

Die Antwort des angeborenen Immunsystems im zeitlichen Verlauf nach Myokardinfarkt

Benedikt Constantin Josef Miritsch

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Medicine and Health der
Technischen Universität München zur Erlangung eines
Doktors der Medizin (Dr.med)
genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Kathrin Schumann, Ph.D.

Prüfende der Dissertation:

1. Prof. Dr. Hendrik Sager
2. Priv.-Doz. Dr. Veit Buchholz

Die Dissertation wurde am 27.10.2023 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die TUM School of Medicine and Health am 13.03.2024
angenommen.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	4
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	6
TABELLENVERZEICHNIS.....	7
ZUSAMMENFASSUNG	8
1 EINLEITUNG.....	10
1.1 KORONARE HERZERKRANKUNGEN	10
1.1.1 MYOKARDINFARKT	10
1.1.2 KARDIALES REMODELING UND CHRONISCHE HERZINSUFFIZIENZ.....	15
1.1.3 HISTOPATHOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN NACH MI.....	18
1.2 DIE ROLLE DES IMMUNSYSTEMS BEI EINEM AKUTEN MYOKARDINFARKT.....	19
1.2.1 ZELLEN DES IMMUNSYSTEMS.....	19
1.2.2 RESERVOIRS	23
1.3 ANTIINFLAMMATORISCHE THERAPIE	24
1.3.1 WUNDHEILUNGSPHASEN NACH MI	24
1.3.2 ZELLULÄRER ABLAUF DER INFLAMMATORISCHEN PHASE.....	25
1.4 ZIELSETZUNG	26
2 MATERIALIEN UND METHODEN	28
2.1 MATERIALIEN	28
2.1.1 CHEMIKALIEN	28
2.1.2 LÖSUNGEN UND PUFFER	29
2.1.3 ANTIKÖRPER	29
2.1.4 VERBRAUCHSMATERIALIEN	31
2.1.5 VERSUCHSTIERE	31
2.1.6 LABORGERÄTE	32
2.1.7 SOFTWARE.....	32
2.2 METHODEN.....	33
2.2.1 TIERHALTUNG.....	33
2.2.2 KARDIALES ISCHÄMIEMODELL.....	33
2.2.3 NARKOSE.....	34
2.2.4 INTUBATION UND BEATMUNG.....	34
2.2.5 LAD LIGATUR ZUR INDUKTION EINES MYOKARDINFARKTES.....	35
2.2.6 POSTOPERATIVE VERSORGUNG.....	36
2.2.7 ORGANENTNAHME.....	37

2.2.8	GEWEBSPROZESSIERUNG	37
2.2.9	ZELLZÄHLUNG	40
2.2.10	DURCHFLUSSZYTOMETRIE.....	40
2.2.11	STATISTISCHE AUSWERTUNGEN	53
3	<u>ERGEBNISSE</u>	<u>54</u>
3.1	HERZ	54
3.1.1	GESAMT-LEUKOZYTEN IM HERZEN	54
3.1.2	NEUTROPHILE GRANULOZYTEN IM HERZEN.....	55
3.1.3	MONOZYTEN UND MAKROPHAGEN IM HERZEN.....	56
3.1.4	LY6C ^{HIGH} MONOZYTEN IM HERZEN	57
3.1.5	LY6C ^{LOW} MONOZYTEN IM HERZEN	58
3.2	BLUT.....	60
3.2.1	GESAMT-LEUKOZYTEN IM BLUT	60
3.2.2	NEUTROPHILE GRANULOZYTEN IM BLUT	61
3.2.3	LY6C ^{HIGH} MONOZYTEN IM BLUT	62
3.2.4	LY6C ^{LOW} MONOZYTEN IM BLUT	63
3.3	KNOCHENMARK	65
3.3.1	GESAMT-LEUKOZYTEN IM KNOCHENMARK	65
3.3.2	NEUTROPHILE GRANULOZYTEN IM KNOCHENMARK.....	66
3.3.3	LY6C ^{HIGH} MONOZYTEN IM KNOCHENMARK	67
3.3.4	LY6C ^{LOW} MONOZYTEN IM KNOCHENMARK.....	68
3.4	MILZ.....	69
3.4.1	RELATIVES GEWICHT DER MILZ.....	69
3.4.2	GESAMT-LEUKOZYTEN IN DER MILZ.....	70
3.4.3	NEUTROPHILE GRANULOZYTEN IN DER MILZ	71
3.4.4	LY6C ^{HIGH} MONOZYTEN IN DER MILZ.....	72
3.4.5	LY6C ^{LOW} MONOZYTEN IN DER MILZ	73
4	<u>DISKUSSION</u>	<u>75</u>
4.1	AUFNAHME UND BEREITSTELLUNG VON LEUKOZYTEN NACH MI/ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE	75
4.2	INFLAMMATORISCHE PHASE.....	75
4.3	REPARATIVE PHASE.....	79
4.4	ZUSAMMENFASSUNG ZEITLICHE AUFLÖSUNG	81
4.5	SUBPOPULATIONSSPEZIFISCHE KINETIK NACH MI	82
4.6	PHÄNOTYPISCHE AUFLÖSUNG DER MONOZYTEN, NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN UND ENDOTHELZELLEN ...	82
4.7	KLINISCHE BEDEUTUNG DER ARBEIT	84
4.8	LIMITATIONEN DER DATEN.....	84
5	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>87</u>
6	<u>DANKSAGUNG.....</u>	<u>95</u>

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
AK	Antikörper
APC-Cy7	Allophycocyanin- Cyanin 7
BSA	Rinderserum-Albumin
BV 510 / BV711 / BV421	Brilliant Violet 510/ Brilliant Violet 711/ Brilliant Violet 421
CD	Cluster of Differentiation
Cy5.5 / Cy7	Cyanin 5.5 / Cyanin 7
d	Tag
DNase	Desoxyribonuklease
EKG	Elektrokardiogramm
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting = Durchflusszytometrie
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FSD	Forward Scatter Detector = Vorwärtslichtdetektor
G	Gauge
h	Stunde
HFmrEF	Herzinsuffizienz mit mittelgradig eingeschränkter Ejektionsfraktion
HFpEF	Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion
HFrEF	Herzinsuffizienz mit eingeschränkter Ejektionsfraktion
i.p.	Intraperitoneal
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
KHK	koronare Herzkrankheit
LAD	left anterior descending artery = Ramus interventricularis anterior

Ly-6C	Lymphozyten Antigen 6 Komplex, Lokus C
Ly6G	Lymphozyten Antigen 6 Komplex, Lokus G
M-CSF	Monozyten-Kolonie-stimulierenden-Faktors
MHCII	Haupthistokompatibilitätskomplexmolekül II
MI	Myokardinfarkt
ml	Milliliter
n-STEMI	Nicht-ST-Strecken- Elevationsmyokardinfarkt
NYHA	New York Heart Association
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCI	perkutane Koronarintervention
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
RBC	Rote Blutkörperchen
rcf	relative centrifugal force = Schleuderziffer
s.c.	subkutan
SSD	Side Scatter Detector = Seitwärtslichtdetektor
STEMI	ST-Strecken-Elevationsmyokardinfarkt

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Differenzierung leukozytärer Subpopulationen (SSD-W/FSD-A)	47
Abbildung 2: Differenzierung leukozytärer Subpopulationen (FSD-W/FSD-A, SSD-W/SSD-A)	48
Abbildung 3: Differenzierung leukozytärer Subpopulationen (SSD-A/autofluoreszenz)	48
Abbildung 4: Differenzierung leukozytärer Subpopulationen (SSD-A/CD45.2)	49
Abbildung 5: Differenzierung leukozytärer Subpopulationen (Lineage/CD11b)	50
Abbildung 6: Differenzierung leukozytärer Subpopulationen (Ly6C/CD115)	50
Abbildung 7: Differenzierung leukozytärer Subpopulationen (CD45.2/CD11b)	51
Abbildung 8: Differenzierung leukozytärer Subpopulationen (Lineage/CD45.2)	52
Abbildung 9: Differenzierung leukozytärer Subpopulationen (F4/80/Ly6C)	52
Abbildung 10: Leukozyten im ischämischen Myokard	55
Abbildung 11: Neutrophile Granulozyten im ischämischen Myokard	56
Abbildung 12: Monozyten und Makrophagen im ischämischen Myokard	57
Abbildung 13: Ly6C ^{high} Monozyten im ischämischen Myokard	58
Abbildung 14: Ly6C ^{low} Monozyten im ischämischen Myokard	59
Abbildung 15: Leukozyten im Blut	61
Abbildung 16: Neutrophilen Granulozyten im Blut	62
Abbildung 17: Ly6C ^{high} Monozyten im Blut	63
Abbildung 18: Ly6C ^{low} Monozyten im Blut	64
Abbildung 19: Leukozyten im Knochenmark	65
Abbildung 20: Neutrophile Granulozyten im Knochenmark	66
Abbildung 21: Ly6C ^{high} Monozyten im Knochenmark	67
Abbildung 22: Ly6C ^{low} Monozyten im Knochenmark	68
Abbildung 23: Gewicht Milz im Verhältnis zum Körpergewicht	70
Abbildung 24: Leukozyten in der Milz	71
Abbildung 25: Neutrophile Granulozyten der Milz	72
Abbildung 26: Ly6C ^{high} Monozyten in der Milz	73
Abbildung 27: Ly6C ^{low} Monozyten der Milz	74

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien	28
Tabelle 2: In der Durchflusszytometrie verwendete monoklonale Primärantikörper	29
Tabelle 3: In der Durchflusszytometrie verwendete Beads	30
Tabelle 4: Verwendete Verbrauchsmaterialien	31
Tabelle 5: Verwendete Laborgeräte	32
Tabelle 6: Verwendete Software und deren Anwendung.....	32
Tabelle 7: Verdünnungen der Organproben	40
Tabelle 8: In der Durchflusszytometrie markierte Zelltypen	42
Tabelle 9: In der Durchflusszytometrie verwendete Antikörper (Primärmarkierung).....	43
Tabelle 10: In der Durchflusszytometrie verwendete Antikörper (Sekundärmarkierung)	44

Zusammenfassung

In den letzten Jahrzehnten ist die Letalität nach einem akuten Myokardinfarkt stetig gesunken. Die Prävalenz der chronischen Herzinsuffizienz, welche eine häufige Komplikation des akuten Myokardinfarkts darstellt, ist hingegen stetig gestiegen. Der chronischen Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt liegt das kardiale Remodeling, infolgedessen es zum Verlust kontraktile Einheiten kommt, zugrunde. Die Hintergründe des Remodelings auf zellulärer Ebene sind allerdings bislang nur unzureichend entschlüsselt worden. Die Beteiligung des angeborenen Immunsystems an inflammatorischen Prozessen nach Myokardinfarkt stellt ein vielversprechendes Ziel für eine mögliche medikamentöse Einflussnahme am kardialen Remodeling dar. Hierfür bedarf es einem grundlegenden Verständnis, zu welchem Zeitpunkt welche Zellen bereitgestellt und in das ischämische Myokard rekrutiert werden. Ziel dieser Arbeit war es Erkenntnisse hierzu zu gewinnen.

Mittels Durchflusszytometrie untersuchten wir im Mausmodell die Anzahl der verschiedenen Zellen des angeborenen Immunsystems in Knochenmark, Milz, Blut und dem ischämischen Myokard. Um den zeitlichen Verlauf zu repräsentieren, wurden die Zeitpunkte 12 h, 24 h, 48 h, 72 h, 5 d und 14 d nach Myokardinfarkt ausgewählt. Unsere Ergebnisse bestätigen, dass sich die Entzündungsprozesse nach Myokardinfarkt in eine inflammatorische und eine reparative Phase unterteilen lassen. Zudem konnten wir einen Unterschied in der differentiellen Bereitstellung und Aufnahme in das Myokard zwischen Monozyten und Granulozyten beobachten. Diese deskriptiven Ergebnisse bieten neue Erkenntnisse über die Kinetik der Zellen des angeborenen Immunsystems im zeitlichen Verlauf nach Myokardinfarkt. Die Daten können somit als Grundlage für weitere Projekte zum besseren Verständnis der Prozesse nach Myokardinfarkt oder Identifizierung neuer therapeutischer Ziele dienen.

Abstract

In recent decades, the mortality of acute myocardial infarction has steadily decreased. In contrast, the prevalence of chronic heart failure, which is a common complication of acute myocardial infarction, has steadily increased. The basis of chronic heart failure after myocardial infarction is cardiac remodeling resulting in ventricular dysfunction. The cellular background of remodeling has not been well understood. The role of the innate immune system in the inflammatory processes after myocardial infarction offers a promising target for possible drug intervention in cardiac remodeling. This requires a fundamental understanding of the supply and recruitment of the cells involved during the course of myocardial infarction. Using flow cytometry, we examined numbers of the different cells of the innate immune system in bone marrow, spleen, blood, and the ischemic myocardium in a mouse model. To represent the time course, the time points 12 h, 24 h, 48 h, 72 h, 5 d, and 14 d after myocardial infarction were selected. Our findings confirmed the dynamics of an inflammatory and reparative phase as well as a variance between the delivery and uptake into the myocardium of monocytes and granulocytes. These descriptive results provide new insights into the kinetics of innate immune cells over the time course after myocardial infarction. Thus, the data may serve as a basis for further projects to better understand the inflammatory processes after myocardial infarction or to identify new therapeutic targets.

1 Einleitung

1.1 Koronare Herzerkrankungen

1.1.1 Myokardinfarkt

1.1.1.1 Definition

Die pathobiologische Definition eines akuten Myokardinfarkts (MI) entspricht einem myokardialen Zelltod durch anhaltende Ischämie (Thygesen et al., 2018). Klinisch unterscheidet man dabei zwischen akutem und chronischem Myokardschaden.

1.1.1.2 Klinik und Diagnostik

Kommt es zur Nekrose von Kardiomyozyten, werden durch den Verlust der Zellintegrität spezifische biologische Marker freigesetzt. Den Goldstandard zur klinischen Diagnose stellt dabei Troponin dar (Thygesen et al., 2018). Troponin ist ein Eiweißbaustein des kontraktilen Apparats der Kardiomyozyten und besteht aus drei Subtypen. Die Subtypen setzen sich aus Subtyp T, I und C zusammen. Troponin T und I werden ausschließlich im Herzen exprimiert (Katrukha, 2013). Sind die Blutwerte für Troponin über die Norm erhöht, deutet dies auf eine Schädigung (injury) der Kardiomyozyten hin. Entscheidend zur Diagnosestellung ist die Kinetik der Werte: Steigen oder fallen die Werte im Verlauf, deutet dies auf eine akute Myokardschädigung hin. Zeigen sich die Werte allerdings stabil und somit ohne Kinetik, suggeriert dies einen chronischen Myokardschaden als Ursache (Vafaie, 2016). Um eine Myokardschädigung als akuten MI zu definieren, bedarf es neben dem durch die kardialen Biomarker erbrachten Nachweises eines akuten myokardialen Zellschadens auch zusätzlicher Hinweise auf die ischämische Pathophysiologie des Geschehens (Ibanez et al., 2018). Dabei detektiert man zunächst typische Symptome und evaluiert die kardiovaskulären Risikofaktoren des Patienten. Anschließend lässt sich der Verdacht auf ein ischämisches Geschehen mittels Elektrokardiogramm (EKG), Echokardiogramm und Koronarangiographie erhärten. Im EKG stellt sich eine akute Ischämie typischerweise als ST-Strecken Hebung in mindestens zwei lokoregionär benachbarten Ableitungen dar (Mendis et al., 2011; Nable & Brady,

2009). Echokardiographisch deuten neu aufgetretene Wandbewegungsstörungen auf ein ischämisches Geschehen mit konsekutivem Zellschaden hin (Ibanez et al., 2018). Koronarangiographische Verfahren ermöglichen den direkten Nachweis einer Obstruktion der Koronararterien. Dabei unterscheidet man zwischen invasiver, Katheter-basierter, und computertomographischer Koronarangiographie. Lässt sich anhand dieser Verfahren eine Ischämie der Kardiomyozyten bestätigen, spricht man in Zusammenschau mit der spezifischen Kinetik der kardialen Biomarker von einem akuten MI (McCarthy et al., 2019). Ferner unterteilt man einen akuten MI in ST-Strecken-Elevations-MI (STEMI) und nicht-ST-Strecken-Elevations-MI (N-STEMI) (Reed, Rossi, & Cannon, 2017; Thygesen et al., 2018). Unterschieden werden die beiden Gruppen anhand des EKG-Befunds. Ein STEMI (ST segment elevation myocardial infarction) ist ein akuter MI, der sich klinisch neben den klassischen Symptome mit den bereits erwähnten ST-Strecken Hebungen oder einem neu aufgetretenen Linksschenkelblock präsentiert (Vafaie, 2016). Ein N-STEMI ist definiert als akuter MI mit typischer Symptomatik und Laborwerten, aber ohne typische EKG-Veränderungen (Thygesen et al., 2018).

1.1.1.3 Pathophysiologie

Pathophysiologisch liegt einem MI eine Ischämie und damit eine Dysbalance zwischen Sauerstoffangebot und Sauerstoffbedarf zugrunde (Reed et al., 2017). Der Mangel an zu Verfügung stehendem Sauerstoff führt schon nach kurzer Zeit zu irreversiblen Zellschäden (injury) der Kardiomyozyten (Burke & Virmani, 2007).

1.1.1.4 Subtypen

Je nach Kausalität der Okklusion differenziert man laut aktueller Definition zwischen fünf verschiedenen Subtypen (Thygesen et al., 2018).

1.1.1.4.1 MI Typ 1

Ein MI, dem eine koronare Herzkrankheit (KHK) zugrunde liegt und der in der Regel durch eine atherosklerotische Plaqueruptur (Ruptur oder Erosion) ausgelöst wird, wird als Typ 1 MI bezeichnet. Dabei bildet sich durch die Plaqueruptur ein Thrombus, der zur distalen koronaren Blutflussunterbindung führt. Durch den aussetzenden Blutfluss

kommt es zu einer Myozyten-Nekrose (Bentzon, Otsuka, Virmani, & Falk, 2014; Falk, Nakano, Bentzon, Finn, & Virmani, 2013; Thygesen et al., 2018).

1.1.1.4.2 MI Typ 2

Ein Typ 2 MI ist dadurch charakterisiert, dass die Sauerstoffunterversorgung nicht einer Embolisation durch einen Thrombus nach Plaqueruptur zugrunde liegt. Bei dem Typ 2 MI kommt es durch mannigfaltige und oft multifaktorielle Mechanismen zu einem Ungleichgewicht zwischen Sauerstoffversorgung und Verbrauch (Thygesen et al., 2018). Folgende Faktoren können bei einem Typ 2 MI ursächlich sein: verminderte Myokardperfusion aufgrund einer Koronararteriosklerose ohne Plaqueruptur, Koronararterienspasmus, koronare mikrovaskuläre Dysfunktion, Koronararteriendissektion sowie andere Mechanismen, die die Sauerstoffversorgung reduzieren, wie beispielsweise schwere Bradyarrhythmien, Atemversagen mit schwerer Hypoxämie, schwere Anämie und Hypotonie oder Schock. Ebenfalls kann ein erhöhter myokardialer Sauerstoffbedarf aufgrund anhaltender Tachyarrhythmie oder schwerer Hypertonie vorliegen (Mendis et al., 2011; Thygesen et al., 2018).

1.1.1.4.3 MI Typ 3

Der Nachweis kardialer Biomarker im Blut ist von grundlegender Bedeutung für die Diagnose von MIs (Thygesen et al., 2018). Ein Typ 3 MI ist dadurch definiert, dass keine Informationen über kardiale Biomarker-Level bestehen oder der Patient verstirbt bevor diese überhaupt messbar ansteigen. Beispielsweise kann die Diagnose eines Typ 3 MIs gestellt werden, wenn sich im EKG des Patienten MI-typische Veränderungen zeigen, der Patient jedoch stirbt, bevor es zur Blutentnahme kommt. Ebenfalls wären die Kriterien für einen Typ 3 MI erfüllt, wenn der Patient unmittelbar nach dem Auftreten erster Symptome verstirbt und es noch nicht zu einer Erhebung der Biomarker gekommen ist. Ziel ist es, mit dieser Definition tödliche MIs von der Gruppe der plötzlichen Todesfälle, die nicht auf einen MI zurückzuführen sind, abzugrenzen (Mendis et al., 2011; Thygesen et al., 2018).

1.1.1.4.4 MI Typ 4

Ein koronarinterventionsbedingter Herzinfarkt wird als Typ 4 MI bezeichnet. Zur Diagnosestellung bedarf es dabei einer Erhöhung des Troponin-Werts um das Fünffache der 99. Perzentile ($< 59 \text{ ng/l}$) bei Patienten mit normalen Ausgangswerten. Bei Patienten mit erhöhten Troponin-Werten vor dem Eingriff, bei denen die Werte stabil ($\leq 20\%$ Schwankung) oder fallend sind, muss der Troponin Spiegel nach der Intervention um mehr als 20% ansteigen. Der absolute Wert nach dem Eingriff muss jedoch immer noch mindestens das Fünffache der 99. Perzentile betragen. Darüber hinaus ist eines der folgenden Elemente erforderlich: akute ischämische EKG-Veränderungen wie beispielsweise die Entwicklung von neuen pathologischen Q-Wellen, bildgebende Nachweise eines neuen Verlusts an vitalem Myokard oder einer neuen regionalen Wandbewegungsstörung sowie angiografische Befunde, die auf eine verfahrensbedingte okkludierende Komplikation hindeuten (z. B. Koronardissektion oder Verschluss einer epikardialen Hauptarterie/eines Seitenasts) (Thygesen et al., 2018). Ferner unterteilt man den Typ 4 MI in a, b und c. Typ 4a ist definiert als ein verfahrensbedingter MI, der innerhalb der ersten 48 Stunden nach der Intervention auftritt. Typ 4b ist durch eine Stent- oder Scaffold-Thrombose gekennzeichnet während Typ 4c eine Restenose nach perkutaner Koronarintervention (PCI) beschreibt (Cohen & Visveswaran, 2020).

1.1.1.4.5 MI Typ 5

Von einem MI Typ 5 spricht man, wenn der MI innerhalb der ersten 48 Stunden nach Koronararterien-Bypass-Transplantation auftritt. Dabei müssen die Troponin Werte um mehr als das 10-fache der 99.ten Perzentile bei Patienten mit normalen Troponin-Ausgangswerten erhöht sein. Bei Patienten mit erhöhten Troponin-Werten vor dem Eingriff, bei denen die Troponin-Werte stabil ($\leq 20\%$ Schwankung) oder fallend sind, muss der Troponin-Wert nach dem Eingriff um mehr als 20% ansteigen. Der absolute Wert nach dem Eingriff muss jedoch immer noch mehr als 10-mal so hoch sein wie die 99. Perzentile. Darüber hinaus ist eines der folgenden Elemente erforderlich: Entwicklung von neuen pathologischen Q-Wellen, angiographisch dokumentierter neuer Transplantatverschluss oder neuer nativer Koronararterienverschluss,

bildgebende Nachweise eines neuen Verlusts an vitalem Myokard oder einer neu aufgetretenen regionalen Wandbewegungsstörung (Thygesen et al., 2018).

1.1.1.5 Genese des häufigsten Myokardinfarkt-Subtypen

Mehr als 80% der akuten MI sind die Folge einer koronaren Atherosklerose mit aufgelagertem luminalen Thrombus (=Typ 1 MI) (Burke & Virmani, 2007; Jia et al., 2013). Die zugrunde liegende Pathophysiologie lässt sich in verschiedene Mechanismen unterteilen. Man unterscheidet zwischen einer Plaqueruptur mit entzündlicher Komponente, die sowohl lokal (u.a. Akkumulation intimaler Makrophagen) als auch systemisch (Erhöhung des zirkulierenden c-reaktiven Proteins) wirkt, und einer Ruptur ohne signifikantes Entzündungsgeschehen (Crea & Libby, 2017). Eine Plaqueruptur führt in der Regel zur Bildung von fibrinreichen "roten" Thromben (Alkarithi, Duval, Shi, Macrae, & Ariens, 2021). Zudem existiert die Gruppe der MI durch Plaqueeosion. Bei Erosion der Plaques bilden sich Ablagerungen, die meist aus plättchenreichen "weißen" Thromben bestehen (Alkarithi et al., 2021; Crea & Libby, 2017).

1.1.1.6 Akuttherapie des akuten Myokardinfarkts

Das Hauptziel der Therapie eines akuten MI besteht darin, das Ausmaß des Infarkts möglichst klein zu halten. Je kleiner das durch die Ischämie nekrotisch veränderte Areal ist, umso geringer sind akute und langzeitige Folgen des Infarkts (Foo et al., 2018). Die Größe des Infarkts wird dabei in erster Linie durch die Zeitdauer der Ischämie beeinflusst (Foo et al., 2018; Hasche, Fernandes, Freedman, & Jeremy, 1995). Therapie der Wahl ist eine PCI, die die Okklusion beseitigt und damit zur Reperfusion des zuvor nicht oder nicht ausreichend perfundierten Gebiets führt. Durch die Reperfusion steigt das Sauerstoffangebot im betroffenen Areal an und verhindert somit das Fortschreiten der durch das Sauerstoffdefizit bedingten Zellschäden (Ibanez et al., 2018). Noch nicht irreversibel geschädigte Kardiomyozyten können somit vor der Nekrose bewahrt werden (Foo et al., 2018). Dieser Sachverhalt erklärt, wieso die Zeit zwischen Diagnosestellung und Reperfusion so niedrig wie möglich gehalten werden sollte. Konkret sollten bis zur Reperfusion mittels PCI weniger als zwei Stunden nach Diagnosestellung und weniger als zwölf Stunden nach Symptombeginn vergehen (Ibanez et al., 2018). Laut aktueller europäischer Leitlinie

zur Therapie von Patienten mit STEMI ist ein Abweichen von oben genannter Strategie nur dann indiziert, wenn eine Behandlung mittels PCI nicht innerhalb von 120 Minuten gewährleistet werden kann. In diesem Fall ist eine medikamentöse Thrombolyse anzustreben. Diese sollte innerhalb der ersten zehn Minuten nach Diagnosestellung begonnen werden (Ibanez et al., 2018). Somit geschieht diese Art der Therapie bestenfalls noch präklinisch durch den behandelnden Notarzt. Laut aktueller Leitlinie müssen diese Patienten trotz erfolgreicher Thrombolyse sekundär, innerhalb von 24 Stunden, mittels PCI behandelt werden. Falls die Thrombolyse nicht erfolgreich war, gilt es dem Patienten so schnell wie möglich mittels PCI zu therapieren (Ibanez et al., 2018; Silber, 2010). Die Reperfusionstherapie mittels PCI hat das Regime des akuten Myokardinfarkts revolutioniert und zu deutlich gesteigerten Überlebensraten geführt (Keeley, Boura, & Grines, 2003). Die verminderte Akutmortalität geht jedoch mit einer erhöhten Rate an Spät komplikationen, insbesondere chronischer Herzinsuffizienz, einher (Velagaleti et al., 2008).

1.1.2 Kardiales Remodeling und chronische Herzinsuffizienz

1.1.2.1 Hintergrund

In den meisten Ländern nimmt die Letalität des akuten MI ab (Johansson, Rosengren, Young, & Jennings, 2017). So hat sich in Deutschland beispielsweise die Herzinfarkt-Sterbeziffer bei Männern um zwei Drittel und bei Frauen um über die Hälfte gegenüber den Daten von vor 30 Jahren verringert (DGK, 01/2018).

Besonders deutlich zeigt sich dieser Trend in Ländern mit hohem Pro-Kopf-Einkommen (Moran et al., 2014; Mozaffarian et al., 2015; Townsend et al., 2016). Grund hierfür sind verbesserte interventionelle und medikamentöse Therapien, wodurch jedoch die gesellschaftlichen Belastungen durch Spätfolgen des MI steigen (M. Nahrendorf, Pittet, & Swirski, 2010). Als besonders relevante Spätfolge ist die der chronischen Herzinsuffizienz zu nennen (Cook, Cole, Asaria, Jabbour, & Francis, 2014). Zur chronischen Herzinsuffizienz als Komplikation eines MI kommt es durch das sogenannte kardiale Remodeling, welches auf einen MI folgt.

1.1.2.2 Definition und Genese

Als kardiales Remodeling wird ein Prozess bezeichnet, der zu Veränderungen in Funktion, Form und Größe des linken Ventrikels führt (Wu et al., 2017). Ursächlich hierfür können physiologische Umstände wie Wachstum oder Training aber auch pathologische Gründe wie beispielsweise ein Herzklappenfehler oder ein Herzinfarkt sein (Sutton & Sharpe, 2000). Das durch die Ischämie betroffene Myokard ist nicht nur von verminderter mechanischer Belastbarkeit und muss, um eine Ventrikelruptur zu vermeiden, durch kardiales Narbengewebe ersetzt werden, sondern initiiert auch eine biochemische Kaskade, die zu den entsprechenden Umbauprozessen führt (Sutton & Sharpe, 2000). Das entstehende Narbengewebe wächst in seiner Ausdehnung, bis es die einwirkenden dilatierenden Kräfte durch die Stärke des Kollagengewebes ausgleichen kann (Sutton & Sharpe, 2000). Das so entstandene Narbengewebe verfügt allerdings über eine verringerte Funktionalität, da es keine kontraktile Eigenschaften besitzt, was somit einen negativen Effekt auf die Leistungsfähigkeit des linken Ventrikels zur Folge hat. Zudem kommt es durch den Umbau zu Veränderungen des Ventrikelvolumens und der Ventrikelform (Pfeffer & Braunwald, 1990).

Durch die beschriebene Pathophysiologie und die damit einhergehende eingeschränkte Funktion, kommt es zum Krankheitsbild der chronischen Herzinsuffizienz (Peet, Ivetic, Bromage, & Shah, 2020). Die Herzinsuffizienz stellt ein klinisches Syndrom dar, welches vor allem durch Abgeschlagenheit, verminderte Leistungsfähigkeit und Dyspnoe charakterisiert ist (Oeing, Tschope, & Pieske, 2016). Pathophysiologisch liegt diesen Symptomen eine verminderte globale (das ganze Herz betreffende) oder linksventrikuläre Funktion zugrunde (Rossignol, Hernandez, Solomon, & Zannad, 2019).

1.1.2.3 Klassifikation

Gängig ist es Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz mittels der Klassifikation der New York Heart Association (NYHA) anhand ihrer Belastbarkeit einzuteilen (Dolgin, Committee, Fox, & Levin, 1994).

Ebenso lässt sich die chronische Herzinsuffizienz aber auch anhand der Ejektionsfraktion in drei Subtypen unterteilen. Laut aktueller europäischer Leitlinie (Oeing et al., 2016) unterscheidet man dabei eine chronische Herzinsuffizienz mit

erhaltener Ejektionsfraktion (HFpEF) bei der die Ejektionsfraktion über 50% liegt von einer chronischen Herzinsuffizienz mit mittelgradig eingeschränkter Ejektionsfraktion (HFmrEF, 40-49%) und einer chronischen Herzinsuffizienz mit eingeschränkter Ejektionsfraktion (HFrEF, <40%) (Oeing et al., 2016). Meistens liegen bei der chronischen Herzinsuffizienz sowohl diastolische als auch systolische Einschränkungen vor (Rossignol et al., 2019).

