

Aus dem Institut für Molekulare Kardiologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Kommissarischer Leiter: Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Flögel

Myokardischämie und das sternale Knochenmark - Eine Studie basierend auf  
experimenteller Magnetresonanz-Bildgebung

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von  
Hauke Alexander Dietz

2025

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Flögel

Zweitgutachterin: Prof. Dr. med. Maria Grandoch

## Zusammenfassung

Der akute Herzinfarkt stellt aufgrund seiner Häufigkeit und der mit ihm einhergehenden Mortalität und Morbidität eines der wichtigsten Krankheitsbilder in der Kardiologie dar. Bereits kurz nach Ischämie beginnt die Einwanderung von Leukozyten in das Infarktareal, die von essenzieller Bedeutung bei der Heilung des Gewebes ist. Als Reaktion auf den dabei erhöhten Bedarf an spezifischen Immunzellen, kommt es im Knochenmark reaktiv zu einer Steigerung der Hämatopoese. Es besteht demnach eine enge Verbindung zwischen der gesunden Knochenmarksfunktion und der Infarktheilung. Neuere Untersuchungen konnten zeigen, dass Immunzellen im Ischämiefall bevorzugt aus dem benachbarten Knochenmark in das betroffene Gewebe einwandern und dabei sogar auf direktem Weg die *Compacta* des Knochens durchqueren. In dieser Arbeit wird postuliert, dass Gleiches auch den Myokardinfarkt betrifft und das Knochenmark des Sternums aufgrund seiner unmittelbaren Nähe zum Herzen verhältnismäßig stark aktiviert wird. Zudem wird angenommen, dass Zellen auf direktem Weg ins Infarktareal eindringen. Um der Fragestellung auf den Grund zu gehen, wurde eine auf experimenteller Magnetresonanztomographie basierte Studie an Versuchstieren durchgeführt. Zunächst wurde das Knochenmark des Sternums und anderer Kompartimente auf spezifische Veränderungen nach Myokardinfarkt hin untersucht. Hierbei kamen das *T1-* und *T2-Mapping* sowie das *Chemical-shift Imaging* zum Einsatz. Im Anschluss wurde ein Mikroinjektionsverfahren entwickelt, um neutrophile Granulozyten im Sternum zu markieren und deren Migration nach Myokardinfarkt durch <sup>19</sup>Fluor-Magnetresonanztomografie (<sup>19</sup>F-MRT) nachzuverfolgen. Anhand der Studien konnten im Sternum spezifische Veränderungen der T2-Relaxationszeit nach Infarkt festgestellt werden, die sich eindeutig von denen anderer Knochenmark-Kompartimente unterscheiden. Sie weisen auf eine verstärkte Inflammation und die rasche Abwanderung von Immunzellen im Knochenmark des Sternums hin. Mit Hilfe der <sup>19</sup>F-MRT ließen sich zudem aus dem Sternum stammende neutrophile Granulozyten im infarzierten Herzen nachweisen. Die Ergebnisse der Untersuchungen weisen in der Tat auf eine verstärkte Aktivierung und somit eine Sonderrolle des Sternums im Rahmen des Myokardinfarkts hin. Bewahrheitet sich dieses Prinzip auch auf anderen Gebieten, könnte dies die allgemeine Sichtweise auf das Knochenmark im Rahmen diverser Krankheitsprozesse nachhaltig verändern.

## Summary

Myocardial infarction remains a disease of major interest in cardiology because of its high prevalence, severe mortality, and morbidity. After the onset of ischemia, leukocytes invade the affected tissue and crucially contribute to myocardial healing. Following the higher demand, the production and release of certain leukocyte subtypes quickly increases in the bone marrow. As one can see, there is a tight link between the bone marrow function and myocardial healing. Newer findings suggest that local bone marrow compartments are involved in inflammatory processes. In case of ischemia, this implies a higher bone marrow activity and even direct migration of cells to the affected tissue. This study hypothesizes that the sternal bone marrow, being in direct vicinity to the heart, is getting specifically activated following myocardial infarction, leading to a special role in supporting the immunological response and contributing to myocardial healing. Moreover, direct leukocyte migration from the sternal bone marrow to the heart is suspected. To collect evidence for the hypothesis, an MR-imaging based study was performed on mice. Firstly, different bone marrow compartments including the sternum were analysed and compared regarding their tissue properties following myocardial ischemia and reperfusion. The protocols implemented T1- and T2-Mapping as well as Chemical-shift Imaging. Secondly, a surgical approach was established to selectively label neutrophils in the sternal bone marrow. The method was then used to follow the migration of neutrophils after myocardial ischemia using  $^{19}\text{F}$ -MRI. The results showed tissue alterations specific to the sternal bone marrow following myocardial infarction. These indicate an inflammatory response and a quick emigration of leukocytes. Moreover, sternal neutrophils could be found in the infarcted myocardium through  $^{19}\text{F}$ -MRI. The results indeed indicate a special role of the sternal bone marrow in myocardial infarction. Moreover, the phenomenon of local bone marrow compartments being entrained in inflammatory processes could turn out as a general principle. If further evidence in this direction was found, it could drastically change our view on the bone marrow function in inflammatory diseases.

## Abkürzungsverzeichnis

Av	.....	Average / Durchschnitt
C/EBP	.....	CCAAT-enhancer-binding Protein
CCR2	.....	C-C Chemokine Receptor Type 2
CD	.....	Cluster of Differentiation
CDK	.....	Cycline-dependent Kinase
CX3CL1	.....	Chemokine CX3C Motif Ligand 1
CX3CR1	.....	Chemokine CX3C Motif Receptor 1
d	.....	Days / Tage
EKG	.....	Elektrokardiogramm
FACS	.....	Fluorescence Activated Cell Sorting / Durchflusszytometrie
FGF	.....	Fibroblast Growth Factor
FOV	.....	Field of View / Sichtfeld
G	.....	Gauge
G-CSF	.....	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GM-CSF	.....	Granulocyte-Macrophage-Colony Stimulating Factor
GMP	.....	Granulozyten-Makrophagen-Progenitoren
h	.....	Hours / Stunden
IL	.....	Interleukin
KGW	.....	Körpergewicht
l	.....	Liter
LDA	.....	Left Anterior Descending Artery
m	.....	Meter
MCP 1	.....	Monocyte Chemotactic Protein 1
MDP	.....	Makrophagen-Dendritische-Zell-Progenitoren
MHz	.....	Megahertz
min	.....	Minuten
Mio	.....	Millionen
mM	.....	Millimol
MR	.....	Magnetresonanz
MRT	.....	Magnetresonanztomografie
NMR	.....	Nuclear Magnetic Resonance / Kernspinresonanz
NO	.....	Stickstoffmonoxid
PFC	.....	Perfluorcarbon
ppm	.....	Parts per million / Millionstel
R	.....	Rezeptor
Rep	.....	Repetitions / Wiederholungen
RF	.....	Radiofrequenzimpuls
ROI	.....	Region of Interest / Bereich von Interesse
s	.....	Sekunden
sc	.....	Subcutaneous / subkutan
SNR	.....	Signal-to-Noise Ratio / Signal-Rausch-Verhältnis
TE	.....	Echozeit
TGF	.....	Transforming Growth Factor
TLR	.....	Toll-Like-Rezeptoren
TNF	.....	Tumor-Nekrose-Faktor
TR	.....	Repetitionszeit
VEGF	.....	Vascular Endothelial Growth Factor

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Verortung.....	1
1.2	Grundlegende Begriffe.....	1
1.2.1	Der Myokardinfarkt .....	1
1.2.2	Das Knochenmark .....	3
1.3	Immunologie nach Myokardinfarkt .....	4
1.3.1	Verortung.....	4
1.3.2	Immunologische Prozesse im Infarktgewebe .....	4
1.3.3	Neutrophile Granulozyten .....	6
1.3.4	Monozyten.....	8
1.3.5	Fazit .....	10
1.4	Inflammation - Das Knochenmark im Stress .....	10
1.4.1	Verortung.....	10
1.4.2	<i>Emergency granulopoiesis</i> .....	10
1.4.3	Zusammenfassung .....	12
1.4.4	Aktivierung des Knochenmarks .....	12
1.5	Hypothese .....	14
1.6	Hintergründe zu den angewandten Methoden .....	14
1.6.1	Die Magnetresonanz-Bildgebung.....	14
1.6.2	Das <i>T1-</i> und <i>T2-Mapping</i> .....	15
1.6.3	Das <i>Chemical-shift Imaging</i> .....	16
1.6.4	Die <sup>19</sup> F-MRT .....	16
1.7	Zielsetzung .....	17
2	Material und Methoden .....	18
2.1	Materialien .....	18
2.1.1	Lösungen und Reagenzien .....	18
2.1.2	Allgemeine Verbrauchsmaterialien .....	19
2.1.3	Gerätschaften .....	19

2.1.4	<i>MR-Scans</i> .....	20
2.2	Übersicht über die durchgeführten Versuche.....	22
2.3	Tierversuche.....	23
2.3.1	Versuchstiere.....	23
2.3.2	Handling während der MR-Messungen.....	24
2.3.3	Intrasternale Injektionen .....	24
2.3.4	Infarktinduktion durch Ischämie-Reperfusion .....	25
2.4	Perfluorcarbon-Nanoemulsion .....	25
2.4.1	Hintergrund.....	25
2.4.2	Herstellung .....	26
2.5	FACS-Analysen .....	26
2.5.1	Hintergrund.....	26
2.5.2	Isolation des Knochenmarks.....	27
2.5.3	Präanalytik und Antikörperfärbung.....	27
2.5.4	FACS-Analyse .....	27
2.6	MR-Messungen .....	28
2.6.1	<i>T1-Mapping</i> .....	28
2.6.2	<i>T2-Mapping</i> .....	31
2.6.3	<sup>1</sup> H/ <sup>19</sup> F-MR-Bildgebung .....	33
2.6.4	<i>Chemical-shift Imaging</i> .....	35
2.7	Statistik.....	35
2.8	Abbildungen.....	35
3	Ergebnisse.....	36
3.1	MR-Analysen des Knochenmarks.....	36
3.1.1	Verortung.....	36
3.1.2	<i>T1-Mapping</i> .....	36
3.1.3	<i>T2-Mapping</i> .....	40
3.1.4	<i>Chemical-shift Imaging</i> .....	44
3.1.5	Zusammenfassung .....	45

3.2	Intrasternale Injektionen und <sup>19</sup> F-MRT .....	45
3.2.1	Verortung.....	45
3.2.2	Einfluss der Injektionen auf die Zellen im Sternum.....	45
3.2.3	<i>Labeling</i> der Zellen im Knochenmark.....	47
3.2.4	<sup>19</sup> F-MRT nach Myokardinfarkt.....	47
4	Diskussion .....	50
4.1	Schlussfolgerung I.....	50
4.2	Diskussion der Teilergebnisse .....	50
4.2.1	<i>T2-Mapping</i> .....	50
4.2.2	<i>T1-Mapping</i> .....	52
4.2.3	<i>Chemical-shift Imaging</i> .....	53
4.2.4	Intrasternale Mikroinjektionen .....	54
4.2.5	<sup>19</sup> F-MRT.....	55
4.3	Schlussfolgerung II .....	56
5	Quellenverzeichnis .....	58

# 1 Einleitung

## 1.1 Verortung

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind weit verbreitet und machen seit Jahrzehnten die Hauptursache aller Todesfälle in den westlichen Industrienationen aus (Timmis *et al.*, 2018). Die Gesamtzahl kardiovaskulärer Erkrankungen nimmt im Rahmen einer wachsenden Bevölkerung und steigenden Lebenserwartung weiter zu (Timmis *et al.*, 2018). Der Myokardinfarkt ist dabei als akutes und lebensbedrohliches Ereignis von großer Relevanz. Mit der Zeit hat eine verbesserte Akutversorgung des Myokardinfarkts, vor allem durch die Verfügbarkeit interventioneller Verfahren, die eine zeitnahe Revaskularisation der betroffenen Koronargefäße ermöglichen, zu einer stetigen Abnahme der Mortalität geführt (Jenča *et al.*, 2021). Gleichzeitig steigt die Prävalenz an Spätfolgen nach initial erfolgreicher Behandlung (Jenča *et al.*, 2021). Diese gehen nach wie vor mit einer hohen Morbidität und Mortalität einher, während die zur Verfügung stehenden therapeutischen Möglichkeiten begrenzt sind (Jenča *et al.*, 2021). Die frühe Phase nach Infarkt, auch nach gelungener Revaskularisation, gilt als wichtig für den Heilungsprozess und den langfristigen Erhalt der Herzfunktion. Das Infarktgewebe ist dabei einer raschen Folge von Veränderungen ausgesetzt, an denen Zellen des Immunsystems entscheidend beteiligt sind. Neuen Erkenntnissen über die immunologischen Vorgänge nach Myokardinfarkt wird eine große Bedeutung für das Verständnis dessen Pathophysiologie zugeschrieben. Darüber hinaus gilt die gezielte Immunmodulation durch Pharmakologika als vielversprechender Ansatz bei der Entwicklung neuer therapeutischer Strategien (Saleh & Ambrose, 2018). Diese Arbeit ist im Bereich der kardiovaskulären Grundlagenforschung einzuordnen und beleuchtet die Rolle immunologischer Vorgänge nach Myokardinfarkt. Es geht dabei um spezifische Aspekte an der Schnittstelle zwischen Infarkt, Immunsystem und Knochenmark.

## 1.2 Grundlegende Begriffe

Im Folgenden werden grundlegende Begriffe erläutert, die einen Einblick in die Thematik vermitteln und ein Verständnis für die Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit schaffen.

### 1.2.1 Der Myokardinfarkt

Der Myokardinfarkt stellt im Wesentlichen eine akute Komplikation langjähriger pathologischer Gefäßveränderungen dar, die zusammengefasst das Krankheitsbild der Atherosklerose ausmachen (Wolf & Ley, 2019). Es handelt sich dabei um eine Erkrankung, die durch die Bildung gefäßverengender Plaques in der Intima mittelgroßer und großer Arterien zur chronischen Minderdurchblutung betroffener Gewebe führt (Wolf & Ley, 2019). Darüber hinaus kann es im Bereich der Plaques zu Oberflächendefekten kommen, die zur

Aktivierung der Blutgerinnung führen. Folglich entsteht ein Gefäßverschluss, der sich als akutes Krankheitsbild äußert (Gimbrone & García-Cardena, 2016). Abseits der Koronararterien manifestiert sich das Krankheitsbild in klinisch relevantem Maß an den Arterien des Gehirns, der Extremitäten und des Magen-Darm-Trakts (Wolf & Ley, 2019). Es sei erwähnt, dass die klassische Definition des Myokardinfarkts infolge eines thrombotischen Gefäßverschlusses zugunsten seltener Ursachen der Myokardischämie erweitert wurde. Zu diesen gehören unter anderem Gefäßspasmen, embolische Ereignisse, Schock, Koronararteriendissektionen und anderweitige Gefäßerkrankungen (Saleh & Ambrose, 2018). Der Verschluss des Gefäßes führt zunächst zur Ischämie des Myokards. Wenn keine Wiederherstellung der Durchblutung erfolgt und auch keine Kollateralen zu anderen Gefäßen bestehen, kommt es zur Nekrose des Gewebes. Die Ischämie geht einher mit dem Verlust der Kontraktilität der Zellen, sodass sich betroffene Kompartimente nicht mehr adäquat zusammenziehen. Die Herzfunktion ist somit eingeschränkt, klinisch treten typischerweise Symptome der Herzinsuffizienz auf. Bei adäquater Kompensation durch das gesunde Gewebe können diese auch ausbleiben. Eine Extremform der akuten Herzinsuffizienz stellt der kardiogene Schock dar, definiert durch eine generalisierte, potenziell lebensbedrohliche Organdysfunktion infolge der systemischen Minderdurchblutung (Bajaj *et al.*, 2015). Eine weitere Folge der Ischämie besteht in der Veränderung der elektrophysiologischen Eigenschaften des Infarktareals. Je nach betroffener Herzregion können so selbst kleine Infarkte zu potenziell lebensbedrohlichen Herzrhythmusstörungen führen. Darüber hinaus verliert das Infarktareal, bedingt durch die Gewebnekrose und die darauffolgende Auflösung der extrazellulären Matrix, an Stabilität und kann infolge des intrakardialen Drucks perforieren oder reißen. Je nach betroffenem Areal kommt es zur Ruptur der freien Ventrikelwand, des Ventrikelseptums oder der Papillarmuskeln. Es entstehen akut lebensbedrohliche Komplikationen wie Herzbeutelamponaden, Shuntsysteme und Klappeninsuffizienzen (Bajaj *et al.*, 2015). Auch im Intervall und nach initial überstandenen Infarkt ereignis können betroffene Patienten noch relevante Komplikationen entwickeln. Im Zentrum steht hierbei erneut die Herzinsuffizienz, diesmal als Folge langfristiger und pathologischer Umbauprozesse am Herzen, die mit dem übergeordneten Begriff des kardialen *Remodelings* beschrieben werden (Schirone *et al.*, 2017). Das kardiale *Remodeling* ist geprägt durch ein komplexes und multifaktorielles Geschehen, an dem diverse zelluläre Akteure beteiligt sind. Viele der dabei relevanten Pathomechanismen basieren im Grunde auf physiologischen Anpassungsprozessen, die durch Fehlregulation zu schädlichen und irreversiblen Veränderungen im Gewebe führen (Schirone *et al.*, 2017). Zu den Hauptcharakteristika des kardialen *Remodelings* gehören die Hypertrophie, d.h. die pathologische Größenzunahme der Kardiomyozyten und die Fibrose, d.h. die interstitielle und perivaskuläre Einlagerung

extrazellulärer Matrix (Schirone *et al.*, 2017). In der Folge kommt es zu Veränderungen der Geometrie und Elastizität der Ventrikel, die zu einer chronisch fortschreitenden Einschränkung der systolischen sowie diastolischen Herzfunktion und letztlich zur globalen Herzinsuffizienz führen (Schirone *et al.*, 2017). Das kardiale *Remodeling* ist eng verknüpft mit immunologischen Vorgängen. So persistieren etwa bestimmte Immunzell-Subpopulationen wie Monozyten, Lymphozyten und Mastzellen im Gewebe und erhalten durch Zytokine und Wachstumsfaktoren ein proinflammatorisches Milieu aufrecht (Schirone *et al.*, 2017). Dieses wird insbesondere mit der Entstehung der myokardialen Fibrose in Verbindung gebracht (Schirone *et al.*, 2017). Es ist zu bedenken, dass der Myokardinfarkt als sogenannte Zivilisationserkrankung innerhalb der letzten Jahrzehnte überhaupt erst an Relevanz gewonnen hat. Aufgrund des fast ausschließlichen Auftretens im hohen und postreproduktiven Lebensalter spielt er aus evolutionärer Sicht bis heute eine untergeordnete Rolle. Demzufolge hat der menschliche Organismus nie adäquate Mechanismen zur Infarktheilung ausgebildet. Es handelt sich bei der Heilung des Myokardinfarkts stets um eine sogenannte „Defektheilung“, einem „behelfsmäßigen“ Ersatz der hochspezialisierten Muskulatur durch einfaches Narbengewebe.

### 1.2.2 Das Knochenmark

Das Knochenmark ist das zentrale Organ der Hämatopoese. Gut geschützt und eingebettet ins Trabekelwerk des Knochens findet sich ein lockeres, gut vaskularisiertes (sog. retikuläres) Bindegewebe, in dessen Maschenwerk die Proliferation und Differenzierung der blutbildenden Zellen stattfindet (Welsch, 2014). An der Spitze der Zellhierarchie stehen die hämatopoetischen Stammzellen, adulte multipotente Zellen, aus deren Differenzierung alle Zellen der myeloischen und lymphatischen Reihe hervorgehen (Welsch, 2014). Sie bilden im Knochenmark sogenannte Nischen, in denen sie in engem Kontakt mit Zellen ihrer Umgebung stehen. Im gegenseitigen Wechselspiel und einem Mikromilieu aus Mediatoren und Wachstumsfaktoren werden in diesen Nischen Proliferation, Differenzierung und Freisetzung der heranwachsenden Zellen reguliert. Zu den Zellen dieser Nischen gehören unter anderem mesenchymale Zellen, das Endothel, Makrophagen und Lymphozyten (Welsch, 2014). Der Umsatz von Zellen im Knochenmark ist sehr hoch. Jeden Tag werden schätzungsweise > 100 Milliarden Blutzellen gebildet und freigesetzt (Boulais & Frenette, 2015). Während sich im Kindesalter noch in allen Knochen aktives, blutbildendes Knochenmark findet, nimmt die Aktivität des Knochenmarks mit der Zeit kontinuierlich ab. Zudem erfolgt diese Abnahme ungleichmäßig, sodass aktives Knochenmark im Erwachsenenalter nur noch in spezifischen Körperregionen nachgewiesen werden kann (Welsch, 2014). Aktives Knochenmark findet sich beim Erwachsenen im Schädel, entlang des Achsenskeletts und der proximalen langen Röhrenknochen (Cristy, 1981). Die höchste

Aktivität verbleibt dabei im Sternum, den Rippen und den Wirbelkörpern, gefolgt von den Hüftknochen (Cristy, 1981). Zusammengenommen beherbergen die Wirbelkörper, die Hüftknochen und die Rippen mit 76% den Großteil des gesamten blutbildenden Knochenmarks, das Sternum macht immerhin 3 % aus (Cristy, 1981). Währenddessen kommt es im nicht-aktiven Knochenmark zur Einlagerung von Speicherfetten in die Bindegewebszellen. Im Bedarfsfall oder im Rahmen pathologischer Vorgänge kann es im inaktiven Knochenmark jedoch zu einer sog. Rekonversion kommen, d.h. einer Umwandlung von inaktivem „gelben“ zu hämatopoetisch aktivem „roten“ Knochenmark (Welsch, 2014).

### 1.3 Immunologie nach Myokardinfarkt

#### 1.3.1 Verortung

Im Folgenden wird auf die immunologischen Vorgänge nach Myokardinfarkt eingegangen, wobei der Fokus auf den beteiligten Effektorzellen des Immunsystems in der frühen Phase nach Ischämie liegt. Dabei werden die neutrophilen Granulozyten und die Monozyten als Hauptinfiltratoren des Infarktgewebes näher beleuchtet.

#### 1.3.2 Immunologische Prozesse im Infarktgewebe

Bereits nach kurzer Zeit (20-30 Minuten Ischämie) kommt es im infarzierten Gewebe zu irreversiblen Schäden und zur Nekrose und Apoptose von Kardiomyozyten (Frangogiannis, 2015). Der Untergang von Zellen, insbesondere durch Nekrose, führt zur Freisetzung sog. *Danger signals*, die über Rezeptoren und Signalkaskaden eine starke proinflammatorische Reaktion in Gang setzen (Heinrich, 2014). Sie bewirken in das Infarktgewebe die Einwanderung verschiedener Immunzell-Populationen, die an der gesamten Infarktheilung entscheidend beteiligt sind (Frangogiannis, 2015). Die Infarktheilung kann dabei in drei Phasen unterteilt werden:

1. Zunächst kommt es in der *inflammatorischen Phase* zur Aktivierung des angeborenen Immunsystems und zur Einwanderung von Leukozyten, die das Infarktareal von Zelldebris befreien.
2. Die sich anschließende *proliferative Phase* ist gekennzeichnet durch ein Abflauen der initialen Inflammation und die Einwanderung mesenchymaler Zellen in das Infarktareal, die durch Sekretion extrazellulärer Matrixproteine eine bindegewebige Narbe bilden.
3. In der letzten *Reifungsphase* ist die Reparation weitgehend abgeschlossen und zuvor eingewanderte Zellen verschwinden. Langfristig kommt es zur Verstärkung und zum Umbau der extrazellulären Matrix (Frangogiannis, 2015).

