

Untersuchungen zu Plättchen-Leukozytenkomplexen bei einem ST-Hebungsinfarkt des Herzens

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Tamara Straub, geb. Genenger

aus Mönchengladbach

Düsseldorf, Dezember 2025

aus dem Institut für Molekulare Kardiologie,
in der Arbeitsgruppe für Experimentelle Kardiovaskuläre Bildgebung,
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Ulrich Flögel
Korreferent: Prof. Dr. Axel Gödecke

Tag der mündlichen Prüfung: 29. Juni 2026

Für Clara, Theo, Ella und Leni

„Das erste, das der Mensch im Leben vorfindet, das letzte, wonach er die Hand ausstreckt, das Kostbarste, was er im Leben besitzt, ist die Familie!“ – Adolph Kolping

I. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, ein besseres Verständnis über das Zusammenspiel und die mögliche Rolle von Plättchen und Leukozyten bei einem akuten Myokardinfarkt (STEMI) zu erhalten.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden zunächst Plättchen-Monozytenkomplexe aus dem Vollblut isoliert und deren Bildung fluoreszenzmikroskopisch und elektronenmikroskopisch nachgewiesen. In der Elektronenmikroskopie konnte zudem gezeigt werden, dass es sich um vollständige Plättchen handelt, welche an die Monozyten gebunden sind. Zudem wurde untersucht welche Zellen nach einem STEMI besonders stark mit Plättchen assoziieren. Durchflusszytometrische Analysen haben ergeben, dass etwa 62,4 % der Monozyten unmittelbar nach Infarkt im Blut der STEMI-Patienten an Plättchen gebunden sind (29,7 % im Blut der KHK-Patienten). Diese Bindung konnte nicht durch ein besonders hohes Verhältnis von Plättchen zu Monozyten erklärt werden, sondern scheint vielmehr auf einer verstärkten Aktivierung der Monozyten und Plättchen zu basieren. Die verstärkte Bindung der beiden Zellpopulationen bleibt außerdem über einen Zeitraum von 6 Monaten nach einem Myokardinfarkt auf dem gleichen Niveau. Zudem führt die Bindung von Plättchen zu einer verstärkten Migration von Monozyten gesunder Probanden.

Um die Auswirkungen der Immunzellen und besonders der Plättchen-Monozytenkomplexe, sowie den Einfluss der Funktionsänderung auf den Verlauf nach einem Myokardinfarkt zu untersuchen, wurde zudem die Bildung von Monozyten-Plättchenkomplexen in Mäusen nach einem experimentell induzierten Myokardinfarkt durchgeführt. Es wurde eine zusätzliche Mausgruppe verwendet, welche mit einer High-fat-Diät über neun Wochen in einen prädiabetischen Zustand versetzt wurde. Patienten mit Diabetes, die einen Myokardinfarkt erleiden zeigen über die Zeit eine schlechtere Herzfunktion, bis hin zum Herzversagen. Die Tiere beider Gruppen hatten nach Infarkt vor allem erhöhte Anteile von Monozyten im Blut. Der Anteil der Plättchen-Monozytenkomplexe war an Tag 7 nach Infarkt bei beiden Mausgruppen erhöht. Bei den prädiabetischen Tieren war der Anstieg im Vergleich zum Anteil der Komplexe vor einer Myokardinduktion signifikant erhöht. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Tiergruppen lag jedoch nicht vor. Eine Untersuchung des infarzierten Bereiches bei prädiabetischen Mäusen und Kontrolltieren mittels Magnetresonanztomographie (MRT) zeigte einen größeren durchblutungsfreien Bereich im Late-Gadolinium Enhancement bei prädiabetischen Tieren. Histologische Untersuchungen zeigten jedoch, dass 21 Tage nach einem Myokardinfarkt die Größe der Narbenbereiche beider Mausgruppen bei etwa 19 – 21 % des linken Ventrikels lag und nicht signifikant verschieden war. Interessanterweise war die

Mortalitätsrate nach MI bei den nicht-diabetischen Kontrolltieren höher, was im Gegensatz zu Studien beim Menschen steht.

Im dritten Teil der Arbeit wurden die Immunzellen und Plättchen-Monozytenkomplexe von Diabetes-Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit (KHK), mit denen von STEMI-Diabetes-Patienten verglichen. Die Proben der STEMI-Diabetes-Patienten zeigten zwar einen höheren Anteil von Plättchen-gebundenen Monozyten als die KHK-Diabetes-Proben, jedoch ist der Anteil und auch die absolute Zellzahl deutlich geringer als bei den STEMI-Proben.

Die direkte Bindung von Plättchen und Monozyten konnte durch die Elektronenmikroskopie nachgewiesen werden. Diese sind zudem bei STEMI-Patienten deutlich im Blut erhöht und durchlaufen eine Funktionsänderung, wie gesteigerte Migration, PSGL-1 Expression und Antigenpräsentation (MHC-I). Die in der Literatur beschriebene erhöhte Mortalität bei Diabetes Patienten nach einem Myokardinfarkt konnte im Tiermodell nicht nachgewiesen werden. Zudem war die Immunzellzahl sowie der Anteil der Plättchen-Monozytenkomplexe bei STEMI-Diabetes-Patienten deutlich niedriger als bei STEMI-Patienten.

II. Abstract

The aim of this study was to gain a better understanding of the interaction and possible role of platelets and leukocytes in acute myocardial infarction (STEMI).

In the first part of this study, platelet-monocyte complexes were isolated from whole blood and their formation was demonstrated by fluorescence microscopy and electron microscopy. Electron microscopy also showed that whole platelets are bound to the monocytes. In addition, it was investigated in which cells are particularly associated with platelets after a STEMI. Flow cytometric analyses showed that around 62.4% of monocytes are bound to platelets in the blood of STEMI patients immediately after infarction (29.7% in the blood of CHD patients). This enhanced binding could not be explained by a high ratio of platelets to monocytes, but rather due to an increased activation of monocytes and platelets. The increased binding of the two cell populations also remains at the same level for 6 months after a myocardial infarction. Furthermore, platelet binding leads to increased migration of monocytes of healthy volunteers.

In order to investigate the effects of immune cells and in particular platelet-monocyte complexes, as well as the influence of functional changes on the progression of myocardial infarction, the formation of monocyte-platelet complexes was also studied in mice after experimentally induced myocardial infarction. An additional group of mice was used, which was placed in a prediabetic state by feeding a high-fat diet for nine weeks. Patients with diabetes who suffer from myocardial infarction show poorer heart function over time, even leading to heart failure. The animals in both groups had increased levels of monocytes in their blood after infarction. The proportion of platelet-monocyte complexes was increased in both mouse groups on day 7 after infarction. In the prediabetic animals, the increase was significantly higher compared to the proportion of complexes before the induction of myocardial infarction. However, there was no significant difference between the animal groups. An examination of the infarcted area in prediabetic mice and control animals using magnetic resonance imaging (MRI) showed a larger area without blood flow in late gadolinium enhancement in prediabetic animals. However, histological examinations showed that 21 days after myocardial infarction, the size of the scar areas in both mouse groups was approximately 19–21% of the left ventricle and did not significantly differ between the groups. Interestingly, the mortality rate after MI was higher in the non-diabetic control animals, which is in contrast to studies in humans.

In the third part of the study, the immune cells and platelet-monocyte complexes of diabetes patients with stable coronary heart disease (CHD) were compared with those of STEMI diabetes patients. Although the samples from STEMI diabetes patients showed a higher

proportion of platelet-bound monocytes than the CHD diabetes samples, the proportion and absolute cell count were significantly lower than in the STEMI samples.

The direct binding of platelets and monocytes was demonstrated by electron microscopy. These are also significantly elevated in the blood of STEMI patients and undergo functional changes such as increased migration, PSGL-1 expression, and antigen presentation (MHC-I). The increased mortality in diabetic patients after myocardial infarction described in the literature could not be demonstrated in the animal model. In addition, the number of immune cells and the proportion of platelet-monocyte complexes were significantly lower in STEMI-diabetes patients than in STEMI patients.

III. Abkürzungsverzeichnis

ACD	Acid Citrate Dextrose
ADP	Adenosindiphosphat
AF488	Alexa Fluor 488
APC	Allophycocyanin
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
BV421	Brilliant Violet 421
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CC	Chemokine mit zwei Cysteinresten am Aminoterminus
CCL	CC Chemokin Ligand
CCR	CC Chemokin Rezeptor
CD	cluster of differentiation
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CT	Computertomografie
CxC	Chemokine mit zwei Cysteinresten getrennt durch weitere Aminosäure
Cy7	Cyanin 7
DAMPs	Damage associated molecular patterns
Dest.	destilliertes

dl	Deziliter
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DNA	Desoxyribonucleinsäure
Ec	Euchromatin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EKG	Echokardiogramm
EPDC	epicadium-derived progenitor cell
et al.	et alteri
FACS	fluorescent activated cell scanning/sorting
Fc	fragmentkristallisierbar
FCS	fetales Kälberserum
FISP	Fast Imaging with Steady State Precession
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	forward scatter (Vorwärtsstreulicht)
g	Gramm
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
µg	Mikrogramm
x g	fache Normfallbeschleunigung
h	Stunde
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
Hc	Heterochromatin
H ₂ O	Wasser
ICAM	Intrazelluläres Adhäsionsmolekül
IE	Injektionseinheiten

Ig	Immunglobulin
IL-	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
kg	Kilogramm
KHK	koronare Herzkrankheit
LAD	left anterior descending artery
LDL	Low density Lipoprotein
LGE	Late Gadolinium enhancement
LV	linker Ventrikel
Lys	Lysosom
MACS	magnetic activated cell sorting
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
MerTK	Rezeptor Tyrosinkinase der TAM-Familie
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
mg	Milligramm
MHC I	major histocompatibility complex I
MHC II	major histocompatibility complex II
Mi	Mitochondrium
MI	Myokardinfarkt
Min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter

µm	Mikrometer
Mme	äußere Kernmembran
MRT	Magnetresonanztomographie
MW	Mittelwert
n	Gruppengröße
NaCl	Natriumchlorid
NBZ	nüchtern Blutzuckerwert
NETose	nuclear extracellular traps
NF-κB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
ng	Nanogramm
NOTCH	Neurogenic locus notch homolog protein
NSTEMI	nicht ST-Hebungsinfarkt
O ₂	Sauerstoff
p	Überschreitungswahrscheinlichkeit
P	Plasmalemma
PBS	phosphat-buffered saline
PE	Phycoerythrin
PerCp	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
%ig	prozentig
PLA	Plättchen-Leukozytenkomplexe
PMA	Plättchen-Monozytenkomplexe
Pnu	Kernporen

PrP	plättchenreiches Plasma
PRR	pattern recognition receptor
PSGL-1	P-Selektin Glykoprotein 1
RANTES	Regulated and Normal T cell Expressed and Secreted
RER	raues Endoplasmatisches Retikulum
ROS	reactive oxygen species
RT	Raumtemperatur
RV	rechter Ventrikel
s.c.	subkutan
SD	Standardabweichung
SSC	Side scatter (Seitwärtsstreulicht)
STEMI	ST-Hebungsinfarkt
TF	Tissue factor
TGF- β	transforming growth factor β
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor α
u.a.	unter anderem
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
VEGF	Vascular endothelial growth factor
Vol%	Volumenprozent
v/v	Volumenkonzentration
WGA	Weizenkeimagglutinin
z.B.	zum Beispiel

IV. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Blutgefäßes im Längsschnitt.....	2
Abbildung 2: STEMI versus NSTEMI.	4
Abbildung 3: Entzündungsreaktion an Tag 4 nach Infarkt.....	4
Abbildung 4: Leukodiapedese.	6
Abbildung 5: Bindung von Plättchen und Leukozyten.....	12
Abbildung 6: J774, Plättchen und PBMCs in der Fluoreszenzmikroskopie.....	5312
Abbildung 7: Raster-Elektronenmikroskopische Aufnahmen von CD41-negativen (oben) und CD41-positiven (unten) Monozyten.....	54
Abbildung 8: Transmissions-Elektronenmikroskopische Aufnahmen von CD41-negativen und CD41-positiven Monozyten.....	56
Abbildung 9: Gating Strategie zur Darstellung von Monozyten-CD41- und Monozyten-CD62P-Komplexen.	57
Abbildung 10: Zellzahl pro ml Blut und Anteil der Monozyten-CD41-Komplexe im Vollblut im Vergleich.....	59
Abbildung 11: Zellzahl pro ml Blut und Anteil der verschiedenen Neutrophilen-CD41-Komplexe und Lymphozyten-CD41-Komplexe im Vollblut im Vergleich.	60
Abbildung 12: Zellzahl pro ml Blut und Anteil der verschiedenen Immunzellen im Vollblut im Vergleich.....	62
Abbildung 13: Anzahl der Thrombozyten im Blut, sowie das Verhältnis von Plättchen zu Monozyten im Vollblut.....	63
Abbildung 14: Relativer Anteil und mittlere Fluoreszenzintensität von J774 bei Inkubation mit Plättchen.....	65
Abbildung 15: Oberflächenexpression von Tissue Factor auf Monozyten im Vollblut gesunder Probanden und STEMI-Patienten..	66
Abbildung 16: Oberflächenexpression von PSGL-1 im Vollblut gesunder Probanden und STEMI-Patienten.....	67
Abbildung 17: Migrationseigenschaften der Monozyten-Plättchenkomplexe und Plättchen bei Verwendung von MCP-1.....	68

Abbildung 18: Oberflächenexpression von MHC-I und MHC-II Molekülen bei Monozyten und Monozyten-Plättchenkomplexen bei gesunden Probanden und STEMI-Patienten.	70
Abbildung 19: Monozyten- und Neutrophilenkomplexe bei den verschiedenen Mausgruppen im Verlauf nach Infarkt.	74
Abbildung 20: Monozyten, Neutrophile Granulozyten und Monozytensubpopulationen im Vollblut im Vergleich nach Infarkt.	76
Abbildung 21: Körpergewichte [g], und Blutzuckerwerte [mg/dl] der beiden Mausgruppen nach Infarkt.	77
Abbildung 22: Herzgewicht in mg und Zellzahl der Herzzimmunzellen in Zellen/mg bei den beiden Tiergruppen.	78
Abbildung 23: Magnetresonanztomographische Messungen der Herzen der Tiere.	79
Abbildung 24: Gomori-Färbung zur Bestimmung der Narbengröße.	80
Abbildung 25: Mortalitätsraten der verschiedenen Mäuse in %.	81
Abbildung 26: Körpergewichte [g], und Blutzuckerwerte [mg/dl] der beiden Mausgruppen ohne Infarkt.	82
Abbildung 27: Monozytenkomplexe und Neutrophilenkomplexe bei DD und KonDD-Tieren ohne Infarktinduktion.	84
Abbildung 28: Zellzahl pro ml Blut und Anteil der verschiedenen Immunzellen im Vollblut im Vergleich ohne Infarktinduktion.	86
Abbildung 29: Magnetresonanztomographische Messungen der Herzen der Tiere ohne Infarktinduktion.	87
Abbildung 30: Zellzahl und Anteil der Monozyten-Komplexe bei Diabetes im Vollblut im Vergleich.	88
Abbildung 31: Zellzahl pro ml Blut und Anteil der verschiedenen Neutrophilen-CD41-Komplexe und Lymphozyten-CD41-Komplexe bei Diabetes im Vollblut im Vergleich.	89
Abbildung 32: Zellzahl pro ml Blut und Anteil der verschiedenen Immunzellen bei Diabetes im Vollblut im Vergleich.	90
Abbildung 33: Plättchenmenge im Blut, das Verhältnis von Plättchen zu Monozyten im Vollblut und der relative Anteil der CD62P-positiven Plättchen bei Diabetes im Vergleich.	91

Ergänzende Abbildung 1: Anteil von MHC-I und MHC-II positiven Zellen an Monozyten und Monozyten-Plättchenkomplexen bei gesunden Probanden und STEMI-Patienten.....	107
---	------------

Inhaltsverzeichnis

I.	Zusammenfassung.....	I
II.	Abstract.....	III
III.	Abkürzungsverzeichnis	V
IV.	Abbildungsverzeichnis	X
1.	Einleitung.....	1
1.1	Der Myokardinfarkt.....	1
1.1.1	STEMI versus NSTEMI.....	3
1.1.2	Die Entzündungsantwort nach einem Myokardinfarkt	4
1.2	Interaktion zwischen Thrombozyten und Leukozyten.....	10
1.2.1	Zusammenspiel von Thrombozyten und Leukozyten.....	11
1.2.2	Komplexbildung von Thrombozyten und Leukozyten.....	11
1.3	Erkrankungen des kardiovaskulären Systems in Zusammenhang mit Plättchen-Leukozytenkomplexen.....	12
1.4	Zielsetzung.....	13
2.	Materialien	15
2.1	Geräte	15
2.2	Verbrauchsmaterialien.....	17
2.3	Chemikalien und Reagenzien.....	18
2.4	Antikörper.....	20
2.5	Herstellung verschiedener Puffer und Medien.....	22
2.6	Verwendete Zelllinien	24
3.	Methoden	25
3.1	Durchflusszytometrie	25
3.2	Versuche mit primär isolierten Immunzellen aus Humanblut	25
3.2.1	Plättchenisolationen	25
3.2.2	Fluoreszenzmikroskopie	26
3.2.3	Elektronenmikroskopie	30
3.2.4	Untersuchungen von Immunzellen und deren Plättchenmarkern in Vollblut	34
3.2.5	Untersuchung der Thrombozyten und ihres Aktivierungsstatusses in Vollblut	35
3.2.6	Inkubation isolierter oder aktivierter Plättchen auf J774.....	36
3.2.7	Zelloberflächenexpression von PSGL-1 und Tissue Factor auf Leukozyten und Leukozyten-Plättchenkomplexen.....	38

3.2.8	Chemotaxis von Monozyten und Monozyten-Plättchenkomplexen	39
3.2.9	Zelloberflächenexpression von MHC-I und MHC-II auf Leukozyten und Leukozyten-Plättchenkomplexen	40
3.3	Tierversuche in der Maus zum diabetischen Mausmodell	41
3.3.1	Induktion einer Ischämie/Reperfusion bei der Maus	42
3.3.2	Immunzellmessungen mit Vollblut der Maus	42
3.3.3	Gewichtsanalysen	43
3.3.4	Glukosetoleranztests	44
3.3.5	Immunzellmessungen mit Mäuseherzen	44
3.3.6	Messungen im Magnetresonanztomographen	46
3.3.7	Ernte der verschiedenen Organe	47
3.3.8	histologische Aufbereitung der Mäuseherzen	48
4.	Ergebnisse	51
4.1	Untersuchungen zu Plättchen-Leukozytenkomplexen	51
4.1.1	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von CD41-Monozytenkomplexe	51
4.1.2	Elektronenmikroskopische Untersuchungen von PLAs	53
4.1.3	Analyse von CD41 positiven Monozyten bei STEMI- und KHK-Patienten	56
4.1.4	STEMI-Patienten haben eine erhöhte Zellzahl von Monozyten und Neutrophilen im Blut	61
4.1.5	Mögliche Ursachen der verstärkten Komplexbildung	62
4.1.6	PMAAs zeigen eine gesteigerte Migration	67
4.2	Plättchen-Leukozytenkomplexe im prädiabetischen Mausmodell	71
4.2.1	Die Plättchen-Monozytenkomplexe steigen nach Infarkt an	71
4.2.2	Die Monozytenzahl im Blut steigt nach Infarkt an	74
4.2.3	Analyse des Blutzuckerwertes vor und nach einem Myokardinfarkt ..	76
4.2.4	DD-Tiere haben keine erhöhte Anzahl von Herzzimmungen	77
4.2.5	Diabetische Tiere zeigen einen größeren Myokardinfarkt	78
4.2.6	Die Mortalität nach einem Myokardinfarkt ist bei den Kontrolltieren höher	80
4.2.7	DD-Tiere zeigen einen deutlich höheren Blutzuckerwert	81
4.2.8	PMA-Anteile sind zwischen den Tiergruppen nicht verschieden	82
4.2.10	Untersuchungen zur Herzfunktion mittels Magnetresonanzbildgebung	86

4.3	Plättchen-Leukozytenkomplexe bei Diabetes Mellitus Typ II in Humanblut...	87
4.3.1	CD41 positive Monozyten sind im Blut von STEMI-Patienten erhöht..	88
4.3.2	STEMI-Diabetes-Patienten haben einen erhöhten Anteil von nicht-klassischen Monozyten im Blut.....	90
4.3.3	Die Plättchenzahl ist bei Patienten mit KHK und Diabetes erhöht.....	91
5.	Diskussion.....	92
5.1	Die Interaktion zwischen Plättchen und Leukozyten.....	92
5.2	Plättchen-Leukozyteninteraktionen bei MI	94
5.3	Plättchen-Leukozytenkomplexe bei Diabetes und MI.....	96
5.4	Ausblick	99
6.	Literaturverzeichnis	100
7.	Publikationsliste	106
8.	Anhang	107
9.	Danksagung	108
10.	Eidesstattliche Erklärung	110

1. Einleitung

1.1 Der Myokardinfarkt

Erkrankungen des kardiovaskulären Systems sind die Haupttodesursache weltweit.¹ Zu ihnen zählen die koronare Herzkrankheit, zerebrovaskuläre Erkrankungen (z.B der Schlaganfall), die rheumatische Herzkrankheit, der Myokardinfarkt und noch weitere. Als größter Risikofaktor für diese Erkrankungen gelten fettreiche Nahrung, Rauchen, Alkohol, Diabetes und physische Inaktivität.²

Das kardiovaskuläre System besteht aus dem Herzen, sowie den einzelnen Blutgefäßen des Organismus und übernimmt als solches vor allem den Transport von Sauerstoff, Kohlenstoffdioxid und Nährstoffen. Auch immunregulatorische Funktionen, wie der Transport von Zellen, Zytokinen und Chemokinen und die Wärmeregulation des Organismus werden durch das kardiovaskuläre System übernommen. Das Herz ist als Pumpe mit vier Kammern das Zentrum des Systems. Das sauerstoffarme Blut gelangt durch die *Vena Cava* in den rechten Vorhof und von dort in den rechten Ventrikel. Über die Pulmonalklappen wird es in die Pulmonalarterie gepumpt bis es die Lunge erreicht. Das mit Sauerstoff angereicherte Blut strömt über die Pulmonalvene in den linken Vorhof und von dort in den linken Ventrikel. Die peripheren Blutgefäße erreicht das Blut anschließend durch die Aortenklappe und die Aorta. Auch das Herz besitzt periphere Blutgefäße, die Koronararterien. Diese haben ihren Ursprung oberhalb der Aortenklappe und verlaufen kranzförmig bis in die Herzspitze. Die Verästelungen der Koronararterien bilden die koronare Mikrovaskulatur, welche die lokale Blutversorgung innerhalb des Herzgewebes ermöglicht³. Die Zellmasse des Herzens bilden vor allem die Kardiomyozyten mit 30,1% Zellanteil im arteriellen Gewebe und 49,2 % im ventrikulären Gewebe, jedoch gehören auch Endothelzellen, Fibroblasten und verschiedene Immunzellen (10,4 % bzw. 5,3 %) zu den Zellen des Herzens⁴.