1.1.2.4 Lebens Einschränkung

Die chronische Herzinsuffizienz ist eine lebensbedrohliche Krankheit, die mit deutlich verminderter Lebenserwartung und einem gravierenden Anstieg der Mortalität einhergeht. Dabei liegt die Ein-Jahres Mortalität nach einer Studie der europäischen Gesellschaft für Kardiologie bei 8,8% für HFrEF und 6,3% für HFpEF (Crespo-Leiro et al., 2016).

1.1.2.5 Epidemiologie und ökonomischer Hintergrund

Der akute MI ist nicht nur die gravierendste Manifestation der KHK (Townsend et al., 2016) sondern auch Hauptursache der chronischen Herzinsuffizienz (Tanai & Frantz, 2015). Im Jahre 2018 stellte die chronische Herzinsuffizienz die häufigste Todesursache und der akute MI die zweithäufigste Todesursache in Deutschland dar (Deutschland, 2021). Somit tragen der akute MI und seine Folgen maßgeblich zur Gesamtsterblichkeit, sowie zu Belastungen für die Gesellschaft und das Gesundheitswesen bei. Wie bereits erwähnt, steigt die Prävalenz der chronischen Herzinsuffizienz vor allem weil die Sterblichkeit des akuten MI abgenommen hat, während die Behandlung der chronischen Herzinsuffizienz als Spätfolge weiterhin insuffizient geblieben ist. (M. Nahrendorf et al., 2010; Peet et al., 2020; Velagaleti et al., 2008).

Die Auswirkungen, die das Krankheitsbild der chronischen Herzinsuffizienz auf das Gesundheitssystem und die Gesellschaft hat, entstehen nicht nur durch direkte Kosten der unmittelbaren Therapie und Belastung des Gesundheitswesens, sondern vor allem auch durch indirekte Kosten wie Arbeitsunfähigkeit, verfrühte Sterblichkeit und häusliche Pflege (Cook et al., 2014). Beispielsweise lag im Jahre 2012 die globale

Belastung durch die chronische Herzinsuffizienz (indirekte und direkte Kosten addiert) bei 108 Milliarden US-Dollar (Cook et al., 2014).

1.1.3 Histopathologische Veränderungen nach MI

1.1.3.1 Makroskopische Prozesse

Nach einem (nicht-revaskularisierten) MI lassen sich mikroskopische und makroskopische Veränderungen unterscheiden. Zunächst, circa 15 Stunden nach Infarkt, stellt sich das Infarktareal makroskopisch als blass und ödematös geschwollen dar. Anschließend, nach 24-72 Stunden, lässt sich makroskopisch eine gelb-gräuliche Verfärbung des betroffenen Myokards erkennen, wobei bereits nach circa 72 Stunden ein vermehrtes Wachstum von Kapillaren um das Infarktgewebe herum einsetzt. Makroskopisch zeigt sich in dieser Phase ein hämorrhagischer Randsaum. Eine Woche nach Infarkt beginnt sich das nekrotische Areal zu verkleinern, bis das betroffene Myokard nach circa drei Wochen markant verschmälert ist. Im Anschluss kommt es aufgrund der Ausbildung von Granulationsgewebe zu einer rot-bräunlichen Verfärbung. Mit der finalen Ausbildung einer Narbe ist der Umbau des Myokards nach circa 8 Wochen abgeschlossen (Böcker et al., 2019).

1.1.3.2 Mikroskopische Prozesse

Nachdem der Blutfluss unterbrochen wurde, werden durch inflammatorische Signale, die aus nekrotischen Kardiomyozyten freigesetzt werden, innerhalb der ersten 24 Stunden vorwiegend neutrophile Granulozyten in das Infarktareal rekrutiert (Michaud et al., 2020). Monozyten und Makrophagen folgen kurze Zeit darauf (Prabhu & Frangogiannis, 2016). Zunächst besteht die Aufgabe der infiltrierenden Zellen darin, nekrotische Zellen, extrazelluläre Matrix und Zelldebris abzubauen. Dabei infiltrieren die Zellen das Infarktareal zunächst randständig. Diese Phase wird als sterile Inflammation beschrieben und ebnet den Weg zur späteren proliferativen und reparativen Phase (Michaud et al., 2020). Ab Tag drei nach Myokardinfarkt beginnt die zuvor genannte proliferative Phase, die ebenso durch Zellen des Immunsystems getragen wird. Dabei verschiebt sich jedoch das Gleichgewicht zwischen neutrophilen

Granulozyten, Monozyten und Makrophagen in Richtung der Makrophagen und Monozyten (M. Nahrendorf et al., 2007; Prabhu & Frangogiannis, 2016). In dieser Phase kommt es durch die Ausschüttung verschiedener Zytokine und Wachstumsfaktoren zur Ausbildung von Granulationsgewebe, wobei Typ I Kollagenfasern, die von Myofibroblasten produziert werden, das entstehende Gewebe stabilisieren. Neben der Ausbildung von Granulationsgewebe ist das Einsprossen von Kapillaren, die das entstehende Gewebe mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgen, und das Freisetzen anti-entzündlicher Signale integraler Bestandteil dieser Phase (Michaud et al., 2020). Abschließend kommt es vor allem durch Remodeling der extrazellulären Matrix zur finalen Narbenbildung (Frangogiannis, Smith, & Entman, 2002), die dadurch gekennzeichnet ist, dass das Granulationsgewebe allmählich verschwindet und durch dichtes Kollagen ersetzt wird. Es verbleibt somit ein hypozelluläres und kompaktes Gewebe (Michaud et al., 2020; M. Nahrendorf et al., 2007; Peet et al., 2020).

1.2 Die Rolle des Immunsystems bei einem akuten Myokardinfarkt

1.2.1 Zellen des Immunsystems

Die Zellen des Immunsystems werden in zwei allgemeine Gruppen eingeteilt: die der angeborenen und die der adaptiven Immunität. Die angeborenen Immunzellen reagieren schnell, während die Reaktion der adaptiven Immunzellen verzögert eintritt und sich erst nach Tagen voll entfaltet (McComb, Thiriot, Akache, Krishnan, & Stark, 2019). Zudem bilden die Zellen der adaptiven Immunität ein immunologisches Gedächtnis aus (Parkin & Cohen, 2001), wobei ähnliches mittlerweile auch für Zellen der angeborenen Immunität beschrieben ist (trained immunity).

Zu den unmittelbar reagierenden Immunzellen des angeborenen Systems gehören die myeloischen Zellen. Diese unterteilt man in mononukleäre Phagozyten und polymorphonukleäre Phagozyten. Zu den mononukleären Phagozyten zählt man die Makrophagen, die größtenteils von Blutmonozyten abstammen, und die eng verwandten dendritischen Zellen, die ebenso auf Monozyten zurückgehen (Beutler, 2004). Die polymorphkernigen Phagozyten, zu denen die neutrophilen Granulozyten

gehören, sind von zentraler Bedeutung für die Eindämmung von Infektionen und die Vermittlung entzündlicher Prozesse (Beutler, 2004; Silvestre-Roig, Braster, Ortega-Gomez, & Soehnlein, 2020).

1.2.1.1 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten machen beim Menschen etwa 70 % aller Leukozyten im Blut aus und werden in hohen Raten fortlaufend im Knochenmark produziert (Dancey, Deubelbeiss, Harker, & Finch, 1976). Von dort aus gelangen die neutrophilen Granulozyten in das Blut, wo sie zirkulieren, bis sie bei Bedarf in Gewebe einwandern. Sobald sie das Ende ihrer Lebensspanne erreicht haben, werden sie größtenteils von Makrophagen durch Phagozytose beseitigt (Bratton & Henson, 2011). Die Lebensspanne bezieht sich auf Produktion bis Apoptose. Die Dauer bis neutrophile Granulozyten nach der Produktion in den Blutkreislauf gelangen, wird auf 5-8 Tage geschätzt. Sobald sie im Blutkreislauf sind, haben diese Zellen eine kurze Halbwertszeit von circa 19 Stunden (Patel, Ginhoux, & Yona, 2021). Obwohl neutrophile Granulozyten einem großen Zellumsatz unterliegen, bleibt ihre Zahl im Blutkreislauf relativ konstant, da ein gut koordiniertes Gleichgewicht zwischen Produktion und Verbrauch besteht (von Vietinghoff & Ley, 2008). Neutrophile Granulozyten gehören zur Gruppe der polymorphkernigen Leukozyten und sind als einer der Hauptakteure bei akuten Entzündungen zu nennen (Kolaczkowska & Kubes, 2013; Phillipson & Kubes, 2011). In den meisten Fällen sind neutrophile Granulozyten die ersten Effektorzellen, die an einen Entzündungsherd rekrutiert werden (Soehnlein & Lindbom, 2010). Sie sind in der Lage, Krankheitserreger durch verschiedene Mechanismen zu eliminieren und Zelltrümmer zu phagozytieren (Soehnlein & Lindbom, 2010). Um ihre Aufgaben bewältigen zu können, besitzen sie ein breites Arsenal an Enzymen und Mechanismen. Unter anderem sind neutrophile Granulozyten mit drei Arten von Granula ausgestattet, die mit entzündungsfördernden Proteinen gefüllt sind (Kolaczkowska & Kubes, 2013). Während einer Entzündung steigt zunächst die Zahl der neutrophilen Granulozyten im Gewebe, um dann mit der Zeit wieder abzunehmen. Dies geschieht, indem die Zellen im Verlauf apoptotisch absterben und von Makrophagen und dendritischen Zellen entfernt werden (Stark et al., 2005). Neutrophile Granulozyten reagieren nicht nur auf diverse Signale, um wie

bereits erwähnt zu einem Entzündungsherd rekrutiert zu werden, sondern produzieren auch selbst verschiedene Zytokine und andere Faktoren, die die Entzündung und auch das Immunsystem beeinflussen und regulieren (Nauseef & Borregaard, 2014; Scapini & Cassatella, 2014). Heutzutage ist es etabliert, dass sie auch zur Resolution von Entzündungen beitragen (Greenlee-Wacker, 2016), sowie potentiell Makrophagen für langfristige Immunreaktionen regulieren können (Chen et al., 2014).

1.2.1.2 Monozyten

Der Hauptanteil der Monozyten zirkuliert nach der Ausreifung im Knochenmark nur für kurze Zeit im peripheren Blut, da der Großteil in extravaskuläres Gewebe emigriert. Dort phagozytieren sie entweder Antigene, um sie anschließend zu Lymphknoten zu transportieren, oder differenzieren unter inflammatorischen Bedingungen zu phagozytotischen Makrophagen aus (Jakubzick et al., 2013; Yanez et al., 2017).

Monozyten machen circa 10 % (Mensch) bzw. 4 % (Maus) der Leukozyten im Blut aus. Die Monozyten der Maus lassen sich anhand der Expression von Zelloberflächenmarkern in zwei primäre Untergruppen unterteilen (Rose, Misharin, & Perlman, 2012), die Ly6C^{high} und Ly6C^{low} Monozyten (M. Nahrendorf et al., 2007). Ly6C^{high} Monozyten werden bei Entzündungen rekrutiert und produzieren anschließend große Mengen an pro-inflammatorischen Zytokinen. Daher werden diese Monozyten auch als inflammatorische Monozyten bezeichnet (Dutta & Nahrendorf, 2015). Im Gegensatz dazu fördern Ly6C^{low} Monozyten reparative Prozesse, wie beispielweise die Bildung von Granulationsgewebe durch Angiogenese und die Produktion von extrazellulärer Matrix (Frantz & Nahrendorf, 2014). Die genannten Funktionen legen nahe, dass diese Zellen aktiv an der Terminierung von Entzündungen beteiligt sind (M. Nahrendorf et al., 2007). Um den mannigfaltigen und wie angedeutet teils gegenläufigen Aufgaben, die Monozyten zu erfüllen haben, gerecht zu werden, existieren auch im Menschen unterschiedliche Subgruppen. Dabei unterscheidet man anhand der cluster of differentiation (CD) Oberflächenmerkmale zwischen klassischen, inflammatorischen CD14⁺ CD16⁻ Monozyten, intermediären CD14⁺ CD16⁺ Monozyten und nicht-klassischen CD16⁻ CD16⁺ Monozyten (Gordon & Taylor, 2005). Humane klassische (und intermediäre) Monozyten stellen den menschlichen Counterpart zu den murinen inflammatorischen

Ly6C^{high} Monozyten dar. Humane nicht-klassische Monozyten hingegen entsprechen am ehesten den murinen Ly6C^{low} Monozyten (Kratofil, Kubes, & Deniset, 2017). Wie experimentelle Studien an Mäusen ergeben haben, gehen Ly6C^{low} Monozyten aus Ly6C^{high} Monozyten hervor (Yona et al., 2013). Beim Menschen bilden sich aus den klassischen Monozyten zunächst intermediäre und danach nicht-klassische Monozyten. Dies geschieht unter dem Einfluss des Monozyten-Kolonie-stimulierenden-Faktors (M-CSF) (Korkosz, Bukowska-Strakova, Sadis, Grodzicki, & Siedlar, 2012; Patel et al., 2017).

1.2.1.3 Makrophagen

Makrophagen sind ubiquitär vorkommende Zellen, die in fast allen Geweben zu finden sind (Honold & Nahrendorf, 2018). Sie entspringen entweder aus zirkulierenden Monozyten oder wurden im Rahmen der Embryonalentwicklung im Gewebe ausgesät (Italiani & Boraschi, 2017). Ihre Aufgabe ist es, nach Krankheitserregern zu suchen oder tote Zellen zu eliminieren. Dabei hängt die Funktion der Makrophagen nicht nur von ihrem Entwicklungsursprung, sondern auch maßgeblich von der Gewebeumgebung ab (Honold & Nahrendorf, 2018). Die einzelnen Makrophagenpopulationen sind sehr heterogen, was höchstwahrscheinlich die erforderlichen Anforderungen an ihre Spezialisierung in den verschiedenen Geweben widerspiegelt. Diese Heterogenität spiegelt sich in ihrer Morphologie, dem Ausmaß der zu erkennenden Krankheitserreger, sowie in der Menge der von ihnen produzierten entzündlichen Zytokine wieder (Saldana, 2021). Die Heterogenität dieser Zellen ist möglicherweise nicht nur das Ergebnis ihres Differenzierungsprozesses im Gewebe, sondern wird wahrscheinlich von ihren monozytären Vorläufern vererbt (Saldana, 2021).

Makrophagen sind Schlüsselzellen für die Integrität und den Schutz des Gewebes. Sie gewährleisten nicht nur die Gewebefunktionen und das homöostatische Gleichgewicht, sondern sind auch potente Effektorzellen bei entzündlichen Ereignissen (Italiani & Boraschi, 2017). Die Funktion von gewebeansässigen Makrophagen im Vergleich zu Makrophagen, die von zirkulierenden Blutmonozyten abstammen, kann sich fundamental unterscheiden (Honold & Nahrendorf, 2018; Italiani & Boraschi, 2017). Prinzipiell haben Makrophagen unter anderem folgende

Funktionen: Monozyten-Rekrutierung, Effektorzellen für entzündliche Prozesse, Schutz vor Infektionen, Aufrechterhaltung einer tolerogenen Mikroumgebung, Immunsuppression und Unterstützung der Gewebsregeneration (Italiani & Boraschi, 2017).

Trotz der angesprochenen Heterogenität wurden Makrophagen lange, analog zu den Monozyten, zwei Polen zugeordnet. Dabei stellten M1 Makrophagen den inflammatorischen, destruktiven Pol dar, und M2 Makrophagen den reparativen, pro-angiogenetischen und pro-fibrotischen Pol. Diese Anschauung geht jedoch auf *in vitro* Studien zurück und zeigt höchstwahrscheinlich ein sehr vereinfachtes Bild bei dem die Heterogenität nicht zu tragen kommt (M. Nahrendorf & Swirski, 2016).

1.2.2 Reservoirs

1.2.2.1 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten unterliegen, wie bereits beschrieben, einem hohem Zellumsatz und müssen deswegen kontinuierlich nachproduziert werden. Um außerdem im Falle eines akut erhöhten Bedarfs, wie etwa einem Myokardinfarkt, in ausreichender Anzahl vorhanden zu sein, gibt es mehrere Reservoirs, in denen Leukozyten unterschiedlicher Reifestadien und Menge gespeichert werden (Summers et al., 2010).

Die Population der neutrophilen Granulozyten im Knochenmark kann in drei Pools unterteilt werden: den Stammzellenpool, den mitotischen Pool und den postmitotischen Pool. Der Stammzellen-Pool besteht aus undifferenzierten hämatopoetischen Stammzellen, während sich der mitotische Pool auf direkte granulozytäre Vorläuferzellen bezieht, die sich in der Proliferations- und Differenzierungsphase befinden. Vollständig ausdifferenzierte reife Neutrophile bilden den postmitotischen Pool. Dieser setzt sich zum einem aus der Knochenmarkreserve und zum anderen aus den zirkulierenden neutrophilen Granulozyten zusammen. Die Knochenmarksreserve steht für die Freisetzung bei Bedarf zur Verfügung (Lawrence, Corriden, & Nizet, 2018). Die zirkulierenden neutrophilen Granulozyten lassen sich wiederum ebenfalls weiter unterteilen. Dabei unterscheidet man zwischen zirkulierenden und marginalisierten Pool. Der zirkulierende Pool repräsentiert die frei

zirkulierenden neutrophilen Granulozyten im Blut, während der marginale Pool diejenigen Zellen umfasst, die sich an Gefäßwänden im mikrovaskulären Gefäßbett anlagern (Lawrence et al., 2018; Summers et al., 2010). Genauer bezieht sich Marginalisierung auf den, durch Anlagerung an die Gefäßwand, verlängerten Transit von neutrophilen Granulozyten durch bestimmte Organe, was wiederum zu intravaskulären Pools führt. Diese Pools finden sich in relevantem Ausmaß unter anderem in der Milz und dem Knochenmark (Summers et al., 2010).

1.2.2.2 Monozyten

Zirkulierende Monozyten haben eine kurze Halbwertszeit, die bei Mäusen nach dem Verlassen des Knochenmarks beispielsweise auf etwa einen Tag geschätzt wird (Liu et al., 2007). Im Vergleich zu anderen myeloischen Zellen verlassen Monozyten das Knochenmark schnell und werden nach ihrer letzten Teilung rasch in den Blutkreislauf freigesetzt (Teh, Ding, Ng, & Chong, 2019). Dies unterstützt die Annahme, dass vor allem die Monozyten im Blut als transientes Reservoir fungieren, um die kontinuierliche Neubesiedlung von peripheren Gewebe mit Makrophagen und dendritischen Zellen zu ermöglichen (Yona & Jung, 2010).

Neben den im Blut zirkulierenden und patrouillierenden Monozyten gibt es in der Milz undifferenzierte Monozyten, die zahlenmäßig ihren Pendanten im Blutkreislauf überlegen sind (Swirski et al., 2009). Swirski et al. konnten zudem zeigen, dass als Reaktion auf einen MI die in der Milz befindlichen Monozyten ihre Mobilität erhöhen und die Milz in Massen verlassen.

1.3 Antiinflammatorische Therapie

1.3.1 Wundheilungsphasen nach MI

Parallel zu den beschriebenen Prozessen, die sich auf pathologischer Ebene nach einem MI im Herzen abspielen, lassen sich drei funktionelle, sich überschneidende, Phasen definieren. Die Phasen lassen sich wie folgt betiteln: die Entzündungsphase, die proliferative Phase und die Reifungsphase (Peet et al., 2020). Während der Entzündungsphase führt die Aktivierung von Chemokin- und Zytokinkaskaden zur

Rekrutierung von Leukozyten in das Infarktgebiet (M. Nahrendorf et al., 2010; Sager, Kessler, & Schunkert, 2017). Neutrophile Granulozyten und inflammatorische Makrophagen säubern durch proteolytische Enzyme und Phagozytose das Infarktareal von nekrotischen Zellen, Debris und Matrixbestandteilen (Sager et al., 2016). Durch Makrophagen werden jedoch auch Zytokine und Wachstumsfaktoren freigesetzt, welche zur Ausbildung von Granulationsgewebe führen. Sobald pro-reparative Makrophagen in ihrer Wirkung überwiegen, spricht man von der reparativen Phase. Durch ihre pro-angiogenen und pro-fibrogenen Eigenschaften wird die Blutzufuhr für das entstehende Granulationsgewebe ermöglicht und die Basis für eine kollagenreiche Narbe geschaffen (Sager et al., 2017). Während der proliferativen Phase produzieren aktivierte Myofibroblasten extrazelluläre Matrixproteine, wodurch im betroffenen Areal und an den Randzonen ein ausgedehntes mikrovaskuläres Netz gebildet wird (Hulsmans, Sam, & Nahrendorf, 2016). Darauf folgend kommt es zur Reifung der Narbe, weshalb die letzte Phase Reifungsphase genannt wird. In dieser Phase werden Fibroblasten und Gefäßzellen apoptotisch und es verbleibt eine Narbe auf Kollagenbasis (Frangogiannis, 2006).

1.3.2 Zellulärer Ablauf der inflammatorischen Phase

Wie bereits angedeutet lassen sich die einzelnen Heilungsphasen nach MI anhand der dominierenden Zellsubtypen voneinander abgrenzen. Die sich unmittelbar an den MI anschließende entzündliche Phase wird hauptsächlich durch die Infiltration von Neutrophilen und inflammatorischen Monozyten/Makrophagen getragen. Infiltrierende Monozyten weisen zunächst einen klassisch-inflammatorischen beziehungsweise Ly6C^{high}-Phänotyp auf, später einwandernde Monozyten besitzen einen reparativen (proangiogen/-fibrotischen) Phänotyp (Matthias Nahrendorf & Swirski, 2013; Yan et al., 2013). Analog zu den beschriebenen Veränderungen der Monozyten lässt sich auch eine Veränderung der Makrophagen beobachten. Das Modell der strikt vom inflammatorischen M1 Phänotyp zum reparativen M2 Phänotyp wechselnden Makrophagen ist mittlerweile überholt. Trotzdem besteht Konsens darüber, dass ein gradueller Wechsel der Makrophagen von pro-inflammatorisch in Richtung pro-reparativ mittels heterogener Subtypen eine Schlüsselrolle bei der Beendigung des Entzündungsprozesses spielt. Ebenso wichtig, um die Inflammation

zu terminieren, scheint die Apoptose der infiltrierenden Neutrophilen zu sein (Peet et al., 2020; Seropian, Toldo, Van Tassell, & Abbate, 2014).

Verschiedene Arbeitsgruppen haben in den letzten 30 Jahren die Rolle und den Beitrag von Leukozyten-Subpopulationen an der Gewebsheilung mittels umfangreicher experimenteller Arbeiten untersucht (Saxena, Russo, & Frangogiannis, 2016). Dabei gingen mehrere potenzielle Angriffspunkte und Stellschrauben hervor, an denen neue Therapien ansetzen könnten, um die Schädigung der Kardiomyozyten während der inflammatorischen Phase zu mindern sowie einem ungünstigen Umbau des Ventrikels entgegenzuwirken (Ong et al., 2018).

Unglücklicherweise sind die Versuche, die vielversprechenden experimentellen Ergebnisse in klinische Therapien zu übertragen, bisher weitestgehend gescheitert beziehungsweise nicht im erwarteten Umfang erfolgreich gewesen (Lecour et al., 2014; Ong et al., 2018). Besonders deutlich zeigt sich, dass das reine Verständnis davon, dass die Inflammation nach MI auch vitales Herzgewebe schädigt, nicht ausreicht, um suffiziente Therapien zu entwickeln. So blieb beispielweise eine generelle Suppression der entzündlichen Prozesse durch Colchizin nach MI ohne Erfolg (Mewton et al., 2021). Erfolgsversprechender sind Therapien, die gezielt auf selektive Ziele Einfluss nehmen, wie beispielweise die Hemmung des Komplementfaktors 5 mittels Pexelizumab (Parviz et al., 2019). Dennoch wurde aus den Forschungsergebnissen der letzten Jahrzehnte deutlich, dass, aufgrund ihrer Beteiligung an Verletzungs-, Reparations- und Regenerationsreaktionen, Entzündungszellen den Schlüssel für die Entwicklung neuer Therapien bei Myokardinfarkten darstellen könnten (Andreadou et al., 2019; Saxena et al., 2016).

1.4 Zielsetzung

Obwohl es überzeugende Beweise für eine Schlüsselrolle des angeborenen Immunsystems bei den nach einem MI ablaufenden Prozessen, die zu einer chronischen Herzinsuffizienz führen, gibt, werden neue Therapeutika und Strategien nur langsam entwickelt (Peet et al., 2020). Es besteht also dringender Handlungsbedarf darin, die Lücke zwischen den aktuellen Erkenntnissen und den therapeutischen Strategien zu schließen, um das Potential einer durch Therapeutika verbesserten Heilung auszureizen (Peet et al., 2020; Saxena et al., 2016). Wegweisend

ist in diesem Zusammenhang beispielsweise die Canakinumab Anti-Inflammatory Thrombosis Outcome Studie (Ridker et al., 2017), in der gezeigt werden konnte, dass durch selektive und gezielte Einflussnahme in das entzündliche Gesamtgeschehen nach einem Myokardinfarkt die Rate an erneuten Myokardinfarkten signifikant gesenkt werden konnte. Diese Ergebnisse motivieren dazu, nach Strategien zu suchen, um ähnliche Resultate für die Rate an chronischen Herzinsuffizienzen nach MI zu erzielen. Ziel dieser Doktorarbeit ist es, deskriptive Informationen darüber zu liefern, welche Zellen der angeborenen Immunität zu welchem Zeitpunkt an der Antwort nach einem Myokardinfarkt beteiligt sind. Um diese Art an Information bereitzustellen, wurden die verschiedenen Kompartimente des angeborenen Immunsystems im zeitlichen Verlauf nach MI untersucht. Als entscheidende Organe wurden durch umfangreiche Literaturrecherche das Knochenmark in seiner Funktion als Produktionsstätte und Speicherorgan der Immunzellen, das Blut als Transport- und Speicherorgan und die Milz, die ebenso an der Produktion und Speicherung der Immunzellen beteiligt ist, identifiziert (Hulsmans et al., 2016; Peet et al., 2020). Alle drei Organe sind durch Ihre Funktion an der raschen Bereitstellung der verschiedenen Zellen nach MI und somit an der Regulierung der Entzündung beteiligt (Swirski et al., 2009).

Um den Zellgehalt in den verschiedenen Organen nach MI zu untersuchen, wurde an 80 Mäusen anhand eines kardialen Ischämie-Modells ein künstlicher Herzinfarkt gesetzt. Anschließend wurde den Versuchstieren nach zuvor festgelegten Zeitintervallen Herz, Milz, Knochenmark und Blut entnommen und mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Perspektivisch sollen die Ergebnisse dieser Arbeit anderen Forschern ermöglichen, zu untersuchen, wie die Homöostase der Immunzellen nach Myokardinfarkt die Qualität der Wundheilung beeinflusst.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Hauptsitz	Katalognummer
Gibco™ PBS (10X), pH 7.4	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA	70011044
RBC-Lyse-Puffer (10X)	BioLegend	San Diego, CA, USA	420301
Rinderserum-Albumin (BSA) Pulver	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA	A2153
Trypanblau Lösung, 0,4 %	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA	93595
Kollagenase Typ I Clostridium histolyticum	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA	C0130-1G
Kollagenase Typ XI Clostridium histolyticum	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA	C7657-500MG
Hyaluronidase bovine testes	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA	H3506-500MG
DNase I	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA	18068015
NaCl 0,9%	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA	7647-14-5
Gibco HEPES-Puffer 1M	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA	15630106

2.1.2 Lösungen und Puffer

1X PBS (phosphatgepufferte Salzlösung):

Endkonzentration von 1 mM KH_2PO_4 , 0.16 M NaCl, 2.97 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 7.4
bei Raumtemperatur

100 ml 10X Gibco™ PBS (Thermo Fisher Scientific)

ad 1000 ml Millipore® Wasser

Lagerung bei Raumtemperatur

FACS-Puffer:

Endkonzentration von 0,5 % BSA

2,5 g BSA (Sigma-Aldrich)

2 ml EDTA- Na_2 (Sigma-Aldrich)

ad 500 ml 1X Gibco™ D-PBS (Thermo Fisher Scientific)

Lagerung bei 4 °C

1X RBC-Lyse-Puffer:

1 ml 10X RBC-Lyse-Puffer (BioLegend)

ad 9ml dH_2O

Lagerung bei Raumtemperatur

Verdaumix-Myokard:

Kollagenase I 450 U/ml

Kollagenase XI 125 U/ml

Hyaluronidase 60 U/ml

DNAse I 60 U/ml

20 ml Hapes-Buffer

Ad 916ml 1X PBS

Lagerung bei -18 °C

2.1.3 Antikörper

Tabelle 2: In der Durchflusszytometrie verwendete monoklonale Primärantikörper

Antikörper	Klon	Hersteller	Hauptsitz	Katalognummer	Farbstoff
anti-mouse B220	RA3-6B2	BioLegend	San Diego, CA, USA	103208	PE
anti-mouse CD115 (CSF-1R)	AFS98	BioLegend	San Diego, CA, USA	135515	Brilliant Violet 711™
anti-mouse CD45.2	104	BioLegend	San Diego, CA, USA	109828	PerCP/Cy5.5

anti-mouse CD49b	DX5	BioLegend	San Diego, CA, USA	108904	PE
anti-mouse CD90.2	53.2.1	BioLegend	San Diego, CA, USA	140314	PE
anti-mouse/human CD11b	M1/70	BioLegend	San Diego, CA, USA	101226	APC/Cy7
anti-mouse I-A/I-E (MHCII)	M5/114.15.2	BioLegend	San Diego, CA, USA	107632	Brilliant Violet 421™
anti-mouse Ly-6C	HK1.4	BioLegend	San Diego, CA, USA	128006	FITC
anti-mouse Ly6G	1A8	BioLegend	San Diego, CA, USA	127604	PE
anti-mouse NK1.1	PK136	BioLegend	San Diego, CA, USA	108708	PE
anti-mouse Ter119	TER-119	BioLegend	San Diego, CA, USA	118208	PE

Tabelle 3: In der Durchflusszytometrie verwendete Beads

Beads		Hersteller	Hauptsitz	Katalognummer
BD FACSDiva™	CS&T	Becton	Franklin	655051
Research Beads		Dickinson	Lakes, NJ, USA	
OneComp™	eBeads	Thermo	Waltham, MA, USA	01-1111-42
Kompensationsbeads		Fisher Scientific		

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller	Hauptsitz	Katalognummer
Eppendorf Safe-Lock Tubes	Eppendorf	Hamburg, Deutschland	0030120086
Falcon® Durchflusszytometerröhrchen	Corning	Corning, NY, USA	352002
Falcon® konische Zentrifugenröhrchen	Corning	Corning, NY, USA	352099 352070
Pre-Separation Filters (30 µm)	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland	130-041-407
BD FACS™ Clean Solution	Becton Dickinson	Franklin Lakes, NJ, USA	340345
BD FACS™ Rinse Solution	Becton Dickinson	Franklin Lakes, NJ, USA	340346

2.1.5 Versuchstiere

In allen Versuchen wurden acht Wochen alte, weibliche C57Bl/6J Mäuse, bereitgestellt durch Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland, verwendet. Die Mäuse wurden in Makrolon® Käfigen der Kategorie III H gehalten und mit ssniff® Standardfutter gefüttert. Vor Beginn der Tierversuche wurde ein Antrag auf Genehmigung des Vorhabens bei der Regierung von Oberbayern gestellt, der unter dem Aktenzeichen 17-179 genehmigt wurde.