Zu den *Danger signals* gehören u.a. intrazelluläre Bestandteile und Proteine, die, wenn sie im Extrazellularraum nachgewiesen werden, dem Organismus eine Verletzung bzw. einen Reparationsbedarf signalisieren (Heinrich, 2014). Sie werden im Rahmen der Nekrose von Kardiomyozyten massenweise freigesetzt und binden typischerweise an *Toll-like* Rezeptoren (TLR) in der Umgebung. Sie bewirken die Aktivierung proinflammatorischer Signalkaskaden um den Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B und die Induktion proinflammatorischer Mediatoren wie IL 1, TNF- $\alpha$  und IL 6 (Frangogiannis, 2015). TLR befinden sich an der Oberfläche von fast allen Zellen des Myokards, darunter Kardiomyozyten, Fibroblasten, Endothelzellen und ortständige Makrophagen (Frangogiannis, 2015). Die freigesetzten Mediatoren bewirken am Endothel der Kapillaren die Rekrutierung von Leukozyten und durch Chemotaxis die Migration der neuen Zellen an den Ort der Inflammation (Kolaczowska & Kubes, 2013). Allen voran neutrophile Granulozyten, aber auch Monozyten, wandern schon nach kurzer Zeit und in großer Zahl in das Infarktgewebe ein. Sie verstärken die Inflammation und beseitigen durch *Phagozytose* Zelldebris und Matrixbestandteile. Der genauen Funktion der neutrophilen Granulozyten und der Monozyten ist aufgrund ihrer Bedeutung für diese Arbeit ein jeweils eigenes Kapitel gewidmet (s. 1.3.3, 1.3.4). Mit zunehmender Beseitigung von Debris und der Apoptose eingewanderter Leukozyten kommt es zum Abflauen der initial starken Inflammation und damit zur Einleitung der proliferativen Phase (Frangogiannis, 2015). Dies ist im Wesentlichen Folge der Beseitigung und Neutralisierung proinflammatorischer *Trigger*, beinhaltet aber auch die Aktivierung inhibitorischer Signalkaskaden und die Freisetzung anti-inflammatorischer Mediatoren: So setzen beispielsweise apoptotische Granulozyten Mediatoren wie IL 10 und TGF- $\beta$  frei und hemmen somit die weitere Rekrutierung ihresgleichen (Frangogiannis, 2015). Die proliferative Phase ist gekennzeichnet durch die Neoangiogenese und die Einwanderung aktivierter Myofibroblasten in das Infarktareal (Frangogiannis, 2015). Bereits kurz nach Infarkt kommt es zum Aussprosseln rudimentärer Gefäßvorläufer aus dem angrenzenden, gesunden Myokard. In der Proliferationsphase bilden sie ein Netzwerk aus funktionsfähigen Gefäßen, die die entstehende Narbe mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgen (Frangogiannis, 2015). Myofibroblasten gehen wahrscheinlich aus kardialen Fibroblasten hervor. Sie proliferieren im Infarktgewebe und bilden unter dem Einfluss von TGF- $\beta$  extrazelluläre Matrixproteine, die zur Bildung einer Narbe im ehemaligen Infarktareal führen (Frangogiannis, 2015). An der Regulation der proliferativen Phase sind kleinere Populationen spezialisierter Makrophagen und Lymphozyten entscheidend beteiligt (Frangogiannis, 2015). Mit der zunehmenden Bildung einer extrazellulären Matrix geht die proliferative in die finale Reifungsphase über. In der Reifungsphase kommt es zur Verstärkung der extrazellulären Matrix durch Vernetzung des Kollagens, einer Reduktion der aktivierten Myofibroblasten und einem Sistieren der

Angiogenese (Frangogiannis, 2015). An allen Phasen der Infarktheilung sind Subpopulationen von Leukozyten beteiligt. Sie beeinflussen durch die Ausschüttung von Mediatoren das Mikromilieu und Zellen in ihrer Umgebung. Ihnen werden daher Schlüsselrollen in der Regulation der Infarktheilung zugeschrieben. Es wird davon ausgegangen, dass Fehlfunktionen sowie die Über- oder Unteraktivität von einzelnen Immunzell-Populationen mit einem verschlechterten *Outcome* nach Myokardinfarkt assoziiert sind (Swirski & Nahrendorf, 2013). Eine erfolgreiche Defektheilung ist auf die geordnete, adäquate immunologische Reaktion auf die Ischämie und ein Gleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Mechanismen angewiesen (Swirski & Nahrendorf, 2013).

### 1.3.3 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten (auch: Neutrophile) sind Zellen der myeloischen Reihe und damit Vertreter des angeborenen Immunsystems. Sie machen mit einem Anteil von circa 60 % den größten Teil der Leukozyten im Blut aus. Sie zirkulieren im gesamten Organismus und können durch Gewebeverletzung, z.B. im Rahmen des ischämischen Myokardinfarkts, aber auch bei äußeren Verletzungen und zur Bekämpfung pathogener Erreger rasch ins betroffene Gewebe einwandern. Sie gehen aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark hervor und durchlaufen in ihrem Differenzierungsprozess, der sog. Granulopoese, verschiedene Vorläuferstadien. Mit der Regulation dieser sukzessiven Differenzierung sind diverse Transkriptionsfaktoren verbunden, darunter RUNX1, PU.1, TAL1 und C/EBP (Manz & Boettcher, 2014). Neutrophile haben nach Ihrer Freisetzung eine kurze Lebenszeit (8 h–5 d) und werden bei Nichtbedarf überwiegend im Knochenmark, der Milz und der Leber ausgemustert (Kolaczowska & Kubes, 2013). Ein Vorgang, der abhängig ist von C-X-C Chemokin Receptor Typ 4 (CXCR4), welcher mit zunehmendem Alter vermehrt auf der Zelloberfläche exprimiert wird (Kolaczowska & Kubes, 2013). Die hohe Anzahl an Zellen kombiniert mit der kurzen Lebenszeit mündet in einem enormen Zellumsatz. Berechnungen zu Folge werden täglich  $0,5-1 \times 10^{11}$  Granulozyten im Knochenmark gebildet und freigesetzt, ein Vorgang, der bei Bedarf noch um ein Vielfaches gesteigert werden kann (Manz & Boettcher, 2014). Kommt es nun zu einer inflammatorischen Reaktion im Gewebe, etwa durch Nekrose und Apoptose von Kardiomyozyten nach Myokardinfarkt, wandern Neutrophile rasch und in großer Zahl in das betroffene Gewebe ein und üben ihre Funktion zur Beseitigung von Zellresten und Debris aus. Nach Infarktbeginn sind Neutrophile schon innerhalb weniger Stunden im ischämischen Gewebe nachweisbar (Frangogiannis, 2015). Die Extravasation von Neutrophilen ist ein gut erforschter, mehrstufiger Prozess, der bevorzugt in den postkapillaren Venolen erfolgt und in folgende Schritte unterteilt werden kann: Anbindung

(*Tethering*), Rollen (*Rolling*), Adhäsion (*Adhesion*), Kriechen (*Crawling*) und Transmigration (*Transmigration*) (Kolaczkowska & Kubes, 2013). Initiiert wird der Vorgang durch die Endothelzellen, die in Anwesenheit proinflammatorischer Mediatoren Adhäsionsmoleküle an ihrer Oberfläche exprimieren und die Neutrophilen so für das „*Tethering*“ aus dem Blutstrom binden (Kolaczkowska & Kubes, 2013). Im Folgenden kommt es zu komplexen signalvermittelten Wechselwirkungen zwischen Neutrophilen und Endothelzellen: Die initial lockere Bindung, vermittelt überwiegend durch Selektine, weicht einer festen Bindung durch Integrine und ICAM. An der Oberfläche des Endothels werden Chemokine präsentiert, anhand derer sich Neutrophile orientieren können und die Neutrophile im Sinne eines „*Priming*“ auf die Ausübung ihrer Effektorfunktionen vorbereiten (Kolaczkowska & Kubes, 2013). Die Transmigration durch das Endothel erfolgt in einem komplexen Vorgang und erfordert die gezielte Auflösung und Wiederherstellung von Zell-Zell-Kontakten und eine hohe Plastizität des Zellgerüsts. Sie erfolgt bevorzugt an Orten mit gering ausgeprägter Basalmembran und durchlässiger Perizytenhülle (Kolaczkowska & Kubes, 2013). Neutrophile üben an ihrem Zielort verschiedene Effektorfunktionen aus, die bei der Heilung von Verletzungen und der Abwehr von Pathogenen zum Tragen kommen. Sie bilden die namensgebenden Granula mit diversen proinflammatorischen Molekülen, darunter antibakteriellen Proteinen (z.B. Defensin), Proteinase zur Auflösung der extrazellulären Matrix (z.B. Matrix-Metalloproteinase 9) und Enzyme zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (z.B. Myeloperoxidase), die sie ins extrazelluläre Milieu ausschütten können (Kolaczkowska & Kubes, 2013). Sie üben Phagozytose aus und neutralisieren so Debris und Pathogene. Eine Besonderheit der Neutrophilen ist die Bildung sogenannter Neutrophiler Extrazellulärer Fallen (*Neutrophil extracellular traps*). Dabei setzen Neutrophile in einem selbstzerstörerischen Prozess intrazelluläre Bestandteile frei, darunter Chromatin, Histone und diverse Proteine. Diese nutzen sie bei der Bekämpfung von Pathogenen, indem sie sie damit markieren und immobilisieren (Kolaczkowska & Kubes, 2013). Es wird angenommen, dass Neutrophile mit ihrer aggressiven proinflammatorischen Reaktion im Rahmen des Myokardinfarkts „über ihr Ziel hinausschießen“ und somit einen schädigenden Einfluss auf das Gewebe und überlebende Zellen im Infarkt haben (Swirski & Nahrendorf, 2013). Nach Ausübung ihrer Effektorfunktionen geht der Großteil der Neutrophilen in Apoptose und setzt dabei antiinflammatorische Mediatoren frei (Frangogiannis, 2015). Auch die Phagozytose apoptotischer Neutrophiler durch kontinuierlich nachkommende Phagozyten hat antiinflammatorische Wirkung. Somit regulieren Neutrophile bedarfsgerecht ihren eigenen Nachschub am inflammatorischen Fokus und ebnen den Weg für Folgeprozesse, etwa den schrittweisen Wiederaufbau des zerstörten Gewebes (Frangogiannis, 2015).

### 1.3.4 Monozyten

Monozyten und deren unmittelbare Nachfolger sind ebenfalls Zellen der myeloischen Reihe und damit Vertreter des angeborenen Immunsystems. Sie sind entscheidend am Postinfarktgeschehen beteiligt und dominieren nach der initialen Durchsetzung des Gewebes mit Neutrophilen das zelluläre Infiltrat des Infarkts (Nahrendorf *et al.*, 2007). Monozyten gehen aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark hervor und durchlaufen in ihrer Entwicklung verschiedene Vorläuferstadien. Dazu gehören Granulozyten-Makrophagen-Progenitoren (GMP) und Makrophagen-Dendritische-Zell-Progenitoren (MDP), bevor sie schließlich als Monozyten in einem CCR2 abhängigen Prozess nach etwa 7 Tagen das Knochenmark verlassen (Leuschner *et al.*, 2012). Nach einer gewissen Zeit der Zirkulation im Blutstrom migrieren sie ins Gewebe und durchwandern dieses entweder als Monozyten, Makrophagen oder Monozytäre-Dendritische-Zellen (Leuschner *et al.*, 2012). Monozyten infiltrieren das Infarktgewebe ab dem ersten Tag nach Myokardinfarkt und lassen sich dort etwa sieben Tage lang in konstant erhöhtem Maße nachweisen. Anschließend sinkt ihre Zahl kontinuierlich und erreicht nach 16 Tagen wieder ihren Ausgangswert (Nahrendorf *et al.*, 2007). Monozyten üben unterschiedliche Funktionen aus:

1. Sie setzen proinflammatorische Faktoren frei, darunter Zytokine (IL1, IL6, TNF $\alpha$ , IF $\gamma$ ), reaktive Sauerstoffspezies, NO-Synthase;
2. Sie phagozytieren apoptotische und nekrotische Kardiomyozyten, neutrophile Granulozyten und weiteren Debris;
3. Sie setzen Enzyme zur Spaltung und Auflösung der vorhandenen extrazellulären Matrix frei (Matrix-Metalloproteinasen, Cathepsine, Plasminogenaktivatoren);
4. Sie fördern die Angiogenese und den erneuten Aufbau der extrazellulären Matrix durch Sekretion von Mediatoren wie VEGF, FGF und TGF $\beta$  (Nahrendorf *et al.*, 2010).

Die Überlebenszeit von Monozyten im Infarktgewebe ist kurz und die Zellen gehen nach etwa 20 h überwiegend in Apoptose (Leuschner *et al.*, 2012). Es sei zu erwähnen, dass ein kleiner Teil der Monozyten das Infarktgewebe wieder verlässt und anschließend vor allem in der Leber und regionalen Lymphknoten wiederzufinden ist (Leuschner *et al.*, 2012). Sowohl im Menschen als auch in der Maus lassen sich unterschiedliche Subpopulationen von Monozyten definieren, die auf verschiedene Weise zum Postinfarktgeschehen beitragen. In der Maus werden in der frühen Phase nach Myokardinfarkt (Tag 1-4) vorwiegend Monozyten vom Typ Ly6C<sup>high</sup> (Phänotyp Gr1<sup>high</sup> CCR2<sup>+</sup> CX3CR1<sup>low</sup>) rekrutiert, die phagozytotisch aktiv sind und überwiegend proinflammatorische Faktoren und Proteinasen zur Auflösung der extrazellulären Matrix bilden (Nahrendorf *et al.*, 2007). Die

Rekrutierung beruht auf einer selektiven Expansion der Ly6C<sup>high</sup> Monozytenpopulation im Blut und ist abhängig von MCP 1, einem Liganden, der vor allem in der frühen Phase des Infarkts im Myokard nachweisbar ist und CCR2 der Monozyten bindet (Nahrendorf *et al.*, 2007). Ly6C<sup>high</sup> Monozyten entsprechen dabei menschlichen CD16<sup>-</sup> Monozyten (Nahrendorf *et al.*, 2010). Anschließend überwiegen im infarzierten Gewebe der Maus Monozyten vom Typ Ly6C<sup>low</sup> (Gr1<sup>low</sup> CCR2<sup>-</sup> CX3CR1<sup>high</sup>), die vor allem antiinflammatorische Signalmoleküle und Wachstumsfaktoren bilden (Nahrendorf *et al.*, 2007). Deren Anhäufung geht auf eine bevorzugte Rekrutierung von Ly6C<sup>low</sup> Monozyten zurück, die abhängig ist von Fractalkin (CX3CL1), einem Chemokin, welches erst verzögert im Infarktverlauf vermehrt exprimiert wird (Nahrendorf *et al.*, 2007). Ly6C<sup>low</sup> Monozyten entsprechen menschlichen CD16<sup>+</sup> Monozyten (Nahrendorf *et al.*, 2010). Die Infiltration des Infarktgewebes durch unterschiedliche Arten von Monozyten ist ein gutes Beispiel für den mehrphasigen zeitlichen Ablauf und die Regulation von Reparationsvorgängen am infarzierten Herzen. Die frühen Monozyten phagozytieren Zellreste und lockern die vorhandene Matrix auf, um damit die Grundlage für den Neuaufbau des Gewebes zu schaffen. Später einwandernde Monozyten hemmen diesen Vorgang und verhindern so einen überschießenden Abbau des Gewebes und die potenzielle Schädigung durch körpereigene Abwehrmechanismen. Das „aufgeräumte“ Infarktgewebe ist nun bereit für den Wiederaufbau und die Bildung von Wachstumsfaktoren und unterstützt den Umbau des Infarkts in eine möglichst funktionsfähige Narbe. Alternativ zum Knochenmark, als die primäre Produktionsstätte der Monozyten, ist die Milz von besonderer Bedeutung im Monozytenhaushalt. Sie beherbergt subkapsular Monozyten in Nestern von 20-50 Zellen, die in ihrer Gesamtheit die Anzahl frei zirkulierender Monozyten im Blut übersteigt und die im Bedarfsfall rasch freigesetzt werden können (Swirski *et al.*, 2009). Nach dem Myokardinfarkt verlassen die Monozyten in einem Angiotensin-II-abhängigen Prozess die Milz und infiltrieren das Infarktgewebe (Swirski *et al.*, 2009). Versuche mit milztransplantierten und splenektomierten Tieren deuten darauf hin, dass einen Tag nach Myokardinfarkt der Großteil der im Infarkt befindlichen Monozyten (41-75%) aus der Milz stammt (Swirski *et al.*, 2009). Zudem finden sich nach Myokardinfarkt in der Milz zahlreiche Vorläuferzellen vom MDP-Typ, die aktiv proliferieren und damit die Monozytenspeicher wieder auffüllen und weitere Monozyten für die Reparationsvorgänge am Herzen bereitstellen (Leuschner *et al.*, 2012). Dieser Prozess wird als extramedulläre Monozytopoiese bezeichnet und ist abhängig von IL 1 $\beta$ , welches nach Infarkt in der Milz nachweisbar ist (Leuschner *et al.*, 2012). Die Milz verfügt also über ein rasch mobilisierbares Monozytenreservoir und ist dazu in der Lage, außerhalb des Knochenmarks reife Monozyten aus Vorläufern zu bilden.

### 1.3.5 Fazit

Die neutrophilen Granulozyten dominieren das Zellinfiltrat des Infarktgewebes in der frühen Phase nach Ischämie und üben im Gewebe wichtige Funktionen aus. Wie im Folgenden zu sehen ist, bedingt der plötzlich erhöhte Bedarf an neutrophilen Granulozyten eine reaktive Aktivierung der Hämatopoese im Knochenmark. Monozyten üben ebenfalls wichtige Funktionen aus, sind den Neutrophilen jedoch quantitativ untergeordnet. Zudem geht deren Nachschub auf Reservoirs und die Monozytopoese außerhalb des Knochenmarks zurück.

## 1.4 Inflammation - Das Knochenmark im Stress

### 1.4.1 Verortung

Wie bereits erläutert, unterliegt das blutbildende Knochenmark einem hohen Zellumsatz. Täglich entstehen durch Proliferation und Differenzierung von Vorläuferzellen, die bis auf die hämatopoetische Stammzelle zurückgehen, differenzierte und funktionsfähige Blutzellen, die aus dem Knochenmark freigesetzt werden. Im Fall von Blutverlust, Infektion oder Verletzung geht der Bedarf an spezifischen Zellpopulationen deutlich über den Grundumsatz hinaus. In solchen Situationen kann das hämatopoetische System seine Leistung um ein Vielfaches steigern.

### 1.4.2 *Emergency granulopoiesis*

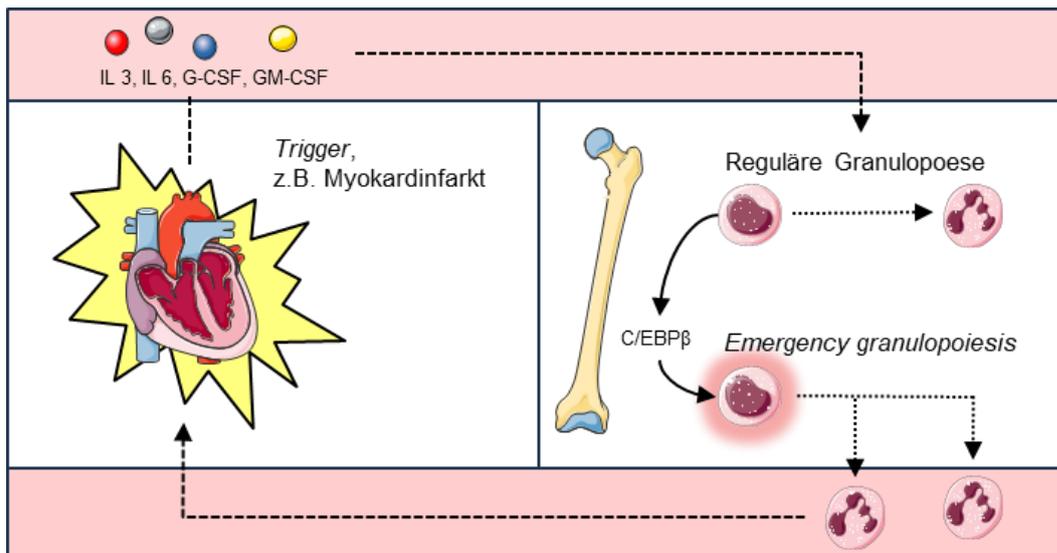
Insbesondere im Fall der neutrophilen Granulozyten, die als Vertreter des angeborenen Immunsystems bei Infektionen, Verletzungen oder Ischämie als Erste und in großer Zahl ins Gewebe abwandern, ist eine rasche und spezifische Steigerung der Granulopoese von Nöten. Somit ist sichergestellt, dass bei erhöhtem Bedarf ausreichend Zellen zur Verfügung stehen und die immunologische Reaktion aufrechterhalten werden kann. Der Effekt ist im klinischen Alltag seit langem bekannt und wird sich diagnostisch zu Nutze gemacht: Eine Leukozytose und Linksverschiebung im Blutbild, d.h. der vermehrte Nachweis von Leukozyten und speziell Granulozyten im Blut und das Vorhandensein von myeloischen Vorstufen, die sonst nur im Knochenmark vorkommen, sind als labormedizinischer Hinweis für eine schwerwiegende Infektion zu werten. Anders als bei den Monozyten, die über beachtliche Reservoirs verfügen, geht der Nachschub von Granulozyten in erster Linie auf eine Steigerung der Granulopoese im Knochenmark zurück (Manz & Boettcher, 2014). Die Steigerung der *de novo* Bildung von neutrophilen Granulozyten durch Proliferation von Vorläuferzellen im Knochenmark als Reaktion auf einen immunologischen Trigger wird als *Emergency granulopoiesis* bezeichnet (Manz & Boettcher, 2014). Nach Manz kann dieser Prozess als regulatorische Schleife verstanden und in drei Phasen unterteilt werden:

1. Zunächst muss ein immunologischer Trigger erkannt werden.

2. Anschließend wird dieser auf molekularer Ebene zu einer Steigerung der Granulopoese umgesetzt.

3. Zuletzt erfolgt eine Rückkopplung, sodass die Granulopoese zum Grundumsatz zurückkehren kann (Manz & Boettcher, 2014).

Die Aktivierung des hämatopoetischen Systems kann entweder direkt oder indirekt erfolgen. Beides ist mit der Aktivierung von TLR assoziiert (Manz & Boettcher, 2014). Bei der relevanteren indirekten Aktivierung erkennen Zellen fernab des Knochenmarks einen Trigger und vermitteln durch die Ausschüttung von Mediatoren die Steigerung der Granulopoese. Zu den granulopoetisch wirksamen Mediatoren gehören IL 3, IL 6, G-CSF und GM-CSF (Manz & Boettcher, 2014). Darüber hinaus exprimieren auch Zellen der Stammzellnische und die hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen selbst TLR und können so direkt aktiviert werden (Manz & Boettcher, 2014). Mit der Granulopoese werden diverse Transkriptionsfaktoren in Verbindung gebracht, von denen zwei aufgrund ihrer antagonistischen Wirkung auf den Zellzyklus besonders herausstechen. C/EBP $\alpha$  wird unter Normalbedingungen stetig exprimiert und reguliert die Granulopoese im Ruhezustand. Es fördert die Differenzierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen zu Granulozyten und sorgt somit für eine stetige Produktion und Freisetzung von Neutrophilen im Knochenmark. Gleichzeitig wirkt C/EBP $\alpha$  hemmend auf den Zellzyklus, indem es die Expression der zellzyklusfördernden Faktoren Myc, Cdk2 und Cdk4 unterdrückt (Manz & Boettcher, 2014). C/EBP $\beta$  hingegen wird unter hämatopoetischen Stressbedingungen exprimiert. Ähnlich zu C/EBP $\alpha$  fördert es die granulopoetische Differenzierung, im Unterschied zu C/EBP $\alpha$  jedoch enthemmt es den Zellzyklus durch gezielte Expression der o.g. Faktoren und verstärkt so die Proliferation von Vorläuferzellen in der Granulopoese (Manz & Boettcher, 2014). Wie zu erwarten, bewirken nun allen voran G-CSF, aber auch GM-CSF und IL 6 über ihre jeweiligen Rezeptoren und Signalwege die Expression von C/EBP $\beta$  und somit den Wechsel von C/EBP $\alpha$ - zu C/EBP $\beta$ -abhängiger Granulopoese (Manz & Boettcher, 2014). C/EBP $\beta$  ist damit als genetischer Schalter für eine gesteigerte Granulopoese in Stresssituationen zu verstehen (Abbildung 1). Abschließend findet zur Regulation des Ganzen eine negative Rückkopplung statt: Die aktivierten Signalwege führen zur Expression von Inhibitoren, die etwa die Rezeptorwirkung des G-CSF-R unterdrücken und so die Rückkehr zur regulären Granulopoese ermöglichen (Manz & Boettcher, 2014).