Bei der koronaren Herzkrankheit (KHK) liegt meist eine Atherosklerose der Koronargefäße zugrunde, welche einen partiellen oder vollständigen Verschluss dieser zur Folge hat. Bei einer Minderperfusion der Koronararterien ohne vollständigen Verschluss über einen längeren Zeitraum, spricht man von einer stabilen KHK, welche nicht unbedingt in einen vollständigen Verschluss und somit in einem Myokardinfarkt mündet. Laut Maddox et. al ist das Risiko eines KHK Patienten jedoch 2 bis 4,5 mal höher einen Myokardinfarkt zu erleiden als bei Patienten ohne KHK⁵.

In Folge einer Verengung der Koronararterien kommt es zu einer Minderperfusion mit einhergehend vermindertem Verhältnis von verfügbarem O₂-Angebot und O₂-Bedarf der Kardiomyozyten. Die Arteriosklerose zeichnet sich durch die Bildung von lipidhaltigen Plaques

in der innersten Schicht der Gefäßwand (Intima) aus. Auf Grund einer hohen und längerfristigen Exposition von LDL Cholesterol (Lipoprotein niedriger Dichte für den Transport von Cholesterin zu den Zellen⁶) wird das Endothel der Gefäße aktiviert und permeabel für Cholesterol. Durch die Präsenz von LDL an den Endothelzellen wird von diesen VCAM-1 exprimiert. Das LDL initiiert somit die Immunantwort. Im Anschluss daran kommt es zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und zur Oxidation des LDL (oxLDL). Durch diese Modifikation des LDL wird zudem die Expression von Adhäsionsmolekülen an der Gefäßwand stimuliert. Abbildung 1 zeigt den schematischen Aufbau einer Gefäßwand bei koronarer Herzkrankheit. In Gelb ist allgemein die Verdickung innerhalb der Gefäßwand dargestellt, welche unter anderem LDL Cholesterol enthält. Gut zu erkennen ist dabei, dass das Blutgefäß nicht mehr im üblichen Umfang für Blut durchlässig ist.

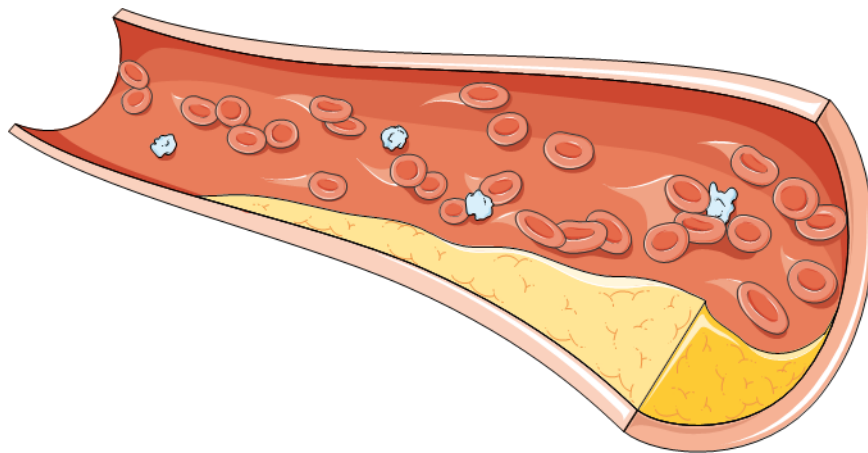


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Blutgefäßes im Längsschnitt. In der Intima wird LDL Cholesterol abgelagert und die Gefäßwand verdickt (gelb), welches mit der Zeit zu einer Immunantwort führt. (übernommen aus: Servier Medical Art)

Im gesunden Gefäß sekretieren die Endothelzellen Plättcheninhibitoren um eine Adhäsion der Plättchen zu verhindern⁷. Auf Grund der Entzündungsreaktion innerhalb eines atherosklerotischen Gefäßes werden verschiedene Zytokine sekretiert. Zu diesen zählt auch IL-6, welches das CD39 auf den Endothelzellen herunter reguliert^{8,9}. Infolgedessen binden die Plättchen an das Endothel und werden so aktiviert. Durch die Aktivierung der Plättchen wird unter anderem P-Selektin auf der Zelloberfläche exprimiert. Es folgt die Adhäsion von weiteren Plättchen und Zytokinsekretion durch diese, welche wiederum die Migration von Monozyten in das Endothel ermöglicht. Auf Grund von verschiedenen, auf den Plättchen exprimierten Molekülen (z.B. P-Selektin und CD40L) ist außerdem eine Bindung von Monozyten an die Plättchen möglich. Die Monozyten differenzieren anschließend zu Makrophagen, welche das oxLDL phagozytieren und zu sogenannten Schaumzellen transformieren. Auf Grund der Monozytenaktivierung werden zudem Antigene auf den Makrophagen präsentiert, welche von T-Zellen erkannt werden und diese in den Inflamationsherd einwandern lassen. Die

Immunzellen aktivieren infolgedessen eine Signalkaskade, welche zudem die glatten Muskelzellen aus tieferen Gewebeschichten einwandern lässt. Die Gefäßwand verdickt somit immer weiter, und der Blutfluss wird gestört.¹⁰ Durch Störungen der Hämodynamik und durch verstärkte Plaquebildung in den Gefäßen kann es entweder zum Gefäßverschluss kommen oder zur Plaqueruptur. Die Plaqueruptur kann anschließend das Gefäß vollständig verschließen oder es kommt zu einer Verschleppung des Plaques in andere Kompartimente. Eine persistierende Koronarinsuffizienz führt bei vollständiger Verengung der Koronargefäße zu einem akuten Myokardinfarkt mit Myokardnekrosen im entsprechenden Areal. Zur Diagnostik der KHK stehen verschiedene Mittel zur Verfügung. Einerseits wird in den Leitlinien angeraten eine Echokardiographie durchzuführen. Sollte diese auffällig erscheinen, sollen weitere nicht-invasive, bildgebende Verfahren wie Kardio-CT oder Kardio-MRT genutzt werden. Bei hohem Verdacht einer stenosierenden KHK wird eine Herzkatheteruntersuchung empfohlen¹¹.

Durch Ruptur eines atherosklerotischen Plaques innerhalb eines Herzkranzgefäßes, kommt es zur Bildung eines Thrombus, welcher das Gefäß verschließt. Die durch dieses Gefäß mit Sauerstoff versorgten Zellen (Kardiomyozyten, Endothelzellen, Fibroblasten) sterben in der Folge ab und durchlaufen apoptotische oder nekrotische Wege.¹² Durch Auflösen des Plaques in einer Herzkatheteruntersuchung, kann die Durchblutung im Gefäß wieder hergestellt werden. Trotz großer Fortschritte in der Medizin zählt der Myokardinfarkt jedoch immer noch zu den häufigsten Todesursachen weltweit (16 % aller Todesfälle¹).

1.1.1 STEMI versus NSTEMI

Bei einem Myokardinfarkt unterscheidet man zwei verschiedene Formen: STEMI (ST-Hebungsinfarkt) und NSTEMI. Die Klassifizierung erfolgt anhand einer echokardiographischen Untersuchung. Bei einem STEMI ist in dieser das ST-Segment um ≥ 2 mm erhöht und es sind sehr deutliche T-Wellen zu erkennen. Bei einem NSTEMI hingegen sind die ST-Segmente erniedrigt und die T-Welle ist möglicherweise invertiert (siehe Abbildung 2). Die Mortalität während des Krankenhausaufenthaltes ist laut Abbott et. al deutlich höher bei STEMI Patienten, jedoch ist der ein Jahres-Outcome bei beiden Infarktvarianten sehr ähnlich. Die Komplikationen der STEMI-Patienten während des Krankenhausaufenthaltes sind möglicherweise auf größere Infarktgrößen und geringere Ejektionsfraktionen zurückzuführen.

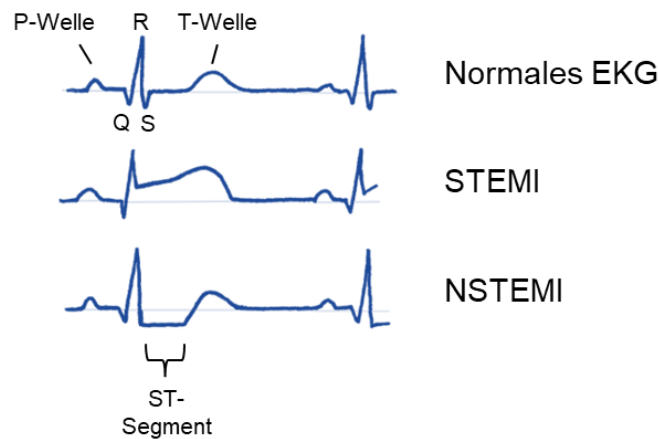


Abbildung 2: STEMI versus NSTEMI. Bei einem STEMI ist im EKG das ST-Segment um ≥ 2 mm erhöht und es sind sehr deutliche T-Wellen zu erkennen, während bei einem NSTEMI die ST-Segmente erniedrigt und die T-Welle invertiert ist. Bild modifiziert nach:

https://www.navigator-medizin.de/krankheiten/images/erkrankungen/herzinfarkt_ekg.png besucht am 17.11.2022

1.1.2 Die Entzündungsantwort nach einem Myokardinfarkt

Wird die Versorgung des Herzens mit Sauerstoff auf Grund einer Verengung oder eines Verschlusses in den Koronararterien nicht adäquat gewährleistet, kommt es zu einer Unterversorgung der Gefäße. Die Folge sind absterbende Kardiomyozyten und ein Herzinfarkt. Der Körper reagiert auf diesen mit einer Entzündungsreaktion, welche in 3 Phasen eingeteilt wird. Man unterscheidet zwischen der inflammatorischen Phase, der reparativen und proliferativen Phase, sowie der Maturation.

Die hochkomplexe Immunreaktion ist beispielhaft und vereinfacht in Abbildung 3 dargestellt¹⁴.

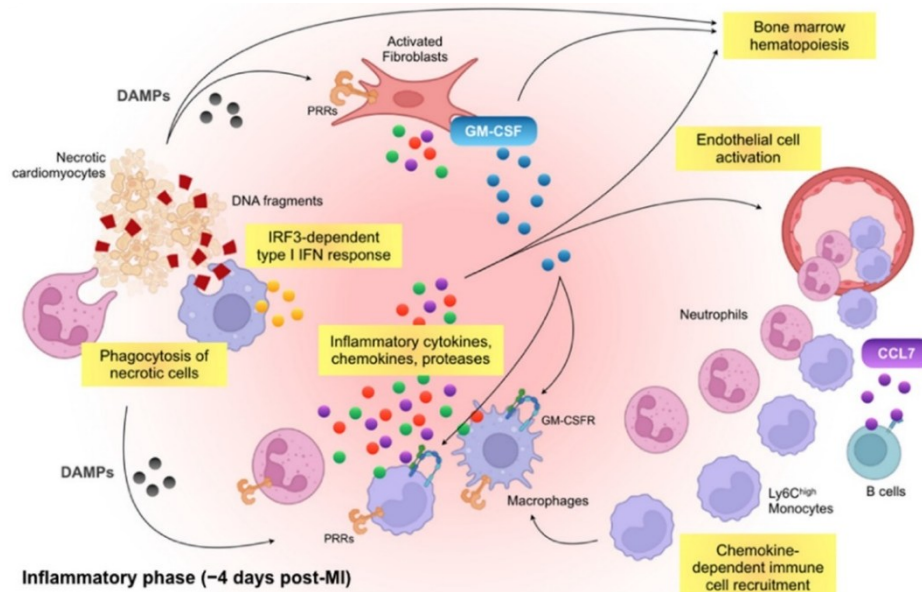


Abbildung 3: Entzündungsreaktion an Tag 4 nach Infarkt. Die nekrotischen Zellen (links) und aktivierten Fibroblasten (oben) des Herzens sekretieren sogenannte DAMPs (danger associated molecular patterns), welche an PRR (pattern recognition receptors) der Makrophagen (unten) im Herzen binden. Die Makrophagen sekretieren wiederum inflammatorische Zytokine, Chemokine wodurch zunächst Neutrophile Granulozyten und klassische Monozyten in das geschädigte Areal einwandern. Übernommen aus: Anzai et. al., 2022

Die inflammatorische Phase

Direkt nach Beginn des Myokardinfarktes setzt die inflammatorische Phase ein. Auf Grund der Sauerstoffarmut wird das Endothel geweitet und durchlässig. Es kommt zur Nekrose in diesem Gewebeteil. Durch die Reperfusion des Infarktes im Rahmen einer Herzkatheteruntersuchung kommt es zu einer plötzlichen Durchblutung der Infarktregion, welche die Nekrose verstärken kann, da unter anderem ROS produziert werden. Nekrotische Kardiomyozyten schütten DAMPs (danger associated molecular patterns) aus, während überlebende Kardiomyozyten aktiviert werden und IL-1 und ROS produzieren. Zu DAMPs gehören DNA, Organellen des Zytosols, Matrixfragmente, ATP und Membranfragmente. Die DAMPs werden nun unter anderem vom Komplementsystem erkannt. Das Komplementsystem besteht aus etwa 40 Proteinen, welche im Blut und auf Zelloberflächen vorkommen. Das Komplementsystem wird durch IgM und weitere Antikörper aktiviert. Man unterscheidet 3 verschiedene Wege des Komplementsystems: den klassischen Weg, den alternativen Weg und den Lektin Weg. Bei der sterilen Gewebeschädigung ist der klassische Weg von Bedeutung. Zunächst kommt es zur Bindung von löslichem IgM an Phosphorlipide innerhalb der geschädigten Zellmembran apoptotischer Zellen¹⁵. Das IgM wird anschließend von C1q des Komplementsystems gebunden, welches daraufhin aktiviert wird und die Komplementkaskade startet¹⁶. Alle drei Wege münden in der C3-Protein Spaltung, welche wiederum die C5-Protein Spaltung bewirkt. Die Spaltprodukte des C5 (C5a und C5b-9) dienen als Chemokine für verschiedene Immunzellen, wodurch eine Einwanderung dieser in das geschädigte Gewebe begünstigt wird. Gleichzeitig kann die Komplementaktivierung jedoch auch die Reperfusion negativ beeinflussen, wie Zhou et. al. Bei ihren Untersuchungen zu Reperfusion bei renaler Ischämie gezeigt haben¹⁷.

Zusätzlich zum Komplementsystem werden die von apoptotischen und nekrotischen Zellen freigesetzten DAMPs zudem von, im Blut zirkulierenden, Immunzellen erkannt (siehe Abbildung 3, links). Sie binden hierzu an „pattern recognition receptors“ (PRRs) der Immunzellen und bewirken so die Aktivierung der Immunkaskaden, allen voran von NF- κ B. ¹⁸

Um die Infiltration der Zellen (Leukodiapedese) zu ermöglichen, sind verschiedene molekulare Schritte nötig. Die durch inflammatorische Zytokine (z.B. TNF- α) aktivierten Endothelzellen exprimieren verstärkt P- und E-Selektine, welche wiederum an L-Selektin oder PSGL-1 auf den Leukozyten binden (siehe Abbildung 4, Mitte links). Diese rollen anschließend entlang des Endothels, bis sie durch Integrine fest an das Endothel binden (siehe Abbildung 4, Mitte rechts). Für diese Bindung werden Chemokin induzierte Immunglobuline (z.B. ICAM-1, VCAM-1) auf der Oberfläche des Endothels präsentiert, welche an Integrine der Leukozyten (z.B.

Mac-1, CD11a, CD18) binden. Die Transmigration durch das Endothel ist anschließend eine Folge der Reorganisation des Zytoskeletts der Leukozyten (siehe Abbildung 4, rechts)¹⁹.

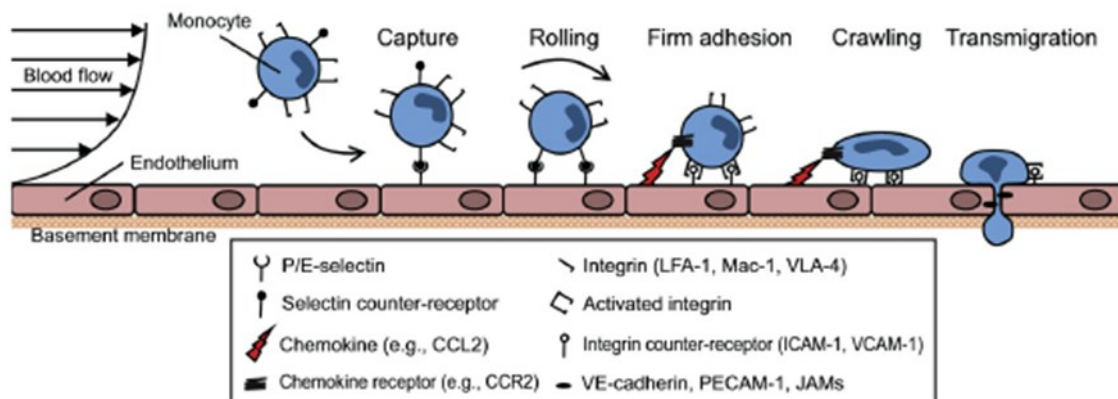


Abbildung 4: Leukodiapedese. Die Leukodiapedese beschreibt die Aktivierung des Endothels, wodurch verschiedene Immunzellen durch Transmigration in das Gewebe migrieren können. Zunächst werden Selektine verstärkt auf dem Endothel präsentiert, welche durch die Leukozyten erkannt werden. Durch Integrine kommt es zur festen Bindung ans Endothel, bevor die transendotheliale Migration mittels Reorganisation des Zytoskeletts beginnt. (Quelle: Mentkowski et. al. 2020)

Die im Herzgewebe vorhandenen Makrophagen erkennen vor allem durch TLR-4 die DAMPs und sekretieren in Folge dessen Zytokine und Chemokine, welche wiederum Monozyten, Neutrophile Granulozyten oder Lymphozyten aktivieren²⁰. Es besitzen jedoch nicht nur die Makrophagen Rezeptoren für Pathogene oder Proteine absterbender Zellen. Auch die übrigen Zellen des Immunsystems, wie Thrombozyten, Neutrophile Granulozyten und Monozyten besitzen Toll-like Rezeptoren auf ihrer Oberfläche und können so die Immunantwort aktivieren.

Des Weiteren aktivieren DAMPs die Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen (siehe Abbildung 3, rechts) und die Mobilisierung von P-Selektin, als weiteres Zelladhäsionsmolekül, aus den Weibel-Palade-Körperchen.

Auf Grund dieser Signalwege kommt es zur Aktivierung vieler proinflammatorischer Gene, welche inflammatorische Zytokine (z.B. $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 und IL-18), Chemokine (z.B. CXC, CC) und Zelladhäsionsmoleküle (z.B. VCAM, Selektine) kodieren. Um die Chemokine an der Infarktregion zu erhalten, werden diese im Endothel und der extrazellulären Matrix an Glykosaminoglukane gebunden. Gleichzeitig erhöht sich hierdurch die Chemokindosis lokal.¹⁸

Nicht alle Immunzellen werden zeitgleich im Myokard benötigt. Durch Chemokin-Expressionsprofile wandern die Immunzellen in einer bestimmten Reihenfolge ein. Die ersten Zellen, welche in Folge einer Gewebeschädigung ins Gewebe migrieren, sind die Thrombozyten. Ihre Hauptaufgabe ist die Erfüllung der Hämostase. Die hierbei genutzten

Adhäsionsmoleküle sind Integrine, welche für die Bindung ans Endothel unerlässlich sind. So ermöglichen Integrine die Adhäsion an Fibronektin, Laminin und Collagen. Werden die Plättchen aktiviert, so verändern sie ihre Struktur und konvertieren von der diskoidalen Form zu einer gestreckten Zelle mit Pseudopodien²¹. Gemeinsam mit dem im Plasma vorhandenen Fibronektin sind die Plättchen jedoch zudem in der Lage einen großen Thrombus zu bilden, welcher möglicherweise Blutgefäße verschließen kann.²²

Thrombozyten sind mit einer Größe von 2-3 µm die kleinsten Zellen des Immunsystems. Sie werden durch Fragmentierung des Zytoplasmas von Megakaryozyten gebildet und besitzen keinen Zellkern²¹. Wie die übrigen Zellen auch, haben Thrombozyten sogenannte Toll-like Rezeptoren an ihrer Oberfläche, mit welchen sie Pathogene oder absterbende Zellen erkennen können²³. Durch die Bindung von Chemokinen werden die Plättchen aktiviert und Granula freigesetzt. Sie besitzen 3 verschiedene Granula-Typen (α-Granula, Densebodies und Lysosome), in welchen Adhäsionsmoleküle, angiogene Faktoren, Zytokine, Chemokine und weitere Proteine vorhanden sind. Mit Hilfe dieser Granula ist es möglich, die Proteine sehr rasch nach Zellaktivierung freizusetzen. Zusätzlich ist es den Zellen, trotz Fehlen des Zellkerns, möglich, weitere Mediatoren wie IL-1β zu produzieren und freizusetzen.²²

Die α-Granula sind am häufigsten vertreten und enthalten vor allem Faktoren für die Hämostase und Entzündungsantwort. So beinhalten sie unter anderem P-Selektin und verschiedene CXC Chemokine²². In den Granula enthaltene Chemokine sind beispielsweise CCL4, CXCL12 und RANTES, welche als Lockstoffe für Neutrophile, Monozyten oder T-Zellen fungieren²⁴. Auf Grund der enthaltenen Mediatoren können andere Immunzellen in ihrer Migration und Aktivität beeinflusst werden.²²

Die sogenannten Densebodies hingegen beinhalten ADP, ATP, Histamine und weitere Mediatoren, welche für die Plättchenaggregation wichtig sind²⁵. Lysosomen stellen die dritte Gruppe dar und beinhalten Glykosidasen, Proteasen und Kollagenasen, welche für die Pathogenbereinigung und die Auflösung der extrazellulären Matrix essenziell sind^{22,26}.

Durch endoskopische Untersuchungen in Mäuseherzen konnte, neben der raschen Migration von Thrombozyten, zudem eine direkte Einwanderung von Monozyten nach Infarkt beobachtet werden. Diese sind Monozyten, welche in den Blutgefäßen des Herzens zuvor patrouillierten und somit direkt ins Infarktgewebe migrieren konnten²⁷.

