur Darstellung und Analyse des Signals wurde das Programm DASYLAB (National Instruments Irland Resources Limited, Irland) verwendet. Nach der Präparation folgte zunächst eine 15-minütige Equilibrationsphase, anschließend wurden die oben genannten Parameter registriert und später offline und geblindet ausgewertet.

## 2.3 Chronisches Ischämie/Reperfuionsmodell

Für den zweiten Teil der Arbeit wurde ein chronisches Ischämie/Reperfuionsmodell gewählt. Die Tiere wurden zunächst einer einstündigen Ischämie unterzogen.



**Abb. 8:** Schematische Darstellung des chronischen Ischämie/Reperfuionsmodells. Nach 60 Minuten Ischämie folgte 14 Tage Reperfusion. Je nach Gruppe wurden Dil-gefärbte eEPCs 24h Stunden nach Ischämie, GM-CSF 7 Tage vor oder unmittelbar nach Ischämie appliziert.

Je nach Gruppe wurden die Tiere prä- und postischämisch behandelt. Nach 14 Tagen Reperfusion wurden funktionelle Parameter, wie unten beschrieben, analysiert. Anschließend die Herzen explantiert und weiter histologisch bearbeitet.

Gruppe D	Tiere [n]
Sham	8
I/R WT	8
I/R ICAM-1 -/-	8
I/R WT + eEPCs	8
I/R ICAM-1 -/- + eEPCs	8
WT I/R + GM-CSF präischämisch	8
WT I/R + GM-CSF postischämisch	8

**Tabelle 4:** Versuchsgruppen des chronischen Ischämie/Reperfuionsmodells. WT-Tiere und ICAM-1-defiziente Tiere wurden nach Ischämie und Reperfusion (I/R) untersucht. Zwei Gruppen wurden mit eEPCs behandelt. Zwei weitere Gruppen wurden entweder 7 Tage vor Ischämie oder direkt nach Ischämie mit GM-CSF behandelt (s. Abb. 8).

### **2.3.1 Infarktinduzierung**

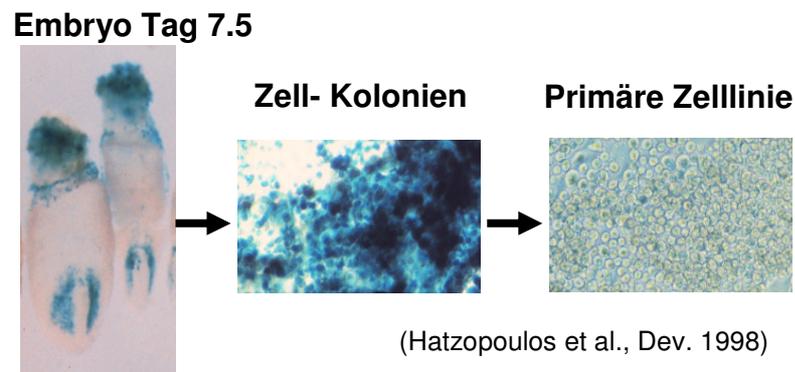
Das chronische Ischämie/Reperusionsmodell unterscheidet sich in einigen Punkten von dem akuten Modell. Nach Eintritt der Narkose wurden die Tiere mit einem Faden an den Vorderzähnen auf einer Schräge fixiert. Dann wurde die Zunge leicht retraktiert, die Stimmritze mit Hilfe einer Pinzette dargestellt und unter Sicht der Tubus (modifizierter Venenverweilkatheter 22G, Insyte-W<sup>TM</sup>, BD GmbH) eingeführt. Anschließend wurde die Maus auf dem Operationstisch platziert und die korrekte Lage des Tubus kontrolliert. Die Beatmung erfolgte durch Anschluss an die Beatmungsmaschine nach dem unter Punkt 2.2.1 beschriebenen Schema.

Die Instrumentierung erfolgte wie schon unter Punkt 2.4.1 beschrieben, allerdings wurde kein venöser Katheter gelegt. Nach 60-minütiger reversibler LAD-Okklusion wurde die Ligatur über dem Gefäß gelockert und entfernt und es folgte die Reperusionsphase. Sodann wurden die Rippen und Muskeln wieder adaptiert und mit zwei bis drei Einzelheftnähten (Polene, 6-0, Ethicon, J & J Int, USA) verschlossen. Anschließend wurde die Haut mit Einzelheftnähten wieder adaptiert. Während des gesamten Versuchs wurde Sauerstoff zur Beatmungsluft zugegeben. Die Maus wurde sobald als möglich von der Beatmung genommen und bis zum vollständigen Erwachen in eine Box mit 30%-igem Sauerstoff unter eine Wärmelampe gelegt, um ein Auskühlen zu vermeiden. Zur postoperativen Analgesie wurden nach Extubation 0,01mg/kgKg Buprenorphin (Temgesic<sup>®</sup>, Essex Pharma, München, Deutschland) i.p. gespritzt. Die Analgesie wurde gegebenenfalls nach 12h bzw. nach 24h wiederholt. Zur Kontrolle wurden "Sham-Operationen" durchgeführt. Sham-operierte Tiere wurden der gleichen chirurgischen Prozedur unterzogen, ohne jedoch die linke Koronararterie zu umstechen und zu verschließen. Die Gesamtdauer der Operation betrug ungefähr 1,5h. Nach erfolgreicher Operation wurden die Tiere zwei Wochen lang unter Standardbedingungen gehalten. Abschließend wurden die Herzfunktionen bestimmt, die Herzen entnommen und histologisch untersucht.

### **2.3.2 Isolation embryonaler endothelialer Progenitorzellen**

Die eEPCs wurden uns von der Arbeitsgruppe von Antonis Hatzopoulos aus der GSF in München, Großhadern zur Verfügung gestellt<sup>74</sup>. Die Zellen werden am Tag 7,5 der Embryonalentwicklung aus den Vascular Bodies einer transgenen Maus isoliert und kultiviert. EEPCs zeichnen sich unter anderem dadurch aus, dass sie frühe endotheliale Marker wie z. B. Tie-2 und Thrombomodulin exprimieren, während nach Diffe-

renzierung mit cAMP und Retinolsäure typische endotheliale Marker wie zum Beispiel von-Willebrand-Faktor im FACS nachweisbar sind. In Zellkultur sind diese eEPCs ohne Veränderung des Phänotyps teilungsfähig.



**Abb. 9:** Isolation embryonaler endothelialer Progenitorzellen. Die Zellen werden am Tag 7,5 der Embryonalentwicklung aus den Vascular Bodies einer transgenen Maus isoliert und kultiviert

### 2.3.3 Applikation der eEPCs

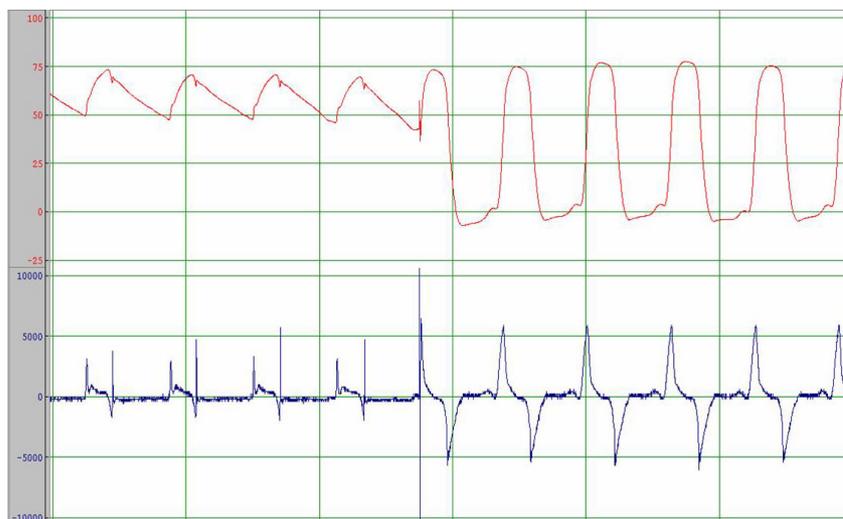
24 Stunden nach myokardialer Ischämie wurden den Tieren 250µl PBS mit  $3 \times 10^5$  eEPCs oder 250µl PBS ohne Zellen über die Schwanzvene injiziert. Dazu wurde ein spezieller Katheter aus einer abgebrochenen Injektionsnadel angefertigt (30½ G Microlance™, BD GmbH), die am stumpfen Ende auf einen PE-Schlauch (ID 0,28mm OD 0,62mm) aufgesetzt wurde. Am distalen Ende wurde eine 1ml Spritze mit einer 27G Kanüle angeschlossen. Die Maus wurde fixiert und die Zellen bzw. das PBS langsam nach Punktion der lateralen Schwanzvene infundiert.

### 2.3.4 Applikation von GM-CSF

Die Tiere wurden, je nach Gruppen, entweder 7 Tage präoperativ oder 7 Tage postoperativ mit GM-CSF behandelt (0,5µg/d, i.p.). Zur Kontrolle der Wirksamkeit wurde das Blut von behandelten und unbehandelten Tieren per FACS analysiert (n=3). GM-CSF-Applikation führte zu einem 1,6-fachen Anstieg der mononukleären Zellen sowie zu einem 1,4-fachen Anstieg der CD34-positiven Zellen innerhalb der mononukleären Zellpopulation. Insgesamt resultierte quantitativ ein 2,2-facher Anstieg der zirkulierenden Zellen<sup>114</sup>.

### 2.3.5 Hämodynamische Messungen

Zwei Wochen nach der myokardialen Ischämie wurden die Herzfunktionen durch invasive Messungen bestimmt. Hierfür wurden die Tiere mit Pentobarbital intraperitoneal (50 mg/kgKG, Trapanal, Byk Gulden, Konstanz) narkotisiert und anschließend wieder auf dem Operationstisch platziert. Die Körpertemperatur wurde dabei konstant bei 37°C gehalten. Nach einem Hautschnitt rechts etwas lateral der Trachea wurde diese frei präpariert und nach Einschnitt ein abgeschnittener 20 G Venenverweilkatheter eingeführt, um die Atmung zu erleichtern. Danach wurde das Carotisdreieck frei präpariert und die Arteria carotis communis freigelegt. Der Nervus vagus wurde vorsichtig separiert und das Gefäß mit einem 0-5er Faden unterminiert. Der Faden wurde distal auf Höhe der Carotidgabel ligiert und leichter Zug auf die Arterie gelegt. Zwei weitere Fäden wurden um das Gefäß geführt und Knoten vorgelegt. Mit dem caudalen Faden wurde das Gefäß proximal temporär abgebunden und im distalen Drittel mit einer Feinschere eingeschnitten. Mit Hilfe einer an der Spitze abgebogenen Kanüle wurde ein 1,4 french Millar Tip Pressure-Transducer (Millar Instruments, Houston, Texas, USA) in das Gefäß eingeführt. Dieser wurde nun mit dem mittleren Faden gesichert, anschließend der proximale Verschluss gelöst und der Katheter weiter bis in den linken Ventrikel avanciert. Die richtige Lage konnte durch Überwachung der Druckkurven überprüft werden (siehe Abb. 10).



**Abb. 10:** Beispiel für eine Messung mittels Millar Tip-Katheter. Abgebildet ist links eine typische Aortenkurve. Nach Passieren der Aortenklappe zeigt sich eine typische linksventrikuläre Druckkurve.

Der Messkatheter war über eine Transducer Control Unit (Model Tc-510, Millar Instruments) an einen Signalverstärker (DC Bridge Amplifier, Type 660, HSE) ange-

geschlossen, von dem das Signal über einen BNC-Connectorblock (BNC Connector Block, HSE, ) und eine A/D-Wandler-Messkarte (DT301, Data Translation, Bietigheim Bissingen, Deutschland) auf Computer übertragen und aufgezeichnet werden konnte. Zur Darstellung und Analyse des Signals wurde das Programm DASYLAB (National Instruments Irland Resources Limited) verwendet. Aus der Druckkurve des linken Ventrikels wurden die Parameter des linksventrikulär entwickelten Druckes (LVDP) sowie dessen Anstiegsgeschwindigkeit ( $dP/dt_{max}$ ,  $dP/dt_{min}$ ) als globale Kontraktilitäts- und Relaxationsparameter des linksventrikulären Druckes analysiert.

### **2.3.6 Histologie**

Nach Beendigung der Messung wurde die Maus getötet und das Herz sowie ggf. Lunge, Leber und Milz entnommen und in TissueTec (Sakure Fintek Europe, Zoeterwoude, NL) eingebettet. Anschließend wurden die Organe auf Trockeneis eingefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Für die folgenden Analysen wurden sagittale Schnitte der Herzen angefertigt.

#### **2.3.6.1 Zelnachweis**

Zum Nachweis der Zellen wurden Dil-gefärbte eEPCs verwendet (Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe). Behandelte Tiere wurden nach sieben Tagen geopfert und die Herzen histologisch mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Zur Darstellung der Gefäße wurde den Tieren fünf Minuten vor Organentnahme FITC-markiertes Promatita Lectin (Sigma, Deisenhofen) injiziert. Nach histologischer Präparation wurden die Herzen mit einem Fluoreszenzmikroskop (CZ AG) untersucht. Als Lichtquelle diente eine 50Watt Quecksilberlampe (HBO50), für die Darstellung der Dil-markierten Zellen wurde ein N2 Filter Block (Excitation: 530 bis 560 nm; Emission:  $>580\text{nm}$ ) verwendet. Das Lectin gefärbte Endothel wurde mittels I 2,3 Filter Block (Excitation: 450 bis 490nm; Emission:  $>515\text{ nm}$ , (CZ AG) dargestellt. Die Bilder wurden mit einer Kamera aufgezeichnet und digitalisiert (AxioCam MRc, CZ AG) sowie mit der dazugehörigen Software gespeichert und analysiert (Axiovision V. 4.x CZ AG).

### **2.3.7 Operationszubehör**

Für die tierexperimentellen Versuche wurde ein Leica OP-Mikroskop verwendet (M651, Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar, Germany). Die aufgeführten

Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, über die Firmen Sigma (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) oder Merck Pharma GmbH (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

## **2.4 Statistik**

Die Daten wurden mit Microsoft Excel 2000 (Microsoft Corporation, Seattle, USA) und SPSS (SPSS 11.0.1., SPSS Inc., Chicago, USA) analysiert. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (SEM) dargestellt. Im Falle eines statistisch signifikanten Unterschiedes nach dem Anova-Test wurde ein Gruppenvergleich mittels Student-Newman-Keuls-Prozedur durchgeführt. Ein P-Wert  $< 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen.

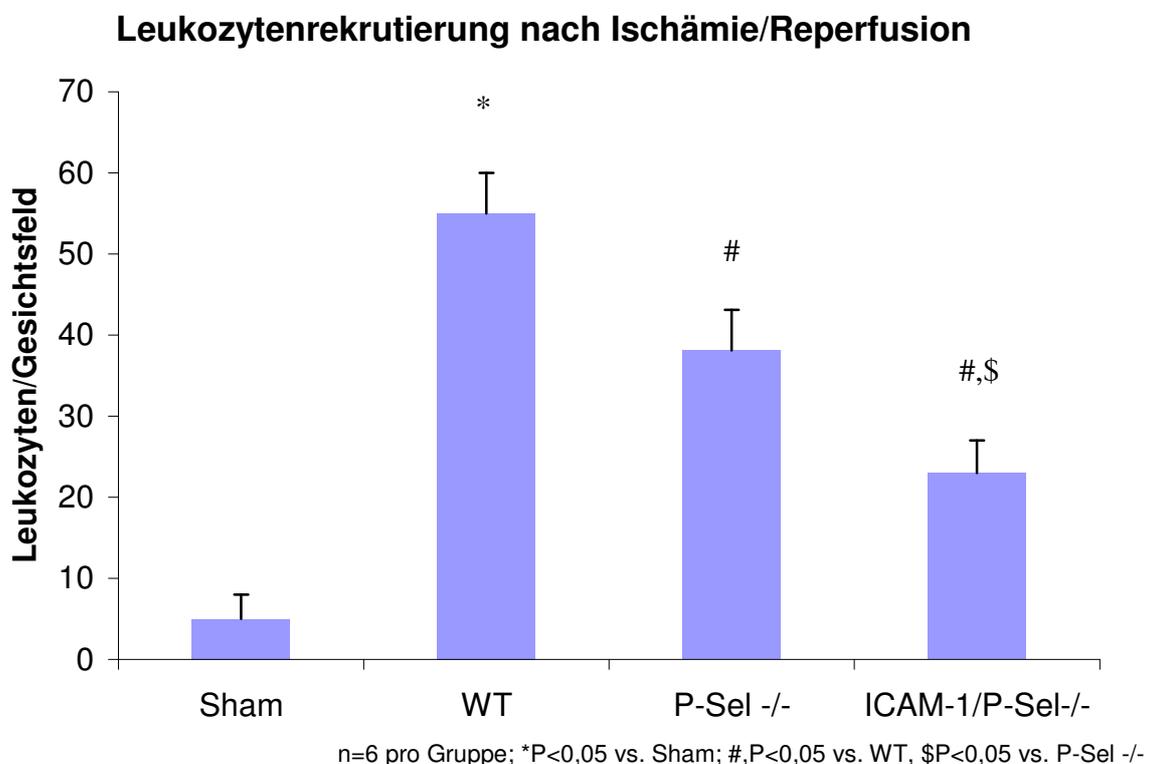
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Adhäsionsmechanismen im akuten Ischämie/Reperfusionmodell

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden die Adhäsionsmechanismen zwischen Leukozyten, Endothel und Thrombozyten in einem akuten murinen myokardialen Ischämie/Reperfusionmodell untersucht. Nach Okklusion der LAD für 20 Minuten folgten 15 Minuten Reperfusion. Zu Beginn der Reperfusion wurden, je nach Protokoll, Leukozyten mit Rhodamin G6-Infusion markiert und/oder gefärbte Thrombozyten infundiert (s. Punkt 2.2)

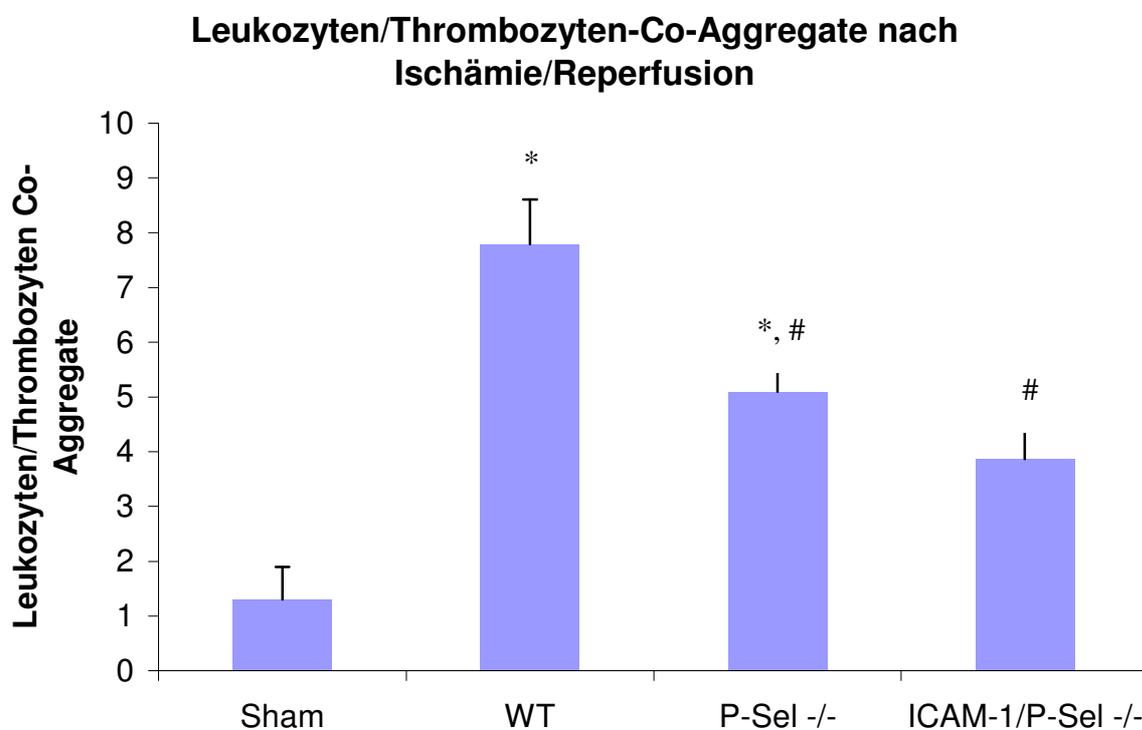
##### 3.1.1 Leukozytenrekrutierung und Co-Aggregatbildung

Die quantitative Analyse der Daten zeigte, dass die 20-minütige Ischämie gefolgt von 15 Minuten Reperfusion eine etwa 10-fache Erhöhung der Leukozytenrekrutierung induziert (von  $5 \pm 1$  auf  $55 \pm 5$  pro Gesichtsfeld, Abb. 11).



**Abb. 11:** Die Ischämie und Reperfusion am Herzen führt zu starkem Anstieg der Leukozytenrekrutierung im postischämischen Myokard. Dieser Anstieg ist in P-Sel -/- Mäusen signifikant reduziert, eine kombinierte ICAM-1-Defizienz kann diese Reduktion noch verstärken.

Bei den P-Selektin-defizienten Tieren zeigte sich eine signifikante Reduktion der postischämischen Leukozytenrekrutierung ( $38 \pm 5$  pro Gesichtsfeld, Abb. 11). Die zusätzliche Defizienz von ICAM-1 zeigte einen additiven Effekt auf die Reduktion der Leukozytenrekrutierung nach Ischämie und Reperfusion ( $23 \pm 4$  pro Gesichtsfeld, Abb. 11). Parallel dazu zeigte sich nach Ischämie und Reperfusion eine 9-fach erhöhte Co-Aggregatbildung im Vergleich zu den Sham-operierten Tieren (von  $0.9 \pm 0.5$  auf  $8.0 \pm 0.8$  pro Gesichtsfeld, Abb. 12), die in P-Selektin-defizienten Herzen signifikant reduziert war ( $5.1 \pm 0.4$  pro Gesichtsfeld, Abb. 12). Die zusätzliche Defizienz von ICAM-1 führte in der Tendenz zu einer weiteren Reduktion der Co-Aggregatbildung ( $3.7 \pm 0.7$  pro Gesichtsfeld, Abb. 12).



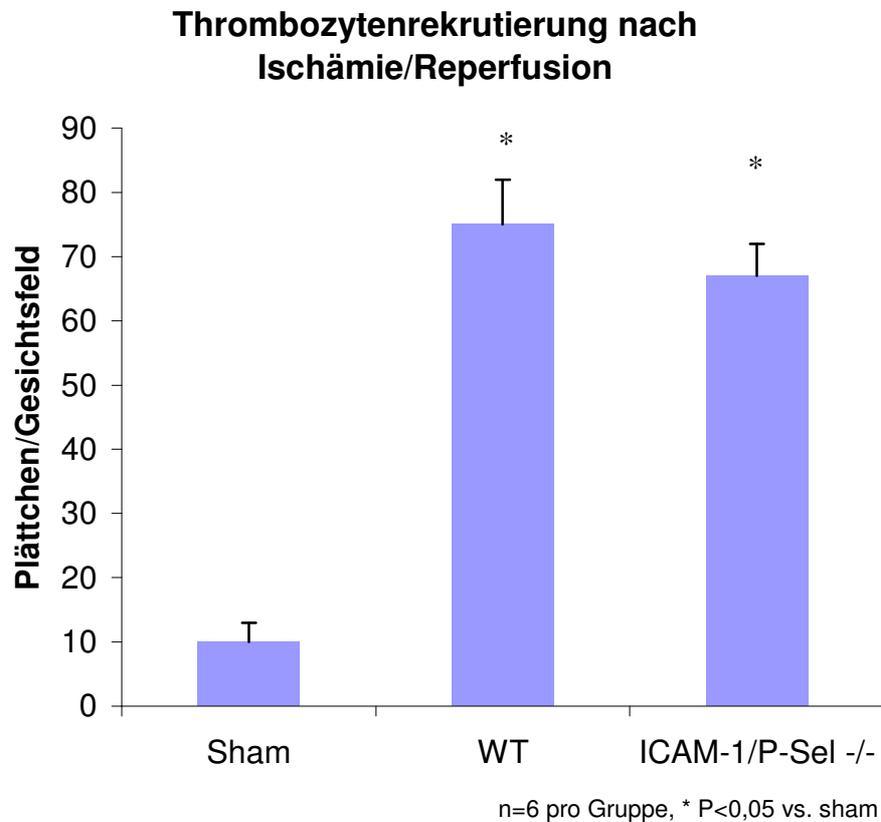
n=6 pro Gruppe, \*, P<0,05 vs. sham ; #, P<0,05 vs. WT,

**Abb. 12:** Die Co-Aggregatbildung ist nach I/R neunfach erhöht im Vergleich zu Sham-operierten Tieren. P-Selektin-Defizienz verringert diesen Anstieg signifikant. In doppel-defizienten Tieren zeigte sich tendenziell eine weitere Abnahme der Rekrutierung.

### 3.1.2 Plättchenrekrutierung nach Ischämie/Reperfusion

Bei der Analyse der Thrombozytenrekrutierung zeigte sich eine andere Tendenz. Durch Ischämie und Reperfusion kam es zu einem 7-fachen Anstieg der Plättchenrekrutierung im Vergleich zu den Sham-operierten Tieren (von  $10 \pm 3$  auf  $75 \pm 7$  pro Gesichtsfeld (Abb. 13). Interessanterweise zeigte sich kein Unterschied in den ICAM-1/P-Selektin-defizienten Tieren nach Ischämie und Reperfusion ( $76 \pm 5$  pro Gesichts-

feld, Abb. 13). Aufgrund dieser Befunde wurde die Gruppe mit den P-Selektin-defizienten Tieren nicht untersucht.