**Abbildung 1: Emergency granulopoiesis**

Schematische Darstellung: Nach einem immunologischen *Trigger* (hier Myokardinfarkt, links) kommt es zur Freisetzung von granulopoetisch wirksamen Mediatoren (oben), die im blutbildenden Knochenmark ein Umschalten der regulären Granulopoese zur *Emergency granulopoiesis* bewirken. C/EBP $\beta$  gilt dabei als wichtiger Transkriptionsfaktor (rechte Seite). Es werden nun mehr Granulozyten gebildet, um die immunologische Reaktion aufrecht zu erhalten (unten).

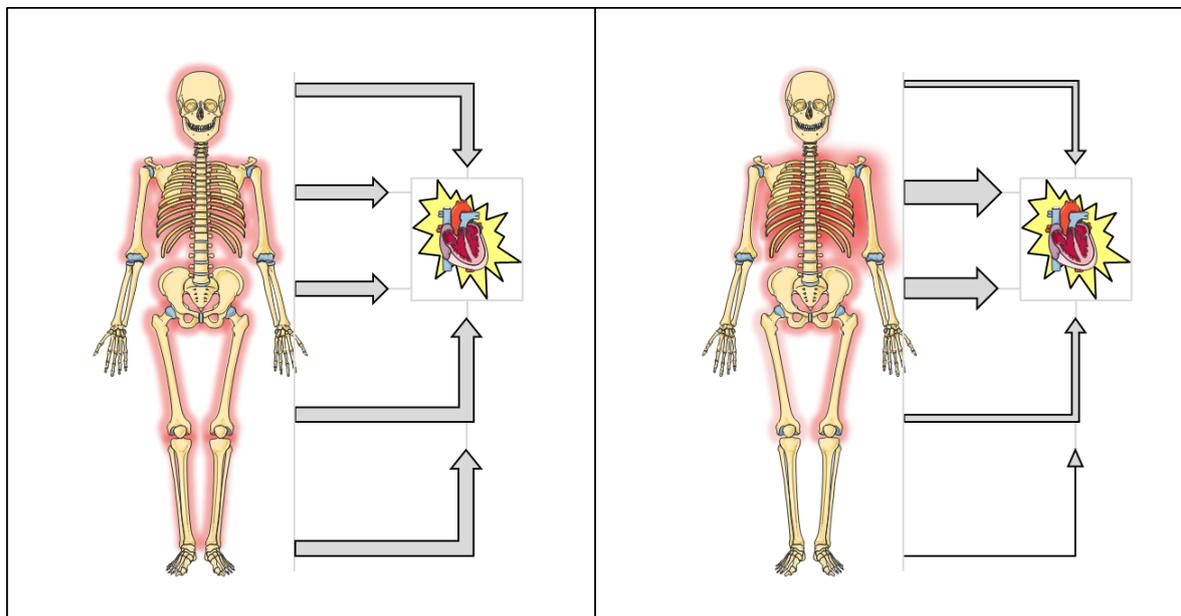
#### 1.4.3 Zusammenfassung

Zusammengefasst wird der Heilungsprozess nach ischämischem Myokardinfarkt maßgeblich von einwandernden Immunzellen mitgetragen und organisiert. Neutrophile Granulozyten und Monozyten stellen dabei die wichtigsten Vertreter während der frühen, inflammatorischen Phase dar. Um den Bedarf an Immunzellen zu decken und die Heilung nicht zu gefährden, findet im blutbildenden Knochenmark prompt eine Steigerung der Hämatopoese statt. Somit wird der Einfluss des Myokardinfarkts auf das blutbildende Knochenmark deutlich, *vice versa* ist auch ein funktionsfähiges Knochenmark für die Heilung nach Myokardinfarkt von Bedeutung. Im Folgenden werden weiterführende Aspekte beleuchtet, die zur Hypothese dieser Arbeit geführt haben.

#### 1.4.4 Aktivierung des Knochenmarks

Bis heute wird im Allgemeinen Folgendes angenommen: Erstens, bei gesteigerter Hämatopoese erfolgt die Freisetzung von Leukozyten gleichmäßig über das gesamte blutbildende Knochenmark. Das hämatopoetische System wird demnach homogen und als eine Einheit aktiviert, unabhängig davon, wo sich der immunologische Fokus befindet. Zweitens, die Freisetzung und Emigration der Leukozyten aus dem Knochenmark findet ausschließlich über den Blutstrom, also auf hämatogenem Wege statt. Es existieren jedoch zunehmend Forschungsergebnisse, die diese dogmatischen Annahmen in Frage stellen.

Das Knochenmark scheint in der Lage zu sein, durchaus flexibel und uneinheitlich auf inflammatorische Trigger zu reagieren. Damit ist gemeint, dass Knochenmark-Kompartimente, die einen räumlichen Bezug zum inflammatorischen Fokus haben, stärker aktiviert und ins Entzündungsgeschehen involviert werden (Abbildung 2). Zudem scheint es möglich, dass neben der hämatogenen Emigration auch eine direkte Migration von Leukozyten durch den Knochen erfolgt (Herisson *et al.*, 2018). Eine angloamerikanische Forschungsgruppe konnte zeigen, dass im Fall des ischämischen Schlaganfalls, aufgrund der räumlichen Nähe, signifikant mehr neutrophile Granulozyten aus dem benachbarten Schädelknochen ins infarzierte Gehirn einwandern, als aus anderen Knochenmark-Kompartimenten (Herisson *et al.*, 2018). Darüber hinaus wurden mikroskopisch kleine Kanäle im Knochen des Schädels nachgewiesen, die das Knochenmark unmittelbar mit den Meningen verbinden, der bindegewebigen Ummantelung des Gehirns. In den Kanälen verlaufen Gefäße, die eine direkte Verbindung zum Knochenmark bilden und über die eine Auswanderung von Neutrophilen aus dem Knochenmark beobachtet wurde (Herisson *et al.*, 2018). Wir nehmen dies als Grund zur Annahme, dass die anatomische Nähe zum Knochenmark einen besonderen Einfluss auf dessen Funktion und Beteiligung an immunologischen Prozessen hat und dass dies als allgemeines Prinzip auch im Rahmen anderer Krankheitsbilder zum Tragen kommt.



**Abbildung 2: Aktivierung des Knochenmarks**

Links: Homogene Aktivierung des Knochenmarks nach einem *Trigger* (hier: Myokardinfarkt);  
 Rechts: Inhomogene, ortsabhängige Aktivierung des Knochenmarks nach Myokardinfarkt mit stärkerer Beteiligung der Kompartimente des linksseitigen Thorax.

## 1.5 Hypothese

In dieser Arbeit wird postuliert, dass das Knochenmark des Sternums aufgrund seiner unmittelbaren Nähe zum Herzen eine Schlüsselrolle in der immunologischen Reaktion nach Myokardinfarkt einnimmt. Das bedeutet, dass es in besonderem Maße aktiviert wird und verhältnismäßig viele Immunzellen aus dem Sternum ins infarzierte Gewebe einwandern. Darüber hinaus wird postuliert, dass Immunzellen aus dem Knochenmark direkt über die Compacta des Knochens in das Infarktareal eindringen. Diese Hypothese wird durch folgende Faktoren unterstützt:

1. Wie bereits unter 1.2.2 beschrieben, beherbergt das Sternum hoch aktives Knochenmark und besitzt damit eine außerordentliche hämatopoetische Potenz.
2. Es ist bekannt, dass der Myokardinfarkt von einer Perikarditis begleitet wird, die einer Ausweitung der immunologischen Reaktion auf das perikardiale Kompartiment entspricht (Frangogiannis, 2015). Da das Sternum unmittelbar ans Perikardium angrenzt, ist eine Inflammation im Knochenmark des Sternums als Folge des Infarkts wahrscheinlich. Unterstützt wird das Ganze durch den Verlauf der *Aa. thoracicae internae*, deren Äste das Sternum versorgen und die mit ihrem perikardialen Verlauf den Transport proinflammatorischer Mediatoren aus dem Infarkt in das Knochenmark ermöglichen. Eine Übertragung der Inflammation in das Knochenmark des Sternums scheint somit wahrscheinlich.
3. Im Ischämiefall ist eine direkte hämatogene Einwanderung von Leukozyten in das betroffene Gewebe nicht möglich, Zellen können lediglich aus den durchbluteten Randbereichen in das infarzierte Gewebe eindringen. Die zusätzliche, direkte Migration von Zellen aus dem Knochenmark scheint somit vorteilhaft.

## 1.6 Hintergründe zu den angewandten Methoden

Im Folgenden soll eine kurze Einführung zu den Hintergründen der angewandten Methoden zum Verständnis der Zielsetzung beitragen. Die einzelnen Verfahren werden anschließend im Teil Material und Methoden detailliert beschrieben.

### 1.6.1 Die Magnetresonanz-Bildgebung

Die Magnetresonanz-Bildgebung (MR-Bildgebung) ist in vielen Bereichen der Medizin zum Standard bei der Beurteilung von Struktur und Funktion von Organen und Geweben avanciert. Ihre Nachteile wie hohe Kosten, eine geringe Verfügbarkeit und lange Messdauern werden durch die hohe Auflösung, das Fehlen ionisierender Strahlung und ihre vielfältigen Einsatzmöglichkeiten aufgehoben. Letztere sind besonders hervorzuheben, die Bandbreite an verfügbaren Pulssequenzen erlaubt es dem Anwender, je nach

Fragestellung Teilkomponenten des MR-Signals zu unterdrücken oder zu verstärken und die Technik so zu seinem Vorteil zu nutzen. Andere bildgebende Verfahren wie das Röntgen oder die Sonografie, basierend auf der Absorption ionisierender Strahlung oder der Reflektion von Schallwellen, nutzen im Grunde singuläre Eigenschaften des Gewebes aus, die wenig zusätzlichen Spielraum bieten. Anders die MR-Bildgebung: Von der Anregung der Spins durch einen Radiofrequenzimpuls über die zeitliche Dynamik des MR-Signals, bis hin zur Anwendung von Gradientenfeldern und weiterer Impulse zwecks Bildgebung, wohnen der MRT viele Variablen inne, die sich auf verschiedenste Art und Weise zu Nutze gemacht werden können. Die unzähligen Möglichkeiten, die die MR-Bildgebung bietet, haben seit ihrer Entdeckung kontinuierlich zur Entwicklung neuer Sequenzen und neuer Anwendungen geführt. In der klassischen MR-Bildgebung wird die Energie gemessen, die Protonen nach Anregung durch einen Radiofrequenzimpuls abgeben, während sie in der sog. Relaxationsphase einem Zustand des Gleichgewichts und der niedrigeren Energie zustreben (Lota *et al.*, 2017). Die Relaxation besteht aus zwei Anteilen: Der Wiederherstellung der longitudinalen Komponente der Magnetisierung (T1 Relaxation) und dem Zerfall der messbaren transversalen Komponente der Magnetisierung (T2 Relaxation) nach einem Radiofrequenzimpuls (Lota *et al.*, 2017). Biologische Proben besitzen spezifische Werte für T1 und T2, deren Unterschiede die Grundlage für den Kontrast in MR-Bildern ausmachen. In der konventionellen MR-Bildgebung beeinflussen T1 und T2 zwar entscheidend das MR-Signal und den Bildkontrast, sie werden allerdings nicht direkt gemessen. Je nach angewandter Sequenz summieren sich die Effekte von T1 und T2 auf und das MR-Signal eines Voxels wird als Graustufe relativ zur Signalintensität eines Spektrums dargestellt (Lota *et al.*, 2017). Es entsteht ein anatomisches Bild, welches der qualitativen Analyse durch einen Beobachter bereitsteht.

### 1.6.2 Das *T1*- und *T2*-Mapping

Im Gegensatz zur konventionellen MR-Bildgebung, ermöglichen weiterentwickelte Verfahren die Messung von T1 und T2 und damit der elektromagnetischen Grundeigenschaften eines Gewebes. Kleinste Veränderungen der Relaxation durch Alterationen auf mikroskopischer Ebene können so registriert und auch quantifiziert werden. Die Quantifizierung hat einen entscheidenden Vorteil, man ist nicht mehr auf die subjektive Analyse durch einen Beobachter angewiesen und selbst geringfügige, diffuse Veränderungen im Gewebe werden erkannt. Beim angewandten *T1*- und *T2*-Mapping handelt es sich um sogenannte parametrische Verfahren, bei denen auf Basis einer Reihe von Messungen die T1- oder T2-Relaxationszeiten einzelner Voxel berechnet werden (Lota *et al.*, 2017). Diese wurden genutzt, um das Knochenmark des Sternums anhand seiner T1- und T2-Werte zu charakterisieren. Anschließend wurde das Gewebe auf

Veränderungen nach Myokardinfarkt hin untersucht und die Daten mit denen anderer Knochenmark-Kompartimente verglichen.

### 1.6.3 Das *Chemical-shift Imaging*

Die klinische MR-Bildgebung basiert auf der Anregung von  $^1\text{H}$ -Protonen. Obwohl diese prinzipiell eine einheitliche Resonanzfrequenz besitzen, kommt es je nach chemischer Bindung des  $^1\text{H}$ -Atoms zu geringfügigen Unterschieden in der Resonanzfrequenz der jeweiligen Atomkerne. Diese minimalen Abweichungen werden als *Chemical shift* bezeichnet und wurden bereits wenige Jahre nach Entdeckung der NMR erstmalig beschrieben (W. G. Proctor and F. C. Yu). In der klinischen MR-Bildgebung kommt vor allem der Unterschied zwischen  $^1\text{H}$  gebunden in Wasser und  $^1\text{H}$  gebunden in langkettigen Kohlenwasserstoffen (überwiegend Fettsäuren) zum Tragen. Der *Chemical shift* von Fetten zu Wasser beträgt im Schnitt 3 ppm,  $^1\text{H}$  in  $\text{H}_2\text{O}$  hat damit eine etwas höhere Resonanzfrequenz als in Kohlenwasserstoffen (Haase *et al.*, 1985). Beide Komponenten kommen physiologisch in großen Mengen vor und tragen so zum MR-Signal eines Gewebes bei. Mit der Entwicklung und Verbreitung der MRT haben sich verschiedene Verfahren etabliert, die sich den *Chemical shift* zu Nutze machen, um das MR-Signal von Wasser und Fett getrennt zu beurteilen und damit zusätzliche Informationen in der klinischen Diagnostik zu liefern.

### 1.6.4 Die $^{19}\text{F}$ -MRT

Während sich die klinische MR-Bildgebung fast ausschließlich auf die Eigenschaften des  $^1\text{H}$  stützt, bedient sich die  $^{19}\text{F}$ -Bildgebung eines weiteren, MR-aktiven Atomkerns. Das Fluorisotop  $^{19}\text{F}$  hat eine eigene Resonanzfrequenz und kann daher unabhängig von  $^1\text{H}$  angeregt werden. Es ermöglicht somit eine zusätzliche und von  $^1\text{H}$  unabhängige MR-Bildgebung.  $^{19}\text{F}$  kommt physiologisch in vernachlässigbar geringer Konzentration vor und kann daher, wenn es extrinsisch appliziert wird, mit hoher Spezifität und ohne Hintergrundsignal im Körper durch MRT nachgewiesen werden (Flögel *et al.*, 2008). Zur biologischen Anwendung kommt das  $^{19}\text{F}$  zum Beispiel in Form von Nanopartikeln, die durch bestimmte Immunzell-Subpopulationen aufgenommen werden (Flögel *et al.*, 2008). Die  $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -Bildgebung macht sich die Vorteile der jeweiligen Atomkerne zu Nutze. Während das  $^{19}\text{F}$  als biologischer Marker appliziert und spezifisch nachgewiesen wird, liefert die dazugehörige  $^1\text{H}$ -Bildgebung hochauflösende anatomische Referenzbilder. Durch das Übereinanderlegen der MR-Bilder einer  $^1\text{H}$ - und  $^{19}\text{F}$ -Messsequenz lässt sich der Marker exakt lokalisieren.

## 1.7 Zielsetzung

Ziel der Arbeit ist es, mit Hilfe der oben beschriebenen Methoden Hinweise für die vermutete Rolle des Sternums nach Myokardinfarkt festzustellen. Hierzu wurden MR-Studien an Versuchstieren durchgeführt und das Knochenmark des Sternums anhand seiner T1- und T2-Werte und seinem Lipidgehalt charakterisiert. Das Gewebe wurde auf Veränderungen nach Myokardinfarkt hin untersucht und die Daten wurden mit denen anderer Knochenmark-Kompartimente verglichen. Die einzige Möglichkeit zum Nachweis einer Migration von Zellen aus dem Sternum in das infarzierte Myokard besteht in der selektiven Markierung der Zellen im Knochenmark. Daher wurde ein mikrochirurgisches Injektionsverfahren entwickelt und ein  $^{19}\text{F}$ -Marker in das Knochenmark des Sternums appliziert, um anschließend die Migration der Zellen durch  $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT bildgebend darzustellen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Lösungen und Reagenzien

**Tabelle 1:** Lösungen und Reagenzien für die Herstellung der Perfluorcarbon-Nanoemulsion

Phosphat-Glycerol-Puffer	Eigenherstellung aus 1 mM) Phosphat (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), 7 mM Dinatriumhydrogenphosphat (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), 3 mM Natriumdihydrogenphosphat, (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), 2,5 % m/m Glycerol (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Phospholipid S 75	LIPOID S 75 (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Deutschland)
Perfluorcarbon	Perfluoro-15-kronen-5-ether 98 % (Abcr GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
Phospholipid PE-PEG	LIPOID PE 18:0/18:0-PEG 2000 (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Deutschland)
Maleimid	DSPE-PEG(2000) Maleimid (Avanti Polar Lipids, Birmingham, USA)
Fluoreszenzmarker	DPPE Atto 647 (ATTO-TEC GmbH, Siegen, Deutschland)
Neutrophile Granulozyten Protein (NGP)	CD177 spezifischer Peptidligand AS-Sequenz FAM-Asp-Phe-Tyr-Lys-Pro-Met-Pro-Asn-Leu-Arg-Ile-Thr-Gly-Gly-Gly-Cys-NH, Fluorochrom 5(6)-Carboxyfluorescein (Genaxxon bioscience, Ulm, Deutschland)

**Tabelle 2:** Lösungen und Reagenzien für die Durchflusszytometrie

PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Lyse-Puffer	Isotone Ammoniumchlorid-Lösung pH 7,4 (Zentralapotheke Universitätsklinikum Düsseldorf)
MACS-Puffer	Eigenherstellung aus 500 ml PBS (Karl Roth, Karlsruhe, Deutschland), 2 mM EDTA, 0,5 % BSA
Fc-Blocking Reagenz	Fc-Rezeptor Blocking Reagenz Maus (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland)
Antikörper	APC/Anti-Maus Ly-6C (BioLegend, San Diego, CA USA), PE-Cyanine7/Anti-Maus Cd11b (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA USA), FITC/Anti-Maus Ly6G (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ USA), PerCP/Anti-Maus CD45 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ USA)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol (Merck, Darmstadt, Deutschland)

### 2.1.2 Allgemeine Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 3:** Allgemeine Verbrauchsmaterialien

Reaktionsgefäße	Eppi safe lock tubes 0,5 ml und 1,5 ml (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
96-Well-Platten	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Zellsieb 100 µm	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
FACS-Röhrchen	Trucount counting tubes (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA)

### 2.1.3 Gerätschaften

**Tabelle 4:** Gerätschaften für die Herstellung der Nanoemulsionen

Hochdruckhomogenisator	Microfluidics LV1 Low Volume Microfluidizer (IDEX Corporation, Lake Forest, USA)
------------------------	---

Disperger	T 18 basic ULTRA-TURRAX (IKA-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland)
Rotator	MACSmix Tube Rotator (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland)

**Tabelle 5:** Gerätschaften für die Durchflusszytometrie

Zentrifugen	Zentrifuge Universal 320R (Hettich, Tuttlingen, Deutschland), Zentrifuge 5424 R (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Durchflusszytometer	FACS Canto II, (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA)

**Tabelle 6:** Gerätschaften MRT

NMR-Spektrometer	Bruker AVANCE III 9.4-T wide bore NMR-Spektrometer mit Microimaging unit (Mini 0.5) und aktiv abgeschirmten Gradientensystemen (Bruker, Rheinstetten, Deutschland) Frequenzen von 400.13 MHz für $^1\text{H}$ und 376.46 MHz für $^{19}\text{F}$
Probenköpfe	Microimaging System Mini 0,5 mit 25 mm birdcage (Bruker, Rheinstetten, Deutschland)
Betriebssystem	ParaVision 5.1 (Bruker, Rheinstetten, Deutschland)

#### 2.1.4 MR-Scans

**Tabelle 7:** MR-Scans

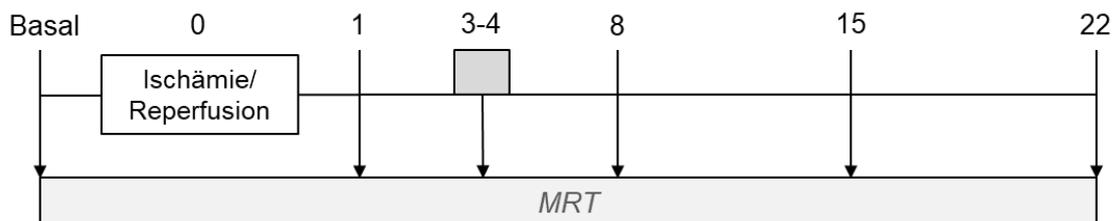
<i>T1-Mapping</i>	Gespoilte Gradientenechosequenz: IntradateFLASH (Bruker, Rheinstetten, Deutschland) Parameter: TR 5820 ms, TE 1262 ms, Rep. 50, FOV 30 x 30 mm, Matrix 256 x 256, Schichtdicke 1 mm, Pixel 0,117 x 0,117 mm, Dauer 39 s, flip angels 2, 5, 8, 11, 14
<i>T2-Mapping</i>	Multi-Spin-Echo-Sequenz: mic_msme (Bruker, Rheinstetten, Deutschland) Parameter: TR 500 ms, TE 3,36 ms, FOV 30 x 30 mm, Matrix 128 x 128, Schichtdicke 1 mm, Pixel 0,234 x 0,234

	mm, Dauer 2 m 8 s, 16 Echo Bilder zu effektiver Echozeit 16 x 3,36 ms (3,36 bis 53,7 ms)
FISP	Gradientenechobasierte cine movies: FISP (Bruker, Rheinstetten, Deutschland) Parameter: TR 6750 ms, TE 1229 ms, Rep. 1, FOV 30 x 30 mm, Matrix 128 x 128, Schichtdicke 1 mm, Pixel 0,234 x 0,234 mm, Dauer 28 s, 16 Bilder EKG getriggert zu Filmchen
Anatomie Sternum	Gradientenecho-Sequenz: mic_flash (Bruker, Rheinstetten, Deutschland) Parameter: TR 112 ms, TE 1,62 ms, Rep. 1, FOV 30 x 30 mm, Matrix 128 x 128, Schichtdicke 1 mm, Pixel 0,234 x 0,234 mm, Dauer 14 s
Anatomie Femur	Spin-Echo-Sequenz mic_rare Parameter: TR 4000 ms, TE 4,4 ms, Rep. 1, FOV 25,6 x 40 mm, Matrix 256 x 256, Schichtdicke 1 mm, Pixel 0,1 x 0,156 mm, Dauer 2 m 8 s
<sup>19</sup> F Herz <i>ex vivo</i>	Spin-Echo-Sequenz mic_rare mit 3D Geolmaging Parameter: TR 2500 ms, TE 15 ms (effektiv 255.34 ms), Rep. 1, Av. 160, FOV 10 x 10 mm, Matrix 128 x 92 x 92, Schichtdicke 10 mm, Pixel 0,078 x 0,109 x 0,109 mm, Dauer 20 h 26 min 40 s
<sup>1</sup> H Herz <i>ex vivo</i>	Spin-Echo-Sequenz mic_rare mit 3D Geolmaging Parameter: TR 2500 ms, TE 3500 ms (effektiv 59,5 ms), Rep. 1, Av. 8, FOV 10 x 10 mm, Matrix 128 x 92 x 92, Schichtdicke 10 mm, Pixel 0,078 x 0,109 x 0,109 mm, Dauer 1 h 1 min 20 s
<sup>19</sup> F <i>in vivo</i>	Spin-Echo-Sequenz mic_rare Parameter: TR 2500 ms, TE 3,088 ms, Rep. 1, Averages

	112, FOV 30 x 30 mm, Matrix 32 x 32, Schichtdicke 2 mm, Pixel 0,938 x 0,938 mm <sup>2</sup> , Dauer 21 m 20 s
<sup>1</sup> H <i>in vivo</i>	Gespoilte Gradientenechosequenz: IntragateFLASH (Bruker, Rheinstetten, Deutschland) Parameter: TR 5820 ms, TE 1262 ms, Rep. 150, FOV 30 x 30 mm, Matrix 256 x 256, Schichtdicke 1 mm, Pixel 0,117 x 0,117 mm, Dauer 1 m 54 s
MCSS <i>Imaging</i>	Stimulierte-Echo-Sequenz: mic_cssim (Bruker, Rheinstetten, Deutschland) Parameter: TR 2000 ms, TE 4310 ms, Rep. 1, FOV 30 x 30 mm, Matrix 128 x 128, Schichtdicke 1 mm, Pixel 0,234 x 0,234 mm, Dauer 1 m 28 s

## 2.2 Übersicht über die durchgeführten Versuche

Im ersten Teil wurden Versuchstiere *in vivo* auf Knochenmarksveränderungen des Sternums und des Femurs nach Myokardinfarkt hin untersucht. Hierzu wurden insgesamt 15 Mäuse in 3 Versuchsreihen einem Ischämie-Reperfusion-Modell unterzogen. Anschließend wurden wiederholt MR-Messungen über einen Zeitraum von 22 Tagen durchgeführt, anfangs im Intervall von 1-3 Tagen, später in wöchentlichen Abständen (Abbildung 3). Ein Versuchstier ist intraoperativ verstorben und wurde daher nicht in die Bewertung miteinbezogen, n ist folglich mit 14 bzw. 9 angegeben. Am Sternum (n=14) und am Femur (n=9) wurden das *T1-Mapping*, das *T2-Mapping* und das *Chemical-shift Imaging* durchgeführt.