Monozyten sind mononukleare Zellen und mit 15-22 µm Durchmesser die größten Zellen des Blutkreislaufs. Sie entstehen aus Vorläuferzellen im Knochenmark und zirkulieren nach ihrer Reifung für wenige Tage in der Blutbahn. Sobald Monozyten ins Gewebe migrieren, differenzieren sie zu Makrophagen. Es gibt drei verschiedene Subtypen der Monozyten,

welche alle eine andere Expression von Oberflächenproteinen zeigen. Die klassischen Monozyten sind CD16-/CD14++ und zeichnen sich durch ihre hohe Phagozytoseaktivität, starke Immunantwort und Gewebemigration aus. Intermediäre Monozyten hingegen sind CD14+/CD16+ und für Antigen-Präsentation, Zytokinsekretion und Apoptoseregulation nötig. Die dritte Monozyten-Population, die nicht-klassischen Monozyten, sind CD16+/CD14-. Sie sind bei der Fc-aktivierten Phagozytose, sowie der Zelladhäsion wichtig.²⁸

Die Anteile der einzelnen Monozyten Subtypen sind im Blut gesunder Probanden sehr verschieden und werden in der Literatur wie folgt angegeben: 80 – 95 % klassische Monozyten, 2 – 8 % intermediäre Monozyten und 2 – 11 % nicht-klassische Monozyten²⁹.

Noch am ersten Tag nach Infarkt sind es jedoch die Neutrophilen Granulozyten, welche in besonders hoher Anzahl im Herzen vorliegen. Erst im Anschluss migrieren weitere proinflammatorische Monozyten und Lymphozyten.³⁰

Neutrophile werden im Knochenmark aus Myeloblasten gebildet. Während ihrer Reifung werden Proteine synthetisiert, welche in verschiedenen Granula gespeichert werden. Der Übergang der reifen Zellen in die Blutbahn ist durch Chemokine geregelt. Im Falle einer Immunantwort wird die Freisetzung drastisch angehoben. Mit lediglich 6-8 h sind Neutrophile die Zellen mit der kürzesten Lebenszeit im Immunsystem.³¹

Es gibt verschiedene, auf dem Endothel präsentierte Chemokine, welche für die Immunantwort durch Neutrophile sorgen. Zu diesen Chemokinen zählen Leukotrien B₄, IL-8 und TNF- α . Durch verschiedene Signalwege und Mediatoren ist so auch eine schnelle Freisetzung der Zellen aus dem Knochenmark möglich.³² Es sind drei Funktionen der Neutrophilen bei einer Entzündungsantwort bekannt: Phagozytose, Degranulation und NETose. Während bei der Phagozytose die Zielstrukturen in Phagosomen eingekapselt und abgebaut werden, werden bei der Degranulation Enzyme oder Proteine freigesetzt, welche beispielsweise die Differenzierung der Monozyten induzieren (z.B. Laktoferrin, Azurozidin).³³ Bei der NETose werden Chromatinfasern mit Histonen, Proteasen und Granulaproteinen freigegeben, um einerseits Mikroorganismen einzufangen, andererseits jedoch auch beispielsweise Fibrinfasern neu zu ordnen.³⁴

Die mit Hilfe von CXC Chemokinen eingewanderten neutrophilen Granulozyten sezernieren proteolytische Enzyme, wodurch Matrixtrümmer und Zellbestandteile abgebaut werden können. Des Weiteren phagozytieren die neutrophilen Granulozyten Zellbestandteile und nehmen sie in ein Phagosom auf. Nach Verschmelzen mit Lysosomen werden die Zelltrümmer abgebaut.¹⁸

Nachdem die Thrombozyten, die ersten Monozyten und die neutrophilen Granulozyten eingewandert sind, migrieren klassische Monozyten in das geschädigte Gewebe.

Nach der Einwanderung der klassischen Monozyten in das entzündete Gewebe kommt es zur weiteren Aktivierung und Differenzierung dieser Zellen und u.a. zur Sekretion von MCP-1 und TNF α , was wiederum die Immigration weiterer Monozyten fördert. Des Weiteren phagozytieren sie Zelltrümmer und sekretieren proteolytische Enzyme wie Kathepsin und Matrix-Metalloproteinasen. Zusammen mit M1 Makrophagen stellen sie die größten Zellzahlen im Herzen nach Infarkt dar.¹⁸ Nach einiger Zeit werden nicht-klassische Monozyten zum Entzündungsherd gelockt, welche anti-inflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren sekretieren¹⁹.

Monozyten zirkulieren nicht nur im Blut. Die Nieren zeigen ein Reservoir für alle Monozyten-Populationen, welche sich unter der Nierenrinde im Mark befinden. Zusätzliche Reservoire für Monozyten stellen außerdem die Milz und das Knochenmark dar. Sie sind nicht differenziert und können bei Bedarf freigesetzt werden und so in den Entzündungsherd gelangen.³⁵

Nicht nur Immunzellen werden durch den Infarkt aktiviert. Auch Fibroblasten werden durch DAMPs stimuliert. Sie liegen normalerweise ruhend im Myokard vor, können jedoch durch die Aktivierung hohe Mengen inflammatorischer Zytokine sekretieren.¹⁸

Reparation, Proliferation und Maturation

Um den Übergang von der inflammatorischen Phase zur reparativen Phase zu ermöglichen, muss die kardiale Mikroumgebung geändert werden. So werden Mediatoren freigesetzt (z.B. Lipoxin, Annexin A1 und Laktoferrin) welche die Transmigration der Neutrophilen Granulozyten verhindern und deren Apoptose einleiten.¹⁸ Die apoptotischen Neutrophilen Granulozyten sekretieren daraufhin „Zersetzungs“-Signale, wodurch Makrophagen die nekrotischen Zellen aufnehmen. Durch die Phagozytose von apoptotischen neutrophilen Granulozyten, wird die Differenzierung von Makrophagen in einen M2 Phänotyp, sowie die Sekretion anti-inflammatorischer und profibrotischer Zytokine (z.B. IL-10 und TGF- β) induziert. Durch deren Sekretion wird die Gewebsreparatur eingeleitet. Im Anschluss an den Abbau der Neutrophilen, migrieren nicht-klassische Monozyten in die Infarktregion, welche zusammen mit den M2-Makrophagen die Gewebsreparatur vorantreiben. Auch diese Zelltypen sekretieren anti-inflammatorische Zytokine (z.B. IL-10, TGF- β), profibrotische und angiogene Faktoren (z.B. Vascular endothelial growth factor).¹⁸

Während der reparativen Phase migrieren auf Grund von kardialen Autoantigenen außerdem T-Helferzellen in die Infarktregion, welche für die Einwanderung von proangiogenen Makrophagen essenziell sind. Zusätzlich modulieren diese die Makrophagendifferenzierung

zu einem M2-Phänotyp.¹⁸ Um die inflammatorische Antwort einzugrenzen, sekretieren die überlebenden Kardiomyozyten im Randbereich des Infarktes Moleküle, welche verhindern, dass die Immunreaktion auf das gesunde Gewebe übergreift.¹⁸

Die Gefäßzellen und Kardiomyozyten im Randbereich des Infarktes sekretieren, während der reparativen Phase verstärkt, VEGF (vascular endothelial growth factor). Dadurch entstehen neue Blutgefäße im Bereich des Infarktes, welche eine Versorgung des Infarktgewebes mit Sauerstoff sicherstellen. Die Neogefäße besitzen dabei keine Perizyten und glatte Muskelzellen, wodurch die Immunzellen einfacher in den Infarktbereich migrieren können³⁶. Erst mit der Zeit der Heilung werden diese Schichten gebildet. Ohne diese würde die Entzündungsantwort verlängert werden.³⁷

Die, in der inflammatorischen Phase aktivierten, Fibroblasten können u.a. durch TGF- β zu Myofibroblasten umgewandelt werden. Durch die Bildung der Myofibroblasten wird nach und nach das Narbengewebe gebildet, da die Bildung und Expression von Kollagen induziert wird. Zudem konnten Smart et. al zeigen, dass epikardiale Vorläuferzellen (EPDC) nach einem Infarkt reaktiviert werden und durch epithelialer zu mesenchymaler Transition zu neuen Fibroblasten, Endothelzellen und glatten Muskelzellen reifen können³⁸.

Auf Grund der Narbenbildung wird die Pumpleistung des Herzens eingeschränkt, gleichzeitig jedoch eine Ruptur des Herzgewebes verhindert. Der intakte Herzmuskel versucht dies mit der Zeit zu kompensieren und verdickt. Die Folge ist eine dilatierte Herzkammer, eine verdickte Herzmuskelwand und trotz allem noch eine eingeschränkte Ejektionsfraktion.³⁹

1.2 Interaktion zwischen Thrombozyten und Leukozyten

Die Thromboinflammation beschreibt die Konkurrenz von Thrombose und Entzündungsantwort. Die Thrombose dient dazu, Blutverlust bei einer Wunde zu verhindern und Wunden zu verschließen. Hierbei kommt es zu einer engen Zusammenarbeit zwischen Immunzellen und Plättchen. Auf Grund übermäßiger ROS-Produktion oder DAMPs in der Gefäßwand, beispielsweise bei einer Atherosklerose, kann das positive Zusammenspiel der Immunzellen und Plättchen zu einer Thromboinflammation führen. Das geschädigte Endothel exprimiert unter anderem Adhäsionsmoleküle für Plättchen, Monozyten und Neutrophile. Zudem kommt es zu einer verstärkten Expression von TNF α , IL-6 und IL-1 β , wodurch weitere Plättchen und Leukozyten rekrutiert werden⁴⁰. Durch die Expression des IL-6 wiederum wird die Expression des Tissue Factor durch Monozyten verstärkt⁴¹. Auf Grund der Tissue Factor Expression durch die Leukozyten wird FVII der Plättchen aktiviert, welches in der Bildung von Fibrin mündet. Durch das Fibrin kommt es anschließend zur Koagulation der Plättchen und

Bildung eines stabilen Thrombus⁴². Thrombose und die Immunantwort sind daher eng miteinander verbunden. Während Immunzellen die Plättchenaktivität beeinflussen können, sekretieren Plättchen verschiedene proinflammatorische Moleküle. Im Falle einer Thromboinflammation ist die Konkurrenz von Thrombose und Entzündung gestört und es kommt zu Blutungen, oder terminalen Thrombosen.⁴³

1.2.1 Zusammenspiel von Thrombozyten und Leukozyten

Verschiedene, durch Plättchen oder Leukozyten sekretierte, Proteine können die Funktion der jeweils anderen Immunzelle beeinflussen. Es wird daher von einem Zusammenspiel der Zellen gesprochen. So führt beispielsweise das von Plättchen sekretierte ADP und ATP zur Degranularisierung der Leukozyten. Außerdem begünstigen einige, von Plättchen sekretierte, Proteine das Rolling von Leukozyten an den Endothelzellen und somit die Einwanderung in das Gewebe⁴⁴. Ein, von Leukozyten sekretierter, Stickoxid-ähnlicher Faktor kann die Aggregation von Plättchen inhibieren, indem die Sekretion von Thrombin auf den Plättchen eingeschränkt wird. Gleichzeitig wird cGMP bei Neutrophilen und cAMP sowie cGMP bei den Monozyten durch den Stickoxid-ähnlichen Faktor verstärkt⁴⁵. Das cAMP der Monozyten aktiviert wiederum den NOTCH-Signalweg und stimuliert so die Immunantwort⁴⁶. Durch die Expression von cGMP in den Neutrophile wird auch eine Modulation der Neutrophilenmigration bewirkt und somit wiederum die Immunreaktion beeinflusst⁴⁷. Durch einen einzigen Faktor, dem Stickoxid-ähnlichen Faktor, wird somit gleichzeitig die Thrombose eingeschränkt, während die Immunreaktion verstärkt wird. Die Thromboinflammation wird reguliert.

Die Thrombosereaktion kann jedoch nicht nur negativ durch Leukozyten beeinflusst werden. So kann der von Leukozyten auf Plättchen übertragene „Tissue Factor“, wie bereits oben erwähnt, die Thrombose vorantreiben. Dabei ist unklar, ob die Neutrophilen den Tissue Factor von anderen Zellen binden und auf Thrombozyten übertragen, oder diesen selbst sekretieren⁴⁸. Die Sekretion von Tissue Factor wird zudem durch das auf den Plättchen exprimierte P-Selektin stimuliert⁴⁹. Studien konnten zeigen, dass Tissue Factor innerhalb eines Thrombus internalisiert wird und scheinbar die Thrombusbildung vorantreibt⁴⁸.

1.2.2 Komplexbildung von Thrombozyten und Leukozyten

Die Interaktion von Plättchen und Leukozyten ist nicht auf den losen Austausch von Molekülen begrenzt. So können die Zellen durch Adhäsionsmoleküle eine Bindung eingehen. Die Bindung der Zellen ist durch verschiedene Rezeptoren und Liganden möglich, welche in Abbildung 5 dargestellt sind. Auf Grund der Thrombozytenmigration in das geschädigte

Gewebe werden nicht nur Chemokine freigesetzt, sondern auch P-Selektin, welches ein Ligand für das auf Leukozyten vorhandene PSGL-1 ist. Es konnte gezeigt werden, dass die Aggregation von Plättchen mit Monozyten die Expression von CD16 positiv beeinflusst und so eine höhere Zahl proinflammatorischer Monozyten existiert⁵⁰. Eine Bindung von Plättchen an Neutrophile kann sowohl durch P-Selektin und PSGL-1, als auch durch das auf Plättchen vorhandene GPIb mit einem Rezeptor auf den Neutrophilen erfolgen. Diese Bindungen haben eine gesteigerte NETose der Neutrophilen zur Auswirkung. Auch eine gesteigerte Produktion von Myeloperoxidase konnte gezeigt werden, wodurch ROS produziert werden⁵¹. Studien konnten außerdem zeigen, dass Thrombin-aktivierte Plättchen bei ihrer Bindung an Monozyten, die Freisetzung von MCP-1 und IL-8 durch die Monozyten verstärken⁵². Auf Grund der Bindung von Monozyten an stimulierte Plättchen findet eine höhere Translokation von NF- κ B zum Zellkern der Monozyten statt. Dadurch wird die Sekretion von pro-inflammatorischem IL-1 β und TNF- α gefördert.⁵³

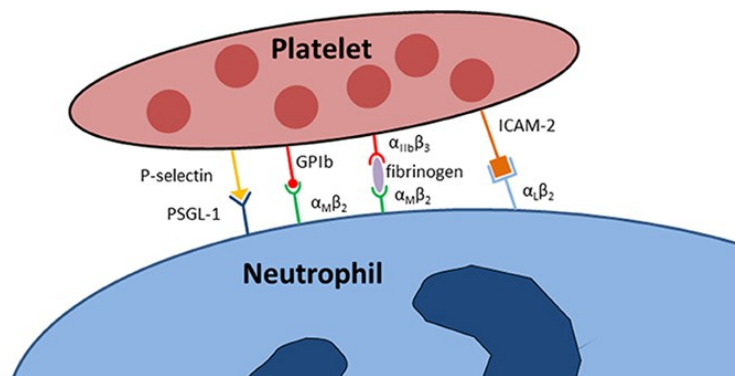


Abbildung 5: Bindung von Plättchen und Leukozyten. Die Bindung der beiden Zellen ist durch P-Selektin auf Plättchen mit PSGL-1 der Leukozyten, oder mit Hilfe verschiedener Glykoproteine (z.B. GPIb und ICAM-2) und Integrine möglich. (Übernommen aus: Rossaint et. al. 2018)

1.3 Erkrankungen des kardiovaskulären Systems in Zusammenhang mit Plättchen-Leukozytenkomplexen

Gerdies et. al. konnten in ihren Experimenten mit CD40 knockout Plättchen in Mäusen zeigen, dass durch das Fehlen von CD40 deutlich weniger Monozyten an Plättchen binden und damit einhergehend der Plaque um die Hälfte kleiner ist. Dies ist wohl auch auf die verringerte Expression von IL-1 β zurückzuführen, welche CD40 abhängig ist^{54,55}. Zudem wurde in Studien festgestellt, dass Monozyten, welche gegenüber CXCL4 auf aktivierten Plättchen exponiert waren, in proinflammatorische Makrophagen differenzieren, welche häufiger Schaumzellen bilden und so die Atherosklerose vorantreiben⁵⁶.

Die Reperusionsverletzung auf Grund eines erneuten, Durchflusses von Blut durch das ischämische Areal nach einer Behandlung im Herzkatheter, wird als thromboinflammatorische, mikrovaskuläre Antwort beschrieben⁵⁷.

Während des Infarktes wird ATP von Endothelzellen der Mikrovaskulatur genutzt, um Hypoxanthin zu produzieren. Die Xanthindehydrogenase kann dieses auf Grund des Sauerstoffmangels jedoch nicht in Xanthin umwandeln. Während einem akuten Infarkt wird die Xanthindehydrogenase in Xanthinoxidase umgewandelt, welche Sauerstoff benötigt, statt NAD, wie die Xanthindehydrogenase, um Hypoxanthin umzuwandeln. Bei einer Reperfusion wird durch den Blutfluss erneut Sauerstoff ins Gewebe transportiert und freigesetzt. Die Xanthinoxidase wandelt nun durch das vorhandene O₂ das sehr häufig vorhandene Hypoxanthin in Xanthin um und produziert dabei reaktive Sauerstoffspezies weiter.⁵⁸ Hierdurch wird wiederum die Komplementkaskade aktiviert, wodurch auch Plättchen und Leukozyten aktiviert werden. Diese Aktivierung kann zu Plättchen-Leukozyten-Aggregaten führen, welche wiederum die Leukozytenmigration und Aktivierung steigert. Zudem können Plättchen-Neutrophilen-Komplexe zu erhöhter NETose führen, welche prothrombotisch wirkt. Durch diese Immunzellaktivierungen in der Mikrovaskulatur wird die Bildung von Mikrovaskulären Obstruktionen gefördert und somit der Reperfusionsschaden verstärkt.⁵⁷

1.4 Zielsetzung

Auf Grund der Schwere der Verläufe nach einem Myokardinfarkt und vieler möglicher Komplikationen, wie mikrovaskulärer Obstruktionen, rücken die Immunzellen immer weiter in den Vordergrund der Infarktforschung. Die bei einer Herzkatheteruntersuchung zumeist eingesetzten Medikamente zur Reperfusion des Herzens, greifen stark in die Funktion der Immunzellen ein. Aufgrund der sehr komplexen Zusammenarbeit der verschiedenen Immunzellen nach einem Myokardinfarkt gibt es bisher keine gesicherte Therapie, welche einerseits Obstruktionen verhindert, andererseits jedoch keine negativen Auswirkungen auf die Narbenbildung im Infarktgebiet hat.

Ziel dieser Arbeit war es, ein besseres Verständnis der Zusammenarbeit der Plättchen und Leukozyten bei einem akuten Myokardinfarkt zu erhalten. Hierbei sollte vor allem die Auswirkung von Plättchen-Leukozytenkomplexen betrachtet werden, auch im Hinblick auf eine diabetische Vorerkrankung. Es ist bekannt, dass Diabetes zum einen die Mortalitätsrate nach einem MI erhöht und dass es außerdem mit einem proentzündlichen Zustand assoziiert ist. Zudem findet man im Blut von Diabetikern eine erhöhte Menge an aktivierten Plättchen und auch an Plättchen-Leukozytenkomplexen. Es wurden daher zunächst die verschiedenen Immunzellen bei Infarktpatienten bestimmt und auf ihre Bindung mit Plättchen hin untersucht.

Vor allem die Plättchenbindung sollte dabei im Vordergrund stehen. So wurde die Assoziation von Plättchen und Monozyten in der Elektronenmikroskopie untersucht und die Auswirkung auf die Funktion der Immunzellen im Hinblick auf die Aktivitätssteigerung und Migration näher untersucht.

Mithilfe dieser Erkenntnisse sollte es möglich sein, die Plättchen-Leukozytenkomplexe als kardiovaskulären Risikofaktor besser zu verstehen und deren Auswirkungen auf die Heilung, gerade auch bei diabetisch vorerkrankten Patienten zu erkennen.