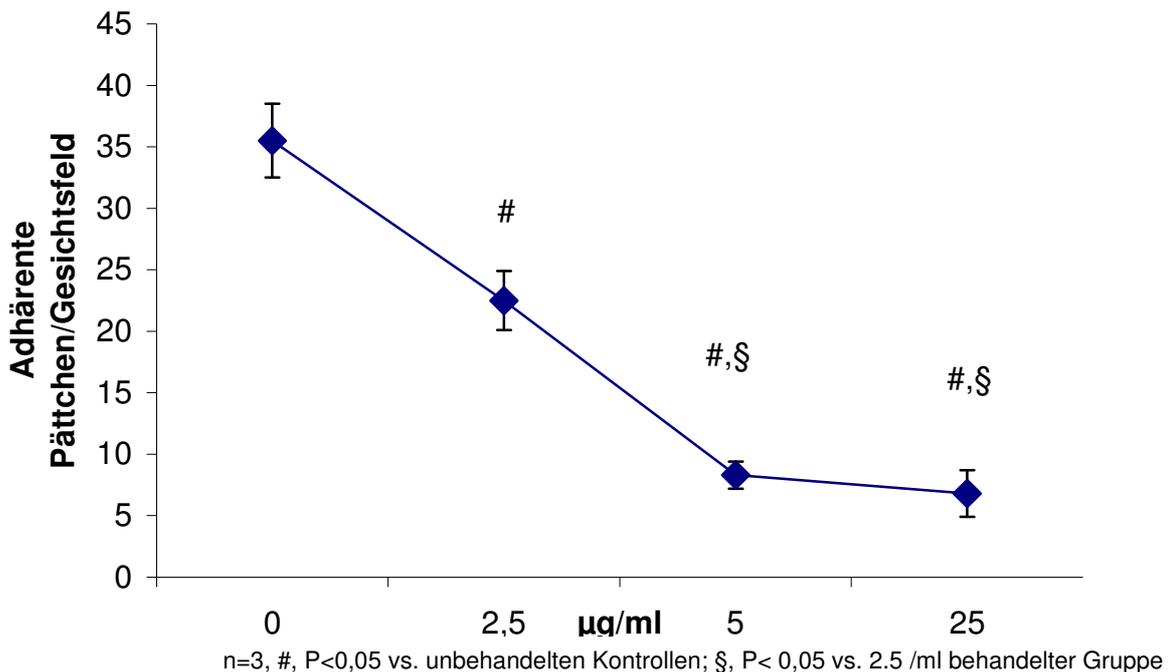


**Abb. 13:** Die Plättchenrekretierung ist ebenfalls stark erhöht nach I/R im Vergleich zu sham-operierten Tieren. Interessanterweise zeigte sich kein Unterschied in den ICAM-1/P-Selektin-defizienten Tieren zu den WT-Tieren nach Ischämie und Reperfusion.

### 3.1.3 Die Rolle der Thrombozyten auf die postischämische Leukozytenadhäsion

Die oben beschriebenen Versuche veranlassten uns, die Rolle der Thrombozyten genauer zu untersuchen. Dazu verwendeten wir Tirofiban, einen synthetischen Antagonisten gegen das thrombozytäre Integrin GPIIb/IIIa. Tirofiban wurde entweder systemisch vor Beginn der Reperfusion appliziert oder vor i. v. Injektion auf Spenderthrombozyten inkubiert.

### Einfluß von GPIIb/IIIa auf die Thrombozyten/Fibrinogenbindung



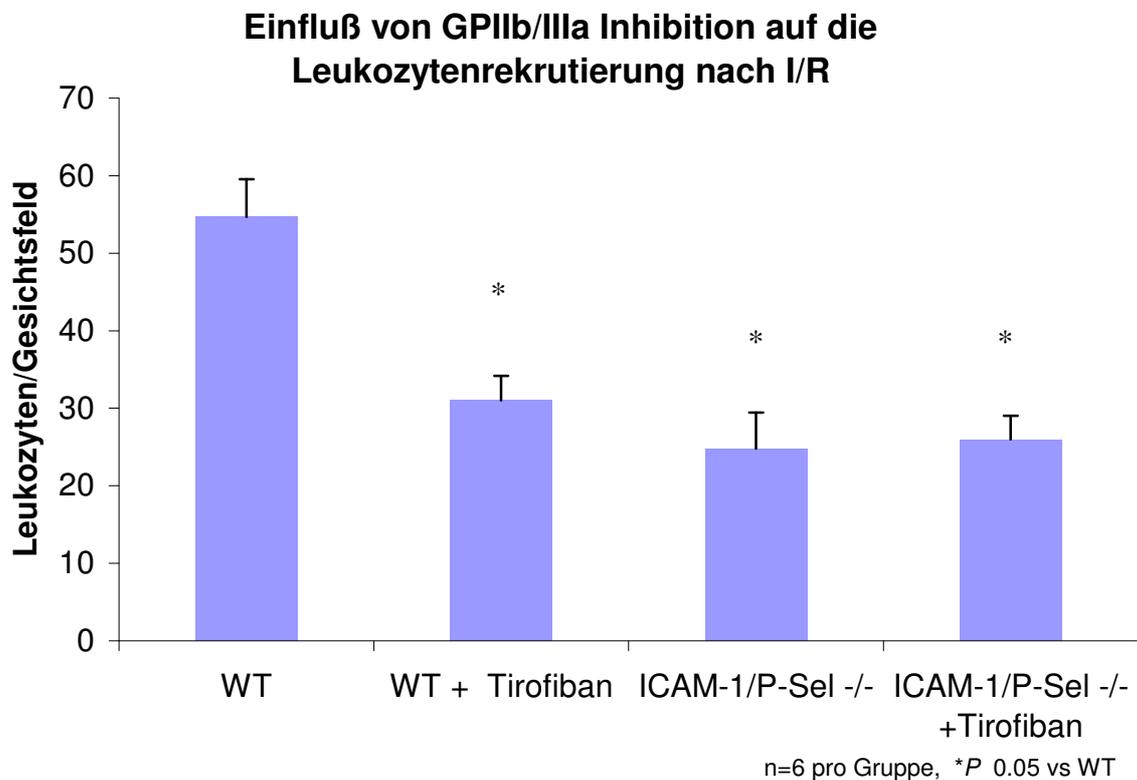
**Abb. 14:** Die Thrombozytenadhäsion nimmt mit zunehmender Tirofiban-Konzentration ab. Ab einer Konzentration von 5 µg/ml zeigte sich eine fast vollständige Hemmung der Adhäsion. Die 5-fache Steigerung zeigte keine zusätzliche Hemmung, daher wurden die weiteren Versuche mit einer Konzentration von 5 µg/ml durchgeführt.

Die funktionelle Bestimmung der Konzentration des GPIIb/IIIa-Antagonisten zeigte eine fast vollständige Hemmung der Plättchenadhäsion bei einer Konzentration von 5 µg/ml. (Abb. 14: Unbehandelt: 35,5±3/Gesichtsfeld (GF), 2,5 µg/ml: 22,5±2,4/GF, 5 µg/ml: 8,3±1,1/GF). Die Erhöhung der Konzentration auf die 5-fache Dosis zeigte keine zusätzliche Hemmung der Adhäsion (25 µg/ml: 6,8±1,9/GF), daher wurden die weiteren Versuche mit einer Konzentration von 5 µg/ml durchgeführt. Ausgehend von einem intravasalen Volumen von 0,75 ml/10 g Körpergewicht, wurde Tirofiban in einer Dosis von 0,36 µg/g Körpergewicht verwendet.

#### 3.1.3.1 Leukozytenrekrutierung und Co-Aggregatbildung nach GPIIb/IIIa-Co-Applikation

Die Injektion von Tirofiban blockierte die Interaktion zwischen Thrombozyten und Leukozyten nach Ischämie und Reperfusion (Abb. 15, Abb. 16). Es zeigte sich, dass die Leukozytenrekrutierung nach Ischämie und Reperfusion durch die Applikation von Tirofiban in den Wildtyp-Tieren signifikant reduziert werden konnte (von 55±5 auf

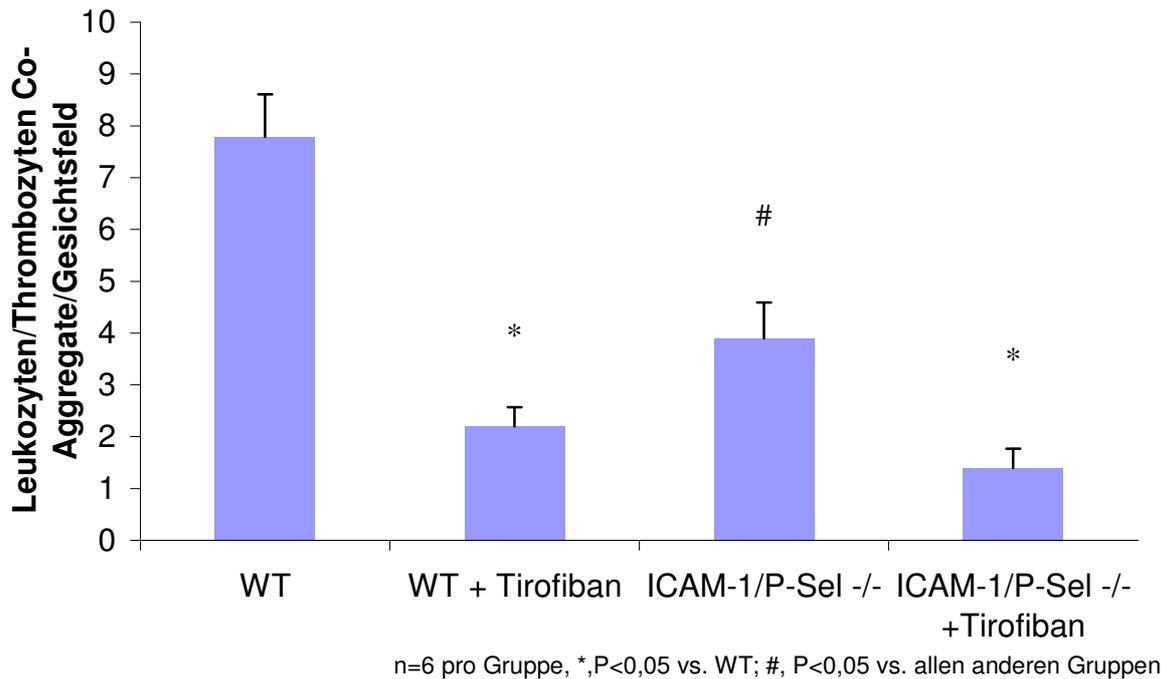
31±3 pro Gesichtsfeld, Abb. 15). Dieser Effekt war vergleichbar mit dem der ICAM-1/P-Selektin-Doppeldefizienz (25±4 pro Gesichtsfeld, Abb. 15). Die Applikation von Tirofiban in die ICAM-1/P-Selektin-defizienten Herzen brachte keinen zusätzlichen Effekt, die Leukozytenrekrutierung war hier nahezu unverändert (26±3 pro Gesichtsfeld, Abb. 15).



**Abb. 15:** Die Zugabe von Tirofiban zu Beginn der Reperfusion, hemmt die Leukozytenrekrutierung signifikant, vergleichbar mit der reduzierten Rekrutierung in ICAM-1/P-Selektin-defizienten Tieren. Die Kombination von Tirofiban und Doppeldefizienz zeigt keine additive Wirkung.

Die Bildung von Leukozyten/Thrombozyten-Co-Aggregaten konnte durch die Injektion von Tirofiban nahezu blockiert werden: Durch die Gabe von Tirofiban in Wildtyp-tiere kam es zu einer signifikanten Reduktion der Co-Aggregatbildung (von 8,0±0,8 auf 2,2±0,4 pro Gesichtsfeld, Abb. 16). Die Co-Aggregatbildung wurde auch in ICAM-1/P-Selektin-defizienten Tieren, die bereits eine verringerte Co-Aggregatbildung aufwiesen, gesenkt (von 3,7±0,7 auf 1,4±0,4 pro Gesichtsfeld, Abb. 16). Die Wirkung von Tirofiban auf die Co-Aggregate war in Wildtyp-Tieren und ICAM-1/P-Selektin-defizienten Tieren nicht signifikant verändert.

### Leukozyten/Thrombozyten Co-Aggregate nach I/R unter Einfluss von Tirofiban



**Abb. 16:** Nach Gabe von Tirofiban zu Beginn der Reperfusion wurde die Co-Aggregatbildung analysiert. Die Reduktion der Co-Aggregatbildung in ICAM-1/Pel<sup>-/-</sup> Tieren kann durch Tirofibangabe in WT-Tieren und ICAM-1/Pel<sup>-/-</sup> Tieren signifikant gesteigert werden.

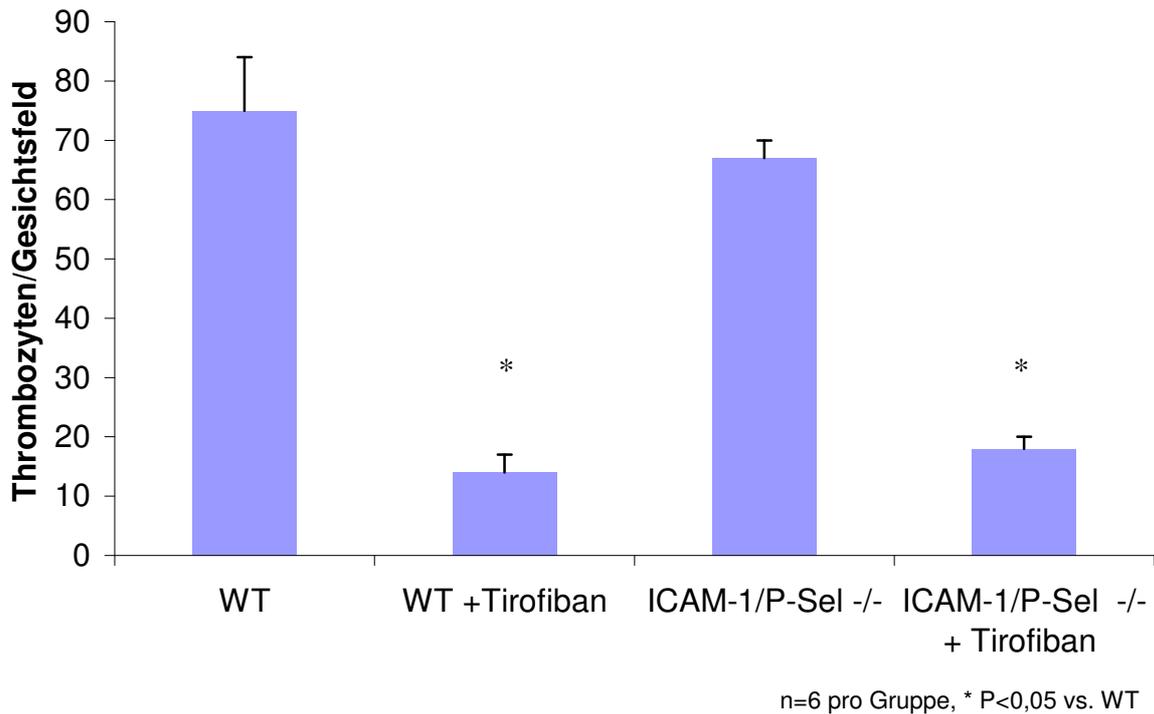
#### 3.1.3.2 Thrombozytenrekrutierung unter Tirofiban

Die Thrombozytenrekrutierung zeigte nach Tirofibangabe ein anderes Bild. Während die ICAM-1/P-Selektin-Defizienz keinen Effekt auf die Thrombozytenadhäsion hatte, konnte die Applikation von Tirofiban vor Beginn der Reperfusion die Adhäsion fast vollständig blockieren (WT: 75±9, ICAM-1/P-SEL<sup>-/-</sup>: 67±3, WT + Tirofiban: 14±3, ICAM-1/P-SEL<sup>-/-</sup> + Tirofiban: 18±2, Abb. 17).

Durch die Blockade des  $\beta_3$ -Integrins GPIIb/IIIa, das hauptsächlich für die Plättchenadhäsion in koronarem Endothel verantwortlich ist (über endotheliales ICAM-1<sup>21</sup>, den Vitronectin-Rezeptor  $\alpha V\beta_3$ <sup>64</sup> und über den vWF-Rezeptor GPIb<sup>21</sup>), hatte eine deutliche Reduktion der Thrombozytenrekrutierung zur Folge.

Diese Befunde zeigten, dass in unserem Modell der akuten myokardialen Ischämie und Reperfusion endotheliales ICAM-1 und P-Selektin in der Leukozytenrekrutierung und Co-Aggregatbildung, nicht jedoch in der Thrombozytenadhäsion involviert sind.

### Einfluß von GPIIb/IIIa Inhibition auf die Thrombozytenrekrutierung nach I/R



**Abb. 17:** Unter Zugabe von Tirofiban kann Plättchenrekrutierung in WT-Tieren und in ICAM-1/P-Selektin-/-Tieren gleichermaßen reduziert werden.

### 3.1.4 Beitrag der Leukozyten und Thrombozyten zum postischämischen Reperfusionsschaden

Die Unterschiede der Leukozytenrekrutierung und Co-Aggregatbildung gaben Hinweise auf mögliche funktionelle Veränderungen durch den postischämischen Reperfusionsschaden. Zur Beurteilung der Herzfunktion im Modell der akuten Ischämie und Reperfusion wurden die Herzen nach der Reperfusion explantiert und wie unter Punkt 2.2.5 beschrieben funktionell analysiert. Anschließend wurde der linksventrikulär entwickelte Druck sowie die globalen Funktionsparameter  $dP/dt_{max}$  für die Kontraktilität bzw.  $dP/dt_{min}$  für die Relaxationsfähigkeit analysiert.

#### 3.1.4.1 Postischämische linksventrikuläre Funktion nach Ischämie und Reperfusion

Es zeigte sich, dass Ischämie und Reperfusion zu einer deutlichen Verschlechterung der systolischen Funktionsparameter führen. Sowohl der linksventrikulär entwickelte Druck (LVDP) als auch die globalen Funktionsparameter  $dP/dt_{max}$  und  $dP/dt_{min}$  zeigen

einen signifikanten Funktionsverlust (Sham vs. WT-I/R: LVDP von  $110 \pm 11$  mmHg auf  $48 \pm 6$  mmHg;  $dP/dt_{max}$  von  $3280 \pm 459$  mmHg/s auf  $1543 \pm 321$  mmHg/s und  $dP/dt_{min}$  von  $-2520 \pm 546$  auf  $-1213 \pm 176$  mmHg/s, Tabelle 5).

Während es in den P-Selektin-defizienten Herzen nur tendenziell zu einer Funktionsverbesserung kam, konnte bei ICAM-1/P-Selektin-defizienten Herzen eine deutliche Funktionsverbesserung beobachtet werden. Im Vergleich zu den Wildtyp-Herzen zeigte sich hier eine Verbesserung der linksventrikulär entwickelten Druckes (LVDP) um 31% (LVDP:  $79 \pm 6$  mmHg, Tabelle 5).

### **Systolische Funktion (LVDP, $dP/dt_{max}$ ) und diastolische Funktion ( $dP/dt_{min}$ ) nach Ischämie und Reperfusion (I/R) in Wildtyp-Mäusen und transgenen Mäusen**

Gruppe	LVDP (mmHg)	$dP/dt_{max}$ (mmHg/s)	$dP/dt_{min}$ (mmHg/s)
Sham	$108 \pm 10$	$3280 \pm 459$	$-2520 \pm 546$
I/R WT	$48 \pm 4^*$	$1543 \pm 321^*$	$-1213 \pm 176^*$
I/R P-Sel -/-	$58 \pm 7^*$	$2480 \pm 403$	$-1780 \pm 336$
I/R Icam-1/P-Sel -/-	$78 \pm 6^{*,\#,\$}$	$2950 \pm 409^\#$	$-2350 \pm 396^\#$
I/R WT + Tirofiban	$60 \pm 3^{*,\#}$	$2750 \pm 250^\#$	$-2183 \pm 125^\#$
I/R Icam-1/P-Sel -/- + Tirofiban	$81 \pm 4^{*,\#,\$}$	$3050 \pm 177^\#$	$-2783 \pm 317^\#$

\* P < 0,05 versus Sham; # P < 0,05 versus I/R WT, \$ P < 0,05 vs. WT + Tirofiban, n=8

**Tabelle 5:** Die akute Ischämie und Reperfusion führte zu einem deutlichen postischämischen Funktionsverlust in WT-Tieren. Dieser funktionelle Schaden war in P-Selektin-defizienten Tieren moderat, in doppeldefizienten Tieren signifikant reduziert. Nach Zugabe von Tirofiban in WT-Tiere, zeigte sich v. a. in den globalen Parametern  $dP/dt_{max}$  und  $dP/dt_{min}$  eine signifikante Verbesserung der LV-Funktion. In ICAM-1/P-Sel-defizienten Tieren zeigte sich keine zusätzliche funktionelle Verbesserung durch die Zugabe von Tirofiban im Vergleich zu den unbehandelten doppeldefizienten Tieren.

Auch die Funktionsparameter  $dP/dt_{max}$  und  $dP/dt_{min}$  zeigten eine signifikante Verbesserung der postischämischen Funktion im Vergleich zu den Wildtyp-Herzen ( $dP/dt_{max}$ :  $2950 \pm 409$  mmHg/s;  $dP/dt_{min}$ :  $-2350 \pm 396$  mmHg/s, Tabelle 5). Die Gabe von Tirofiban vor Beginn der Reperfusion führte bei den Wildtyp-Herzen zu einer moderaten, aber signifikanten, Verbesserung des entwickelten linksventrikulären Druckes (LVDP:  $60 \pm 3$  mmHg, Tabelle 5). Eine deutlichere Verbesserung konnte in den globalen Funktionsparametern  $dP/dt_{max}$  und  $dP/dt_{min}$  beobachtet werden ( $dP/dt_{max}$ :

2750±250mmHg/s,  $dP/dt_{\min}$ : -2183±125mmHg/s, Tabelle 5). Die Kombination von ICAM-1/P-Selektin-Defizienz und Tirofiban-Infusion führte zu keinen additiven Effekt zu der Verbesserung des postischämischen Schadens im Vergleich zu der Gruppe der unbehandelten I/R-ICAM-1/P-Selektin-defizienten Gruppe (Tabelle 5).

Diese Ergebnisse bestätigten unsere Hypothese, dass die Leukozytenrekrutierung den postischämischen myokardialen Funktionsverlust beeinflusst und die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und P-Selektin im Rekrutierungsprozess eine essenzielle Rolle spielen. Die Unterschiede in den Rekrutierungsmechanismen von Leukozyten und Thrombozyten veranlassten uns zur genaueren Untersuchung der Rekrutierung von Blutplättchen, im Speziellen des Plättchen-Selektins (P-Selektin).

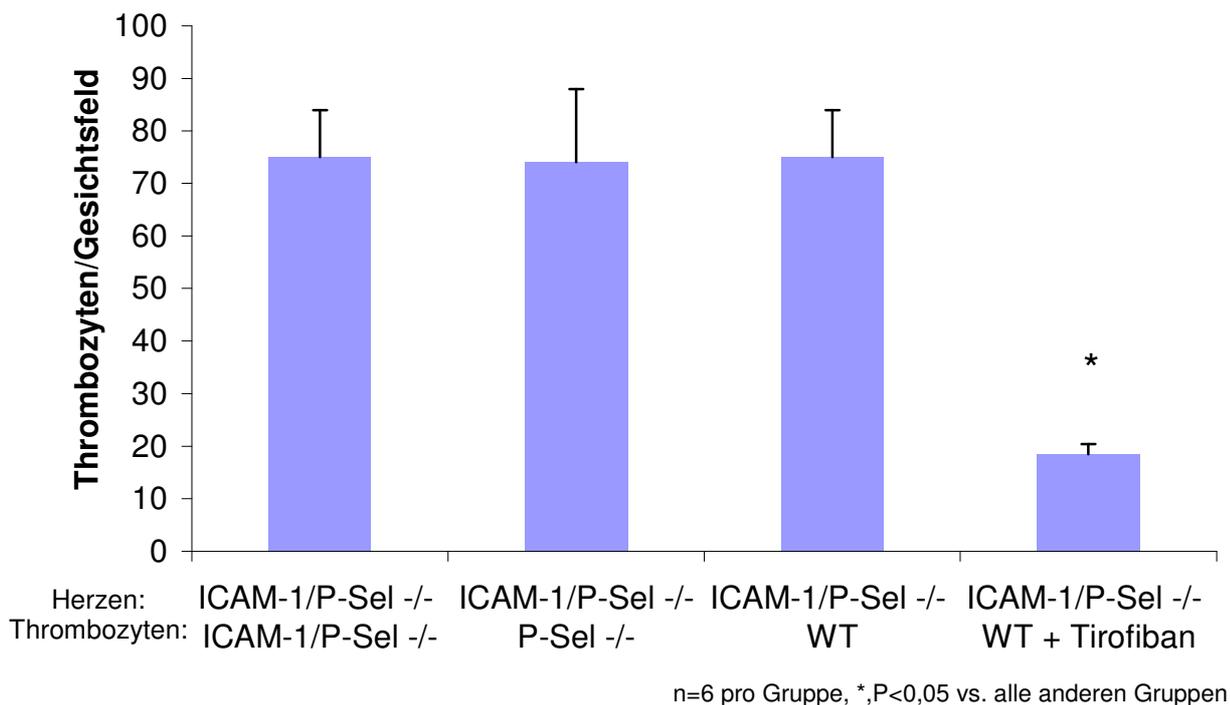
### **3.1.5 Thrombozytäres P-Selektin vermittelt postischämische Leukozytenrekrutierung**

Um den Beitrag des P-Selektins an der postischämischen Leukozytenrekrutierung weiter zu untersuchen, infundierten wir Rhodamin G6-gefärbte Thrombozyten von Wildtyp-, P-Selektin-, oder ICAM-1/P-Selektin-defizienten Spendern in Herzen von ICAM-1/P-Selektin-defizienten Empfängermäusen. In den Empfängertieren war durch die Doppeldefizienz die direkte Interaktion von Leukozyten und Endothel durch die Defizienz des endothelialen P-Selektins und des endothelialen ICAM-1s stark vermindert (Abb. 15, Abb. 19). Nach Reperfusion wurden die ex vivo markierten Thrombozyten analysiert.