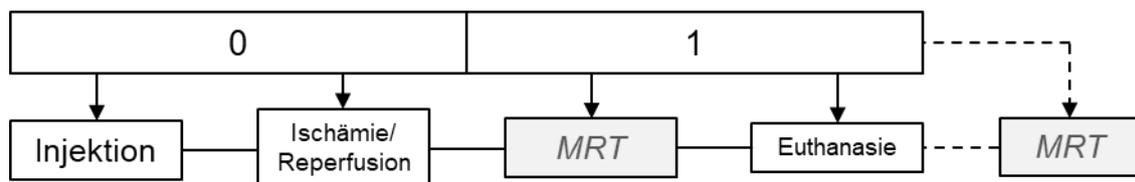
**Abbildung 3: Versuchsreihe MRT des Knochenmarks**

Zeitstrahl mit angezeigten Messzeiten basal und an 1-22 Tagen nach *Ischämie-Reperfusion*

Im zweiten Teil wurde ein mikrochirurgisches Verfahren zur Markierung von Immunzellen im Knochenmark des murinen Sternums etabliert. Als Marker diente eine Perfluorcarbon-Nanoemulsion, die durch Injektion in die Knochensegmente appliziert wurde. Zur Beurteilung der Güte des Verfahrens wurde das Knochenmark des Sternums nach Injektion

isoliert und durch FACS analysiert. Hierbei wurden insbesondere die für die Fragestellung relevanten „*First responder*“ der myeloischen Reihe untersucht, d.h. Neutrophile und Monozyten. Es wurde der Einfluss der Injektion auf die Gesamtzahl der Zellen im Sternum und die Aufnahme des Markers in die Zellen analysiert. Insgesamt wurden je sechs Sterna für Messungen basal- und *post injectionem, ex vivo* (n=12) verwendet und 4 Versuchstiere für die Messungen *post injectionem, in vivo* (n=4).

Anschließend wurden die Methoden aus den vorausgehenden Versuchen kombiniert, um die Migration von myeloischen Zellen aus dem Sternum in das infarzierte Herz bildgebend darzustellen. Hierzu wurde unser Marker wenige Stunden vor Ischämie-Reperfusion in das Sternum injiziert. Einen Tag nach der Intervention wurden MR-Messungen durchgeführt, um den Marker mittels  $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT im Herzen zu lokalisieren (Abbildung 4). Dies erfolgte zunächst *in vivo* und nach Euthanasie der Versuchstiere auch *ex vivo*, an jeweils drei Versuchstieren (n=3).



**Abbildung 4: Versuchsreihe  $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT nach Injektion**

Zeitstrahl mit Intervention und Zeitpunkte der MR-Messungen

## 2.3 Tierversuche

### 2.3.1 Versuchstiere

Die Versuche erfolgten anhand männlicher Mäuse vom Stamm C57BL/6 mit einem Gewicht von 20-25 g und einem Alter von 10-12 Wochen (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, Frankreich). Für die Zeit der Versuche wurden sie an der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gehalten und erhielten Standardfutter sowie freien Zugang zu Trinkwasser. Alle durchgeführten Versuche wurden beim Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV NRW) beantragt und genehmigt (Aktenzeichen: 81-02.04.2020.A290). Vor Durchführung der Tierversuche erfolgte die Teilnahme am „Versuchstierkudkurs“ der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf („Versuchstierkundliche Einführung zur Erlangung des Fachkundenachweises gemäß §9 des geltenden Tierschutzgesetzes“).

### 2.3.2 Handling während der MR-Messungen

Während der MR-Messungen wurden die Versuchstiere mittels Isofluran über eine institutseigene Atemmaske sediert (1,5 % Isofluran in 20/80 % Sauerstoff/Stickstoff-Gemisch, Fluss 75 ml/min). Es wurde eine konstante Temperatur von 37 °C beibehalten und es erfolgte ein kontinuierliches Monitoring der Herz- und Atemfrequenz (Oberflächen-EKG, Drucksensor) über das Monitoring-System M1025 (SA Instruments, Stony Brook, USA).



**Abbildung 5: Workflow am MRT**

Links ein Versuchstier (schematisch) im MR-Spektrometer, mittig der Doktorand bei der Bedienung des Spektrometers und rechts ein anatomisches MR-Bild in Schnittebene des Sternums.

### 2.3.3 Intrasternale Injektionen

Es erfolgte die übliche Vorbereitung und Narkotisierung der Versuchstiere mittels inhalativer Sedierung über eine institutseigene Atemmaske (1,5 % Isofluran in 20/80 % Sauerstoff/Stickstoff-Gemisch, Fluss 75 ml/min) und subkutan applizierter Analgesie mit Carprofen 5 mg/kg KGW. Die Haut wurde im Thoraxbereich mittels Schere über einen Zentimeter im Längsschnitt eröffnet, anschließend erfolgte die weitere Präparation stumpf entlang der *Linea mediana* bis zur Sternumoberfläche. Nach Darstellung der einzelnen Sternumsegmente wurden diese vorsichtig punktiert und jeweils 5 µl der vorbereiteten Emulsion wurden langsam injiziert. Die Injektion erfolgte mittels Sterican 30 G Kanüle (B. Braun, Melsungen, Deutschland) und Präzisionsspritze (Hamilton, Reno, USA). Je Versuchstier wurden drei Segmente punktiert. Im Falle leichter Blutungen wurden die Injektionsstellen komprimiert. Abschließend wurde die Wunde mittels fortlaufender Naht der Muskulatur und Einzelknopfnähten der Haut wieder verschlossen. Postoperativ erfolgte eine Analgesie mit Carprofen 5.0 mg/kg KGW s.c. täglich bis zum Ende der Versuchsreihe.

### 2.3.4 Infarktinduktion durch Ischämie-Reperfusion

Es erfolgte die übliche Vorbereitung der Versuchstiere: Narkotisierung nach Intubation mittels Vasofix Braunüle 20 G (B. Braun, Melsungen, Deutschland.); Beatmung mittels Gasgemischs aus 1,5 % Isofluran in 20/80 % Sauerstoff/Stickstoff-Gemisch; Präoperative Analgesie mit Carprofen 5 mg/kg KGW s.c.; Anlage eines EKGs zur intraoperativen Überwachung und zur Ischämiekontrolle. Anschließend erfolgte die Infarktinduktion nach institutseigenem Standard: Hautschnitt über 0,5 cm im Bereich der lateralen Thoraxwand; stumpfe Präparation der Thoraxmuskulatur bis zum knöchernen Thorax; Anlage von interkostalen Haltefäden; stumpfe Präparation der Zwischenrippenmuskulatur; Spreizung der Rippen und Eröffnung des Perikards; transiente Ligatur der LDA mittels 7/0 Prolene-Faden und Erfolgskontrolle der Operation durch infarkttypische EKG-Veränderungen; nach 50-minütiger Ischämiezeit Lösen der Ligatur und Verschluss der Schichten durch Vicrylnähte in Einzelknopftechnik. Postoperativ erfolgte eine Analgesie mit Carprofen 5 mg/kg KGW s.c. täglich bis zum Ende der Versuchsreihe. Die Durchführung des Ischämie-Reperfusions-Modells erfolgte durch Dr. med. Zhaoping Ding, ärztlicher Mitarbeiter am Institut für Molekulare Kardiologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Herzlichen Dank an der Stelle.

## 2.4 Perfluorcarbon-Nanoemulsion

### 2.4.1 Hintergrund

Als biologischer  $^{19}\text{F}$ -Marker für die Versuche diente eine Perfluorcarbon-Nanoemulsion. Hierfür wurde Perfluoro-15-kronen-ether verwendet, eine zyklische Kohlenwasserstoffverbindung mit 20  $^{19}\text{F}$ -Kernen. Aufgrund seines einfachen NMR-Spektrums und der hohen Dichte an Resonanzkernen stellt es einen potenten Marker in der  $^{19}\text{F}$ -Bildgebung dar, der sich in diversen *in vivo* Anwendungen bewährt hat (Flögel *et al.*, 2008). Um das Perfluorcarbon biologisch nutzen zu können, wird es in Form einer Nanoemulsion appliziert. Die dabei entstehenden Partikel sind physiologisch mit Lipoproteinen zu vergleichen: Eine Hülle aus Phospholipiden vermittelt nach außen hin eine Löslichkeit in Blut und Gewebe, während sich im hydrophoben Inneren die kohlenwasserstoffhaltigen Perfluoro-15-kronen-ether befinden. Die einzelnen Bestandteile formieren sich aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften zu Partikeln / Lipidtröpfchen, die durch weitere, mechanische Prozessierung (Dispersion und Hochdruckhomogenisation) zerkleinert werden, bis sie Zielgrößen von 100-200 nm erreichen (Bouvain *et al.*, 2020). Die Nanoemulsionen werden nach *in vivo* Injektion überwiegend von Immunzellen der myeloischen Reihe durch Phagozytose aufgenommen und dienen dann als Marker für Myelozyten, die im Rahmen von inflammatorischen Prozessen an bestimmte *Foci* migrieren

und sich dort durch  $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT nachweisen lassen (Flögel *et al.*, 2008). Durch zusätzliche Moleküle können die Eigenschaften der Partikel weiter moduliert werden (Bouvain *et al.*, 2020). Dies diente in unserem Fall einer erhöhten Selektivität der Partikel für die Aufnahme durch neutrophile Granulozyten. Durch den Zusatz von Polyethylenglycol (PEG) zur Emulsion wird dieses in die Phospholipid-Hülle der Partikel integriert und verhindert zunächst die unselektive Aufnahme der Nanoemulsion durch Phagozyten. Gleichzeitig fördert das Neutrophile-Granulozyten-Protein (NGP) die Aufnahme der Nanoemulsion speziell durch neutrophile Granulozyten. Der Peptidligand wird über einen Maleimid-Lipidanker an der Oberfläche der Partikel gebunden (Bouvain *et al.*, 2020). Außerdem wurde ein Fluoreszenzfarbstoff hinzugefügt, um die Aufnahme der Emulsion auch durch Fluoreszenz nachweisen zu können.

#### 2.4.2 Herstellung

Zur Herstellung von 5000 mg der Perfluorcarbon-Nanoemulsion wurden 150 mg Phospholipid S 75, 5 mg Maleimid, 5 mg Phospholipid PE-PEG, 100 µg Fluoreszenzmarker und 2000 mg Perfluorcarbon zusammengeführt und mit Phosphat-Glycerol-Puffer zu einer Gesamtmasse von 5 g aufgewogen. Anschließend wurde durch Dispersion mittels Disperger eine Voremulsion erzeugt, die durch 5 Zyklen im Hochdruckhomogenisator bei 1000 Bar zur Nanoemulsion weiterverarbeitet wurde. Abschließend erfolgte der Zusatz von 240 µg Neutrophile-Granulozyten-Protein, welches über 24 h durch Rotation im Rotator an die Partikel gekoppelt wurde.

### 2.5 FACS-Analysen

#### 2.5.1 Hintergrund

Zur Beurteilung der Güte des *Labeling*-Verfahrens wurden Analysen des sternalen Knochenmarks mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Noch vor Durchführung der eigentlichen Durchflusszytometrie musste das Knochenmark aus dem Sternum gelöst und entsprechend vorbereitet werden. Die Durchflusszytometrie / das FACS ist ein quantitatives Verfahren zur Analyse von Zellen in einem flüssigen Medium. Durch hydrodynamische Fokussierung werden die Zellen eines Mediums einzeln an einem Laser vorbeigelenkt. Photodetektoren registrieren die Lichtbrechung jeder passierenden Zelle als sogenanntes „*Event*“. Hierüber kann die genaue Konzentration von bestimmten Zellen in einem Medium bestimmt werden. Zudem geben die lichtbrechenden Eigenschaften Auskunft über Größe und Granularität der Zellen. Die Streuung in Richtung des Laserstrahls korreliert mit der Zellgröße und wird als „*Forward scatter*“ bezeichnet, die Streuung orthogonal zum Strahlengang korreliert mit der Granularität und wird als „*Side scatter*“ bezeichnet. Durch den zusätzlichen Einsatz fluoreszenzmarkierter Antikörper können weitere Antigene

bestimmt und die Zellen genauer klassifiziert werden. Der Fluoreszenzfarbstoff wird durch den Laser angeregt und emittiert Licht einer spezifischen Wellenlänge, das über zusätzliche Detektoren nachgewiesen wird.

### 2.5.2 Isolation des Knochenmarks

Um das Knochenmark mittels FACS analysieren zu können, musste dieses zunächst aus dem Knochen isoliert werden. Hierzu wurde das Sternum durch scharfes Durchtrennen der sternumnahen Rippen- und Schlüsselbeinansätze aus dem Thorax gelöst und anschließend durch das Entfernen von anhängendem Muskel- und Bindegewebe sowie kurzem Waschen in PBS gesäubert. Die Lösung des Knochenmarks aus dem Sternum erfolgte durch Zentrifugation (Amend *et al.*, 2016). Das Sternum wurde der Länge nach aufgeschnitten und in ein kleines Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Das Gefäß wurde am tiefsten Punkt mit einer 21 G Kanüle eingestochen und mitsamt seinem Inhalt in ein großes Eppendorf Reaktionsgefäß platziert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 10.000 g über 30 Sekunden. Durch die Zentrifugalkraft löst sich das flüssige Mark vom Knochen und sammelt sich als *Pellet* am Grund des größeren Reaktionsgefäßes. Matrixhaltiges Knochen- und Bindegewebe verbleiben dabei im kleinen Reaktionsgefäß. Abschließend wurden die Zellen in 500 µl DMEM resuspendiert und über das Zellsieb gegeben. Um sicherzustellen, dass das Knochenmark vollständig aus dem Sternum gelöst wird, wurde der Vorgang ab Zentrifugation zweimal wiederholt.

### 2.5.3 Präanalytik und Antikörperfärbung

Nach Isolation des Knochenmarks mussten die Zellen weiter aufgearbeitet und gefärbt werden, bevor sie dem FACS zugeführt wurden. Zunächst erfolgte eine Erythrozytenlyse durch Resuspension des Knochenmarks eines Sternums in 3 ml Lysepuffer (Inkubationszeit 10 min). Anschließend wurden die Zellen in 2 ml MACS-Puffer gewaschen, die folgenden Schritte erfolgten mit 100 µl der Lösung auf einer 96 Well Platte. Nach Blockade der zellulären Fc-Rezeptoren mittels *Fc-blocking reagents* (10 µl in 90 µl MACS, Inkubationszeit 10 min) wurden die Zellen durch Inkubation mit einem Cocktail aus je 1 µl CD45-, Ly6G-, Ly6C-, CD11b-Antikörper zu 100 µl MACS-Puffer (20 min) gefärbt und abschließend in 100 µl DAPI-MACS-Lösung (1000:1) resuspendiert. Die Probe wurde in ein FACS-Röhrchen überführt und zeitnah analysiert.

### 2.5.4 FACS-Analyse

Als Zytometer diente ein FACS-Canto II, die Datenverarbeitung erfolgte anhand der dazugehörigen Software FACS Diva (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA). Das *Gating* erfolgte nach institutseigenem Standard wie folgt: Myeloische Zellen wurden durch die Expression von CD45 und CD11b identifiziert. Weiter wurde anhand der

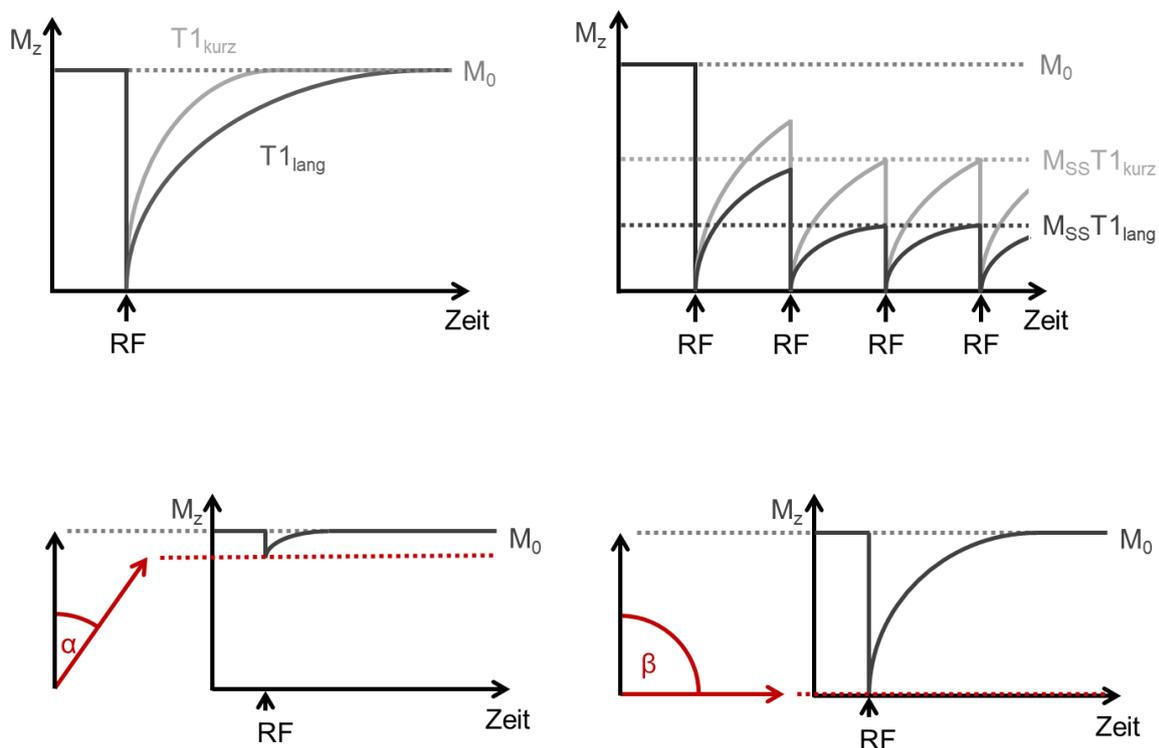
Expression von Ly6G zwischen neutrophilen Granulozyten (Ly6G positiv) und Monozyten (Ly6G negativ) unterschieden. Die Zellen wurden anhand des Fluoreszenzmarkers DPPE Atto 647 auf die Aufnahme von PFC-Nanoemulsion hin untersucht.

## 2.6 MR-Messungen

### 2.6.1 *T1-Mapping*

Das *T1-Mapping* bezeichnet die Berechnung der longitudinalen Relaxationszeit einzelner Voxel und deren Darstellung in einer anatomischen, meist farbkodierten *Map* (Reiter *et al.*, 2018a).  $T_1$  ist die Zeitkonstante der longitudinalen Relaxation, d.h. für die Ausrichtung der Spins einer Probe entlang des Hauptmagnetfelds. Sie wird in ms angegeben und ist als intrinsischer Parameter des Gewebes eine kontrastgebende Determinante in der MR-Bildgebung. Jedes Gewebe besitzt einen Normbereich spezifischer  $T_1$ -Zeiten, von dem Abweichungen auf Veränderungen im Gewebe des betroffenen Voxels hinweisen (Reiter *et al.*, 2018a). Damit lassen sich physiologische und pathophysiologische Prozesse auf mikroskopischer und molekularer Ebene durch Alterationen der  $T_1$ -Zeit charakterisieren. Zu einer Zunahme von  $T_1$  kommt es etwa bei Ödemen, Fibrosierungen, Nekrosen und Amyloidablagerungen. Allesamt Vorgänge, die als Gemeinsamkeit ein Missverhältnis von Zellen und Extrazellularraum zu Gunsten von letzterem haben (Reiter *et al.*, 2018b). Zu einer Verkürzung der  $T_1$ -Zeit kommt es zum Beispiel durch Lipidakkumulation oder die Einlagerung ferromagnetischer Ionen. So sind etwa Eisenspeicherkrankheiten schon früh durch eine deutliche  $T_1$ -Verkürzung charakterisiert (Reiter *et al.*, 2018b). Durch das *T1-Mapping* werden all diese Veränderungen in einem Parameter erfasst und quantifiziert. Sie lassen sich so innerhalb einer Probe oder im zeitlichen Verlauf oder anhand bekannter Normwerte miteinander vergleichen. Eine breite Anwendung findet das Verfahren bisher in der Kardiologie. Hier ist es ein anerkanntes diagnostisches Tool zur Beurteilung des Myokards und trägt zur verbesserten Diagnostik bei diversen kardialen Erkrankungen bei (z.B. Myokarditis, Amyloidose, Morbus Anderson-Fabry, Eisenkardiomyopathie), (Reiter *et al.*, 2020). Darüber hinaus ist auch ein prognostischer Wert der  $T_1$ -Zeit bekannt. So korreliert beispielsweise die  $T_1$ -Zeit des infarzierten Gewebes nach Myokardinfarkt mit der langfristigen Einschränkung der Herzfunktion (Haberhorn *et al.*, 2017). Veränderungen der  $T_1$ -Zeit hängen somit auch mit klinisch relevanten Endpunkten zusammen. Dem von uns gewählten Ansatz liegt eine von Coolen *et al.* 2011 veröffentlichte Methode zu Grunde: Die Basis dafür bildet eine gespoilte Gradientenecho-Bildgebungssequenz („FLASH“ *Fast low angle shot sequence*). Durch kurze Repetitionszeiten wird eine vollständige longitudinale Relaxation zwischen den Radiofrequenzimpulsen verhindert. Die Signalintensität verringert sich so lange, bis ein *Steady-state* erreicht ist. Die Signalintensität ist im *Steady-state* bei gegebener TR abhängig von  $T_1$  und dem *Flip angle*, dieser Zusammenhang wird durch die

Ernst-Gleichung beschrieben (Coolen *et al.*, 2011), (Abbildung 6). Ein Satz von MR-Bildern, die mit unterschiedlichen *Flip angles* erzeugt wurden, wird nun Voxel für Voxel mithilfe der Ernst-Gleichung auf seine T1-Zeiten hin untersucht. Das Verfahren ist als sog. *Driven equilibrium single-pulse observation of T1* (DESPOT1) Analyse bekannt (Coolen *et al.*, 2011). Um die durch Atmung und Herzaktion verursachten Bewegungsartefakte zu minimieren, bedient man sich zusätzlich einer Navigatorschicht im Bereich des Herzens und der großen Arterien. Das generierte Navigatorecho variiert periodisch mit der Herzaktion und der Atmung, einzelne Messungen können so im Nachhinein einer bestimmten Phase im Herzzyklus zugeordnet oder verworfen werden (Coolen *et al.*, 2011).