2. Materialien

2.1 Geräte

Tabelle 1: Verwendete Geräte und Apparaturen

Gerät	Hersteller	Typenbezeichnung
Analysenwaage	Ohaus Europe (Greifensee, Schweiz)	PA214
	Kern (Balingen, Deutschland)	AEJ
Autoklav	F. & M Lautenschläger (Köln, Deutschland)	5169
Blutzuckermessgerät	Roche	Accu-Chek Aviva
Brutschrank	Thermo Fisher (Rockford, USA)	HERAcell 150i CO2 Incubator
Chemolumineszenz Imager	Intas (Göttingen, Deutschland)	Intas ECL CHEmilum Imager
Durchflusszytometer	BD Biosciences (San Jose, USA)	FACS CANTO II
	BD Biosciences (San Jose, USA)	LSR FORTESSA
Digitalkamera	Olympus (Hamburg, Deutschland)	F-View, UC30
Elektronenmikroskop	Zeiss	FIB-SEM Zeiss CrossBeam 550
	Hitachi	Hitachi H-7100
Heizblöcke	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)	Thermomixer compact
	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)	Thermomixer comfort
Inkubator	Memmert (Schwabach, Deutschland)	
Kryostat	Leica Biosystems (Nußloch, Deutschland)	CM3050S
Magnetrührer	MP Biomedicals (Santa Ana, USA)	FastPrep-24

Gerät	Hersteller	Typenbezeichnung
Mikroskop	Olympus (Hamburg, Deutschland)	BX 61
	Olympus (Hamburg, Deutschland)	CKX31
Mikrotiterschüttler	IKA (Staufen, Deutschland)	MTS 2/4
Mikrotom	Leica Biosystems (Nußloch, Deutschland)	HistoCore MULTICUT
MR-Microimagingssystem	Bruker (Rheinstetten, Deutschland)	Mini 0.5
MR-Resonatorspule	Bruker (Rheinstetten, Deutschland)	30mm-Birdcage
	Bruker (Rheinstetten, Deutschland)	45mm-Quadratur
MR-Spektrometer	Bruker (Rheinstetten, Deutschland)	400MHz Bruker AVANCE III Widebore
Neubauer Zählkammer	Marienfeld Superior (Lauda, Königshofen, Deutschland)	
pH-Meter	Knick (Berlin, Deutschland)	766 Calimatic
Pinzetten	Roth (Karlsruhe, Deutschland)	
Pipetten	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)	Research
Plattenschüttler	IKA Werke (Staufen, Deutschland)	MTS 2/4
Rollenmischer	CAT (Staufen, Deutschland)	RM5
Sterilbank	Labogene (Lyngø, Dänemark)	Scanlaf Mars Pro Cytosafe Class 2
Vakuum-Absaugsystem	KNF Neuberger Inc. (Trenton, USA)	Liquiport

Gerät	Hersteller	Typenbezeichnung
Vortexer	VWR International (Darmstadt, Deutschland)	
	neoLab (Heidelberg, Deutschland)	Vortex-Genie 2
Zentrifugen	Beckman Coulter (Brea, USA)	Allegra X-30R
	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)	5415R
	Thermo Fisher (Rockford, USA)	Heraeus Megafuge 16R
	Thermo Fisher (Rockford, USA)	Heraeus Biofuge Primo P

2.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
6-Well-Platten	Greiner Bio One (Österreich, Kremsmünster)
24-Well-Platten	Greiner Bio One (Österreich, Kremsmünster)
96-Well-Platten	Greiner Bio One (Österreich, Kremsmünster)
15 ml-Falcon	Greiner Bio One (Österreich, Kremsmünster)
50 ml-Falcon	Greiner Bio One (Österreich, Kremsmünster)
Citratröhrchen	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
Deckgläschen Ø 12 mm	Thermo Fisher (Rockford, USA)
Deckgläschen 24 x 60 mm	Thermo Fisher (Rockford, USA)
EASYstrainer 40 µm, 70 µm, 100 µm	Greiner Bio One (Österreich, Kremsmünster)
Eppendorfgefäß (250 µl, 500 µl, 1,5 ml, 2 ml)	Greiner Bio One (Österreich, Kremsmünster)
Erlenmeyerkolben 500 ml	Duran (Deutschland, Wertheim)
FACS-Tubes (5 ml Polystyren Rundboden-Tube)	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
Flügelpunktionskanüle 21 g	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)

Bezeichnung	Hersteller
Glasgefäße 25 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml	Duran (Deutschland, Wertheim)
Heparinröhrchen	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
Insulinspritzen (0,5 ml)	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
Isofluran	Actavis GmbH (Österreich, Wien)
Klebefolie	Bio-Rad (Deutschland, Düsseldorf)
LS Column	Miltenyi
Objektträger (SuperFrost Plus)	R. Langenbrinck GmbH (Emmendingen, Deutschland)
Objektträger (Polylysine)	Thermo Fisher (Rockford, USA)
Parafilm	Bemis (USA, Wisconsin)
Pipettenspitzen	StarLab (Deutschland, Hamburg)
Sicherheitsinjektionskanüle	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
Skalpell	Feather Safety Razor Co. (Japan, Osaka)
Spritzen (1 ml, 2 ml)	B. Braun SE (Melsungen, Deutschland)
Stripetten (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Greiner Bio One (Österreich, Kremsmünster)
Thincert Cell Culture Inserts 24 Well	Greiner Bio One (Österreich, Kremsmünster)
Zellkulturflaschen 25 cm ² , 75 cm ² , 275 cm ²	Greiner Bio One (Österreich, Kremsmünster)
Zellkulturschalen 10 cm	Greiner Bio One (Österreich, Kremsmünster)

2.3 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Konzentration/ Molekulargewicht	Hersteller
Adenosindiphosphat	427,2 g/mol	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Albumin Fraktion V, endotoxingepreift (BSA)	66000 g/mol	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Buprenorphin	0,3 mg/ml	MSD Sharp & Dohme GmbH (Haar, Deutschland)

Bezeichnung	Konzentration/ Molekulargewicht	Hersteller
Citratsäure-Monohydrat	210,14 g/mol	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Collagenase Typ 2	≥125 U/mg	Worthington Biochemical Corporation (Lakewood, USA)
D (+) – Glukose (wasserfrei)	180,16 g/mol	Merck (Darmstadt, Deutschland)
DMEM high Glucose	-	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
DPBS	-	Biofroxx (Deutschland, Einhausen)
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	372,24 g/mol	PanReac AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
FCS	-	Biochrom (Deutschland, Berlin)
Formaldehyd Lösung	4 %ig	neoFroxx GmbH (Einhausen, Deutschland)
Glutamax	-	Sigma-Aldrich (Deutschland, Darmstadt)
HBSS-Puffer	-	Gibco (Waltham, USA)
Heparin-Natrium	5000 i.E./ml	B. Braun SE (Melsungen, Deutschland)
HEPES-Puffer	1 M	Thermo Fisher (USA, Rockford,)
Histopaque 1077	1077 g/ml	Sigma-Aldrich (Deutschland, Darmstadt)
Histopaque 1119	1119 g/ml	Sigma-Aldrich (Deutschland, Darmstadt)
Insulin-Lösung	100 i.E./ml	Lilly Deutschland GmbH (Bad Homburg, Deutschland)
Isofluran	-	Piramal Critical Care B.V. (Voorschoten, Niederlande)
Kaliumchlorid (KCl)	74,56 g/mol	Roth (Karlsruhe, Deutschland)

Bezeichnung	Konzentration/ Molekulargewicht	Hersteller
Natriumchlorid (NaCl)	58,44 g/mol	Sigma-Aldrich (Deutschland, Darmstadt)
Natriumcitrat-Dihydrat	294,10 g/mol	Sigma-Aldrich (Deutschland, Darmstadt)
Natriumhydroxid	-	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natrium Pyruvat	-	Sigma-Aldrich (Deutschland, Darmstadt)
PBS	-	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Penicillin/Streptomycin	-	Biochrom (Deutschland, Berlin)
Trypsin/EDTA	-	Gibco (USA, Rockford)
Zitronensäure	210,14 g/mol	Sigma-Aldrich (Deutschland, Darmstadt)

2.4 Antikörper

Tabelle 4: Verwendete Antikörper

Spezifität	Fluorochrom	Klon	Reaktivität	Firma
CCR2	BV421	SA203G11	Murin	BioLegend GmbH (Fell, Deutschland)
CD11b	APC	ICRF44	Human	BioLegend GmbH (Fell, Deutschland)
CD11b	BV711	M1/70	Murin	BioLegend GmbH (Fell, Deutschland)
CD11b	PE-Cy7	M1/70	Murin	Invitrogen, Thermo Fisher (Rockford, USA)
CD14	PE-Cy7	63D3	Human	BioLegend GmbH (Fell, Deutschland)
CD16	APC-Cy7	B73.1	Human	BioLegend GmbH (Fell, Deutschland)

Spezifität	Fluorochrom	Klon	Reaktivität	Firma
CD41	FITC	HIP8	Human	BioLegend GmbH (Fell, Deutschland)
CD41	PE	HIP8	Human	BioLegend GmbH (Fell, Deutschland)
CD41	AF 488	HIP8	Human	BioLegend GmbH (Fell, Deutschland)
CD41	PE	MWReg30	Murin	BioLegend GmbH (Fell, Deutschland)
CD42d	PE	HIP1	Human	BioLegend GmbH (Fell, Deutschland)
CD42d	PE	1C2	Murin	BioLegend GmbH (Fell, Deutschland)
CD45	AF488	30-F11	Murin	BioLegend GmbH (Fell, Deutschland)
CD45	APC	30-F11	Murin	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
CD62P	PerCP	AK4	Human	BioLegend GmbH (Fell, Deutschland)
CD62P	PE	RMP-1	Murin	BioLegend GmbH (Fell, Deutschland)
CD64	APC	X54-5/7.1	Murin	BioLegend GmbH (Fell, Deutschland)
CD142	PE	NY2	Human	BioLegend GmbH (Fell, Deutschland)
CD162	PE	KPL-1	Human	BioLegend GmbH (Fell, Deutschland)
DAPI	Pacific Blue	-	-	Sigma Life Science (St. Louis, USA)
Live/Dead	Aqua	-	-	Invitrogen, Thermo Fisher (Rockford, USA)

Spezifität	Fluorochrom	Klon	Reaktivität	Firma
Ly6G	APC/Fire750	1A8	Murin	BioLegend GmbH (Fell, Deutschland)
Ly6G	PerCP	1A8	Murin	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
Ly6C	AF700	HK1.4	Murin	BioLegend GmbH (Fell, Deutschland)
Ly6C	APC/Fire750	HK1.4	Murin	BioLegend GmbH (Fell, Deutschland)
MertK	PE	2B10C42	Murin	BioLegend GmbH (Fell, Deutschland)
MHCI	FITC	W6/32	Human	BioLegend GmbH (Fell, Deutschland)
MHCII	FITC	L243	Human	BioLegend GmbH (Fell, Deutschland)
MHCII	PE/Dazzle	M5/114.15.2	Murin	BioLegend GmbH (Fell, Deutschland)
WGA	AF594	-	-	Invitrogen, Thermo Fisher (Rockford, USA)

2.5 Herstellung verschiedener Puffer und Medien

Tabelle 5: Herstellung verschiedener Puffer und Medien

Name	Zusätze	Konzentrationen
ACD (Acid Citrate Dextrose)	Natriumcitrat-Dihydrat	85 mM
	Citratsäure-Monohydrat	71 mM
	D (+) -Glukose	111 mM
ADP-HBSS (1 µM)	Adenosindiphosphat	98,5 mg
	HBSS-Puffer	2,305 ml
	1:100 verdünnen mit HBSS-Puffer	

Name	Zusätze	Konzentrationen
Medium (10 % FCS)	FCS	10 %
	Penicillin/Streptomycin	1 %
	Glutamax	1 %
	MEM NEAA	1 %
	Natrium-Pyruvat	1 %
Medium (30 % FCS)	FCS	30 %
	Penicillin/Streptomycin	1 %
	Glutamax	1 %
	MEM NEAA	1 %
	Natrium-Pyruvat	1 %
Lysepuffer für Erythrozyten (hergestellt durch die Zentralapotheke der Universitätsklinik Düsseldorf)	Ammoniumchlorid	8,29 mg/ml
	Kaliumhydrogencarbonat	1 mg/ml
	Natrium-EDTA	0,0375 mg/ml
MACS-Puffer	PBS	
	BSA	2 %
	EDTA	1 mM
PBS-EDTA (5 mM)	EDTA	5 mM
	PBS	
Phosphat-Glycerol-Puffer (pH 7.4)	Na ₂ HPO ₄	7 mM
	NaH ₂ PO ₄	3 mM
	Glycerol	2,5 vol%
Waschpuffer (pH 6.5)	Zitronensäure	36 mM
	Natriumchlorid	103 mM
	Kaliumchlorid	5 mM
	EDTA	5 mM
	D (+) -Glukose	5,6 mM
	BSA	0,35 %

2.6 Verwendete Zelllinien

Tabelle 6: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	ATCC-Nummer
J774	TIB-67 TM

3. Methoden

3.1 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie wurde für verschiedene Versuchsteile als analysierende Methode verwendet. Mit Hilfe verschiedenster Laser und Detektoren ermöglicht sie eine schnelle Messung der qualitativen und quantitativen Eigenschaften von Zellpopulationen und einzelnen Zellen. Nach dem Verbringen der gewünschten Zellen in eine Suspension, werden diese mit zu untersuchenden, fluoreszierenden Antikörpern markiert. Mit Hilfe einer Trägerflüssigkeit wird ein Druck aufgebaut und die Zellen ins Gerät eingesogen. Je nach Geschwindigkeit ist es nun möglich die Zellen einzeln an verschiedenen Lasern vorbeizuführen. Je nach Gerät variieren die Laser und ihre Detektoren. In jedem Gerät ist jedoch je ein Detektor für Vorwärts- (FSC) und einer für Seitwärtsstreulicht (SSC) verbaut. Diese ermöglichen ein Maß für das ungefähre Volumen (FSC) und die Granularität, sowie interne Komplexität (SSC) der Zelle. Sie sind dabei unabhängig von der Fluoreszenz der jeweiligen Zelle. Weiterführend werden die Zellen an weiteren Fluoreszenzspezifischen Laser vorbeigeführt. Die Intensität des detektierten Lichtsignals gibt dabei Rückschlüsse auf die Dichte des jeweiligen Antigens.

Die Durchflusszytometrie kann somit für die Ermittlung der Antigenexpression verschiedener Zellen genutzt werden. In den folgenden Versuchsteilen wurde sie genutzt, um die verschiedenen Immunzellen des Blutes zu analysieren und quantifizieren, sowie die Bindung verschiedener Zelloberflächenmarker zu überprüfen.

3.2 Versuche mit primär isolierten Immunzellen aus Humanblut

3.2.1 Plättchenisolationen

In einigen Versuchsteilen genügte die Gewinnung von plättchenreichem Plasma. Für andere Versuchsteile wiederum wurde eine weitere Isolation der Plättchen notwendig, um diese nutzen zu können.

3.2.1.1 Gewinnung von plättchenreichem Plasma

Das plättchenreiche Plasma wurde für die Inkubation von Plättchen aus gesunden Probanden und STEMI Patienten auf J774 verwendet, sowie für die Fluoreszenzmikroskopie von Plättchen. Das Blut eines gesunden Probanden wurde durch eine fachkundige Person aus der vena mediana cubiti in ein Heparinröhrchen abgenommen. Hierbei hemmte das Heparin die Blutgerinnung durch Bindung an Antithrombin III und somit durch Inhibition der Gerinnungsfaktoren. Bei STEMI Patienten wurde das Blut direkt im Herzkatheterlabor aus der Aorta entnommen und in ein Heparinröhrchen überführt. Nach der Abnahme wurde 1 ml des

Blutes in je ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gegeben und bei 200 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Die obere Schicht entsprach dem plättchenreichen Plasma (PrP) und wurde in ein neues Gefäß pipettiert. Im Anschluss erfolgten unverzüglich die jeweiligen weiteren Versuchsschritte.

3.2.1.2 Gewinnung von isolierten Plättchen

Zur Fluoreszenzmikroskopie von an J774 gebundenen Plättchen, sowie für die Plättchenaktivierung mussten diese aus plättchenreichem Plasma weiter isoliert werden. Hierzu wurde durch eine fachkundige Person jeweils 4 ml Vollblut über die vena mediana cubiti entnommen. Das gewonnene Blut wurde in Citratröhrchen aufgefangen. Das Citrat diente hierbei dem Entzug von Ca_2^+ um die Blutgerinnung zu hemmen. Um eine Aktivierung der Plättchen zu verhindern, wurden alle Versuchsschritte bei Raumtemperatur durchgeführt. Zunächst wurde das gesamte Röhrchen für 20 Min bei 120 x g zentrifugiert und der Überstand in ein Falcon überführt. Nach Hinzugabe von 10 % v/v von ACD wurde die Suspension für 10 Min bei 200 x g zentrifugiert. Das plättchenarme Plasma (Überstand) wurde abgesaugt und das Pellet in 1 ml Waschpuffer resuspendiert. Es folgte eine Überführung der Suspension in ein neues Falcon und eine erneute Zentrifugation für 10 Min bei 2000 x g. Durch seinen pH von 6,5 verhinderte der Waschpuffer hierbei eine Aktivierung der Plättchen. Das Pellet wurde erneut in 1 ml Waschpuffer aufgenommen und zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 1 ml Assay-Puffer aufgenommen und für weiterführende Versuche verwendet.

3.2.2 Fluoreszenzmikroskopie

Da nicht klar war, ob die Monozyten an vollständige Plättchen oder an deren Exosomen, Mikrovesikel oder Plättchenfragmente gebunden sind, wurden mikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Zur Einschätzung der Größe der in unseren Versuchen an die Monozyten gebundenen CD41-positiven Bestandteile wurden zunächst fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen durchgeführt.

Die Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht es, bestimmte Zellstrukturen, welche für den Betrachter relevant sind, zu betrachten, ohne dabei ein störendes Hintergrundsignal zu erhalten. Sie beruht dabei auf der Fähigkeit mancher Moleküle Photonen in einer Wellenlänge zu emittieren, wobei die Absorption dieser Photonen einer meist kürzeren Wellenlänge entspricht. Aleksander Jablonski hat zur Veranschaulichung dieses Übergangs von Elektronen das Jablonski-Diagramm erstellt. In diesem ist die Anregung eines Elektrons durch Photonen auf einen höheren Energiezustand dargestellt, gefolgt von einem Energieverlust durch Schwingungen. Hierbei wird ein Photon emittiert, dessen Wellenlänge länger ist als die des ursprünglich absorbierten (S_1 zu S_0). Ein Teil der Energie wird zuvor jedoch durch

strahlungslose Energieverluste abgegeben (S_2 zu S_1). Die geringere Energie des Photons auf Grund der strahlungslosen Energieverluste wird dabei als „Stokes-Verschiebung“ bezeichnet. (Grundlagen der Fluoreszenz und Fluoreszenzmikroskopie, Zeiss).

Nach der Entdeckung des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) im Jahre 1962 wurden noch viele weitere Moleküle mit fluoreszierenden Eigenschaften gefunden, welche für die Fluoreszenzmikroskopie verwendet werden können. Diese werden hierzu an Antikörper konjugiert, welche wiederum direkt mit dem gewünschten Protein interagieren. Bei dieser direkten Immunfluoreszenz kommt es lediglich zu geringen Kreuzreaktivitäten, während die Signalintensität geringer ist. Bei der indirekten Immunfluoreszenz ist das Fluorophor an einen sekundären Antikörper konjugiert, welcher wiederum an einen primären Antikörper binden muss. Es kommt hierbei zu einer Signalverstärkung, jedoch auch zu verstärkter Kreuzreaktivität.

Im Fluoreszenzmikroskop wird durch eine Lichtquelle und einen Anregungsfilter die Probe angestrahlt und reflektiert. Das emittierte Licht wird im Anschluss durch einen Emissionsfilter zum Detektor geleitet. In den meisten Fluoreszenzmikroskopen werden hier keine einfachen Filter, sondern komplexe Filterwürfel verwendet, um Fluorophore nutzen zu können. Es ist jedoch darauf zu achten, dass bei gleichzeitiger Verwendung mehrerer Fluorophore die Emissionsspektren so wenig Überschneidung wie möglich zeigen.

3.2.2.1 Plättchen in der Fluoreszenzmikroskopie

Ein erster Test erfolgte in der Fluoreszenzmikroskopie mit plättchenreichem Plasma, um zunächst die Antikörperbindung zu untersuchen. Das plättchenreiche Plasma wurde hierzu zunächst wie in 3.2.1.1 gewonnen. Im Anschluss wurden 2 x 100 µl des Plasmas auf Polylysine beschichtete Objektträger gegeben. Das Polylysin erhöht die Interaktion zwischen negativ geladenen Ionen der Zellmembran und der positiv geladenen Ionen auf dem Objektträger, wodurch eine Anhaftung der Plättchen nach einer 30-minütigen Interaktion im Brutschrank (37°C) auf dem Objektträger erfolgte. Die Flüssigkeit auf dem Objektträger wurde schließlich abgossen und entweder 100 µl PBS, oder 100 µl CD41-AF488 (1:200 in PBS) für 30 Minuten in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur auf den Zellen inkubiert. Die ungebundenen Antikörper wurden vorsichtig mit 100 µl PBS abgewaschen. Es folgte eine Fixierung der Zellen mit 100 µl PFA (4 %) für 10 Minuten bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer. Anschließend wurde das PFA abgossen und die Zellen erneut mit 100 µl PBS gewaschen. Zur Eindeckelung wurden die Proben mit einigen Tropfen „ProLong™ Gold antifade reagent with DAPI“ beträufelt und ein Deckgläschen aufgelegt. Die Mikroskopie folgte am nächsten Tag.

3.2.2.2 J774-Plättchenkomplexe in der Fluoreszenzmikroskopie

In einem weiteren Testversuch sollten J774 Zellen an Plättchen gebunden werden und ihre Interaktion fluoreszenzmikroskopisch dargestellt werden. Aus diesem Grund wurden zunächst die J774 vorbereitet. Da J774 Zellen semi-adhärenent sind, wurden sowohl die in Suspension vorliegenden Zellen als auch die auf dem Flaschenboden angewachsenen Zellen verwendet. Das Medium wurde aus der Zellkulturflasche in ein Falcon überführt und bei 350 x g für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Währenddessen wurden die Zellen am Flaschenboden mit 5 ml PBS gewaschen und anschließend mit 5 ml 5 mM PBS-EDTA für 115 Minuten bei 37 °C inkubiert. Das EDTA bindet in dieser Zeit Calcium und Magnesium und unterbricht somit die Bindung der Zellen an den Flaschenboden. Nach erfolgter Inkubation wurden zur Reaktionsunterbindung 5 ml Medium in die Flasche gegeben und die gesamte Suspension in ein frisches Falcon überführt. Dieses wurde ebenfalls für 5 Min bei 350 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Aus beiden Falcon wurde nach der Zentrifugation der Überstand abgesaugt und die Pellets mit je 2,5 ml Medium resuspendiert. Die jeweiligen Suspensionen wurden zusammengeführt und Die Zellen mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer gezählt. Hierzu wurden 10 µl der Suspension auf die Kammer gegeben und alle 4 x 16 Kleinquadrate ausgezählt. Mit Hilfe einer einfachen Rechnung konnten dann die Zellen pro ml ermittelt werden:

$$\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} = \frac{\text{Zellzahl}}{4} * 10^4$$

In 12 Wells einer 24-Well-Platte wurde nun jeweils ein rundes Deckgläschen (Ø 12 mm) gelegt und 3 x 10⁵ Zellen darauf gegeben. Es folgte eine Inkubation über Nacht im Brutschrank bei 37 °C zur Anhaftung der Zellen.

Am darauffolgenden Tag wurden die Plättchen auf den J774 Zellen inkubiert. Hierzu wurden die Plättchen wie in Versuch 3.2.1.2 isoliert und in 1 ml Medium aufgenommen. Die Plättchen wurden bei 2000 x g für 5 Min bei Raumtemperatur zentrifugiert und einmal mit 200 µl PBS gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation wurden diese in 1 ml Medium aufgenommen und auf die J774 Wells gegeben. Dabei wurden auf 3 der Wells keine Plättchen gegeben, während auf jeweils 3 Wells 100 µl der Plättchen gegeben wurden. Die Zellen wurden daraufhin im Brutschrank für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde der Überstand abgesaugt und jeweils mit 200 µl PBS vorsichtig gewaschen. Es folgte nun die Inkubation mit den Antikörpern. Hierzu wurden je Plättchenkonzentration drei verschiedene Färbungen verwendet, um adäquate Kontrollen zu gewährleisten. Die Färbungen sind in Tabelle 7 dargestellt und wurden jeweils mit 100 µl Lösung auf einer Folie in einer Feuchtkammer für 30 Minuten durchgeführt.

Tabelle 7: Antikörperfärbung J774 Plättchenkomplexe

Probe	Antikörper
1	Nur PBS
2	WGA-AF647
3	WGA-AF647 + CD41-AF488

Nach Ablauf der Inkubation wurden die Deckgläschen 2-mal mit jeweils 200 µl PBS gewaschen und mit 100 µl PFA (4 %) für 10 Minuten fixiert. Anschließend wurde das PFA mit 200 µl PBS abgewaschen und mit Hilfe eines Tropfens „ProLong™ Gold antifade reagent with DAPI“ auf einem Objektträger fixiert. Die Fluoreszenzmikroskopie folgte am nächsten Tag.