In die Experimentalgruppe wurde diejenigen Versuchstiere aufgenommen, welche zuvor eine LAD-Ligatur erhalten hatten. Es wurden nur die Tiere in die Analyse eingeschlossen, die bis zum Zeitpunkt der geplanten Organentnahme nicht verstorben waren. Als Kontrollgruppe dienten genetische identische Mäuse im gleichen Alter.

2.1.6 Laborgeräte

Tabelle 5: Verwendete Laborgeräte

Laborgerät	Typ	Hersteller	Hauptsitz
Durchflusszytometer	LSRFortessa™	Becton Dickinson	Franklin Lakes, NJ, USA
Neubauer	Neubauer	Paul	Lauda
Zählkammer	improved ZK06	Marienfeld GmbH & Co. KG	Königshofen, Deutschland
Zentrifuge	Heraeus® Megafuge® 2.0 R	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Laborschüttler	Vortex- Genie® 2 Mixer	Sigma- Aldrich	St. Louis, MO, USA

2.1.7 Software

Tabelle 6: Verwendete Software und deren Anwendung

Entwickler	Software	Anwendung	Entwicklersitz
Becton Dickinson	FlowJo™ Version 8 für macOS	Datenauswertung Durchflusszytometrie	Franklin Lakes, NJ, USA
Becton Dickinson	BD FACSDiva™ Version 9	Messung Durchflusszytometrie	Franklin Lakes, NJ, USA
GraphPad Software	GraphPad Prism® Version 8 für macOS	Statistische Datenauswertung	San Diego, CA, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Tierhaltung

Die Tierhaltung der Bestandstiere erfolgte in IVC-Käfigen (individually ventilated cage). Die Außenbedingungen der Mäuse wurde bei einer Temperatur von 24°C und einem automatischen Lichtregime im 12 Stunden Rhythmus konstant gehalten. Die Luftfeuchtigkeit wurde um die 55% aufrechterhalten. Die Tiere hatten freien Zugang zu Futter und Wasser und wurden in Gruppen bis zu 4 Tieren gehalten. Bei den Käfigen handelte es sich um IVC-Käfige vom Makrolon-Typ III (800cm²). Als Enrichment waren neben Holzschneitzelstreu und Unterschlupfhäusschen auch Zellstoff, Nestlets und Holzwolle den Käfigen beigefügt.

Nach der LAD-Ligatur wurden die Tiere in einem Ventilated Cabinet gehalten, um eine optimale postoperative Versorgung zu gewährleisten. Die Käfige im Ventilated Cabinet waren mindestens 335cm² groß und ausgestattet mit Häuschen und Beschäftigungsmaterial. Es bestand freier Zugang zu Futter und Wasser. Das Ventilated Cabinet war mit einem automatischen Lichtregime im 12 Stunden Rhythmus ausgestattet. Zur Überwachung der Temperatur und Luftfeuchte wurde ein mobiler Datenlogger verwendet, der einmal stündlich alle Parameter maß und 1x wöchentlich ausgelesen wurde. Die Tiere der Kontrollgruppe waren unter den gleichen Haltungsbedingungen untergebracht.

2.2.2 Kardiales Ischämiemodell

Um die systemischen Auswirkungen einer kardialen Ischämie, wie sie bei einem Myokardinfarkt vorliegt, zu untersuchen, wurde ein permanentes LAD-Ligaturmodell verwendet. LAD steht hierbei für left anterior descending artery, eines der Hauptversorgungsgefäße des Herzens. Der Vorteil des permanenten LAD-Ligaturmodells liegt in der maximalen Ausprägung der Ischämie und der damit einhergehenden deutlichen systemischen Reaktion (Frangogiannis, 2014a). Durch die hohe Expertise des Operateurs konnte eine, verhältnismäßig, atraumatische Operation, verbunden mit einer hohen postoperativen Überlebensrate sichergestellt werden.

2.2.3 Narkose

Sämtliche chirurgische Eingriffe wurden in Vollnarkose durchgeführt. Die Narkose erfolgte durch eine intraperitoneale (i.p.) Injektion (manuelle Fixation von Nackenfell und Schwanz) von Midazolam (5 mg/kg Körpergewicht (KG)), Medetomidin (0,5 mg/kg KG) und Fentanyl (0,05 mg/kg KG) (MMF-Narkose) mittels einer 30 Gauge Kanüle. Zusätzlich erhielten die Tiere 20 min vor Narkoseende und für die anschließenden 72 h postoperativ in einem 8-Stundenintervall 0,1 mg/kg KG subcutan (s.c.) Buprenorphin. Während der Narkose wurde Dexpanthenolsalbe auf die Augen gegeben, um ein Austrocknen zu verhindern. Durch Reflexprüfung (Zwischenzehenreflex, Schwanzreflex und Ohrreflex) wurde eine ausreichende Narkosetiefe bzw. chirurgische Toleranz sichergestellt. Bei Bedarf wurde ein Drittel der Narkoseausgangsdosis i.p. nachinjiziert.

2.2.4 Intubation und Beatmung

Nach Wirkungseintritt der Narkose (Reflexprüfung, siehe oben) wurde die Maus in Rückenlage auf eine selbstregulierende Wärmeplatte verbracht und die Extremitäten des Versuchstieres mit Klebestreifen auf dieser fixiert. Mit Hilfe eines peranal platzierten Temperaturmessers wurde eine konstante Körpertemperatur von 37°C (+/- 0,2°C) bis zur Extubation gewährleistet. Zunächst wurde der Oberkiefer hinter den beiden Schneidezähnen mit einem um die Wärmeplatte gespannten Gummiband retendiert. Zur sicheren trachealen Intubation und der Verhinderung einer ösophagealen Fehlintubation wurde die Halshaut auf einer Länge von etwa 0,5 cm longitudinal in der Medianebene über der Trachea mit Hilfe einer Schere eröffnet. Der Verlauf des Kehlkopfes und der Trachea wurden durch stumpfe Präparation des darüber liegenden Weichteilgewebes, bei dem es sich im Wesentlichen um Speicheldrüsengewebe handelt, dargestellt. Nachfolgend wurde der Unterkiefer angehoben, unter unbedingter Schonung der Zunge, und die Trachea unter Sicht mit einer stumpfen Metallkanüle (1.1 mm Außendurchmesser, Hugo Sachs Elektronik) intubiert. Die korrekte Lage des Tubus wurde durch die transparente Trachealwand kontrolliert und ein Heben und Senken des Thorax sowie eine suffiziente

Sauerstoffversorgung der Maus validiert. Das kraniale Ende der Kanüle war über einen Gummischlauch mit einem volumengesteuerten Beatmungsgerät (Minivent 845; HugoSachs Elektronik) verbunden. Die Tiere wurden mit einem Volumen von etwa 200 µl und einer Frequenz von 150 Zügen pro Minute beatmet. Von Beginn der Beatmung an wurde der Frischluft über den Inspirationsschenkel 100%-iger Sauerstoff beigemischt. Nach erfolgreicher Intubation wurden Tubus und Beatmungsschläuche sorgfältig mittels Klebestreifen fixiert. Abschließend wurde der zervikale Hautschnitt über der Trachea mittels fortlaufender Naht der Fadenstärke 5-0 verschlossen.

2.2.5 LAD Ligatur zur Induktion eines Myokardinfarktes

Zunächst wurde Enthaarungscreme über dem Operationsgebiet aufgetragen. Nach ausreichender Einwirkzeit wurden alle Haare sowie Reste der Enthaarungscreme über der Stelle der linksanterolateralen Thorakotomie rückstandlos entfernt. Es erfolgte zudem eine zweimalige Hautdesinfektion mit 70%-igem Ethanol sowie Povidon-Jod. Die Haut wurde linksanterolateral bogenförmig, parallel zum Verlauf der Rippen des linksseitigen, dritten Interkostalraumes auf einer Länge von etwa 10 mm eröffnet. Anschließend wurden die darunter liegenden Muskelschichten, namentlich M. pectorales major und minor, durchtrennt. Ventrale Anteile des M. latissimus dorsi und des M. serratus ventralis wurden lateral ebenfalls durchtrennt und die Rippen freigelegt. Für eine bessere Übersicht und um nach Abschluss der Operation eine gute Adaption der im Verlauf der OP retrahierenden kutanen Schnittträger zu ermöglichen, wurden diese stumpf mit Hilfe zweier Pinzetten nach kaudal und kranial hin mobilisiert. Der Thorax wurde durch vorsichtige Durchtrennung der Interkostalmuskulatur unter Schonung der medialseitig, parasternal verlaufenden A. mammaria interna mit Hilfe einer Mikroschere eröffnet. Daraufhin bestand eine weitestgehend freie Aufsicht auf die Vorderwand des Herzens. Durch Umstechen der jeweils kaudal und kranial des eröffneten Interkostalraumes liegenden Rippenbogens mit einem geflochtenen Ethibond-Faden der Stärke 5-0 und anschließendem Aufspreizen, wurde die Exposition des Herzens für die anschließende Ligation optimiert. Die jeweiligen Enden der Haltnähte wurden mittels Klebestreifen unter Zug nach seitlich kaudal und kranial

hin fixiert und justiert. Zunächst wurde das transparente Perikard unter Schonung der lateral liegenden Lunge eröffnet. Nach Identifikation der LAD, die zwischen der kaudalen Spitze des linken Vorhofes und des Apex liegt, erfolgte die Umstechung der LAD auf Höhe des ersten Drittels der Strecke zwischen kaudaler Spitze des linken Atriums und Apex mit einem nicht resorbierbaren Prolene-Faden der Stärke 8/0. Bei der Ligation wurde darauf geachtet, dass das Myokard nicht zu oberflächlich, aber auch nicht zu tief durchstoßen wird. Eine Perforation des Cavums war wegen der Möglichkeit fataler Blutungen unbedingt zu vermeiden. Nach sorgfältiger Lagekontrolle des Fadens wurde das Gefäß durch mehrmaliges, vorsichtiges Verknoten abgebunden. Bei korrekter Positionierung der Ligatur zeigte sich unmittelbar danach ein ablassend-ischämisch werdendes Myokardareal im Bereich der Vorderwand, entsprechend dem Versorgungsgebiet des okkludierten Gefäßes. Nach erfolgreicher Ligatur wurden die Haltenähte zum Aufspreizen des Thorax entfernt. Anschließend erfolgte ein schichtweiser Wundverschluss. Die Thoraxhöhle wurde durch Adaption von Interkostalmuskulatur und M. pectoralis minor und Anbringen zweier Einzelknopfnähte mit Hilfe eines geflochtenen, nicht-resorbierbarem Ethibond-Faden der Stärke 5-0 verschlossen. Der M. pectoralis major wurde mit zwei Einzelknopfnähten gleichen Fadenmaterials adaptiert. Abschließend wurde, ebenfalls mit gleichem Fadenmaterial die Haut in fortlaufend überwendlicher Technik verschlossen.

2.2.6 Postoperative Versorgung

Die Mäuse verblieben auf der selbstregulierenden Wärmeplatte am Ventilator (siehe oben) bis die Antagonisierung der Narkose durch s.c. Injektion von Atipamezol (2,5mg/kg KG) und Flumazenil (0,5 mg/kg KG) ausreichend war. Nach Einsetzen der Schutzreflexe wurde die Maus schnellstmöglich extubiert, von der Beatmung genommen und in einen mit Zellstoff ausgelegten Makrolonkäfig TypIII gelegt. Zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur wurde der Käfig auf einer Wärmematte (thermostatgesteuertes Heizkissen) positioniert, die unter den Käfig geschoben wurde. Bis zum Einsetzen erster Laufversuche wurde Sauerstoff in die Tierbox insuffliert. Die Gesamtdauer der Operation von der In- bis zur Extubation betrug in etwa 30 Minuten.

Die postoperative Analgesie wurde durch s.c. Buprenorphin-Applikationen gewährleistet. Die Medikamentengabe erfolgte im 8-Stundenintervall für 72 h. Im Weiteren wurde Buprenorphin bei Bedarf verabreicht. Die postoperative Haltung der Tiere erfolgte in Kleingruppen. Die Einzelkäfige standen zur optimalen Beobachtung in einem Ventilated Cabinet innerhalb des Labors. Es wurden angefeuchtete Futterpellets in den Käfig gelegt und Schalen mit Wasser in den Käfig gestellt, um den Tieren in den ersten postoperativen Tagen den Zugang zu Nahrung und Wasser zu erleichtern. In den ersten 72 h post op. wurden die Tiere dreimal täglich kontrolliert und beurteilt.

2.2.7 Organentnahme

Für die Organentnahme wurden die Versuchstiere nach 12 h, 24 h, 72 h, 5 d, und 14 d mittels zervikaler Dislokation unter 5%-iger Isoflurannarkose euthanasiert. Nach sichergestelltem Tod wurde das Körpergewicht bestimmt und den Mäusen mit einer Kapillare Blut abgenommen. Als nächster Schritt wurde der Brustkorb mit einer Schere eröffnet um das rechte Atrium mit einem kleinem Schnitt zu perforieren. Dies war notwendig um einen Abfluss für den anschließenden Schritt, in welchem über die linke Herzkammer mit 20ml PBS gespült wurde, zu schaffen. Die Perfusion gewährleistete eine Blutleere der zu untersuchenden Organe, in denen verbliebene Blutzellen zu falschen Auswertungen geführt hätten. Nach dem Spülvorgang wurden Milz, Herz, beide Femur entnommen. Die Milz wurde, nachdem sie von anheftendem Gewebe gesäubert wurde, gewogen. Des weiteren wurde zunächst das Gewicht des vollständigen Herzens bestimmt. Anschließend wurde unter visueller Kontrolle das ischämische Myokard abgesetzt und dieses nochmals getrennt gewogen.

2.2.8 Gewebprozessierung

2.2.8.1 Blut

Das gewonnene Blut wurde in ein Reagenzglas transferiert und ein 10µl Aliquot zur späteren Zellzählung entnommen. Ein Lysereaktion diente zur Elimination der Erythrozyten wurde für 5 min mit 3 ml 1X red blood cell (RBC)-Lyse-Puffer der bei Raumtemperatur durchgeführt. Der 1X RBC-Lyse-Puffer wurde nach

Gebrauchsanweisung des Herstellers vorbereitet. Die Reaktion wurde mit 5 ml PBS-Buffer gestoppt und die Proben für 8 min mit 400 rcf bei 4 Grad Celsius zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand verworfen und das verbliebene Zellpellet in 300 µl FACS-Puffer resuspendiert. Die resultierende Einzelzellsuspension wurde nachfolgend für die Durchflusszytometrie-Färbung verwendet.

2.2.8.2 Milz

Nach der Entnahme wurde die von anheftendem Gewebe gesäuberte Milz mit Hilfe eines Stempels und PBS-Puffer durch einen 40 µm Zellfilter gedrückt. Unter dem Zellfilter war ein 50 ml Reaktionsgefäß platziert, um die Zellsuspension zu sammeln. Um möglichst wenig des zu analysierende, Gewebes in den Poren des Filters zu verlieren, wurde der Filter während des Prozesses mehrmals mit PBS-Puffer gespült. Im Anschluss wurden alle Reaktionsgefäße mit PBS-Puffer auf 40ml aufgefüllt und für 8 min mit 400 rcf bei 4 Grad Celsius zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde der entstandene Überstand abgegossen und das am Boden des Reaktionsgefäß befindliche Zellpellet in 3 ml 1X RBC-Lyse-Puffer resuspendiert. Der RBC-Lyse_Puffer verblieb für 5 min bei Raumtemperatur im Reaktionsgefäß, um alle in der Suspension befindliche Erythrozyten zu lysieren. Nach 5 Minuten wurde die Reaktion durch Hinzugeben von 45 ml PBS-Puffer gestoppt und die Proben erneut für 8 Minuten mit 400 rcf zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet anschließend in 300 µl PBS-Puffer resuspendiert. Es wurde ein 10µl Alliquot zur späteren Zellzählung entnommen und die resultierende Einzelzellsuspension wurde nachfolgend für die Durchflusszytometrie-Färbung verwendet.

2.2.8.3 Knochenmark

Die Femora wurden nach der Entnahme von anheftenden Muskelresten gesäubert und anschließend am distalen und proximalen Ende durchtrennt. Durch das Eröffnen der Knochenenden ist es möglich, den Röhrenknochen mit einer 18G Nadel von beiden Enden mit PBS-Puffer zu spülen und dabei Knochenmark zu lösen. Dazu wurde der Knochen über einem 40 µm Zellfilter platziert, unter dem ein 50 ml Reaktionsgefäß installiert war. Um das Knochenmark möglichst vollständig zu lösen, wurden die Femur jeweils 3-mal mit 3ml von beiden Enden gespült. Das auf dem

Zellfilter befindliche Knochenmark wurde, analog zum Vorgehen bei der Milz, durch abwechselndes Stempeln und Spülen in Suspension gebracht. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß mit PBS-Puffer auf 45 ml aufgefüllt. Die Proben wurden für 8 Minuten mit 400 rcf bei 4 Grad Celsius zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand abgegossen und das verbliebene Zellpellet in 300 µl FACS-Puffer resuspendiert. Es wurde ein 10µl Aliquot zur späteren Zellzählung entnommen und die resultierende Einzelzellsuspension wurde nachfolgend für die Durchflusszytometrie-Färbung verwendet.

2.2.8.4 Herz

Die zuvor abgetrennten ischämischen Bereiche der Herzen wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, in denen 1 ml Lysemischung zum chemischen Verdau vorgelegt war. Damit der enzymatische Verdau effizient ablaufen konnte, wurden die Myokardstücke mit Hilfe von chirurgischen Scheren im Reaktionsgefäß zerkleinert. Im Anschluss wurden die Gefäße für eine Stunde bei 37 Grad Celcius mit 750 Rotationen pro Minute inkubiert. Nach einer Stunde wurden die Proben aus den Reaktionsgefäßen auf 40 µm Zellfilter transferiert. Unter den Zellfiltern waren 50 ml Reaktionsgefäße installiert, um die Zellsuspension zu sammeln. Die 1,5 ml Reaktionsgefäße wurden jeweils zweimal mit 1 ml FACS-Buffer gespült, und das Volumen im Anschluss ebenfalls auf den Zellfilter transferiert. Die Zellen wurden durch repetitierendes Stempeln und Spülen in Suspension gebracht. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß mit PBS-Puffer auf 45 ml aufgefüllt und 8 Minuten mit 400G bei 4 Grad Celsius zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand verworfen und das entstandene Zellpellet in 300 µl FACS-Puffer resuspendiert. Die Lösung wurde nochmals durch Zellfilter pipettiert, um ein späteres Verstopfen des Durchflusszytometers mit großen Zelltrümmern zu verhindern. Außerdem wurden ebenfalls 10µl zur Zellzählung aliquotiert.

2.2.9 Zellzählung

2.2.9.1 Durchführung

Um absolute Zellzahlen ermitteln zu können, wurden Aliquots aus den fertig prozessierten Proben entnommen. Die manuell ermittelten Zahlen konnten nachfolgend zur Quantifizierung der in der Durchflusszytometrie identifizierten Subpopulationen verwendet werden. Die entsprechenden Aliquots wurden vor der Zählung gründlich gemischt, um eine homogene Verteilung der Zellen in der Lösung zu gewährleisten. Anschließend wurden 10 µl auf eine Neubauer-improved Zählkammer aufgetragen. Pro Probe wurden jeweils vier Felder ausgezählt. Mittels folgender Formel konnte somit die durchschnittliche Zellzahl pro ml ausgerechnet werden:

Zellzahl/ml = Mittelwert (der ausgezählten Felder) * Verdünnungsfaktor (siehe Tabelle 7) * 10^4 Zellen/ml.

2.2.9.2 Verdünnungen

Tabelle 7: Verdünnungen der Organproben

Organprobe	Verdünnungsfaktor
Herz	1
Blut	6
Knochenmark	15
Milz	30

2.2.10 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein optisches Messverfahren. Zur Bestimmung der Zusammensetzung der Zellsubpopulationen in den ausgewählten Organen wurde eine differenzierte Zellanalyse der gewonnenen Zellen mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Dazu wurde ein Multi-Farben-Durchflusszytometer der Firma Becton Dickinson verwendet. Beim Gerät handelte es sich um ein LSRFortessa™. Damit die Zellen differenziert werden können ist es notwendig, dass sie einzeln und nacheinander die Detektoren beziehungsweise die Messküvette passieren. Dazu

werden die Zellen in einem laminaren Flüssigkeitsstrom zentriert. In der Messküvette passieren die Zellen orthogonal zur Flussrichtung ausgerichtete Laser mit hoher Geschwindigkeit. Das LSRFortessa verfügt über drei Laser: einen violetten mit der Wellenlänge 405 nm, einen blauen mit der Wellenlänge 488 nm und einen roten mit der Wellenlänge 640 nm. Durch die auf die Zellen ausgerichteten Laser werden die Elektronen der Fluoreszenzfarbstoffe angeregt und auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach passieren des Laserstrahls fallen die Elektronen unter Abgabe von Photonen auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die emittierte Photonenkonzentration (Floureszenzlicht) wird durch einen Photonendetektor gemessen. Das erfasste Fluoreszenzlicht wird über eine Reihe von dichroitischen Spiegeln und Filtern in absteigender Wellenlänge aufgetrennt. Das aufgetrennte Floureszenzlicht wird von Photomultipliern erfasst, welche spektralbereichsspezifisch sind

Jedes gebundene Fluorochrom besitzt ein spezifisches Absorptions- und Emissionsspektrum. Zusätzlich erfasst der Vorwärtsstreulicht Detektor (Forward Scatter Detektor) jenes Licht, dass durch die Zelle in Strahlungsrichtung der Laser abgelenktes wird. Dieses Licht kann als Maß für die relative Größe der gemessenen Zellen dienen. Das an intrazellulären Bestandteilen im 90 °-Winkel abgelenkte Licht wird vom Seitwärtsstreulicht Detektor (Side Scatter Detektor) gemessen und ist somit ein indirektes Maß für die Granularität der Zelle. Durch Markierung der zu messenden Zellen anhand ihrer bekannten Oberflächenmerkmale mittels monoklonaler Antikörper und Konjugation dieser Antikörper mit Fluorochromen ist eine genaue Differenzierung möglich.

Das LSRFortessa™ verfügt über eine parallele Laseranordnung mit separaten optischen Kollektionssystemen für jeden Laser. Dies erlaubt eine simultane Messung von Fluorochromen mit überlappenden Emissionsspektren bei Exzitation durch unterschiedliche Laser (Biosciences; McKinnon, 2018).

2.2.10.1 Antikörper

Zur Immunphänotypisierung der Zellsubtypen wurden zunächst T-Lymphozyten, B-Lymphozyten natürliche Killerzellen, Erythrozyten, Thrombozyten sowie neutrophile Granulozyten mittels monoklonaler Primärantikörper mit dem Farbstoff PE markiert.

Somit konnten Sie als Gruppe in der späteren Auswertung gegen andere Zellen abgegrenzt werden.

Weitere Subtypen wurden durch Antikörper, die jeweils gegen spezifische Antigene (Marker) auf der Zelloberfläche der Zellsubtypen gerichtet waren, markiert. So konnten diese später identifiziert werden. Diese Antikörper waren, um sie differenzieren zu können, alle mit einem individuellen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Alle Marker, die durch den Farbstoff PE markiert wurden, wurden unter dem Begriff Lineage subsumiert.

2.2.10.2 Stainings

Um die verschiedenen Populationen der myeloiden Zellen analysieren und abbilden zu können, wurden die entsprechenden Einzelzellsuspensionen in zwei Färbeschritten markiert. Der erste Schritt diente dazu, nicht-myeloide Zellen mit PE zu markieren. Im zweiten Schritt wurden die Zellen von Interesse spezifisch markiert. Tabelle 8 gibt Auskunft über die mittels Antikörper markierten Antigene und die dadurch identifizierten Subpopulationen.

Tabelle 8: In der Durchflusszytometrie markierte Zelltypen

Zelltyp	Oberflächenantigen
T-Lymphozyten	B220, CD90.2
B-Lymphozyten	DC49b
NK-Zellen	NK1.1
Granulozyten	LY6G
Thrombozyten	CD49b
Erythrozyten	Ter119
Leukozyten	CD45.2
Myeloide Zellen	CD11b
Mononukleäre Phagozyten	MHCII
Monozyten/Makrophagen	CD115
Monozyten/Makrophagen	LY6C

2.2.10.3 Markierung der Oberflächenantigene

2.2.10.3.1 Primärmarkierung:

Im ersten Schritt wurde 1XFACS-Puffer in einem Reaktionsgefäß vorgelegt. Anschließend wurden folgende mit PE fluoreszenzmarkierte Antikörper hinzugegeben:

Tabelle 9: In der Durchflusszytometrie verwendete Antikörper (Primärmarkierung)

Antikörper	Finale Verdünnung
Anti-B220 AK	1:100
Anti-CD49b AK	0,5:100
Anti-CD90.2 AK	0,2:100
Anti-NK1.1 AK	1:100
Anti-Ter119 AK	1:100
Anti-Ly6G AK	1:100

Nach Zugabe der Antikörper wurde die entstandene Lösung mit Hilfe eines Laborschüttlers gemischt. Danach wurden je 50 µl der Antikörpermischung zu den entsprechenden Zellsuspensionen des lysierten Vollbluts (siehe 2.2.8.1) sowie den gewonnenen Zellsuspensionen aus Milz, Knochenmark und Herz (siehe 2.2.8.2, 2.2.8.3 und 2.2.8.4) gegeben. Nach Durchmischung folgte eine 20-minütige Inkubation auf Eis. In dieser Zeit wurden die Proben mit Aluminiumfolie bedeckt. Im Anschluss wurde die Reaktion durch Zugabe von 1000 µl FACS-Puffer gestoppt. Die Zellen wurden bei 300 rcf und 4 °C für 10 min zentrifugiert und die Überstände vorsichtig aspiriert. Die sich am Boden der Reagenzgläser befindlichen Zellpellets wurden gelöst und in je 300 µl FACS-Puffer resuspendiert.

2.2.10.3.2 Sekundärmarkierung

Im zweiten Färbeschritt wurde pro Probe 48 µl FACS-Puffer in einem Reaktionsgefäß vorgelegt und die nachfolgend gelisteten Antikörper hinzugefügt.

Tabelle 10: In der Durchflusszytometrie verwendete Antikörper (Sekundärmarkierung)

Antikörper	Menge	Markierung
Anti-MHCII AK	0,5 µl	BV421
Anti-Ly6C AK	0,5 µl	FITC
Anti-CD45.2 AK	0,5 µl	PerCP-Cy 5.5
Anti-CD11b AK	0,5 µl	APC-Cy7
Anti-CD115 AK	0,5 µl	BV711

Die Inkubation mit dem zweiten Antikörpermix erfolgte wie bei der Primärmarkierung beschrieben.

2.2.10.4 Kompensation

Bei der vorliegenden durchflusszytometrischen Bestimmung handelt es sich um eine Mehrfarbenmessung. Die Exzitation erfolgte simultan und räumlich getrennt durch den violetten, blauen und roten Laser. Die Fluorochrome wurden so kombiniert, dass durch die separaten optischen Kollektionssysteme sowie die Longpass-Spiegel und Bandpass-Filter das Emissionslicht jedes Fluorochroms weitestgehend nur durch einen Photomultiplier detektiert wurde.

2.2.10.4.1 Kompensationsmessung

In speziellen Reaktionsgefäßen für die Durchflusszytometrie wurden für jedes Fluorochrom 300 µl FACS-Puffer vorgelegt. Nach Zugabe von je 20 µl Kompensationsbeads wurde je 1 µl des entsprechenden fluoreszenzmarkierten Antikörpers hinzugegeben. Nach Durchmischen mittels Laborschüttler schloss sich eine 15-minütige Inkubation auf Eis unter Aluminiumfolie an. Im Anschluss wurden je 1000 µl FACS-Puffer zu den Proben gegeben, welche anschließend bei 400 G und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert wurden. Die Überstände wurden vorsichtig aspiriert und die Pellets in je 600 µl FACS-Puffer resuspendiert. Mittels Kompensationsmessung konnte so die Überlappungen der Emissionsspektren der einzelnen Fluorochrome (Spillover) herausgerechnet werden. Dadurch wurde sichergestellt, dass Signale eines Farbstoffs nicht fälschlicherweise einem anderen Spektrum zugeordnet wurden.

2.2.10.5 Auswertung

Die Messung der Proben am Durchflusszytometer erfolgte direkt im Anschluss an die Markierung der Oberflächenantigene. Die Daten wurden exportiert und mit Hilfe der Software FlowJo™ von Becton Dickinson ausgewertet. Zur Auswertung wurden die Messergebnisse der Durchflusszytometrie in zweidimensionalen Streudiagrammen betrachtet und die prozentualen Anteile der jeweiligen Zellsubpopulationen analysiert. Zur späteren statistischen Auswertung wurden die manuell bestimmten, absoluten Zellzahlen herangezogen und mit den entsprechenden prozentualen Werten

verrechnet. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die so errechneten Werte anschließend auf Gewicht/Volumen des entnommenen Organs relativiert. Abschließend wurden die Werte der Experimentalgruppen in Relation zu den Kontrollgruppen gesetzt.

Zur Analyse der Subpopulationen wurden alle gemessenen Werte in einem Punktwolkendiagramm aufgetragen. Jeder Datenpunkt entsprach dabei einer Zelle. Mittels des Vorwärtsstreulicht Detektors (FSD, Werte relativ zur Größe der gemessenen Zellen) sowie des Seitwärtsstreulicht Detektors (SSD, Werte relativ zur Granularität der gemessenen Zellen) konnten die Zellen primär unterschieden und geclustert werden. Ein Cluster ist dabei eine Gruppe von Zellen, die sich aufgrund ähnlich ausgeprägter Intensität des gemessenen Werts in derselben Region des Diagramms darstellen.

Zur präziseren und differenzierteren Analyse der einzelnen Subpopulationen wurden anschließend die verschiedenen Marker, die mit individuellen Fluoreszenzfarbstoffen markiert waren, genutzt. Dazu diente das Prinzip, dass die emittierte Photonenkonzentration, die durch den Detektor registriert wird, sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern pro Zelle verhält. Je höher die gemessene Fluoreszenzintensität desto mehr Marker befanden sich auf der Oberfläche der Zelle. Durch dieses Prinzip wurde eine quantitative Bestimmung der Marker pro Zelle möglich. Die Auflösung der Daten konnte erhöht werden, indem sie mittels Gating weiter analysiert wurden. Gating bezeichnet das Prinzip, dass um eine Teilgesamtheit ein Fenster gezogen wird. Die Menge der sich in dem Fenster befindlichen Datenpunkte (Zellen) wird somit zur weiteren Auswertung ausgewählt. Die Auflösung wird dadurch erhöht, dass die ausgewählten Subpopulationen im nächsten Diagramm gegen neue Marker aufgetragen werden. Dieses Vorgehen wurde konsekutiv wiederholt, um einzelne Subpopulationen zu identifizieren und eine Aussage über die Zusammensetzung dieser in Bezug auf alle Messpunkte (Zellen) treffen zu können.

2.2.10.6 Gating/Identifikation von Immunzell-Subtypen

Durch folgende Schritte wurden die Subpopulationen innerhalb der Organe in ihrer relativen Zusammensetzung ermittelt.