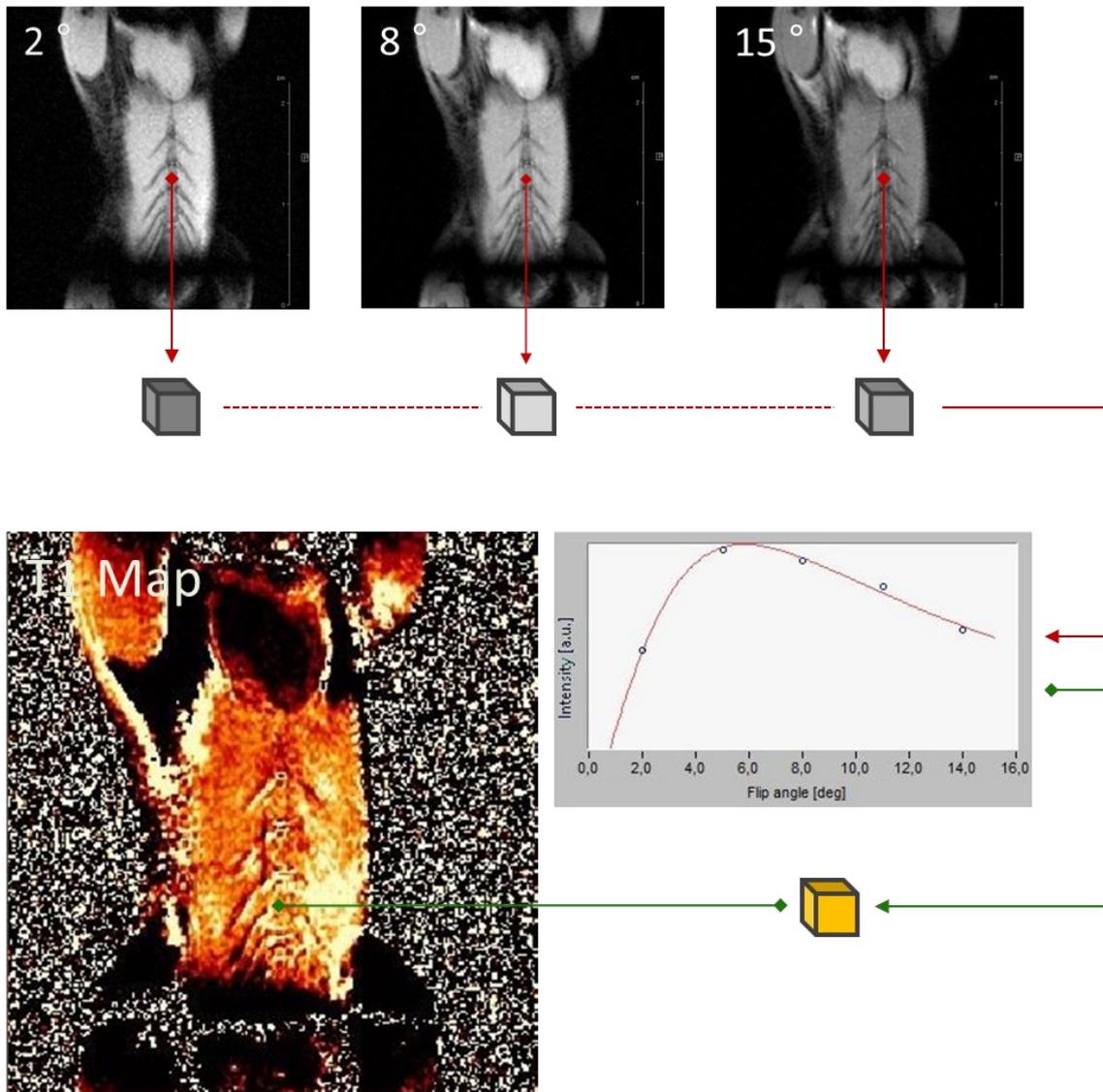


**Abbildung 6: Zusammenhang von T1, TR und dem *Flip angle***

Abgebildet ist die Längsmagnetisierung  $M_z$  gegen die Zeit. **Oben links:** Nach einem Radiofrequenzimpuls (RF) werden die Spins ausgelenkt und präzessieren senkrecht zur z-Richtung, die Komponente  $M_z$  ist daher gering.  $M_z$  nimmt mit der Zeit durch longitudinale Relaxation, d.h. die erneute Ausrichtung der Spins entlang des Hauptmagnetfeldes wieder zu. In Geweben mit kurzer T1-Zeit (T1 kurz) geschieht diese Ausrichtung schneller als in Geweben mit langer T1-Zeit (T1 lang).  $M_z$  erreicht dadurch früher seinen Ausgangswert  $M_0$ . **Oben rechts:** Bei repetitiven Radiofrequenzimpulsen mit kurzer Repetitionszeit (TR) wird der Vorgang der longitudinalen Relaxation unterbrochen. Je nach vorausgegangener Relaxation steht  $M_z$  nur noch anteilig zur erneuten Anregung bereit und verringert sich mit jedem weiteren RF-Impuls. Nach mehreren RF-Impulsen stellt sich ein *Steady state* ein.  $M_z$  und damit die Intensität des MR-Signals ist dann abhängig von T1. Dargestellt sind  $M_z$  im *Steady state* je eines Gewebes mit kurzer und langer T1-Zeit ( $M_{SS} T1_{kurz}$  /  $M_{SS} T1_{lang}$ ). **Unten:** Der *Flip angle* eines RF-Impulses bestimmt den Grad der Auslenkung der Spins und beeinflusst damit sowohl die Signalintensität als auch die Dauer der vollständigen longitudinalen Relaxation, d.h. bis zur Ausrichtung aller Spins entlang des Hauptmagnetfeldes und dem Erreichen des Ausgangswerts  $M_0$ . Bei kleinem *Flip angle*  $\alpha$  entsteht ein Signal von schwacher Intensität, welches rasch relaxiert. Bei größerem *Flip angle*  $\beta$  entsteht ein

kräftiges Signal, die vollständige Relaxation bis zum Erreichen von  $M_0$  benötigt entsprechend mehr Zeit.

Konkret nutzten wir für das *T1-Mapping* eine gespoilte Gradientenechosequenz mit retrospektivem *Gating*: IntradateFLASH (Bruker, Rheinstetten, Deutschland). Anhand von Navigatorechos wurden Messungen dem Herzzyklus in sechs Phasen zugeordnet, Messungen während der Atembewegung wurden verworfen (Cardiac frame: 6, respiratory frame: 1). Für die verschiedenen T1-Wichtungen wurde die Sequenz mit unterschiedlichen *Flip angles* wiederholt (2°, 5°, 8°, 11°, 14°). Die Generierung der Maps erfolgte nach der DESPOT1-Methode mittels einer institutseigenen Software basierend auf LabVIEW (National Instruments, Austin, USA). Die *Region of Interest* (ROI) / das Knochenmark wurde anhand anatomischer  $^1\text{H}$ -Scans für jedes Versuchstier exakt festgelegt. Aus den T1-Relaxationszeiten jedes Pixels der ROIs wurde der Mittelwert sowie die Standardabweichung ermittelt.



**Abbildung 7: T1-Mapping**

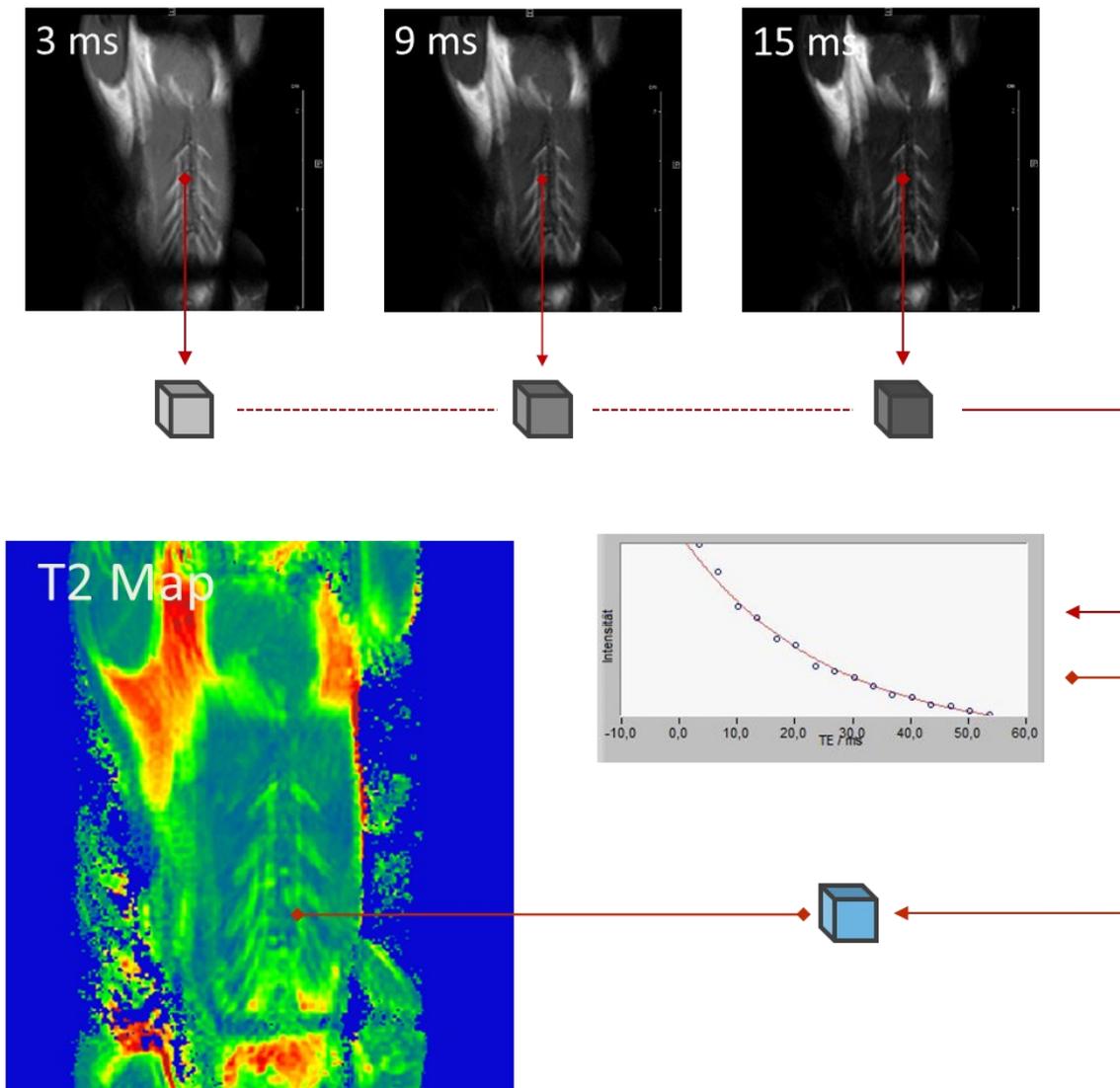
MR-Bilder der *T1-Mapping* Sequenz „IntragateFLASH“ mit unterschiedlichen *Flip angles* von 2°, 8°, 15°. Aus der Signalintensität jedes Pixels wird mittels DESPOT-1 Analyse die T1-Zeit geschätzt und in einer farbkodierten *T1-Map* dargestellt.

### 2.6.2 T2-Mapping

Analog zum *T1-Mapping* wird beim *T2-Mapping* eine *Map* generiert, bei der jeder Datenpunkt der transversalen Relaxationszeit T2 eines Voxels entspricht. T2 ist eine Konstante und beschreibt die Zeit in ms, in der die Intensität des MR-Signals durch exponentiellen Verfall auf 37 % seines Ausgangswerts abfällt. Sie wird dabei nicht direkt gemessen, sondern aus einem Satz MR-Bildern berechnet (Lota *et al.*, 2017). Ein wichtiger, die T2-Zeit beeinflussender Parameter ist der Wassergehalt eines Gewebes. Kommt es zum Beispiel im Rahmen einer inflammatorischen Reaktion und permeablen Gefäßen zu interstitiellen Flüssigkeitsansammlungen, führen diese in der Regel zu einer erhöhten T2-

Zeit (Lota *et al.*, 2017). Das *T2-Mapping* findet bisher Anwendung in der Kardiologie und kann hierbei mit großer Genauigkeit ein ödematös verändertes Myokard bei unterschiedlichen Erkrankungen detektieren (z.B. Myokarditis, Sarkoidose, Myokardinfarkt, Takotsubo Kardiomyopathie, Transplantatabstoßung), (Lota *et al.*, 2017). Im Fall der Myokarditis gilt es sogar als das überlegene Verfahren zur Bestimmung der Entzündungsaktivität (Mavrogeni *et al.*, 2017). Gleichzeitig existieren Faktoren, die zu einer Verkürzung der T2-Zeit führen. Hierzu gehört etwa der Eisengehalt des Gewebes. Eisen führt mit seinen ferromagnetischen Eigenschaften zu lokalen Veränderungen des Magnetfelds und beschleunigt so die transversale Relaxation. T2 und T2\* gewichtete Sequenzen werden daher regelmäßig zur Beurteilung einer Herzbeteiligung bei Erkrankungen des Eisenstoffwechsels und stark transfusionsbedürftigen Patienten eingesetzt (Lota *et al.*, 2017). Technisch liegt dem *T2-Mapping* eine Spin-Echo-Sequenz zu Grunde. Nach initialer Exzitation sorgen weitere RF-Impulse für die Generierung von Spin-Echos durch Refokussierung der durch T2\*-Effekte außer Phase geratenen Spins. Die Signalintensität der Echos ist nun abhängig von T2. Durch Spin-Echos zu unterschiedlichen Echozeiten kann anhand der Abnahme der Signalintensität die Relaxationszeit T2 einzelner Voxel berechnet werden.

Konkret nutzten wir für das *T2-Mapping* eine Multi-Spin-Echo-Sequenz: mic\_msme (Bruker, Rheinstetten, Deutschland). Durch wiederholte 180°-Refokussierungsimpulse entstehen insgesamt 16 Spin-Echos zu sukzessive ansteigenden Echozeiten (alle 3,36 ms bis 53,7 ms). Anhand der exponentiell abnehmenden Signalstärke wird T2 als die Zeitkonstante der transversalen Relaxation auf der Basis einzelner Voxel errechnet. Das *Mapping* erfolgt auch hier mittels institutseigener Software basierend auf LabVIEW (National Instruments, Austin, USA). Die Auswertung erfolgt, analog zum *T1-Mapping*, durch Ermittlung von Mittelwert und Standardabweichung für T2 aus den Werten aller Pixel der ROIs.



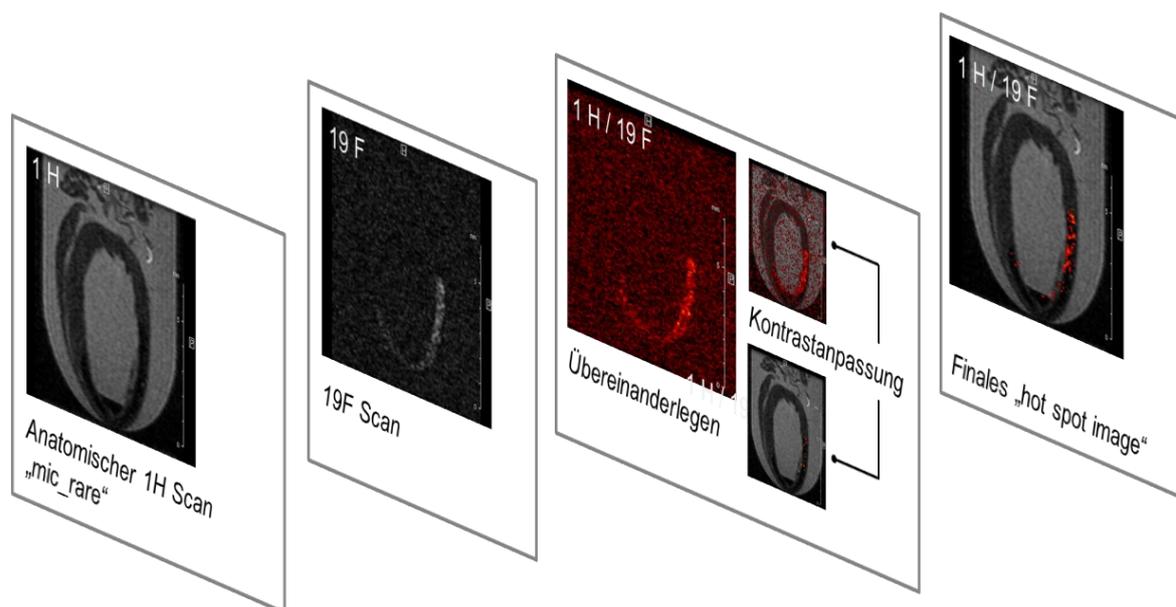
**Abbildung 8: T2-Mapping**

MR-Bilder der *T2-Mapping* Sequenz „mic\_msme“ nach unterschiedlichen Echozeiten von 3, 9, 15 ms. Aus jedem Pixel wird anhand der exponentiell abnehmenden Signalintensität die T2-Zeit geschätzt und in einer farbkodierten *T2-Map* dargestellt.

### 2.6.3 $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MR-Bildgebung

Um die Migration der mittels PFC markierten Zellen im Sternum darstellen zu können, nutzten wir die  $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -Bildgebung, ein 2008 von Flögel *et al.* vorgestelltes Verfahren (Flögel *et al.*, 2008). Während sich die klinische MR-Routinediagnostik fast ausschließlich auf die Eigenschaften des  $^1\text{H}$  stützt, bedient sich die  $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -Bildgebung eines weiteren, MR-aktiven Atomkerns. Das Fluorisotop  $^{19}\text{F}$  hat eine eigene Resonanzfrequenz und kann daher unabhängig von  $^1\text{H}$  angeregt werden. Es ermöglicht somit eine zusätzliche und von  $^1\text{H}$  unabhängige MR-Bildgebung.  $^{19}\text{F}$  kommt physiologisch in vernachlässigbar geringer Konzentration vor und kann daher, wenn es extrinsisch appliziert wird, mit hoher Spezifität

und ohne Hintergrundsignal im Körper durch MRT nachgewiesen werden (Flögel *et al.*, 2008). Die  $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -Bildgebung macht sich die Vorteile der jeweiligen Atomkerne zu Nutze. Während das  $^{19}\text{F}$  als biologischer Marker appliziert und spezifisch nachgewiesen wird, liefert die dazugehörige  $^1\text{H}$ -Bildgebung hochauflösende Bilder. Durch das Übereinanderlegen der MR-Bilder einer  $^1\text{H}$ - und einer  $^{19}\text{F}$ -Messsequenz lässt sich der Marker exakt lokalisieren und anatomisch zuordnen. Da die Bildgebung aufgrund der unterschiedlichen Resonanzfrequenzen nicht gleichzeitig erfolgen kann, werden dafür zwei sequenzielle und unmittelbar hintereinander durchgeführte Messungen benötigt. Für die *in vivo* Messungen verwendeten wir eine Gradientenechosequenz für  $^1\text{H}$  (IntragateFLASH, s. Tabelle 7) und eine Spin-Echo Sequenz für  $^{19}\text{F}$  (mic\_rare, s. Tabelle 7). Die *ex vivo* Messungen erfolgten anhand zweier Spin-Echo Sequenzen für jeweils  $^1\text{H}$  und  $^{19}\text{F}$  (mic\_rare, s. Tabelle 7). Die Bildebene bleibt währenddessen unverändert, zwischen den Sequenzen wird lediglich das Messsystem auf die jeweils neue Resonanzfrequenz eingestellt. Für die Messungen *ex vivo* ermöglichte der Resonator mit einem geringeren Durchmesser eine verbesserte räumliche Auflösung und die verlängerte Aquisitionszeit ein höheres *Signal-to-Noise-Ratio* (SNR). Die Herzen wurden für die *ex vivo* Messungen in Formaldehyd fixiert. Das Übereinanderlegen der Bilder erfolgte mittels des „Hot iron“-Tools der Herstellersoftware Paravision 5.1 (Bruker, Rheinstetten, Deutschland), (Abbildung 9). Die Auswertung erfolgte qualitativ.



**Abbildung 9: Prozess der  $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MR-Bildgebung**

Von links nach rechts: Zunächst werden sequenziell ein  $^1\text{H}$ - und ein  $^{19}\text{F}$ -Bild gleicher Bildebene generiert. Diese werden im Anschluss digital übereinandergelegt. Durch entsprechende Kontrastanpassung entsteht das finale  $^1\text{H}/^{19}\text{F}$  „Hot spot“ MR-Bild.

#### 2.6.4 Chemical-shift Imaging

Um Veränderungen im Lipidgehalt des Knochenmarks feststellen zu können, nutzten wir ein Verfahren zur Separation der Fett- und Wasserkomponente des MR-Signals im sog. *Multi-chemical-shift-selective* (MCSS) *Imaging*. Als Basis diente eine Spin-Echo-Bildgebungssequenz (mic\_cssim, s. Tabelle 7), die frequenzselektive RF-Impulse bei der Anregung sowie für die Echo-Generierung verwendet. Die *Spins* der Wasser- und Fettkomponente können so getrennt voneinander für die Bildgebung angeregt und ausgewertet werden (Flögel *et al.*, 2021). Die Auswertung erfolgt mittels der Hersteller-Software Paravision 5.1 (Bruker, Rheinstetten, Deutschland) durch Ermittlung von Mittelwert und Standardabweichung der Signalintensität des Fettsignals aus den Werten aller Pixel der ROIs.

#### 2.7 Statistik

Falls nicht anders angegeben, werden die Werte als Mittelwert plus Standardabweichung angegeben. Zur Identifikation von Ausreißern erfolgte der Ausreißertest nach Grubbs, die Untersuchung auf signifikante Unterschiede erfolgte durch t-Testung (Zweistichproben-t-Test, gepaart oder ungepaart, Signifikanzniveau  $p \leq 0,05$ ). Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Boston, USA) und Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, USA).

#### 2.8 Abbildungen

Abbildungen wurden mit Hilfe von Microsoft Powerpoint (Microsoft Corporation, Redmond, USA) erstellt und enthalten Illustrationen von Servier Medical Art (Les Laboratoires Servier, Suresnes, Frankreich).

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 MR-Analysen des Knochenmarks

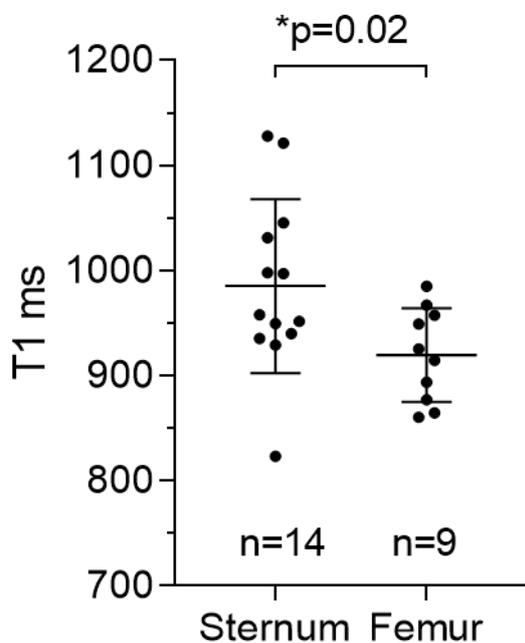
##### 3.1.1 Verortung

Dieser Versuchsteil zielte darauf ab, mit Hilfe MR-bildgebender Verfahren charakteristische Veränderungen im Knochenmark nach kardialer Ischämie-Reperfusion festzustellen. Es wird angenommen, dass diese Hinweise auf Unterschiede in der immunologischen Reaktion des Knochenmarks infolge des Myokardinfarkts liefern. Der Fokus lag dabei im Besonderen auf dem Sternum. Hierzu bestimmten wir verschiedene, MR-spezifische Parameter des Gewebes und verglichen die Daten des Sternums mit denen anderer Kompartimente.