3.2.2.3 PBMCs in der Fluoreszenzmikroskopie

Nach der erfolgreichen Darstellung von J774-Plättchenkomplexen, wurde ein weiterer Versuch mit PBMCs durchgeführt. Hierzu wurden 5 ml Humanblut über die vena mediana cubiti in einem Heparinröhrchen abgenommen. Nach der Abnahme wurde das Blut 1:1 in einem Falcon mit PBS verdünnt und langsam auf 5 ml Ficoll 1077 geschichtet. Die Probe wurde für 20 Minuten bei 800 x g und Raumtemperatur ohne Beschleunigung und Bremse zentrifugiert, wodurch eine Phasentrennung auf Grund der verschiedenen Dichten des Ficoll und der Blutbestandteile erfolgte. Während die Erythrozyten und Granulozyten in der unteren Phase zu finden waren und das Blutplasma in der oberen Phase, trennte der Ficoll die PBMCs von den Erythrozyten ab. Die PBMCs wurden in ein neues Falcon übertragen und 1:1 mit PBS gemischt. Um übrigen Ficoll aus der Suspension zu entfernen, wurde diese für 10 Min bei RT und 500 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Medium (10 % FCS) resuspendiert und 3 x 100 µl auf Poly-L-Lysin-Objektträger gegeben. Zur Zellanhaftung wurden die Objektträger in einer Feuchtkammer für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Flüssigkeit wurde von den Objektträgern vorsichtig abgegossen und die Zellen mit 100 µl PBS gewaschen. Die Färbung erfolgte wie bereits in Tabelle 7 angegeben und mit jeweils 100 µl Lösung für 30 Minuten in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Antikörperlösungen abgegossen und die Zellen erneut mit 100 µl PBS gewaschen. Zur Fixierung wurden jeweils 100 µl PFA (4 %) für 10 Min auf die Zellen gegeben. Nach einem weiteren Waschschrift konnten die Objektträger mit einem Tropfen „ProLong™ Gold antifade reagent with DAPI“ und einem Deckgläschen versiegelt werden. Die Fluoreszenzmikroskopie folgte am nächsten Tag.

3.2.3 Elektronenmikroskopie

Durch die Elektronenmikroskopie ist es möglich kleinste Strukturen im Nanometer-Bereich zu visualisieren. Sie eignet sich daher besonders gut, um die genauen Bindungsstrukturen zwischen Monozyten und Plättchen, sowie die Strukturen innerhalb der Zellen zu erkennen.

In diesem Versuchsteil wurden zwei verschiedene elektronenmikroskopische Techniken verwendet. Zum einen die Raster-Elektronenmikroskopie, um oberflächliche Strukturen zu visualisieren, und zum anderen die Transmissionselektronenmikroskopie, um die Strukturen innerhalb der Zellen zu erkennen.

3.2.3.1 Raster-Elektronenmikroskopie

Bei der Raster- Elektronenmikroskopie emittiert eine Elektronenquelle einen Elektronenstrahl durch mehrere Linsen, welche als Sonde fungieren, auf die Probenoberfläche. Die Sonde hat dabei nur wenige Nanometer Durchmesser und rastert mit Hilfe von Ablenkspulen die Probe ab. Durch Wechselwirkungen mit der Probenoberfläche kommt es zu verschiedenen Streuprozessen und zur Emission von Sekundärelektronen. Die von der Probe emittierten Elektronen werden durch einen Detektor eingefangen und in ein Bild umgeschrieben. Durch die verschiedenen Streuprozesse und Sekundärelektronen erhält das Raster-Elektronenmikroskop eine enorme Tiefenschärfe und das Bild erscheint nahezu dreidimensional.

Um die Proben optimal betrachten zu können, müssen diese in ein Hochvakuum verbracht werden, sowie elektronisch leitend sein. Bei nicht-leitenden Proben, können diese mit Kohlenstoff, Gold oder Chrom beschichtet werden. Hierzu werden sogenannte Sputtertechniken verwendet, da diese homogene, sehr dünne Leitschichten auf die Probe aufbringen. Durch Rotieren des Probenhalters wird die dünne Schicht gleichmäßig aufgetragen.

3.2.3.2 Monozyten und Monozyten-Plättchenkomplexe in der Raster-Elektronenmikroskopie

Für die Raster-Elektronenmikroskopie von Monozyten und Monozyten-Plättchenkomplexen, war es zunächst notwendig diese als separate Populationen aus Humanblut zu isolieren. Hierzu wurden 24 ml Blut aus der vena mediana cubiti entnommen und in einem Heparinröhrchen aufgefangen. Nach einer 1:1 Verdünnung des Blutes mit PBS wurde die Suspension langsam auf 20 ml Ficoll 1077 geschichtet. Durch Zentrifugation (800 x g, 20 Min, RT) wurden die einzelnen Bestandteile ihrer Dichte nach geschichtet und die PBMC-Schicht

(milchige Schicht, 2. Von oben) konnte in ein neues Falcon überführt werden. Zum Waschen wurde die Suspension erneut 1:1 mit PBS verdünnt und zentrifugiert (10 Min, 300 x g, RT). Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurden die Zellen in 2 ml PFA (4 %) fixiert, um weitere Zellinteraktionen im Versuchsverlauf zu verhindern. Im Anschluss an die Inkubationszeit (10 Min) folgte eine Zentrifugation (500 x g, 5 Min, RT) und die Aufnahme des Pellets in 8 ml MACS-Puffer. Die Zellen wurden, wie bereits in vorherigen Versuchen erklärt, mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer gezählt und später zentrifugiert (500 x g, 5 Min, RT). Zur Isolation der Monozyten und der Monozyten-Plättchenkomplexe wurden zwei Isolationsschritte verwendet. Zunächst wurden die Monozyten als gesamte Population isoliert und das „Pan Monocyte Isolation Kit“ (Miltyeni Biotec) verwendet, welches die Isolation der Monozyten ohne deren Kopplung an Antikörper oder Beads ermöglicht. Es wurde sich strikt an die Anweisungen des Kits gehalten, die für die manuelle Isolation angegeben sind. Nach den verschiedenen Inkubationsschritten der Zellen wurde eine LS Column in einem Magneten verwendet und mit 3 ml MACS-Puffer gewaschen. Auf die Zugabe der Zellen folgten drei Waschschritte mit jeweils 2 ml MACS-Puffer. Ein Falcon unterhalb der Säule gewährleistete ein stetes Auffangen der Zellen und des MACS-Puffers. Die Zellen wurden während der gesamten Isolation auf Eis verarbeitet. Anschließend wurde die durch die Säule gelaufenen Zellen zentrifugiert (500 x g, 5 Min, 4 °C) und in 5 ml MACS-Puffer resuspendiert. Es folgte eine erneute Zählung der Zellen und deren Zentrifugation (500 x g, 5 Min, 4 °C), um mit dem zweiten Isolationsschritt fortzufahren. Das Zellpellet wurde in 1 ml CD41-FITC Antikörper (1:200) aufgenommen und für 10 Min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Zum Entfernen ungebundener Antikörper wurden 2 ml MACS-Puffer zugegeben und die Suspension zentrifugiert (5 Min, 500 x g, 4 °C). Pro 10^7 Zellen wurden 90 µl MACS-Puffer und 10 µl Anti-FITC MicroBeads (Miltyeni Biotec) auf das Pellet gegeben und für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Erneut wurden 2 ml MACS-Puffer zugegeben und die Zellsuspension zentrifugiert (10 Min, 300 x g, 4°C). Nach Resuspendierung des Pellets erfolgte die Zelltrennung in einer LS Column. Die Säule wurde in den Magneten eingeklemmt, ein Falcon darunter gestellt und mit 3 ml MACS-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden auf die Säule gegeben und erneut mit 3 x 2 ml MACS-Puffer gewaschen. Zellen, welche nicht im Magneten verbleiben, bilden eine reine Monozytenpopulation ab. Zur Isolation der Monozyten-Plättchenkomplexe wurde ein neues Falcon unter die Säule gestellt und die Säule aus dem Magneten entfernt. Mit Hilfe von 5 ml MACS-Puffer und einem Säulenstempel wurden die zuvor magnetisch gebundenen Zellen herausgepresst. Beide Zellpopulationen wurden im Anschluss für 5 Min bei 500 x g zentrifugiert und in 1 ml Medium (10 % FCS) resuspendiert. Da zu diesem Zeitpunkt nicht ausreichend bekannt war, wie ab hier weiter mit den Zellen vorgegangen werden sollte, wurden beide Populationen auf jeweils 2 Eppendorfgefäße aufgeteilt und für 4 Minuten bei

4000 x g zentrifugiert. Die Gefäße wurden, wie in Tabelle 8 dargestellt, beschriftet und verwendet.

Tabelle 8: Proben der Raster-Elektronenmikroskopie

Probe	Population	Verwendung
1	Monozyten	1. aufbringen auf Objektträger 2. dehydrieren
2	Monozyten-Plättchenkomplexe	1. aufbringen auf Objektträger 2. dehydrieren
A	Monozyten	1. Dehydrieren 2. Aufbringen auf Objektträger
B	Monozyten-Plättchenkomplexe	1. Dehydrieren 2. Aufbringen auf Objektträger

Nach der Zentrifugation wurden zunächst alle Pellets gleichermaßen mit 500 µl Osmiumtetroxid (1 %) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben erneut zentrifugiert (4 Min, 4000 x g, RT) und die Pellets mit 500 µl PBS überschichtet, ohne diese zu zerstören.

Die Proben A und B wurden nun zunächst dehydriert, während die Proben 1 und 2 zunächst auf die Objektträger aufgebracht wurden. Zur Dehydrierung wurden die Proben in einer Acetonreihe (50 % Aceton, 70 % Aceton, 90 % Aceton, 100 % Aceton) für jeweils 30 Minuten überschichtet. Im Anschluss daran folgte das Aufbringen der Proben auf Polylysin beschichtete Objektträger. Diese mussten jedoch zunächst mit Hilfe eines Glasschneiders in die passende Größe von ca. 9 mm Durchmesser verbracht werden. Zum Aufbringen auf die Objektträger wurden die Pellets in 500 µl 100 % Aceton aufgenommen, 50 µl der Suspension auf den Objektträger gegeben und diese für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert.

Von den Proben, welche zunächst auf die Objektträger aufgebracht wurden (1 & 2) wurde das PBS abgenommen und das Pellet in 500 µl Medium (10 % FCS) resuspendiert. Auf die zuvor verkleinerten Objektträger wurden jeweils 50 µl Suspension gegeben und die Objektträger für 30 Min bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Flüssigkeit abgegossen und die Objektträger in eine Acetonreihe (50 % Aceton, 70 % Aceton, 90 % Aceton, 100 % Aceton) gelegt. Wie auch bei den zuvor dehydrierten Proben wurden hier jeweils Inkubationszeiten von 30 Minuten verwendet. Frau Dr. Ann Kathrin Bergmann von der Core Facility für Elektronenmikroskopie verbrachte die Proben anschließend auf einen Probenhalter und

sputterte diese für 2 Minuten mit Chrom (Quorum Sputter Coater). Die Proben wurden mit Hilfe eines FIB-SEM Zeiss CrossBeam 550 Raster-Elektronenmikroskops betrachtet.

3.2.3.3 Transmissions-Elektronenmikroskopie

Ähnlich wie bei der Raster Elektronenmikroskopie, werden im Transmissions-Elektronenmikroskop durch eine Elektronenquelle und mehrere Linsen, Elektronenstrahlen auf die Probe fokussiert. Die Elektronenstrahlen werden hierbei jedoch auf Grund der sehr dünnen Schichtdicke durch die Probe hindurch gestrahlt und gebeugt. Durch eine Zwischenlinse werden die Elektronenstrahlen dann auf einen Detektor gelenkt, welcher ein Bild erzeugt.

Um Proben in der Transmissions-Elektronenmikroskopie abbilden zu können, dürfen sie nicht dicker als einige hundert Nanometer sein. Dies wird durch Einbringen der Proben in Epoxidharz und anschließendes Schneiden mit Ultramikrotomen ermöglicht. Zur Kontrastierung können Substanzen wie Osmiumtetroxid verwendet werden, welches in Lipiden zu einer Kohlenstoff Doppelbindung führt und diese Bereiche elektronendicht werden lässt. Daher erscheinen vor allem Membranen durch Osmiumtetroxid in der Transmissions-Elektronenmikroskopie schwarz.

3.2.3.4 Monozyten und Monozyten-Plättchenkomplexe in der Transmissions-Elektronenmikroskopie

Zur Darstellung der einzelnen Strukturen innerhalb der Zellen und der genaueren Bindungsstelle zwischen Monozyten und Plättchen wurde nach der Raster-Elektronenmikroskopie eine Transmissions-Elektronenmikroskopie durchgeführt. Hierzu wurden 30 ml Blut aus der vena mediana cubiti entnommen und in einem Heparinröhrchen aufgefangen. Nach einer 1:1 Verdünnung des Blutes mit PBS wurde die Suspension langsam auf 30 ml Ficoll 1077 geschichtet. Durch Zentrifugation (800 x g, 20 Min, RT) wurden die einzelnen Bestandteile ihrer Dichte nach geschichtet und die PBMC-Schicht (milchige Schicht, 2. Von oben) konnte in ein neues Falcon überführt werden. Zum Waschen wurde die Suspension erneut 1:1 mit PBS verdünnt und zentrifugiert (10 Min, 300 x g, RT). Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurden die Zellen in 2 ml PFA (4 %) fixiert, um weitere Zellinteraktionen im Versuchsverlauf zu verhindern. Im Anschluss an die Inkubationszeit (10 Min) folgte eine Zentrifugation (500 x g, 5 Min, RT) und die Aufnahme des Pellets in 8 ml MACS-Puffer. Die Zellen wurden, wie bereits in vorherigen Versuchen erklärt, mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer gezählt und später zentrifugiert (500 x g, 5 Min, RT). Zur Isolation der Monozyten und der Monozyten-Plättchenkomplexe wurden zwei Isolationskits verwendet. Zunächst wurden die Monozyten als gesamte Population isoliert und das „Pan Monocyte

Isolation Kit“ (Miltenyi Biotec) verwendet, welches die Isolation der Monozyten ohne deren Kopplung an Antikörper oder Beads ermöglicht. Es wurde sich strikt an die Anweisungen des Kits gehalten, die für die manuelle Isolation angegeben sind. Die genauen Schritte zur Isolation sind bereits in Methode 3.2.3.2 erklärt. Beide Zellpopulationen wurden im Anschluss für 5 Min bei 500 x g zentrifugiert und in 4 ml MACS-Puffer resuspendiert. Um eine genügende Zellzahl für die Elektronenmikroskopie vorzubereiten, wurden die Zellen erneut gezählt und je Population 1 Millionen Zellen zentrifugiert (500 x g, 5 Min, 4 °C). Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Pellet mit 500 µl Glutaraldehyd überschichtet. Im weiteren Verlauf wurden die Zellpellets von Frau Dr. Ann Kathrin Bergmann aus der Core-Facility für Elektronenmikroskopie mit Osmiumtetroxid behandelt, in Epoxidharz verbracht und mit Hilfe eines Ultramikrotom geschnitten. Die Transmissions-Elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem TEM Hitachi H-7100 durchgeführt.

3.2.4 Untersuchungen von Immunzellen und deren Plättchenmarkern in Vollblut

Zur Untersuchung der verschiedenen Immunzellen und Plättchenmarker auf diesen wurde von STEMI- sowie KHK-Patienten und gesunden Probanden beider Geschlechter Vollblut entnommen. Hierzu wurde durch eine fachkundige Person jeweils 4 ml Vollblut über die vena mediana cubiti entnommen. Das gewonnene Blut wurde in Heparinröhrchen aufgefangen. Das Heparin wurde genutzt um durch seine Bindung an, im Blut vorkommendes, Antithrombin II die Gerinnungsfaktoren Thrombin und Faktor Xa zu hemmen.

Es wurden 250 µl des Blutes in 3 ml Erythrozyten-Lysepuffer gegeben und für 10 Min bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss folgte eine Zentrifugation für 10 Min bei 500 x g und 4 °C. Die im Überstand vorhandenen, lysierten Erythrozyten wurden abgegossen und das Zellpelett wurde erneut mit 3 ml Lysepuffer resuspendiert. Nach einer weiteren Inkubation und Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Zellpelett in 1 ml MACS-Puffer aufgenommen. Es wurden je 100 µl der Suspension in 9 FACS-Tubes gegeben. Anschließend wurden alle Tubes bei 4 °C und 500 x g für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Antikörperfärbungen wurden im Verhältnis 1:200 in MACS-Puffer durchgeführt. Die jeweiligen Färbungen sind in Tabelle 9 angegeben.

Tabelle 9: Antikörperfärbung von Immunzellen aus Vollblut

Tube	Antikörper
1	Nur MACS-Puffer
2	CD11b-APC
3	CD11b-APC + CD41-FITC
4	CD11b-APC + CD42b-PE
5	CD11b-APC + CD62P-PerCp
6	CD11b-APC + CD14-PE/Cy7 + CD16-APC/Cy7
7	CD11b-APC + CD14-PE/Cy7 + CD16-APC/Cy7 + CD41-FITC
8	CD11b-APC + CD14-PE/Cy7 + CD16-APC/Cy7 + CD41-FITC + CD42b-PE
9	CD11b-APC + CD14-PE/Cy7 + CD16-APC/Cy7 + CD41-FITC + CD42b-PE + CD62P-PerCp

Im Anschluss wurden die Proben für 30 Minuten bei 4 °C im Dunkeln inkubiert, um ein Anlagern der Antikörper zu ermöglichen. Es folgte eine Zentrifugation der Proben für 5 Min bei 4 °C und 500 x g. Der Überstand wurde verworfen und die Proben zweimal mit jeweils 200 µl MACS-Puffer gewaschen. Für die Durchführung der Durchflusszytometrie wurden alle Pellets in 200 µl DAPI (1 µg/ml in MACS-Puffer) resuspendiert. Die Messung erfolgte am BD FACS Canto II für 100 Sekunden auf Geschwindigkeit medium.

3.2.5 Untersuchung der Thrombozyten und ihres Aktivierungsstatus in Vollblut

Zur Untersuchung der Thrombozyten und ihres Aktivierungsstatus wurde von STEMI- sowie KHK-Patienten und gesunden Probanden beider Geschlechter Vollblut entnommen. Hierzu wurde durch eine fachkundige Person jeweils 4 ml Vollblut über die vena mediana cubiti entnommen. Das gewonnene Blut wurde in Heparinröhrchen aufgefangen. Daraufhin wurden 500 µl des Blutes in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gegeben und für 10 Min bei 200 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entnommen und 1:10 mit PBS verdünnt. Es wurden je 100 µl der Suspension in 3 FACS-Tubes mit jeweils 100 µl PBS gegeben. Anschließend wurden alle Tubes bei RT und 1000 x g für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Antikörperfärbungen wurden im Verhältnis 1:200 in MACS-Puffer durchgeführt. Die jeweiligen Färbungen sind in Tabelle 10 angegeben.

Tabelle 10: Antikörperfärbung von Thrombozyten aus Vollblut

Tube	Antikörper
1	Nur MACS-Puffer
2	CD41-FITC
3	CD41-FITC + CD62P-PerCp

Im Anschluss wurden die Proben für 30 Minuten bei 4 °C im Dunkeln inkubiert, um ein Anlagern der Antikörper zu ermöglichen. Es folgte eine Zentrifugation der Proben für 10 Min bei RT und 1000 x g. Der Überstand wurde verworfen und die Proben zweimal mit jeweils 200 µl MACS-Puffer gewaschen. Für die Durchführung der Durchflusszytometrie wurden alle Pellets in 200 µl DAPI (1 µg/ml in MACS-Puffer) resuspendiert. Die Messung erfolgte am BD FACS Canto II für 20 Sekunden auf Geschwindigkeit high.

3.2.6 Inkubation isolierter oder aktivierter Plättchen auf J774

In diesem Versuchsteil sollte einerseits die Interaktion von Plättchen aus Blut von STEMI Patienten und gesunden Probanden mit J774 untersucht werden, um zu erkennen, ob die Zellinteraktion verschieden ist. Andererseits sollte die Interaktion von Plättchen mit J774 nach Aktivierung untersucht werden, um zu zeigen, ob die gesteigerte Aktivierung ursächlich für die verschiedenen Interaktionsintensitäten ist.

3.2.6.1 Plättcheninkubation von gesunden Probanden und STEMI Patienten auf J774

Zur Ermittlung der Plättcheninteraktion mit J774 wurde die Suspension aus der Zellkulturflasche in ein Falcon überführt und für 5 Minuten bei 350 x g zentrifugiert. Eventuell auf dem Boden anhaftende Zellen wurden nach einem Waschschrift mit PBS, mit 5 ml PBS-EDTA für 15 Min im Brutschrank (37 °C) inkubiert. Die Reaktion wurde mit 5 ml Medium (10 % FCS) gestoppt und die Suspension in ein frisches Falcon überführt. Im Anschluss an eine Zentrifugation (350 x g, 5 Min, RT) wurde das Pellet in 5 ml Medium (10 % FCS) resuspendiert und zu dem ebenfalls in 5 ml Medium resuspendierten Pellet der Ursprungssuspension gegeben. Die Zellzahl pro ml wurde, wie schon in Versuch 3.2.2.2 mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer ermittelt. Anschließend wurden jeweils 5 Eppendorfgefäße (2 ml) mit 1×10^6 Zellen gefüllt und die Suspension mit Medium auf 1 ml aufgefüllt. Zur Erholung der Zellen wurden diese zunächst für 30 Minuten in den Brutschrank gegeben, bevor das plättchenreiche Plasma zugegeben wurde. Das plättchenreiche Plasma wurde wie in Versuch 3.2.1.1 aus Blut von gesunden Probanden und STEMI Patienten gewonnen. Als Kontrolle

wurde in eines der J774 Gefäße kein Plasma gegeben, in die anderen wurden jeweils 50 µl bzw. 500 µl des Plasmas aus STEMI bzw. gesunden Blutproben gegeben. Um eine mögliche Interaktion zu gewährleisten, wurden die Eppendorfg Gefäße mit den Zellen für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden alle Proben auf jeweils 2 FACS-Tubes aufgeteilt, zentrifugiert (500 x g, 4 °C, 5 Min) und der Überstand verworfen. Je ein Tube pro Probe diente als Antikörperkontrolle und wurde lediglich mit 200 µl MACS-Puffer versetzt, während in die übrigen Tubes 200 µl der verdünnten CD41-FITC Antikörper (1:200) gegeben wurden. Die Färbung erfolgte im Dunkeln und auf Eis für 30 Minuten. Darauf folgte eine Zentrifugation aller Proben bei 500 x g für 5 Min (4 °C) und zweimaliges Waschen der Pellets mit 200 µl MACS-Puffer. Für die durchflusszytometrische Messung am BD FACS Canto II wurden alle Proben mit jeweils 200 µl DAPI (1 µg/ml) resuspendiert.