#### **3.1.5.1 Postischämische Plättchenrekrutierung unter ICAM-1/P-Selektin-Defizienz**

Nach Infusion der heterologen Plättchen in ICAM-1/P-Selektin-defiziente Herzen zeigte sich kein Unterschied in der Thrombozytenadhäsion zwischen der Wildtyp-, P-Selektin  $-/-$ , und der ICAM-1/P-Selektin  $(-/-)$ -Gruppe. Die Blockade von GPIIb/IIIa durch Inkubation von WT-Plättchen mit Tirofiban vor Applikation konnte die Adhäsion jedoch signifikant reduzieren (ICAM-1/P-SEL  $-/-$ : 75±9, P-Selektin  $-/-$ : 74±14, WT: 75±9, WT + Tirofiban: 18±2 pro Gesichtsfeld, Abb. 18).

## Thrombozytenrekrutierung nach Ischämie/Reperfusion

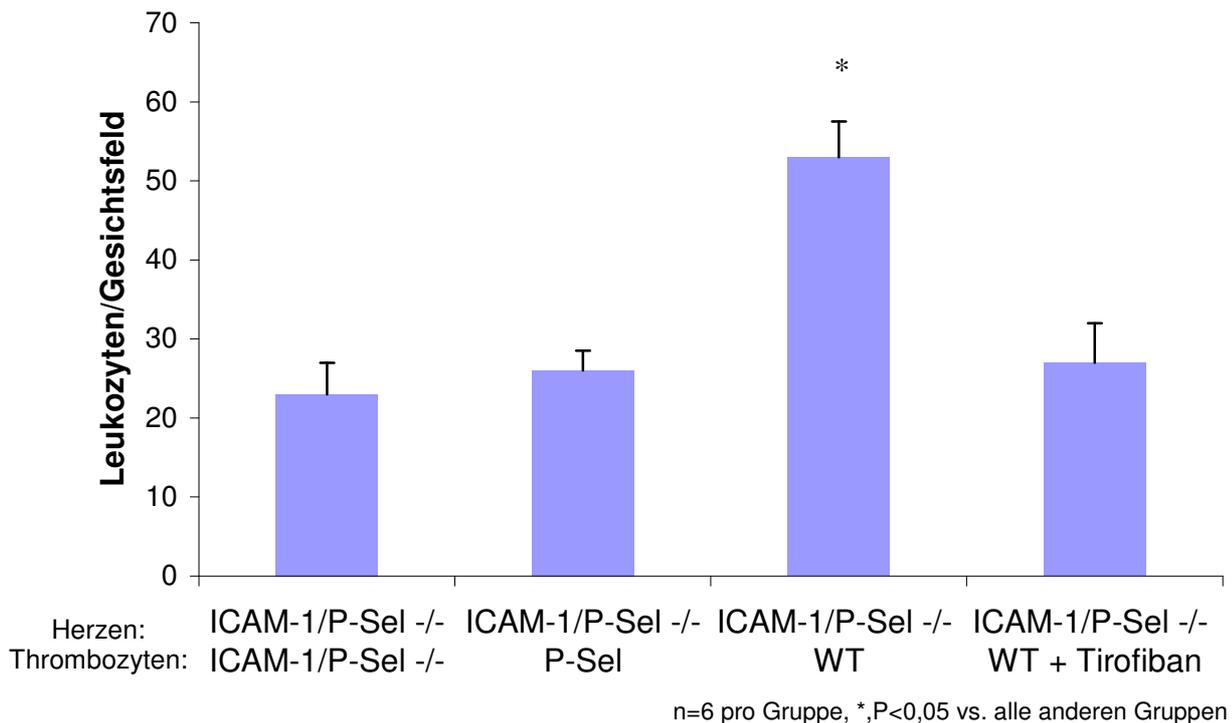


**Abb. 18:** Heterologe Thrombozyten wurden in ICAM-1/P-Selektin-defiziente Tiere infundiert. Die Plättchenrekrutierung war weder durch P-Selektin- noch durch ICAM-1-Defizienz beeinflusst. Die Blockade von GPIIb/IIIa durch Inkubation von WT-Plättchen mit Tirofiban ex vivo führte jedoch zu einer signifikanten Reduktion der Rekrutierung.

### 3.1.5.2 Leukozytenrekrutierung in ICAM-1/P-Selektin-defizienten Herzen

Die Analyse der Leukozytenrekrutierung nach heterologer Plättcheninfusion zeigte einen interessanten Befund. Während nach Infusion von P-Selektin- bzw. ICAM-1/P-Selektin-defizienten Thrombozyten keine Zunahme der Leukozytenrekrutierung beobachtet werden konnte (im Vergleich zu ICAM-1/P-Selektin- Herzen in die keine Thrombozyten infundiert wurden; Abb. 11), erhöhte die Infusion von Wildtyp-Plättchen in die doppeldefizienten Herzen die postischämische Leukozytenrekrutierung signifikant. Durch die Inkubation der Wildtyp-Plättchen mit Tirofiban, konnte nicht nur die Plättchenadhäsion reduziert werden (Abb. 18), sondern auch die oben beschriebene Erhöhung der Leukozytenrekrutierung verhindert werden (ICAM-1/P-Selektin -/-:  $23 \pm 4$ , P-Selektin -/-:  $26 \pm 2,5$ , WT:  $53 \pm 4,5$ , WT + Tirofiban:  $27 \pm 5$  pro Gesichtsfeld, Abb. 19).

## Leukozyten Rekrutierung nach Ischämie/Reperfusion



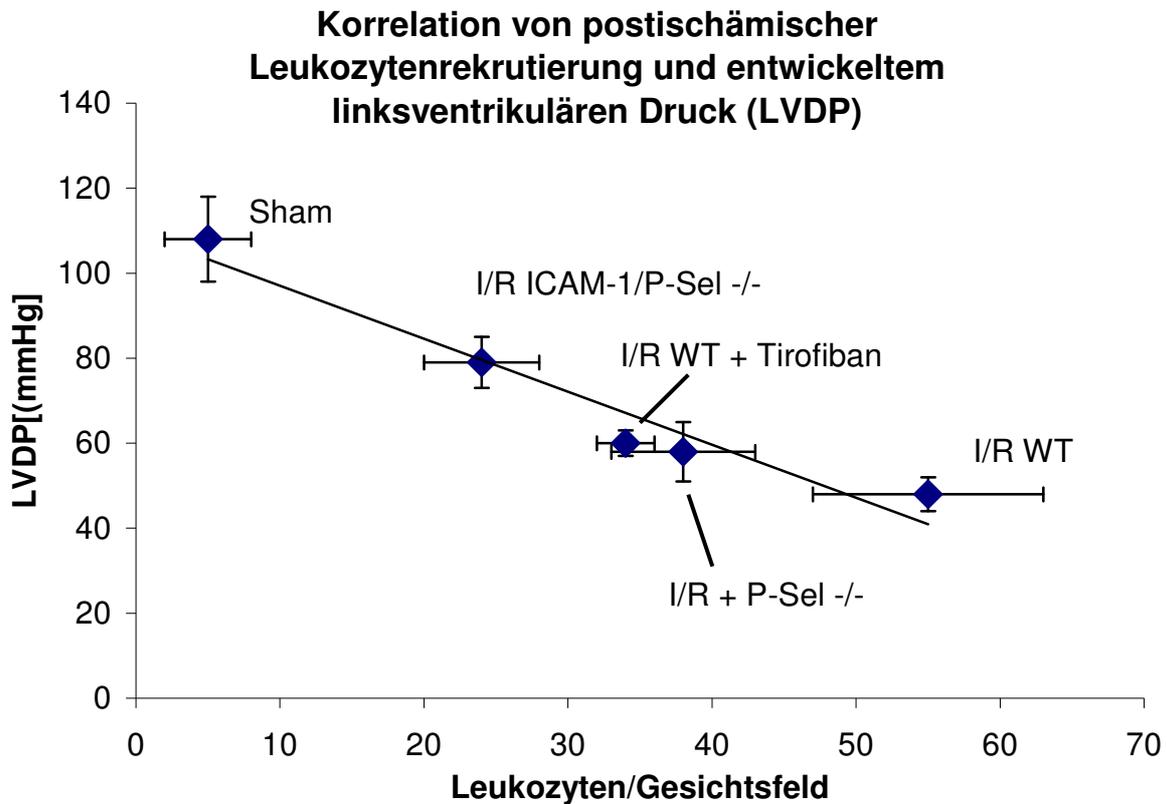
**Abb. 19:** Die Leukozytenrekrutierung ist in ICAM-1/P-Sel-defizienten Herzen vermindert. Während die Infusion von ICAM-1/P-Sel- bzw. von P-Selektin-defizienten Thrombozyten keinen Effekt auf die Leukozytenrekrutierung zeigte, verdoppelte die Infusion von WT-Plättchen die Leukozytenrekrutierung in den ICAM-1/P-Selektin-defizienten Herzen. Dieser Effekt wurde durch Tirofibangabe blockiert.

Aufgrund dieser Beobachtungen kamen wir zu dem Schluss, dass P-Selektin-exprimierende Thrombozyten, die im postischämischen Myokard adhärten, die reduzierte Leukozytenrekrutierung in ICAM-1/P-Selektin-defizienten Herzen kompensieren konnten. Die Ergebnisse legen nahe, dass thrombozytäres P-Selektin für diese Kompensation eine entscheidende Rolle spielt. So ist zu vermuten, dass Leukozyten in ICAM-1/P-Sel-defizienten Herzen über den P-Selektin-Liganden an adhärenente P-Selektin-exprimierende Thrombozyten binden, und dies zu einer Zunahme der postischämischen Leukozytenrekrutierung führt.

### 3.1.6 Leukozytenadhäsion korreliert mit dem Ausmaß des postischämischen Funktionsverlustes

Der Einfluss der Leukozyten- oder Thrombozytenrekrutierung auf die postischämische myokardiale Funktion wurde durch die Korrelation zwischen Leukozyten- oder Thrombozytenrekrutierung und dem linksventrikulär entwickelten Druck erfasst. Ab-

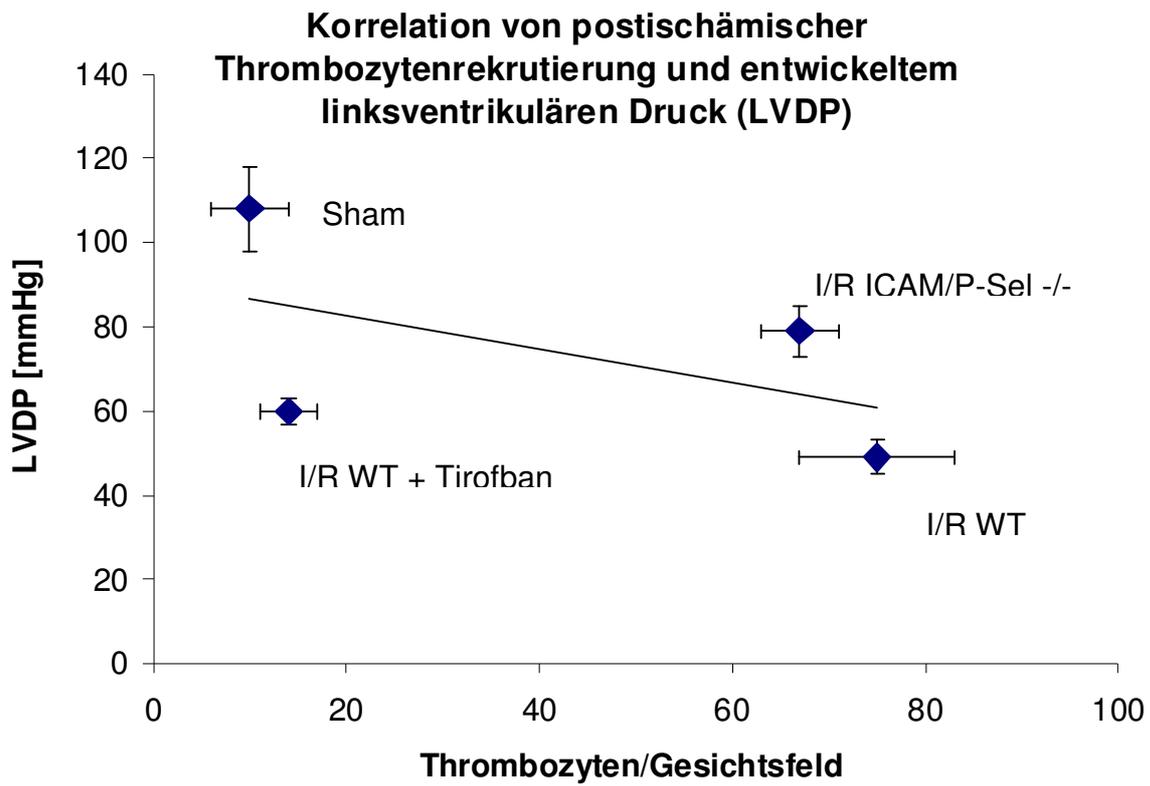
bildung 20 zeigt eine hohe Korrelation zwischen Leukozytenrekretierung und verminderter linksventrikulärer Funktion ( $r=0,93$ ,  $P=0,01$ , Abb. 20).



**Abb. 20:** Zwischen linksventrikulär entwickeltem Druck und Leukozytenrekretierung zeigte sich eine hohe Korrelation ( $r=0,93$ ;  $P=0,01$ ).

### 3.1.7 Plättchenadhäsion ist unabhängig vom postischämischen Reperfusionsschaden

Im Gegensatz dazu konnten wir keine signifikante Korrelation zwischen Plättchenrekretierung und linksventrikulärer Funktion feststellen ( $r=0,3$ ,  $P=0,13$ , Abb. 21). Aus diesen Ergebnissen folgerten wir, dass einerseits die leukozytäre Rekrutierung für den frühen postischämischen Funktionsverlust ausschlaggebend ist. Andererseits scheinen Thrombozyten nicht durch Adhäsion am postischämischen Schaden beteiligt zu sein, jedoch könnten sie durch Modulation der Leukozytenrekretierung zur postischämischen myokardialen Dysfunktion beitragen.



**Abb. 21:** Zwischen LVDP und Thrombozytenrekrutierung konnte keine Korrelation nachgewiesen werden ( $r=0,3$ ;  $P=0,13$ ).

## **3.2 Zelluläre Therapien der myokardialen I/R im chronischen Modell**

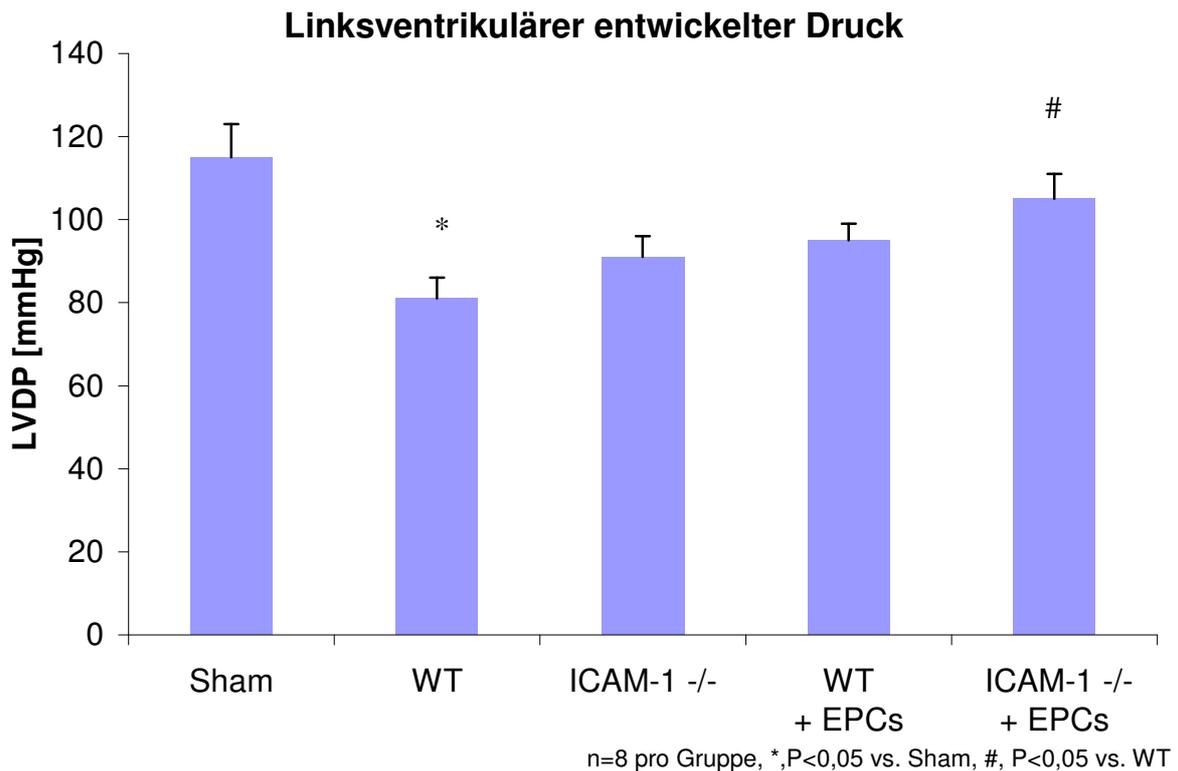
Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 und P-Selektin sind neben der Rekrutierung potentiell schädigender Leukozyten auch an der Adhäsion potentiell kardioprotektiver Zellen beteiligt.

Der Rolle der Adhäsionsmoleküle für kardioprotektive Zellen haben wir uns durch die Untersuchung von Adhäsion und Myokardfunktion nach Applikation klonaler embryonaler EPCs (eEPCs) (s. Punkt 2.3.2) angenähert. Die Bedeutung von ICAM-1 und P-Selektin für endogene EPCs wurde hierbei durch Knochenmarksmobilisation mittels GM-CSF untersucht.

Als Modell wurde ein chronisches myokardiales Ischämie/Reperusionsmodell gewählt, in dem nach Okklusion der LAD für 60 Minuten eine Reperfusion von 14 Tagen folgte. Nach 14 Tagen wurden die hämodynamischen und histologischen Analysen der Herzen durchgeführt (s. Punkt 2.3).

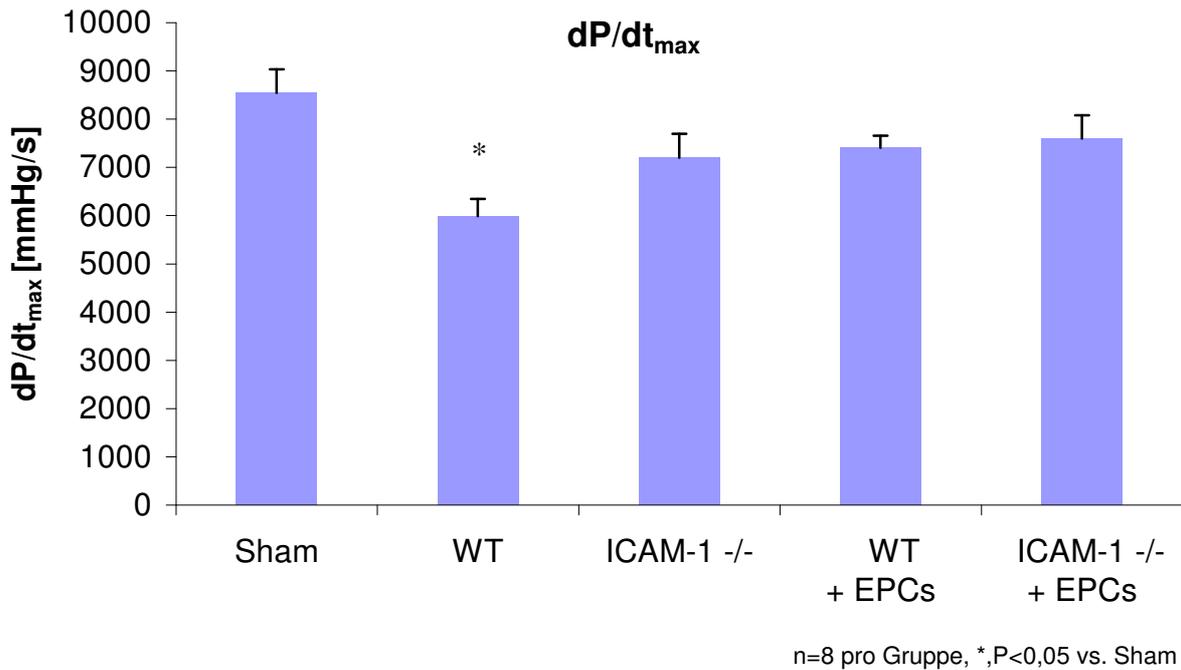
### **3.2.1 Postischämische Applikation embryonaler EPCs und ICAM-1-Defizienz reduzieren den postischämischen Reperusions-schaden**

Nach einstündiger LAD-Okklusion folgte eine 14-tägige Reperfusion. Im Vergleich zu den Sham-operierten Tieren zeigte sich in den unbehandelten WT-Kontrollen (WT) ein deutlicher postischämischer Funktionsverlust sowohl im entwickelten linksventrikulären Druck (Sham: LVDP:  $115 \pm 8$  mmHg, WT: LVDP:  $81 \pm 5$  mmHg, Abb. 22) als auch in den globalen systolischen und diastolischen Parametern  $dP/dt_{max}$  und  $dP/dt_{min}$  (Sham:  $8546 \pm 491$  mmHg/s, WT:  $5991 \pm 395$  mmHg/s, Abb. 23, Sham:  $-7129 \pm 464$  mmHg/s, WT:  $-5121 \pm 190$  mmHg/s, Abb. 24)

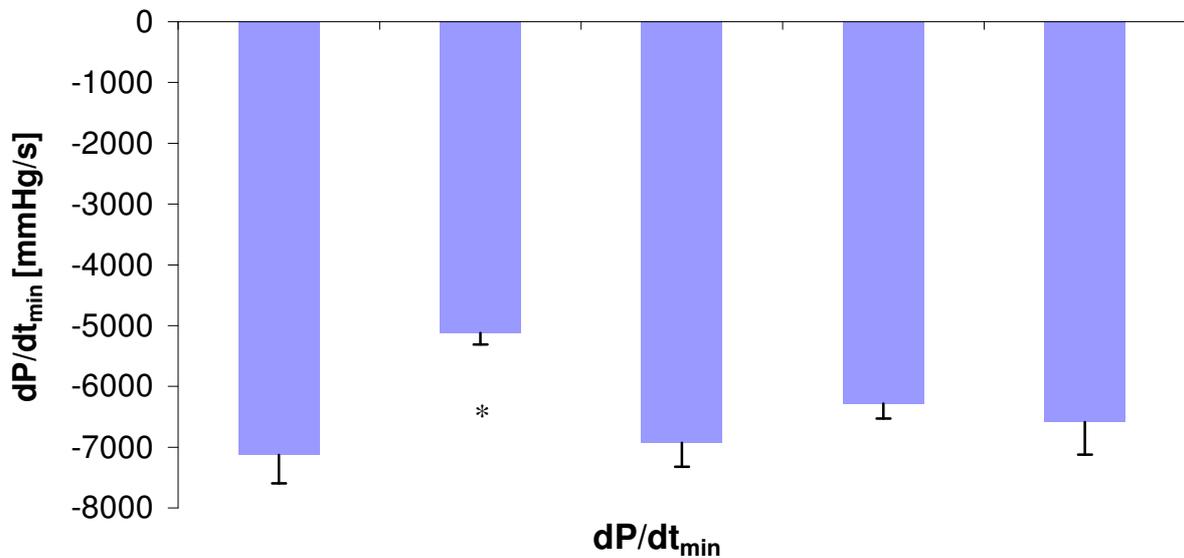


**Abb. 22:** Nach einer Stunde Ischämie gefolgt von 14 Tagen Reperfusion kommt es zu einer signifikanten Reduktion des postischämischen linksventrikulär entwickelten Druckes. ICAM-1-Defizienz reduziert diesen postischämischen Funktionsverlust in ähnlicher Weise wie die Applikation von eEPCs. Die Kombination von ICAM-1 und eEPC-Behandlung zeigt einen zusätzlichen protektiven Effekt.

In ICAM-1-defizienten Tieren war dieser signifikante postischämische Funktionsverlust deutlich reduziert (ICAM-1  $-/-$ : LVDP:  $91 \pm 5$  mmHg, Abb. 22). Die globalen systolischen und diastolischen Parameter  $dP/dt_{max}$  und  $dP/dt_{min}$  bestätigen diesen Befund (ICAM-1  $-/-$ :  $7204 \pm 501$  mmHg/s Abb. 23,  $-6926 \pm 394$  mmHg/s Abb. 24). Ein vergleichbar protektiver Effekt zeigte sich sowohl durch die Infusion von  $3 \times 10^6$  eEPCs 24 Stunden nach Ischämie sowohl im LVDP (WT+eEPCs:  $95 \pm 4$  mmHg, Abb. 22) als auch in den globalen Funktionsparametern  $dP/dt_{max}$  und  $dP/dt_{min}$  (WT+eEPCs:  $7404 \pm 256$  mmHg/s, Abb. 23;  $-6283 \pm 244$ , Abb. 24). Interessanterweise fand sich in der Kombination von ICAM-1-Defizienz und eEPC-Behandlung ein positiver additiver Effekt v. a. auf den entwickelten LV-Druck, (LVDP: ICAM-1 + eEPCs:  $105 \pm 6$  mmHg, Abb. 22), allerdings nicht auf  $dP/dt_{max}$ .