2.2.10.6.1 Knochenmark, Blut, Milz

1. Alle detektierten Ereignisse wurden in einem zweidimensionalen Punktwolkendiagramm gegeneinander aufgetragen. Dabei wurde nach Vorwärtsstreulichtdetektor gegen Seitwärtsstreulichtdetektor selektiert. Durch diese zwei Kriterien konnten die Datenpunkte anhand Ihrer Größe und Granularität auftrennen werden. Somit ließen sich Zelltrümmer und intakte Zellen voneinander trennen. (Dargestellt in Abb.1). Es wurde daraufhin ein Fenster um alle lebenden Zellen gezogen.

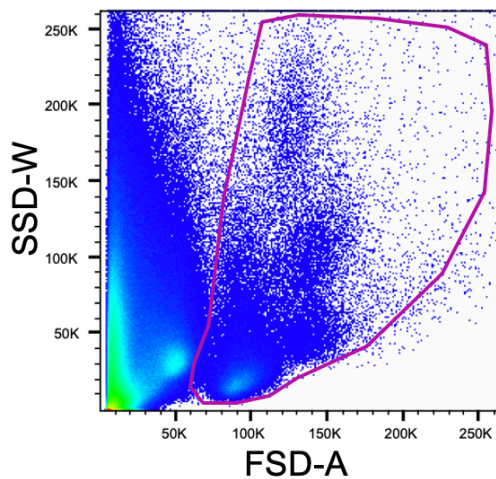


Abbildung 1: Differenzierung leukozytärer Subpopulationen (SSD-W/FSD-A)

Exemplarisches Streudiagramm aus prozessierter und fluoreszenzmarkierter Organprobe. Differenzierung aller durchflusszytometrisch erfasster Ereignisse anhand ihrer Größe (FSD = Vorwärtsstreulicht) und Granularität (SSD = Seitwärtsstreulicht). Es lassen sich somit vitale Zellen und Zelltrümmer voneinander abgrenzen. Erstellt aus einer Organprobe der Experimentalgruppe mit der Software FlowJo™.

2. In diesem Schritt wurden nur noch Zellen betrachtet, die innerhalb des Fensters lagen, das im vorherigen Schritt erstellt wurde. Als nächstes wurde FSD-A (Area) gegen FSD-W (Width) und anschließend SSD-A gegen SSD-W aufgetragen. Durch diese Schritte konnten Doublets (aneinanderheftenden Zellen) ausgeschlossen werden. Area und Width sind zwei Werte die sich aus dem Spannungsimpuls pro Zellen, den das Zytometer erfasst berechnen lassen. Diese Werte erhöhen sich, wenn statt einer Zelle ein Zell-Doublet durch die Messküvette fließt.

Die in den Fenstern integrierten Zellen wurden im nächsten Schritt weiter separiert.

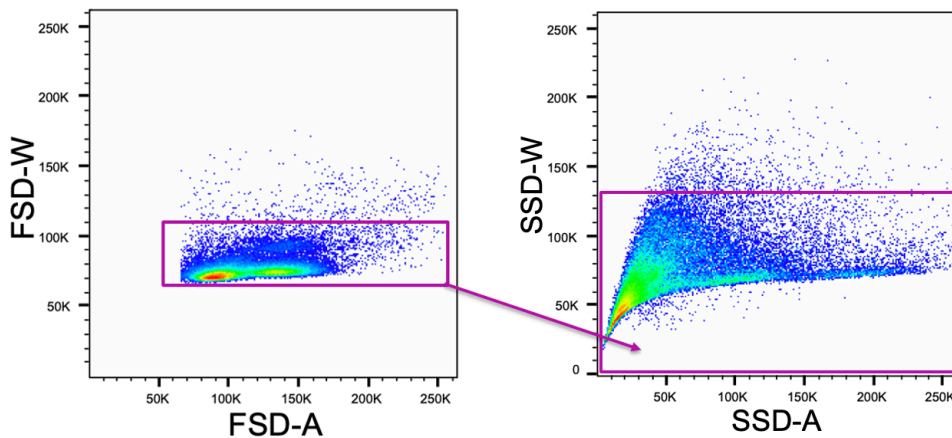


Abbildung 2: Differenzierung leukozytärer Subpopulationen (FSD-W/FSD-A, SSD-W/SSD-A)
 Exemplarisches Streudiagramm aus prozessierter und fluoreszenzmarkierter Organprobe. Differenzierung der in Abb.2 im Fenster eingeschlossenen Zellen anhand ihrer Werte für FSD-W/A (FSD = Vorwärtsstreulicht) und SSD-W/A (SSD = Seitwärtsstreulicht). Erstellt aus einer Organprobe der Experimentalgruppe mit der Software FlowJo™.

3. Ziel dieses Schrittes war es, alle autofluoreszierenden Partikel zu eliminieren. Dazu wurde der Seitwärtsstreulichtdetektor gegen einen Autofluoreszenz-Kanal (Kanal, für den kein Fluoreszenz-markierter Antikörper in der vorangehenden Färbung verwendet wurde) aufgetragen.

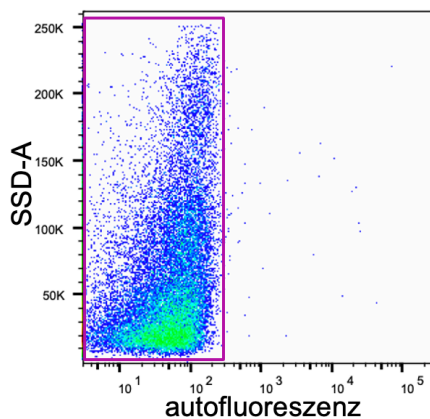


Abbildung 3: Differenzierung leukozytärer Subpopulationen (SSD-A/autofluoreszenz)

Exemplarisches Streudiagramm aus prozessierter und fluoreszenzmarkierter Organprobe. Differenzierung der in Abb.3 im Fenster eingeschlossenen Zellen anhand ihrer Werte für SSD-A (SSD = Seitwärtsstreulicht) und autofluoreszenz. Erstellt aus einer Organprobe der Experimentalgruppe mit der Software FlowJo™.

4. In diesem Schritt wurde der Seitwärtsstreulichtdetektor gegen CD45.2 aufgetragen. Somit konnte die Gruppe der Leukozyten von allen anderen Zellen getrennt werden. Es wurde eine Auswahl um die Gesamtheit der Leukozyten gezogen. (Abb.3) Somit wurden in allen weiteren Schritten ausschließlich leukozytäre Zellen analysiert.

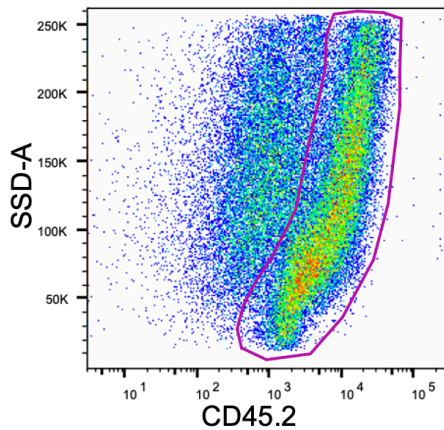


Abbildung 4: Differenzierung leukozytärer Subpopulationen (SSD-A/CD45.2)
Exemplarisches Streudiagramm aus prozessierter und fluoreszenzmarkierter Organprobe. Differenzierung der in Abb. 4 im Fenster eingeschlossenen Zellen anhand der Expression von CD45.2 (Leukozyten). Erstellt aus einer Organprobe der Experimentalgruppe mit der Software FlowJo™.

5. In nachfolgenden Diagramm wurde Lineage gegen CD11b aufgetragen. Somit konnte alle zuvor mittels PE markierten Zellen von den myeloiden Zellen getrennt werden. In der Gruppe der myeloiden Zellen erschreinen neutrophile Granulozyten sowohl CD11b als auch PE positiv (Abbildung 5). Alle anderen myeloiden Zellen sind nur CD11b positiv.

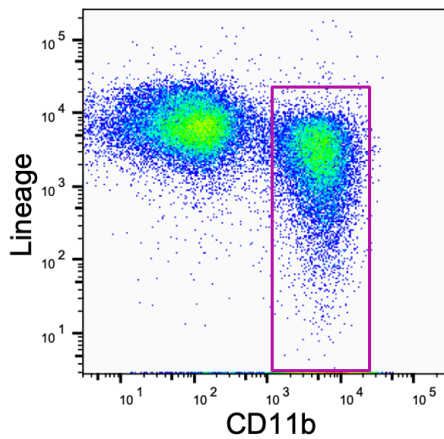


Abbildung 5: Differenzierung leukozytärer Subpopulationen (Lineage/CD11b)

Exemplarisches Streudiagramm aus prozessierter und fluoreszenzmarkierter Organprobe. Differenzierung der in Abb. 5 im Fenster eingeschlossenen Zellen anhand der Expression von CD11b (neutrophile Granulozyten, Monozyten, Makrophagen) und „Lineage“ = einfarbig mit PE gefärbte Zellen (T-, B-, NK-Zellen, Granulozyten). Erstellt aus einer Organprobe der Experimentalgruppe mit der Software FlowJo™. Es wurde ein Fenster um alle CD11b positiven Zellen gezogen, um diese Selektion zu markieren und im nächsten Fenster weiter zu separieren.

6. Der nächste Schritt bestand darin, CD115 gegen Ly6C aufzutragen. Dadurch konnte man drei Zellgruppen voneinander trennen: Ly6C- und CD115- positive Zellen ($\text{Ly6C}^{\text{high}}$ Monozyten), Ly6C- negative aber CD115 positive Zellen (neutrophile Granulozyten) sowie Ly6C- und CD115- negative Zellen (Ly6C^{low} Monozyten). Siehe Abbildung 6.

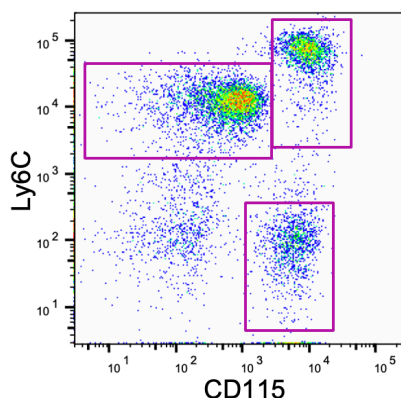


Abbildung 6: Differenzierung leukozytärer Subpopulationen (Ly6C/CD115)

Exemplarisches Streudiagramm aus prozessierter und fluoreszenzmarkierter Organprobe. Differenzierung der in Abb. 6 im Fenster eingeschlossenen Zellen anhand der Expression von Ly6C und CD115. Erstellt aus einer Organprobe der Experimentalgruppe mit der Software FlowJo™.

2.2.10.6.2 Herz

Bis einschließlich Schritt 4 (aus 2.2.10.6) waren die Analyseschritte parallel zu den der anderen Organe.

Um die Auflösung und die Reinheit der zu betrachtenden Subpopulationen im Herzen zu erhöhen, wurden folgende Schritte angewandt.

1. In dieser Auswahl wurden Zellen selektiert, die für CD11b und CD45.2 positive waren. Durch Anwenden dieses Fensters wurden Monozyten, Makrophagen und neutrophile Granulozyten nochmals von allen anderen Zellen getrennt und somit die Reinheit der zu analysierenden Subpopulationen erhöht.

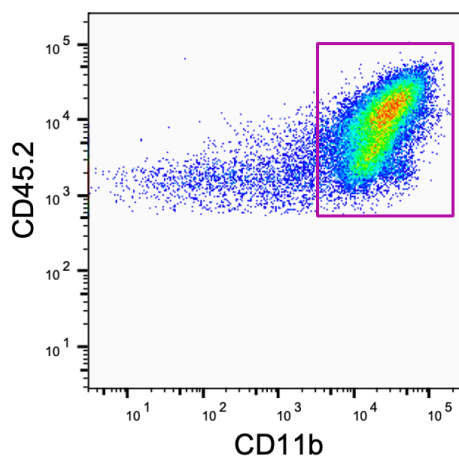


Abbildung 7: Differenzierung leukozytärer Subpopulationen (CD45.2/CD11b)
Exemplarisches Streudiagramm aus prozessierter und fluoreszenzmarkierter Organprobe. Differenzierung der in Abb. 7 im Fenster eingeschlossenen Zellen anhand der Expression von CD45.2 und CD11b. Erstellt aus einer Organprobe der Experimentalgruppe mit der Software FlowJo™.

Es wurde ein Fenster um alle CD45.2 und CD11b positiven Zellen gezogen, um diese im nächsten Schritt weiter zu differenzieren (Abb. 7).

2. In diesem Fenster wurde Lineage gegen CD45.2 aufgetragen. Somit konnten alle zuvor mit Lineage markierten Zellen von denen unterschieden werden, die nicht mit Lineage markiert wurden. Durch vorherige Selektion waren zu diesem Zeitpunkt der Analyse nur noch myeloide Zellen verblieben.

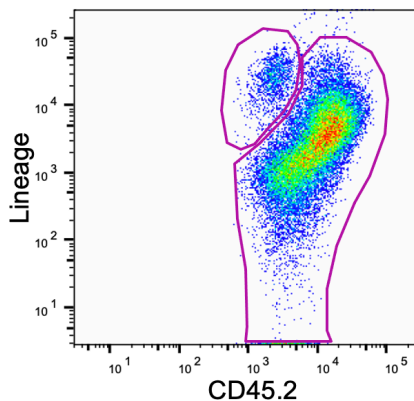


Abbildung 8: Differenzierung leukozytärer Subpopulationen (Lineage/CD45.2)

Exemplarisches Streudiagramm aus prozessierter und fluoreszenzmarkierter Organprobe. Differenzierung der in Abb. 8 im Fenster eingeschlossenen Zellen anhand der Expression von CD45.2 und Lineage. Erstellt aus einer Organprobe der Experimentalgruppe mit der Software FlowJo™.

Es wurde ein Fenster um alle CD45.2 positiven, Lineage negativen Zellen (Monozyten, Makrophagen) und eins um die Gruppe der Lineage positiven, CD45.2 Positiven Zellen gezogen (Neutrophile Granulozyten). Die Subgruppe der CD45.2 positiven, Lineage negativen Zellen wurde weiter analysiert (Abbildung8).

3. Die im Herzen befindlichen Monozyten wurden weiter differenziert. Dazu wurde Ly6C gegen F4/80 aufgetragen. Durch die Marker konnte die Gruppe der Ly6C^{high} von der Gruppe der Ly6C^{low} Monozyten getrennt werden.

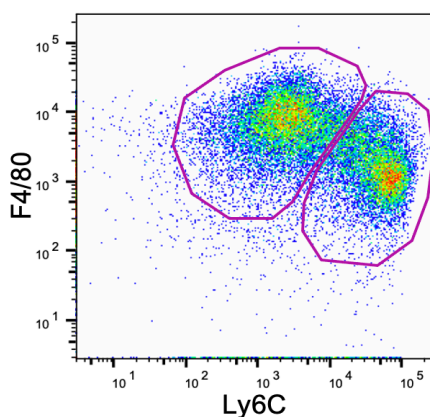


Abbildung 9: Differenzierung leukozytärer Subpopulationen (F4/80/Ly6C). Exemplarisches Streudiagramm aus prozessierter und fluoreszenzmarkierter Organprobe. Differenzierung der in Abb. 9 im Fenster eingeschlossenen Zellen anhand der Expression von F4/80 und Ly6C. Erstellt aus einer Organprobe der Experimentalgruppe mit der Software FlowJo™.

2.2.11 Statistische Auswertungen

Die digitale Dokumentation der erfassten Daten aus den Experimenten erfolgte mittels der Software Excel der Firma Microsoft. Die statistischen Analysen erfolgten mit der Software Prism der Firma GraphPad. Für quantitative stetig-skalierte Merkmale wurden bei symmetrischer Verteilung Mittelwert und Standardabweichung bestimmt und bei asymmetrischer Verteilung Median sowie Spannweite oder Interquartilsabstand. Bei fehlender Normalverteilung in den analysierten quantitativen Merkmalen erfolgten Vergleiche mit dem Kruskal-Wallis-Test. Waren die Werte Normalverteilt erfolgte die Analyse mittels einer Einweg-Varianzanalyse (one-way ANOVA).

3 Ergebnisse

3.1 Herz

Die Gesamtzahl der Leukozyten sowie die einzelnen Subpopulationen im Herzen zeigte sich in der Experimentalgruppe gegenüber der Kontrollgruppe zu jedem betrachteten Zeitpunkt erhöht.

3.1.1 Gesamt-Leukozyten im Herzen

Die Anzahl der Gesamt-Leukozyten im ischämischen Myokard unterschied sich gegenüber der Kontrollgruppe zu jedem Zeitpunkt außer 14 Tage nach MI signifikant. Innerhalb der Versuchsgruppe stieg die Zahl der Leukozyten von 12 h bis 72 h nach MI progredient an. Ab dem Zeitpunkt 5 d nach MI fiel die Anzahl über die beobachteten Zeitpunkte wieder, um nach 14 d auf ein vergleichbares Niveau wie zum Zeitpunkt 12 h nach MI zurückzukehren.

Die Dynamik der im ischämischen Myokard befindlichen Leukozyten zeigt somit einen Gipfel bei drei Tagen nach MI. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich durchschnittlich 15-m

al so viele Leukozyten im Myokard als bei Tieren ohne MI (Abbildung 10).

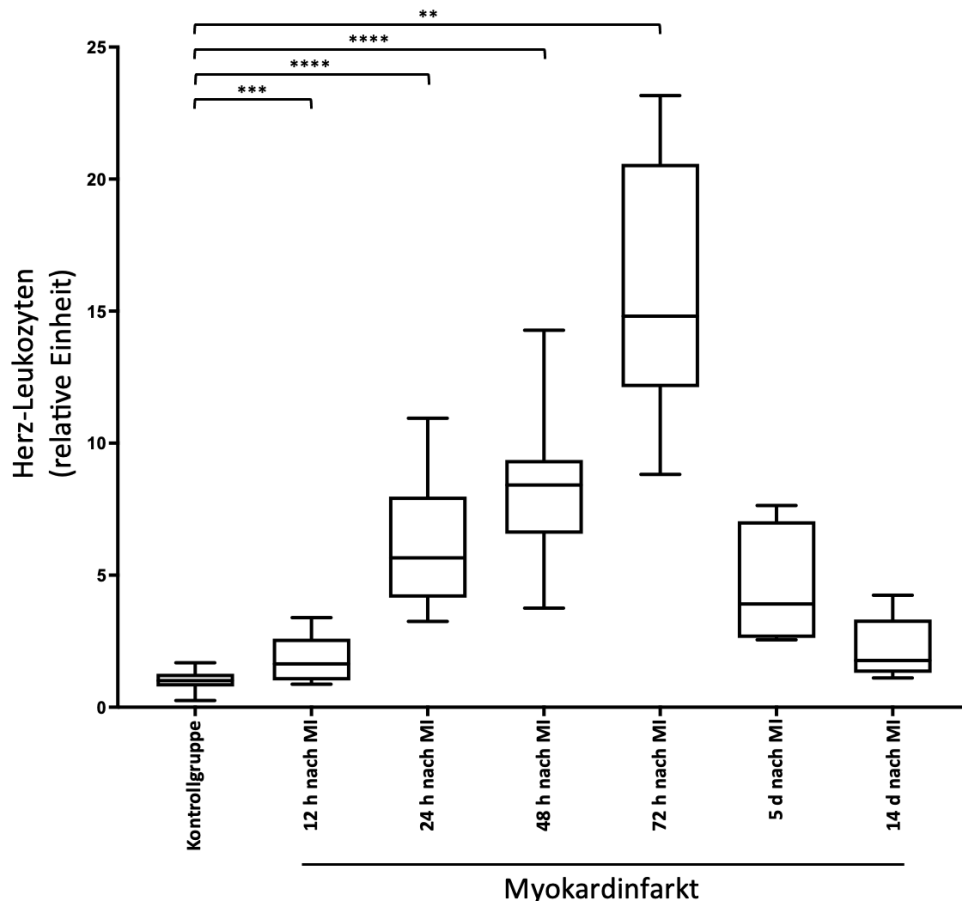


Abbildung 10: Leukozyten im ischämischen Myokard

Verlauf der relativen Anzahl der Leukozyten nach MI im Vergleich zur Kontrollgruppe. Gezeigt ist die relative Leukozytenzahl im ischämischen Myokard bei Mäusen nach operativem LAD-Verschluss im zeitlichen Verlauf gegenüber der Leukozytenzahl in einem vergleichbaren Stück Myokard der Kontrolltiere (normalisiert auf die Kontrollgruppe=1). Dargestellt als Box-Plot mit Median und Interquartilsabstand (Box). Punkte außerhalb des 5. und 95. Perzentils (Whisker) sind als Symbole dargestellt. Für die Vergleiche wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Kontrollgruppe, $n=45$; 12 h nach MI, $n=8$; 24h nach MI, $n=8$; 48 h nach MI, $n=15$; 72 h nach MI, $n=8$; 5 d nach MI, $n=14$; 14 d nach MI, $n=7$.

3.1.2 Neutrophile Granulozyten im Herzen

Die Anzahl der neutrophilen Granulozyten war gegenüber den Kontrolltieren an den Zeitpunkten 12 h, 24 h, 48 h, 72 h und 5 d nach MI signifikant erhöht, mit dem höchsten Wert zum Zeitpunkt 48 h nach MI. Ab 72 h nach MI fielen die Durchschnittswerte der jeweiligen Zeitpunkte wieder kontinuierlich ab. 14 Tage nach MI erreichte die Anzahl der neutrophilen Granulozyten wieder ähnliche Werte, wie sie bei den Kontrolltieren festzustellen waren (Abbildung 11).

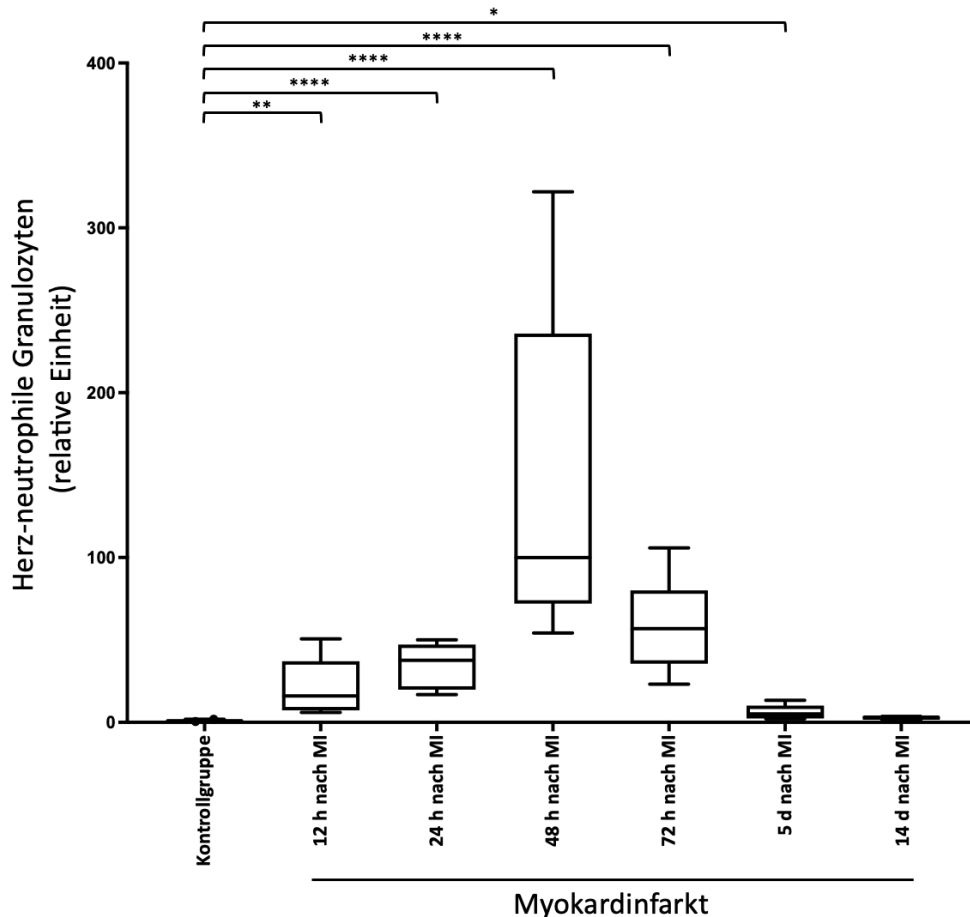


Abbildung 11: Neutrophile Granulozyten im ischämischen Myokard

Verlauf der relativen Anzahl der neutrophilen Granulozyten nach MI im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Gezeigt ist die relative Zahl der neutrophilen Granulozyten im ischämischen Myokard bei Mäusen nach operativem LAD-Verschluss im zeitlichen Verlauf gegenüber der neutrophilen Granulozytenzahl in einem vergleichbaren Stück Myokard der Kontrolltiere (normalisiert auf die Kontrollgruppe=1). Dargestellt als Box-Plot mit Median und Interquartilsabstand (Box). Punkte außerhalb des 5. und 95. Perzentils (Whisker) sind als Symbole dargestellt. Für die Vergleiche wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Kontrollgruppe, $n=45$; 12 h nach MI, $n=8$; 24h nach MI, $n=8$; 48 h nach MI, $n=15$; 72 h nach MI, $n=8$; 5 d nach MI, $n=14$; 14 d nach MI, $n=7$.

3.1.3 Monozyten und Makrophagen im Herzen

Die relative Anzahl der Monozyten und Makrophagen (addiert) war gegenüber den Kontrolltieren an den Zeitpunkten 24 h, 48 h, 72 h und 5 d nach MI signifikant erhöht. Im Gegensatz zu den neutrophilen Granulozyten fanden sich die höchsten Werte zum Zeitpunkt 72 h nach MI. Über die Zeitpunkte 5 d und 14 d näherten sich die Durchschnittswerte der Experimentalgruppe wieder dem Durchschnittswert der Kontrollgruppe an. Auch bei dieser Subpopulation kam es somit zu einem transienten Anstieg der Zellzahlen nach MI. Bei dieser Subgruppe an Zellen stellte nicht ein

einzelner Zeitpunkt den prominenten Gipfel der Werte. Die Durchschnittswerte von 24 h bis 72 h lagen alle in einem Bereich zwischen 12- und 20-facher Erhöhung (Abbildung 12).

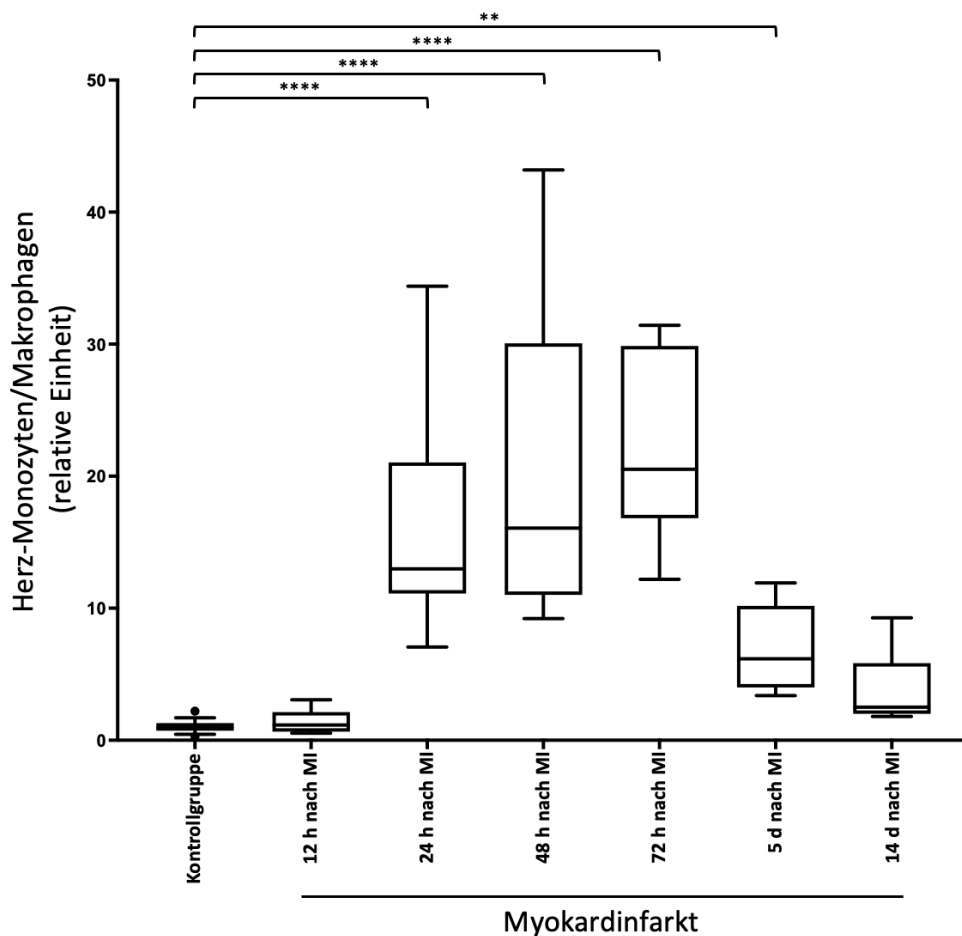


Abbildung 12: Monozyten und Makrophagen im ischämischen Myokard

Verlauf der relativen Anzahl der Monozyten und Makrophage nach MI im Vergleich zur Kontrollgruppe. Gezeigt ist die relative Zahl der Monozyten und Makrophagen im ischämischen Myokard bei Mäusen nach operativem LAD-Verschluss im zeitlichen Verlauf gegenüber der Monozyten- und Makrophagenzahl in einem vergleichbaren Stück Myokard der Kontrolltiere (normalisiert auf die Kontrollgruppe=1). Dargestellt als Box-Plot mit Median und Interquartilsabstand (Box). Punkte außerhalb des 5. und 95. Perzentils (Whisker) sind als Symbole dargestellt. Für die Vergleiche wurde eine one-way ANOVA verwendet: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Kontrollgruppe, $n=45$; 12 h nach MI, $n=8$; 24h nach MI, $n=8$; 48 h nach MI, $n=15$; 72 h nach MI, $n=8$; 5 d nach MI, $n=14$; 14 d nach MI, $n=7$.

3.1.4 Ly6C^{high} Monozyten im Herzen

Die Zahl der Ly6C^{high} Monozyten war gegenüber den Kontrolltieren zu den Zeitpunkten 24 h, 48 h, 72 h und 5 d nach MI signifikant erhöht. Innerhalb der Zeitpunkte stieg die Anzahl bis 48 h nach MI progredient an, um ab 72 h nach MI wieder abzufallen. Innerhalb dieser Kinetik zeigte sich der maximale Mittelwert (48 h nach MI) mit einer 75-fachen Erhöhung gegenüber den Kontrolltieren. In Bezug auf diesen Wert fielen

die nachfolgenden Mittelwerte stark ab und erreichten 14 d nach MI annähernd wieder das Niveau der Kontrolltiere (Abbildung 13).