##### 3.1.2 T1-Mapping

Im Rahmen der MR-Analysen wurden *T1-Maps* des Sternums und des Femurs erstellt, um das jeweilige Knochenmark auf Veränderungen der T1-Zeit hin zu untersuchen.

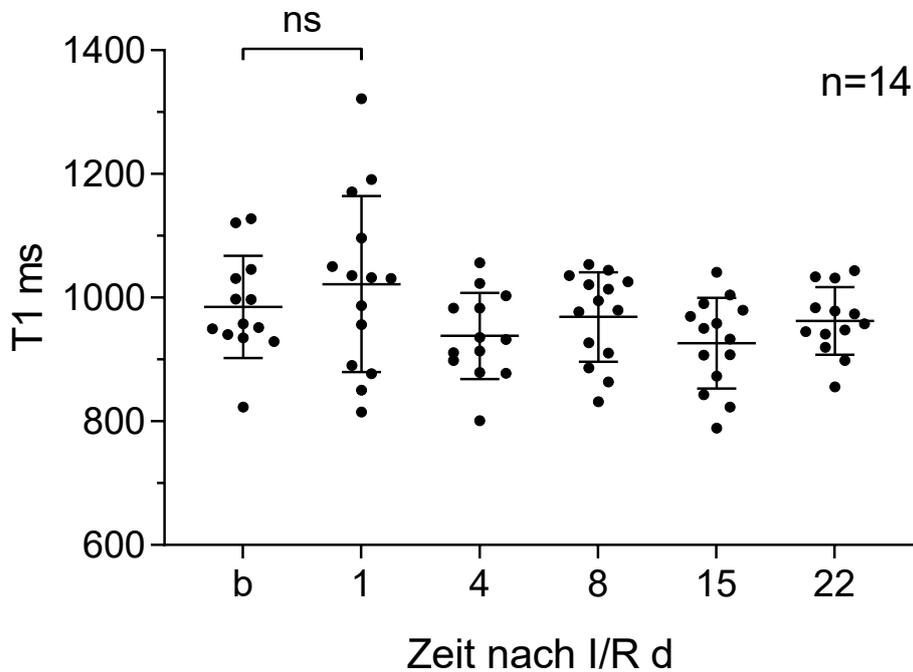
Das Knochenmark des Sternums weist basal eine höhere T1-Zeit auf als das Knochenmark des Femurs (Sternum  $985 \pm 79$  ms, Femur  $919 \pm 42$  ms,  $\Delta$  66 ms ( $p=0,02$ ), Abbildung 10).



**Abbildung 10: T1 Sternum und Femur**

Basalwerte für T1 in ms im Knochenmark von Sternum und Femur im Vergleich. Mittelwerte und Standardabweichung.

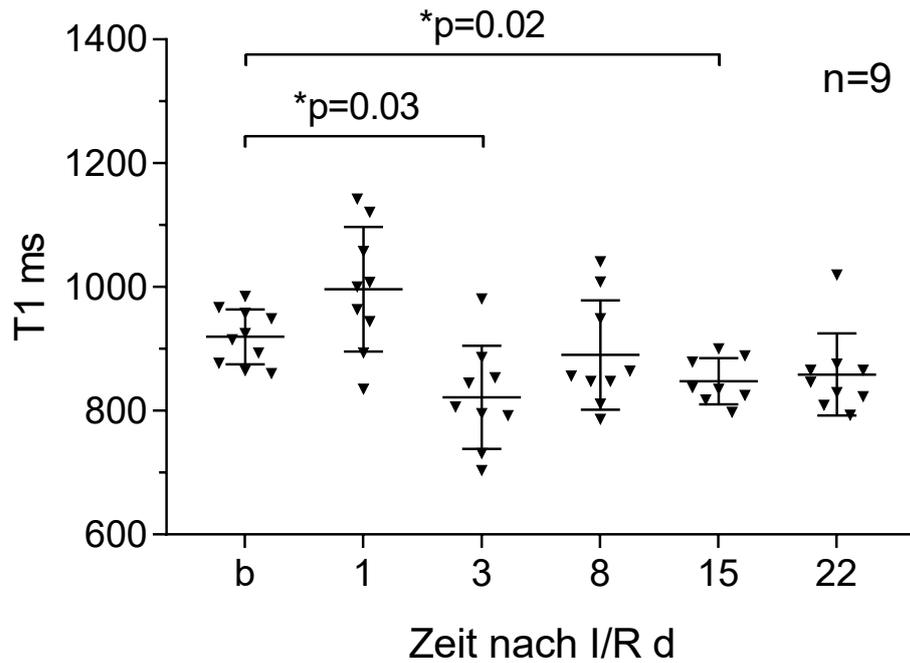
Im Anschluss an die Ischämie-Reperfusion kommt es zu keiner signifikanten Veränderung der T1-Zeit im Sternum. Auffallend ist lediglich eine Zunahme der Streuung der Messwerte am ersten Postinfarkttag (Abbildung 11).



**Abbildung 11: T1 Sternum**

T1 in ms, basal und an verschiedenen Tagen (d) nach Ischämie-Reperfusion (I/R). Mittelwerte und Standardabweichung.

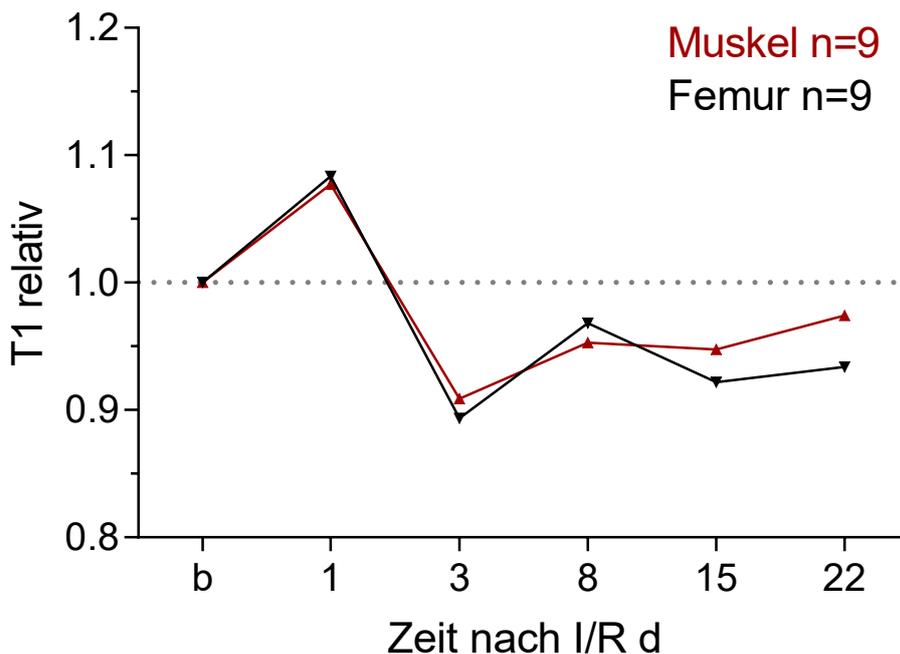
Im Femur hingegen lässt sich eine zweiphasige Reaktion auf die Ischämie-Reperfusion beobachten. Zunächst kommt es zu einer transienten Zunahme der T1-Zeit um 79 ms am ersten Tag (8,6 %,  $p=0,1$ ). Diese ist gefolgt von einer Abnahme von T1 über mehr als 14 Tage nach Ischämie-Reperfusion. Am stärksten ist die Abnahme dabei nach drei Tagen, hier liegt T1 mit 822 ms 12 % unter dem Basalwert ( $p=0,03$ ). Die T1-Erhöhung am ersten Postinfarkttag ist nicht signifikant. Im Verlauf gleichen sich die Werte für T1 wieder den Ausgangswerten an (Abbildung 12).



**Abbildung 12: T1 Femur**

T1 in ms, basal und an verschiedenen Tagen (d) nach Ischämie-Reperfusion (I/R). Mittelwerte und Standardabweichung.

Zusätzlich zu den Messungen im Knochenmark wurden Referenzwerte für die Relaxationszeiten in der Muskulatur erhoben. Diese dienen der Differenzierung zwischen knochenmarksspezifischen und nicht-knochenmarksspezifischen Veränderungen nach Infarkt. Nicht-knochenmarksspezifische Veränderungen sind allgemeiner Natur und treten gleichsam in unterschiedlichen Geweben auf. Sie sind somit von den Alterationen im Knochenmark abzugrenzen, die spezifisch auf physiologische Prozesse im Knochenmark zurückzuführen sind und denen primär unser Interesse gilt. Vergleicht man die Veränderungen von T1 im Knochenmark des Femurs mit denen in der Muskulatur, so sind deutliche Parallelen in deren Verläufen zu erkennen (Abbildung 13).



**Abbildung 13: T1 Femur und Muskel**

T1 als Verhältnis zum Basalwert im Femur und der Muskulatur basal (b) und an verschiedenen Tagen (d) nach Ischämie-Reperfusion (I/R). Mittelwerte.

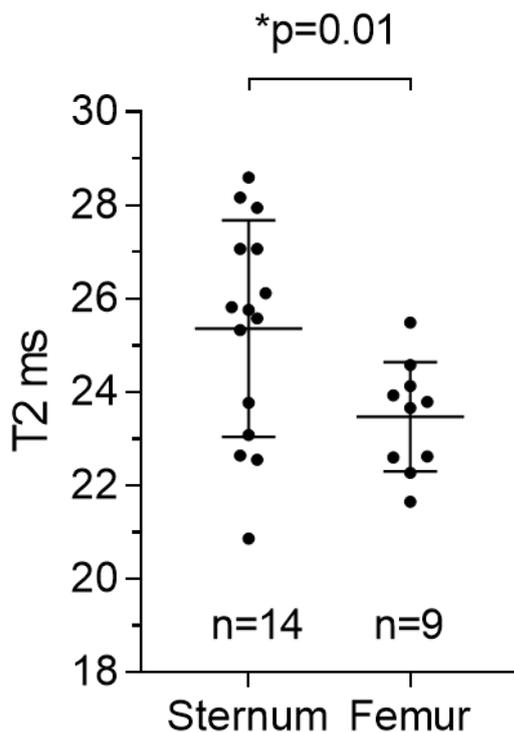
Zusammenfassend lässt sich aus den Ergebnissen des *T1-Mappings* folgendes festhalten:

1. Nach Infarkt ist eine signifikante Abnahme von T1 im Femur zu beobachten. Im Sternum kommt es hingegen zu keiner messbaren Veränderung.
2. Die gemessenen Veränderungen im Knochenmark des Femurs sind identisch zu denen im Bereich der Muskulatur. Wir müssen daraus folgern, dass es sich um globale Veränderungen nach Infarkt handelt, die in unterschiedlichen Geweben in gleichem Maße auftreten und die nicht knochenmarksspezifisch sind.
3. Bei genauer Betrachtung fällt auf, dass der Verlauf der Werte im Sternum nach Infarkt denen des Femurs und der Muskulatur entspricht. Die Veränderungen treten lediglich in weniger ausgeprägter Form auf. Dabei ist zu bedenken, dass die Messungen unabhängig voneinander erfolgen. Es handelt sich demnach wahrscheinlich nicht um eine zufällige Schwankung der Werte, wie man zunächst annehmen könnte, sondern spiegelt womöglich die gleichen Veränderungen wider, die auch im Femur und der Muskulatur auftreten. Es ist daher zu diskutieren, ob das *T1-Mapping* empfindlich genug ist, um Schwankungen der T1-Zeit im Sternum adäquat zu detektieren (s. Kapitel 4.2.2).

### 3.1.3 T2-Mapping

Im Rahmen der MR-Analysen wurden *T2-Maps* des Sternums und des Femurs erstellt, um das jeweilige Knochenmark auf Veränderungen der T2-Zeit hin zu untersuchen.

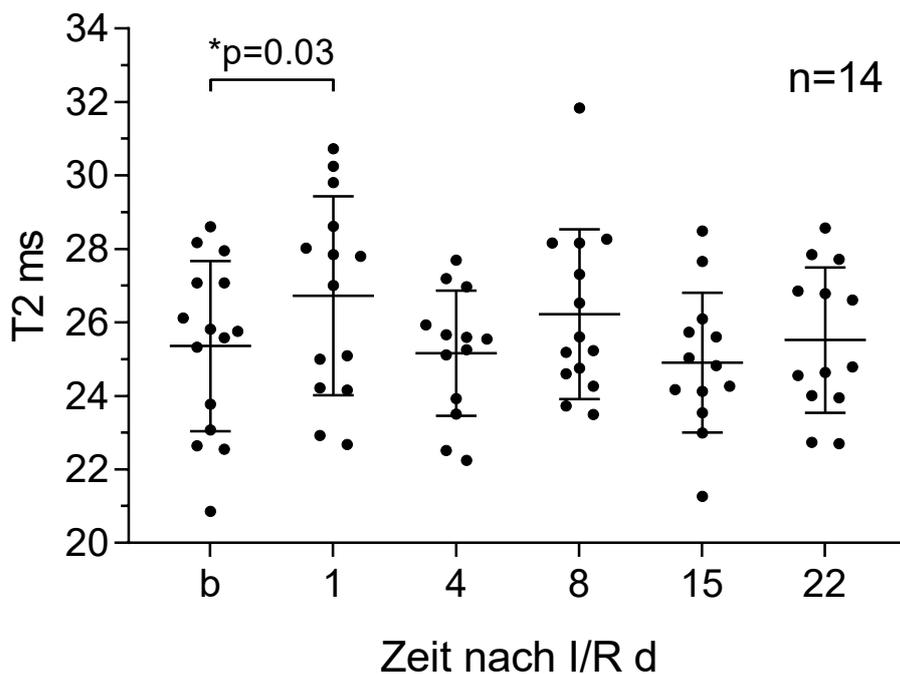
Vergleicht man die Basalwerte, so weist das Knochenmark des Sternums eine höhere T2-Zeit auf als das Knochenmark des Femurs (Sternum  $25,4 \pm 2,2$  ms, Femur  $23,5 \pm 1,1$  ms,  $\Delta 1,9$  ms ( $p=0.01$ ), Abbildung 14).



**Abbildung 14: T2 Sternum und Femur**

Basalwerte für T2 in ms im Knochenmark von Sternum und Femur im Vergleich. Mittelwerte und Standardabweichung.

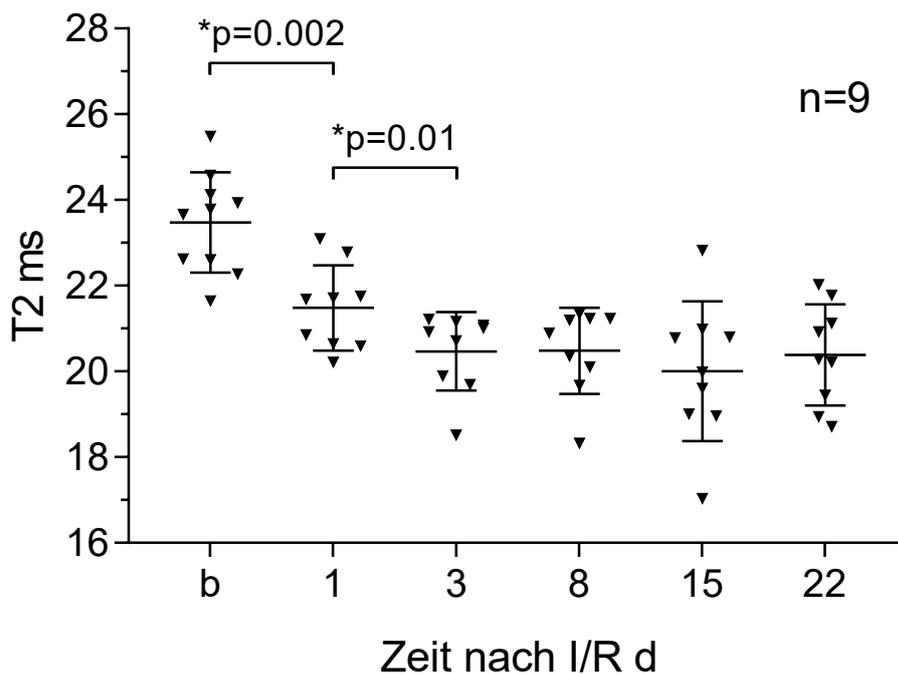
Die Ischämie-Reperfusion führt im Sternum zu einem vorübergehenden Anstieg der T2-Zeit um 5,4 % am ersten Tag, dieser ist statistisch signifikant ( $p=0.03$ ). Anschließend nähert sich die T2-Zeit wieder den Basalwerten an. Im restlichen Beobachtungszeitraum liegen keine weiteren Veränderungen vor (Abbildung 15).



**Abbildung 15: T2 Sternum**

T2 in ms, basal und an verschiedenen Tagen (d) nach Ischämie-Reperfusion (I/R). Mittelwerte und Standardabweichung.

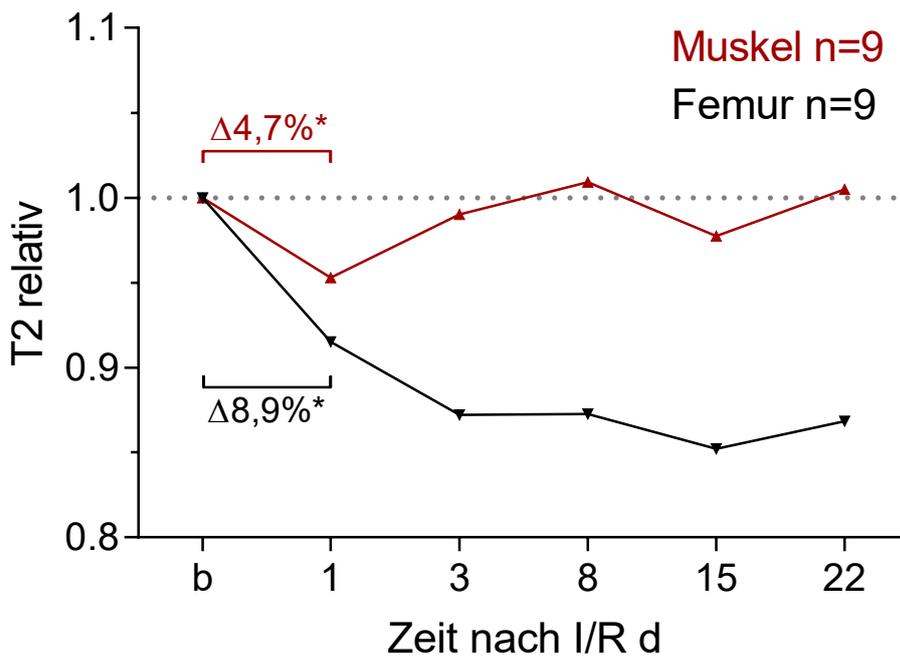
Im Femur kommt es nach Ischämie-Reperfusion zu einer sukzessiven Reduktion der T2-Zeit über 3 Tage: Zunächst von 23,5 auf 21,5 ms (Tag 1, 8,5%,  $p=0.002$ ), anschließend weiter auf 20,5 ms (Tag 3, 4,2%,  $p=0.01$ ). Ab dem dritten Tag treten keine weiteren Veränderungen auf, die T2-Zeit bleibt auch zum Ende des Beobachtungszeitraums hin erniedrigt (Abbildung 16).



**Abbildung 16: T2 Femur**

T2 in ms, basal und an verschiedenen Tagen (d) nach Ischämie-Reperfusion (I/R). Mittelwerte und Standardabweichung.

Zusätzlich zu den Messungen im Knochenmark wurden auch für die T2-Zeit Referenzwerte im Bereich der Muskulatur bestimmt. Parallel zu den Veränderungen im Knochenmark, kommt es auch in der Muskulatur zu einer leichten Reduktion der T2-Zeit am ersten Tag nach Infarkt. Diese ist im Vergleich zum Knochenmark des Femurs nur etwa halb so stark ausgeprägt. Die im Femur weiter zu beobachtende, langfristige Reduktion von T2 bleibt in der Muskulatur aus. Hier gleichen sich die Werte ab dem dritten Tag nach Infarkt wieder den Ausgangswerten an (Abbildung 17).



**Abbildung 17: T2 Femur und Muskel**

T2 als Verhältnis zum Basalwert im Femur und der Muskulatur basal (b) und an verschiedenen Tagen (d) nach Ischämie-Reperfusion (I/R). Mittelwerte.

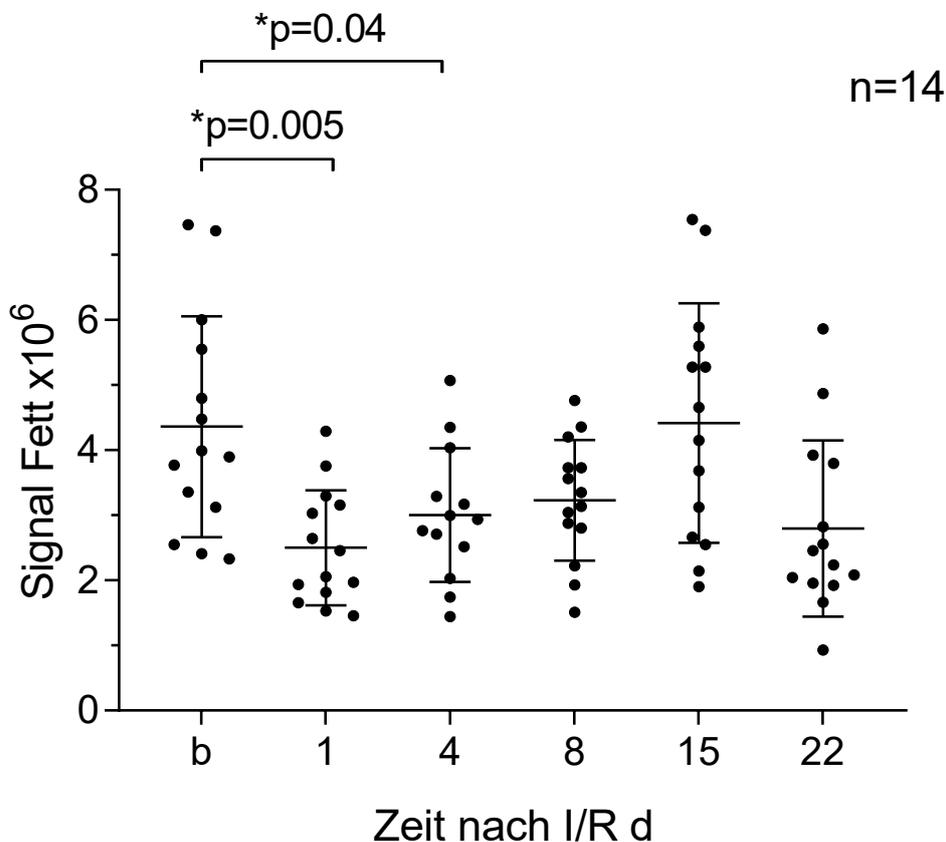
Zusammenfassend lässt sich aus den Ergebnissen des *T2-Mappings* folgendes festhalten:

1. Nach Infarkt kommt es im Knochenmark des Sternums zu einer frühen und kurzweiligen Erhöhung der T2-Zeit. Dahingegen fällt die T2-Zeit im Femur sukzessive ab und bleibt anhaltend erniedrigt.
2. Die gemessenen T2-Veränderungen im Knochenmark sind, wie der Vergleich zu den Referenzwerten zeigt, spezifisch für die jeweiligen Kompartimente und können damit auf Prozesse zurückgeführt werden, die infolge des Infarkts im Knochenmark stattfinden. Die gegenläufigen Veränderungen der T2-Zeiten legen dabei nahe, dass das Knochenmark von Sternum und Femur unterschiedlich auf den Myokardinfarkt reagiert. Dies wird hier als deutlichen Hinweis im Sinne der Hypothese interpretiert, die besagt, dass das Sternum eine immunologische Sonderrolle nach Myokardinfarkt einnimmt. Mögliche Ursachen der Veränderungen und weiterführende Aspekte werden im Diskussionsteil näher beleuchtet (Kapitel 4.2.1).