**Abb. 23 (oben) und Abb. 24 (unten):** Die Analyse der globalen Funktionsparameter  $dP/dt_{max}$  (**Abb. 23**) und  $dP/dt_{min}$  (**Abb. 24**) zeigte eine Reduktion des postischämischen Reperfusionsschadens durch ICAM-1-Defizienz und eEPC-Behandlung. Die Kombination zeigte hier keine signifikante additive Protektion.



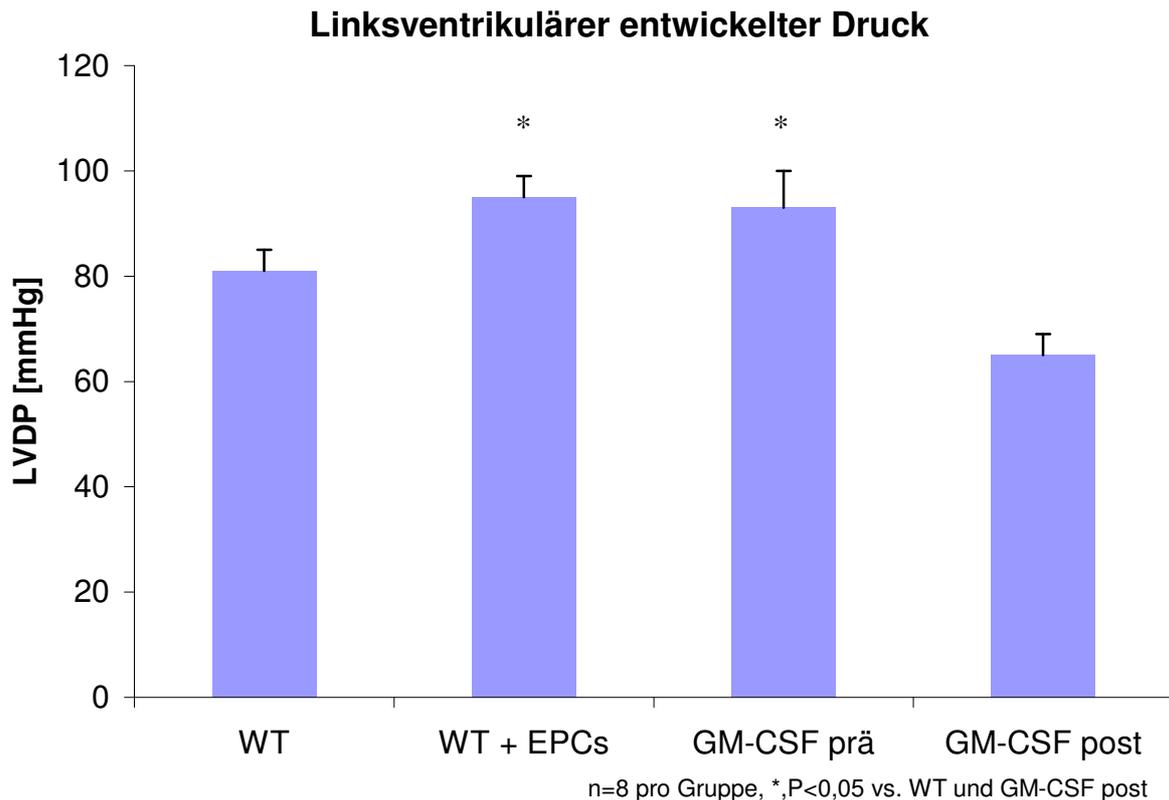
**Abb. 24**

n=8 pro Gruppe, \*, P<0,05 vs. Sham

### 3.2.2 Präischämische Behandlung mit GM-CSF wirkt kardioprotektiv.

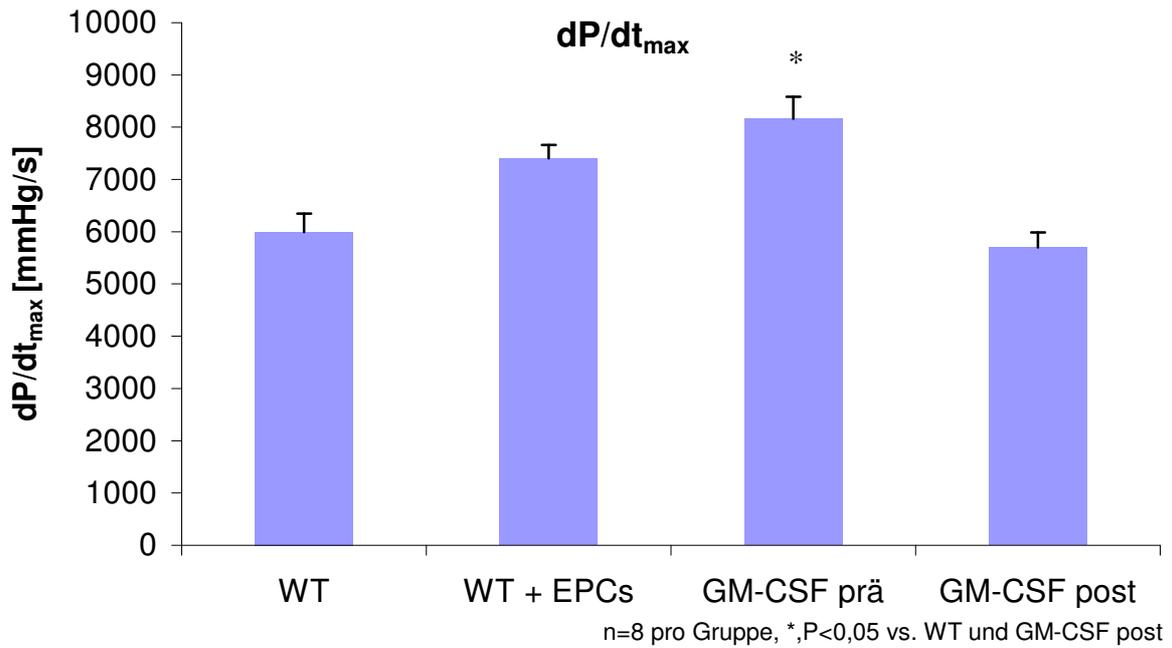
In der Gruppe der präischämisch mit GM-CSF behandelten Tiere zeigte sich ebenfalls ein reduzierter postischämischer Funktionsverlust im Vergleich zu den unbehandelten Wildtyp-Tieren (GM-CSF prä: LVDP:  $93 \pm 4$  mmHg, Abb. 26,  $dP/dt_{max}$ :

7240±780mmHg/s und  $dP/dt_{\min}$ : -7255±356mmHg/s). Der benefizielle Effekt war vergleichbar mit der eEPC-Behandlung der WT-Tiere (Abb. 22). Die beschriebenen Effekte konnten in der Analyse des entwickelten Druckes und noch stärker ausgeprägt bei der Auswertung der globalen Funktionsparameter  $dP/dt_{\max}$  (Abb. 26) und  $dP/dt_{\min}$  (Abb. 27) beobachtet werden (GM-CSF prä  $dP/dt_{\max}$ : 8159mmHg/s und  $dP/dt_{\min}$ : -7255mmHg/s, Abb. 26, Abb. 27).

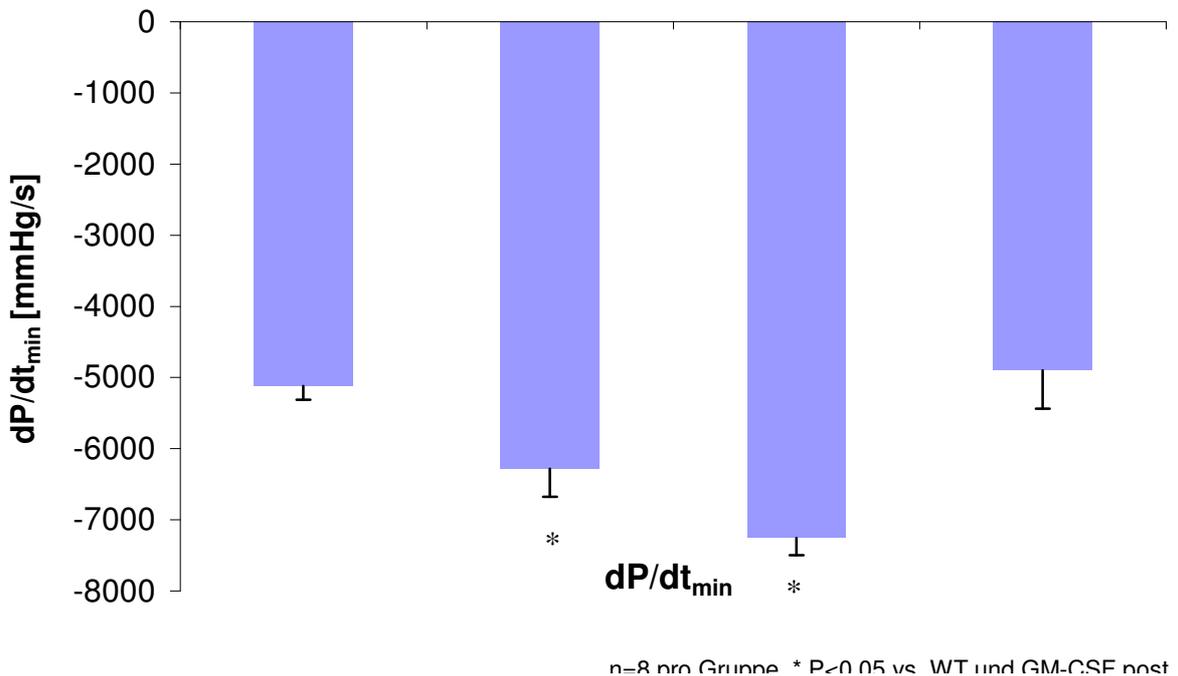


**Abb. 25:** Die präischämische und postischämische Applikation von GM-CSF wurde verglichen mit der EPC-Applikation. Während die präischämische Applikation von GM-CSF einen vergleichbaren protektiven Effekt wie die postischämische Infusion von eEPCs zeigte, zeigte die postischämische Applikation von GM-CSF keine Verbesserung des LVDP postischämisch.

Die postischämische Behandlung mit GM-CSF hingegen zeigte keine Verbesserung der Herzfunktion nach 14 Tagen, sondern eine tendenzielle Verschlechterung, die jedoch nicht signifikant war (GM-CSF post: LVDP: 65±5 mmHg,  $dP/dt_{\max}$ : 5700mmHg/s und  $dP/dt_{\min}$ : -4899mmHg/s, Abb. 25, Abb. 26, Abb. 27).



**Abb. 26 (oben) und 27 (unten):** In den globalen Parametern  $dP/dt_{max}$  (**Abb. 26**) und  $dP/dt_{min}$  (**Abb. 27**) bestätigt sich der Befund der Messungen des entwickelten Druckes aus Abb. 25. Die präischämische Applikation von GM-CSF zeigt einen vergleichbaren protektiven Effekt wie die postischämische Infusion von eEPC, während die postischämische Applikation von GM-CSF vergleichbar war mit den unbehandelten WT-Tieren

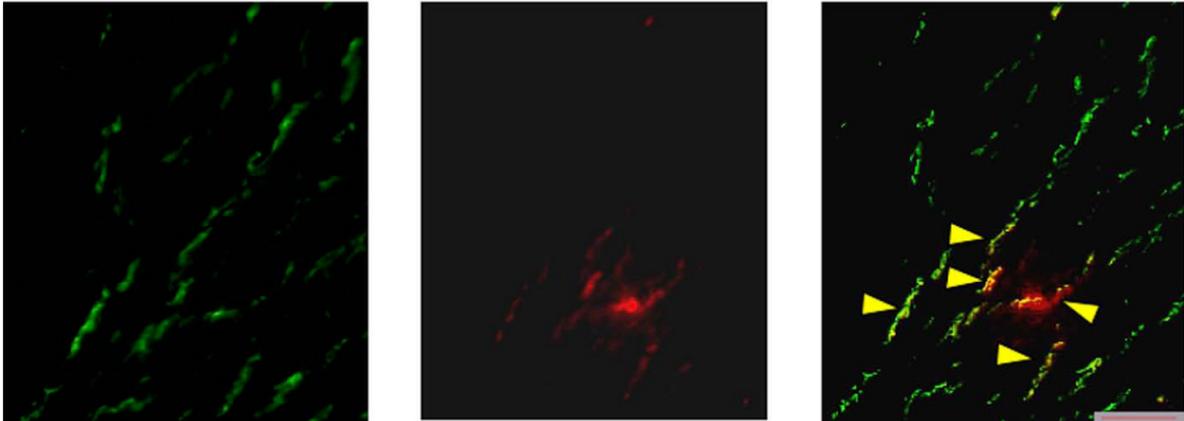


**Abb. 27**

### 3.2.3 Zellnachweis

Zum Nachweis der eEPCs im Infarktgebiet wurden, wie unter Punkt 2.3.6.1 beschrieben, Dil-markierte eEPCs 24 Stunden nach Ischämie infundiert und die Herzen nach sieben Tagen analysiert. Insgesamt stellte es sich als schwierig dar, die eEPCs

nachzuweisen. Grund hierfür könnte die hohe Autofluoreszenz des Myokards sein. Abbildung 28 zeigt im mittleren Bild fluoreszenz-markierte eEPCs in Assoziation mit vaskulären Strukturen im ischämischen Herzen. Das im linken Bild dargestellte Endothel wurde durch Injektion von FITC-konjugiertem Helix pomatia Lectin gefärbt. Die Überlagerung der beiden Fluoreszenzbilder zeigt die Einbindung der eEPCs (orange) in die Gefäßstrukturen (rechtes Bild, gelbe Pfeile; Balken = 50  $\mu\text{m}$ ).



**Abb. 28** Dil-gefärbte eEPCs im postischämischen Myokard. Die Überlagerung der beiden Fluoreszenzbilder zeigt die Einbindung der eEPCs (orange) in die Gefäßstrukturen (rechtes Bild, gelbe Pfeile; Balken = 50  $\mu\text{m}$ ).

## 4. Diskussion

### 4.1 Myokardiale Ischämie und Reperfusion am akuten und chronischen Mausmodell

Der endothelabhängige Ischämie/Reperfusionsschaden beruht auf Interaktion zwischen Endothel und Blutzellen. Das akute Tiermodell erlaubt es, unterschiedliche zelluläre Komponenten mittels Fluoreszenzfarbstoffen selektiv anzufärben und so die Adhäsionsmechanismen unter Berücksichtigung der makrohämodynamischen Parameter zu analysieren.

Die Methodik der fluoreszenzmikroskopischen Analyse der postischämischen Adhäsionsmechanismen ist für den Kleintierorganismus (Maus, Ratte, Hamster) aufgrund der Organgröße sehr gut geeignet. Wir entschieden uns für ein murines Modell, da sich über die Verwendung von gentechnisch veränderten Tierstämmen einzelne Komponenten auf ihre biologische Signifikanz für die Relevanz und Ausprägung des myokardialen I/R-Schadens untersuchen lassen. Weiterhin ist diese Spezies zum einen immunologisch sehr gut charakterisiert und zum anderen das Modell der myokardialen Ischämie in vivo und am isolierten Organ in der Literatur ausführlich beschrieben<sup>39, 143, 144, 196, 199</sup>.

Für die Analyse der Adhäsionsmechanismen wurde ein in vivo Modell gewählt, da hier die Komplexität der Adhäsionsmechanismen besser zu beurteilen ist als im isolierten Organ. Das Präparat im isolierten Organ wird mit Krebs-Henseleit-Lösung perfundiert. Vorteilhaft ist die Möglichkeit, die Adhäsion einer definierten Anzahl von Zellen einer Zelllinie zu untersuchen. Weiterhin können durch Einführung eines flüssigkeitsgefüllten Ballons in den linken Ventrikel die funktionalen Daten erhoben werden. Nachteilig ist jedoch, dass wichtige Faktoren wie z. B. Gerinnungsfaktoren und inflammatorische Signale, die im zirkulierenden Blut vorhanden sind, nicht berücksichtigt werden. Zudem ist eine invasive Präparation Ursache für eine gewisse Variabilität und ergibt einen weiteren, nicht zu unterschätzenden Störfaktor. Während der Präparation kommt es bei der Explantation zu einer kurzen Ischämie (2-4 Minuten) und damit zu einer zumindest kurzzeitigen Präkonditionierung, die die Ergebnisse ebenfalls beeinflussen kann. Beide Modelle, sowohl das akute in vivo Modell mit anschließender Fluoreszenzmikroskopie als auch das isolierte Organ, können über chronische Veränderungen keine Aussagen treffen.

Aus diesen Überlegungen heraus entschieden wir uns, ein chronisches Modell der myokardialen Ischämie und Reperfusion zu etablieren. Hierdurch können hämodynamische Messungen zeitlich versetzt zur Ischämie mittels Miniaturkatheter durchgeführt werden. Dieses Vorgehen ermöglicht es, funktionelle Daten Tage oder Wochen nach der Ischämie zu erheben und langfristige funktionelle und histologische Veränderungen zu analysieren.

#### **4.1.1 Fluoreszenzmikroskopie am Herzen**

Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden ex vivo im Anschluss an die in vivo Experimente durchgeführt. Da die Herzfrequenz in vivo in Bereichen zwischen 350 und 500 Schlägen pro Minute liegt, ist es in diesem Modell bisher nicht möglich, in vivo Messungen durchzuführen. Die Tatsache, dass aufgrund der Herzkontraktion im Mausmodell keine in vivo Analyse durchgeführt werden kann, muss als systemimmanenter Nachteil akzeptiert werden. Eine intravitalmikroskopische Analyse des schlagenden Herzens ist bisher nur am Großtiermodell beschrieben, bei dem die Optik auf das schlagende Herzen befestigt wird<sup>181</sup>. Da in diesem Modell gentechnisch veränderte Tiere nicht verfügbar sind, erschien für unsere Fragestellungen das oben beschriebene Modell als am besten geeignet.

#### **4.1.2 Einfluss der chirurgische Präparation**

Die mikrochirurgische Präparation, v. a. am Kleintiermodell, stellt immer einen Störfaktor dar. Auch wenn in allen Untersuchungen konsequent auf minimale Traumatisierung, geringen Blutverlust und zügige Präparation geachtet wurde, können Störeffekte durch die Narkose, das Operationstrauma, die Thorakotomie, durch einen geringen unvermeidbaren Blutverlust und durch die künstliche Beatmung nicht ausgeschlossen werden. Um den Einfluss der Präparation zu erfassen, wurden Sham-Kontrollgruppen analysiert. Ein Alternative bestünde in der Methode von Mark Entman (Anschlingen der LAD und elektive Okklusion ohne Öffnung des Thorax zu einem späteren Zeitpunkt)<sup>33</sup>.

## 4.2 Leukozyten/Thrombozyten-Interaktion am Modell akuter myokardialer Ischämie und Reperfusion

Die Interaktion zwischen Endothel, Leukozyten und Thrombozyten und deren Einfluss auf den frühen Reperfusionsschaden wurde *in vivo* an Wildtyp-, P-Selektin- und ICAM-1/P-Selektin-defizienten Tieren untersucht. Für die postischämische Leukozytenrekrutierung sind P-Selektin und ICAM-1 essenzielle Adhäsionsmoleküle. In Abwesenheit von P-Selektin war die Verminderung der Leukozytenadhäsion und des postischämischen linksventrikulären Funktionsverlustes moderat. Dieser Effekt wurde durch die zusätzliche Abwesenheit von ICAM-1 verstärkt (Abb. 11, Tabelle 5). Bekanntermaßen beeinflusst die Funktion von P-Selektin und ICAM-1 die Leukozytenrekrutierung maßgeblich<sup>27</sup>. Wir konnten in dieser Arbeit erstmals zeigen, dass im Rahmen von Ischämie und Reperfusion *in Abwesenheit der endothelialen Adhäsionsmolekülen ICAM-1 und P-Selektin* Thrombozyten eine wichtige Rolle für die Rekrutierung von Leukozyten spielen und so den postischämischen Funktionsverlust beeinflussen könnten. Dieser molekulare Mechanismus der Interaktion von Endothel, Thrombozyten und Leukozyten konnte weiter charakterisiert werden.

Die Inhibition der Plättchenadhäsion mittels GPIIb/IIIa-Inhibitor Tirofiban in wirksamer Hemmkonzentration (Abb. 14) reduzierte die Leukozytenadhäsion und die linksventrikuläre Dysfunktion (Abb. 15, Tabelle 5). Während in ICAM-1/P-Selektin-defizienten Herzen die direkte Rekrutierung von Leukozyten stark eingeschränkt war, konnte diese durch die Infusion von Wildtyp-Plättchen nahezu vollständig wiederhergestellt werden. Die Inhibition der Plättchenadhäsion durch die zusätzliche Gabe von Tirofiban konnte diesen Effekt wieder aufheben (Abb. 19). Diese Experimente demonstrieren die Rolle des thrombozytären P-Selektins und des  $\beta_3$ -Integrins GPIIb/IIIa in der postischämischen Leukozytenrekrutierung und im leukozyten-induzierten Reperfusionsschaden.

### 4.2.1 Funktionelle Bedeutung von Leukozyten/Thrombozyten-Co-Aggregaten

In verschiedenen Tiermodellen und zwei klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Leukozyten-Plättchen-Interaktion mit dem myokardialen Reperfusionsschaden korreliert<sup>120, 145, 150, 159</sup>. Es stellt sich die Frage, wie Thrombozyten die leukozytäre Rekrutierung beeinflussen. Eine Möglichkeit besteht in der Formation

von Co-Aggregaten zwischen Plättchen und Leukozyten, welche die Kapillaren physikalisch blockieren könnten (Capillary plugging). Diese Leukozyten-Plättchen-Co-Aggregate könnten zur Verstärkung der postischämischen myokardialen Dysfunktion beitragen. Dies wurde beispielsweise in einem xenotypischen Modell, in dem humane Leukozyten in Meerschweinchenherzen verwendet wurden, beobachtet. In diesem xenotypischen Modell war eine direkte Interaktion von leukozytärem MAC-1 (human) und endothelialem ICAM-1 (Meerschwein) ausgeschlossen<sup>110</sup>.

In der vorliegenden Studie, in der homologe und heterologe Thrombozyten und Leukozyten verwendet wurden, sprechen die Ergebnisse gegen eine mechanische kapilläre Verlegung. In unseren Versuchen zeigte sich, dass die Leukozytenrekrutierung in ICAM-1/P-Selektin-defizienten Herzen nach Infusion von P-Selektin-defizienten Plättchen im Vergleich zur Infusion von Tirofiban-behandelten Wildtyp-Plättchen nicht erhöht ist (Abb. 19). Allerdings ist die Co-Aggregat-Retention in P-Selektin-defizienten und ICAM-1/P-Selektin-defizienten Herzen (Abb. 12) höher, als in den Tirofiban-behandelten Gruppen (Abb. 16). Adhärente Plättchen beeinflussten möglicherweise die Leukozytenrekrutierung in diesen Herzen.

Erste Hinweise für einen alternativen Mechanismus fanden sich in Vorversuchen, in denen in isolierten Herzen nach Ischämie und Reperfusion Leukozyten nach Thrombozyteninfusion über die adhärennten Plättchen rekrutiert wurden: Im Vergleich zu Versuchen ohne vorherige Plättchen-Infusion erhöhte sich die Leukozytenrekrutierung nach Bolusgabe von Wildtyp-Plättchen in ICAM-1/P-Selektin-defizienten Herzen (kurz vor einer Leukozyten-Infusion) um ein Vierfaches. Diese Befunde sind vereinbar mit einem 2-Stufen-Modell der thrombozyten-mediierten Leukozytenrekrutierung, in dem die Plättchenadhäsion der leukozytären Adhäsion an thrombozytäre Adhäsionsmoleküle vorausgeht.

Hämodynamische Veränderungen können als Ursache für die unterschiedliche Rekrutierung ausgeschlossen werden, da in isolierten Herzen der Perfusionsdruck identisch ist (siehe Punkt 2.2.5.2). Analog war der systemische systolische Blutdruck in Wildtyp-Tieren im Vergleich zu P-Selektin- und ICAM-1-defizienten Tieren identisch, so dass dieser Parameter auch im in vivo Modell keinen Einfluss auf Unterschiede in der Adhäsion hatte<sup>151, 158</sup>.

Es stellt sich weiterhin die Frage welches vaskuläre Segment verantwortlich ist für plättchen-vermittelte Leukozytenadhäsion. Dieses Problem wurde in vorliegender Arbeit nicht eingehender untersucht. In früheren Studien an isolierten Herzen zeigte sich, dass postischämische Leukozytenadhäsion bevorzugt in kleinen, postkapillären

Venolen (15-50µm Durchmesser) und teilweise in größeren Venolen adhären, nicht aber in Arteriolen<sup>70, 112</sup>. Das gleiche vaskuläre Segment scheint, wenn auch nicht ausschließlich, Ort von adhärenen Plättchen zu sein, wie in einem Modell an mesenterialer Zirkulation zu sehen war<sup>135, 174</sup>. Ferner konnte thrombozytenvermittelte Leukozytenadhäsion in diesem vaskulären Segment in mesenterischer Mikrozirkulation gezeigt werden<sup>174</sup>. Die Plättchenadhäsion in koronarem Endothel, die die Leukozytenrekrutierung vermitteln kann, involviert das  $\beta_3$ -Integrin GPIIb/IIIa, dessen Inhibition die Plättchenadhäsion in Wildtyp-Mäusen blockiert (Abb. 17, Abb. 18). Dieses pleiotrope Molekül ist ein Rezeptor für Fibrinogen, Fibronectin und von-Willebrand-Faktor, welches an endotheliales ICAM-1 (über Fibrinogen), den Vitronectin-Rezeptor  $\alpha V\beta_3$  (über Fibrinogen und Fibronectin) und den vWF-Rezeptor GPIb (über von Willebrand Faktor) bindet. Die Rolle dieser endothelialen Plättchenrezeptoren wurde an ruhenden Zellen von humanen Umbilikalvenen demonstriert<sup>21, 174</sup>. Diese Plättchenrezeptoren werden durch Aktivierung des Endothels rasch hochreguliert und sind vor allem an postischämisch aktiviertem Endothel präsent ( $\alpha V\beta_3$ <sup>64</sup> und GP1b<sup>165</sup>). Auf der anderen Seite zeigte sich in unseren Versuchen unter Verwendung von ICAM-1/P-Selektin-defizienten Mäusen, dass die Abwesenheit von endothelialelem ICAM-1, welches in der Reperfusion im Darm als Rezeptor für Plättchen dient<sup>136</sup>, die Thrombozytenadhäsion im Herzen in unserem Modell nicht beeinflusste (Abb. 13). Die zusätzliche Abwesenheit von P-Selektin in den doppelt-defizienten Tieren beeinträchtigte die Plättchenadhäsion nicht zusätzlich (Abb. 13). Diese Befunde bestätigen die Ergebnisse einer Studie, in der Thrombozytenadhäsion an Mausvenen bei niedriger Scherkraft durch von-Willebrand-Faktor deutlich verstärkt wurde, nicht jedoch durch P-Selektin Translokation<sup>11</sup>.