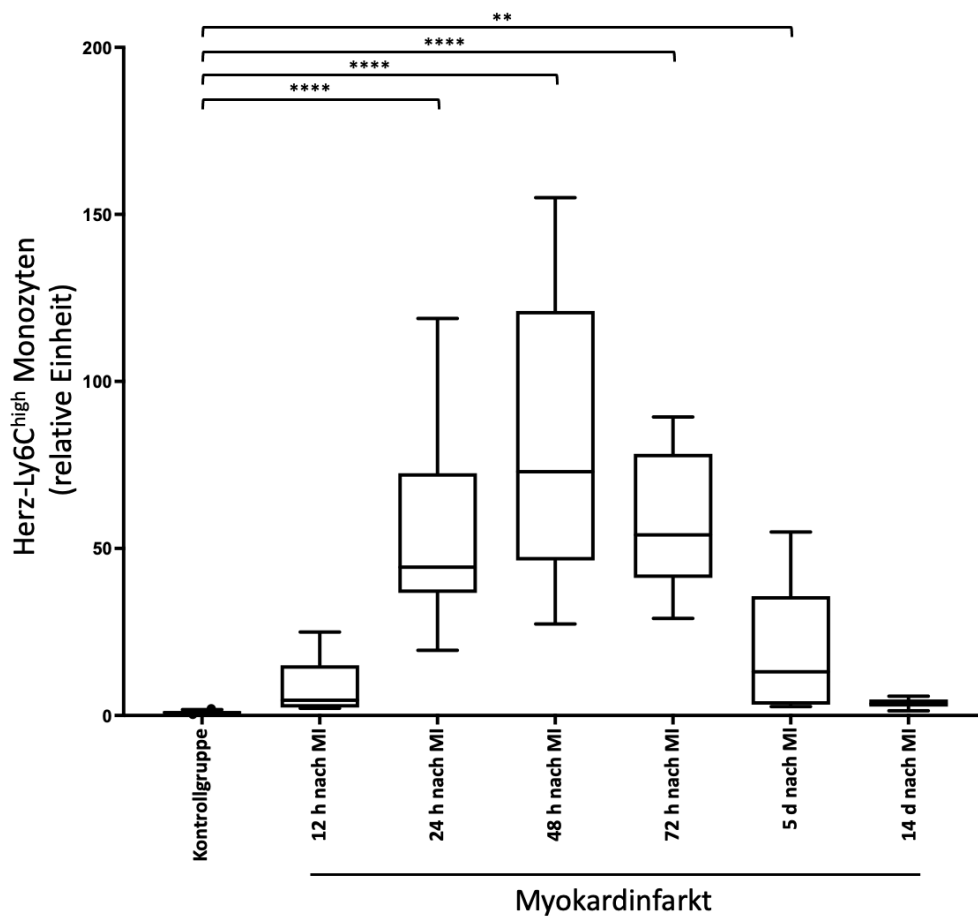


Abbildung 13: Ly6C^{high} Monozyten im ischämischen Myokard

Verlauf der relativen Anzahl der Ly6C^{high} Monozyten nach MI im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Gezeigt ist die relative Zahl der Ly6C^{high} Monozyten im ischämischen Myokard bei Mäusen nach operativem LAD-Verschluss im zeitlichen Verlauf gegenüber der Ly6C^{high} Monozytenzahl in einem vergleichbaren Stück Myokard der Kontrolltiere (normalisiert auf die Kontrollgruppe=1). Dargestellt als Box-Plot mit Median und Interquartilsabstand (Box). Punkte außerhalb des 5. und 95. Perzentils (Whisker) sind als Symbole dargestellt. Für die Vergleiche wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001. Kontrollgruppe, n=45; 12 h nach MI, n=8; 24h nach MI, n=8; 48 h nach MI, n=15; 72 h nach MI, n=8; 5 d nach MI, n=14; 14 d nach MI, n=7.

3.1.5 Ly6C^{low} Monozyten im Herzen

Die Anzahl der Ly6C^{low} Monozyten war gegenüber den Kontrolltieren an den Zeitpunkten 24 h, 48 h, 72 h, 5 d und 14 d nach MI signifikant erhöht. Zum Messpunkt 12 h nach MI waren die Werte gegenüber der Kontrollgruppe im Durchschnitt leicht erniedrigt. Die Zellzahl der Ly6C^{low} Monozyten im ischämischen Myokard stieg, im Vergleich zum vorhergehenden Zeitpunkt, zwischen den Messpunkten 24 h und 72 h nach MI kontinuierlich. Ab dem Zeitpunkt 5 d nach MI fielen die Mittelwerte wieder

ab. Der Mittelwert war 14 d nach MI verglichen zu den Kontrolltieren weiterhin signifikant erhöht.

Insgesamt stellte sich die Dynamik der Ly6C^{low} Monozyten im Myokard nach MI ähnlich wie die der Ly6C^{high} Monozyten in Abbildung 13 dar. Die Mittelwerte waren dabei jedoch weniger stark erhöht und fielen im zeitlichen Verlauf langsamer wieder ab. Zudem blieb die Zellzahlen gegenüber den Kontrolltieren auch 14 d nach MI erhöht (Abbildung 14).

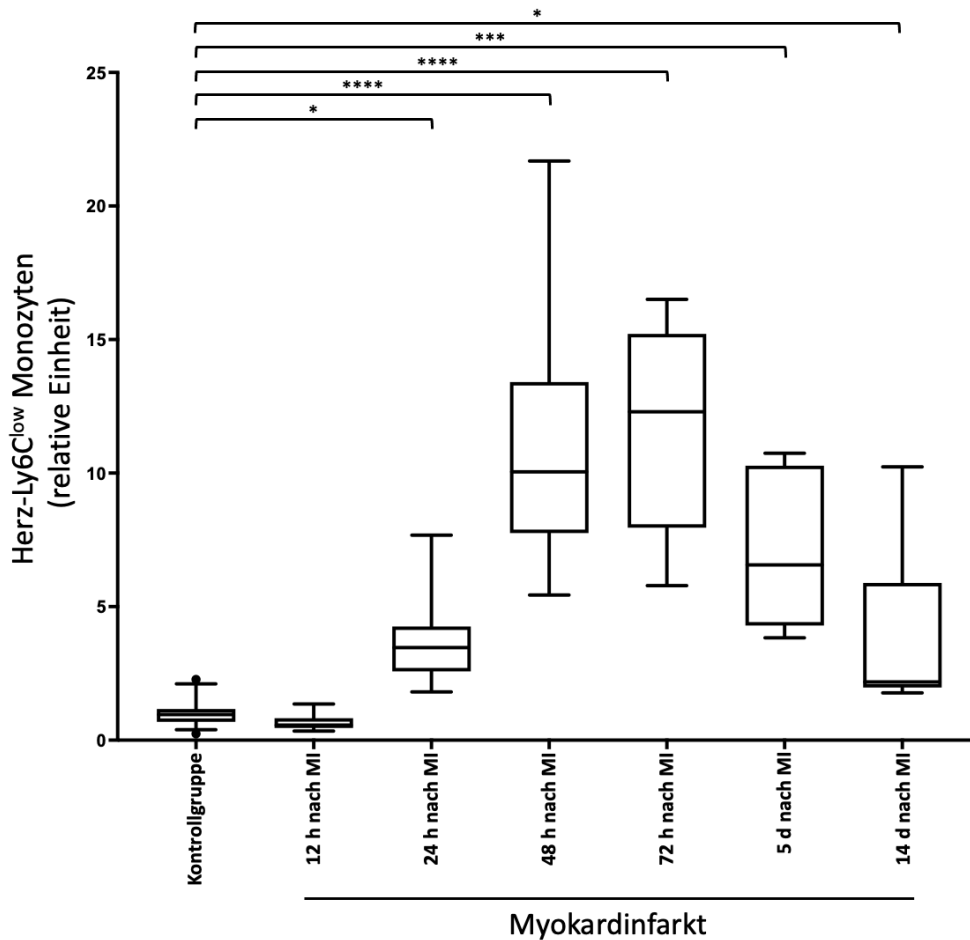


Abbildung 14: Ly6C^{low} Monozyten im ischämischen Myokard

Verlauf der relativen Anzahl der Ly6C^{low} Monozyten nach MI im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Gezeigt ist die relative Zahl der Ly6C^{low} Monozyten im ischämischen Myokard bei Mäusen nach operativem LAD-Verschluss im zeitlichen Verlauf gegenüber der relativen Ly6C^{low} Monozytenzahl in einem vergleichbaren Stück Myokard der Kontrolltiere (normalisiert auf die Kontrollgruppe=1). Dargestellt als Box-Plot mit Median und Interquartilsabstand (Box). Punkte außerhalb des 5. und 95. Perzentils (Whisker) sind als Symbole dargestellt. Für die Vergleiche wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001. Kontrollgruppe, n=45; 12 h nach MI, n=8; 24h nach MI, n=8; 48 h nach MI, n=15; 72 h nach MI, n=8; 5 d nach MI, n=14; 14 d nach MI, n=7.

3.2 Blut

Die Gesamtheit der Leukozyten als auch die analysierten Leukozyten-Subpopulationen im Blut nach MI unterschieden sich, je nach Zeitpunkt, stark in ihrer Anzahl. Dabei variierten die Mittelwerte der frühen Zeitpunkte meist stärker im Vergleich zu den Kontrolltieren als die Mittelwerte der späteren Zeitpunkte.

3.2.1 Gesamt-Leukozyten im Blut

Die Zahl der zirkulierenden Leukozyten im Blut war gegenüber den Kontrolltieren an den Zeitpunkten 12 h, 24 h und 48 h signifikant erniedrigt. Ab dem Zeitpunkt 72 h nach MI bis einschließlich 14 d nach MI unterschieden sich die Mittelwerte der Leukozytenzahl im Blut nicht signifikant zu denen der Kontrollgruppe. Die Gesamtkinetik der zirkulierenden Leukozyten nach MI zeigt einen Abfall der Mittelwerte innerhalb der ersten Messzeitpunkte um dann zwischen dem Zeitpunkt 48 h und 72 h nach MI wieder auf ein Niveau, ähnlich dem der Kontrolltiere, zurückzukehren. Maximal waren die Werte dabei um circa 75% gegenüber den Kontrolltieren erniedrigt (Abbildung 15).

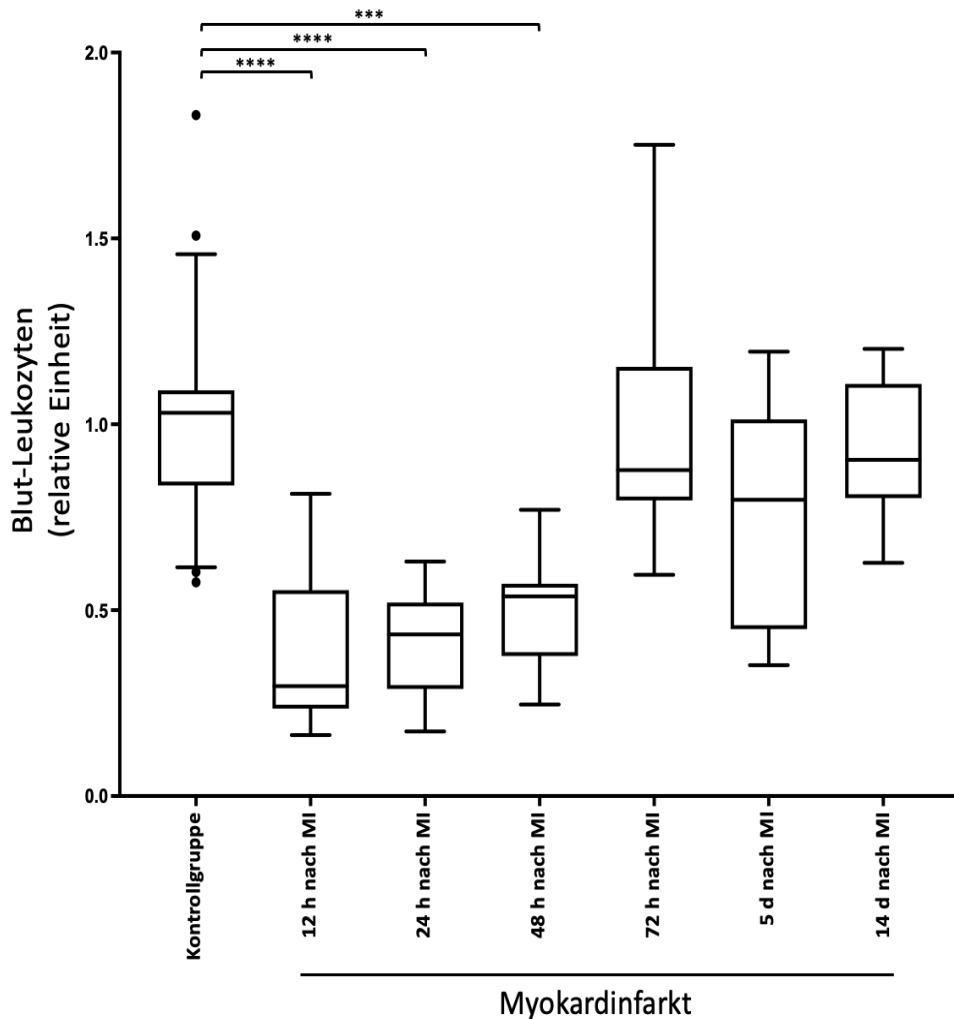


Abbildung 15: Leukozyten im Blut

Verlauf der relativen Anzahl der Leukozyten nach MI im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Gezeigt ist die relative Zahl der Blut-Leukozyten bei Mäusen nach operativem LAD-Verschluss im zeitlichen Verlauf gegenüber der Blut-Leukozytenzahl der Kontrolltiere (normalisiert auf die Kontrollgruppe=1). Dargestellt als Box-Plot mit Median und Interquartilsabstand (Box). Punkte außerhalb des 5. und 95. Perzentils (Whisker) sind als Symbole dargestellt. Für die Vergleiche wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Kontrollgruppe, $n=54$; 12 h nach MI, $n=13$; 24h nach MI, $n=16$; 48 h nach MI, $n=15$; 72 h nach MI, $n=12$; 5 d nach MI, $n=14$; 14 d nach MI, $n=7$.

3.2.2 Neutrophile Granulozyten im Blut

Die durchschnittliche Zahl der neutrophilen Granulozyten war gegenüber den Kontrolltieren an den Zeitpunkten 12 h und 24 h nach MI signifikant erhöht. Innerhalb der weiteren Zeitpunkte unterschieden sich die Mittelwerte nicht signifikant von der Kontrollgruppe. Die Dynamik der neutrophilen Granulozyten nach MI im Blut zeigt einen Anstieg der Werte innerhalb der ersten 24 h nach MI, um dann wieder abzufallen und auf das Niveau der Kontrollgruppe zurückzukehren. Der Mittelwert der Experimentalgruppe hatte bei 12 h sein Maximum und war gegenüber den Kontrolltieren 1,6-fach erhöht (Abbildung 16).

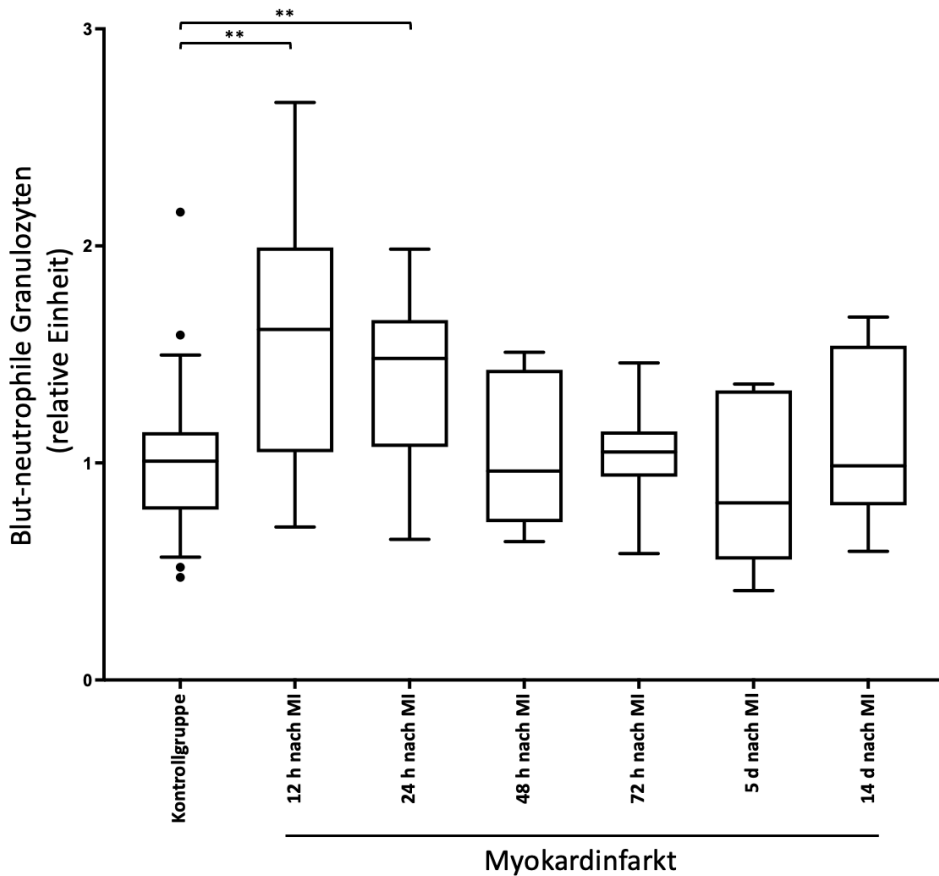


Abbildung 16: Neutrophilen Granulozyten im Blut

Verlauf der relativen Anzahl der Leukozyten nach MI im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Gezeigt ist die relative Zahl der neutrophilen Granulozyten im Blut bei Mäusen nach operativem LAD-Verschluss im zeitlichen Verlauf gegenüber der neutrophilen Granulozytenzahl im Blut der Kontrolltiere (normalisiert auf die Kontrollgruppe=1). Dargestellt als Box-Plot mit Median und Interquartilsabstand (Box). Punkte außerhalb des 5. und 95. Perzentils (Whisker) sind als Symbole dargestellt. Für die Vergleiche wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Kontrollgruppe, $n=54$; 12 h nach MI, $n=13$; 24h nach MI, $n=16$; 48 h nach MI, $n=15$; 72 h nach MI, $n=12$; 5 d nach MI, $n=14$; 14 d nach MI, $n=7$.

3.2.3 Ly6C^{high} Monozyten im Blut

Die relative Zellzahl der Ly6C^{high} Monozyten war gegenüber den Kontrolltieren an den Zeitpunkten 12 h, 24 h und 48 h nach MI signifikant erniedrigt. Innerhalb des Zeitraums zwischen 48 h und 72 h stieg die Anzahl wieder. Die Mittelwerte der Zeitpunkte von 72 h bis 14 d nach MI unterschieden sich nicht mehr signifikant von dem Mittelwert der Kontrollgruppe. Zusammengefasst zeigt die Kinetik, im Vergleich zu den Kontrolltieren, eine Reduktion der Anzahl der Ly6C^{high} Monozyten bis einschließlich 48 h nach MI. Die Mittelwerte lagen an allen drei Zeitpunkten bei etwa

50% im Vergleich zu den Kontrolltieren. Anschließend kehrten die Mittelwerte wieder auf ein Niveau ähnlich dem der Kontrollgruppe zurück (Abbildung 17).

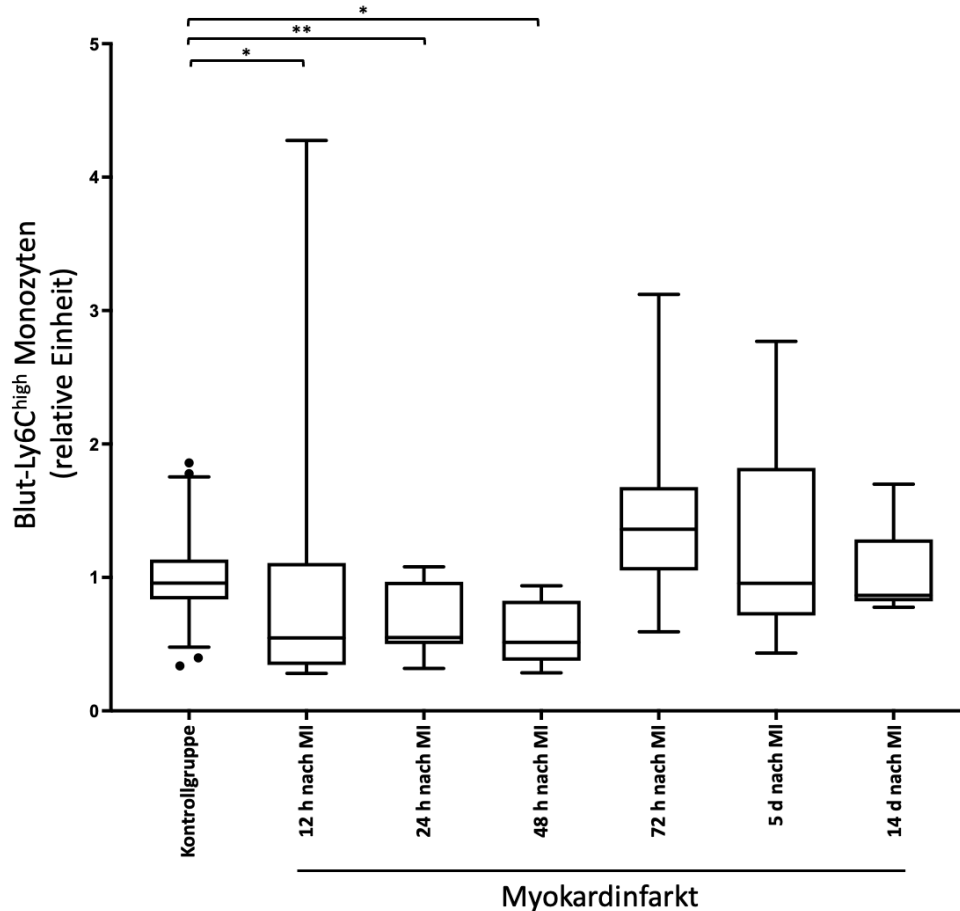


Abbildung 17: Ly6C^{high} Monozyten im Blut

Verlauf der relativen Anzahl der Ly6C^{high} Monozyten nach MI im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Gezeigt ist die relative Zahl der Ly6C^{high} Monozyten im Blut bei Mäusen nach operativem LAD-Verschluss im zeitlichen Verlauf gegenüber der Ly6C^{high} Monozytenzahl im Blut der Kontrolltiere (normalisiert auf die Kontrollgruppe=1). Dargestellt als Box-Plot mit Median und Interquartilsabstand (Box). Punkte außerhalb des 5. und 95. Perzentils (Whisker) sind als Symbole dargestellt. Für die Vergleiche wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001. Kontrollgruppe, n=54; 12 h nach MI, n=13; 24h nach MI, n=16; 48 h nach MI, n=15; 72 h nach MI, n=12; 5 d nach MI, n=14; 14 d nach MI, n=7.

3.2.4 Ly6C^{low} Monozyten im Blut

Die relative Zahl der zirkulierenden Ly6C^{low} Monozyten nach MI war gegenüber den Kontrolltieren an den Zeitpunkten 12 h, 24 h und 48 h nach MI signifikant erniedrigt. Die Mittelwerte der Zeitpunkte von 72 h bis einschließlich 14 d nach MI zeigten keinen signifikanten Unterschied gegenüber den Kontrolltieren. Innerhalb dieser Zeitpunkte kam es in den Gruppen zu einer großen Streuung der Werte.

Die Dynamik der zirkulierenden Ly6C^{low} Monozyten nach MI zeigte ein Absinken der Mittelwerte bis 48 h nach MI, um in den nachfolgenden Zeitpunkten wieder zu steigen. Ab 72 h nach MI waren die Mittelwerte höher als die der Kontrollgruppe. Wegen der breiten Streuung der Werte war dieser Unterschied jedoch nicht signifikant (Abbildung 18).

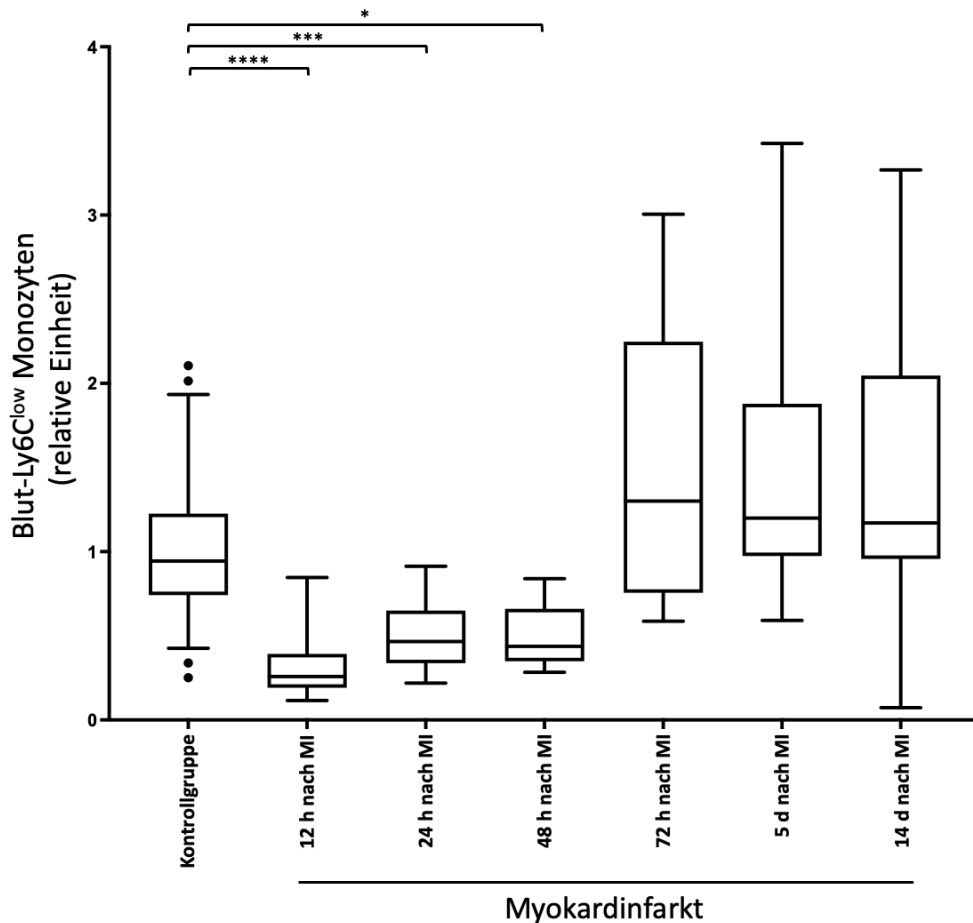


Abbildung 18: Ly6C^{low} Monozyten im Blut

Verlauf der relativen Anzahl der Ly6C^{low} Monozyten nach MI im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Gezeigt ist die relative Zahl von Ly6C^{low} Monozyten im Blut bei Mäusen nach operativem LAD-Verschluss im zeitlichen Verlauf gegenüber der Ly6C^{low} Monozytenzahl im Blut der Kontrolltiere (normalisiert auf die Kontrollgruppe=1). Dargestellt als Box-Plot mit Median und Interquartilsabstand (Box). Punkte außerhalb des 5. und 95. Perzentils (Whisker) sind als Symbole dargestellt. Für die Vergleiche wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001. Kontrollgruppe, n=54; 12 h nach MI, n=13; 24h nach MI, n=16; 48 h nach MI, n=15; 72 h nach MI, n=12; 5 d nach MI, n=14; 14 d nach MI, n=7.

3.3 Knochenmark

3.3.1 Gesamt-Leukozyten im Knochenmark

Die relative Anzahl der Leukozyten im Knochenmark war gegenüber den Kontrolltieren an dem Zeitpunkt 12 h bis 48 h nach MI signifikant erniedrigt, zum Zeitpunkt 14 d nach MI signifikant erhöht. Die Mittelwerte der anderen Zeitpunkte unterschieden sich nicht signifikant von dem der Kontrollgruppe. Die Dynamik der Mittelwerte zeigte zunächst ein Absinken bei 12 h nach MI, um dann am Zeitpunkt 24 h nach MI wieder auf das Niveau der Kontrolltiere zu steigen. Der Mittelwert war 48 h nach MI wieder deutlich erniedrigt. Anschließend kam es zu einem progredienten Anstieg der Mittelwerte bis einschließlich 14 d nach MI (Abbildung 19).

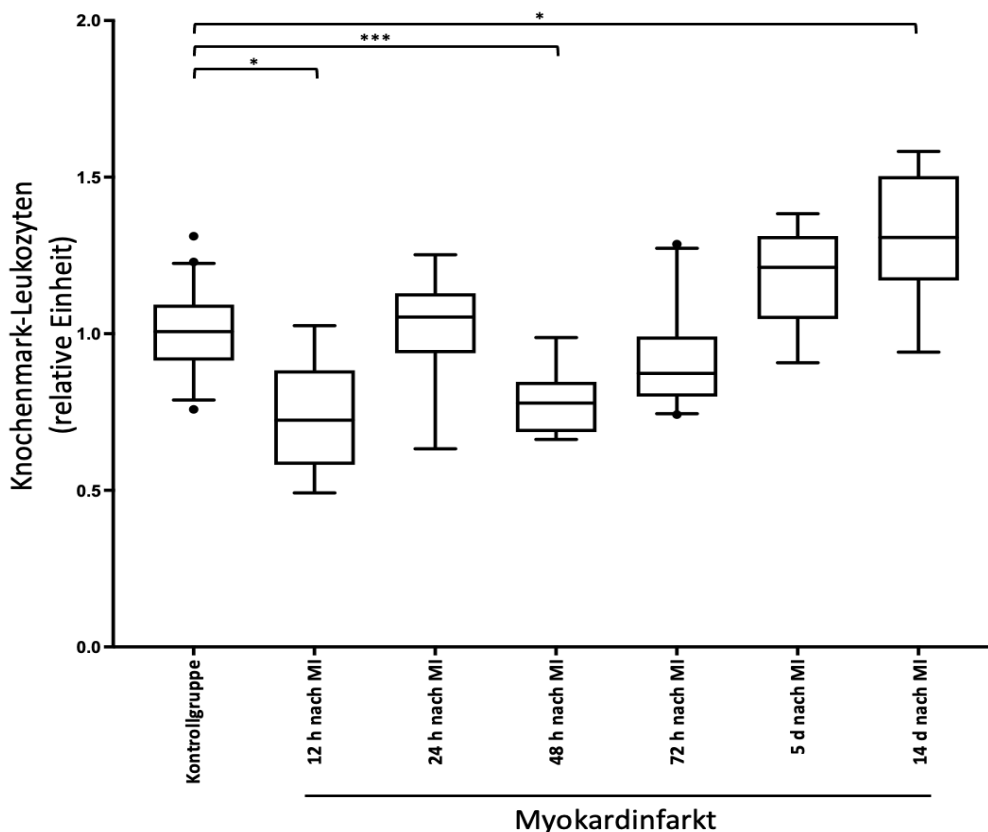


Abbildung 19: Leukozyten im Knochenmark

Verlauf der relativen Anzahl der Leukozyten nach MI im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Gezeigt ist die relative Zahl der Leukozyten im Knochenmark bei Mäusen nach operativem LAD-Verschluss im zeitlichen Verlauf gegenüber der Leukozytenzahl im Knochenmark der Kontrolltiere (normalisiert auf die Kontrollgruppe=1). Dargestellt als Box-Plot mit Median und Interquartilsabstand (Box). Punkte außerhalb des 5. und 95. Perzentils (Whisker) sind als Symbole dargestellt. Für die Vergleiche wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Kontrollgruppe, $n=43$; 12 h nach MI, $n=14$; 24 h nach MI, $n=8$; 48 h nach MI, $n=8$; 72 h nach MI, $n=22$; 5 d nach MI, $n=14$; 14 d nach MI, $n=7$.