### 3.1.4 Chemical-shift Imaging

Im Rahmen der MR-Analysen wurde im Sternum zusätzlich das *Multi-chemical-shift-selective Imaging* angewandt, um das Knochenmark auf Veränderungen seines Lipidgehalts hin zu untersuchen.

Unmittelbar nach Ischämie-Reperfusion kommt es im Sternum zu einer signifikanten Reduktion des Fettsignals. Am ersten Tag nimmt die Intensität im Vergleich zum Ausgangswert um 43 % ab ( $p=0.005$ ). Über einen Zeitraum von zwei Wochen regeneriert sich das Signal stetig und erreicht nach 15 Tagen wieder den Ausgangswert. Paradoxe Weise kommt es zum Ende des Beobachtungszeitraums erneut zu einer Abnahme des Signals (Abbildung 18).



**Abbildung 18: Fettsignal Sternum**

Signalintensität für Fett basal und an verschiedenen Tagen (d) nach Ischämie-Reperfusion (I/R). Mittelwerte und Standardabweichung.

Der Signalabfall weist auf einen verminderten Lipidgehalt im Gewebe hin. Dies könnte mit einem veränderten Stoffwechsel und Umbauprozessen im Knochenmark als Reaktion auf den Myokardinfarkt in Verbindung stehen. Es sei auf die hohe Streuung der Messwerte

hingewiesen. Für das *MCSS Imaging* konnten leider keine validen Vergleichswerte im Bereich des Femurs erhoben werden.

### 3.1.5 Zusammenfassung

Mit Hilfe der angewandten MR-Verfahren ist es gelungen, das Knochenmark im Hinblick auf seine T1- und T2-Relaxationszeiten zu charakterisieren. Für die T2-Zeit fanden sich als Reaktion auf den Infarkt knochenmarkspezifische Veränderungen in Sternum und Femur. Darüber hinaus konnte eine Abnahme des Fettgehalts im Sternum festgestellt werden.

## 3.2 Intrasternale Injektionen und <sup>19</sup>F-MRT

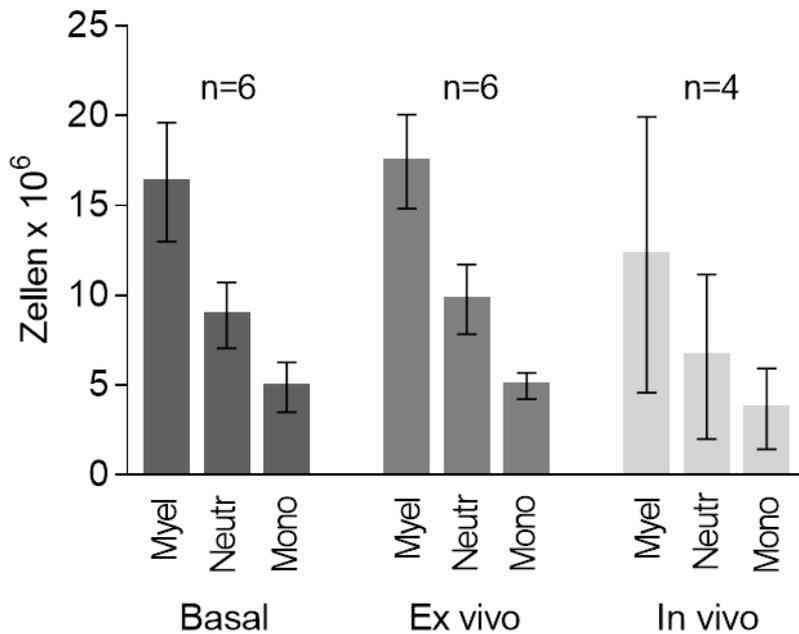
### 3.2.1 Verortung

Die intrasternalen Injektionen und die <sup>19</sup>F-MRT zielten darauf ab, die Migration von neutrophilen Granulozyten aus dem Sternum in das Infarktareal des Herzens nachzuverfolgen, um Hinweise für eine direkte Passage von Neutrophilen über den Knochen zu liefern. Hierzu wurde ein Mikroinjektionsverfahren entwickelt, bei dem ein neutrophilenspezifischer Marker in das Knochenmark des murinen Sternums appliziert wird. Die Validierung des Verfahrens erfolgte zunächst mit Hilfe von FACS-Analysen. Anschließend wurden <sup>19</sup>F-MR-Bilder generiert, um die Migration der aus dem Sternum stammenden Neutrophilen im Herzen bildgebend darzustellen.

### 3.2.2 Einfluss der Injektionen auf die Zellen im Sternum

Um das Injektionsverfahren zu validieren, wurden FACS-Analysen der Zellen im Sternum durchgeführt. Dabei wurde der Einfluss der Injektionen auf die Gesamtzahl der wichtigsten Vertreter der myeloischen Reihe des Knochenmarks untersucht.

Mit Hilfe der von uns angewandten Methodik zur Extraktion des Knochenmarks lassen sich im Sternum 1,6 Mio. myeloische Zellen nachweisen, davon circa 900.000 Neutrophile und 500.000 Monozyten. Nach Injektion *ex vivo* kommt es zu keiner signifikanten Veränderung der Zellen im Sternum. Die Gesamtzahl und das Verhältnis von Neutrophilen zu Monozyten bleiben annähernd gleich. Nach Injektion *in vivo* hingegen kommt es zu einer Abnahme der Zellzahlen im Sternum. Die Gesamtzellzahl verringert sich um circa 25 %. Das Verhältnis der einzelnen Populationen zueinander bleibt dabei gleich. Auffallend ist zudem eine Zunahme der Streuung der Messergebnisse nach *in vivo* Injektion (Abbildung 19).



**Abbildung 19: Zellverteilung Sternum**

Zellzahlen von Myeloischen (Myel), Neutrophilen (Neutr) und Monozyten (Mono) im murinen Sternum basal und nach *ex vivo* / *in vivo* Injektion von <sup>19</sup>F-Nanoemulsion. Mittelwerte und Standardabweichung.

Als Zwischenfazit lässt sich folgendes formulieren:

1. Die gewählte Methode der Zellextraktion führt zu reproduzierbaren Ergebnissen. Es ist darüber hinaus anzunehmen, dass durch eine unvollständige Extraktion und den Verlust von Zellen bei der Aufarbeitung die tatsächliche Anzahl der Zellen im Sternum noch höher ist.
2. Durch die Injektion *ex vivo* kommt es nicht zu einer Abnahme der Zellen im Sternum. Die Injektion an sich führt somit nicht zur Nekrose / Apoptose oder Volumenverdrängung und hat somit keinen direkten Einfluss auf die Zielzellen im Knochenmark.
3. Nach der Injektion *in vivo* verringert sich die Anzahl an Zielzellen im Sternum um etwa ein Viertel. Da dies unter *ex vivo* Bedingungen nicht der Fall ist, muss dies bedingt sein durch eine physiologische Reaktion auf die Injektion. Als Ursache kommen die sekundäre Nekrose / Apoptose sowie eine zirkulationsbedingte Verschleppung von Zielzellen in Betracht. Eine Reduktion der Zellzahl durch die Injektion war indes zu erwarten und das Ausmaß ist für den Erfolg unserer Folgeversuche als hinnehmbar anzusehen.

### 3.2.3 *Labeling* der Zellen im Knochenmark

Anschließend wurde untersucht, inwieweit die Zielzellen im Knochenmark des Sternums die Nanoemulsion in relevanten Mengen aufnehmen. Als Maß für eine relevante Aufnahme diente der Nachweis des der Nanoemulsion beigefügten Fluoreszenzfarbstoffs in der Durchflusszytometrie. Eine suffiziente Aufnahme der Nanoemulsion durch die Zielzellen ist als Voraussetzung für die spätere Darstellung in der  $^{19}\text{F}$ -MRT anzusehen. Nach *ex vivo* Injektion lassen sich 13 % der Neutrophilen und 0,4 % der Monozyten im Sternum durch Fluoreszenz identifizieren. Nach *in vivo* Injektion sinkt der Anteil an markierten Zellen, lediglich 0,3 % der Neutrophilen und 0,1 % der Monozyten werden im FACS durch Fluoreszenz identifiziert.

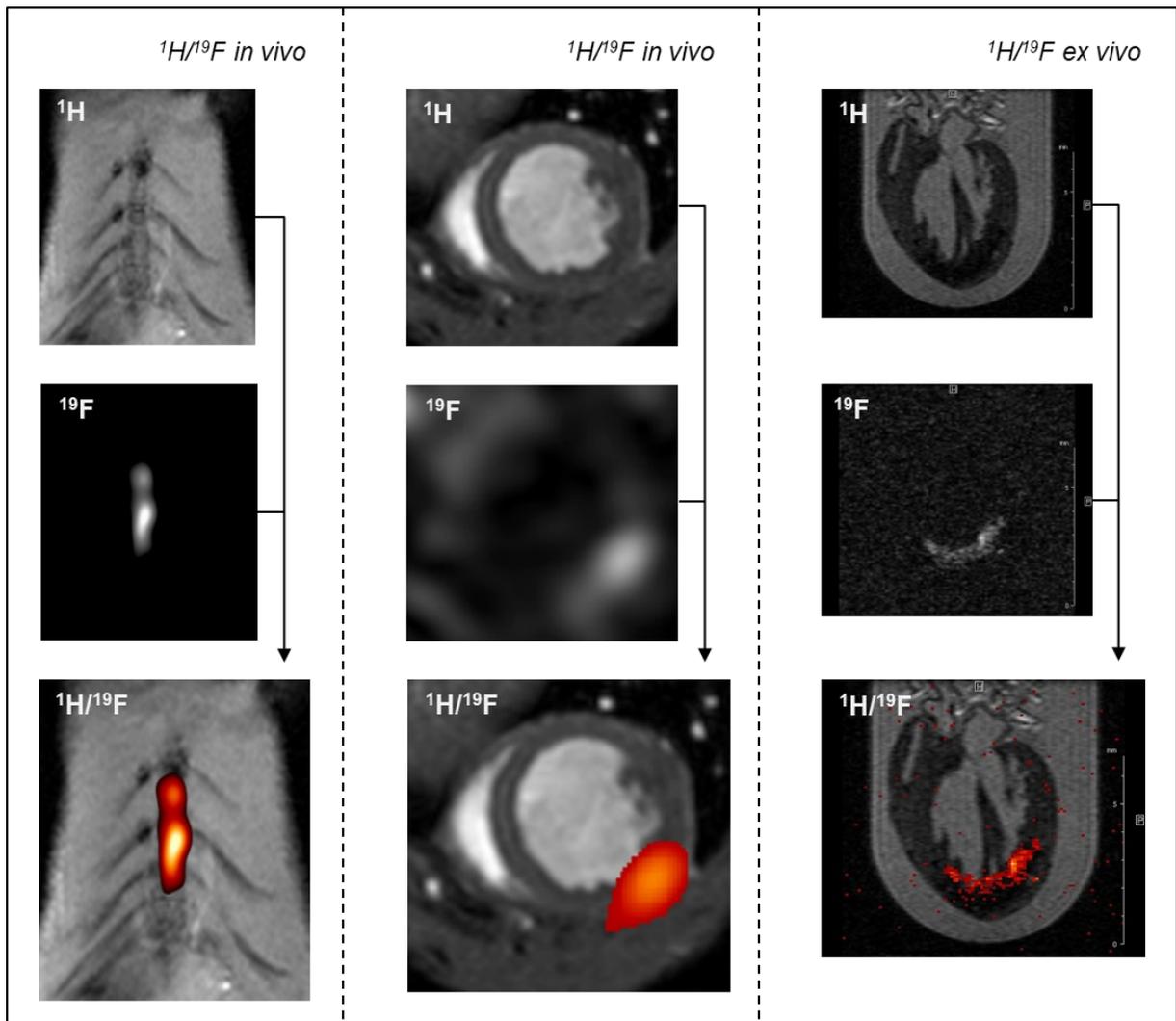
Hieraus müssen folgende Schlüsse gezogen werden:

1. Die Applikation unseres Markers in das Knochenmark des Sternums ist technisch möglich und führt unter *ex vivo* Bedingungen zu einer relevanten Aufnahme der Nanoemulsion in die Zielzellen. In 13 % aller Neutrophilen kann der Marker eindeutig durch Fluoreszenz nachgewiesen werden.
2. Das *Labeling* ist neutrophilenspezifisch. Wie durch die Modifikation der Oberflächenmoleküle der Nanoemulsion bezweckt, erfolgt auch hier eine fast ausschließliche Aufnahme der Nanoemulsion durch Neutrophile. Damit gelten die Ergebnisse der Folgeuntersuchungen spezifisch für die Population der neutrophilen Granulozyten. Störfaktoren durch die unspezifische Aufnahme und den Nachweis anderer Zellpopulationen werden so vermieden.
3. Unter *in vivo* Bedingungen scheint die Aufnahme des Markers deutlich verringert zu sein. Weniger als 1 % der Neutrophilen lassen sich durch Fluoreszenz eindeutig als „gelabelt“ abgrenzen. Dies ist als Kritikpunkt zu werten, gleichzeitig stehen die Daten im Widerspruch zu den in 3.2.4 erzielten Ergebnissen in der  $^{19}\text{F}$ -MRT und sind daher zu diskutieren. Mögliche Ursachen und weiterführende Aspekte werden im Diskussionsteil beleuchtet (Kapitel 4.2.4).

### 3.2.4 $^{19}\text{F}$ -MRT nach Myokardinfarkt

Um die Migration der neutrophilen Granulozyten aus dem Sternum in das Infarktareal bildgebend darzustellen, wurde das neu etablierte Mikroinjektionsverfahren in Kombination mit der  $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT angewandt.

Nach vorausgehender intrasternaler Markierung der Neutrophilen lässt sich vor Ort ein deutliches  $^{19}\text{F}$ -Signal im Knochenmark nachweisen. Nach anschließender Ischämie-Reperfusion kann man auch im Herzen bereits *in vivo* nach 24 h in zwei von drei Versuchstieren ein  $^{19}\text{F}$ -Signal erkennen. Dieses scheint über den gesamten linken Ventrikel verteilt, mit *punctum maximum* an der Vorderwand. In den zwei gleichen Versuchstieren lässt sich an den Herzen auch *ex vivo* ein deutliches  $^{19}\text{F}$ -Signal im Myokard detektieren. Dieses lokalisiert sich besonders um die Herzspitze und in den Innenbereichen des linken Ventrikels (Abbildung 20).



**Abbildung 20:  $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT des Herzens nach Infarkt**

$^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT des Sternums *in vivo* (links) nach intrasternaler Injektion.  $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT des Herzens *in vivo* (mittig) und *ex vivo* (rechts) nach intrasternaler Injektion und Ischämie-Reperfusion. Abgebildet sind oben das  $^1\text{H}$ -Bild, in der Mitte das dazugehörige  $^{19}\text{F}$ -Bild und unten das kombinierte  $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -Bild eines von insgesamt drei Versuchstieren ( $n=3$ ).

Zusammenfassend lässt sich nach vorausgehender intrasternaler Markierung ein deutliches  $^{19}\text{F}$ -Signal im Infarktareal des Herzens nachweisen. Dieses wird generiert von

neutrophilen Granulozyten, die nach myokardialer Ischämie aus dem Knochenmark des Sternums in das Infarktgewebe einwandern. Es handelt sich dabei um einen in erster Linie qualitativen Nachweis, der keine genauen Rückschlüsse über das Ausmaß der Migration zulässt. Die Verteilung des Signals zeigt dabei keine Auffälligkeiten und entspricht am ehesten einer homogenen Einwanderung der Zellen im Bereich des infarzierten Gewebes.

## 4 Diskussion

### 4.1 Schlussfolgerung I

Mit Hilfe der MR-Bildgebung ist es gelungen, das Knochenmark des Sternums zu charakterisieren und spezifische Veränderungen nach Myokardinfarkt festzustellen. Die Unterschiede im Verlauf der T2-Relaxationszeiten von Sternum und Femur deuten darauf hin, dass in den jeweiligen Knochenmark-Kompartimenten grundverschiedene physiologische Prozesse als Reaktion auf den Infarkt stattfinden. Dies stützt die Hypothese, die von einer immunologischen Sonderrolle des Sternums nach Myokardinfarkt ausgeht. Die weiteren Ergebnisse aus dem *Chemical-shift Imaging* und der  $^{19}\text{F}$ -MRT bekräftigen dies, indem sie Veränderungen im Lipidhaushalt des Sternums aufdecken und die Migration von Neutrophilen aus dem Sternum ins infarzierte Herz darstellen. Hingegen zeigen sich für die zusätzlich postulierte direkte Migration von Neutrophilen über die *Compacta* des Sternums keine Hinweise.

### 4.2 Diskussion der Teilergebnisse

#### 4.2.1 T2-Mapping

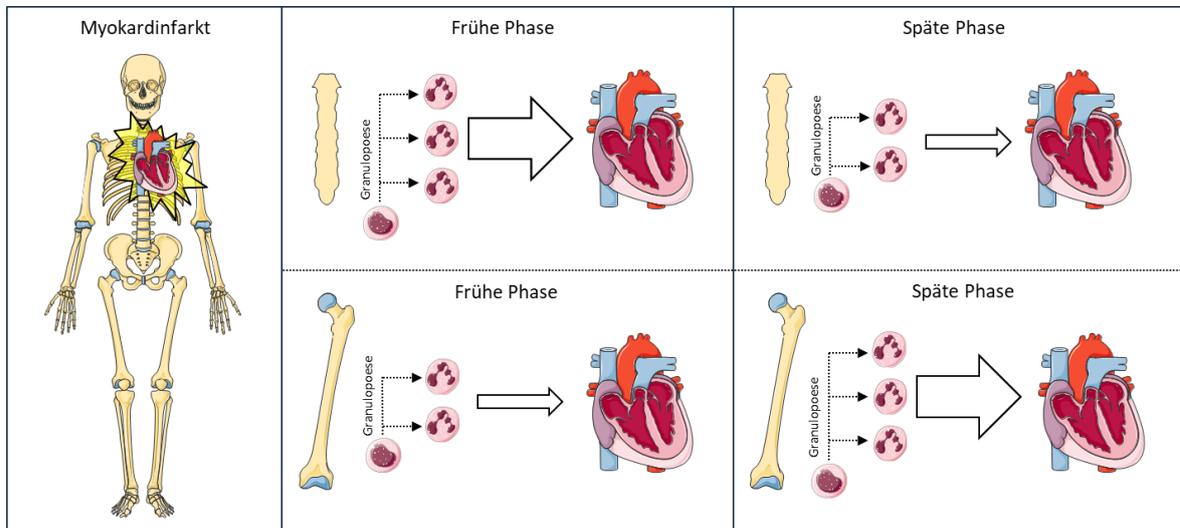
Für die T2-Relaxationszeit kommt es im Sternum zu einem kurzweiligen Anstieg, während sie im Femur sukzessive abfällt und anhaltend niedrig bleibt. Der Vergleich zur Referenz zeigt, dass es sich hierbei um regional spezifische Prozesse im Knochenmark handelt. An dieser Stelle sei festgehalten, dass ein *proof of concept* für die durchgeführten MR-Analysen vorliegt: In den gewählten Parametern stellen sich Veränderungen sowohl für das Sternum als auch für den Femur dar, die gezielt auf die jeweiligen Knochenmark-Kompartimente zurückzuführen sind. Deren Gegenläufigkeit sowie die Unterschiede im zeitlichen Verlauf, werden dabei im Sinne der Hypothese gewertet. Zunächst einmal widersprechen sie der Annahme, dass in allen Knochenmark-Kompartimenten eine gleichförmige und stereotype immunologische Reaktion auf den Myokardinfarkt stattfindet. Es liegt viel mehr auf der Hand, dass es zu einer komplexen und ortsabhängigen Antwort des blutbildenden Knochenmarks in Folge des Infarkts kommt. Dies lässt darauf schließen, dass das Sternum aufgrund seiner räumlichen Nähe zum Infarkt verstärkt aktiviert wird und vermehrt Immunzellen aus dem Knochenmark abwandern. Bevor im Folgenden genauer auf die Hintergründe der Ergebnisse eingegangen wird, sei nochmal auf die Charakteristika und die Aussagekraft von T1 und T2 hingewiesen: Es handelt sich bei den Relaxationszeiten T1 und T2 um MR-spezifische, elektromagnetische Eigenschaften des Gewebes. Sie korrelieren daher nicht zwangsläufig mit histologischen oder anderweitig klinisch geläufigen Befunden (Reiter *et al.*, 2020). Hinzu kommt der voxelbasierte Charakter der MRT: Prozesse innerhalb eines Voxels, die zu Veränderungen der Relaxationszeiten

führen, summieren sich auf und können sich so gegenseitig verstärken oder aufheben, was bei diagnostischen Überlegungen stets berücksichtigt werden muss (Reiter *et al.*, 2018a). Die Relaxationszeiten sollten daher möglichst als eigenständige Parameter angesehen werden (Reiter *et al.*, 2018b). Dennoch erlauben die Ergebnisse Rückschlüsse auf die zu Grunde liegenden physiologischen Veränderungen im Gewebe. Nach Ischämie-Reperfusion kommt es zu einem T2-Anstieg im Sternum. Eine Erhöhung der T2-Zeit ist typischerweise assoziiert mit einer ödematösen und entzündlichen Veränderung des Gewebes. Im Rahmen der Myokarditis gilt T2 sogar als der überlegene Parameter zur Bestimmung der Entzündungsaktivität (Mavrogeni *et al.*, 2017). In Bezug auf die Hypothese, die von einer verstärkten Aktivierung des Sternums ausgeht, ist eine ödematöse Veränderung im Knochenmark und damit eine T2-Erhöhung nicht unwahrscheinlich. Die Wirkung von proinflammatorischen Mediatoren aus dem Infarkt könnte einen Einfluss auf das Gefäßsystem im Knochenmark haben und somit die gezielte Aktivierung des Sternums widerspiegeln. Tatsächlich ist eine erhöhte Gefäßpermeabilität im Knochenmark als Reaktion auf einen inflammatorischen Trigger bereits beschrieben (Vandoorne *et al.*, 2018). Verantwortlich dafür sind gelockerte Kontakte zwischen den Endothelzellen. Interessant ist dies zudem im Hinblick darauf, dass Endothelzellen als Bestandteil der hämatopoetischen Nische die Stammzellproliferation beeinflussen können (Vandoorne *et al.*, 2018). Außerdem geht eine längere T2-Zeit typischerweise mit einem erniedrigten Zellgehalt im Gewebe einher und deutet so auf eine abnehmende Zellzahl im Knochenmark des Sternums hin (Lota *et al.*, 2017).

Im Femur kommt es hingegen nach Ischämie-Reperfusion zu einem T2-Abfall im Knochenmark. Typischerweise geht eine kürzere T2-Zeit mit einem erhöhten Zellgehalt im Gewebe einher (Lota *et al.*, 2017). Demnach kann die T2-Verkürzung auf eine steigende Anzahl von Zellen im Knochenmark zurückzuführen sein. Diese erfolgt graduell über mehrere Tage und bleibt über längere Zeit erhalten. Hierbei kommt als Ursache eine Steigerung der Hämatopoese in Betracht, die sich als Folge des Infarkts graduell ausbildet und über den Beobachtungszeitraum hinaus Bestand hat. Hierzu passt auch eine mögliche Rekonversion, d.h. die Reaktivierung von inaktivem, zellarmem Knochenmark zu blutbildendem, zellreichem Knochenmark.

Zusammengefasst werden die Ergebnisse wie folgt interpretiert: Im Sternum kommt es unmittelbar nach Infarkt und getriggert durch eine verstärkte Wirkung proinflammatorischer Mediatoren aus dem räumlich nahen, ischämischen Myokard, zu einem Ödem und einer raschen Mobilisierung von Zellen aus dem Knochenmark, die sich in einem Anstieg der T2-Zeit widerspiegeln. Parallel dazu führt der Infarkt im Femur, zeitlich etwas verzögert, zu einer graduellen Steigerung der Hämatopoese und zur Rekonversion inaktiven

Knochenmarks, um dem erhöhten Bedarf an Leukozyten während der Infarktheilung auch langfristig gerecht zu werden. Dies spiegelt sich wiederum in dem Abfall der T2-Zeit wider (Abbildung 21).