Über die Endothel-Plättchen-Interaktion hinaus reduziert die Inhibition von GPIIb/IIIa die Rekrutierung der Leukozyten und die Leukozyten/Thrombozyten-Co-Aggregatbildung. Ein potentieller direkter Effekt von Tirofiban auf Leukozyten-Adhäsionsmoleküle ist bisher noch nicht beschrieben worden, im Gegensatz zu Abciximab, einem alternativen GPIIb/IIIa-Inhibitor<sup>160</sup>. Daraus lässt sich schließen, dass die Blockade von GPIIb/IIIa durch Tirofiban die endotheliale Thrombozytenadhäsion inhibiert und dadurch zu einer Reduktion der Co-Aggregatbildung und der thrombozyten-vermittelten Leukozytenrekrutierung führt.

Eine Möglichkeit der Interaktion zwischen Thrombozyten und Leukozyten wurde in einem in vitro Modell beschrieben, in dem thrombozytäres GPIIb/IIIa unter Scherspannung als Hauptrezeptor für polymorphkernige Granulozyten diente und am

ehesten über das  $\beta_2$ -Integrin MAC-1 und Fibrinogen mit Thrombozyten interagiert<sup>217</sup>. Der geringe Anteil der Leukozyten/Thrombozyten-Interaktion, der in dieser Arbeit unter Zugabe von Tirofiban beobachtet wurde, könnte durch Bindung von thrombozytärem ICAM-2 und leukozytären  $\beta_2$ -Integrinen<sup>34, 107</sup> oder durch GPIb $\alpha$ , dass an eine CD11b-Unterdomeäne des MAC-1-Moleküles bindet<sup>185</sup>, vermittelt werden. Es sei erwähnt, dass die Interaktion der leukozytären  $\beta_2$ -Integrine mit thrombozytärem GPIb, GPIIb/IIIa oder ICAM-2 eine feste und definitive Interaktion von Leukozyten und Thrombozyten mediiieren kann<sup>30</sup>.

#### **4.2.2 Thrombozytäres P-Selektin vermittelt thrombozytenmedierte Leukozytenrekrutierung**

Der initiale Kontakt zwischen Thrombozyten und Leukozyten ist, ähnlich wie beim Endothel-Leukozyten-Kontakt, charakterisiert durch reversible Bindung<sup>217</sup>. Dass das thrombozytäre P-Selektin, welches an den PSLG-1 von Leukozyten bindet, hier eine essenzielle Rolle spielt, wurde sowohl in Zellkultur<sup>34, 45</sup> als auch in vivo<sup>188</sup> beschrieben.

Um nun die Interaktion von thrombozytärem bzw. endothelialem P-Selektin mit leukozytären Rezeptoren zu differenzieren, verwendeten wir Mäuse mit P-Selektin- und ICAM-1-Defizienz. In diesen Mäusen war die direkte Leukozyten-Endothel-Interaktion stark eingeschränkt. Wenn zirkulierende oder von Spendern infundierte Plättchen P-Selektin-Defizienz aufwiesen, zeigte sich keine Änderung der Leukozytenrekrutierung (Abb 11, Abb 19). Auffallend war, dass die Infusion von Plättchen, die P-Selektin exprimierten, die Leukozytenrekrutierung in ICAM-1/P-Selektin-defizienten Herzen mehr als verdoppelt (Abb. 19).

Erwähnenswert ist hierbei, dass die Versuche mit den P-Selektin-defizienten bzw. P-Selektin-exprimierenden Plättchen in Tieren mit dem gleichen genetischen Hintergrund durchgeführt wurden und zudem eine definierte Anzahl von Plättchen infundiert wurde, um artifizielle Unterschiede bei den Leukozyten- oder Thrombozytenzählungen auszuschließen.

Eine Möglichkeit für die postischämische Rekrutierung von Leukozyten in ICAM-1/P-Selektin-defizienten Tieren wäre über das thrombozytäre Glykoprotein IIb/IIIa von adherenten Plättchen und das leukozytäre  $\beta_2$ -Integrin MAC-1 über Fibrinogen<sup>218</sup>. Letztendlich ist die Leukozytenrekrutierung in den doppeldefizienten Tieren nicht vollständig aufgehoben. Der Befund, dass die Infusion von WT-Thrombozyten, nicht jedoch

von P-Selektin-defizienten Plättchen, eine mehr als zweifache Steigerung der Leukozytenrekrutierung zur Folge hat, lässt darauf schließen, dass thrombozytäres P-Selektin in unserem Modell eine signifikante Rolle in der thrombozyten-vermittelten Leukozytenrekrutierung spielt.

Wir konnten somit erstmals zeigen, dass die Rekrutierung von Leukozyten über die Bindung von thrombozytärem P-Selektin ein redundantes System für postischämische, thrombozyten-vermittelte Leukozytenrekrutierung in vivo darstellt. Diese Erkenntnisse bestätigen die beschriebene Rolle der Plättchen in anderen Organen nach Reperfusion wie dem Darm<sup>174</sup> und der Niere<sup>187</sup>. Dieser Mechanismus könnte von Bedeutung sein, wenn die Interaktion von endotheliale ICAM-1 und  $\beta$ -2-Integrinen z. B. durch Antikörperinfusion blockiert wird. Dies könnte erklären, weshalb zwei klinische Studien mit CD11/CD18-Antikörper-Gabe nach PTCA keinen benefiziellen Effekt auf die Infarktgröße erreichte<sup>46, 172</sup>.

Für den frühen postischämischen Funktionsverlust ist die leukozytäre Rekrutierung ausschlaggebend. Wie in anderen Arbeiten gezeigt<sup>52, 121</sup>, war auch in unserem akuten I/R-Modell eine hohe Korrelation zwischen Leukozytenrekrutierung und verminderter linksventrikulärer Funktion zu beobachten ( $r=0,93$ , Abb. 20). Andererseits scheinen Thrombozyten nicht direkt am postischämischen Schaden beteiligt zu sein, da eine signifikante Korrelation zwischen Plättchenrekrutierung und linksventrikulärer Funktion nicht festzustellen war ( $r=0,3$ , Abb. 21).

Aus diesen Ergebnissen folgern wir, dass Thrombozyten indirekt zum Reperfusionsschaden beitragen, indem sie die postischämische Leukozytenadhäsion verstärken. Diese plättchen-vermittelte Leukozytenadhäsion benötigt zwar P-Selektin-exprimierende Plättchen, nicht jedoch endotheliales P-Selektin. Die Antagonisierung von GPIIb/IIIa, die in Patienten effektiv ist für die Thrombolysebehandlung<sup>31</sup>, PTCA<sup>177</sup> und Stent-Implantation<sup>10, 149, 203</sup>, inhibiert sowohl die Plättchenadhäsion als auch thrombozyten-vermittelte Leukozytenrekrutierung.

Zumindest in diesem Modell der akuten myokardialen Ischämie und Reperfusion zeigte die GPIIb/IIIa-Antagonisierung eine protektive Wirkung über die Plättchen-Inhibition hinaus, in dem sie den durch plättchenvermittelte Leukozytenrekrutierung induzierten akuten Reperfusionsschaden reduzierte.

## **4.3 Zelluläre Therapien der myokardialen I/R im chronischen Modell**

Auswirkungen einer reduzierten Leukozytenadhäsion auf den chronischen postischämischen Reperfusionsschaden wurden in einem weiteren Schritt im chronischen Modell untersucht. Hierzu wurde zunächst ein chronisches Mausmodell der myokardialen Ischämie und Reperfusion nach der Methode von Michael et al. etabliert<sup>144</sup> (s. Punkt 2.3). Zur Analyse der postischämischen Hämodynamik wurde die invasive Druckmessung mittels Millar-Tip Katheter etabliert (s. Punkt 2.3.5).

Neben Wildtyp-Tieren wurden ICAM-1-defiziente Tiere untersucht, in denen die Leukozytenadhäsion reduziert ist<sup>89, 158</sup>. In einer weiteren Gruppe wurden in vitro expandierte embryonale endotheliale Progenitorzellen (eEPCs) 24 Stunden nach LAD-Okklusion in WT und ICAM-1-Tiere infundiert. So konnten wir einen möglichen protektiven Effekt der eEPCs auf die postischämische LV-Funktion untersuchen. Durch die Kombination von ICAM-1-Defizienz und eEPC-Behandlung konnte die Wirkung der eEPCs unabhängig von einem durch Leukozyten vermittelten Reperfusionsschaden analysiert werden. Zum Vergleich der Therapie mit ex vivo expandierten Zellen wurden autologe Progenitorzellen und mononukleäre Zellen aus dem Knochenmark mittels GM-CSF-Gabe mobilisiert. GM-CSF wurde präischämisch und postischämisch appliziert, nach 14 Tagen wurde die postischämische myokardiale Funktion untersucht.

### **4.3.1 Die Defizienz von ICAM-1 reduziert den postischämischen Reperfusionsschaden nach 14 Tagen**

Postischämisch einwandernde neutrophile Leukozyten setzen kardiotoxische Substanzen frei, z. B. reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wie Wasserstoffperoxid und proteolytische Enzyme, die das postischämische Gewebe schädigen<sup>36, 44, 72</sup>. Sie können Kapillaren verstopfen und so zu einer Minderung des Blutflusses führen<sup>9</sup>. Ferner werden proinflammatorische Cytokine wie z. B. Leukotrien B4 und Plättchen-Aktivierender Faktor (PAF) freigesetzt, die zusätzlich die Leukozyten- und Thrombozytenrekrutierung verstärken<sup>44, 72</sup>. ROS können jegliche biologisch relevanten Moleküle schädigen, z. B. ungesättigte Fettsäuren von Zellmembranen oder Sulfhydrylgruppen von strukturellen Proteinen. Sie können Enzyme oxidieren sowie die oxidative Phosphorylierung in Mitochondrien inhibieren<sup>7, 47</sup>. Zusätzlich modulieren

ROS weitere zelluläre Aktivitäten. Z. B. können sie NO inaktivieren<sup>69</sup>, die Adhäsion von PMNs an intakte Gefäße induzieren<sup>62</sup> und die Bildung intravaskulärer Thrombose fördern<sup>68</sup>. So tragen PMNs durch die Produktion von ROS direkt und indirekt durch Initiierung weiterer schädigender Prozesse zur Gewebeschädigung bei.

Neben der Antagonisierung von proinflammatorischen Faktoren wie z. B. NF- $\kappa$ B<sup>111</sup>, ist die Blockade von Adhäsionsmolekülen<sup>60</sup> oder deren Deletion<sup>158</sup> eine Möglichkeit, die Leukozyteneinwanderung in postischämisches Areal zu reduzieren. Für die feste Adhäsion ist das endotheliale ICAM-1 essenziell, da es als Ligand für CD18-Integrine der Leukozyten dient<sup>50, 125</sup>. Die Defizienz von ICAM-1 oder CD18 führt nach 30 Minuten Ischämie und 3 Stunden Reperfusion zu einer reduzierten Infiltration von Leukozyten und einer Reduktion der nekrotischen Areale im Infarktgebiet<sup>158</sup>. In einem chronischen Ischämie/Reperusionsmodell war die Infarktgröße 24 Stunden nach 30-minütiger LAD-Okklusion in ICAM-1- und CD-18-defizienten Tieren signifikant verringert<sup>89</sup>. In unserem Modell zeigte sich in den Tieren, in denen die Leukozytenadhäsion durch die ICAM-1-Defizienz reduziert war, eine signifikante Verbesserung der postischämischen myokardialen Funktion im Vergleich zu WT-Kontrollen (Abb. 22, Abb. 23, Abb. 24).

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass ICAM-1-Defizienz und die dadurch reduzierte postischämische Leukozytenadhäsion den leukozyten-assoziierten Reperfusionsschaden im chronischen Modell reduziert.

#### **4.3.2 Postischämische Applikation von eEPCs verbessert die linksventrikuläre Myokardfunktion**

Die Applikation von in vitro expandierten Zellen ist ein therapeutischer Ansatz, der in jüngerer Zeit in experimentellen und klinischen Studien untersucht wurde<sup>81, 138, 167, 208</sup>.

Die systemische Applikation von humanen Angioblasten 48 Stunden nach LAD-Okklusion in einem Rattenmodell bewirkte eine deutliche Besserung der Myokardfunktion in den behandelten Tieren nach 2 und 15 Wochen. Gleichzeitig zeigte sich eine gesteigerte Neovaskulogenese und verringerte Apoptose im Infarkttrandgebiet<sup>103</sup>. Humane EPCs wurden nach venöser Applikation drei Stunden nach LAD-Okklusion in das Infarktgebiet rekrutiert. 4 Wochen später zeigte sich eine signifikante Infarktreduktion und Verbesserung der LV-Funktion<sup>97</sup>.

Embryonale EPCs haben die Eigenschaft in hypoxisches Gewebe einzuwandern, wie in einem Tumor-Metastasen-Modell gezeigt werden konnte. Das verstärkte „Homing“

der eEPCs stand hier in engem Zusammenhang mit schlechter Tumordurchblutung, niedriger Perfusion sowie hohem VEGF- und Hypoxyniveau<sup>219</sup>. In der vorliegenden Arbeit konnten nach systemischer Applikation von Dil-markierten eEPCs diese nach 14 Tagen im ischämischen Areal in Nachbarschaft mit vaskulären Segmenten nachgewiesen werden (Abb. 28). Dieses ist ein Hinweis darauf, dass eEPCs in der Lage sind nach Applikation in postischämisches Myokard einzuwandern. Die funktionelle Analyse der Herzen nach 14 Tagen Reperfusion zeigte eine signifikante Reduktion des Reperfusionsschadens in den behandelten Tieren. Der linksventrikulär entwickelte Druck und die globalen Parameter für Kontraktilität und Relaxation zeigten eine deutliche Verbesserung im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen. Somit konnten wir nachweisen, dass eEPCs in der Lage sind in ischämischem Areal zu adhären und protektiv auf die postischämische Funktion zu wirken.

#### **4.3.2.1 Protektive Mechanismen embryonaler EPCs**

Es wurde postuliert, dass der positive Effekt, der durch Behandlung mit EPCs gezeigt wurde, auf Inkorporation und Differenzierung der applizierten Zellen zu adulten Endothelzellen und der damit verbundenen verbesserten Neoangiogenese beruht<sup>97</sup>. Die Inkorporation der eEPCs in vaskulären Strukturen ist ausreichend belegt<sup>219</sup>. Jedoch erklärt die geringe Anzahl der nachgewiesenen Zellen den Effekt der eEPCs auf Tumorstadium nicht vollständig. In der vorliegenden Arbeit konnten eingewanderte eEPCs im ischämischen Areal nachgewiesen werden, ein großer Teil davon zeigte sich in enger Nachbarschaft mit Blutgefäßen (Abb. 28).

In ähnlicher Weise fanden sich adulte, aus dem Knochenmark stammende Zellen, in chronisch ischämischen Hinterläufen, nicht in erster Linie integriert in das Endothel, sondern perivaskulär<sup>77, 228</sup>. Die Daten dieser und anderer Arbeiten geben Hinweise darauf, dass erhöhte Vaskularisierung und Gewebefunktion ein Resultat aus indirekten Effekten von Progenitorzellen im geschädigten Gewebe ist. Die Eigenschaft, in ischämisches Gewebe zu migrieren<sup>114, 126, 208, 211</sup>, ermöglicht es lokal einen benefiziellen Effekt zu erzielen. Embryonale EPCs können so als Vehikel für parakrine angiogenese-fördernde „Software“ funktionieren<sup>101, 102</sup>.

Einer der protektiven Mechanismen wird über den PI3-kinase/AKT-Signalweg mediiert, dessen Aktivierung zu einem vermehrten Überleben von Myozyten führt<sup>75, 139</sup>. Humorale Aktivatoren dieses Signalweges, wie z. B. Insulin-Like-Growth-Factor-1<sup>140</sup>, Leukemia-Inhibitory-Factor<sup>153</sup> und Thymosin- $\beta_4$ <sup>19</sup> sind stark exprimiert in eEPCs (3,3-

fach, 4,0-fach, und 7,1-fach über dem Durchschnitt; Affymetrix Analyse). In vitro sind eEPCs in der Lage, durch Bereitstellung von humoralen Mediatoren frühe Protektion gegen Zelltod von Myozyten zu vermitteln<sup>114</sup>. In einem xenogenen Großtiermodell der myokardialen Ischämie und Reperfusion verbesserte die retrograde Applikation muriner eEPCs die Kapillarisation, reduzierte den Infarkt und führte zu einer verbesserten postischämischen linksventrikulären Funktion, teilweise über die Aktivierung des PI3-kinase/AKT-Signalweges<sup>113</sup>.

In einer Modellvorstellung für die protektiven Effekte der eEPCs wandern die systemisch applizierten Vorläuferzellen in postischämisches Gewebe ein. Dort dienen sie über einen längeren Zeitraum als Quelle für parakrine Angiogenese-fördernde humorale Aktivatorien wie z. B. Thymosin- $\beta_4$  und führen somit zu einer verbesserten postischämischen Funktion, wie auch in dieser Arbeit gezeigt werden konnte.

### **4.3.3 Adhäsion von eEPCs ist unabhängig von der ICAM-1-Expression**

Zur Beantwortung der Frage, inwieweit der postischämische Leukozyten-vermittelte Reperfusionsschaden den protektiven Effekt der eEPC-Behandlung beeinflusst, wurden in einer weiteren Gruppe ICAM-1-defiziente Tiere mit eEPCs behandelt. Es zeigte sich, dass die Kombination von ICAM-1-Defizienz und eEPC-Behandlung einen additiven benefiziellen Effekt auf die postischämische LV-Funktion hatte (Abb. 22, Abb. 23). Unter verringerter Leukozytenadhäsion zeigte sich der protektive Effekt der embryonalen EPCs noch deutlicher: Der durch die Reduktion der Leukozytenadhäsion verringerte Reperfusionsschaden in den ICAM-1-defizienten Tieren konnte durch die Infusion der eEPCs noch weiter reduziert werden. Dies deutet darauf hin, dass die Defizienz von ICAM-1 keinen Einfluss auf die eEPC-Adhäsion hat, wie unsere Gruppe auch in einem in situ Adhäsionsassay am Herzen zeigen konnte (Browarczyk, Kupatt, unpublizierte Daten).

Alternative Adhäsionsmechanismen für eEPCs z. B. über E-Selektin, P-Selektin und PSGL-1 sind in einem Tumorangio-genese-modell beschrieben worden. Durch die Verwendung von spezifischen Antikörpern konnte die Adhäsion von eEPCs in diesem Modell reduziert werden<sup>211</sup>.

Im Gegensatz zu den embryonalen Zellen medierte in adulten EPCs VLA-4, welches auf deren Oberfläche vorhanden ist, das Homing an endotheliale Monolayer aus dem Knochenmark stammender Mikrogefäße über die Bindung an VCAM-1<sup>57, 141</sup>. In frühe-

ren Arbeiten konnte durch die Neutralisierung von VLA-4 das Homing von humanen CD34-Zellen an Knochenmarkszellen von fetalen Schafen blockiert werden<sup>227</sup>.

In einer erst kürzlich erschienenen Arbeit zeigte sich, dass eEPCs nicht ausschließlich direkt über endotheliale Adhäsionsmechanismen rekrutiert werden, sondern an denudierten Carotiden auch indirekt über adhärenente Thrombozyten. Hier erfolgte die Interaktion zwischen eEPCs und adhärenenten Thrombozyten über die Adhäsionsmoleküle VLA-4 und PSGL-1<sup>118</sup>.

Die Adhäsion von Leukozyten und der damit verbundene leukozyten-assoziierte Reperfusionsschaden ist durch die Defizienz von ICAM-1 auch im chronischen Ischämie/Reperusionsmodell vermindert. Die Adhäsion von eEPCs scheint dagegen unabhängig von ICAM-1 zu sein. Hier scheinen Selektine<sup>211</sup>,  $\beta_1$ -Integrine<sup>57, 141</sup> und indirekt auch Thrombozyten<sup>118</sup> eine wesentliche Rolle zu spielen.

#### **4.3.4 Die präischämische Applikation von GM-CSF verbessert die myokardiale linksventrikuläre Funktion**

Um den protektiven Effekt der eEPCs mit der Wirkung mobilisierter Progenitorzellen des Knochenmarks zu vergleichen, wurde in einer abschließenden Versuchsreihe GM-CSF präischämisch und postischämisch appliziert. In experimentellen und klinischen Studien konnte durch die Applikation von Knochenmarks-mobilisierenden Zytokinen eine verbesserte Neoangiogenese und Funktion in ischämischen Organen erreicht werden<sup>85, 96, 155, 197</sup>. Wir orientierten uns an einem Tiermodell von Asahara et al.<sup>197</sup>, in dem durch die präischämische Gabe von GM-CSF sieben Tage vor Ischämie die Perfusion im ischämischen Hinterlaufmodell im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen verbessert worden war. Es zeigte sich außerdem eine Zunahme der kapillären Dichte in den GM-CSF-behandelten Tieren, ebenso wie eine verbesserte Neovaskularisation in der Cornea der Maus<sup>197</sup>. Orlic et al. konnte durch präischämische Gabe von G-CSF und Stromal-Cell-Derived-Factor-1 (SDF-1) in einem Mausmodell mit permanenter LAD-Okklusion die Infarktgröße und postischämische Funktion verbessern<sup>155</sup>. Auch in unserem Modell der temporären LAD-Okklusion gefolgt von 14-tägiger Reperfusion war der postischämische Schaden nach Vorbehandlung mit GM-CSF verringert, während die postischämische Applikation die postischämische Funktion tendenziell verschlechterte (Abb. 25, Abb. 26, Abb. 27).

Die Applikation von GM-CSF führt zu einer Mobilisierung von unterschiedlichen Zellen aus dem Knochenmark. Es kommt Stunden nach der Applikation zu einer Erhö-

hung der zirkulierenden mononukleären Zellen, Granulozyten und Progenitorzellen<sup>79, 189, 197, 206</sup>. Thrombozyten, Erythrozyten und Lymphozyten werden von der GM-CSF-Gabe nicht beeinflusst<sup>1</sup>.

Durch die Erhöhung der zirkulierenden Progenitorzellen, die in dem ischämischen Areal adhären, wirken EPC-mobilisierende Faktoren protektiv auf das postischämische Myokard<sup>155, 183</sup>. Die genauen Mechanismen sind bisher noch nicht vollständig geklärt. Es wird jedoch vermutet, dass die Zellen im perivaskulären Gewebe akkumulieren<sup>228</sup> und über Sekretion von proangiogenetischen Proteinen wie z. B. VEGF, basic-Fibroblast-Growth-Factor, Insulin-Like-Growth-Factor-1, und SDF-1 Neoangiogenese fördern<sup>226</sup> und beispielsweise Apoptose in Kardiomyozyten verringern<sup>205</sup>.

Monozyten wandern drei bis fünf Tage nach Ischämie in das Infarktareal und differenzieren dort zu Makrophagen<sup>54</sup>. Sie unterstützen den Remodellingprozess z. B. durch das Abräumen des geschädigten Gewebes<sup>223</sup>. Eine weitere wichtige Funktion besteht in der Bereitstellung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren<sup>220</sup>, ferner modifizieren mononukleäre Zellen den Metabolismus der extrazellulären Matrix durch Synthese von Matrix-Metalloproteinasen und deren Inhibitoren<sup>53, 61</sup>. Die Amplifikation der Monozyten durch GM-CSF-Gabe kann so zu gesteigerter Arteriogenese führen<sup>26</sup>. In einer klinischen Studie an Patienten mit schwerer koronarer Herzkrankheit, führte die Applikation von GM-CSF zwei Wochen nach Behandlungsbeginn zu einem gesteigerten kollateralen koronaren Blutfluss<sup>179</sup>.

Neben Monozyten und den Progenitorzellen führt die GM-CSF-Gabe auch zu einer Erhöhung der zirkulierenden Leukozyten<sup>1</sup>. Die massive Leukozyten-Infiltration in postischämisches Myokard führt zu einer Gewebeschädigung und korreliert mit dem Ausmaß der myokardialen Schädigung wie u. a. im ersten Teil dieser Arbeit und von weiteren Autoren<sup>52, 90</sup> gezeigt wurde. In unseren Versuchen brachte die postischämische Applikation von GM-CSF keinen protektiven Effekt. Ebenso zeigte sich nach postischämischer GM-CSF-Gabe in einem Großtiermodell nach 50-minütiger LAD-Okklusion, gefolgt von 3 Wochen Reperfusion, keine funktionelle Verbesserung und keine Reduktion des Infarktes im Vergleich zu Kontroll-Tieren<sup>201</sup>. Nach Stimulation von endogenem GM-CSF mit Romutide im Rattenmodell kam es zu einer deutlichen Vergrößerung des Infarktes 2 Wochen nach LAD-Okklusion, einhergehend mit fehlgeleiteter Kollagensynthese im Infarkt-Gebiet<sup>131</sup>. Bei diesem Befund sei jedoch einschränkend anzumerken, dass Romutide vielfältige unspezifische immunostimulatorische Effekte hervorruft, wie zum Beispiel die Induktion von Interleukin-1, Interleukin-6, TNF- $\alpha$ , Interferon- $\gamma$  und Komplement-Faktoren<sup>15</sup>.