3.3.2 Neutrophile Granulozyten im Knochenmark

Die relative Zellzahl der neutrophilen Granulozyten war gegenüber den Kontrolltieren an den Zeitpunkten 12 h und 48 h nach MI signifikant erniedrigt. An den Zeitpunkten 5 und 14 d nach MI signifikant erhöht. Die Mittelwerte der anderen Zeitpunkte unterschieden sich nicht signifikant von dem der Kontrollgruppe. Die Dynamik der Mittelwerte verhielt sich annähernd parallel zu der Dynamik in Abbildung 19. Nach erstmaligem Abfall des Mittelwerts zum Zeitpunkt 12 h nach MI, kehrte der Mittelwert 24 h nach MI auf das Niveau der Kontrollgruppe zurück. Zum Zeitpunkt 48 h nach MI folgte ein zweites Absinken des Mittelwerts gegenüber den Kontrolltieren. Ab dem Messpunkt 72 h nach MI bis einschließlich 5 d nach MI stieg die Zahl der neutrophilen Granulozyten im Knochenmark wieder an (Abbildung 20).

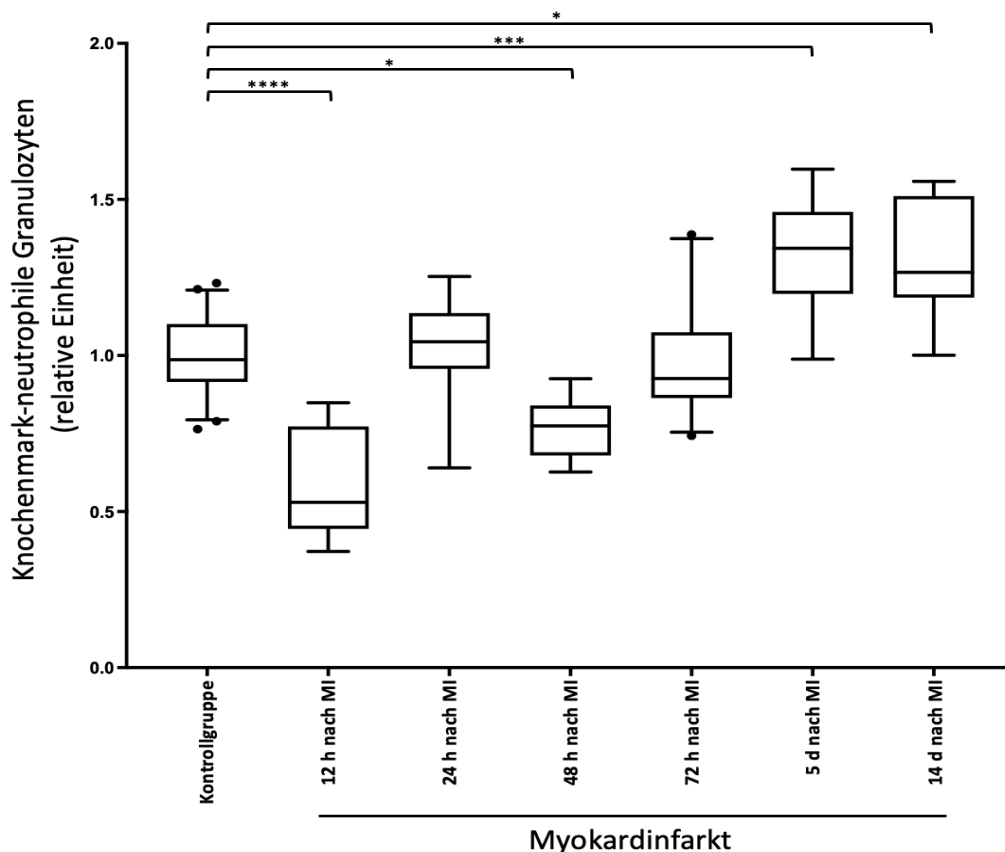


Abbildung 20: Neutrophile Granulozyten im Knochenmark

Verlauf der relativen Anzahl der neutrophilen Granulozyten nach MI im Vergleich zur Kontrollgruppe. Gezeigt ist die relative Zahl der neutrophilen Granulozyten im Knochenmark bei Mäusen nach operativem LAD-Verschluss im zeitlichen Verlauf gegenüber der neutrophilen Granulozytenzahl im Knochenmark der Kontrolltiere (normalisiert auf die Kontrollgruppe=1). Dargestellt als Box-Plot mit Median und Interquartilsabstand (Box). Punkte außerhalb des 5. und 95. Perzentils (Whisker) sind als Symbole dargestellt. Für die Vergleiche wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Kontrollgruppe, $n=43$; 12 h nach MI, $n=14$; 24h nach MI, $n=8$; 48 h nach MI, $n=8$; 72 h nach MI, $n=22$; 5 d nach MI, $n=14$; 14 d nach MI, $n=7$.

3.3.3 Ly6C^{high} Monozyten im Knochenmark

Die Anzahl der Ly6C^{high} Monozyten im Knochenmark war gegenüber den Kontrolltieren zum Zeitpunkt 12 h nach MI signifikant erniedrigt und zum Zeitpunkt 72 h nach MI signifikant erhöht. Die Dynamik zeigte ein Abfallen des Mittelwerts gegenüber der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt 12 h nach MI. Anschließend stiegen die Mittelwerte konsekutiv bis zum Zeitpunkt 72 h nach MI. Zum Zeitpunkt 5 d nach MI fiel der Mittelwert, bezogen auf den vorhergehenden Zeitpunkt, wieder ab. 14 d nach MI lag der Mittelwert wieder über dem zum Zeitpunkt 5d nach MI (Abbildung 21).

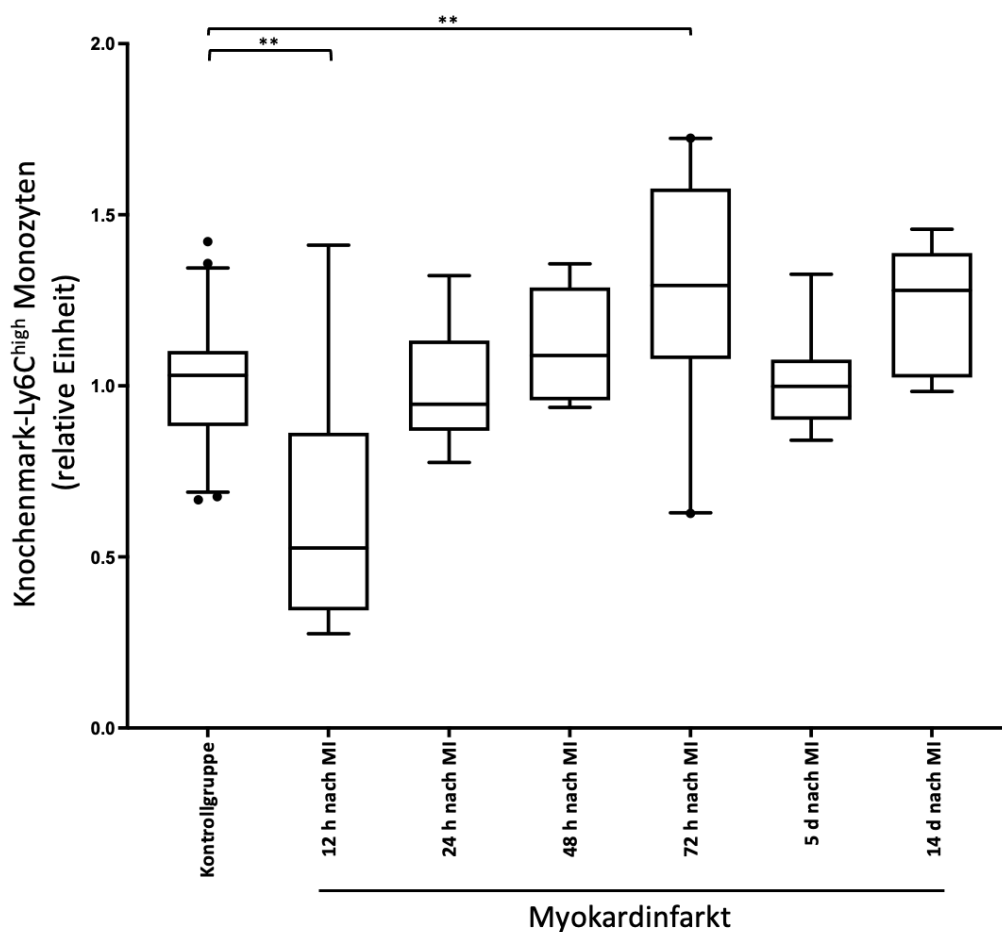


Abbildung 21: Ly6C^{high} Monozyten im Knochenmark

Verlauf der relativen Anzahl der Ly6C^{high} Monozyten nach MI im Vergleich zur Kontrollgruppe. Gezeigt ist die relative Zahl der Ly6C^{high} Monozyten im Knochenmark bei Mäusen nach operativem LAD-Verschluss im zeitlichen Verlauf gegenüber der Ly6C^{high} Monozytenzahl im Knochenmark der Kontrolltiere (normalisiert auf die Kontrollgruppe=1). Dargestellt als Box-Plot mit Median und Interquartilsabstand (Box). Punkte außerhalb des 5. und 95. Perzentils (Whisker) sind als Symbole dargestellt. Für die Vergleiche wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001. Kontrollgruppe, n=43; 12 h nach MI, n=14; 24h nach MI, n=8; 48 h nach MI, n=8; 72 h nach MI, n=22; 5 d nach MI, n=14; 14 d nach MI, n=7.

3.3.4 Ly6C^{low} Monozyten im Knochenmark

Die relative Zellzahl der Ly6C^{low} Monozyten im Knochenmark war gegenüber den Kontrolltieren an dem Zeitpunkt 48 h, 72 h und 5 d nach MI signifikant erniedrigt. Die anderen Mittelwerte unterschieden sich nicht signifikant von dem der Kontrolltiere. Die Dynamik der Ly6C^{low} Monozyten im Knochenmark nach MI verhielt sich in den ersten Messpunkten nach MI ohne signifikante Änderung des Mittelwerts. Nach 48 h kam es jedoch zu einem deutlichen absinken der Werte. Diese blieben, verglichen mit den Kontrolltieren, bis 5 d nach MI um ca. 50% erniedrigt. Zum letzten gemessenen Zeitpunkt (14 d nach MI) stieg der Mittelwert wieder auf das Niveau der Kontrollgruppe (Abbildung 22).

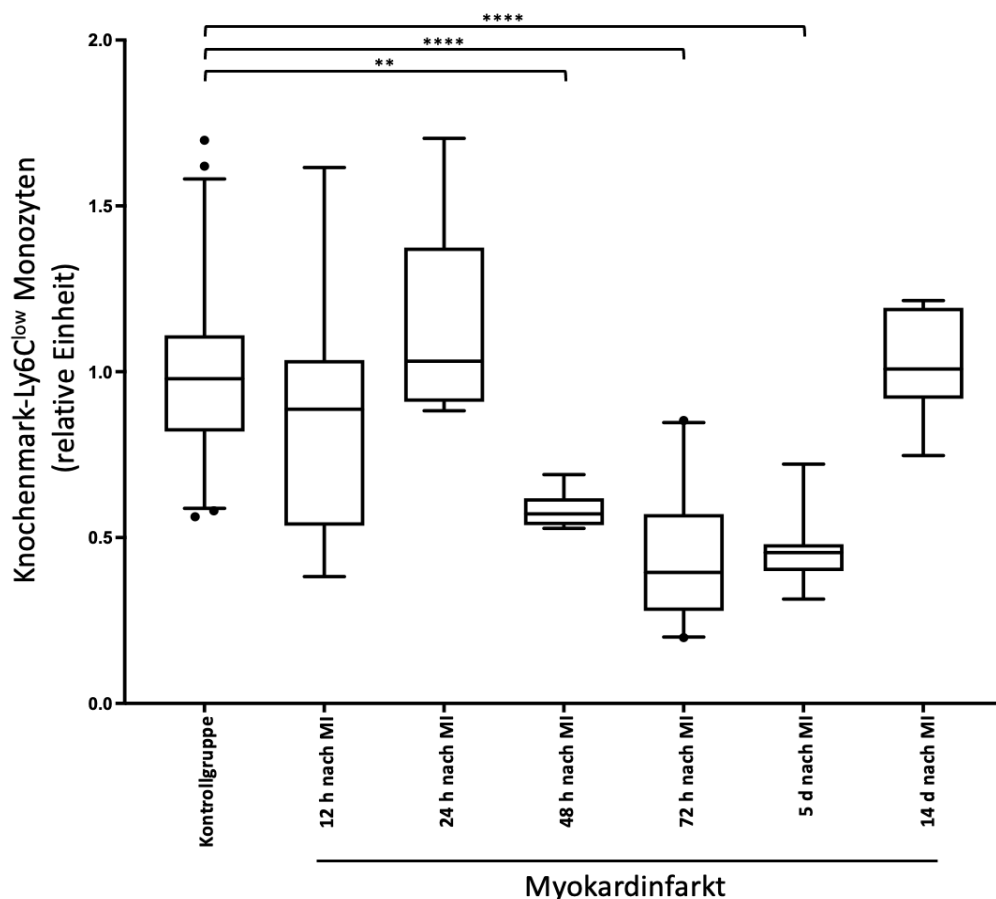


Abbildung 22: Ly6C^{low} Monozyten im Knochenmark

Verlauf der relativen Anzahl der Ly6C^{low} Monozyten nach MI im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Gezeigt ist die relative Zahl der Ly6C^{low} Monozyten im Knochenmark bei Mäusen nach operativem LAD-Verschluss im zeitlichen Verlauf gegenüber der Ly6C^{low} Monozytenzahl im Knochenmark der Kontrolltiere (normalisiert auf die Kontrollgruppe=1). Dargestellt als Box-Plot mit Median und Interquartilsabstand (Box). Punkte außerhalb des 5. und 95. Perzentils (Whisker) sind als Symbole dargestellt. Für die Vergleiche wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001. Kontrollgruppe, n=43; 12 h nach MI, n=14; 24 h nach MI, n=8; 48 h nach MI, n=8; 72 h nach MI, n=22; 5 d nach MI, n=14; 14 d nach MI, n=7.

3.4 Milz

3.4.1 Relatives Gewicht der Milz

Das relative Gewicht der Milz war gegenüber den Kontrolltieren an dem Zeitpunkt 24 h nach MI signifikant erniedrigt. An den Zeitpunkten 72 h und 5 d nach MI waren die Mittelwerte gegenüber den Kontrolltieren signifikant erhöht. Innerhalb des Zeitraums bis 12 h nach MI fiel das Gewicht und zeigte ab 48 h nach MI wieder eine progredient zunehmende Dynamik. Der Maximalwert wurden dabei am Zeitpunkt 7 d nach MI erreicht. Zu diesem Zeitpunkt wog die Milz der Experimentaltiere (bezogen auf das gesamte Körpergewicht) circa das 1,3-fache gegenüber den Kontrolltieren. 14 d nach MI fielen die Werte im Durchschnitt wieder ab und erreichten ein ähnliches Niveau wie das der Kontrolltiere (Abbildung 23).

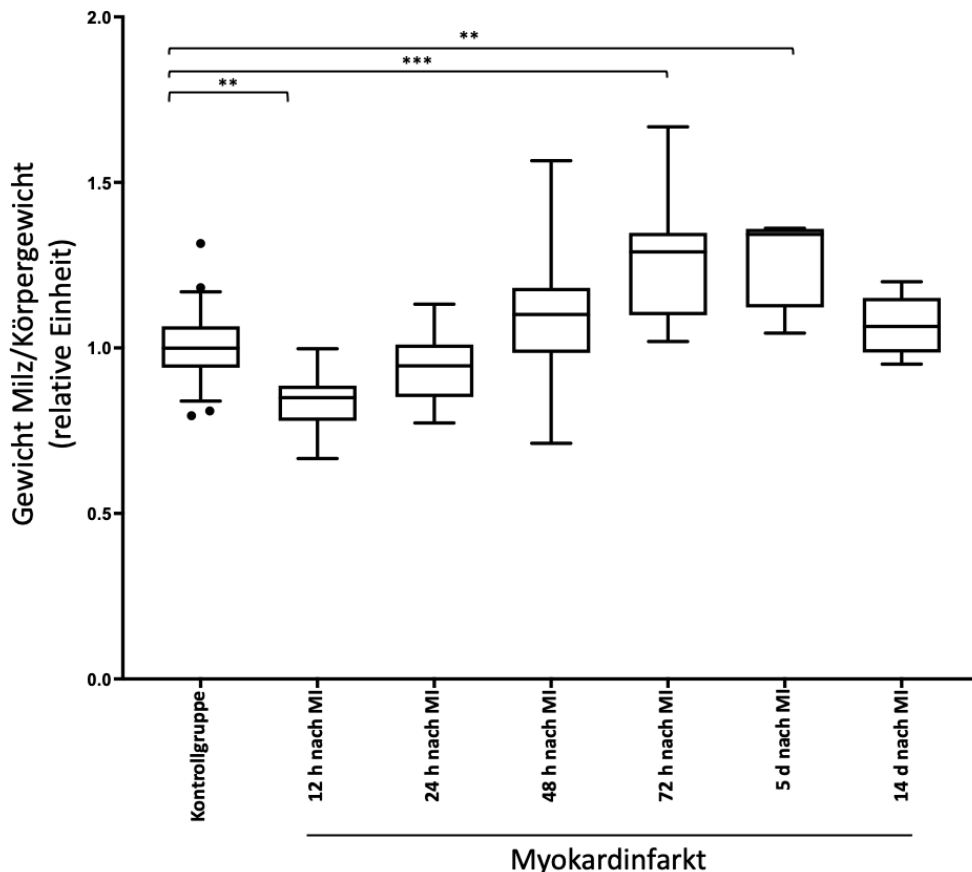


Abbildung 23: Gewicht Milz im Verhältnis zum Körpergewicht

Verlauf des Gewichts der Milz nach MI im Verhältnis zur Kontrollgruppe.

Gezeigt ist das Gewicht der Milz im Verhältnis zum Körpergewicht bei Mäusen nach operativem LAD-Verschluss im zeitlichen Verlauf gegenüber dem Gewicht der Milz der Kontrolltiere (normalisiert auf die Kontrollgruppe=1). Dargestellt als Box-Plot mit Median und Interquartilsabstand (Box). Punkte außerhalb des 5. und 95. Perzentils (Whisker) sind als Symbole dargestellt. Für die Vergleiche wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Kontrollgruppe, $n=40$; 12 h nach MI, $n=8$; 24h nach MI, $n=8$; 48 h nach MI, $n=8$; 72 h nach MI, $n=8$; 5 d nach MI, $n=14$; 14 d nach MI, $n=7$.

Die Mittelwerte der Zellsubpopulationen innerhalb der Milzproben unterschieden sich nicht signifikant von denen der Kontrollgruppe. Trotzdem ließen sich teilweise Dynamiken der Subpopulationen zu den verschiedenen Zeitpunkten nach MI beobachten.

3.4.2 Gesamt-Leukozyten in der Milz

Die relative Zellzahl der Leukozyten in der Milz nach MI unterschied sich zu keinem Zeitpunkt signifikant von dem Mittelwert der Kontrollgruppe. Zu beobachten war, dass es sowohl innerhalb der Kontrollgruppe als auch in der Experimentalgruppe zu großen Streuungen der Werte kam (Abbildung 24).

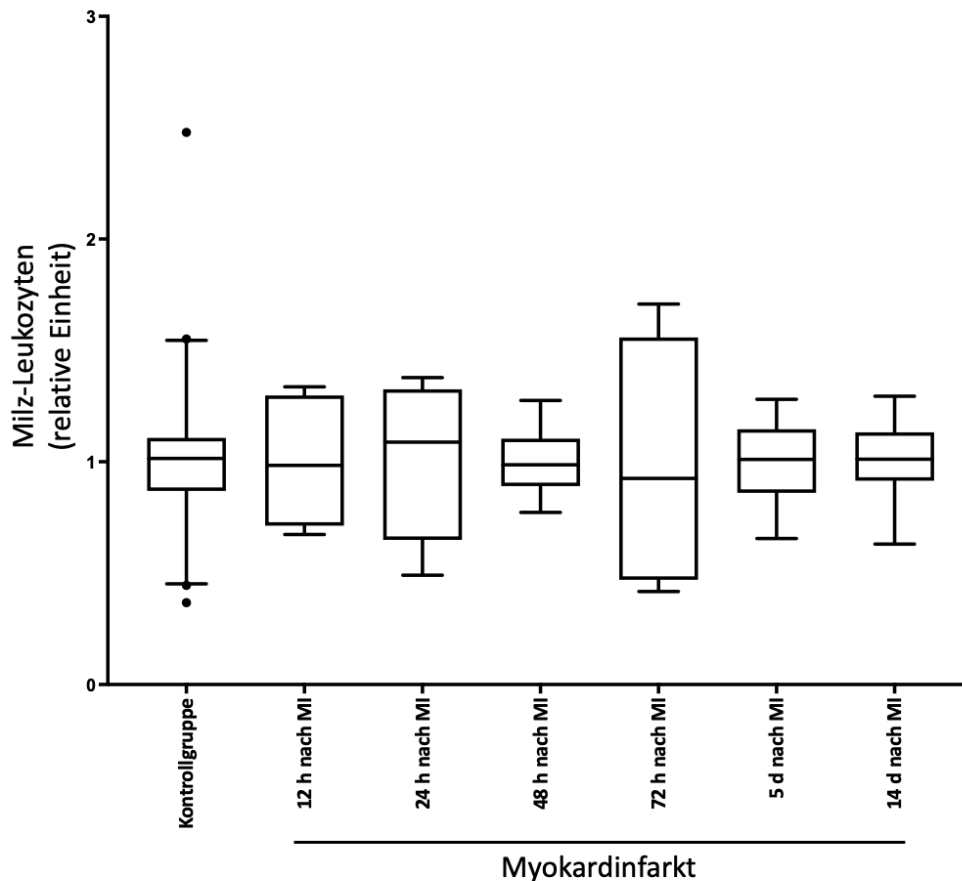


Abbildung 24: Leukozyten in der Milz

Verlauf der relativen Anzahl der Leukozyten nach MI im Verhältnis zur Kontrollgruppe.

Gezeigt ist die relative Zahl der Leukozyten in der Milz bei Mäusen nach operativem LAD-Verschluss im zeitlichen Verlauf gegenüber der Leukozytenzahl in der Milz der Kontrolltiere (normalisiert auf die Kontrollgruppe=1). Dargestellt als Box-Plot mit Median und Interquartilsabstand (Box). Punkte außerhalb des 5. und 95. Perzentils (Whisker) sind als Symbole dargestellt. Für die Vergleiche wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Kontrollgruppe, n=40; 12 h nach MI, n=8; 24h nach MI, n=8; 48 h nach MI, n=8; 72 h nach MI, n=8; 5 d nach MI, n=14; 14 d nach MI, n=7.

3.4.3 Neutrophile Granulozyten in der Milz

Die relative Zahl der neutrophilen Granulozyten in der Milz war gegenüber den Kontrolltieren zu keinem Zeitpunkt signifikant erhöht oder erniedrigt. Die Dynamik der neutrophilen Granulozyten in der Milz nach MI zeigte dabei einen Maximalwert nach 12 h, um von diesem Zeitpunkt bis 48 h nach MI progredient abzusinken. Nach 48 h war der Mittelwert wieder auf Niveau der Kontrollgruppe angestiegen und blieb auch innerhalb der späteren Zeitpunkte auf diesem Level (Abbildung 25).

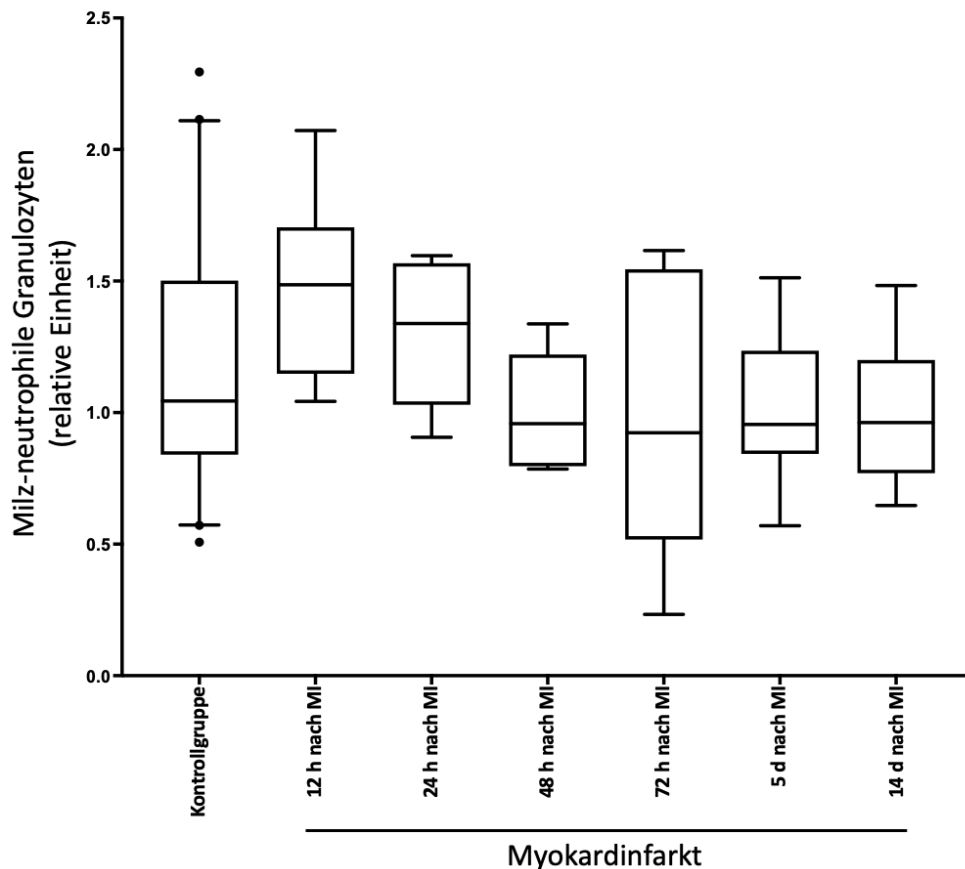


Abbildung 25: Neutrophile Granulozyten der Milz

Verlauf der relativen Anzahl der neutrophilen Granulozyten nach MI im Verhältnis zur Kontrollgruppe. Gezeigt ist die relative Zahl der neutrophilen Granulozyten in der Milz bei Mäusen nach operativem LAD-Verschluss im zeitlichen Verlauf gegenüber der neutrophilen Granulozytenzahl in der Milz der Kontrolltiere (normalisiert auf die Kontrollgruppe=1). Dargestellt als Box-Plot mit Median und Interquartilsabstand (Box). Punkte außerhalb des 5. und 95. Perzentils (Whisker) sind als Symbole dargestellt. Für die Vergleiche wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Kontrollgruppe, n=40; 12 h nach MI, n=8; 24h nach MI, n=8; 48 h nach MI, n=8; 72 h nach MI, n=8; 5 d nach MI, n=14; 14 d nach MI, n=7.

3.4.4 Ly6C^{high} Monozyten in der Milz

Die relative Anzahl der Ly6C^{high} Monozyten in der Milz nach MI unterschied sich zu keinem Zeitpunkt signifikant von dem Mittelwert der Kontrollgruppe. Die Mittelwerte lagen zu allen Messpunkten nahe an dem der Kontrollgruppe. Zu beobachten war, dass es sowohl innerhalb der Kontrollgruppe als auch in der Experimentalgruppe zu großen Streuungen der Werte kam. Es zeigt sich keine abfallende oder ansteigende Dynamik im Vergleich zu den Kontrolltieren oder zwischen den verschiedenen Zeitpunkten nach MI (Abbildung 26).

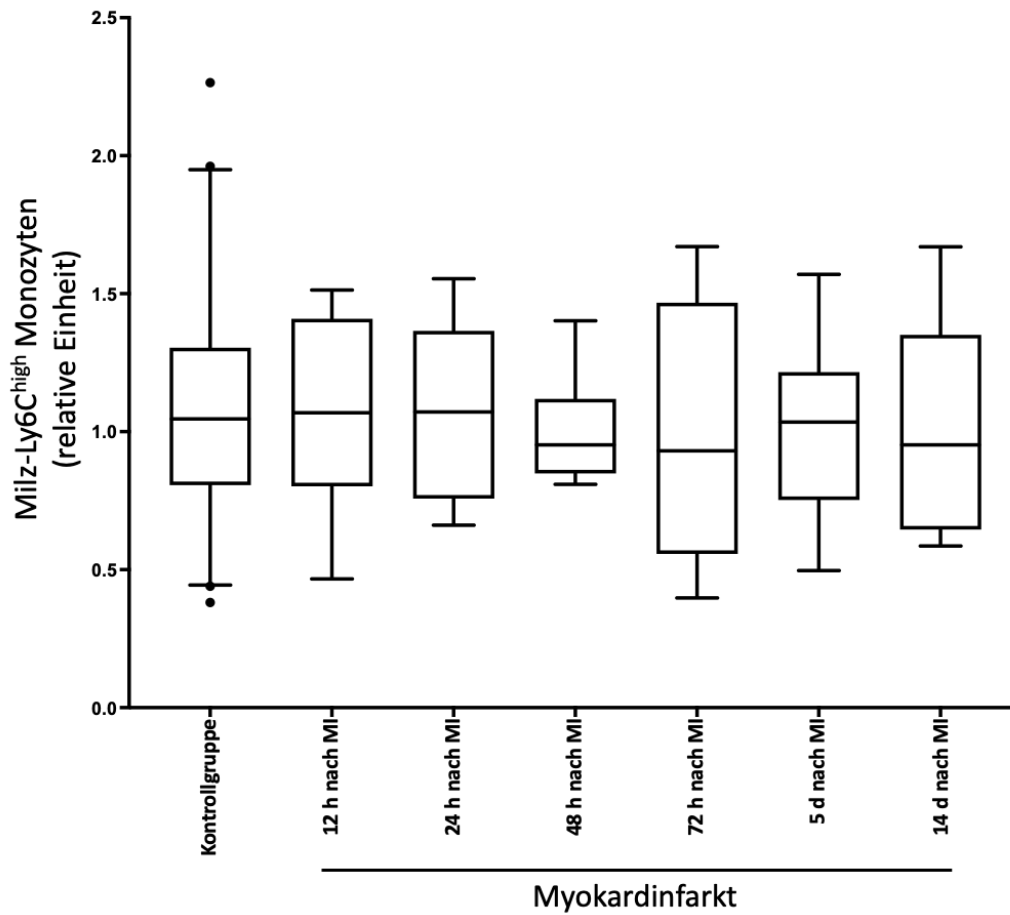


Abbildung 26: Ly6C^{high} Monozyten in der Milz

Verlauf der relativen Anzahl der Ly6C^{high} Monozyten nach MI im Verhältnis zur Kontrollgruppe. Gezeigt ist die relative Zahl der Ly6C^{high} Monozyten in der Milz bei Mäusen nach operativem LAD-Verschluss im zeitlichen Verlauf gegenüber der Ly6C^{high} Monozytenzahl in der Milz der Kontrolltiere (normalisiert auf die Kontrollgruppe=1). Dargestellt als Box-Plot mit Median und Interquartilsabstand (Box). Punkte außerhalb des 5. und 95. Perzentils (Whisker) sind als Symbole dargestellt. Für die Vergleiche wurde eine Einweg-Varianzanalyse (one-way ANOVA) verwendet. Kontrollgruppe, n=40; 12 h nach MI, n=8; 24h nach MI, n=8; 48 h nach MI, n=8; 72 h nach MI, n=8; 5 d nach MI, n=14; 14 d nach MI, n=7.