3.2.6.2 Inkubation aktivierter Plättchen auf J774

Da nicht klar war, woher eine gesteigerte Interaktion der Plättchen mit den J774 rühren könnte, wurden die Plättchen mit Hilfe von ADP aktiviert und auf den Zellen inkubiert. Die J774 Zellen wurden daher zunächst wie in 3.2.6.1 vorbereitet und nach dem Zählen wurden in je 5 Eppendorfg Gefäße 1×10^6 Zellen gegeben. Alle Suspensionen wurden mit Medium auf 1 ml aufgefüllt und für 30 Minuten in den Brutschrank gegeben. Währenddessen wurden die Plättchen wie in 3.2.1.2 isoliert und in 1 ml HBSS-Puffer aufgenommen. Um nur einen Teil der Plättchen zu aktivieren, wurden die Plättchen auf 2 Eppendorfg Gefäße aufgeteilt. Beide Plättchenproben wurden zentrifugiert (2000 x g 10 Min, RT), wobei eines der Pellets mit 500 µl HBSS-Puffer resuspendiert wurde, während das andere mit 1 µM ADP (in HBSS) resuspendiert wurde. Durch das ADP und das Calcium des HBSS wurden die Plättchen aktiviert. Die Aktivierung erfolgte für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurden alle Plättchensuspensionen mit 500 µl MACS-Puffer versetzt und bei 2000 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Die Plättchen wurden daraufhin in 1 ml Medium aufgenommen und auf die J774 gegeben. Dabei wurde in ein J774 Gefäß lediglich 50 µl Medium gegeben und in die übrigen jeweils 50 µl Plättchen (aktiviert bzw. nicht-aktiviert), oder 500 µl Plättchen (aktiviert bzw. nicht-aktiviert). Die J774-Plättchen-Suspensionen wurden für 30 Minuten im Brutschrank bei 37 °C inkubiert, um eine eventuelle Interaktion zu ermöglichen. Jeweils 500 µl der Suspensionen wurden in ein FACS-Tube überführt und zentrifugiert (500 x g, 5 Min, RT). Es folgte die Antikörperfärbung aller Tubes mit 200 µl CD41-FITC (1:200) für 30 Minuten, bei 4 °C im Dunkeln. Die Proben wurden zentrifugiert (500 x g, 5 Min, RT) und die Pellets zweimal mit 200 µl MACS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden alle Proben mit 200 µl DAPI (1 µg/ml) resuspendiert und im BD FACS Canto II durchflusszytometrisch analysiert.

3.2.7 Zelloberflächenexpression von PSGL-1 und Tissue Factor auf Leukozyten und Leukozyten-Plättchenkomplexen

Neben einer eventuellen Aktivierung der Thrombozyten auf Grund verschiedener Entzündungsvorgänge im Körper, ist es auch denkbar, dass die Oberflächenexpression von PSGL-1 (CD162) oder vom Tissue Factor (CD142) auf Monozyten für die gesteigerte Interaktion zwischen Monozyten und Plättchen verantwortlich ist. PSGL-1 ist eine der möglichen Bindungsstellen für Plättchen an Monozyten. Der Tissue Factor hingegen beeinflusst Signalprozesse, wodurch es zur Blutgerinnung kommt. Es wurden daher zu beiden Oberflächenmarkern durchflusszytometrische Analysen durchgeführt.

Nach einer Abnahme von 2,5 ml Humanblut aus der vena mediana cubiti von STEMI-Patienten und gesunden Probanden, wurde das Blut 1:1 in PBS verdünnt. Durch Schichtung der Blutsuspension auf 5 ml Ficoll 1077 und anschließende Zentrifugation (800 x g, 20 Min, RT, ohne Beschleunigung/Bremse) konnten die PBMCs aus der Probe entnommen und in ein neues Falcon überführt werden. Die PBMCs wurden 1:1 mit PBS verdünnt und erneut zentrifugiert (300 x g, 10 Min, RT). Nach Verwurf des Überstandes wurde das Pellet in 2,4 ml MACS-Puffer resuspendiert und je 200 µl in 6 FACS-Tubes gegeben. Alle FACS-Tubes wurden zentrifugiert (500 x g, 5 Min) und einer Antikörperfärbung (200 µl; 1:200) unterzogen. Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 11 nachzulesen.

Tabelle 11: Antikörperfärbung von Tissue Factor und PSGL-1

Tube	Antikörper
1	Nur MACS-Puffer
2	CD11b-APC
3	CD11b-APC + CD14-PE/Cy7 + CD16-APC/Cy7
4	CD11b-APC + CD14-PE/Cy7 + CD16-APC/Cy7 + CD41-FITC
5	CD11b-APC + CD14-PE/Cy7 + CD16-APC/Cy7 + CD41-FITC + CD142-PE
6	CD11b-APC + CD14-PE/Cy7 + CD16-APC/Cy7 + CD41-FITC + CD162-PE

Die Antikörperfärbung wurde für 30 Minuten bei 4 °C im Dunkeln durchgeführt. Alle FACS-Tubes wurden anschließend für 5 Minuten bei 500 x g zentrifugiert und die Pellets mit 200 µl MACS-Puffer gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation wurden die Pellets in 200 µl DAPI (1 µg/ml) resuspendiert und am BD FACS Canto II durchflusszytometrisch gemessen.

3.2.8 Chemotaxis von Monozyten und Monozyten-Plättchenkomplexen

Durch Untersuchungen zur Chemotaxis von Monozyten und Monozyten-Plättchenkomplexen sollten die Auswirkungen der Komplexbildung auf die Zellfunktion untersucht werden. Außerdem sollte festgestellt werden, ob diese Zellen nach einem STEMI eine veränderte Funktion aufweisen. Zu diesem Zweck wurde gesunden Probanden und STEMI-Patienten 4 ml Blut entnommen und in einem Heparinröhrchen aufgefangen. Nach einer 1:1 Verdünnung mit PBS wurde die Suspension vorsichtig auf 8 ml Ficoll 1077 geschichtet. Durch Zentrifugation (800 x g, 20 Min, RT, ohne Beschleunigung/Bremse) wurden die verschiedenen Zellen voneinander separiert und die PBMC-Schicht (2. Schicht von oben, milchig) konnte in ein frisches Falcon überführt werden. Die Suspension wurde erneut 1:1 mit PBS verdünnt und zentrifugiert (300 x g, 10 Min, RT), um überschüssiges Ficoll zu entfernen. Im Anschluss wurde das Pellet in 2,5 ml MACS-Puffer resuspendiert und die Zellen mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer gezählt. Nach dem Zählen wurde eine 24-Well Platte mit Medium (10 % FCS) und MCP-1, sowie Thincert Zellkultur Migrationskammern (3 µm) vorbereitet. Die genaue Zusammensetzung der einzelnen Wells ist in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12: Chemotaxis von Monozyten und Monozyten-Plättchenkomplexen

Well	Zusammensetzung
1	- 1 ml Medium (10 % FCS) - 10 ng/ml MCP-1 - Migrationskammer
2	- 1 ml Medium (10 % FCS) - Migrationskammer
3	- 1 ml Medium (10 % FCS) - 10 ng/ml MCP-1
4	- 1 ml Medium (10 % FCS)

In jedes der 4 Wells wurden anschließend 100.000 PBMCs gegeben. Diese wurden, wenn vorhanden, in die Migrationskammer pipettiert. Zusätzlich zu den PBMCs wurden die Migrationskammern mit Medium (10 % FCS) auf 300 µl aufgefüllt. Es folgte eine Inkubation der Migrationsplatte für 3 Stunden bei 37 °C. Währenddessen wurden Kontrollanalysen mit den noch vorhandenen Zellen durchgeführt. Hierzu wurde von der PBMC-Suspension 200 µl in je 5 FACS-Tubes gegeben und für 5 Minuten bei 500 x g zentrifugiert. Die Pellets wurden nun mit 200 µl Antikörpern (1:200; siehe Tabelle 13) für 30 Minuten bei 4 °C im Dunkeln gefärbt.

Tabelle 13: Antikörperfärbung der Chemotaxis-Proben

Tube	Antikörper
1	Nur MACS-Puffer
2	CD11b-APC
3	CD11b-APC + CD14-PE/Cy7 + CD16-APC/Cy7
4	CD11b-APC + CD14-PE/Cy7 + CD16-APC/Cy7 + CD41-FITC
5	CD11b-APC + CD14-PE/Cy7 + CD16-APC/Cy7 + CD41-FITC + CD62P-PerCp

Nach Ablauf der Inkubation erfolgte eine Zentrifugation (500 x g, 5 Min, 4 °C) und ein Waschschrift der Pellets mit jeweils 200 µl MACS-Puffer. Die Pellets wurden erneut zentrifugiert (500 x g, 5 Min, 4 °C) und in 200 µl DAPI (1 µg/ml) aufgenommen. Die durchflusszytometrische Messung erfolgte im BD FACS Canto II.

Nachdem auch die 3 Stunden Inkubationszeit der Migrationsplatte vorüber war, wurden die Suspensionen zunächst unterhalb der Migrationskammern entnommen und in ein FACS-Tube gegeben und im Anschluss die Suspensionen innerhalb der Migrationskammern. Alle FACS-Tubes wurden zentrifugiert (500 x g, 5 Min, 4 °C) und die Pellets in 200 µl Antikörper aufgenommen (1:200; CD11b-APC + CD14-PE/Cy7 + CD16-APC/Cy7 + CD41-FITC + CD62P-PerCp). Die Färbung erfolgte für 30 Minuten bei 4 °C im Dunkeln. Durch Zentrifugation (500 x g, 5 Min, 4 °C) und Resuspendierung mit 200 µl MACS-Puffer wurden ungebundene Antikörper entfernt. Die Pellets wurden erneut zentrifugiert (500 x g, 5 Min, 4 °C) und in 200 µl DAPI (1 µg/ml) aufgenommen. Die durchflusszytometrische Messung erfolgte im BD FACS Canto II.

3.2.9 Zelloberflächenexpression von MHC-I und MHC-II auf Leukozyten und Leukozyten-Plättchenkomplexen

Um Hinweise zu erhalten, inwieweit die Leukozyten-Plättchenkomplexe eine veränderte Immunaktivität zeigen, wurde die Oberflächenexpression von MHC-I und MHC-II auf den Leukozyten ermittelt. Sowohl MHC-I als auch MHC-II werden für die Antigenrepräsentation benötigt. T-Zellen erkennen diese Komplexe und beginnen mit der entsprechenden Immunantwort. Eine gesteigerte Expression auf der Oberfläche lässt daher auf eine gesteigerte Immunantwort schließen. Zur Untersuchung der Expression wurden 2,5 ml von STEMI Patienten und gesunden Probanden entnommen und 1:1 in PBS verdünnt. Es folgte eine Schichtung der Blutsuspension auf 5 ml Ficoll 1077, sowie eine Zentrifugation (800 x g, 20 Min, RT, ohne Beschleunigung/Bremse) um die PBMCs aus der Probe entnehmen zu

können. Die PBMCs wurden 1:1 mit PBS verdünnt und erneut zentrifugiert (300 x g, 10 Min, RT). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 2,4 ml MACS-Puffer resuspendiert. Von dieser Suspension wurden je 200 µl in 6 FACS-Tubes gegeben. Alle FACS-Tubes wurden zentrifugiert (500 x g, 5 Min) und einer Antikörperfärbung (200 µl; 1:200) unterzogen. Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 14 nachzulesen.

Tabelle 14: Antikörperfärbung von MHC-I und MHC-II

Tube	Antikörper
1	Nur MACS-Puffer
2	CD11b-APC
3	CD11b-APC + CD14-PE/Cy7 + CD16-APC/Cy7
4	CD11b-APC + CD14-PE/Cy7 + CD16-APC/Cy7 + CD41-PE
5	CD11b-APC + CD14-PE/Cy7 + CD16-APC/Cy7 + CD41-PE + W6/32-FITC (MHC-I)
6	CD11b-APC + CD14-PE/Cy7 + CD16-APC/Cy7 + CD41-PE + L243-FITC (MHC-II)

Nachdem die Antikörperfärbung für 30 Minuten bei 4 °C im Dunkeln durchgeführt wurde, wurden alle FACS-Tubes für 5 Minuten bei 500 x g zentrifugiert und die Pellets mit 200 µl MACS-Puffer gewaschen. Es folgte eine erneute Zentrifugation und Resuspendierung der Pellets in 200 µl DAPI (1 µg/ml). Die Proben wurden am BD FACS Canto II durchflusszytometrisch gemessen.

3.3 Tierversuche in der Maus zum diabetischen Mausmodell

Für diese Arbeit wurden ausschließlich 8 Wochen alte, männliche C57BL/6-Mäuse genutzt. Ihr Körpergewicht lag zu Beginn der Versuchsreihen bei 20 – 30 Gramm. Sie wurden von der zentralen Tieranlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf bei Janvier bezogen und entweder in der zentralen Tieranlage oder im Institut für Pharmakologie in einem dafür vorgesehenen Klimaschrank mit 12-Stunden-Hell-Dunkel-Zyklus gehalten. In diesem Versuchsteil sollte der Einfluss von Diabetes auf den Verlauf eines Herzinfarktes untersucht werden. Aus diesem Grund wurden die Mäuse auf zwei verschiedene Arten gefüttert. Alle Tiere erhielten Leitungswasser *ad libitum*. Eine der Gruppen erhielt eine Hoch-Fett-Nahrung (DD), welche ein diabetisches Mausmodell erzeugen soll. Die andere Gruppe erhielt ein Futter, welches eine identische Zusammensetzung enthielt, jedoch deutlich weniger Fett beinhaltete (Kon-DD). Alle Tiere erhielten Leitungswasser *ad libitum*. Die beiden Futtergruppen wurden

bei allen Versuchen genutzt, um einen Vergleich ziehen zu können. Die Mäuse waren bei Start der Fütterung jeweils 8 Wochen alt und wurden für 9 Wochen ausschließlich mit dem jeweiligen Futter versorgt. Nach den 9 Wochen wurde ein Infarkt induziert und die Fütterung fortgesetzt. Der entsprechende Tierversuchsantrag ist unter dem Aktenzeichen 84-02.04.2015.A489 gelistet.

3.3.1 Induktion einer Ischämie/Reperfusion bei der Maus

Zur Überprüfung des Einflusses des diabetischen Mausmodells auf die Infarktgröße und die Immunzellantwort nach Infarkt, wurde bei allen Tieren nach 9 Wochen der Fütterung ein Infarkt induziert. Es wurde hierzu stets das Ischämie/Reperusionsmodell von einem Mitarbeiter des Instituts für Molekulare Kardiologie durchgeführt.

Die Mäuse wurden zunächst mit 1.5 Vol% Isofluran anästhesiert (Einleiten der Narkose bis Intubation ebenfalls mit Isofluran). Die anschließende Aufrechterhaltung der Narkose wurde mit einer Atemmaske und 2 Vol% Isofluran sichergestellt. Um ein Auskühlen zu verhindern, wurden die Mäuse während des gesamten Eingriffs auf einer Wärmeplatte gelagert und die Körpertemperatur über ein Rektalthermometer kontrolliert. Zum Schutz der Augen wurde zudem Augensalbe appliziert. Anschließend wurde der Thoraxbereich der Mäuse rasiert, gesäubert und desinfiziert. Die Thoraxmuskulatur wurde stumpf präpariert und mittels Haltefaden armiert. Die Zwischenrippenmuskulatur wurde unter Schonung der A. thoracica interna stumpf auf präpariert und der Zwischenrippenraum gespreizt. Hiernach wurde das Perikard stumpf eröffnet und mittels 7/0 Prolene-Fadens die linke Koronararterie (left anterior descending coronary artery, LAD) für 50 Minuten ligiert. Nach 50 min wurde die Okklusion gelöst und der Thorax mittels zweischichtigen Wundverschluss wieder verschlossen. Zur Analgesie wurde 30 Minuten vor Induktion des Herzinfarkts gewichtsadaptiert Buprenorphin (0.1 mg/kg) s.c. zur Schmerzbekämpfung verabreicht. Die analgetische Prozedur mit gewichtsadaptiertem Buprenorphin 0.1 mg/kg subkutan wurde bis zum 3. Tag nach Herzinfarkt wiederholt. Die Verabreichung des Analgetikums erfolgt über die ersten drei Tage 3-mal täglich und nachts über das Trinkwasser.

3.3.2 Immunzellmessungen mit Vollblut der Maus

Der Einfluss der diabetischen Diät auf die Immunzellen im Blut der Mäuse war unbekannt. Es wurden daher regelmäßige Blutentnahmen durchgeführt und die verschiedenen Immunzellen Durchflusszytometrisch analysiert.

Für die Blutentnahmen wurde die Maus zunächst in eine Zwangsröhre verbracht und die Schwanzspitze angeritzt. Das Blut wurde vorsichtig aus dem Schwanz heraus massiert, bis einige Tropfen mit Hilfe einer EDTA-Microvette aufgefangen wurden. Die Microvette wurde anschließend in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gestellt und das Blut mit einer Einmalpipette herausgepresst. Es wurden 20 µl des Blutes in ein frisches Gefäß überführt und 100 µl Fc-Block (1:10) zugegeben. Die Inkubation des Fc-Blocks erfolgte für 10 Minuten bei 4 °C und wurde mit einer Zentrifugation (500 x g, 5 Min, 4 °C) beendet. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 600 µl MACS-Puffer resuspendiert. Nun wurden 200 µl der Suspension in je 3 FACS-Tubes gegeben und erneut zentrifugiert (500 x g, 5 Min, 4 °C). Es folgte die Antikörperfärbung der Proben für 30 Minuten bei 4 °C im Dunkeln. Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 15 angegeben und ihre Verdünnungen in Tabelle 16.

Tabelle 15: Antikörperfärbung von Immunzellen der Maus

Tube	Antikörper
1	CD45-APC + CD11b-PE/Cy7 + Ly6G-PerCP + Ly6C-APC/Fire + CD41-PE
2	CD45-APC + CD11b-PE/Cy7 + Ly6G-PerCP + Ly6C-APC/Fire + CD42d-PE
3	CD45-APC + CD11b-PE/Cy7 + Ly6G-PerCP + Ly6C-APC/Fire + CD62P-PE

Tabelle 16: Konzentrationen der eingesetzten Antikörper bei Maus-Immunzellen

Antikörper	Eingesetzte Konzentration
CD45-APC	1:200
CD11b-PE/Cy7	1:200
Ly6G-PerCP	1:100
Ly6C-APC/Fire	1:200
CD41-PE	1:200
CD42d-PE	1:200
CD62P-PE	1:200

Nach der Färbung wurden die Proben erneut zentrifugiert (500 x g, 5 Min, 4 °C) und zweimal mit 200 µl MACS-Puffer gewaschen. Für die durchflusszytometrische Messung am BD FACS Canto II wurden die Pellets in 1800 µl DAPI (1 µg/ml) resuspendiert. Zur Bestimmung der Zellzahlen wurden die Proben für 90 Sekunden bei Geschwindigkeit „low“ gemessen.

3.3.3 Gewichtsanalysen

Durch die Hoch-Fett-Nahrung sollten die Mäuse dieser Gruppe deutlich mehr Gewicht zulegen als die Mäuse der Kontrollgruppe. Das Gewicht wurde daher und zur Kontrolle des Wohlergehens regelmäßig kontrolliert. Die Mäuse wurden dazu in eine Schale gesetzt, welche auf einer Waage tariert wurde, und das Gewicht notiert.

3.3.4 Glukosetoleranztests

Um den diabetischen Status der Mäuse zu ermitteln, wurden regelmäßige Glukosetoleranztests durchgeführt. Zunächst wurden die Mäuse gewogen und das durchschnittliche Gewicht der Kontrollgruppe ermittelt. Anschließend wurde den Mäusen für 6 Stunden das Futter entzogen und darauf geachtet, dass keines in der Einstreu zurückblieb. Die Maus wurde in eine Zwangsröhre verbracht und mit Hilfe einer Schere der Schwanz angeritzt. Der entstehende Blutstropfen wurde mit einem Teststreifen und dem zugehörigen Aviva Accu Chek aufgefangen und der Nüchtern-Blutzuckerwert bestimmt. Nun wurden jeweils 1 mg Glukose (40 %ige Stammlösung) pro Gramm des durchschnittlichen Gewichts intraperitoneal injiziert. Nach 5, 15, 30, 60 und 120 Minuten wurde erneut der Blutzuckerwert bestimmt. Sobald alle Messungen abgeschlossen waren, wurde das Futter wieder den Mäusen zur Verfügung gestellt.

3.3.5 Immunzellmessungen mit Mäuseherzen

Immunzellen können einen großen Einfluss auf die Infarktgröße nehmen. Daher wurde in diesem Versuchsteil die verschiedenen Immunzellen des Herzens analysiert. Hierbei wurden Herzen aus unserem diabetischen Mausmodell, sowie Herzen aus Kontrollmäusen miteinander verglichen.

Die Mäuse erhielten zunächst eine Injektion von 250 IE Heparin i.p. etwa 10 Minuten bevor sie mit Hilfe einer CO₂-Kammer getötet wurden. Anschließend wurde das Blut der Maus aus dem Vorhof entnommen und die Femoralarterien durchtrennt. Zum Entfernen von noch vorhandenem Blut wurde das Herz für 2 Minuten mit PBS gespült. Hierbei wurden sowohl der linke als auch der rechte Ventrikel genutzt. Nachfolgend wurde das Herz vorsichtig aus dem Brustkorb entnommen und in PBS gelegt. Noch anhaftendes Gewebe (Lunge bzw. Fett) wurden entfernt. Das Herz wurde in eine neue Schale mit einem Tropfen PBS auf Eis überführt und mit einem Skalpell in etwa 1 mm große Stücke zerkleinert. Die Herzstücke wurden anschließend in ein 2 ml Eppendorfgefäß mit 1 ml Verdauungslösung gegeben und gewogen. Um die Herzen zu verdauen, wurden diese für 20 Minuten bei 37 °C in einem Rotor inkubiert und dabei alle 10 Minuten auf und ab pipettiert. Nach Ende des Verdaus wurde die Suspension

erneut pipettiert, um die Zellen zu dissoziieren und auf Eis gegeben. Alle folgenden Schritte wurden jeweils auf Eis durchgeführt. Zur weiteren Dissoziation der Zellen wurden diese durch einen 100 µm Filter gepresst, mit 15 ml PBS aufgefüllt und durch einen 40 µm Filter gegeben. Es folgte eine Zentrifugation (800 x g, 10 Min, 4 °C) und das Pellet wurde in 1 ml Lysepuffer resuspendiert. Für die Lyse wurde die Suspension für 7 Min inkubiert (4 °C) und im Anschluss mit PBS auf 10 ml aufgefüllt. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde das Pellet in 200 µl PBS resuspendiert und für die Antikörperfärbung weiterverwendet. Zusätzlich wurden die Zellen einer Zellzählung mit Flow Count Beads unterzogen.

Für die Antikörperfärbung wurden 50 µl der Zellen in 2 FACS Tubes gegeben, während für die Zellzählung lediglich 10 µl in ein Tube gegeben wurden. Die übrigen Zellsuspensionen aller Herzen wurden zusammengeführt und zur Färbungskontrolle jeweils 50 µl in 4 FACS Tubes gegeben. In die Färbungs-Tubes wurden nun jeweils 2 µl Fc-Block gegeben und für 10 Min im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss daran wurden 2 µl des Live/Dead Farbstoffs hinzugegeben und für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Zum Beenden der Reaktionen wurde 1 ml PBS zugegeben und für 5 Minuten bei 800 x g zentrifugiert. Die Pellets wurden in 50 µl Antikörpersuspension, welche in Tabelle 17 angegeben sind, resuspendiert und für 15 Minuten inkubiert. Die zu den Antikörpern gehörigen eingesetzten Konzentrationen sind in Tabelle 18 angegeben.