Neben der Mobilisation von Knochenmarkszellen zeigten sich zunehmend Hinweise auf die direkten Wirkungen von GM-CSF auf die Effektorzellen. Soldi et al. konnten die direkte Aktivierung des Jak/Stat-Signalweges in humanen Endothelzellen durch GM-CSF zeigen<sup>190</sup>. Die Aktivierung dieses Signalweges führt zu einer Stimulation der Angiogenese<sup>212</sup>. In einer neueren Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des Jak/Stat-Signalweges in Myozyten durch G-CSF in isolierten Mäuseherzen nach 30-minütiger Ischämie und Reperfusion sowie 14 Tage nach chronischer Myokardischämie protektiv wirkt<sup>73</sup>.

Ein entscheidender Faktor für eine erfolgreiche therapeutische Wirkung ist der Zeitpunkt der Applikation. Eine mögliche Erklärung liegt in der Kinetik der Zellmobilisation. Während sich die Anzahl der zirkulierenden Leukozyten drei Tage nach GM-CSF-Applikation wieder normalisiert, sind Monozyten und Progenitorzellen noch eine Woche nach Beendigung der Behandlung erhöht<sup>1, 197</sup>.

Es bleibt festzustellen, dass die Modifikation des Knochenmarks durch Zytokin-Applikation protektive, aber auch schädigende Wirkungen haben kann. Neben der Wahl des Zytokins ist die Dauer der Applikation entscheidend für den Effekt der Therapie.

#### **4.3.5 Knochenmarksstimulierende Zytokine nach Myokardischämie in klinischen Studien**

Zur Behandlung von Patienten mit akutem Koronarsyndrom mit GM-CSF gibt es zur Zeit keine klinischen Studien. Alternativ zu GM-CSF wurde G-CSF mittlerweile in sechs klinischen Studien appliziert. In den ersten ungeblindeten Studien mit kleinem Patientenkollektiv zeigte sich in den G-CSF-behandelten Gruppen echokardiographisch eine Besserung der Ejektionsfraktion (EF) und des Wall-Motion-Index<sup>85, 86</sup> sowie der szintigraphisch bestimmten Perfusion<sup>106</sup>. Eine weitere Studie zeigte sechs Monate nach Infarkt in der G-CSF behandelten Gruppe eine signifikante Verbesserung der EF in der Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT), während in der Kontrollgruppe keine Verbesserung beobachtet wurde<sup>198</sup>. In fünf geblindeten und randomisierten Studien mit größerem Patientenkollektiv zeigte sich zwar eine Verbesserung der globalen Herzfunktion sowie eine Reduktion der Infarktgröße in der Magnetresonanztomographie<sup>43, 164</sup>, echokardiographisch<sup>42</sup> bzw. szintigraphisch gemessen<sup>198, 213, 229</sup>, jedoch konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen G-CSF- und Placebo-behandelten Gruppen beobachtet werden.

Die klaren Effekte der tierexperimentellen Versuche konnten in den klinischen Studien bisher nur unzureichend reproduziert werden. Mehrere Variablen können verantwortlich sein für diese Ergebnisse: Der Zeitpunkt der Zytokin-Applikation nach der Revaskularisierung scheint ein wichtiger Faktor für die therapeutische Effektivität zu sein. In den tierexperimentellen Arbeiten an Kleintieren wurde G-CSF und GM-CSF vor oder direkt nach der Induktion der Ischämie gegeben<sup>32, 97, 114, 155</sup>. In einem Großtiermodell führte die frühe postischämische Applikation von G-CSF zu einer geringeren linksventrikulären Dilatation im Vergleich zur 7 Tage verzögerten Applikation<sup>17</sup>. In der positiven FIRSTLINE-AMI-Studie wurde die G-CSF-Behandlung 90 Minuten nach Revaskularisierung begonnen, während in den negativen Studien G-CSF nach 31 Stunden<sup>43</sup>, 30 Stunden<sup>164</sup> und 5 Tagen<sup>229</sup> gegeben wurde.

Die G-CSF-Dosis, die in den klinischen Studien appliziert wurde, lag mit 10µg/kg/KG deutlich unterhalb der in den tierexperimentellen Studien verabreichten Mengen. In den experimentellen Studien wurde die 5- bis 10-fache Dosis, teilweise mit zusätzlichen Zytokinen kombiniert, gegeben.

In einer Arbeit von Lehrke et al. zeigte sich, dass nach Myokardinfarkt junge Tiere deutlich mehr von der G-CSF-Behandlung profitierten als ältere Tiere<sup>122</sup>. Betrachtet man die klinischen Studien unter diesen Gesichtspunkten, zeigt sich, dass die Patienten in der FIRSTLINE-AMI-Studie ca. 10 Jahre jünger waren als in der REVIVAL-2-Studie oder der G-CSF-STEMI-Studie.

In den heterogenen Patientenkollektiven der klinischen Studien gibt es viele Variablen wie z. B. unterschiedliche Infarktgrößen, unterschiedlich ausgeprägte endotheliale Dysfunktion und variable Komorbiditäten. Ferner werden Infarktpatienten mit einer Standardtherapie von Medikamenten z.B. β-Blocker, ACE-Hemmer, Heparin und Statinen behandelt, die schon an sich zu einer Besserung der postischämischen Funktion und der Infarktgröße führt. Hinzu kommt, dass der direkte experimentelle Effekt mit klinischen Parametern nur teilweise erfassbar ist.

In weiteren Studien wird es notwendig sein, den optimalen Zeitpunkt und die optimale Dosis zu evaluieren und weiterhin mögliche Co-Applikation, z. B. SDF-1 zur Effizienzsteigerung und Verbesserung der Rekrutierung zu untersuchen, um knochenmark-stimulierende Zytokine als adjuvante Therapie im akuten Koronarsyndrom einsetzen zu können.

## 5. Zusammenfassung

Der akute Myokardinfarkt ist eine der häufigsten Diagnosen in den industrialisierten Ländern. In der Regel kommt es zu einem thrombotischen Verschluss einer Koronararterie. Die rasche Revaskularisierung und die dadurch erhoffte Reduktion des infarzierten Areals ist die wichtigste therapeutische Maßnahme zur Rettung des ischämischen Myokards und zur Senkung der Morbidität und Mortalität. Nach der plötzlichen Reperfusion des postischämischen Gewebes kommt es zu einem sogenannten myokardialen Ischämie/Reperfusionsschaden, der sich als Endothel- und Myozytenschädigung ausbildet.

Folge von rascher Reoxygenierung sind u. a. eine gesteigerte inflammatorische Reaktion und in diesem Rahmen eine gesteigerte Einwanderung von Leukozyten in das ischämische Areal. Die Rolle der Thrombozyten für die postischämische Leukozytenrekrutierung war bisher unklar.

In unserer Studie wurden Wildtyp- (WT), P-Selektin- und ICAM-1/P-Selektindefiziente Mäuse einer 20-minütigen LAD-Okklusion unterzogen, gefolgt von 15 Minuten Reperfusion, um den Effekt der Interaktion zwischen Endothel, Leukozyten und Thrombozyten und den Einfluss auf den frühen Reperfusionsschaden zu untersuchen. Anschließend wurden die Herzen ex vivo fluoreszenzmikroskopisch bzw. mittels LV-Druckmessung im isolierten Herzen analysiert. Zur Analyse der Zell-Zell-Interaktion wurden zu Beginn der Reperfusion zirkulierende Leukozyten mit Rhodamin G6 gefärbt bzw.  $2 \times 10^8$  BCECF-AM- oder Rhodamin G6-gefärbte homologe oder heterologe Thrombozyten systemisch infundiert.

In P-Selektin-defizienten Tieren war die Verminderung der Leukozytenrekrutierung (Abb. 11) und die Bildung der Leukozyten/Thrombozyten-Co-Aggregate (Abb. 12) sowie die Reduktion des postischämischen linksventrikulären Funktionsverlustes (Tabelle 5) moderat. Dieser Effekt wurde durch die zusätzliche Abwesenheit von ICAM-1 verstärkt (Abb. 11, Abb. 12, Tabelle 5). Die Adhäsion von Plättchen war nicht beeinflusst (Abb. 13). Die Inhibition der Thrombozytenadhäsion mittels Tirofiban, einem GPIIb/IIIa-Inhibitor (Abb. 14), reduzierte die Leukozytenadhäsion und die linksventrikuläre Dysfunktion (Abb. 15, Tabelle 5). Während in ICAM-1/P-Selektindefizienten Herzen die direkte Rekrutierung von Leukozyten stark eingeschränkt war, konnte diese durch die Infusion von Wildtyp-Plättchen nahezu vollständig wiederhergestellt werden. Die Inhibition der Plättchenadhäsion durch die zusätzliche Gabe von Tirofiban konnte diesen Effekt wieder aufheben (Abb. 19). Unsere Experimente demonstrieren erstmals die Rolle des thrombozytären P-Selektins und des  $\beta_3$ -Integrins

GPIIb/IIIa als redundanten Rekrutierungsmechanismus für die thrombozytenvermittelte postischämische Leukozytenrekrutierung in vivo.

Über diesen redundanten Mechanismus tragen Thrombozyten indirekt zum Reperfusionsschaden bei, indem sie die postischämische Leukozytenadhäsion verstärken. Diese thrombozytenvermittelte Leukozytenadhäsion benötigt P-Selektin-suffiziente Plättchen, nicht jedoch endotheliales P-Selektin. Die Antagonisierung von GPIIb/IIIa, die in Patienten effektiv ist für die Thrombolysebehandlung<sup>31</sup>, PTCA<sup>177</sup> und Stent-Implantation<sup>10, 149, 203</sup>, inhibiert sowohl die Plättchenadhäsion als auch thrombozytenvermittelte Leukozytenrekrutierung.

Im experimentellen Modell der akuten myokardialen Ischämie und Reperfusion zeigte die GPIIb/IIIa-Antagonisierung eine protektive Wirkung über die Plättchen-Inhibition hinaus, in dem sie den durch plättchenvermittelte Leukozytenrekrutierung induzierten akuten Reperfusionsschaden reduzierte.

In einem weiteren Schritt wurde ein chronisches Mausmodell der myokardialen Ischämie und Reperfusion etabliert, um die Auswirkungen einer reduzierten Leukozytenadhäsion auf den chronischen postischämischen Reperfusionsschaden zu untersuchen und mit alternativen Behandlungsmethoden zu vergleichen. WT-Tiere und ICAM-1-defiziente Tiere wurden einer einstündigen LAD-Okklusion unterzogen, gefolgt von 14 Tagen Reperfusion. Anschließend wurde die linksventrikuläre Funktion mittels invasiver Millar-Tip Kathetermessung analysiert. 24 Stunden nach Ischämie wurden  $3 \cdot 10^6$  in vitro expandierte embryonale EPC (eEPC) systemisch in WT-Tiere oder ICAM-1-defiziente Tiere infundiert. In zwei weiteren WT-Gruppen wurden autologe Progenitorzellen und mononukleäre Zellen aus dem Knochenmark mobilisiert mittels Gabe von  $0,5 \mu\text{g}$  GM-CSF 7 Tage vor Ischämie bzw. direkt postischämisch.

In den ICAM-1-defizienten Tieren war der postischämische Funktionsverlust im Vergleich zu den WT-Kontrollen etwa im gleichen Maß verringert wie bei den eEPC-behandelten Tieren (Abb. 22 Abb. 23, Abb. 24). Unter reduzierter Leukozytenreduktion in den ICAM-1-defizienten Tieren zeigte sich ein zusätzlicher benefizieller Effekt durch die Behandlung mit eEPCs (Abb. 22 Abb. 23, Abb. 24). Dil-markierte eEPCs konnten histologisch im Infarkt-Areal in enger Nachbarschaft mit Blutgefäßen nachgewiesen werden (Abb. 28).

Die Adhäsion von Leukozyten und der damit verbundene leukozyten-assoziierte Reperfusionsschaden ist durch die Defizienz von ICAM-1 auch im chronischen Ischämie/Reperusionsmodell vermindert.

Embryonale EPCs sind in der Lage in ischämisches Areal einzuwandern, zu inkorporieren und protektiv auf die postischämische Funktion zu wirken. Sie können so über einen längeren Zeitraum als Quelle für parakrine, angiogenese-fördernde, humorale Aktivatoren wie z. B. Thymosin- $\beta_4$  den Remodellingprozess unterstützen und führen somit zu einer verbesserten postischämischen Funktion.

Die Adhäsion von embryonalen EPCs scheint dagegen unabhängig von ICAM-1 zu sein. Hier spielen Selektine<sup>211</sup>,  $\beta_1$ -Integrine<sup>57, 141</sup> und indirekt auch Thrombozyten<sup>118</sup> eine wesentliche Rolle.

Die präischämische Mobilisation von hämatopoetischen Progenitorzellen aus dem Knochenmark mittels GM-CSF hatte in unserem Modell eine vergleichbar protektive Wirkung wie die eEPC-Behandlung oder die Antagonisierung der Leukozytenadhäsion durch ICAM-1-Defizienz, während die postischämische Applikation den postischämischen Funktionsverlust nicht verbesserte (Abb. 25, Abb. 26, Abb. 27).

Die Zytokin-Applikation zeigte bei rechtzeitiger Applikation vor Beginn der Ischämie eine protektive Wirkung. Dieses Protokoll ist allerdings nicht in der Klinik anwendbar. In weiteren Studien wird es notwendig sein, den optimalen Zeitpunkt und die optimale Dosis zu evaluieren und mögliche Co-Applikation, z. B. Stromal-Cell-Derived-Factor-1, zur Verbesserung der Rekrutierung und zur Effizienzsteigerung zu untersuchen, um knochenmark-stimulierende Zytokine als erfolgversprechende Behandlungsalternativen im akuten Koronarsyndrom am Menschen einsetzen zu können.

## 6. Abkürzungsverzeichnis

CD	Cluster of Differentiation
eEPC	Embryonale endotheliale Progenitorzellen
EF	Ejektionsfraktion
EPC	Adulte endotheliale Progenitorzellen
ESL-1	E-Selektin Ligand-1
GF	Gesichtsfeld
G-CSF	Granulozyten Kolonie-stimulierendem Faktor
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierendem Faktor
GP	Glykoprotein
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
ICAM-1/P-Sel	ICAM-1/P-Selektin-defiziente Tiere
IFN	Interferon
IL-	Interleukin
I/R	Ischämie und Reperfusion
JAM	Junctional Adhesion Molecule
KG	Körpergewicht
LAD	Left Ascending Artery
LFA-1	Lymphozyten-Funktionsassoziiertes Antigen-1
LV	Linker Ventrikel
LVDP	Leftventricular Developed Pressure
MAC-1	Monocyte Adhesion Complex-1
NFkB	Nuclear Factor kB
NO	Stickstoffmonoxid
P-Sel	P-Selektin-defiziente Tiere
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PMN	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PTCA	Perkutane transluminale Koronarangioplastie
PECAM-1	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1
PSGL-1	P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1
ROS	Reaktive Oxygen Spezies
SCA-1	Stammzell-Antigen-1
SDF-1	Stromal-Cell-Derived-Factor-1
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor-alpha
VLA-4	Very Late Antigen-4
VCAM-1	Vascular Adhesion Molecule-1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGF-R2	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2
vWF	von Willebrand Factor
WT	Wildtyp

## 7. Literaturverzeichnis

- (1) Aglietta M, Piacibello W, Sanavio F, Stacchini A, Apra F, Schena M, Mossetti C, Carnino F, Caligaris-Cappio F, Gavosto F. Kinetics of human hemopoietic cells after in vivo administration of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Clin Invest* 1989 February;83(2):551-7.
- (2) AHA- ACC- ESC-Guidelines. Part 5: Acute Coronary Syndromes. *Circulation* 2005 November 29;112(22\_suppl):III-55.
- (3) Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, Urbich C, Ihling C, Technau-Ihling K, Zeiher AM, Dimmeler S. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med* 2003 November;9(11):1370-6.
- (4) Aicher A, Zeiher AM, Dimmeler S. Mobilizing Endothelial Progenitor Cells. *Hypertension* 2005 March 1;45(3):321-5.
- (5) Alon R, Kassner PD, Carr MW, Finger EB, Hemler ME, Springer TA. The integrin VLA-4 supports tethering and rolling in flow on VCAM-1. *J Cell Biol* 1995 March 1;128(6):1243-53.
- (6) Altieri DC. Coagulation assembly on leukocytes in transmembrane signaling and cell adhesion. *Blood* 1993 February 1;81(3):569-79.
- (7) Ambrosio G, Flaherty JT, Duilio C, Tritto I, Santoro G, Elia PP, Condorelli M, Chiariello M. Oxygen radicals generated at reflow induce peroxidation of membrane lipids in reperfused hearts. *J Clin Invest* 1991 June;87(6):2056-66.
- (8) Ambrosio G, Tritto I. Reperfusion injury: experimental evidence and clinical implications. *Am Heart J* 1999 August;138(2 Pt 2):S69-S75.
- (9) Ambrosio G, Weisman HF, Mannisi JA, Becker LC. Progressive impairment of regional myocardial perfusion after initial restoration of postischemic blood flow. *Circulation* 1989 December;80(6):1846-61.
- (10) Anderson KM, Califf RM, Stone GW, Neumann FJ, Montalescot G, Miller DP, Ferguson JJ, III, Willerson JT, Weisman HF, Topol EJ. Long-term mortality benefit with abciximab in patients undergoing percutaneous coronary intervention. *J Am Coll Cardiol* 2001 June 15;37(8):2059-65.
- (11) Andre P, Denis CV, Ware J, Saffaripour S, Hynes RO, Ruggeri ZM, Wagner DD. Platelets adhere to and translocate on von Willebrand factor presented by endothelium in stimulated veins. *Blood* 2000 November 15;96(10):3322-8.
- (12) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der ZR, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997 February 14;275(5302):964-7.
- (13) Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM. Bone Marrow Origin of Endothelial Progenitor Cells Responsible for Postnatal Vasculogenesis in Physiological and Pathological Neovascularization. *Circ Res* 1999 August 6;85(3):221-8.

- (14) Assmus B, Schachinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Dobert N, Grunwald F, Aicher A, Urbich C, Martin H, Hoelzer D, Dimmeler S, Zeiher AM. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* 2002 December 10;106(24):3009-17.
- (15) Azuma I. Review: inducer of cytokines in vivo: overview of field and romur-tide experience. *Int J Immunopharmacol* 1992 April;14(3):487-96.
- (16) Badorff C, Dimmeler S. Neovascularization and cardiac repair by bone mar-row-derived stem cells. *Handb Exp Pharmacol* 2006;(174):283-98.
- (17) Beohar N, Flaherty JD, Davidson CJ, Vidovich M, Singhal S, Rapp JA, Erdogan A, Lee DC, Rammohan C, Brodsky A, Wu E, Pieper K, Virmani R, Bonow RO, Mehta J. Granulocyte-colony stimulating factor administration af-ter myocardial infarction in a porcine ischemia-reperfusion model: functional and pathological effects of dose timing. *Catheter Cardiovasc Interv* 2007 February 1;69(2):257-66.
- (18) Bevilacqua MP, Nelson RM. Selectins. *J Clin Invest* 1993 Febru-ary;91(2):379-87.
- (19) Bock-Marquette I, Saxena A, White MD, Michael DiMaio J, Srivastava D. Thymosin [beta]4 activates integrin-linked kinase and promotes cardiac cell migration, survival and cardiac repair. *Nature* 2004 November 25;432(7016):466-72.
- (20) Bolli R, Marban E. Molecular and Cellular Mechanisms of Myocardial Stun-ning. *Physiol Rev* 1999 April 1;79(2):609-34.
- (21) Bombeli T, Schwartz BR, Harlan JM. Adhesion of Activated Platelets to En-dothelial Cells: Evidence for a GPIIb/IIIa-dependent Bridging Mechanism and Novel Roles for Endothelial Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1), al-pha vbeta 3 Integrin, and GPIbalpha. *J Exp Med* 1998 February 2;187(3):329-39.
- (22) Braunwald E, Kloner RA. The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation* 1982 December;66(6):1146-9.
- (23) Brenner B, Gulbins E, Schlottmann K, Koppenhoefer U, Busch GL, Walzog B, Steinhausen M, Coggeshall KM, Linderkamp O, Lang F. L-selectin acti-vates the Ras pathway via the tyrosine kinase p56lck. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996 December 24;93(26):15376-81.
- (24) Britten MB, Abolmaali ND, Assmus B, Lehmann R, Honold J, Schmitt J, Vogl TJ, Martin H, Schachinger V, Dimmeler S, Zeiher AM. Infarct remodeling af-ter intracoronary progenitor cell treatment in patients with acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): mechanistic insights from serial contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Circulation* 2003 November 4;108(18):2212-8.
- (25) Bubel S, Wilhelm D, Entelmann M, Kirchner H, Kluter H. Chemokines in stored platelet concentrates. *Transfusion* 1996 May;36(5):445-9.

- (26) Buschmann IR, Hoefler IE, van Royen N, Katzer E, Braun-Dulleus R, Heil M, Kostin S, Bode C, Schaper W. GM-CSF: a strong arteriogenic factor acting by amplification of monocyte function. *Atherosclerosis* 2001 December;159(2):343-56.
- (27) Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 1994 October 1;84(7):2068-101.
- (28) Clark SC, Kamen R. The human hematopoietic colony-stimulating factors. *Science* 1987 June 5;236(4806):1229-37.
- (29) Crosby JR, Kaminski WE, Schatteman G, Martin PJ, Raines EW, Seifert RA, Bowen-Pope DF. Endothelial Cells of Hematopoietic Origin Make a Significant Contribution to Adult Blood Vessel Formation. *Circ Res* 2000 October 27;87(9):728-30.
- (30) de Gaetano G, Cerletti C, Evangelista V. Recent Advances in Platelet-Polymorphonuclear Leukocyte Interaction. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis* 1999;29(1):41-9.
- (31) de Lemos JA, Antman EM, Gibson CM, McCabe CH, Giugliano RP, Murphy SA, Coulter SA, Anderson K, Scherer J, Frey MJ, Van Der WR, Van De WF, Braunwald E. Abciximab improves both epicardial flow and myocardial reperfusion in ST-elevation myocardial infarction. Observations from the TIMI 14 trial. *Circulation* 2000 January 25;101(3):239-43.
- (32) Deindl E, Zaruba MM, Brunner S, Huber B, Mehl U, Assmann G, Hoefler IE, Mueller-Hoecker J, Franz WM. G-CSF administration after myocardial infarction in mice attenuates late ischemic cardiomyopathy by enhanced arteriogenesis. *FASEB J* 2006 May 1;20(7):956-8.
- (33) Dewald O, Frangogiannis NG, Zoerlein MP, Duerr GD, Taffet G, Michael LH, Welz A, Entman ML. A murine model of ischemic cardiomyopathy induced by repetitive ischemia and reperfusion. *Thorac Cardiovasc Surg* 2004 October;52(5):305-11.
- (34) Diacovo TG, deFougerolles AR, Bainton DF, Springer TA. A functional integrin ligand on the surface of platelets: intercellular adhesion molecule-2. *J Clin Invest* 1994 September;94(3):1243-51.
- (35) Dietel M, Dudenhausen J, Suttrop N, Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL. *Harrisons Innere Medizin*. 15. Auflage ed. Berlin: Manfred Dietl; 2003.
- (36) Duilio C, Ambrosio G, Kuppusamy P, DiPaula A, Becker LC, Zweier JL. Neutrophils are primary source of O<sub>2</sub> radicals during reperfusion after prolonged myocardial ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001 June 1;280(6):H2649-H2657.
- (37) Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK, Dinarello CA, Springer TA. Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol* 1986 July 1;137(1):245-54.

- (38) Dustin ML, Springer TA. Lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) interaction with intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is one of at least three mechanisms for lymphocyte adhesion to cultured endothelial cells. *J Cell Biol* 1988 July 1;107(1):321-31.
- (39) Eberli FR, Sam F, Ngoy S, Apstein CS, Colucci WS. Left-ventricular structural and functional remodeling in the mouse after myocardial infarction: assessment with the isovolumetrically-contracting Langendorff heart. *J Mol Cell Cardiol* 1998 July;30(7):1443-7.
- (40) Ebnet K, Vestweber D. Molecular mechanisms that control leukocyte extravasation: the selectins and the chemokines. *Histochemistry and Cell Biology* 1999 July;112(1):1-23.
- (41) ECC Guidelines. Part 7: The Era of Reperfusion : Section 1: Acute Coronary Syndromes (Acute Myocardial Infarction). *Circulation* 2000 August 22;102(90001):1721-203.
- (42) Ellis SG, Penn MS, Bolwell B, Garcia M, Chacko M, Wang T, Brezina KJ, McConnell G, Topol EJ. Granulocyte colony stimulating factor in patients with large acute myocardial infarction: Results of a pilot dose-escalation randomized trial. *American Heart Journal* 2006 December;152(6):1051.
- (43) Engelmann MG, Theiss HD, Hennig-Theiss C, Huber A, Wintersperger BJ, Werle-Ruedinger AE, Schoenberg SO, Steinbeck G, Franz WM. Autologous Bone Marrow Stem Cell Mobilization Induced by Granulocyte Colony-Stimulating Factor After Subacute ST-Segment Elevation Myocardial Infarction Undergoing Late Revascularization: Final Results From the G-CSF-STEMI (Granulocyte Colony-Stimulating Factor ST-Segment Elevation Myocardial Infarction) Trial. *J Am Coll Cardiol* 2006 October 17;48(8):1712-21.
- (44) Entman ML, Smith CW. Postreperfusion inflammation: a model for reaction to injury in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 1994 September;28(9):1301-11.
- (45) Evangelista V, Manarini S, Sideri R, Rotondo S, Martelli N, Piccoli A, Totani L, Piccardoni P, Vestweber D, de Gaetano G, Cerletti C. Platelet/Polymorphonuclear Leukocyte Interaction: P-Selectin Triggers Protein-Tyrosine Phosphorylation-Dependent CD11b/CD18 Adhesion: Role of PSGL-1 as a Signaling Molecule. *Blood* 1999 February 1;93(3):876-85.
- (46) Faxon DP, Gibbons RJ, Chronos NA, Gurbel PA, Sheehan F. The effect of blockade of the CD11/CD18 integrin receptor on infarct size in patients with acute myocardial infarction treated with direct angioplasty: the results of the HALT-MI study. *J Am Coll Cardiol* 2002 October 2;40(7):1199-204.
- (47) Ferrari R, Ceconi C, Curello S, Guarnieri C, Caldarera CM, Albertini A, Visioli O. Oxygen-mediated myocardial damage during ischaemia and reperfusion: role of the cellular defences against oxygen toxicity. *J Mol Cell Cardiol* 1985 October;17(10):937-45.
- (48) Flores NA, Goulielmos NV, Seghatchian MJ, Sheridan DJ. Myocardial ischaemia induces platelet activation with adverse electrophysiological and arrhythmogenic effects. *Cardiovasc Res* 1994 November;28(11):1662-71.