**Abbildung 21: Schematische Interpretation der Ergebnisse des T2-Mappings**

Veränderungen in der Granulopoese und Abwanderung von Granulozyten in das Infarktgewebe im Sternum (oben) und Femur (unten) in der frühen (links) und späten Phase (rechts) nach Myokardinfarkt.

#### 4.2.2 T1-Mapping

Für die T1-Relaxationszeit konnte keine signifikante Veränderung im Sternum nach Ischämie-Reperfusion festgestellt werden. Im Femur kommt es zwar zu einem Abfall der T1-Zeit, im Vergleich zur Referenz zeigt sich jedoch, dass es sich hierbei wahrscheinlich um unspezifische Veränderungen handelt. Sie sind nicht auf das Knochenmark begrenzt und daher in Bezug auf die spezifische Fragestellung von untergeordneter Bedeutung. Wie im Ergebnisteil bereits angedeutet, fällt bei genauer Betrachtung ein ähnlicher Verlauf der Werte im Sternum auf, wie er auch im Femur und der Muskulatur zu beobachten ist. Folglich ist davon auszugehen, dass die generalisierten und andernorts messbaren Veränderungen auch im Sternum stattfinden. Entweder ist der Effekt an sich im Sternum weniger ausgeprägt oder aber das Verfahren ist nicht empfindlich genug, um die T1-Veränderungen adäquat zu detektieren. Letzteres gilt es zu diskutieren und eröffnet hier die Möglichkeit, Kritikpunkte an der Methodik zu beleuchten. Bei der MRT und damit auch dem *Mapping* handelt es sich um voxelbasierte Verfahren. Das bedeutet, die Messwerte setzen sich aus den Eigenschaften aller Einzelkomponenten innerhalb eines jeweiligen Voxels zusammen. Dies hat immer auch zur Folge, dass unerwünschte Komponenten innerhalb eines Voxels oder einer ROI die Messwerte beeinflussen (Reiter *et al.*, 2018b). Zum Beispiel können

größere Gefäße und Bindegewebe, welche ein Organ durchziehen, von den eigentlichen Eigenschaften des Parenchyms ablenken. Ähnliches gilt an Grenzflächen von Organen zu benachbartem Gewebe, bei denen Voxel zwangsläufig beide Komponenten beinhalten und so weder die eine noch die andere korrekt widerspiegeln. Der Effekt ist als Partialvolumeneffekt bekannt und bedingt eine systematische Beeinflussung der Messergebnisse (Reiter *et al.*, 2020). Beim Knochenmark des Sternums ist anzumerken, dass es sich bei den einzelnen Segmenten um sehr kleine ROIs handelt. Zudem ist die Abgrenzung zwischen Markraum und Knochen, die anatomisch sowieso fließend ist, ungenauer als beispielsweise im deutlich größeren Femur. Man muss davon ausgehen, dass das *T1-Mapping* beim Sternum aufgrund der kleinen ROI und zusätzlichen Störfaktoren wie dem Partialvolumeneffekt an die Grenzen seiner Auflösung stößt und damit Veränderungen der T1-Zeit im Knochenmark des Sternums nicht adäquat zu detektieren sind. Darüber hinaus findet sich auch in größeren Knochenmark-Kompartimenten, wie dem Femur, kein Hinweis auf spezifische Veränderungen der T1-Zeit nach Myokardinfarkt.

#### 4.2.3 *Chemical-shift Imaging*

Im Rahmen des *MCSS Imaging* kommt es im Sternum zu einer signifikanten Abnahme des Signals nach Myokardinfarkt, die gleichsam auf eine Abnahme des Lipidgehalts im Gewebe hindeutet. Wie bereits im Einführungsteil erläutert, tendiert alterndes Knochenmark zur Einlagerung von Speicherlipiden (1.2.2). Der Lipidgehalt korreliert dabei mit der Knochenmark-Aktivität: Je inaktiver das Knochenmark, desto mehr Lipide werden in den Retikulumzellen gespeichert. Darüber hinaus besitzen alle stoffwechselaktiven Zellen intrazellulär Reserven an Lipiden, die als Energiequelle für ihren Metabolismus dienen. Die Ergebnisse können somit als Hinweis für eine verstärkte metabolische Aktivität im Knochenmark und einen erhöhten Energiebedarf gedeutet werden, der sich in einem Verbrauch der intrazellulären Lipide äußert. Darüber hinaus ist an eine Rekonversion des Knochenmarks zu denken, also die Umwandlung von hämatopoetisch inaktivem zu aktivem Knochenmark. Beide Effekte bewirken wahrscheinlich synergistisch eine Abnahme des Gesamtgehalts an Lipiden im Knochenmark. Es sei angemerkt, dass die Rolle des Lipidstoffwechsels im Knochenmark bei verschiedenen Erkrankungen zunehmend in den Fokus aktueller Forschung rückt (Li *et al.*, 2022). Kritisch ist anzumerken, dass die Messwerte mit einer starken Streuung behaftet sind und daher auch keine validen Vergleichswerte zum Femur vorliegen.

Die Abnahme des Lipidgehalts im Sternum weist auf eine verstärkte metabolische Aktivität nach Infarkt hin, begleitet von einem Rekonversionsprozess im Knochenmark. Beide Aspekte sind mit einer erhöhten hämatopoetischen Aktivität assoziiert.

#### 4.2.4 Intrasternale Mikroinjektionen

Bezüglich der FACS-Analysen des sternalen Knochenmarks stechen folgende zwei Aspekte hervor, die es zu vertiefen gilt:

Erstens, die intrasternalen Injektionen *in vivo* führen im Vergleich zu *ex vivo* zu einer Abnahme der Zellzahlen im Sternum.

Zweitens, die Aufnahme des Markers in die Zielzellen scheint unter *in vivo* Bedingungen deutlich erschwert zu sein.

Die intrasternalen Injektionen führen allein *in vivo* zu einer Abnahme der Zellzahlen im Sternum. Wie bereits im Ergebnisteil angedeutet, kann diese Abnahme nur sekundär und auf die physiologische Reaktion des Gewebes speziell unter *in vivo* Bedingungen zurückzuführen sein (3.2.2). Als Ursache kommen die Nekrose und Apoptose sowie eine Translokation von Zielzellen in Betracht. Ersteres könnte bedingt sein durch eine proinflammatorische Reaktion auf den Marker oder das Trauma im Knochenmark, die als Folge der Injektion zur Nekrose und Apoptose von Zielzellen führen. Es sei darauf hingewiesen, dass die Injektion an sich nicht zu einem Untergang von Zellen führt. In diesem Fall wäre auch unter *ex vivo* Bedingungen ein Zellverlust nachzuweisen. Eine Verschleppung von Zielzellen kommt ebenfalls in Frage, z.B. bedingt durch den hydrostatischen Druck und die aktive Zirkulation, die zu einem Verlust der Zellen aus der Einstichstelle oder durch venöse Drainage führen können. Da all die genannten Faktoren auf einer Reaktion unmittelbar während oder nach der Injektion beruhen, ist es schwierig, ihnen entgegenzuwirken. Eine Möglichkeit bestünde in der Nutzung noch kleinerer Kanülen für die Injektionen, um das Trauma und dessen Folgen im Knochenmark zu minimieren.

Unter *in vivo* Bedingungen scheint die Aufnahme des Markers in die Zielzellen deutlich erschwert. Weniger als 1 % der Neutrophilen lassen sich durch Fluoreszenz eindeutig als „gelabelt“ abgrenzen. Die Daten stehen im Widerspruch zu dem deutlichen Signalnachweis, der vor und nach Myokardinfarkt durch markierte Neutrophile im Sternum bzw. im Herzen gezeigt werden kann (Abbildung 20). Zu bedenken ist dabei, dass der Nachweis der Nanoemulsion in den Zellen durch Fluoreszenz nicht mit dem Nachweis durch  $^{19}\text{F}$  in der MRT gleichzusetzen ist. Während in der Durchflusszytometrie ein Schwellenwert an Signal überschritten werden muss, der eine Zelle eindeutig von der gesamten Population abgrenzt, um als „gelabelt“ zu gelten, reicht bereits die Aufnahme kleiner Mengen des  $^{19}\text{F}$ -Markers, um in der Summe ein Signal in der MR-Bildgebung zu generieren. Hierfür spricht ebenfalls, dass selbst unter „optimalen“ Bedingungen, d.h. nach *ex vivo* Injektion, nur 13 % der neutrophilen Granulozyten im Knochenmark durch Fluoreszenz als „gelabelt“ identifiziert werden. Die Durchflusszytometrie scheint demnach nicht das idealste Verfahren zu sein,

um die Aufnahme der Nanopartikel in die Zielzellen im Knochenmark zu bewerten. Nichtsdestotrotz ist anzunehmen, dass die Aufnahme der Nanoemulsion unter *in vivo* Bedingungen deutlich verringert ist. Dies ist nicht weiter verwunderlich, da durch die aktive Zirkulation von einer verkürzten Kontaktzeit zwischen Zielzellen und Nanopartikeln auszugehen ist. Auch eine Verteilung der Emulsion durch venöse Drainage oder Rückblutung aus der Einstichstelle ist möglich. Letztlich kann durch den Nachweis der Neutrophilen im Infarktareal rückwirkend eine suffiziente Markierung der Zellen im Sternum angenommen werden. Zudem bestätigt sich durch *proof of concept* die Praktikabilität der neu konzipierten intrasternalen Mikroinjektionen.

#### 4.2.5 <sup>19</sup>F-MRT

Nach der *in vivo* Injektion unseres Markers in das Sternum lässt sich ein deutliches <sup>19</sup>F-Signal im Infarktbereich des Herzens darstellen. Dies entspricht dem Nachweis von markierten neutrophilen Granulozyten, die nach Ischämie aus dem Knochenmark des Sternums in das betroffene Myokard einwandern und sich dort an der Infarktheilung beteiligen. Es handelt sich um den erstmaligen Nachweis von Immunzellen im Infarktgewebe, die selektiv aus dem Sternum stammen. Das Ergebnis bekräftigt die Hypothese, dass Zellen in kurzer Zeit und großer Zahl aus dem sternalen Knochenmark in das Infarktareal einwandern und deckt sich dabei mit den Ergebnissen des *T2-Mappings*. Es beweist jedoch nicht, dass sich das Sternum dabei überverhältnismäßig an der Infarktheilung beteiligt. Ein „Übersetzen“ von Neutrophilen aus dem bekanntermaßen aktiven Knochenmark des Sternums als Reaktion auf den Infarkt war indes zu erwarten. Beim <sup>19</sup>F-Signal im Herzen handelt es sich um einen qualitativen Nachweis, der keine Rückschlüsse über die genaue Anzahl an eingewanderten Zellen zulässt. Eine Quantifizierung der aus dem Sternum stammenden Neutrophilen, insbesondere im Hinblick auf einen möglichen Vergleich zu Neutrophilen anderer Herkunft, wäre in Folgeversuchen erstrebenswert und böte zusätzliche Belege für die Hypothese. Aus der Lokalisation des <sup>19</sup>F-Signals lässt sich kein Hinweis für die postulierte direkte Migration der Zellen durch den Knochen ableiten. Die gleichmäßige Verteilung des Signals über das Infarktareal spricht am ehesten für eine überwiegend hämatogene Migration der Zellen. Ein möglicher Beweis dafür, dass Neutrophile über die *Compacta* des Sternums in das Myokard einwandern, gelänge vielleicht eher durch den Nachweis von Einzelzellen an der anatomischen Schnittstelle zwischen Knochen und Myokard. Hierfür scheint der mikroskopische Nachweis gelabelter Zellen der <sup>19</sup>F-MRT methodisch überlegen und böte ebenfalls einen Ansatz für mögliche Folgeversuche. Zu diskutieren sind zudem folgende Aspekte, die im Rahmen der intrasternalen Injektionen zu bedenken sind:

1. Die Injektionen haben einen destruktiven Effekt auf das Knochenmark. Es ist anzunehmen, dass aufgrund der geringen Größe der Knochenmark-Kompartimente das Eindringen der Kanüle und die Applikation des Markers einen Teil des Knochenmarks im Sternum funktionsunfähig machen. Die FACS-Analysen zeigen nach Injektion eine Reduktion der Zellen im Knochenmark um 25 %. Eine Abschätzung des genauen Ausmaßes der funktionellen Beeinträchtigung ist dennoch schwierig. Es ist zu erwarten, dass die Funktionalität des Knochenmarks zu einem gewissen Grad eingeschränkt wird.

2. Die Nanoemulsion gelangt in den Blutstrom und wird dort von neutrophilen Granulozyten aufgenommen. Durch die traumatische Eröffnung der Mikrozirkulation und venöse Drainage könnten Partikel aus dem Sternum unweigerlich ins Blut gelangen und hier durch zirkulierende, nicht im Sternum befindliche neutrophile Granulozyten aufgenommen werden. Dies ist dahingehend problematisch, da so auch Neutrophile außerhalb des Sternums den  $^{19}\text{F}$ -Marker aufnehmen und nach Ischämie-Reperfusion ins Infarktareal einwandern könnten.

Zusammengefasst lässt sich durch die  $^{19}\text{F}$ -MRT die Migration der Neutrophilen aus dem Sternum ins Herz bildgebend nachverfolgen. Dies entspricht dem erstmaligen Nachweis von Immunzellen aus dem Sternum am Infarktgeschehen und bestätigt die Durchführbarkeit der intrasternalen Mikroinjektionen. Die Ergebnisse unterstützen zwar die Hypothese, beweisen aber nicht, dass das Knochenmark des Sternums überverhältnismäßig an der Infarktheilung beteiligt ist. Hierfür und für den Nachweis einer möglichen direkten Migration sind weiterführende Versuche von Nöten.

#### 4.3 Schlussfolgerung II

Die Ergebnisse der MR-Analysen stellen sich so dar, dass Knochenmark-Kompartimente unterschiedlicher Lokalisation auch unterschiedliche Funktionen im Rahmen inflammatorischer Prozesse einnehmen. Im Fall des Myokardinfarkts kommt es zu einer lokalen Ausbreitung der Inflammation, die eine rasche Abwanderung von Leukozyten aus dem nahegelegenen Knochenmark des Sternums zur Folge hat. Im Gegensatz dazu führt der Infarkt in entfernten Knochenmark-Kompartimenten zu einer langfristigen Steigerung der hämatopoetischen Aktivität. Insofern bestätigt sich die Hypothese, dass das Knochenmark des Sternums eine Sonderrolle in der Infarktheilung einnimmt. Der Nachweis der Migration von neutrophilen Granulozyten aus dem Sternum in das Infarktareal innerhalb der ersten 24 h bekräftigt zudem die Bedeutung des Sternums in der inflammatorischen Phase der Infarktheilung. Darüber hinaus beleuchten die Ergebnisse die Komplexität der Knochenmarksfunktion im Zusammenspiel der verschiedenen Kompartimente bei lokalen Entzündungsprozessen. Sie deuten auf eine dynamische Aufgabenteilung innerhalb des

Gesamtknochenmarks hin, die auf der räumlichen Nähe zum inflammatorischen Fokus beruht. Wenn diese Schlussfolgerungen zutreffen, ist davon auszugehen, dass sich ein solches Geschehen nicht nur auf den Myokardinfarkt begrenzt, sondern als allgemeines Prinzip im Rahmen aller Krankheitsbilder mit inflammatorischer Komponente zum Tragen kommt. Dies würde die Sichtweise auf das Knochenmark im Rahmen diverser Krankheitsprozesse nachhaltig verändern.

## 5 Quellenverzeichnis

- Amend, S.R., Valkenburg, K.C. & Pienta, K.J. (2016) Murine Hind Limb Long Bone Dissection and Bone Marrow Isolation. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (110). Available from: <https://doi.org/10.3791/53936>.
- Bajaj, A., Sethi, A., Rathor, P., Suppogu, N. & Sethi, A. (2015) Acute Complications of Myocardial Infarction in the Current Era: Diagnosis and Management. *Journal of Investigative Medicine : the Official Publication of the American Federation for Clinical Research*, 63(7), 844–855. Available from: <https://doi.org/10.1097/JIM.0000000000000232>.
- Boulais, P.E. & Frenette, P.S. (2015) Making sense of hematopoietic stem cell niches. *Blood*, 125(17), 2621–2629. Available from: <https://doi.org/10.1182/blood-2014-09-570192>.
- Bouvain, P., Temme, S. & Flögel, U. (2020) Hot spot 19 F magnetic resonance imaging of inflammation. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 12(6), e1639. Available from: <https://doi.org/10.1002/wnan.1639>.
- Coolen, B.F., Geelen, T., Paulis, L.E.M., Nauerth, A., Nicolay, K. & Strijkers, G.J. (2011) Three-dimensional T1 mapping of the mouse heart using variable flip angle steady-state MR imaging. *NMR in Biomedicine*, 24(2), 154–162. Available from: <https://doi.org/10.1002/nbm.1566>.
- Cristy, M. (1981) Active bone marrow distribution as a function of age in humans. *Physics in Medicine and Biology*, 26(3), 389–400. Available from: <https://doi.org/10.1088/0031-9155/26/3/003>.
- Flögel, U., Ding, Z., Hardung, H., Jander, S., Reichmann, G. & Jacoby, C. et al. (2008) In vivo monitoring of inflammation after cardiac and cerebral ischemia by fluorine magnetic resonance imaging. *Circulation*, 118(2), 140–148. Available from: <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.737890>.
- Flögel, U., Temme, S., Jacoby, C., Oerther, T., Keul, P. & Flocke, V. et al. (2021) Multi-targeted 1H/19F MRI unmasks specific danger patterns for emerging cardiovascular disorders. *Nature Communications*, 12(1), 5847. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26146-6>.
- Frangogiannis, N.G. (2015) Pathophysiology of Myocardial Infarction. *Comprehensive Physiology*, 5(4), 1841–1875. Available from: <https://doi.org/10.1002/cphy.c150006>.
- Gimbrone, M.A. & García-Cardeña, G. (2016) Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circulation Research*, 118(4), 620–636. Available from: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306301>.

- Haase, A., Frahm, J., Hänicke, W. & Matthaei, D. (1985) 1H NMR chemical shift selective (CHESS) imaging. *Physics in Medicine and Biology*, 30(4), 341–344. Available from: <https://doi.org/10.1088/0031-9155/30/4/008>.
- Haberkorn, S.M., Jacoby, C., Ding, Z., Keul, P., Bönner, F. & Polzin, A. et al. (2017) Cardiovascular Magnetic Resonance Relaxometry Predicts Regional Functional Outcome After Experimental Myocardial Infarction. *Circulation. Cardiovascular Imaging*, 10(8). Available from: <https://doi.org/10.1161/CIRCIMAGING.116.006025>.
- Heinrich (2014) *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg.
- Herisson, F., Frodermann, V., Courties, G., Rohde, D., Sun, Y. & Vandoorne, K. et al. (2018) Direct vascular channels connect skull bone marrow and the brain surface enabling myeloid cell migration. *Nature Neuroscience*, 21(9), 1209–1217. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0213-2>.
- Jenča, D., Melenovský, V., Stehlik, J., Staněk, V., Kettner, J. & Kautzner, J. et al. (2021) Heart failure after myocardial infarction: incidence and predictors. *ESC Heart Failure*, 8(1), 222–237. Available from: <https://doi.org/10.1002/ehf2.13144>.
- Kolaczowska, E. & Kubes, P. (2013) *Neutrophil recruitment and function in health and inflammation*.
- Leuschner, F., Rauch, P.J., Ueno, T., Gorbatov, R., Marinelli, B. & Lee, W.W. et al. (2012) Rapid monocyte kinetics in acute myocardial infarction are sustained by extramedullary monocytopoiesis. *The Journal of Experimental Medicine*, 209(1), 123–137. Available from: <https://doi.org/10.1084/jem.20111009>.
- Li, Z., Bowers, E., Zhu, J., Yu, H., Hardij, J. & Bagchi, D.P. et al. (2022) Lipolysis of bone marrow adipocytes is required to fuel bone and the marrow niche during energy deficits. *ELife*, 11. Available from: <https://doi.org/10.7554/eLife.78496>.
- Lota, A.S., Gatehouse, P.D. & Mohiaddin, R.H. (2017) T2 mapping and T2\* imaging in heart failure. *Heart Failure Reviews*, 22(4), 431–440. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10741-017-9616-5>.
- Manz, M.G. & Boettcher, S. (2014) Emergency granulopoiesis. *Nature Reviews. Immunology*, 14(5), 302–314. Available from: <https://doi.org/10.1038/nri3660>.
- Mavrogeni, S., Apostolou, D., Argyriou, P., Velitsista, S., Papa, L. & Efentakis, S. et al. (2017) T1 and T2 Mapping in Cardiology: "Mapping the Obscure Object of Desire". *Cardiology*, 138(4), 207–217. Available from: <https://doi.org/10.1159/000478901>.
- Nahrendorf, M., Pittet, M.J. & Swirski, F.K. (2010) *Monocytes: protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction*.
- Nahrendorf, M., Swirski, F.K., Aikawa, E., Stangenberg, L., Wurdinger, T. & Figueiredo, J.-L. et al. (2007) The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte

- subsets with divergent and complementary functions. *The Journal of Experimental Medicine*, 204(12), 3037–3047. Available from: <https://doi.org/10.1084/jem.20070885>.
- Reiter, G., Reiter, C., Kräuter, C., Fuchsjäger, M. & Reiter, U. (2018a) Cardiac magnetic resonance T1 mapping. Part 1: Aspects of acquisition and evaluation. *European Journal of Radiology*, 109, 223–234. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2018.10.011>.
- Reiter, U., Reiter, C., Kräuter, C., Fuchsjäger, M. & Reiter, G. (2018b) Cardiac magnetic resonance T1 mapping. Part 2: Diagnostic potential and applications. *European Journal of Radiology*, 109, 235–247. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2018.10.013>.
- Reiter, U., Reiter, C., Kräuter, C., Nizhnikava, V., Fuchsjäger, M.H. & Reiter, G. (2020) Quantitative klinische Herz-Magnetresonanztomografie. *RoFo : Fortschritte Auf Dem Gebiete Der Rontgenstrahlen Und Der Nuklearmedizin*, 192(3), 246–256. Available from: <https://doi.org/10.1055/a-0999-5716>.
- Saleh, M. & Ambrose, J.A. (2018) Understanding myocardial infarction. *F1000Research*, 7, 1378. Available from: <https://doi.org/10.12688/f1000research.15096.1>.
- Schirone, L., Forte, M., Palmerio, S., Yee, D., Nocella, C. & Angelini, F. et al. (2017) A Review of the Molecular Mechanisms Underlying the Development and Progression of Cardiac Remodeling. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 3920195. Available from: <https://doi.org/10.1155/2017/3920195>.
- Swirski, F.K. & Nahrendorf, M. (2013) Leukocyte behavior in atherosclerosis, myocardial infarction, and heart failure. *Science (New York, N.Y.)*, 339(6116), 161–166. Available from: <https://doi.org/10.1126/science.1230719>.
- Swirski, F.K., Nahrendorf, M., Etzrodt, M., Wildgruber, M., Cortez-Retamozo, V. & Panizzi, P. et al. (2009) Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science*, 325(5940), 612–616. Available from: <https://doi.org/10.1126/science.1175202>.
- Timmis, A., Townsend, N., Gale, C., Grobbee, R., Maniadakis, N. & Flather, M. et al. (2018) European Society of Cardiology: Cardiovascular Disease Statistics 2017. *European Heart Journal*, 39(7), 508–579. Available from: <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehx628>.
- Vandoorne, K., Rohde, D., Kim, H.-Y., Courties, G., Wojtkiewicz, G. & Honold, L. et al. (2018) Imaging the Vascular Bone Marrow Niche During Inflammatory Stress. *Circulation Research*, 123(4), 415–427. Available from: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.313302>.
- W. G. Proctor and F. C. Yu The Dependence of a Nuclear Magnetic Resonance Frequency upon Chemical Compound.

Welsch, U. (2014) *Lehrbuch Histologie*, 4th edition. Urban & Fischer in Elsevier: München.

Wolf, D. & Ley, K. (2019) Immunity and Inflammation in Atherosclerosis. *Circulation*

*Research*, 124(2), 315–327. Available from:

<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.313591>.