3.4.5 Ly6C^{low} Monozyten in der Milz

Die relative Zahl der Ly6C^{low} Monozyten in der Milz nach MI unterschied sich ebenfalls zu keinem Zeitpunkt signifikant von dem Mittelwert der Kontrollgruppe. Auch bei dieser Zellsubpopulation in der Milz kam es zu einer großen Streuung der Werte. Der Mittelwert der Experimentalgruppe 12 h und 14 d nach MI war gegenüber der Kontrollgruppe erhöht. Ein Absinken des Mittelwerts unterhalb des Niveaus der Kontrollgruppe war 72 h nach MI zu beobachten. An den restlichen Zeitpunkten war der Mittelwert nahe zu dem der Kontrollgruppe. (Abbildung 27).

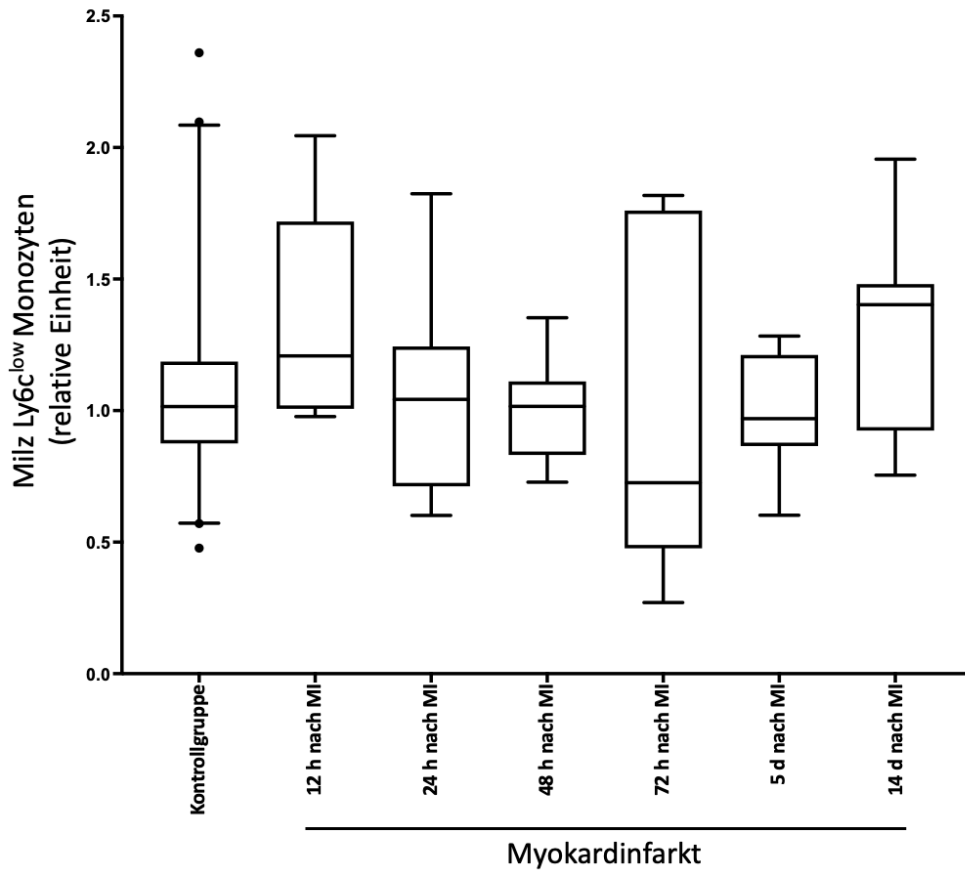


Abbildung 27: Ly6C^{low} Monozyten der Milz

Verlauf der relativen Anzahl der Ly6C^{low} Monozyten nach MI im Verhältnis zur Kontrollgruppe.

Gezeigt ist die relative Zahl der Ly6C^{low} Monozyten in der Milz bei Mäusen nach operativem LAD-Verschluss im zeitlichen Verlauf gegenüber der Ly6C^{low} Monozytenzahl in der Milz der Kontrolltiere (normalisiert auf die Kontrollgruppe=1). Dargestellt als Box-Plot mit Median und Interquartilsabstand (Box). Punkte außerhalb des 5. und 95. Perzentils (Whisker) sind als Symbole dargestellt. Für die Vergleiche wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Kontrollgruppe, n=40; 12 h nach MI, n=8; 24h nach MI, n=8; 48 h nach MI, n=8; 72 h nach MI, n=8; 5 d nach MI, n=14; 14 d nach MI, n=7.

4 Diskussion

4.1 Aufnahme und Bereitstellung von Leukozyten nach MI/Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen bisherige Forschungsergebnisse zur Dynamik der Phasen, die nach einem MI ablaufen. Denn wie Nahrendorf, Pittet und Swirski oder Peet et al. konnten auch wir anhand der Daten eine inflammatorische und reparative Phase nach MI identifizieren. Darüber hinaus liefert diese Arbeit eine zeitliche und organspezifische Auflösung, die so noch nicht dargestellt wurde. Durch die ausgewählten Organe und Zeitpunkte liefern diese Daten umfassende Informationen über die Bereitstellung und Aufnahme myeloischer Zellen in das ischämische Myokard nach MI. Diese Daten könnten, zusammen mit ergänzenden Erkenntnissen, zur Entwicklung neuer Ansätze für die gezielte Einflussnahme am Wundheilungsprozesses nach MI genützt werden.

4.2 Inflammatorische Phase

Die ersten 72 h nach MI lassen sich der inflammatorischen Phase zuordnen. Deutlich wird dies, wenn man die Zellen im ischämischen Myokard betrachtet. Der durch Nekrose der Kardiomyozyten ausgelöste Zelltod führt zur Freisetzung intrazellulärer Bestandteile und aktiviert somit das angeborene Immunsystem (Frangogiannis, 2014b). Die leukozytären Hauptakteure der inflammatorischen Reaktion im Herzen stellen Ly6C^{high} Monozyten sowie Makrophagen und neutrophile Granulozyten dar. Neutrophile Granulozyten können die Infarktgröße ausweiten, indem sie zur Entzündung des Gewebes beitragen. Dies geschieht unter anderem dadurch, dass sie toxische (pro-inflammatorische) Substanzen freisetzen. Ly6C^{high} Monozyten tragen zur inflammatorischen Antwort nach MI bei, indem sie nach der Migration in das Myokard zu aktiven Makrophagen werden. Diese Makrophagen setzen eine Vielzahl von Entzündungsstoffen und Zytokinen frei (Bonvini, Hendiri, & Camenzind, 2005).

In diesem Zusammenhang zeigen unsere Ergebnisse, dass die Zellzahl der neutrophilen Granulozyten im Myokard bereits 12 h nach MI um über das 30-fache gegenüber den Kontrolltieren gestiegen ist. Neutrophile Granulozyten wandern also unmittelbar nach MI in großer Anzahl ins Myokard ein. Ihr Maximum erreichen sie 48h nach MI und bleiben auch zum Zeitpunkt 72 h nach MI in ihrer Anzahl stark erhöht. Unsere Daten zeigen zudem, dass im Laufe der beobachteten Zeitpunkte die Entzündung regressiert ist und nach 14 Tagen keine relevante inflammatorische Komponente auf zellulärer Ebene (neutrophile Granulozyten, Ly6C^{high} Monozyten) mehr nachzuweisen ist. Dies bestätigt vorangegangene Forschungsarbeiten, die ebenfalls über eine komplette Inflammationsresolution nach 14 Tagen berichten (M. Nahrendorf et al., 2010).

Ly6C^{high} Monozyten, die zweite Zellpopulation, die zur inflammatorischen Antwort nach einem MI beiträgt, verhalten sich in ihrer Dynamik ähnlich. Die Anzahl der Zellen steigt ebenfalls 12h nach MI an, jedoch nicht so stark wie die der neutrophilen Granulozyten. Innerhalb der ersten 72 h nach MI bleibt auch ihre Zellzahl deutlich erhöht und erreicht ebenfalls zum Zeitpunkt 48 h nach MI ihr Maximum. Die von uns nachgewiesene Kinetik der neutrophilen Granulozyten und Ly6C^{high} Monozyten entspricht somit der bekannten Dynamik: Die Zahl der beiden Zellsubpopulationen ist während der ersten 72 h nach MI stark erhöht (M. Nahrendorf et al., 2010).

Dieser Zeitraum kann somit als Maximum der inflammatorischen Phase im Herzen betrachtet werden.

Bevor neutrophile Granulozyten und Ly6C^{high} Monozyten zur inflammatorischen Antwort im Herzen beitragen können, müssen sie zunächst in größerer Zahl bereitgestellt werden. Dabei müssen sie über die Blutbahn vom Ort der Speicherung oder Produktion zum Herzen transportiert werden. Die Anzahl der Leukozyten im Blut spiegelt also das Verhältnis zwischen Bereitstellung und Aufnahme wider. Die Zahl der neutrophilen Granulozyten im Blut stieg in unseren Versuchen unmittelbar nach MI an und blieb zunächst erhöht. Interessanterweise fällt jedoch die Zellzahl der neutrophilen Granulozyten im Blut zum Zeitpunkt 48 h nach MI bereits wieder ab, wohingegen die Anzahl dieser Zellen im Myokard zu diesem Zeitpunkt den Maximalwert erreicht. Dies suggeriert, dass die Zellen, die innerhalb der ersten Stunden nach MI durch den Blutstrom bereitgestellt werden, im Herzen akkumulieren

und so zum Gipfel am Zeitpunkt 48 h nach MI beitragen. Es scheint, dass es durch den bereits 48 h nach MI einsetzenden Rückgang der Bereitstellung der neutrophilen Granulozyten konsekutiv 72 h nach MI zum Abfall der Anzahl dieser Zellen im ischämischen Myokard kommt. Diese Beobachtung korreliert mit der kurzen Lebensdauer der neutrophilen Granulozyten (Patel et al., 2021). Wie bereits erwähnt wird die Zahl der Zellsubpopulationen im Herzen nach MI durch zwei wesentliche Mechanismen gesteuert: Bereitstellung und Aufnahme. Diese zwei Parameter stehen dabei in einem Verhältnis zueinander, wobei je nach Produktion, Freisetzung und Verbrauch das Gleichgewicht auf einer der beiden Seiten liegen kann. Die Aufnahme an neutrophilen Granulozyten in das ischämische Myokard ist nach MI um ein Vielfaches erhöht (Epelman, Liu, & Mann, 2015; Frangogiannis, 2012). Die Bereitstellung scheint jedoch der entscheidende Faktor für die Anzahl im Herzen zu sein, denn sie übersteigt die Rate, mit der die neutrophilen Granulozyten in das Herz aufgenommen werden, zunächst deutlich, was an der erhöhten Zellzahl im Blut zu sehen ist. Zudem verhält sich die Zellzahl im Myokard, wie bereits beschrieben, um 24 h versetzt, aber parallel zu der bereitgestellten Zellzahl im Blut.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass primär zwar ein großer Abgang der neutrophilen Granulozyten aus dem Blut in das Herz stattfindet, der zeitgleiche Zugang in das Blut aber überwiegt und deshalb zunächst hohe Zellzahlen im Blut gemessen werden können.

Bei den Ly6C^{high} Monozyten zeigt sich in der Zirkulation eine unterschiedliche Dynamik. Die Anzahl dieser Zellen im Blut fällt unmittelbar nach MI gegenüber den Kontrolltieren ab und bleibt bis zum Zeitpunkt 48 h nach MI erniedrigt. Anschließend steigt die Zahl wieder auf das Niveau der Kontrolltiere. Es scheint also als würde die Anzahl der Ly6C^{high} Monozyten im Myokard nicht, wie bei den neutrophilen Granulozyten, primär durch vermehrte Bereitstellung gesteuert. Viel mehr lassen die Daten die Annahme zu, dass die Zahl der Ly6C^{high} Monozyten im Herzen durch die gesteigerte Aufnahme gesteuert wird, denn die Anzahl der Ly6C^{high} Monozyten im Blut bleibt so lange erniedrigt, bis der Maximalwert der Ly6C^{high} Monozyten im Herzen erreicht ist und steigt erst danach wieder an. Zum Zeitpunkt 72 h nach MI nimmt also vermutlich die Rate an ins Herzen migrierende Ly6C^{high} Monozyten ab und bedingt somit einen Anstieg der Anzahl der Ly6C^{high} Monozyten im Blut. Nichtsdestotrotz ist es wahrscheinlich, dass auch die Bereitstellung dieser Zellsubpopulation gesteigert

ist. Es scheint jedoch, dass das Verhältnis zwischen Aufnahme und Bereitstellung dieser Subpopulation eher auf Seiten der gesteigerten Aufnahme liegt.

Zusammenfassend lässt sich diese Dynamik wie folgt schildern: nach MI kommt es zu einem vermehrten Abgang der Ly6C^{high} Monozyten aus dem Blut in das Myokard und im Verhältnis dazu, zu weniger Zugang dieser Zellen in das Blut. Die Zellzahlen im Blut imponieren daher niedriger.

Bevor die Zellen im Blut bereitgestellt werden können, müssen Sie entweder aus den entsprechenden Speichern freigesetzt werden oder produziert werden. Für diesen Aspekt spielen das Knochenmark und die Milz eine entscheidende Rolle (Swirski et al., 2009). Die Anzahl der neutrophilen Granulozyten im Knochenmark fällt zum Zeitpunkt 12 h nach MI gegenüber den Kontrolltieren ab. Vermutlich ist dieser Abfall Ausdruck des schlagartig gesteigerten Bedarfs, der noch nicht durch eine gesteigerte Produktion kompensiert werden kann.

Zwar fällt 12 h nach MI das relative Gewicht der Milz in der Experimentalgruppe, was von einigen Autoren dadurch erklärt wird, dass es zur massiven Ausschwemmung von myeloiden Zellen aus der Milz kommt (Halade, Norris, Kain, Serhan, & Ingle, 2018; Swirski et al., 2009). Die Zellzahl der neutrophilen Granulozyten in der Milz zeigt sich in den Daten dieser Arbeit jedoch zu keinem Zeitpunkt signifikant gegenüber den Kontrolltieren verändert. Mögliche Gründe hierfür werden weiter unten im Text diskutiert.

24 h nach MI unterscheidet sich die Anzahl der neutrophilen Granulozyten im Knochenmark gegenüber den Kontrolltieren nicht, wohingegen sie 48 h nach MI nochmals erniedrigt ist. Möglich wäre, dass, bedingt durch die Lebensdauer der unmittelbar nach MI ins Myokard rekrutierten neutrophilen Granulozyten (circa 24 h), nach 48h wieder ein stark gesteigerter Bedarf vorliegt, der die Produktionsrate übersteigt. Ab dem Zeitpunkt 72 h nach MI unterscheidet sich die Zahl der neutrophilen Granulozyten im Knochenmark nicht mehr von der der Kontrollgruppe oder ist sogar, vermutlich kompensatorisch, etwas erhöht.

Ähnlich verhält es sich mit den Ly6C^{high} Monozyten im Knochenmark. Die Zahl dieser fällt unmittelbar nach MI, vermutlich als Folge des massiv gesteigerten Bedarfs gegenüber den Kontrolltieren ab. Danach steigt die Anzahl jedoch wieder auf das Level der Kontrolltiere und ist 72 h nach MI sogar leicht erhöht. Auch dieser Gipfel könnte einer kompensatorisch gesteigerten Produktion mit nachlassendem

Verbrauch geschuldet sein. Bei den Ly6C^{high} Monozyten kommt es nicht wie bei den neutrophilen Granulozyten zu einem wellenförmigen Verlauf der Zellzahl im Knochenmark während der inflammatorischen Phase. Grund hierfür könnte die längere Lebensdauer der Monozyten/Makrophagen sein und ein damit einhergehender kontinuierlicher Bedarf im Gegensatz zu einem eher punktuellen Bedarf bei den neutrophilen Granulozyten.

4.3 Reparative Phase

Ab circa 72h nach MI beginnt die inflammatorische Phase in die reparative Phase überzugehen. Ly6C^{low} Monozyten sind zwar primär als Zellen der reparativen Phase zu nennen, jedoch können auch aus Ly6C^{high} Monozyten in der späteren Heilungsphase reparative Makrophagen entstehen (Hilgendorf et al., 2014). Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Anzahl der Ly6C^{low} Monozyten im Herzen zwar bereits 24 h nach MI steigt, die Maximalwerte jedoch erst 72 h nach MI, also zum Beginn der reparativen Phase, erreicht werden. Die Zahl bleibt auch an den Zeitpunkten 5 d und 14 d nach MI signifikant erhöht und ist dabei Ausdruck der stattfindenden reparativen Phase (M. Nahrendorf et al., 2010).

Die Anzahl an Ly6C^{low} Monozyten im Blut ist unmittelbar, 12 h nach MI bis 48 h nach MI, leicht, aber signifikant erniedrigt. Im Zeitraum 72 h nach MI bis 14 d nach MI bleibt die Zellzahl der Ly6C^{low} Monozyten gegenüber den Kontrolltieren leicht erhöht. Es scheint also, dass bis zum Zeitpunkt 48 h nach MI der Nachschub der Ly6C^{low} Monozyten aus Produktionsstätten und Speicherstätten nicht ausreicht, um die gesteigerte Aufnahme zu kompensieren. Dabei muss dennoch die Anzahl an Ly6C^{low} Monozyten, die zum Zeitpunkt 48 h ins Blut freigesetzt wird, erhöht sein, denn zu diesem Zeitpunkt kommt es wie bereits erwähnt zu einem deutlichen Anstieg der Anzahl an Ly6C^{low} Monozyten im ischämischen Myokard. Ohne eine gesteigerte Freisetzung in das Blut wäre der Abfall der Zahl der zirkulierenden Ly6C^{low} Monozyten höchstwahrscheinlich deutlich ausgeprägter.

Die Bereitstellung der zirkulierenden Ly6C^{low} Monozyten erfolgt, wie bei den neutrophilen Granulozyten und Ly6C^{high} Monozyten, mittels gesteigerter Produktion und vermehrter Freisetzung. Wie bereits in der Einleitung erwähnt sind dafür vor allem das Knochenmark und die Milz von Bedeutung. Die Anzahl der Ly6C^{low} Monozyten im

Knochenmark bleibt bis zum Zeitpunkt 48 h nach MI nahezu unverändert, um dann signifikant zu sinken. Grund hierfür könnte ein, ab diesem Zeitpunkt, drastisch gesteigerter Bedarf sein, der nicht mehr durch die Produktion gedeckt wird. Dabei könnten neben dem Bedarf im Herzen auch ein Wiederauffüllen der Speicher (z.B. Milz) eine weitere Komponente darstellen. Zum Zeitpunkt 14 d nach MI steigt die Zahl wieder und unterscheidet sich nicht mehr signifikant gegenüber der Kontrollgruppe. Zum Zeitpunkt 48 h, also kurz vor Beginn der reparativen Phase, war die Anzahl der Ly6C^{low} Monozyten sowohl im Knochenmark als auch im Blut erniedrigt. Im Myokard stieg die Zahl zu diesem Zeitpunkt bereits signifikant. Möglich wäre also, dass die Ly6C^{low} Monozyten zum Zeitpunkt 48 h durch eine beginnende stark gesteigerte Aufnahme im selben oder größerem Ausmaß aus dem Blut in das Myokard rekrutiert werden, wie sie aus dem Knochenmark in das Blut freigesetzt werden. Zu diesem Zeitpunkt scheint die Produktion also nicht ausreichend erhöht zu sein, um die Blutspiegel der Ly6C^{low} Monozyten konstant zu halten. Dies ist erst ab dem Zeitpunkt 72 h der Fall. Ab diesem Zeitpunkt wirkt es so, als ob die Bereitstellung durch das Knochenmark auszureichen, um die Zahl der Ly6C^{low} Monozyten im Blut, trotz gesteigerter Aufnahme in das Herz, wieder auf das Level der Kontrolltiere zu heben. Während der reparativen Phase, also des Zeitraums ab 72 h nach MI ist die Anzahl der Ly6C^{low} Monozyten im Blut und Herzen erhöht. Die Zahl im Knochenmark fällt jedoch auf ein Niveau unterhalb dem der Kontrolltiere. Denkbar wäre also, dass der Bedarf innerhalb dieser Phase durch Rekrutierung aus dem Knochenmark gedeckt wird und ausreicht, um die Anzahl im Herzen zu erhöhen und gleichzeitig die Blutspiegel stabil zu halten. Zu diesen Zeitpunkten scheint jedoch die Produktion nicht suffizient genug zu sein, um auch die Level innerhalb des Knochenmarks auf dem Ausgangsniveau zu halten.

Die Anzahl der Ly6C^{low} Monozyten in der Milz verändert sich gegenüber den Kontrolltieren zu keinem Zeitpunkt signifikant. Es lässt sich anhand unserer Ergebnisse also keine Aussage über die Rolle der Milz für die Bereitstellung der Ly6C^{low} Monozyten nach MI treffen. Andere Gruppen konnten jedoch zeigen, dass die Milz maßgeblich zur Bereitstellung der Monozyten nach MI beiträgt (Swirski et al., 2009). Die Gründe, warum unsere Daten eine solche Aussage nicht zulassen, werden an nachfolgender Stelle diskutiert.

4.4 Zusammenfassung zeitliche Auflösung

Zusammengefasst lässt sich die Kinetik der myeloiden Zellen nach MI in die bekannten zwei Phasen (inflammatorisch und reparativ) einteilen. Die ersten drei Tage nach MI finden sich erhöhte Level von neutrophilen Granulozyten und Ly6C^{high} Monozyten im Myokard. Ab 72 h steigt die Anzahl der Ly6C^{low} Monozyten im Myokard, während die Zahl der inflammatorischen Zellen abnimmt. Neben der Anzahl im Myokard verändern sich auch die Zellzahlen in den betrachteten hämatopoetischen Organen. Die relevanten Beobachtungen lassen sich dabei wie folgt zusammenfassen:

Die Anzahl der neutrophilen Granulozyten im Blut verhält sich um 24 h versetzt zu der im Herzen. Bevor die Zellzahl im Herzen steigt, steigt sie zunächst im Blut und ebenso fällt sie erst im Blut, bevor sie im Herzen abnimmt. Die Anzahl der Ly6C^{high} Monozyten im Blut ist hingegen nahezu über den kompletten Zeitraum der inflammatorischen Phase erniedrigt (12 h bis 48 h). Die Zahl beider Zellsubpopulationen fällt im Knochenmark 12 h nach MI signifikant und kehrt mit Ende der inflammatorischen Phase wieder auf das Niveau der Kontrolltiere zurück.

Die Zahl der Ly6C^{low} Monozyten im Myokard steigt bereits zum Zeitpunkt 24 h nach MI leicht an. Es werden also bevor die inflammatorische Phase in die reparative Phase übergeht, Ly6C^{low} Monozyten in das Myokard rekrutiert. In dieser Zeit sinkt die Anzahl der Ly6C^{low} Monozyten im Blut. Dies liegt vermutlich daran, dass erst ab Beginn der reparativen Phase eine gesteigerte Produktion der Ly6C^{low} Monozyten, die einen konstanten Blutspiegel ermöglicht, einsetzt. Die Maximalwerte im Herzen werden zum Beginn der reparativen Phase erreicht. Bis zum Zeitpunkt 14 d nach MI bleiben die Werte, als Ausdruck der reparativen Prozesse, erhöht. In dem Zeitraum der reparativen Phase ist die Zahl der Ly6C^{low} Monozyten im Knochenmark unterhalb dem der Kontrolltiere. Die Zellzahl im Knochenmark kehrt erst 14 d nach MI wieder auf das Niveau der Kontrolltiere zurück. Diese Beobachtung deckt sich mit der Annahme, dass nach 14 d die reparative Phase terminiert ist (Prabhu & Frangogiannis, 2016).

4.5 Subpopulationsspezifische Kinetik nach MI

Anhand der erhobenen Daten lässt sich vor allem eine Aussage über die Kinetik der betrachteten Subpopulationen treffen. Dabei scheint die Anzahl der myeloiden Zellen im Herzen über zwei Mechanismen gesteuert zu sein. Die zeitliche Auflösung der Zellzahlen deutet darauf hin, dass die Anzahl im Myokard primär über die Aufnahme (Monozyten) aus dem Blut ins Myokard oder über die bereitgestellte Menge im Blut (neutrophile Granulozyten) gesteuert beziehungsweise vorgegeben wird. Zusammengefasst lässt sich diese Annahme vor allem an der bereitgestellten Anzahl der Zellsubpopulationen im Blut ableiten. Während die Zahl der neutrophilen Granulozyten im Blut einen Verlauf mit Maximum hat, bleibt die Zahl der Monozyten im Blut weitestgehend stabil. Die Anzahl der neutrophilen Granulozyten im Herzen folgt, mit einem zeitlichen Versatz von 24h, der Anzahl im Blut. Die Zahl der Monozyten/Makrophagen im Herzen hingegen tut dies nicht.

Die Erkenntnis über die individuelle Kinetik der Subpopulationen bietet zwei neue Angriffspunkte, um den Verlauf nach einem MI therapeutisch zu manipulieren. So könnte, in Zusammenschau mit weiterem Hintergrundwissen zu den einzelnen Subpopulationen nach MI, die Aufnahme oder die Bereitstellung therapeutisch beeinflusst werden.

4.6 Phänotypische Auflösung der Monozyten, neutrophilen Granulozyten und Endothelzellen

Zusammenfassend lässt sich aussagen, dass die Erkenntnis über die unterschiedliche Kinetik der myeloiden Subpopulationen durch weitere Untersuchungen ergänzt werden muss. Besonders die Bereitstellung der Zellen sollte durch Wissen zur genauen Abstammung komplementiert werden. Wie genau die Aufnahme der Zellen in das ischämische Myokard erfolgt, sollte durch phänotypische Untersuchungen erweitert werden. Insbesondere die Endothelzellen spielen bei der Aufnahme eine entscheidende Rolle.

Genauer ist neben der zeitlichen Auflösung der myeloiden Zellen eine phänotypische Auflösung von entscheidender Bedeutung, um ein besseres Verständnis der zellulären Prozesse, die auf einen MI folgen, zu bekommen. Kenntnis darüber, wann welche

Zellen produziert, freigesetzt und schlussendlich in das Herz aufgenommen werden, ist zwar fundamental; um aber gezielt intervenieren sowie neue Therapeutika entwickeln zu können, bedarf es aber zudem Wissen über den genauen zellulären Phänotyp. In diesem Zusammenhang sind speziell myeloide Zellen von Bedeutung, aber auch kardiale Endothelzellen. Ausstehend sind jedoch Arbeiten, die eine solche phänotypische Auflösung der Zellsubpopulationen für alle beteiligten Organe über einen längeren Zeitraum nach MI abbilden.

Des Weiteren zeigen die Daten dieser Arbeit zwar die verschiedenen Zellzahlen der Zellsubpopulationen zu bestimmten Zeitpunkten nach MI, weshalb Annahmen über Bereitstellung und Aufnahme der einzelnen Zellen getroffen werden können. Schlussendlich ist es aber ebenso wichtig, zukünftig genaue Aussagen über die Abstammung einzelner Zellen treffen zu können. Dieses Wissen würde dazu beitragen, einen noch detaillierteren Blick auf das Geschehen nach MI zu erlangen. In Zusammenschau mit zeitlicher und phänotypischer Auflösung hätte man damit Kenntnisse über die genaue Herkunft der Zellen und somit eine dritte Komponente, die Herkunfts-spezifische Auflösung, gewonnen.

Abstammungsanalysen, die sich mit der Herkunft der myeloiden Zellen, die in das ischämische Myokard einwandern, beschäftigen, gibt es bereits. Diese sind jedoch nicht von der nötigen zeitlichen Auflösung und decken meist auch nicht die volle phänotypische Breite der Zellsubpopulationen ab, die vonnöten wäre. Für Makrophagen gibt es fundiertes Vorwissen zu dieser Frage (Heidt et al., 2014). Dabei ist es etabliert, dass Makrophagen im gesunden Myokard auf embryonale Vorläufer zurückgehen und sich lokal selbst erneuern (Epelman et al., 2014). Ein Großteil der unmittelbar nach MI auftretenden Makrophagen stammt jedoch von zirkulierenden Monozyten ab (Honold & Nahrendorf, 2018). Abstammungsanalysen, die zudem zusätzlich eine breite zeitliche Komponente beinhalten und die relevanten Phasen nach MI abdecken, wären ein großer Gewinn zum weiteren Entschlüsseln der Möglichkeiten, in die Wundheilung einzugreifen. Außerdem sollten alle beteiligten Organe bedacht und alle relevanten Zellsubpopulationen eingeschlossen werden.

4.7 Klinische Bedeutung der Arbeit

Die Monozytenzahl im Blut nach einem Herzinfarkt korreliert positiv mit dem linksventrikulären enddiastolischen Volumen und negativ mit der Ejektionsfraktion bei Patienten (Maekawa et al., 2002). Neben dieser Korrelation gibt es wie bereits mehrfach erwähnt deutliche Beweise dafür, dass myeloide Zellen die Wundheilung im Herzen nach MI maßgeblich beeinflussen (Peet et al., 2020). Es wird intensiv an der Identifikation von therapeutischen Zielen zur Verringerung des Ausmaßes eines akuten MIs geforscht. Myeloide Zellen wurden hierbei als potente Angriffspunkte für eine Manipulation der Wundheilung adressiert (Andreadou et al., 2019). Die von verschiedenen Gruppen studierten entzündungshemmenden Therapien haben es jedoch nicht geschafft, die Größe des Infarkts zu verringern und die klinischen Ergebnisse bei MI-Patienten zu verbessern (Saxena et al., 2016). Um erfolgsversprechende Chancen auf eine verbesserte Applikation der entzündungshemmenden Therapien aus experimentellen Studien in das klinische Setting zu ermöglichen, bedarf es verbesserten Hintergrundwissens. Darunter zählt vor allem die Auswahl des geeigneten Ziels, also der relevanten Subpopulation, zum richtigen Zeitpunkt, oder die Kombination mehrerer Ziele. Das richtige Timing kann durch eine zeitliche Auflösung, wie sie diese Arbeit bietet, identifiziert werden. Zur Auswahl der relevanten Subpopulationen bedarf es einer zusätzlichen, umfassenden phänotypischen Auflösung. Für pharmakologische Angriffspunkte wird zudem eine genaue Auflösung der Abstammung der Subpopulationen benötigt. Die derzeitige Lücke zwischen unserem aktuellen Wissen und den therapeutischen Strategien könnte durch neue Erkenntnisse und Kombination dieser drei Punkte geschlossen werden. Die Erkenntnis, dass sich die verschiedenen Subpopulationen in ihrer Kinetik unterscheiden, ist das zentrale Ergebnis dieser Arbeit und sollte bei zukünftigen Untersuchungen und Therapieansätzen bedacht werden.