- (49) Forde RC, Fitzgerald DJ. Reactive Oxygen Species and Platelet Activation in Reperfusion Injury. *Circulation* 1997 February 18;95(4):787-9.
- (50) Forlow SB, Ley K. Selectin-independent leukocyte rolling and adhesion in mice deficient in E-, P-, and L-selectin and ICAM-1. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001 February 1;280(2):H634-H641.
- (51) Frangogiannis NG, Entman ML. Chemokines in myocardial ischemia. *Trends Cardiovasc Med* 2005 July;15(5):163-9.
- (52) Frangogiannis NG, Youker KA, Entman ML. The role of the neutrophil in myocardial ischemia and reperfusion. *EXS* 1996;76:263-84.:263-84.
- (53) Frangogiannis NG, Mendoza LH, Lindsey ML, Ballantyne CM, Michael LH, Smith CW, Entman ML. IL-10 Is Induced in the Reperfused Myocardium and May Modulate the Reaction to Injury. *J Immunol* 2000 September 1;165(5):2798-808.
- (54) Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovascular Research* 2002 January;53(1):31-47.
- (55) Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovascular Research* 2002 January;53(1):31-47.
- (56) Frenette PS, Denis CV, Weiss L, Jurk K, Subbarao S, Kehrel B, Hartwig JH, Vestweber D, Wagner DD. P-Selectin Glycoprotein Ligand 1 (PSGL-1) Is Expressed on Platelets and Can Mediate Platelet-Endothelial Interactions In Vivo. *J Exp Med* 2000 April 18;191(8):1413-22.
- (57) Frenette PS, Subbarao S, Mazo IB, von Andrian UH, Wagner DD. Endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule-1 promote hematopoietic progenitor homing to bone marrow. *PNAS* 1998 November 24;95(24):14423-8.
- (58) Furie B, Furie BC. Leukocyte crosstalk at the vascular wall. *Thromb Haemost* 1997 July;78(1):306-9.
- (59) Furie MB, McHugh DD. Migration of neutrophils across endothelial monolayers is stimulated by treatment of the monolayers with interleukin-1 or tumor necrosis factor- alpha. *J Immunol* 1989 November 15;143(10):3309-17.
- (60) Furie MB, Tancinco MC, Smith CW. Monoclonal antibodies to leukocyte integrins CD11a/CD18 and CD11b/CD18 or intercellular adhesion molecule-1 inhibit chemoattractant-stimulated neutrophil transendothelial migration in vitro. *Blood* 1991 October 15;78(8):2089-97.
- (61) Ganz T. Macrophage function. *New Horiz* 1993 February;1(1):23-7.
- (62) Gasic AC, McGuire G, Krater S, Farhood AI, Goldstein MA, Smith CW, Entman ML, Taylor AA. Hydrogen peroxide pretreatment of perfused canine vessels induces ICAM-1 and CD18-dependent neutrophil adherence. *Circulation* 1991 November;84(5):2154-66.
- (63) Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, Koch W, Laugwitz KL, Adelsberger H, Langenbrink K, Page S, Neumeier D, Schomig A, Brand K. Activated plate-

lets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells. *Circulation* 1998 September 22;98(12):1164-71.

- (64) Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, Reininger A, Adelsberger H, Gebhardt A, Schomig A. Vitronectin Receptor ( $\alpha v \beta 3$ ) Mediates Platelet Adhesion to the Luminal Aspect of Endothelial Cells : Implications for Reperfusion in Acute Myocardial Infarction. *Circulation* 1997 September 16;96(6):1809-18.
- (65) Gearing AJ, Newman W. Circulating adhesion molecules in disease. *Immunol Today* 1993 October;14(10):506-12.
- (66) Gehling UM, Ergun S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M, Schuch G, Schafhausen P, Mende T, Kilic N, Kluge K, Schafer B, Hossfeld DK, Fiedler W. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood* 2000 May 15;95(10):3106-12.
- (67) Golino P, Ashton JH, Buja LM, Rosolowsky M, Taylor AL, McNatt J, Campbell WB, Willerson JT. Local platelet activation causes vasoconstriction of large epicardial canine coronary arteries in vivo. Thromboxane A2 and serotonin are possible mediators. *Circulation* 1989 January;79(1):154-66.
- (68) Golino P, Ragni M, Cirillo P, Avvedimento VE, Feliciello A, Esposito N, Scognamiglio A, Trimarco B, Iaccarino G, Condorelli M, Chiariello M, Ambrosio G. Effects of tissue factor induced by oxygen free radicals on coronary flow during reperfusion. *Nat Med* 1996 January;2(1):35-40.
- (69) Gryglewski RJ, Palmer RMJ, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* 1986 April 3;320(6061):454-6.
- (70) Habazettl H, Kupatt C, Zahler S, Becker BF, Messmer K. Selectins and beta 2-integrins mediate post-ischaemic venular adhesion of polymorphonuclear leukocytes, but not capillary plugging, in isolated hearts. *Pflugers Arch* 1999 September;438(4):479-85.
- (71) Handgretinger R, Gordon PR, Leimig T, Chen X, Buhring HJ, Niethammer D, Kuci S. Biology and plasticity of CD133+ hematopoietic stem cells. *Ann N Y Acad Sci* 2003 May;996:141-51.
- (72) Hansen PR. Role of Neutrophils in Myocardial Ischemia and Reperfusion. *Circulation* 1995 March 15;91(6):1872-85.
- (73) Harada M, Qin Y, Takano H, Minamino T, Zou Y, Toko H, Ohtsuka M, Matsuura K, Sano M, Nishi Ji, Iwanaga K, Akazawa H, Kunieda T, Zhu W, Hasegawa H, Kunisada K, Nagai T, Nakaya H, Yamauchi-Takahara K, Komuro I. G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes. *Nat Med* 2005 February 20;advanced online publication.
- (74) Hatzopoulos AK, Folkman J, Vasile E, Eiselen GK, Rosenberg RD. Isolation and characterization of endothelial progenitor cells from mouse embryos. *Development* 1998 April;125(8):1457-68.

- (75) Hausenloy DJ, Yellon DM. New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovasc Res* 2004 February 15;61(3):448-60.
- (76) Hawkins HK, Entman ML, Zhu JY, Youker KA, Berens K, Dore M, Smith CW. Acute inflammatory reaction after myocardial ischemic injury and reperfusion. Development and use of a neutrophil-specific antibody. *Am J Pathol* 1996 June;148(6):1957-69.
- (77) Heil M, Ziegelhoeffer T, Mees B, Schaper W. A Different Outlook on the Role of Bone Marrow Stem Cells in Vascular Growth: Bone Marrow Delivers Software not Hardware. *Circ Res* 2004 March 19;94(5):573-4.
- (78) Heymans S, Luttun A, Nuyens D, Theilmeier G, Creemers E, Moons L, Dyspersin GD, Cleutjens JP, Shipley M, Angellilo A, Levi M, Nube O, Baker A, Keshet E, Lupu F, Herbert JM, Smits JF, Shapiro SD, Baes M, Borgers M, Collen D, Daemen MJ, Carmeliet P. Inhibition of plasminogen activators or matrix metalloproteinases prevents cardiac rupture but impairs therapeutic angiogenesis and causes cardiac failure. *Nat Med* 1999 October;5(10):1135-42.
- (79) Hill AD, Naama HA, Calvano SE, Daly JM. The effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on myeloid cells and its clinical applications. *J Leukoc Biol* 1995 December 1;58(6):634-42.
- (80) Hillebrands JL, Klatter FA, van Dijk WD, Rozing J. Bone marrow does not contribute substantially to endothelial-cell replacement in transplant arteriosclerosis. *Nat Med* 2002 March;8(3):194-5.
- (81) Hristov M, Weber C. Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2004;8(4):498-508.
- (82) Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992 April 3;69(1):11-25.
- (83) Iademarco MF, McQuillan JJ, Dean DC. Vascular Cell Adhesion Molecule 1: Contrasting Transcriptional Control Mechanisms in Muscle and Endothelium. *PNAS* 1993 May 1;90(9):3943-7.
- (84) Iademarco MF, McQuillan JJ, Rosen GD, Dean DC. Characterization of the promoter for vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). *J Biol Chem* 1992 August 15;267(23):16323-9.
- (85) Ince H, Petzsch M, Kleine HD, Eckard H, Rehders T, Burska D, Kische S, Freund M, Nienaber CA. Prevention of Left Ventricular Remodeling With Granulocyte Colony-Stimulating Factor After Acute Myocardial Infarction: Final 1-year Results of the Front-Integrated Revascularization and Stem Cell Liberation in Evolving Acute Myocardial Infarction by Granulocyte Colony-Stimulating Factor (FIRSTLINE-AMI) Trial. *Circulation* 2005 August 30;112(9\_suppl):I-73.
- (86) Ince H, Petzsch M, Kleine HD, Schmidt H, Rehders T, Korber T, Schumichen C, Freund M, Nienaber CA. Preservation From Left Ventricular Re-

modeling by Front-Integrated Revascularization and Stem Cell Liberation in Evolving Acute Myocardial Infarction by Use of Granulocyte-Colony-Stimulating Factor (FIRSTLINE-AMI). *Circulation* 2005 November 15;112(20):3097-106.

- (87) Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, Entman ML, Michael LH, Hirschi KK, Goodell MA. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 2001 June;107(11):1395-402.
- (88) Jennings RB, Schaper J, Hill ML, Steenbergen C, Jr., Reimer KA. Effect of reperfusion late in the phase of reversible ischemic injury. Changes in cell volume, electrolytes, metabolites, and ultrastructure. *Circ Res* 1985 February;56(2):262-78.
- (89) Jones SP, Trocha SD, Strange MB, Granger DN, Kevil CG, Bullard DC, Lefler DJ. Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules in a chronic murine model of myocardial reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000 November 1;279(5):H2196-H2201.
- (90) Jordan JE, Zhao ZQ, Vinten-Johansen J. The role of neutrophils in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 1999 September;43(4):860-78.
- (91) Jung U, Norman KE, Scharffetter-Kochanek K, Beaudet AL, Ley K. Transit Time of Leukocytes Rolling through Venules Controls Cytokine-induced Inflammatory Cell Recruitment In Vivo. *J Clin Invest* 1998 October 15;102(8):1526-33.
- (92) Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, Kearney M, Li T, Isner JM, Asahara T. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *PNAS* 2000 March 28;97(7):3422-7.
- (93) Kansas GS. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood* 1996 November 1;88(9):3259-87.
- (94) Kanz L, Brugger W, Mertelsmann R. Haematopoietic growth factors and peripheral blood stem cells as supportive agents in dose intensification. *Eur J Cancer* 1993;29A Suppl 5:S23-S26.
- (95) Kastrati A, Mehilli J, Schuhlen H, Dirschinger J, Dotzer F, ten Berg JM, Neumann FJ, Bollwein H, Volmer C, Gawaz M, Berger PB, Schomig A, the Intracoronary Stenting and Antithrombotic Regimen-Rapid Early Action for Coronary Treatment (ISAR-REACT) Study Investigators. A Clinical Trial of Abciximab in Elective Percutaneous Coronary Intervention after Pretreatment with Clopidogrel. *N Engl J Med* 2004 January 15;350(3):232-8.
- (96) Kawada H, Fujita J, Tsuma M, Matsuzaki Y, Okano H, Fukuda K, Hotta T, Ando K. Cardiac Myofibroblasts of Hematopoietic Origin Are Mobilized by G-CSF and Contribute to Cardiac Repair after Myocardial Infarction. *ASH Annual Meeting Abstracts* 2005 November 16;106(11):1699.

- (97) Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, Yamaguchi JI, Uchida S, Masuda H, Silver M, Ma H, Kearney M, Isner JM, Asahara T. Therapeutic Potential of Ex Vivo Expanded Endothelial Progenitor Cells for Myocardial Ischemia. *Circulation* 2001 February 6;103(5):634-7.
- (98) Keeley EC, Boura JA, Grines CL. Primary angioplasty versus intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: a quantitative review of 23 randomised trials. *The Lancet* 2003 January 4;361(9351):13-20.
- (99) Kelley C, Blumberg H, Zon LI, Evans T. GATA-4 is a novel transcription factor expressed in endocardium of the developing heart. *Development* 1993 July 1;118(3):817-27.
- (100) Kelm M, Strauer BE. Das akute Koronarsyndrom. *Der Internist* 2005 March;46(3):265-74.
- (101) Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Lee CW, Barr S, Fuchs S, Epstein SE. Marrow-Derived Stromal Cells Express Genes Encoding a Broad Spectrum of Arteriogenic Cytokines and Promote In Vitro and In Vivo Arteriogenesis Through Paracrine Mechanisms. *Circ Res* 2004 March 19;94(5):678-85.
- (102) Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Shou M, Lee CW, Barr S, Fuchs S, Epstein SE. Local Delivery of Marrow-Derived Stromal Cells Augments Collateral Perfusion Through Paracrine Mechanisms. *Circulation* 2004 March 30;109(12):1543-9.
- (103) Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, Homma S, Edwards NM, Itescu S. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* 2001 April;7(4):430-6.
- (104) Kubes P, Jutila M, Payne D. Therapeutic potential of inhibiting leukocyte rolling in ischemia/reperfusion. *J Clin Invest* 1995 June;95(6):2510-9.
- (105) Kuebler WM, Kuhnle GE, Groh J, Goetz AE. Leukocyte kinetics in pulmonary microcirculation: intravital fluorescence microscopic study. *J Appl Physiol* 1994 January 1;76(1):65-71.
- (106) Kuethe F, Figulla HR, Herzau M, Voth M, Fritzenwanger M, Opfermann T, Pachmann K, Krack A, Sayer HG, Gottschild D, Werner GS. Treatment with granulocyte colony-stimulating factor for mobilization of bone marrow cells in patients with acute myocardial infarction. *American Heart Journal* 2005 July;150(1):115.
- (107) Kuijper PH, Gallardo Tores HI, Lammers JW, Sixma JJ, Koenderman L, Zwaginga JJ. Platelet associated fibrinogen and ICAM-2 induce firm adhesion of neutrophils under flow conditions. *Thromb Haemost* 1998 September;80(3):443-8.
- (108) Kunkel EJ, Chomas JE, Ley K. Role of Primary and Secondary Capture for Leukocyte Accumulation In Vivo. *Circ Res* 1998 January 23;82(1):30-8.

- (109) Kupatt C, Habazettl H, Goedecke A, Wolf DA, Zahler S, Boekstegers P, Kelly RA, Becker BF. Tumor necrosis factor-alpha contributes to ischemia- and reperfusion-induced endothelial activation in isolated hearts. *Circ Res* 1999 March 5;84(4):392-400.
- (110) Kupatt C, Habazettl H, Hanusch P, Wichels R, Hahnel D, Becker BF, Boekstegers P. c7E3Fab reduces postischemic leukocyte-thrombocyte interaction mediated by fibrinogen. Implications for myocardial reperfusion injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000 October;20(10):2226-32.
- (111) Kupatt C, Wichels R, Deiss M, Molnar A, Lebherz C, Raake P, von DG, Hahnel D, Boekstegers P. Retroinfusion of NFkappaB decoy oligonucleotide extends cardioprotection achieved by CD18 inhibition in a preclinical study of myocardial ischemia and retroinfusion in pigs. *Gene Ther* 2002 April;9(8):518-26.
- (112) Kupatt C, Habazettl H, Zahler S, Weber C, Becker BF, Messmer K, Gerlach E. ACE-inhibition prevents postischemic coronary leukocyte adhesion and leukocyte-dependent reperfusion injury. *Cardiovascular Research* 1997 December;36(3):386-95.
- (113) Kupatt C, Hinkel R, Lamparter M, von Bruhl ML, Pohl T, Horstkotte J, Beck H, Muller S, Delker S, Gildehaus FJ, Buning H, Hatzopoulos AK, Boekstegers P. Retroinfusion of Embryonic Endothelial Progenitor Cells Attenuates Ischemia-Reperfusion Injury in Pigs: Role of Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT Kinase. *Circulation* 2005 August 30;112(9\_suppl):I-117.
- (114) Kupatt C, Horstkotte J, Vlastos GA, Pfosser A, Lebherz C, Semisch M, Thalgot M, Buttner K, Browarzyk C, Mages J, Hoffmann R, Deten A, Lamparter M, Muller F, Beck H, Buning H, Boekstegers P, Hatzopoulos AK. Embryonic endothelial progenitor cells expressing a broad range of proangiogenic and remodeling factors enhance vascularization and tissue recovery in acute and chronic ischemia. *FASEB J* 2005 July 11;04-3282fje.
- (115) Kupatt C, Wichels R, Horstkotte J, Krombach F, Habazettl H, Boekstegers P. Molecular mechanisms of platelet-mediated leukocyte recruitment during myocardial reperfusion. *J Leukoc Biol* 2002 September 1;72(3):455-61.
- (116) Kuroda T, Shiohara E, Homma T, Furukawa Y, Chiba S. Effects of leukocyte and platelet depletion on ischemia--reperfusion injury to dog pancreas. *Gastroenterology* 1994 October;107(4):1125-34.
- (117) Lalor P, Nash GB. Adhesion of flowing leucocytes to immobilized platelets. *Br J Haematol* 1995 April;89(4):725-32.
- (118) Langer H, May AE, Daub K, Heinzmann U, Lang P, Schumm M, Vestweber D, Massberg S, Schonberger T, Pfisterer I, Hatzopoulos AK, Gawaz M. Adherent Platelets Recruit and Induce Differentiation of Murine Embryonic Endothelial Progenitor Cells to Mature Endothelial Cells In Vitro. *Circ Res* 2006 February 3;98(2):e2-10.
- (119) Laverriere AC, MacNeill C, Mueller C, Poelmann RE, Burch JB, Evans T. GATA-4/5/6, a subfamily of three transcription factors transcribed in developing heart and gut. *J Biol Chem* 1994 September 16;269(37):23177-84.

- (120) Lefer AM, Campbell B, Scalia R, Lefer DJ. Synergism between platelets and neutrophils in provoking cardiac dysfunction after ischemia and reperfusion: role of selectins. *Circulation* 1998 September 29;98(13):1322-8.
- (121) Lefer DJ, Flynn DM, Anderson DC, Buda AJ. Combined inhibition of P-selectin and ICAM-1 reduces myocardial injury following ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1996 December 1;271(6):H2421-H2429.
- (122) Lehrke S, Mazhari R, Durand DJ, Zheng M, Bedja D, Zimmet JM, Schuleri KH, Chi AS, Gabrielson KL, Hare JM. Aging Impairs the Beneficial Effect of Granulocyte Colony-Stimulating Factor and Stem Cell Factor on Post-Myocardial Infarction Remodeling. *Circ Res* 2006 September 1;99(5):553-60.
- (123) Leo R, Pratico D, Iuliano L, Pulcinelli FM, Ghiselli A, Pignatelli P, Colavita AR, FitzGerald GA, Violi F. Platelet Activation by Superoxide Anion and Hydroxyl Radicals Intrinsically Generated by Platelets That Had Undergone Anoxia and Then Reoxygenated. *Circulation* 1997 February 18;95(4):885-91.
- (124) Ley K, Gaetgens P. Endothelial, not hemodynamic, differences are responsible for preferential leukocyte rolling in rat mesenteric venules. *Circ Res* 1991 October;69(4):1034-41.
- (125) Ley K. Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in the inflammatory process. *Cardiovascular Research* 1996 October;32(4):733-42.
- (126) Li M, Nishimura H, Iwakura A, Wecker A, Eaton E, Asahara T, Losordo DW. Endothelial Progenitor Cells Are Rapidly Recruited to Myocardium and Mediate Protective Effect of Ischemic Preconditioning via "Imported" Nitric Oxide Synthase Activity. *Circulation* 2005 March 8;111(9):1114-20.
- (127) Lo SK, Golenbock DT, Sass PM, Maskati A, Xu H, Silverstein RL. Engagement of the Lewis X Antigen (CD15) Results in Monocyte Activation. *Blood* 1997 January 1;89(1):307-14.
- (128) Lub M, van KY, Figdor CG. Competition between lymphocyte function-associated antigen 1 (CD11a/CD18) and Mac-1 (CD11b/CD18) for binding to intercellular adhesion molecule-1 (CD54). *J Leukoc Biol* 1996 May;59(5):648-55.
- (129) Luscinskas FW, Ding H, Lichtman AH. P-selectin and vascular cell adhesion molecule 1 mediate rolling and arrest, respectively, of CD4+ T lymphocytes on tumor necrosis factor alpha-activated vascular endothelium under flow. *J Exp Med* 1995 March 1;181(3):1179-86.
- (130) Ma XL, Lefer DJ, Lefer AM, Rothlein R. Coronary endothelial and cardiac protective effects of a monoclonal antibody to intercellular adhesion molecule-1 in myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation* 1992 September;86(3):937-46.
- (131) Maekawa Y, Anzai T, Yoshikawa T, Sugano Y, Mahara K, Kohno T, Takahashi T, Ogawa S. Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor inducer on left ventricular remodeling after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2004 October 6;44(7):1510-20.

- (132) Maes A, Van de Werf F, Nuyts J, Bormans G, Desmet W, Mortelmans L. Impaired Myocardial Tissue Perfusion Early After Successful Thrombolysis : Impact on Myocardial Flow, Metabolism, and Function at Late Follow-up. *Circulation* 1995 October 15;92(8):2072-8.
- (133) Marcus AJ, Safier LB. Thromboregulation: multicellular modulation of platelet reactivity in hemostasis and thrombosis. *FASEB J* 1993 April 1;7(6):516-22.
- (134) Masinovsky B, Urdal D, Gallatin WM. IL-4 acts synergistically with IL-1 beta to promote lymphocyte adhesion to microvascular endothelium by induction of vascular cell adhesion molecule-1. *J Immunol* 1990 November 1;145(9):2886-95.
- (135) Massberg S, Enders G, Leiderer R, Eisenmenger S, Vestweber D, Krombach F, Messmer K. Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin. *Blood* 1998 July 15;92(2):507-15.
- (136) Massberg S, Enders G, Matos FC, Tomic LI, Leiderer R, Eisenmenger S, Messmer K, Krombach F. Fibrinogen deposition at the postischemic vessel wall promotes platelet adhesion during ischemia-reperfusion in vivo. *Blood* 1999 December 1;94(11):3829-38.
- (137) Massberg S, Eisenmenger S, Enders G, Krombach F, Messmer K. Quantitative analysis of small intestinal microcirculation in the mouse. *Research in Experimental Medicine* 1998 July 13;198(1):23-35.
- (138) Masuda H, Asahara T. Post-natal endothelial progenitor cells for neovascularization in tissue regeneration. *Cardiovasc Res* 2003 May 1;58(2):390-8.
- (139) Matsui T, Rosenzweig A. Convergent signal transduction pathways controlling cardiomyocyte survival and function: the role of PI 3-kinase and Akt. *J Mol Cell Cardiol* 2005 January;38(1):63-71.
- (140) Matsui T, Li L, del Monte F, Fukui Y, Franke TF, Hajjar RJ, Rosenzweig A. Adenoviral Gene Transfer of Activated Phosphatidylinositol 3'-Kinase and Akt Inhibits Apoptosis of Hypoxic Cardiomyocytes In Vitro. *Circulation* 1999 December 7;100(23):2373-9.
- (141) Mazo IB, Gutierrez-Ramos JC, Frenette PS, Hynes RO, Wagner DD, von Andrian UH. Hematopoietic Progenitor Cell Rolling in Bone Marrow Microvessels: Parallel Contributions by Endothelial Selectins and Vascular Cell Adhesion Molecule 1. *J Exp Med* 1998 August 3;188(3):465-74.
- (142) Meerschaert J, Furie MB. Monocytes use either CD11/CD18 or VLA-4 to migrate across human endothelium in vitro. *J Immunol* 1994 February 15;152(4):1915-26.
- (143) Metzler B, Mair J, Lercher A, Schaber C, Hintringer F, Pachinger O, Xu Q. Mouse model of myocardial remodelling after ischemia: role of intercellular adhesion molecule-1. *Cardiovasc Res* 2001 February 1;49(2):399-407.
- (144) Michael LH, Entman ML, Hartley CJ, Youker KA, Zhu J, Hall SR, Hawkins HK, Berens K, Ballantyne CM. Myocardial ischemia and reperfusion: a mur-

- ine model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1995 December 1;269(6):H2147-H2154.
- (145) Mickelson JK, Ali MN, Kleiman NS, Lakkis NM, Chow TW, Hughes BJ, Smith CW. Chimeric 7E3 Fab (ReoPro) decreases detectable CD11b on neutrophils from patients undergoing coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 1999 January;33(1):97-106.
- (146) Morrison SJ, Wright DE, Weissman IL. Cyclophosphamide/granulocyte colony-stimulating factor induces hematopoietic stem cells to proliferate prior to mobilization. *PNAS* 1997 March 4;94(5):1908-13.
- (147) Mustonen T, Alitalo K. Endothelial receptor tyrosine kinases involved in angiogenesis. *J Cell Biol* 1995 May 1;129(4):895-8.
- (148) Neish AS, Williams AJ, Palmer HJ, Whitley MZ, Collins T. Functional analysis of the human vascular cell adhesion molecule 1 promoter. *J Exp Med* 1992 December 1;176(6):1583-93.
- (149) Neumann FJ, Hochholzer W, Pogatsa-Murray G, Schomig A, Gawaz M. Antiplatelet effects of abciximab, tirofiban and eptifibatid in patients undergoing coronary stenting. *J Am Coll Cardiol* 2001 April;37(5):1323-8.
- (150) Neumann FJ, Blasini R, Schmitt C, Alt E, Dirschinger J, Gawaz M, Kastrati A, Schomig A. Effect of Glycoprotein IIb/IIIa Receptor Blockade on Recovery of Coronary Flow and Left Ventricular Function After the Placement of Coronary-Artery Stents in Acute Myocardial Infarction. *Circulation* 1998 December 15;98(24):2695-701.
- (151) Neumann FJ, Marx N, Gawaz M, Brand K, Ott I, Rokitta C, Sticherling C, Meinel C, May A, Schomig A. Induction of Cytokine Expression in Leukocytes by Binding of Thrombin-Stimulated Platelets. *Circulation* 1997 May 20;95(10):2387-94.
- (152) Nian M, Lee P, Khaper N, Liu P. Inflammatory Cytokines and Postmyocardial Infarction Remodeling. *Circ Res* 2004 June 25;94(12):1543-53.
- (153) Oh H, Fujio Y, Kunisada K, Hirota H, Matsui H, Kishimoto T, Yamauchi-Takahara K. Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase through Glycoprotein 130 Induces Protein Kinase B and p70 S6 Kinase Phosphorylation in Cardiac Myocytes. *J Biol Chem* 1998 April 17;273(16):9703-10.
- (154) Okada Y, Marchevsky AM, Zuo XJ, Pass JA, Kass RM, Matloff JM, Jordan SC. Accumulation of platelets in rat syngeneic lung transplants: a potential factor responsible for preservation-reperfusion injury. *Transplantation* 1997 September 27;64(6):801-6.
- (155) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *PNAS* 2001 August 28;98(18):10344-9.