Tabelle 17: Antikörperfärbung von Immunzellen der Mäuseherzen

Tube	Antikörper
Mausspezifisch 1	CD45-AF488 + CD11b-BV711 + Ly6G-APC-Fire + CD64-APC + MHCII-PEDazzle + CCR2-BV421 + Ly6C-AF700 + MertK-PE
Mausspezifisch 2	CD45-AF488 + CD11b-BV711 + Ly6G-APC-Fire + CD64-APC + MHCII-PEDazzle + CCR2-BV421 + Ly6C-AF700 + MertK-PE
Gepoolt 1	CD45-AF488 + CD11b-BV711 + Ly6G-APC-Fire + CD64-APC + MHCII-PEDazzle + Ly6C-AF700 + MertK-PE
Gepoolt 2	CD45-AF488 + CD11b-BV711 + Ly6G-APC-Fire + CD64-APC + MHCII-PEDazzle + CCR2-BV421 + Ly6C-AF700
Gepoolt 3	CD45-AF488 + CD11b-BV711 + Ly6G-APC-Fire + MHCII-PEDazzle + CCR2-BV421 + Ly6C-AF700 + MertK-PE
Gepoolt 4	CD45-AF488 + CD11b-BV711 + Ly6G-APC-Fire + CD64-APC + CCR2-BV421 + Ly6C-AF700 + MertK-PE

Tabelle 18: Konzentrationen der eingesetzten Antikörper bei Maus-Immunzellen des Herzens

Antikörper	Eingesetzte Konzentration
CD45-AF488	1:200
CD11b-BV711	1:50
Ly6G-APC-Fire	1:80
CD64-APC	1:20
MHCII-PEDazzle	1:160
CCR2-BV421	1:80
Ly6C-AF700	1:200
MertK-PE	1:80

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden alle Proben mit jeweils 1 ml PBS verdünnt und zentrifugiert (800 x g, 5 Min, 4 °C). Die Pellets wurden in 250 µl MACS-Puffer resuspendiert und am BD Fortessa durchflusszytometrisch gemessen.

Die FACS Tubes der Flow Count Zählung wurden mit jeweils 200 µl MACS-Puffer verdünnt und anschließend 10 µl Flow Count Beads zugegeben. Von diesen Beads wurde durch Angehörige des Instituts für Pharmakologie zuvor die Konzentration bestimmt, welche in diesem Versuch 1004 Beads/µl bzw. 989 Beads/µl betrug. Nach Zugabe der Beads konnten auch diese Proben durchflusszytometrisch am BD Fortessa analysiert werden.

3.3.6 Messungen im Magnetresonanztomographen

3.3.6.1 Herzfunktionsmessungen

Die Kontrolle der Herzfunktion der verschiedenen Mausgruppen erfolgte mit Hilfe von in vivo ¹H MRT-Messungen. Die Messungen erfolgten jeweils vor der Fütterungsanpassung, sowie 3, 6 und 9 Wochen danach, einen Tag und 3 Tage nach Infarkt, sowie 21 Tage nach Infarkt. Die Maus wurde hierzu mittels 1,5 % Isofluran in wassergesättigter Luft narkotisiert und in den Probenkopf überführt. Die Ableitung des EKGs wurde über die Vorder- und Hinterpfoten mit einem „Small Animal Monitoring+Gating System“ erfasst. Gleichzeitig wurde hierüber mittels eines Drucksensors die Respiration der Maus überwacht. Der Probenkopf wurde anschließend mitsamt der Maus in den Magneten verbracht, welcher eine Temperierung auf 38 °C ermöglichte. Nach Aufnahme von orientierenden Scans wurden hochaufgelöste FISP-Scans zur kardialen Funktionsdiagnostik angefertigt.

3.3.6.2 Bestimmung des ischämischen Areals

Um einen Eindruck der Infarktauswirkungen direkt nach Infarkt zu erhalten, wurde zusätzlich zu den Untersuchungen der Herzfunktion an Tag 1 nach Infarkt die Untersuchung des ischämischen Areals mittels „Late Gadolinium Enhancement“ (LGE) vorgenommen. Hierzu wurden zunächst 200 µl Gadobensäure (133,6 mg/ml) i.p. injiziert. Anschließend erfolgte die Verbringung der Maus in den Probenkopf wie in 3.3.6.1 angegeben. Auch die MRT-Messungen erfolgten wie in 3.3.6.1.

3.3.7 Ernte der verschiedenen Organe

Die Ernte der Mäuse erfolgte nach 4 oder 22 Tagen nach Infarkt. Mäuse, welche nach 4 Tagen getötet wurden, wurden für Immunzellmessungen der Mäuseherzen verwendet, während jene nach 22 Tagen für histologische Untersuchungen verwendet wurden. Die in diesem Versuchsteil beschriebene Ernte wurde lediglich bei den histologischen Mäusen durchgeführt. Die Ernte der Mäuseherzen für Immunzellmessungen ist in Kapitel 3.3.5 beschrieben.

Zunächst wurde den Mäusen für 6 Stunden das Futter entzogen und darauf geachtet, dass keine Futterreste im Einstreu zurückbleiben. Die Mäuse erhielten nun eine Injektion von 250 IE Heparin i.p. etwa 10 Minuten bevor sie mit Hilfe einer CO₂-Kammer getötet wurden. Die Mäuse wurden gewogen und ihre Länge bestimmt. Nach Eröffnen des Brustkorbs, wurde das Blut aus dem rechten Vorhof entnommen. Hierzu wurde eine 1 ml Spritze verwendet, welche 50 µl 100 mM EDTA enthielt. Das Blut wurde sofort in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und auf Eis gegeben. Das EDTA verhinderte während der weiteren Mausernte die Blutgerinnung. Anschließend wurde das Herz entnommen, gewogen und in ein Falcon mit PBS gegeben. Mit Hilfe einer Spritze und 2 ml PBS wurde überschüssiges Blut aus dem Herzen gespült, bevor dieses in ein Eppendorfgefäß mit 700 µl PFA (4 %) überführt wurde.

Auf die Herzentnahme folgte die Entnahme des braunen Fettgewebes aus dem Nacken der Maus. Nachdem dieses frei präpariert wurde, wurde es gewogen und in drei Teile aufgeteilt. Ein Teil wurde zu Proteingewinnung genutzt, ein Teil zur RNA-Analyse, der dritte Teil zu histologischen Analysen.

Im Anschluss wurde die Leber entnommen und gewogen. Ihr linker großer Lappen wurde, ebenso wie das braune Fettgewebe, in 3 Teile geteilt und für Proteinbestimmung, RNA-Gewinnung und histologische Analysen verwendet.

Das epididymale Fett, welches sich direkt unterhalb der Bauchdecke nahe der Hoden befindet, wurde von einem der Hoden getrennt und entnommen. Nach kurzem Wiegen wurde auch dieses in 3 Teile geteilt und für die vorgenannten Analysen verwendet.

Da auch in den MRT-Untersuchungen teilweise die Beinmuskeln betrachtet wurden, wurden diese für histologische Zwecke entnommen. Es wurden sowohl der Gastrocnemius als auch der Soleus frei präpariert, gewogen und in ein Eppendorfgefäß mit 700 µl PFA (4 %) verbracht.

Die Tibia beider Hinterläufe wurde vollständig von Restgewebe befreit, ihre Länge gemessen und je eine Seite in eine Histosette mit PBS und eine in ein Eppendorfgefäß für die RNA-Isolation verbracht.

Die RNA und Proteinproben wurden bei -80 °C eingefroren und von der Arbeitsgruppe für Pharmakologie verwendet. Ebenso wurden die histologischen Proben von Leber, Muskeln, Fettgewebe und Tibia von dieser Arbeitsgruppe weiterverwendet und analysiert. Auch das Blut wurde durch diese Arbeitsgruppe genutzt. Die Herzen wurden für diese Arbeit histologisch aufbereitet und die Narbengröße ermittelt. Die Immunzellmessungen an Tag 4 nach Infarkt sind in 3.3.5 näher beschrieben.

3.3.8 histologische Aufbereitung der Mäuseherzen

Die histologische Aufbereitung der Mäuseherzen erfolgte zum Zweck der Ermittlung der Narbengröße. Nachdem die Herzen wie in 3.3.7 isoliert wurden, wurden diese für 24 Stunden in 4 % PFA inkubiert. Im Anschluss wurden die Herzen in Histosetten überführt, welche bis zur Entwässerung bei 4 °C in PBS gelagert wurden. Die Entwässerung der Herzen ist auf Grund der fehlenden Wasserlöslichkeit von Paraffin notwendig. Die Entwässerung wurde mit einer aufsteigenden Alkoholreihe ermöglicht.

Im Anschluss an die Entwässerung wurden die Herzen in ca. 60 °C warmem Paraffin gelagert. Die finale Einbettung erfolgte mit Hilfe passender Gussformen an einer Paraffin Ausgießstation. Die Herzen wurden jeweils so eingebettet, dass vom Apex aufwärts geschnitten werden konnte. Die ausgehärteten Paraffinblöcke wurden zunächst etwas zurechtgeschnitten, sodass die Schnittfläche nicht zu groß wurde. Anschließend wurde der Block im Mikrotom eingespannt und mit dem Mikrotom 5 µm dicke Schnitte angefertigt, bis der Apex auf den ersten Schnitten zu erkennen war. Die ersten 4 Schnitte des Apex wurden in ein 37 °C warmes Wasserbad gegeben und auf SuperFrost Objektträger aufgezogen. Nun wurden die nächsten 330 µm verworfen und die folgenden 20 µm wurden erneut auf Objektträger aufgezogen. In diesem Schema wurde weiter verfahren, bis Schnitte von insgesamt

10 Ebenen aufgezogen waren. Die Objektträger wurden allesamt in einen Glasständer überführt und für 24 Stunden bei 60 °C inkubiert. Bei diesem Schritt wurde überschüssiges Paraffin von den Objektträgern entfernt und die Färbung vereinfacht.

Die Färbung mit Gomoris erfolgte in einer Färbeapparatur unter dem Laborabzug. Nach Einhängen der Objektträger in die vorgesehenen Halter, wurden die Objektträger für 2 x 15 Minuten mit Roticlear entparaffiniert. Es folgte eine absteigende Alkoholreihe für jeweils 5 Minuten. Die verwendeten Lösungen sind in Tabelle 19 ersichtlich.

Tabelle 19: Absteigende Alkoholreihe für die histologische Aufbereitung

Nummer	Verwendete Lösung
1	100 % Ethanol
2	100 % Ethanol
3	96 % Ethanol
4	70 % Ethanol
5	Dest. H ₂ O

Um eine besonders kontrastreiche Färbung zu ermöglichen, wurden die Herzschnitte für 15 Minuten bei 58 °C in Bouinscher-Lösung fixiert. Die Lösung wurde kurz mit Leitungswasser abgespült und anschließend mit fließendem Leitungswasser für 5 Minuten jegliche Restlösung entfernt. Die eigentliche Färbung wurde für 5 Minuten mit „Weigerts Eisenhämatoxylin“ gestartet. Die Färbelösung wurde erneut für 5 Minuten unter fließendem Leitungswasser abgespült. Die Gomorisfärbung wurde mit einer zuvor angesetzten Gomoris Lösung für 25 Minuten durchgeführt. Die Gomorislösung wurde kurz mit Wasser abgespült, und anschließend durch Inkubation der Herzschnitte in 0,5 % Essigsäure für 2 x 2 Minuten vollständig abgewaschen. Anschließend folgte eine aufsteigende Alkoholreihe, deren Dauer und Konzentrationen in Tabelle 20 angegeben sind.

Tabelle 20: Aufsteigende Alkoholreihe für die histologische Aufbereitung

Inkubationszeit	Verwendete Lösung
2 Minuten	70 % Ethanol
2 Minuten	96 % Ethanol
2 Minuten	100 % Ethanol
2 Minuten	100 % Ethanol

Als Intermedium wurden die Schnitte nun erneut in Roticlear inkubiert (2 x 5 Minuten), bevor sie mit Roti Mount und einem Deckgläschen versiegelt wurden. Die gefärbten Herzschnitte wurden bis zu ihrer Mikroskopie bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert.

3.3.8.1 Analyse histologischer Schnitte

Die zuvor gefärbten Herzschnitte wurden mit einem Zeiss Axio Imager Mikroskop und einem 5 x Objektiv als Kachelaufnahme aufgenommen. Alle Aufnahmen erfolgten im Hellfeld. Nach der mikroskopischen Aufnahme konnten diese mit der Zeiss ZEN 3.0 Software weiter analysiert werden. Um die Narbengröße zu ermitteln, wurde in dieser Software bei jedem Herzschnitt der grau/blaue Narbenbereich, das Lumen von rechtem und linkem Ventrikel, sowie die einzelnen Ventrikel umkreist. Es wurde sehr genau darauf geachtet, dass das gesamte Narbengewebe betrachtet wurde. Die Software gab anschließend die Größe der jeweils umkreisten Flächen in μm^2 an, wodurch eine genaue Flächenermittlung erfolgen konnte.

4. Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von Plättchen-Immunzellkomplexen als kardiovaskulären Risikofaktor im Rahmen eines Myokardinfarktes näher zu untersuchen. Dazu wurden im ersten Teil (4.1) die Immunzellen von STEMI-Patienten und gesunden Probanden hinsichtlich ihrer Komplexbildung mit Thrombozyten im Blut, sowohl durchflusszytometrisch als auch mikroskopisch analysiert. Um die Ursache der Komplexbildung näher zu betrachten, wurden zudem Oberflächenmarker als auch die Aktivierung und Funktion der Immunzellen analysiert.

Es ist bekannt, dass Diabetes zum einen die Mortalitätsrate nach einem MI erhöht und dass es zudem mit einem proentzündlichen Zustand assoziiert ist. Zudem findet man im Blut von Diabetikern eine erhöhte Menge an aktivierten Plättchen und auch an Plättchen-Leukozytenkomplexen. Im zweiten Teil (4.2) der Arbeit wurden Mäuse durch Fütterung einer fettreichen Diät über einen Zeitraum von neun Wochen in einen prädiabetischen Zustand versetzt. Im Verlaufe dieser Fütterungsphase wurden repetitiv Immunzellen und Plättchen-Leukozytenkomplexe im Blut, sowie die Herzfunktion mittels MRT analysiert. Nach diesen 9 Wochen wurde experimentell ein Myokardinfarkt (50 Min Ischämie/Reperfusion) induziert und anschließend Immunzellen im Blut/PLAs, die Infarktgröße und die Herzfunktion über weitere 4 Wochen analysiert.

Im dritten Teil dieser Arbeit (4.3) wurde das Blut von STEMI-Diabetes-Patienten auf die Immunzellanteile und die Komplexbildung hin untersucht. Als Kontrollgruppe dienten dabei KHK-Diabetes-Patienten.

4.1 Untersuchungen zu Plättchen-Leukozytenkomplexen

4.1.1 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von CD41-Monozytenkomplexe

Das gängigste Verfahren zur Analyse von Plättchen-Leukozytenkomplexen ist die Durchflusszytometrie. Hierbei werden z.B. Antikörper eingesetzt, welche gegen die Plättchen-spezifischen Antigene CD41, oder CD62P gerichtet sind. Jedoch kann durch diese Methode keine Aussage darüber getroffen werden, ob die Leukozyten intakte Plättchen oder deren Vesikel oder Exosome gebunden haben.

Um zu untersuchen, ob Immunzellen mit vollständigen Thrombozyten oder Vesikeln aus Thrombozyten interagieren, wurden zunächst J774 Makrophagen in vitro mit isolierten Plättchen inkubiert (J774 ohne Plättchen dienten als Kontrolle), fixiert und anschließend mit

DAPI, Weizenkeim-Agglutinin (WGA), sowie CD41 gefärbt. J774, die nicht mit Plättchen inkubiert wurden, zeigten eine deutliche rote WGA-Färbung der Zellmembran (siehe Abbildung 6 A, 1. Reihe), jedoch kein CD41-Signal. Proben, bei welchen Plättchen zugegeben wurden, zeigten zudem kleinere grüne CD41-Färbungen. Diese sind bei Überlagerung beider Kanäle zumeist am Rande der WGA-Färbung zu sehen (siehe Abbildung 6 A, 2. Reihe). Anhand der Bilddaten wurde auch die Größe der WGA-/CD41-gefärbten Strukturen analysiert.

Abbildung 6 B zeigt die Größenanalyse der zuvor gezeigten Zellen. Während die WGA gefärbten Zellen eine Größe von etwa $12,0\ \mu\text{m} \pm 1,7\ \mu\text{m}$ zeigten, konnte für die CD41-positiven Zellen eine Größe von etwa $2,8\ \mu\text{m} \pm 0,7\ \mu\text{m}$ festgestellt werden.

Im nächsten Schritt wurden dann primär isolierte Monozyten von gesunden, freiwilligen Spendern mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. PBMCs wurden auf beschichteten Objektträgern inkubiert und wiederum mit DAPI, WGA und CD41 gefärbt und fixiert. Wie in Abbildung 6 C zu sehen, konnten bei diesem Versuch größere und kleinere WGA gefärbte Strukturen erkannt werden, wobei lediglich die größeren Strukturen einen blau gefärbten Zellkern aufwiesen. Die CD41-Färbung ist ausschließlich auf die kleineren Strukturen begrenzt. In der Überlagerung aller Färbungen konnte festgestellt werden, dass ein Teil der CD41-positiven Strukturen in enger räumlicher Nähe zu den größeren Zellen vorhanden ist (siehe Abbildung 6 C, gelbe Färbung). Auch kleine Filopodien der großen Zellen in Richtung der kleineren CD41-Zellen sind zu finden. Die CD41-Zellen sind teilweise miteinander verbunden und bilden Komplexe.

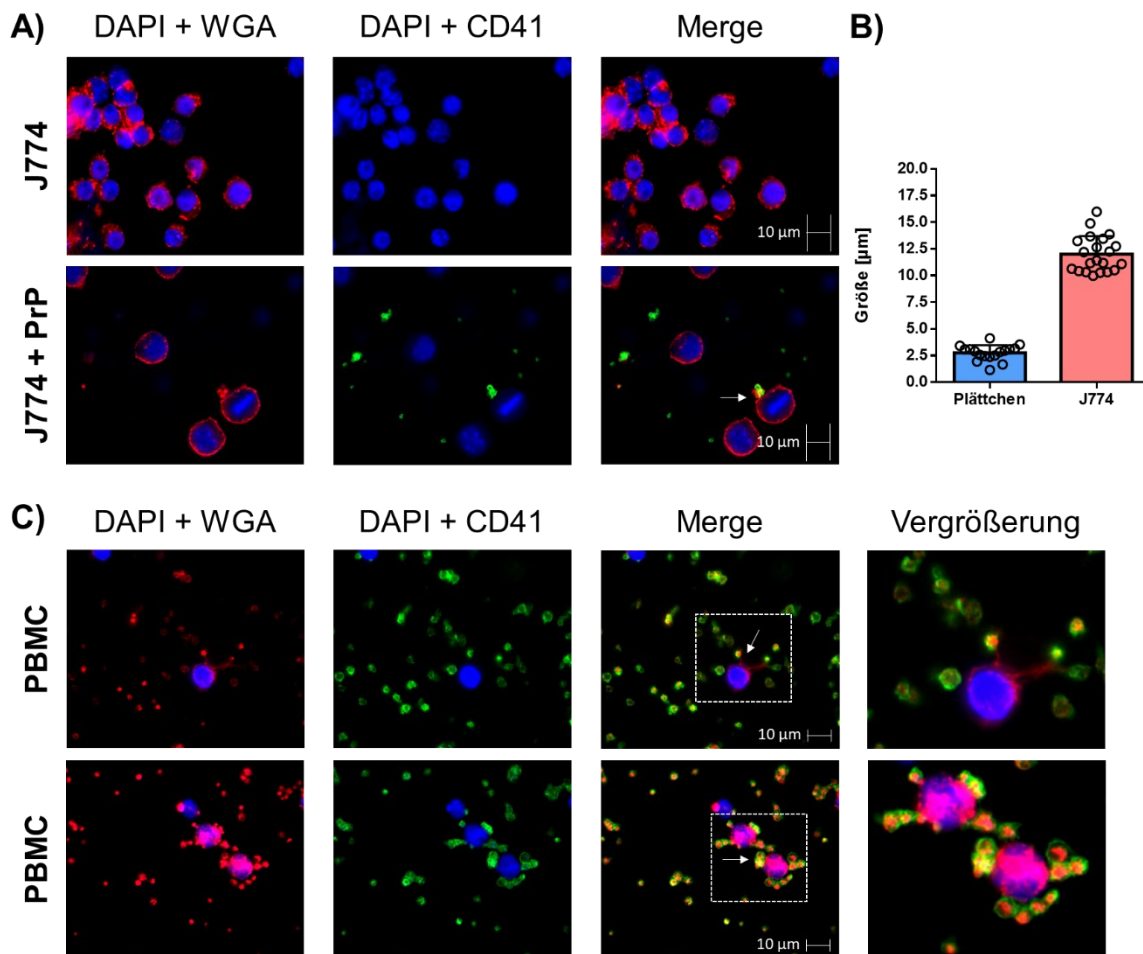


Abbildung 6: J774, Plättchen und PBMCs in der Fluoreszenzmikroskopie. **A:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von J774-Makrophagen, die mit und ohne isolierten Plättchen behandelt wurden. Die Zellmembran wurde mit rot fluoreszierendem Weizen-Agglutinin (WGA-Alexa594) angefärbt, Zellkerne mit blau fluoreszierendem DAPI. CD41-positive Strukturen sind in grün zu erkennen. **B:** Größe der WGA-/CD41-gefärbten Strukturen in den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von J774 und Plättchen. Dargestellt ist der MW ± SD. n = 17-21. **C:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von PBMCs, die mit rot fluoreszierendem Weizen-Agglutinin (WGA) und DAPI gefärbt wurden. CD41-positive Strukturen sind in grün zu erkennen. Rechts sind jeweils vergrößerte Ausschnitte dargestellt. Pfeil: CD41 Strukturen in der Nähe von Monozyten.