4.8 Limitationen der Daten

Mehrere Faktoren sollten bei dem Betrachten der Daten berücksichtigt werden, denn es gibt Umstände, die vom ausgewählten Experimentaufbau nur unzureichend

abgedeckt werden. Ein murines Tiermodell eignet sich zwar gut bezüglich genetischer Gleichheit der Versuchstiere und ermöglicht es, eine relativ große Zahl an Individuen einzuschließen, gleicht aber nicht in allen Grundvoraussetzungen den Bedingungen im Menschen. Insbesondere ist die Zusammensetzung der humanen Leukozyten eine andere als die der murinen Versuchstiere. Das Verhältnis zwischen Lymphozyten und Neutrophilen unterscheidet sich dabei stark: menschliches Blut ist reich an Neutrophilen (50-70% Neutrophile, 30-50% Lymphozyten), während im Blut von Mäusen die Lymphozyten stark überwiegen (75-90% Lymphozyten, 10-25% Neutrophile) (Mestas & Hughes, 2004). Diese Tatsache sollte bei der Interpretation der Daten beachtet werden, da der Effekt, den die neutrophilen Granulozyten oder Monozyten/Makrophagen auf die Wundheilungsphase nach MI haben, beim Menschen größer sein könnte. Dies wäre allein dadurch zu erklären, dass diese Zellen im Menschen prozentual häufiger vertreten sind. Zudem sollte bedacht werden, dass es sich beim verwendeten MI-Modell um eine permanente Ligatur handelte. Dieses Modell ist gut etabliert und unsere Arbeitsgruppe/ der Operateur verfügt über eine große Expertise mit diesem Modell. Beim Menschen kommt es nach Herzinfarkt oft jedoch zu einer Reperfusion des betroffenen Myokards, da mittels Herzkatheter-Eingriff die auslösende Okklusion wieder beseitigt wird.

Orientierend lässt sich sagen, dass die Unterschiede zwischen nicht-reperfundierten und reperfundierten Infarktmodellen im Folgenden bestehen: Für Studien, die sich mit der Kardioprotektion und der Bewertung von Strategien zur weiteren Optimierung der derzeitigen Behandlung befassen, sollte das Reperfusion-MI-Modell verwendet werden. Für Studien, die sich mit der Minderung des Risikos der Entwicklung von Herzinsuffizienz nach einem Infarkt befassen, ist es am besten, ein nicht-reperfundiertes MI-Modell zu verwenden. Dies liegt daran, dass die Wundheilung und Narbenbildung bei einem nicht-reperfundierten MI ausgeprägter ist (Lindsey et al., 2021). Zusätzlich bietet das Reperfusion-MI Modell weitere Nachteile, die in der Natur des operativen Eingriffs liegen. Die Operation hat eine längere Dauer als die des nicht-Reperfusion-Modells, welche unter anderem mit einer erhöhten Narkosebelastung für die Tiere einhergeht. Zudem ist das Infektionsrisiko beim Reperfusion-Modell deutlich höher als beim nicht-Reperfusion-Modell (Xu, Alloush, Beck, & Weisleder, 2014). Aus diesen Gründen haben wir uns für ein permanentes Ligaturmodell entschieden.

Die Daten, die die Zusammensetzung der Subpopulationen in der Milz widerspiegeln, deckten sich nach der Auswertung unserer Experimente nicht mit bereits bekannten Daten. Dort wurde nachgewiesen, dass es nach MI zu einer massiven Freisetzung von Monozyten aus der Milz kommt (M. Nahrendorf et al., 2010). Durch diese Freisetzung fällt die Anzahl an Monozyten in der Milz vor allem am ersten Tag nach MI (Swirski et al., 2009).

Eine Erklärung dafür, dass unsere Daten von den bereits publizierten Daten abweichen, könnte eine zu geringe Anzahl an Versuchstieren sein. Zusätzlich führte die sehr zellreiche Suspension, die aus dem Milzproben gewonnen wurde, teilweise dazu, dass die Durchflussskammer unseres Durchflusszytometers okkludierte. Womöglich ist es aus selbem Grunde zu fehlerhaften Messungen gekommen, welche sich in den abweichenden Daten widerspiegeln. Weitere Experimente, in denen das Protokoll dahingehend abgeändert wird, dass die Milz-Proben besser analysiert werden können, sind ausstehend.

5 Literaturverzeichnis

- Alkarithi, G., Duval, C., Shi, Y., Macrae, F. L., & Ariens, R. A. S. (2021). Thrombus Structural Composition in Cardiovascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *41*(9), 2370-2383. doi:10.1161/ATVBAHA.120.315754
- Andreadou, I., Cabrera-Fuentes, H. A., Devaux, Y., Frangogiannis, N. G., Frantz, S., Guzik, T., . . . Hausenloy, D. J. (2019). Immune cells as targets for cardioprotection: new players and novel therapeutic opportunities. *Cardiovasc Res*, *115*(7), 1117-1130. doi:10.1093/cvr/cvz050
- Bentzon, J. F., Otsuka, F., Virmani, R., & Falk, E. (2014). Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circulation research*, *114*(12), 1852-1866.
- Beutler, B. (2004). Innate immunity: an overview. *Mol Immunol*, *40*(12), 845-859. doi:10.1016/j.molimm.2003.10.005
- Biosciences, B. BD LRS Fortessa Brochure. Retrieved from https://www.bdbiosciences.com/content/dam/bdb/marketing-documents/bd_lsrfortessa_brochure_resource.pdf
- Böcker, W., Denk, H., Heitz, P. U., Moch, H., Höfler, G., & Kreipe, H. (2019). *Lehrbuch Pathologie*: Elsevier Health Sciences.
- Bonvini, R. F., Hendiri, T., & Camenzind, E. (2005). Inflammatory response post-myocardial infarction and reperfusion: a new therapeutic target? *European Heart Journal Supplements*, *7*(suppl_1), I27-I36. doi:10.1093/eurheartj/sui077
- Bratton, D. L., & Henson, P. M. (2011). Neutrophil clearance: when the party is over, clean-up begins. *Trends Immunol*, *32*(8), 350-357. doi:10.1016/j.it.2011.04.009
- Burke, A. P., & Virmani, R. (2007). Pathophysiology of acute myocardial infarction. *Medical Clinics of North America*, *91*(4), 553-572.
- Chen, F., Wu, W., Millman, A., Craft, J. F., Chen, E., Patel, N., . . . Gause, W. C. (2014). Neutrophils prime a long-lived effector macrophage phenotype that mediates accelerated helminth expulsion. *Nat Immunol*, *15*(10), 938-946. doi:10.1038/ni.2984
- Cohen, M., & Visveswaran, G. (2020). Defining and managing patients with non-ST-elevation myocardial infarction: Sorting through type 1 vs other types. *Clin Cardiol*, *43*(3), 242-250. doi:10.1002/clc.23308
- Cook, C., Cole, G., Asaria, P., Jabbour, R., & Francis, D. P. (2014). The annual global economic burden of heart failure. *Int J Cardiol*, *171*(3), 368-376. doi:10.1016/j.ijcard.2013.12.028
- Crea, F., & Libby, P. (2017). Acute Coronary Syndromes: The Way Forward From Mechanisms to Precision Treatment. *Circulation*, *136*(12), 1155-1166. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.117.029870
- Crespo-Leiro, M. G., Anker, S. D., Maggioni, A. P., Coats, A. J., Filippatos, G., Ruschitzka, F., . . . Heart Failure Association of the European Society of, C. (2016). European Society of Cardiology Heart Failure Long-Term Registry (ESC-HF-LT): 1-year follow-up outcomes and differences across regions. *Eur J Heart Fail*, *18*(6), 613-625. doi:10.1002/ejhf.566
- Dancey, J. T., Deubelbeiss, K. A., Harker, L. A., & Finch, C. A. (1976). Neutrophil kinetics in man. *J Clin Invest*, *58*(3), 705-715. doi:10.1172/JCI108517
- Deutschland, S. B. (2021). *Todesursachenstatistik*.

- DGK. (01/2018). Presstext Retrieved from <https://dgk.org/daten/PA-Herzinfarkt-17012018.pdf>
- Dolgin, M., Committee, N. Y. H. A. C., Fox, A. C., & Levin, R. I. (1994). *Nomenclature and Criteria for Diagnosis of Diseases of the Heart and Great Vessels*: Little, Brown.
- Dutta, P., & Nahrendorf, M. (2015). Monocytes in myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *35*(5), 1066-1070. doi:10.1161/ATVBAHA.114.304652
- Epelman, S., Lavine, K. J., Beaudin, A. E., Sojka, D. K., Carrero, J. A., Calderon, B., . . . Mann, D. L. (2014). Embryonic and adult-derived resident cardiac macrophages are maintained through distinct mechanisms at steady state and during inflammation. *Immunity*, *40*(1), 91-104. doi:10.1016/j.immuni.2013.11.019
- Epelman, S., Liu, P. P., & Mann, D. L. (2015). Role of innate and adaptive immune mechanisms in cardiac injury and repair. *Nat Rev Immunol*, *15*(2), 117-129. doi:10.1038/nri3800
- Falk, E., Nakano, M., Bentzon, J. F., Finn, A. V., & Virmani, R. (2013). Update on acute coronary syndromes: the pathologists' view. *European heart journal*, *34*(10), 719-728.
- Foo, C. Y., Bonsu, K. O., Nallamothu, B. K., Reid, C. M., Dhipayom, T., Reidpath, D. D., & Chaiyakunapruk, N. (2018). Coronary intervention door-to-balloon time and outcomes in ST-elevation myocardial infarction: a meta-analysis. *Heart*, *104*(16), 1362-1369. doi:10.1136/heartjnl-2017-312517
- Frangogiannis, N. G. (2006). The mechanistic basis of infarct healing. *Antioxid Redox Signal*, *8*(11-12), 1907-1939. doi:10.1089/ars.2006.8.1907
- Frangogiannis, N. G. (2012). Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. *Circ Res*, *110*(1), 159-173. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.243162
- Frangogiannis, N. G. (2014a). The immune system and the remodeling infarcted heart: cell biological insights and therapeutic opportunities. *J Cardiovasc Pharmacol*, *63*(3), 185-195. doi:10.1097/FJC.0000000000000003
- Frangogiannis, N. G. (2014b). The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling. *Nat Rev Cardiol*, *11*(5), 255-265. doi:10.1038/nrcardio.2014.28
- Frangogiannis, N. G., Smith, C. W., & Entman, M. L. (2002). The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res*, *53*(1), 31-47. doi:10.1016/s0008-6363(01)00434-5
- Frantz, S., & Nahrendorf, M. (2014). Cardiac macrophages and their role in ischaemic heart disease. *Cardiovasc Res*, *102*(2), 240-248. doi:10.1093/cvr/cvu025
- Gordon, S., & Taylor, P. R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*, *5*(12), 953-964. doi:10.1038/nri1733
- Greenlee-Wacker, M. C. (2016). Clearance of apoptotic neutrophils and resolution of inflammation. *Immunol Rev*, *273*(1), 357-370. doi:10.1111/imr.12453
- Halade, G. V., Norris, P. C., Kain, V., Serhan, C. N., & Ingle, K. A. (2018). Splenic leukocytes define the resolution of inflammation in heart failure. *Sci Signal*, *11*(520). doi:10.1126/scisignal.aao1818
- Hasche, E. T., Fernandes, C., Freedman, S. B., & Jeremy, R. W. (1995). Relation between ischemia time, infarct size, and left ventricular function in humans. *Circulation*, *92*(4), 710-719. doi:10.1161/01.cir.92.4.710
- Heidt, T., Courties, G., Dutta, P., Sager, H. B., Sebas, M., Iwamoto, Y., . . . Nahrendorf, M. (2014). Differential contribution of monocytes to heart macrophages in steady-state and after myocardial infarction. *Circ Res*, *115*(2), 284-295. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.303567

- Hilgendorf, I., Gerhardt, L. M., Tan, T. C., Winter, C., Holderried, T. A., Chousterman, B. G., . . . Swirski, F. K. (2014). Ly-6Chigh monocytes depend on Nr4a1 to balance both inflammatory and reparative phases in the infarcted myocardium. *Circ Res*, *114*(10), 1611-1622. doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.303204
- Honold, L., & Nahrendorf, M. (2018). Resident and Monocyte-Derived Macrophages in Cardiovascular Disease. *Circ Res*, *122*(1), 113-127. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.311071
- Hulsmans, M., Sam, F., & Nahrendorf, M. (2016). Monocyte and macrophage contributions to cardiac remodeling. *J Mol Cell Cardiol*, *93*, 149-155. doi:10.1016/j.yjmcc.2015.11.015
- Ibanez, B., James, S., Agewall, S., Antunes, M. J., Bucciarelli-Ducci, C., Bueno, H., . . . Group, E. S. C. S. D. (2018). 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*, *39*(2), 119-177. doi:10.1093/eurheartj/ehx393
- Italiani, P., & Boraschi, D. (2017). Development and Functional Differentiation of Tissue-Resident Versus Monocyte-Derived Macrophages in Inflammatory Reactions. *Results Probl Cell Differ*, *62*, 23-43. doi:10.1007/978-3-319-54090-0_2
- Jakubzick, C., Gautier, E. L., Gibbings, S. L., Sojka, D. K., Schlitzer, A., Johnson, T. E., . . . Condon, T. (2013). Minimal differentiation of classical monocytes as they survey steady-state tissues and transport antigen to lymph nodes. *Immunity*, *39*(3), 599-610. Retrieved from [https://www.cell.com/immunity/pdf/S1074-7613\(13\)00335-X.pdf](https://www.cell.com/immunity/pdf/S1074-7613(13)00335-X.pdf)
- Jia, H., Abtahian, F., Aguirre, A. D., Lee, S., Chia, S., Lowe, H., . . . Jang, I. K. (2013). In vivo diagnosis of plaque erosion and calcified nodule in patients with acute coronary syndrome by intravascular optical coherence tomography. *J Am Coll Cardiol*, *62*(19), 1748-1758. doi:10.1016/j.jacc.2013.05.071
- Johansson, S., Rosengren, A., Young, K., & Jennings, E. (2017). Mortality and morbidity trends after the first year in survivors of acute myocardial infarction: a systematic review. *BMC Cardiovasc Disord*, *17*(1), 53. doi:10.1186/s12872-017-0482-9
- Katrukha, I. A. (2013). Human cardiac troponin complex. Structure and functions. *Biochemistry (Mosc)*, *78*(13), 1447-1465. doi:10.1134/S0006297913130063
- Keeley, E. C., Boura, J. A., & Grines, C. L. (2003). Primary angioplasty versus intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: a quantitative review of 23 randomised trials. *Lancet*, *361*(9351), 13-20. doi:10.1016/S0140-6736(03)12113-7
- Kolaczkowska, E., & Kubes, P. (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*, *13*(3), 159-175. doi:10.1038/nri3399
- Korkosz, M., Bukowska-Strakova, K., Sadis, S., Grodzicki, T., & Siedlar, M. (2012). Monoclonal antibodies against macrophage colony-stimulating factor diminish the number of circulating intermediate and nonclassical (CD14⁺⁺ CD16⁺/CD14⁺ CD16⁺⁺) monocytes in rheumatoid arthritis patient. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, *119*(22), 5329-5330. doi: 10.1182/blood-2012-02-412551
- Kratofil, R. M., Kubes, P., & Deniset, J. F. (2017). Monocyte Conversion During Inflammation and Injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *37*(1), 35-42. doi:10.1161/ATVBAHA.116.308198
- Lawrence, S. M., Corriden, R., & Nizet, V. (2018). The Ontogeny of a Neutrophil: Mechanisms of Granulopoiesis and Homeostasis. *Microbiol Mol Biol Rev*, *82*(1). doi:10.1128/MMBR.00057-17

- Lecour, S., Botker, H. E., Condorelli, G., Davidson, S. M., Garcia-Dorado, D., Engel, F. B., . . . Hausenloy, D. J. (2014). ESC working group cellular biology of the heart: position paper: improving the preclinical assessment of novel cardioprotective therapies. *Cardiovasc Res*, *104*(3), 399-411. doi:10.1093/cvr/cvu225
- Lindsey, M. L., de Castro Bras, L. E., DeLeon-Pennell, K. Y., Frangogiannis, N. G., Halade, G. V., O'Meara, C. C., . . . Brunt, K. R. (2021). Reperfused vs. nonreperfused myocardial infarction: when to use which model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *321*(1), H208-H213. doi:10.1152/ajpheart.00234.2021
- Liu, K., Waskow, C., Liu, X., Yao, K., Hoh, J., & Nussenzweig, M. (2007). Origin of dendritic cells in peripheral lymphoid organs of mice. *Nat Immunol*, *8*(6), 578-583. doi:10.1038/ni1462
- Maekawa, Y., Anzai, T., Yoshikawa, T., Asakura, Y., Takahashi, T., Ishikawa, S., . . . Ogawa, S. (2002). Prognostic significance of peripheral monocytosis after reperfused acute myocardial infarction: a possible role for left ventricular remodeling. *J Am Coll Cardiol*, *39*(2), 241-246. doi:10.1016/s0735-1097(01)01721-1
- McCarthy, C. P., Raber, I., Chapman, A. R., Sandoval, Y., Apple, F. S., Mills, N. L., & Januzzi, J. L., Jr. (2019). Myocardial Injury in the Era of High-Sensitivity Cardiac Troponin Assays: A Practical Approach for Clinicians. *JAMA Cardiol*, *4*(10), 1034-1042. doi:10.1001/jamacardio.2019.2724
- McComb, S., Thiriot, A., Akache, B., Krishnan, L., & Stark, F. (2019). Introduction to the Immune System. *Methods Mol Biol*, *2024*, 1-24. doi:10.1007/978-1-4939-9597-4_1
- McKinnon, K. M. (2018). Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol*, *120*, 5 1 1-5 1 11. doi:10.1002/cpim.40
- Mendis, S., Thygesen, K., Kuulasmaa, K., Giampaoli, S., Mähönen, M., Ngu Blackett, K., . . . infarction, W. g. o. b. o. t. p. e. o. t. W. c. f. r. o. W. d. o. m. (2011). World Health Organization definition of myocardial infarction: 2008–09 revision. *International journal of epidemiology*, *40*(1), 139-146.
- Mestas, J., & Hughes, C. C. (2004). Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol*, *172*(5), 2731-2738. doi:10.4049/jimmunol.172.5.2731
- Mewton, N., Roubille, F., Bresson, D., Prieur, C., Bouletti, C., Bochaton, T., . . . Angoulvant, D. (2021). Effect of Colchicine on Myocardial Injury in Acute Myocardial Infarction. *Circulation*, *144*(11), 859-869. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.121.056177
- Michaud, K., Basso, C., d'Amati, G., Giordano, C., Kholova, I., Preston, S. D., . . . Association for European Cardiovascular, P. (2020). Diagnosis of myocardial infarction at autopsy: AECVP reappraisal in the light of the current clinical classification. *Virchows Arch*, *476*(2), 179-194. doi:10.1007/s00428-019-02662-1
- Moran, A. E., Forouzanfar, M. H., Roth, G. A., Mensah, G. A., Ezzati, M., Flaxman, A., . . . Naghavi, M. (2014). The global burden of ischemic heart disease in 1990 and 2010: the Global Burden of Disease 2010 study. *Circulation*, *129*(14), 1493-1501. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.004046
- Mozaffarian, D., Benjamin, E. J., Go, A. S., Arnett, D. K., Blaha, M. J., Cushman, M., . . . Stroke Statistics, S. (2015). Heart disease and stroke statistics--2015 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*, *131*(4), e29-322. doi:10.1161/CIR.0000000000000152
- Nable, J. V., & Brady, W. (2009). The evolution of electrocardiographic changes in ST-segment elevation myocardial infarction. *Am J Emerg Med*, *27*(6), 734-746. doi:10.1016/j.ajem.2008.05.025

- Nahrendorf, M., Pittet, M. J., & Swirski, F. K. (2010). Monocytes: protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction. *Circulation*, *121*(22), 2437-2445. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.916346
- Nahrendorf, M., & Swirski, F. K. (2013). Monocyte and macrophage heterogeneity in the heart. *Circulation research*, *112*(12), 1624-1633.
- Nahrendorf, M., & Swirski, F. K. (2016). Abandoning M1/M2 for a Network Model of Macrophage Function. *Circ Res*, *119*(3), 414-417. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.309194
- Nahrendorf, M., Swirski, F. K., Aikawa, E., Stangenberg, L., Wurdinger, T., Figueiredo, J. L., . . . Pittet, M. J. (2007). The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med*, *204*(12), 3037-3047. doi:10.1084/jem.20070885
- Nauseef, W. M., & Borregaard, N. (2014). Neutrophils at work. *Nat Immunol*, *15*(7), 602-611. doi:10.1038/ni.2921
- Oeing, C. U., Tschöpe, C., & Pieske, B. (2016). [The new ESC Guidelines for acute and chronic heart failure 2016]. *Herz*, *41*(8), 655-663. doi:10.1007/s00059-016-4496-3
- Ong, S. B., Hernandez-Resendiz, S., Crespo-Avilan, G. E., Mukhametshina, R. T., Kwek, X. Y., Cabrera-Fuentes, H. A., & Hausenloy, D. J. (2018). Inflammation following acute myocardial infarction: Multiple players, dynamic roles, and novel therapeutic opportunities. *Pharmacol Ther*, *186*, 73-87. doi:10.1016/j.pharmthera.2018.01.001
- Parkin, J., & Cohen, B. (2001). An overview of the immune system. *Lancet*, *357*(9270), 1777-1789. doi:10.1016/S0140-6736(00)04904-7
- Parviz, Y., Waleed, M., Vijayan, S., Adlam, D., Lavi, S., Al Nooryani, A., . . . Stone, G. W. (2019). Cellular and molecular approaches to enhance myocardial recovery after myocardial infarction. *Cardiovasc Revasc Med*, *20*(4), 351-364. doi:10.1016/j.carrev.2018.05.021
- Patel, A. A., Ginhoux, F., & Yona, S. (2021). Monocytes, macrophages, dendritic cells and neutrophils: an update on lifespan kinetics in health and disease. *Immunology*, *163*(3), 250-261. doi:10.1111/imm.13320
- Patel, A. A., Zhang, Y., Fullerton, J. N., Boelen, L., Rongvaux, A., Maini, A. A., . . . Yona, S. (2017). The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation. *Journal of Experimental Medicine*, *214*(7), 1913-1923. doi:10.1084/jem.20170355
- Peet, C., Ivetic, A., Bromage, D. I., & Shah, A. M. (2020). Cardiac monocytes and macrophages after myocardial infarction. *Cardiovasc Res*, *116*(6), 1101-1112. doi:10.1093/cvr/cvz336
- Pfeffer, M. A., & Braunwald, E. (1990). Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation*, *81*(4), 1161-1172. doi:10.1161/01.cir.81.4.1161
- Phillipson, M., & Kubes, P. (2011). The neutrophil in vascular inflammation. *Nat Med*, *17*(11), 1381-1390. doi:10.1038/nm.2514
- Prabhu, S. D., & Frangogiannis, N. G. (2016). The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis. *Circ Res*, *119*(1), 91-112. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.303577
- Reed, G. W., Rossi, J. E., & Cannon, C. P. (2017). Acute myocardial infarction. *Lancet*, *389*(10065), 197-210. doi:10.1016/S0140-6736(16)30677-8
- Ridker, P. M., Everett, B. M., Thuren, T., MacFadyen, J. G., Chang, W. H., Ballantyne, C., . . . Group, C. T. (2017). Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N Engl J Med*, *377*(12), 1119-1131. doi:10.1056/NEJMoa1707914

- Rose, S., Misharin, A., & Perlman, H. (2012). A novel Ly6C/Ly6G-based strategy to analyze the mouse splenic myeloid compartment. *Cytometry A*, *81*(4), 343-350. doi:10.1002/cyto.a.22012
- Rossignol, P., Hernandez, A. F., Solomon, S. D., & Zannad, F. (2019). Heart failure drug treatment. *Lancet*, *393*(10175), 1034-1044. doi:10.1016/S0140-6736(18)31808-7
- Sager, H. B., Hulsmans, M., Lavine, K. J., Moreira, M. B., Heidt, T., Courties, G., . . . Nahrendorf, M. (2016). Proliferation and Recruitment Contribute to Myocardial Macrophage Expansion in Chronic Heart Failure. *Circ Res*, *119*(7), 853-864. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.309001
- Sager, H. B., Kessler, T., & Schunkert, H. (2017). Monocytes and macrophages in cardiac injury and repair. *J Thorac Dis*, *9*(Suppl 1), S30-S35. doi:10.21037/jtd.2016.11.17
- Saldana, J. I. (2021). Macrophages. *british society for immunology*. Retrieved from <https://www.immunology.org/public-information/bitesized-immunology/cells/macrophages>
- Saxena, A., Russo, I., & Frangogiannis, N. G. (2016). Inflammation as a therapeutic target in myocardial infarction: learning from past failures to meet future challenges. *Transl Res*, *167*(1), 152-166. doi:10.1016/j.trsl.2015.07.002
- Scapini, P., & Cassatella, M. A. (2014). Social networking of human neutrophils within the immune system. *Blood*, *124*(5), 710-719. doi:10.1182/blood-2014-03-453217
- Seropian, I. M., Toldo, S., Van Tassell, B. W., & Abbate, A. (2014). Anti-inflammatory strategies for ventricular remodeling following ST-segment elevation acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, *63*(16), 1593-1603. doi:10.1016/j.jacc.2014.01.014
- Silber, S., Van de Werf, F. & Mitglieder der Task Force. (2010). Akutes Koronarsyndrom mit persistierender ST-Streckenhebung (STEMI). *Kardiologe* *4*, 93–106.
- Silvestre-Roig, C., Braster, Q., Ortega-Gomez, A., & Soehnlein, O. (2020). Neutrophils as regulators of cardiovascular inflammation. *Nat Rev Cardiol*, *17*(6), 327-340. doi:10.1038/s41569-019-0326-7
- Soehnlein, O., & Lindbom, L. (2010). Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol*, *10*(6), 427-439. doi:10.1038/nri2779
- Stark, M. A., Huo, Y., Burcin, T. L., Morris, M. A., Olson, T. S., & Ley, K. (2005). Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity*, *22*(3), 285-294. doi:10.1016/j.immuni.2005.01.011
- Summers, C., Rankin, S. M., Condliffe, A. M., Singh, N., Peters, A. M., & Chilvers, E. R. (2010). Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol*, *31*(8), 318-324. doi:10.1016/j.it.2010.05.006
- Sutton, M. G., & Sharpe, N. (2000). Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation*, *101*(25), 2981-2988. doi:10.1161/01.cir.101.25.2981
- Swirski, F. K., Nahrendorf, M., Eitzrodt, M., Wildgruber, M., Cortez-Retamozo, V., Panizzi, P., . . . Pittet, M. J. (2009). Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science*, *325*(5940), 612-616. doi:10.1126/science.1175202
- Tanai, E., & Frantz, S. (2015). Pathophysiology of Heart Failure. *Compr Physiol*, *6*(1), 187-214. doi:10.1002/cphy.c140055
- Teh, Y. C., Ding, J. L., Ng, L. G., & Chong, S. Z. (2019). Capturing the Fantastic Voyage of Monocytes Through Time and Space. *Front Immunol*, *10*, 834. doi:10.3389/fimmu.2019.00834

- Thygesen, K., Alpert, J. S., Jaffe, A. S., Chaitman, B. R., Bax, J. J., Morrow, D. A., . . . Executive Group on behalf of the Joint European Society of Cardiology /American College of Cardiology /American Heart Association /World Heart Federation Task Force for the Universal Definition of Myocardial, I. (2018). Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). *Circulation*, *138*(20), e618-e651. doi:10.1161/CIR.0000000000000617
- Townsend, N., Wilson, L., Bhatnagar, P., Wickramasinghe, K., Rayner, M., & Nichols, M. (2016). Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update 2016. *Eur Heart J*, *37*(42), 3232-3245. doi:10.1093/eurheartj/ehw334
- Vafaie, M. (2016). State-of-the-art diagnosis of myocardial infarction. *Diagnosis (Berl)*, *3*(4), 137-142. doi:10.1515/dx-2016-0024
- Velagaleti, R. S., Pencina, M. J., Murabito, J. M., Wang, T. J., Parikh, N. I., D'Agostino, R. B., . . . Vasani, R. S. (2008). Long-term trends in the incidence of heart failure after myocardial infarction. *Circulation*, *118*(20), 2057-2062. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.784215
- von Vietinghoff, S., & Ley, K. (2008). Homeostatic regulation of blood neutrophil counts. *J Immunol*, *181*(8), 5183-5188. doi:10.4049/jimmunol.181.8.5183
- Wu, Q. Q., Xiao, Y., Yuan, Y., Ma, Z. G., Liao, H. H., Liu, C., . . . Tang, Q. Z. (2017). Mechanisms contributing to cardiac remodelling. *Clin Sci (Lond)*, *131*(18), 2319-2345. doi:10.1042/CS20171167
- Xu, Z., Alloush, J., Beck, E., & Weisleder, N. (2014). A murine model of myocardial ischemia-reperfusion injury through ligation of the left anterior descending artery. *J Vis Exp*(86). doi:10.3791/51329
- Yan, X., Anzai, A., Katsumata, Y., Matsushashi, T., Ito, K., Endo, J., . . . Shen, W. (2013). Temporal dynamics of cardiac immune cell accumulation following acute myocardial infarction. *Journal of molecular and cellular cardiology*, *62*, 24-35.
- Yanez, A., Coetzee, S. G., Olsson, A., Muench, D. E., Berman, B. P., Hazelett, D. J., . . . Goodridge, H. S. (2017). Granulocyte-Monocyte Progenitors and Monocyte-Dendritic Cell Progenitors Independently Produce Functionally Distinct Monocytes. *Immunity*, *47*(5), 890-902 e894. doi:10.1016/j.immuni.2017.10.021
- Yona, S., & Jung, S. (2010). Monocytes: subsets, origins, fates and functions. *Curr Opin Hematol*, *17*(1), 53-59. doi:10.1097/MOH.0b013e3283324f80
- Yona, S., Kim, K. W., Wolf, Y., Mildner, A., Varol, D., Breker, M., . . . Jung, S. (2013). Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity*, *38*(1), 79-91. doi:10.1016/j.immuni.2012.12.001

6 Danksagung

Die Daten für diese Arbeit wurden in den Laboren des deutschen Herzzentrums der Technischen Universität München erhoben.

Betreut und beraten wurde die Arbeit von Prof. Dr. med. Hendrik Sager, Prof. Dr. med. Heribert Schunkert und Dr. Julia Hinterdobler und Dr. Rolf Weidenhagen.

Manuskriptrevisionen wurden von Prof. Dr. med. Hendrik Sager und Dr. Julia Hinterdobler durchgeführt.

Besondere Anerkennung und Dank gebührt Dr. Julia Hinterdobler, die maßgeblich an der Planung, Ausarbeitung und Korrektur dieses Manuskripts beteiligt war. Ohne ihre hingabevolle Unterstützung wäre die Fertigstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Schließlich möchte ich meiner ganzen Familie, meiner Freundin, meinen engsten Studienfreunden und insbesondere meinen beiden Eltern danken, die mir stets das größte Vorbild sind. Ohne ihre Motivation und Unterstützung hätte ich diese Arbeit nicht vollenden können.