- (156) Ott I, Neumann FJ, Gawaz M, Schmitt M, Schomig A. Increased Neutrophil-Platelet Adhesion in Patients With Unstable Angina. *Circulation* 1996 September 15;94(6):1239-46.
- (157) Palabrica T, Lobb R, Furie BC, Aronovitz M, Benjamin C, Hsu YM, Sajer SA, Furie B. Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by P-selectin on adherent platelets. *Nature* 1992 October 29;359(6398):848-51.
- (158) Palazzo AJ, Jones SP, Girod WG, Anderson DC, Granger DN, Lefer DJ. Myocardial ischemia-reperfusion injury in CD18- and ICAM-1-deficient mice. *Am J Physiol* 1998 December;275(6 Pt 2):H2300-H2307.
- (159) Palazzo AJ, Jones SP, Anderson DC, Granger DN, Lefer DJ. Coronary endothelial P-selectin in pathogenesis of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1998 November 1;275(5):H1865-H1872.
- (160) Peter K, Schwarz M, Ylanne J, Kohler B, Moser M, Nordt T, Salbach P, Kubler W, Bode C. Induction of Fibrinogen Binding and Platelet Aggregation as a Potential Intrinsic Property of Various Glycoprotein IIb/IIIa (alpha IIb beta 3) Inhibitors. *Blood* 1998 November 1;92(9):3240-9.
- (161) Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL. Peripheral Blood "Endothelial Progenitor Cells" Are Derived From Monocyte/Macrophages and Secrete Angiogenic Growth Factors. *Circulation* 2003 March 4;107(8):1164-9.
- (162) Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH, Verfaillie CM. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest* 2002 February 1;109(3):337-46.
- (163) Rijn MVD, Heimfeld S, Spangrude GJ, Weissman IL. Mouse Hematopoietic Stem-Cell Antigen Sca-1 is a Member of the Ly-6 Antigen Family. *PNAS* 1989 June 15;86(12):4634-8.
- (164) Ripa RS, Jorgensen E, Wang Y, Thune JJ, Nilsson JC, Sondergaard L, Johnsen HE, Kober L, Grande P, Kastrup J. Stem Cell Mobilization Induced by Subcutaneous Granulocyte-Colony Stimulating Factor to Improve Cardiac Regeneration After Acute ST-Elevation Myocardial Infarction: Result of the Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Stem Cells in Myocardial Infarction (STEMMI) Trial. *Circulation* 2006 April 25;113(16):1983-92.
- (165) Romo GM, Dong JF, Schade AJ, Gardiner EE, Kansas GS, Li CQ, McIntire LV, Berndt MC, Lopez JA. The Glycoprotein Ib-IX-V Complex Is a Platelet Counterreceptor for P-Selectin. *J Exp Med* 1999 September 20;190(6):803-14.
- (166) Rosen SD, Bertozzi CR. The selectins and their ligands. *Curr Opin Cell Biol* 1994 October;6(5):663-73.
- (167) Rossig L, Urbich C, Dimmeler S. Endothelial Progenitor Cells at Work: Not Mature Yet, but Already Stress-Resistant. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004 November 1;24(11):1977-9.

- (168) Rothlein R, Czajkowski M, O'Neill MM, Marlin SD, Mainolfi E, Merluzzi VJ. Induction of intercellular adhesion molecule 1 on primary and continuous cell lines by pro-inflammatory cytokines. Regulation by pharmacologic agents and neutralizing antibodies. *J Immunol* 1988 September 1;141(5):1665-9.
- (169) Rothlein R, Springer TA. The requirement for lymphocyte function-associated antigen 1 in homotypic leukocyte adhesion stimulated by phorbol ester. *J Exp Med* 1986 May 1;163(5):1132-49.
- (170) Ruf A, Patscheke H. Platelet-induced neutrophil activation: platelet-expressed fibrinogen induces the oxidative burst in neutrophils by an interaction with CD11C/CD18. *Br J Haematol* 1995 August;90(4):791-6.
- (171) Ruggeri ZM. Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. *J Thromb Haemost* 2003 July;1(7):1335-42.
- (172) Rusnak JM, Kopecky SL, Clements IP, Gibbons RJ, Holland AE, Peterman HS, Martin JS, Saoud JB, Feldman RL, Breisblatt WM, Simons M, Gessler CJ, Jr., Yu AS. An anti-CD11/CD18 monoclonal antibody in patients with acute myocardial infarction having percutaneous transluminal coronary angioplasty (the FESTIVAL study). *Am J Cardiol* 2001 September 1;88(5):482-7.
- (173) Sako D, Chang XJ, Barone KM, Vachino G, White HM, Shaw G, Veldman GM, Bean KM, Ahern TJ, Furie B, . Expression cloning of a functional glycoprotein ligand for P-selectin. *Cell* 1993 December 17;75(6):1179-86.
- (174) Salter JW, Kriegelstein CF, Issekutz AC, Granger DN. Platelets modulate ischemia/reperfusion-induced leukocyte recruitment in the mesenteric circulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001 December 1;281(6):G1432-G1439.
- (175) Schachinger V, Assmus B, Britten MB, Honold J, Lehmann R, Teupe C, Abolmaali ND, Vogl TJ, Hofmann WK, Martin H, Dimmeler S, Zeiher AM. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial. *J Am Coll Cardiol* 2004 October 19;44(8):1690-9.
- (176) Schmits R, Kundig TM, Baker DM, Shumaker G, Simard JJ, Duncan G, Wakeham A, Shahinian A, van der Heiden A, Bachmann MF, Ohashi PS, Mak TW, Hickstein DD. LFA-1-deficient mice show normal CTL responses to virus but fail to reject immunogenic tumor. *J Exp Med* 1996 April 1;183(4):1415-26.
- (177) Schoemig A, Kastrati A, Dirschinger J, Mehilli J, Schricke U, Pache J, Martinoff S, Neumann FJ, Schwaiger M, The Stent versus Thrombolysis for Occluded Coronary Arteries in Patients with Acute Myocardial Infarction Study Investigators. Coronary Stenting plus Platelet Glycoprotein IIb/IIIa Blockade Compared with Tissue Plasminogen Activator in Acute Myocardial Infarction. *N Engl J Med* 2000 August 10;343(6):385-91.
- (178) Secombe JF, Schaff HV. Coronary artery endothelial function after myocardial ischemia and reperfusion. *Ann Thorac Surg* 1995 September;60(3):778-88.

- (179) Seiler C, Pohl T, Wustmann K, Hutter D, Nicolet PA, Windecker S, Eberli FR, Meier B. Promotion of Collateral Growth by Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor in Patients With Coronary Artery Disease: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *Circulation* 2001 October 23;104(17):2012-7.
- (180) Seko Y, Enokawa Y, Tamatani T, Kannagi R, Yagita H, Okumura K, Yazaki Y. Expression of sialyl Lewis(X) in rat heart with ischaemia/reperfusion and reduction of myocardial reperfusion injury by a monoclonal antibody against sialyl Lewis(X). *J Pathol* 1996 November;180(3):305-10.
- (181) Sheridan FM, Cole PG, Ramage D. Leukocyte Adhesion to the Coronary Microvasculature During Ischemia and Reperfusion in an In Vivo Canine Model. *Circulation* 1996 May 15;93(10):1784-7.
- (182) Sheridan WP, Begley CG, Juttner CA, Szer J, To LB, Maher D, McGrath KM, Morstyn G, Fox RM. Effect of peripheral-blood progenitor cells mobilised by filgrastim (G-CSF) on platelet recovery after high-dose chemotherapy. *Lancet* 1992 March 14;339(8794):640-4.
- (183) Shi Q, Rafii S, Wu MH-D, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage LR, Moore MAS, Storb RF, Hammond WP. Evidence for Circulating Bone Marrow-Derived Endothelial Cells. *Blood* 1998 July 15;92(2):362-7.
- (184) Shyu WC, Lin SZ, Yang HI, Tzeng YS, Pang CY, Yen PS, Li H. Functional Recovery of Stroke Rats Induced by Granulocyte Colony-Stimulating Factor-Stimulated Stem Cells. *Circulation* 2004 September 28;110(13):1847-54.
- (185) Simon DI, Chen Z, Xu H, Li CQ, Dong JF, McIntire LV, Ballantyne CM, Zhang L, Furman MI, Berndt MC, Lopez JA. Platelet Glycoprotein Ib{alpha} Is a Counterreceptor for the Leukocyte Integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J Exp Med* 2000 July 10;192(2):193-204.
- (186) Simpson PJ, Todd RF, III, Fantone JC, Mickelson JK, Griffin JD, Lucchesi BR. Reduction of experimental canine myocardial reperfusion injury by a monoclonal antibody (anti-Mo1, anti-CD11b) that inhibits leukocyte adhesion. *J Clin Invest* 1988 February;81(2):624-9.
- (187) Singbartl K, Forlow SB, Ley K. Platelet, but not endothelial, P-selectin is critical for neutrophil-mediated acute postischemic renal failure. *FASEB J* 2001 November 1;15(13):2337-44.
- (188) Smyth SS, Reis ED, Zhang W, Fallon JT, Gordon RE, Collier BS. Beta(3)-integrin-deficient mice but not P-selectin-deficient mice develop intimal hyperplasia after vascular injury: correlation with leukocyte recruitment to adherent platelets 1 hour after injury. *Circulation* 2001 May 22;103(20):2501-7.
- (189) Socinski M, Elias A, Schnipper L, Cannistra S, Antman K, Griffin J. GRANULOCYTE-MACROPHAGE COLONY STIMULATING FACTOR EXPANDS THE CIRCULATING HAEMOPOIETIC PROGENITOR CELL COMPARTMENT IN MAN. *The Lancet* 1988 May 28;331(8596):1194-8.

- (190) Soldi R, Primo L, Brizzi MF, Sanavio F, Aglietta M, Polentarutti N, Pegoraro L, Mantovani A, Bussolino F. Activation of JAK2 in Human Vascular Endothelial Cells by Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor. *Blood* 1997 February 1;89(3):863-72.
- (191) Spangrude GJ, Brooks DM. Mouse strain variability in the expression of the hematopoietic stem cell antigen Ly-6A/E by bone marrow cells. *Blood* 1993 December 1;82(11):3327-32.
- (192) Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 1988 July 1;241(4861):58-62.
- (193) Sriramarao P, von Andrian UH, Butcher EC, Bourdon MA, Broide DH. L-selectin and very late antigen-4 integrin promote eosinophil rolling at physiological shear rates in vivo. *J Immunol* 1994 November 1;153(9):4238-46.
- (194) Staunton DE, Dustin ML, Springer TA. Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1. *Nature* 1989 May 4;339(6219):61-4.
- (195) Steegmaier M, Levinovitz A, Isenmann S, Borges E, Lenter M, Kocher HP, Kleuser B, Vestweber D. The E-selectin-ligand ESL-1 is a variant of a receptor for fibroblast growth factor. *Nature* 1995 February 16;373(6515):615-20.
- (196) Sumeray MS, Yellon DM. Characterisation and validation of a murine model of global ischaemia-reperfusion injury. *Mol Cell Biochem* 1998 September;186(1-2):61-8.
- (197) Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, Wagner M, Isner JM, Asahara T. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 1999 April;5(4):434-8.
- (198) Takano H, Hasegawa H, Kuwabara Y, Nakayama T, Matsuno K, Miyazaki Y, Yamamoto M, Fujimoto Y, Okada H, Okubo S, Fujita M, Shindo S, Kobayashi Y, Komiyama N, Takekoshi N, Imai K, Himi T, Ishibashi I, Komuro I. Feasibility and safety of granulocyte colony-stimulating factor treatment in patients with acute myocardial infarction. *International Journal of Cardiology* In Press, Corrected Proof.
- (199) Tarnavski O, McMullen JR, Schinke M, Nie Q, Kong S, Izumo S. Mouse cardiac surgery: comprehensive techniques for the generation of mouse models of human diseases and their application for genomic studies. *Physiol Genomics* 2004 February 13;16(3):349-60.
- (200) Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, Amano K, Kishimoto Y, Yoshimoto K, Akashi H, Shimada K, Iwasaka T, Imaizumi T. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 2002 August 10;360(9331):427-35.
- (201) Terrovitis J, Charitos C, Dolou P, Papalois A, Eleftheriou A, Tsolakis E, Charitos E, Mponios M, Karanastasis G, Koudoumas D, Agapitos E, Nanas JN. No effect of stem cell mobilization with GM-CSF on infarct size and left

- ventricular function in experimental acute myocardial infarction. *Basic Research in Cardiology* 2004 July;99(4):241-6.
- (202) Thornhill MH, Wellicome SM, Mahiouz DL, Lanchbury JS, Kyan-Aung U, Haskard DO. Tumor necrosis factor combines with IL-4 or IFN-gamma to selectively enhance endothelial cell adhesiveness for T cells. The contribution of vascular cell adhesion molecule-1-dependent and -independent binding mechanisms. *J Immunol* 1991 January 15;146(2):592-8.
- (203) Topol EJ, Moliterno DJ, Herrmann HC, Powers ER, Grines CL, Cohen DJ, Cohen EA, Bertrand M, Neumann FJ, Stone GW, DiBattiste PM, Yakubov SJ, DeLucca PT, Demopoulos L, the T, I. Comparison of Two Platelet Glycoprotein IIb/IIIa Inhibitors, Tirofiban and Abciximab, for the Prevention of Ischemic Events with Percutaneous Coronary Revascularization. *N Engl J Med* 2001 June 21;344(25):1888-94.
- (204) Tunstall-Pedoe H, Kuulasmaa K, Amouyel P, Arveiler D, Rajakangas AM, Pajak A. Myocardial infarction and coronary deaths in the World Health Organization MONICA Project. Registration procedures, event rates, and case-fatality rates in 38 populations from 21 countries in four continents. *Circulation* 1994 July;90(1):583-612.
- (205) Uemura R, Xu M, Ahmad N, Ashraf M. Bone Marrow Stem Cells Prevent Left Ventricular Remodeling of Ischemic Heart Through Paracrine Signaling. *Circ Res* 2006 June 9;98(11):1414-21.
- (206) Ulich TR, del Castillo J, McNiece I, Watson L, Yin SM, Andresen J. Hematologic effects of recombinant murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on the peripheral blood and bone marrow. *Am J Pathol* 1990 August 1;137(2):369-76.
- (207) Urbich C, Aicher A, Heeschen C, Dernbach E, Hofmann WK, Zeiher AM, Dimmeler S. Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells. *J Mol Cell Cardiol* 2005 November;39(5):733-42.
- (208) Urbich C, Dimmeler S. Endothelial Progenitor Cells: Characterization and Role in Vascular Biology. *Circ Res* 2004 August 20;95(4):343-53.
- (209) Urbich C, Heeschen C, Aicher A, Dernbach E, Zeiher AM, Dimmeler S. Relevance of Monocytic Features for Neovascularization Capacity of Circulating Endothelial Progenitor Cells. *Circulation* 2003 November 18;108(20):2511-6.
- (210) Urrand-Lions M, Angerfeldt JP, Ang S, Errera P, Ourshargh S, Hof BA. Junctional Adhesion Molecule-C Regulates the Early Influx of Leukocytes into Tissues during Inflammation. *J Immunol* 2005 May 15;174(10):6406-15.
- (211) Vajkoczy P, Blum S, Lamparter M, Mailhammer R, Erber R, Engelhardt B, Vestweber D, Hatzopoulos AK. Multistep nature of microvascular recruitment of ex vivo-expanded embryonic endothelial progenitor cells during tumor angiogenesis. *J Exp Med* 2003 June 16;197(12):1755-65.

- (212) Valdembri D, Serini G, Vacca A, Ribatti D, Bussolino F. In vivo activation of JAK2/STAT-3 pathway during angiogenesis induced by GM-CSF. *FASEB J* 2002 February 1;16(2):225-7.
- (213) Valgimigli M, Rigolin GM, Cittanti C, Malagutti P, Curello S, Percoco G, Bugli AM, Porta MD, Bragotti LZ, Ansani L, Mauro E, Lanfranchi A, Giganti M, Feggi L, Castoldi G, Ferrari R. Use of granulocyte-colony stimulating factor during acute myocardial infarction to enhance bone marrow stem cell mobilization in humans: clinical and angiographic safety profile. *Eur Heart J* 2005 September 2;26(18):1838-45.
- (214) Venditti A, Buccisano F, Del PG, Battaglia A, Tamburini A, Bruno A, Adorno G, Caravita T, Santinelli S, Del MB, Epiceno AM, Ballatore G, Amadori S. Multiparametric analysis for the enumeration of CD34+ cells from bone marrow and stimulated peripheral blood. *Int J Mol Med* 1998 January;1(1):67-70.
- (215) Verma S, Fedak PWM, Weisel RD, Butany J, Rao V, Maitland A, Li RK, Dhillon B, Yau TM. Fundamentals of Reperfusion Injury for the Clinical Cardiologist. *Circulation* 2002 May 21;105(20):2332-6.
- (216) von Andrian UH, Chambers JD, McEvoy LM, Bargatze RF, Arfors K, Butcher EC. Two-Step Model of Leukocyte-Endothelial Cell Interaction in Inflammation: Distinct Roles for LECAM-1 and the Leukocyte {beta}2 Integrins in vivo. *PNAS* 1991 September 1;88(17):7538-42.
- (217) Weber C, Springer TA. Neutrophil accumulation on activated, surface-adherent platelets in flow is mediated by interaction of Mac-1 with fibrinogen bound to alphaIIb beta3 and stimulated by platelet-activating factor. *J Clin Invest* 1997 October 15;100(8):2085-93.
- (218) Weber C, Fraemohs L, Dejana E. The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. *Nat Rev Immunol* 2007 June;7(6):467-77.
- (219) Wei J, Blum S, Unger M, Jarmy G, Lamparter M, Geishauser A, Vlastos GA, Chan G, Fischer KD, Rattat D, Debatin KM, Hatzopoulos AK, Beltinger C. Embryonic endothelial progenitor cells armed with a suicide gene target hypoxic lung metastases after intravenous delivery. *Cancer Cell* 2004 May;5(5):477-88.
- (220) Weihrauch D, Arras M, Zimmermann R, Schaper J. Importance of monocytes/macrophages and fibroblasts for healing of micronecroses in porcine myocardium. *Mol Cell Biochem* 1995 June 7;147(1-2):13-9.
- (221) Xie J, Li R, Kotovuori P, Vermot-Desroches C, Wijdenes J, Arnaout MA, Nor-tamo P, Gahmberg CG. Intercellular adhesion molecule-2 (CD102) binds to the leukocyte integrin CD11b/CD18 through the A domain. *J Immunol* 1995 October 1;155(7):3619-28.
- (222) Yamamoto Y, Yasumizu R, Amou Y, Watanabe N, Nishio N, Toki J, Fukuhara S, Ikehara S. Characterization of peripheral blood stem cells in mice. *Blood* 1996 July 15;88(2):445-54.

- (223) Yang F, Liu YH, Yang XP, Xu J, Kapke A, Carretero OA. Myocardial infarction and cardiac remodelling in mice. *Exp Physiol* 2002 September 1;87(5):547-55.
- (224) Yellon DM, Baxter GF. Protecting the ischaemic and reperfused myocardium in acute myocardial infarction: distant dream or near reality? *Heart* 2000 April 1;83(4):381-7.
- (225) Yoshida N, Granger DN, Anderson DC, Rothlein R, Lane C, Kvietys PR. Anoxia/reoxygenation-induced neutrophil adherence to cultured endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1992 June 1;262(6):H1891-H1898.
- (226) Yoshioka T, Ageyama N, Shibata H, Yasu T, Misawa Y, Takeuchi K, Matsui K, Yamamoto K, Terao K, Shimada K, Ikeda U, Ozawa K, Hanazono Y. Repair of Infarcted Myocardium Mediated by Transplanted Bone Marrow-Derived CD34+ Stem Cells in a Nonhuman Primate Model. *Stem Cells* 2005 March 1;23(3):355-64.
- (227) Zanjani ED, Meida-Porada G, Livingston AG, Flake AW, Ogawa M. Human bone marrow. *Exp Hematol* 1998 April;26(4):353-60.
- (228) Ziegelhoeffer T, Fernandez B, Kostin S, Heil M, Voswinckel R, Helisch A, Schaper W. Bone Marrow-Derived Cells Do Not Incorporate Into the Adult Growing Vasculature. *Circ Res* 2004 February 6;94(2):230-8.
- (229) Zohlnhofer D, Ott I, Mehilli J, Schomig K, Michalk F, Ibrahim T, Meisetschlager G, von WJ, Bollwein H, Seyfarth M, Dirschinger J, Schmitt C, Schwaiger M, Kastrati A, Schomig A. Stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor in patients with acute myocardial infarction: a randomized controlled trial. *JAMA* 2006 March 1;295(9):1003-10.

## 8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Privat Dozent Dr. med. Christian Kupatt für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und die Einführung in die wissenschaftliche Arbeit und Denkweise. Durch sein unermüdliches Interesse und seine Anregungen trug er entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Ebenfalls danke ich Prof. Dr. med. Peter Boekstegers sehr für die Unterstützung und Aufnahme in seine Arbeitsgruppe sowie für den Vorschlag für die Gewährung eines Stipendiums der Rudolf- und Brigitte Zenner-Stiftung. Diese Stiftung unterstützt Doktoranden des Universitätsklinikums Großhadern und verdient dafür meinen außerordentlichen Dank.

Allen Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe, vor allem Rabea Hinkel, Susanne Helbig und Melanie Schröder, möchte ich für die freundschaftliche, wissenschaftliche und technische Unterstützung danken, ohne die die vorliegende Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Herr Prof. Dr. med. K. Meßmer der uns die Räumlichkeiten des Institutes für Chirurgische Forschung zur Durchführung unserer Experimente zur Verfügung stellte möchte ich danken. Im besonderen danke ich für die freundliche Aufnahme am Institut für Chirurgische Forschung sowie für die vielfachen bereitwilligen Hilfen, vor allem von Dr. Andrej Khandoga und Prof. Dr. med. vet. F. Krombach.

Gewidmet ist diese Arbeit meinen Eltern Dr. med. Elisabeth Horstkotte und Dr. med. Ernst Horstkotte, die mit uneingeschränkter, liebevoller Unterstützung meine Ausbildung und diese Arbeit ermöglichten.

## 9. Lebenslauf

### **Persönliche Daten:**

Jan Christian Horstkotte  
geboren am 9. Februar 1976  
in Bremen

Familienstand: ledig  
Nationalität: deutsch

### **Eltern:**

Dr. med. Ernst Horstkotte  
Dr. med. Elisabeth Horstkotte, geb. Antweiler

### **Schulbildung:**

1982 – 1996  
1992 – 1993

Grundschule und gymnasiale Ausbildung in Bremen  
Highschoolabschluss nach 1-jährigem Aufenthalt in  
Harvey, North Dakota, USA

1996

Abitur (Note 1,4)

### **Zivildienst:**

1996 – 1997

Rettungssanitäter beim Arbeiter Samariter Bund,  
Bremen

### **Studium:**

1998 – 2004

Studium der Humanmedizin an der Ludwig-  
Maximilian-Universität, München

Oktober 2004

Drittes Staatsexamen (Note 2,6)

### **Förderung:**

Juli 2002 – Juni 2003

Stipendium der Rudolf und Brigitte Zenner Stiftung,  
München

### **Berufliche Tätigkeit:**

Seit November 2004

Wissenschaftlicher Assistent der Medizinischen Klinik  
I, Klinikum Großhadern, Ludwig-Maximilians-  
Universität München