4.1.2 Elektronenmikroskopische Untersuchungen von PLAs

In der Fluoreszenzmikroskopie konnten deutliche Assoziationen zwischen Thrombozyten und Monozyten festgestellt werden. Es war jedoch nicht möglich die genauen Strukturen der Zellen zu erkennen oder einen Kontaktpunkt der Komplexe. Daher wurden in Kooperation mit Dr. Ann Kathrin Bergmann (Core Facility Elektronenmikroskopie, HHU Düsseldorf) elektronenmikroskopische Aufnahmen der Plättchen-Monozytenkomplexe (PMA) angefertigt. Es wurden zunächst Monozyten mit Hilfe eines Monozytenisolutionskits von den anderen Blutzellen getrennt. In einem nächsten Schritt wurden dann die Plättchen-Monozytenkomplexe (PMA) mittels MACS-Isolation von den Monozyten ohne Plättchen getrennt. Beide

Zellpopulationen (Monozyten und PMAs) wurden mit Osmiumtetroxid fixiert und für die jeweilige Elektronenmikroskopie vorbereitet. Zunächst wurden die Zellen im Raster-Elektronenmikroskop untersucht und zu diesem Zweck auf Objektträgern gebunden, dehydriert und mit Chrom beschichtet. In den CD41-negativen Monozytenpopulationen liegen rundliche Einzelzellen vor (siehe Abbildung 7, obere Reihe). Die CD41-positiven Monozyten zeigen neben den rundlichen Einzelzellen (Monozyten) auch viele dieser Zellen, welche über kleinere rundliche Strukturen miteinander verbunden sind und größere Komplexe bilden, welche aus mehreren großen und kleinen Zellen bestehen (Abbildung 7, untere Reihe). Da es sich um Zellen verschiedener Größen handelt, wird davon ausgegangen, dass es sich um Plättchen-Monozytenkomplexe handelt.

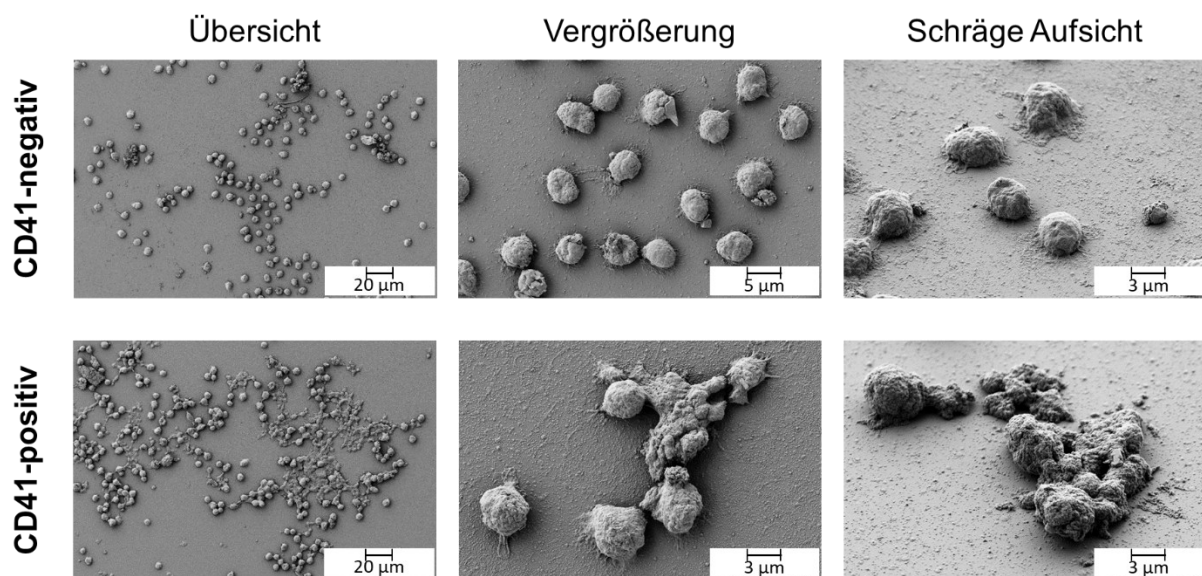


Abbildung 7: Raster-Elektronenmikroskopische Aufnahmen von CD41-negativen (oben) und CD41-positiven (unten) Monozyten. Die Zellen wurden zunächst auf den Objektträger gegeben und anschließend dehydriert und kontrastiert. Links sind Übersichtsaufnahmen zu sehen, mittig Detailbilder, rechts leicht angeschrägte Detailaufnahmen. Die CD41-negativen Zellen zeigen große rundliche Monozyten. Die CD41-positiven zeigen Zellkomplexe aus größeren Monozyten und kleineren Strukturen.

Da auf Grund der Struktur und Größe der Zellen nicht eindeutig bestimmt werden konnte, ob es sich tatsächlich um Monozyten und Plättchen handelt, und genaue Kontaktstellen der Zellen nicht zu erkennen waren, wurden die Monozyten und PMA außerdem über Transmissions-Elektronenmikroskopie untersucht. Hierbei wurden die Zellen auf die gleiche Weise isoliert wie für die Raster-Elektronenmikroskopie, jedoch wurden diese nach der Fixierung mit Glutaraldehyd mit Osmiumtetroxid gefärbt und in Epoxidharz eingebettet (siehe Methoden 3.2.3.4). Nach dem Schneiden am Mikrotom konnten die Präparate im Elektronenmikroskop analysiert werden.

In den Proben der CD41-negativen Monozyten konnten lediglich Zellen erkannt werden, welche einen Zellkern aufwiesen, erkennbar am schwarz gefärbten Heterochromatin (Abbildung 8, obere Reihe). Ihre durchschnittliche Größe beträgt etwa 10 µm. Auf den Schnitten mit CD41-positiven Monozyten waren zusätzlich zu den Monozyten auch Strukturen ohne Zellkern zu sehen, welche nur unwesentlich kleiner als die Monozyten erschienen (siehe Abbildung 8, mittlere und untere Reihe). Zwischen den verschiedenen Strukturen konnte eine direkte Verbindung beobachtet werden, welche eine leicht graue Färbung zeigte (Abbildung 8, roter Pfeil).

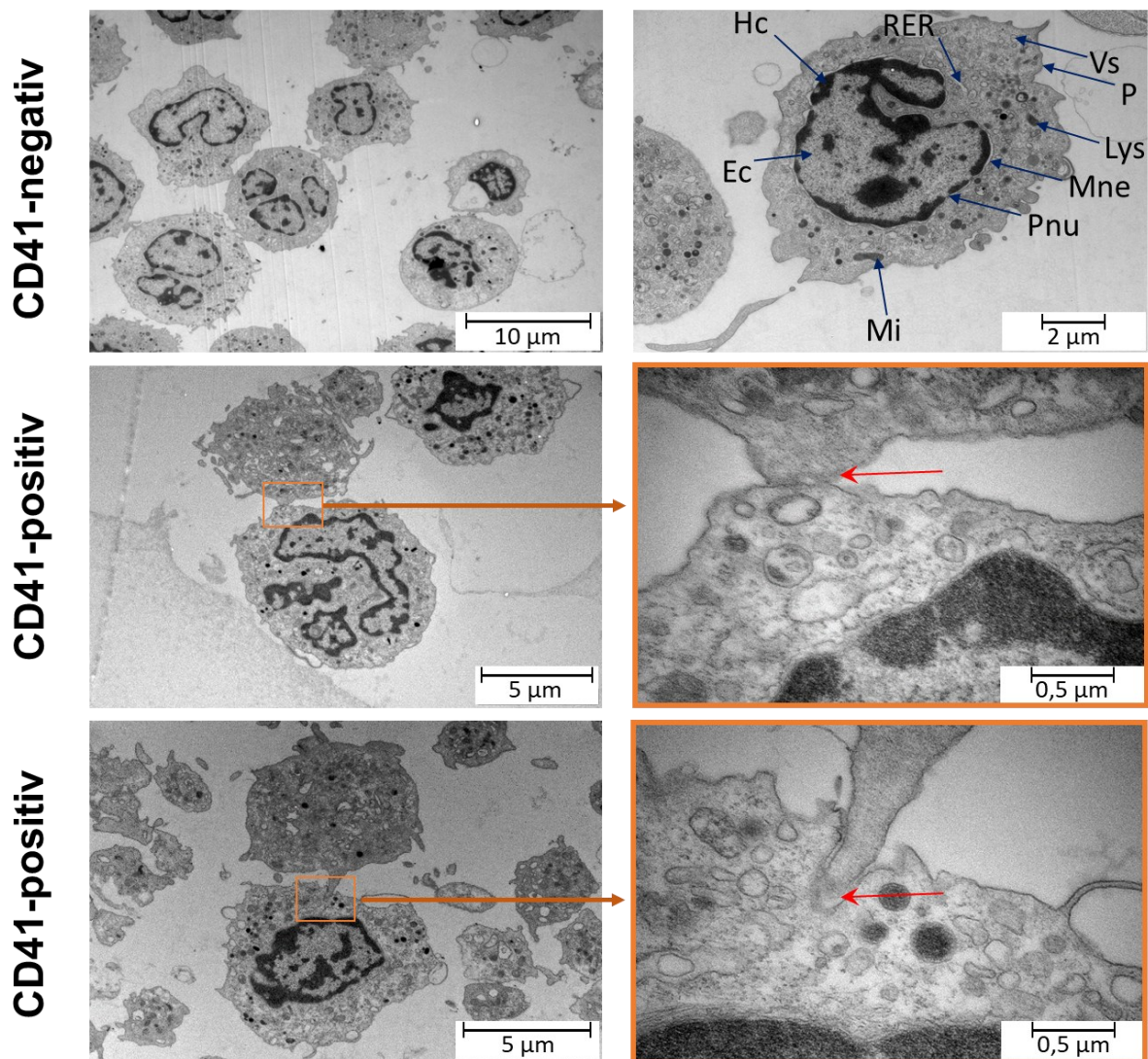


Abbildung 8: Transmissions-Elektronenmikroskopische Aufnahmen von CD41-negativen und CD41-positiven Monozyten. Die obere Reihe zeigt CD41-negative Monozyten, die 2. und 3. Reihe CD41-positive. Links sind Übersichtsaufnahmen zu sehen, rechts Detailaufnahmen. Die CD41-negativen Monozyten sind große, rundliche Zellen mit gut zu erkennendem Heterochromatin (Schwarze Strukturen; Hc). Die CD41-positiven Monozyten zeigen Zellkomplexe aus größeren Monozyten und anderen, in etwa gleich großen Zellstrukturen, welche kein Chromatin beinhalten und somit Thrombozyten darstellen. Die orangen umrandeten Bereiche der linken Reihe sind rechts im Detail dargestellt. Zwischen den Zellen ist eine graue Färbung im Verbindungsbereich zu sehen (roter Pfeil). Ec: Euchromatin, Hc: Heterochromatin, Lys: Lysosom, Mi: Mitochondrium, Mne: äußere Kernmembran, P: Plasmalemma, Pnu: Kernporen, RER: raues Endoplasmatisches Retikulum, Vs: Vesikel

4.1.3 Analyse von CD41 positiven Monozyten bei STEMI- und KHK-Patienten

Nachdem die Plättchen-Monozytenkomplexe mikroskopisch untersucht wurden, wurden die Leukozyten-CD41-Komplexe in Blutproben von gesunden Spendern, sowie STEMI- und KHK-Patienten näher analysiert. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit DAPI, CD11b, CD14, CD16, CD41 und CD62P gefärbt. DAPI wurde genutzt, um tote Zellen von der Analyse

auszuschließen. Mit Hilfe von CD14 und CD16 können Monozyten und Neutrophile Granulozyten voneinander getrennt betrachtet werden bei der Durchflusszytometrie. Während CD41 auf allen Plättchen exprimiert wird, ist CD62P lediglich auf aktivierten Plättchen vorhanden. Abbildung 9 zeigt zunächst durchflusszytometrische DotPlots, welche das Gating von Monozyten-CD41-Komplexen und Monozyten-CD62P-Komplexen näher beschreiben. Exemplarisch sind diese DotPlots von Proben eines STEMI-Patienten dargestellt.

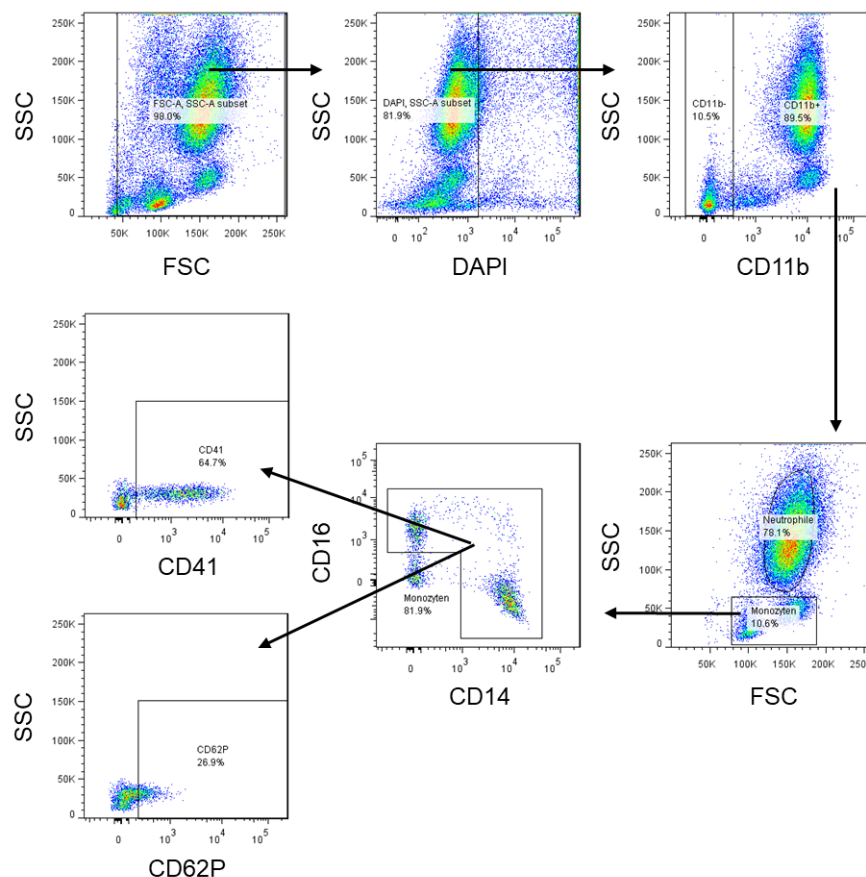


Abbildung 9: Gating Strategie zur Darstellung von Monozyten-CD41- und Monozyten-CD62P-Komplexen.

Abbildung 10 A zeigt die Zellzahlen und Anteile der Monozyten-CD41-Komplexe bei gesunden Probanden, STEMI- und KHK-Patienten. Bei STEMI-Patienten beträgt der Anteil von CD41-Komplexen an den Monozyten auf $62,4 \% \pm 23,2 \%$ ($p < 0,05$), während bei gesunden Probanden lediglich etwa $20,6 \% \pm 10,6 \%$ der Monozyten CD41-positiv sind. Bei KHK-Patienten liegt der Anteil bei etwa $29,7 \% \pm 15,9 \%$ und ist somit noch deutlich niedriger als bei STEMI-Patienten.

Um zu untersuchen, wie stark der Marker für aktivierte Thrombozyten auf den Monozyten vertreten ist, wurde CD62P auf den Monozyten des Blutes analysiert. Auch hier ist, wie in Abbildung 10 B zu sehen, der Anteil der Plättchen-Monozytenkomplexe im Blut von STEMI-

Patienten höher ($32,8 \% \pm 19,1 \%$; $p < 0,01$), während die KHK-Blutproben ($7,3 \% \pm 4,7 \%$) einen ähnlichen Anteil wie die Blutproben der gesunden Probanden aufweisen ($4,4 \% \pm 3,3 \%$).

Es stellte sich nun die Frage, ob die Erhöhung der CD41- und CD62P-Komplexe auch in den absoluten Zellzahlen feststellbar sind. Die Zahl der CD41+ Monozyten im Blut der STEMI-Patienten liegt mit $138.559 \text{ Zellen/ml} \pm 85.990 \text{ Zellen/ml}$ ($p < 0,05$) höher als bei Blutproben gesunder Spender (Gesund: $29.200 \text{ Zellen/ml} \pm 24.878 \text{ Zellen/ml}$). Die PMA-Zahl in Blutproben der KHK-Patienten ist leicht erhöht. Wie zuvor bei den Zellanteilen für CD62P-positive Zellen, sind auch die Zellzahlen bei Blutproben der gesunden Probanden und KHK-Patienten vergleichbar. Die Zahl der im Blut vorhandenen CD62P-positiven Monozyten ist bei STEMI-Patienten mit $66.498 \text{ Zellen/ml} \pm 45.256 \text{ Zellen/ml}$ ($p < 0,01$, siehe Abbildung 10 B) stark erhöht im Vergleich zu den Proben gesunder Probanden (Gesund: $6427 \text{ Zellen/ml} \pm 5136 \text{ Zellen/ml}$).

Beide Thrombozytenmarker (CD41/CD62P) wurden im Blut von STEMI-Patienten auch über einen Zeitraum von 6 Monaten untersucht, um festzustellen, ob der Anteil der positiven Monozyten in der Zeit nach Infarkt wieder absinkt. Wie Abbildung 10 zeigt, bleiben sowohl CD41-positive Monozyten als auch jene mit CD62P assoziierten, über den Zeitraum von 6 Monaten nach Infarkt in ihrem Anteil konstant. So sind unmittelbar nach Myokardinfarkt $62,4 \% \pm 23,2 \%$ der Monozyten im Blut mit CD41 assoziiert, während der Anteil nach 5 Tagen auf $56,6 \% \pm 24,1 \%$ absinkt und nach 6 Monaten bei $53,5 \% \pm 19,8 \%$ liegt. Der Anteil für die CD62P-positiven Monozyten liegt über den gesamten Zeitraum deutlich niedriger. Im Blut der STEMI-Patienten direkt nach Infarkt liegt dieser bei $32,8 \% \pm 19,1 \%$ und sinkt nach 5 Tagen ab, während nach 6 Monaten der Anteil ansteigt (siehe Abbildung 10).

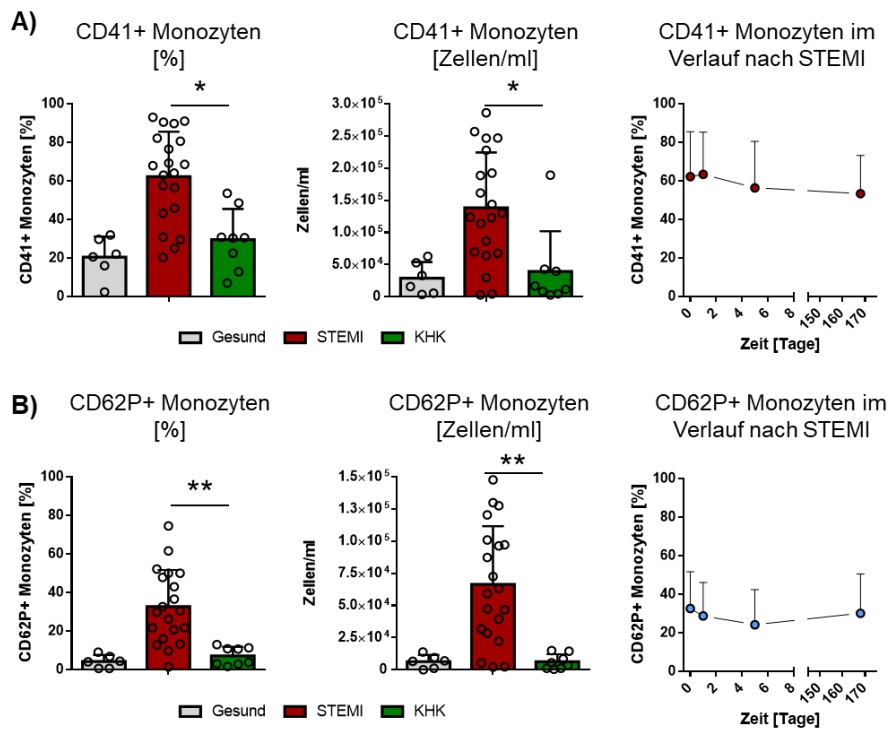


Abbildung 10: Zellzahl pro ml Blut und Anteil der Monozyten-CD41-Komplexe im Vollblut im Vergleich. A: Zellzahl und Anteil der Monozyten-CD41-Komplexe im Vollblut bei gesunden Probanden, STEMI-Patienten und KHK-Patienten im Vergleich. Dargestellt ist außerdem der relative Anteil der CD41+ Monozyten über einen Zeitraum von 6 Monaten nach STEMI. **B:** Zellzahl und Anteil der Monozyten-CD62P-Komplexe im Vollblut im Vergleich. Dargestellt ist außerdem der relative Anteil der CD62P+ Monozyten über einen Zeitraum von 6 Monaten nach STEMI. Grau: gesunde Probanden; rot: STEMI-Patienten; grün: KHK-Patienten. Dargestellt ist der MW $\pm$ SD. n = 5-20. * p $\leq$ 0,05; ** p $\leq$ 0,01

Neben den Monozyten der verschiedenen Patienten und Probandengruppen wurde außerdem untersucht, inwieweit die Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten mit Thrombozyten interagieren. Der Zellanteil bei Neutrophilen-CD41-Komplexen ist, im Gegensatz zum Anteil von gesunden Probanden, in Proben von STEMI-Patienten und KHK-Patienten leicht erhöht (STEMI: 15,5 % $\pm$ 10,0 %, KHK: 14,5 % $\pm$ 7,2 %). Die Werte für das Blut von STEMI-Patienten und KHK-Patienten sind vergleichbar. Die geringste Zellzahl CD41-positiver neutrophiler Granulozyten zeigen Blutproben der gesunden Probanden mit 51.053 Zellen/ml $\pm$ 75.721 Zellen/ml. KHK-Patienten liegen somit etwa doppelt so hoch in ihrer Zellzahl. Im Blut von STEMI-Patienten liegt die absolute Zellzahl noch deutlich höher. Wie in Abbildung 11 A, rechts, zu sehen, gibt es einen leichten Anstieg der CD41-Anteile in den ersten 6 Monaten nach STEMI. So fällt der Anteil der CD41-positiven neutrophilen Granulozyten nach 24 Stunden zunächst ab und steigt im Anschluss nach 5 Tagen an. Nach 6 Monaten ist der Zellanteil mit 34,2 % $\pm$ 28,8 % nahezu unverändert.

Der Anteil CD41-positiver Lymphozyten ist deutlich niedriger als bei den Neutrophilen, während CD41-positive Lymphozyten mit $6,2 \% \pm 4,1 \%$ ($p < 0,01$) bei den Blutproben der STEMI-Patienten am höchsten (siehe Abbildung 11 B) und bei KHK-Patienten mit $1,7 \% \pm 0,9 \%$ am niedrigsten sind. Die absoluten Zellzahlen der Lymphozyten sind bei STEMI-Proben deutlich höher als bei den anderen Patientengruppen. In den 6 Monaten nach STEMI kann in den Blutproben ein leichter Anstieg der CD41-positiven Lymphozyten festgestellt werden, nachdem es an Tag 1 zunächst einen geringen Abfall gibt. So liegt der Anteil nach STEMI zunächst bei $6,2 \% \pm 4,1 \%$ ($p < 0,005$ im Vergleich zu 1 Tag) und nach 6 Monaten bei $11,5 \% \pm 7,6 \%$ ($p < 0,005$ im Vergleich zu 1 Tag).

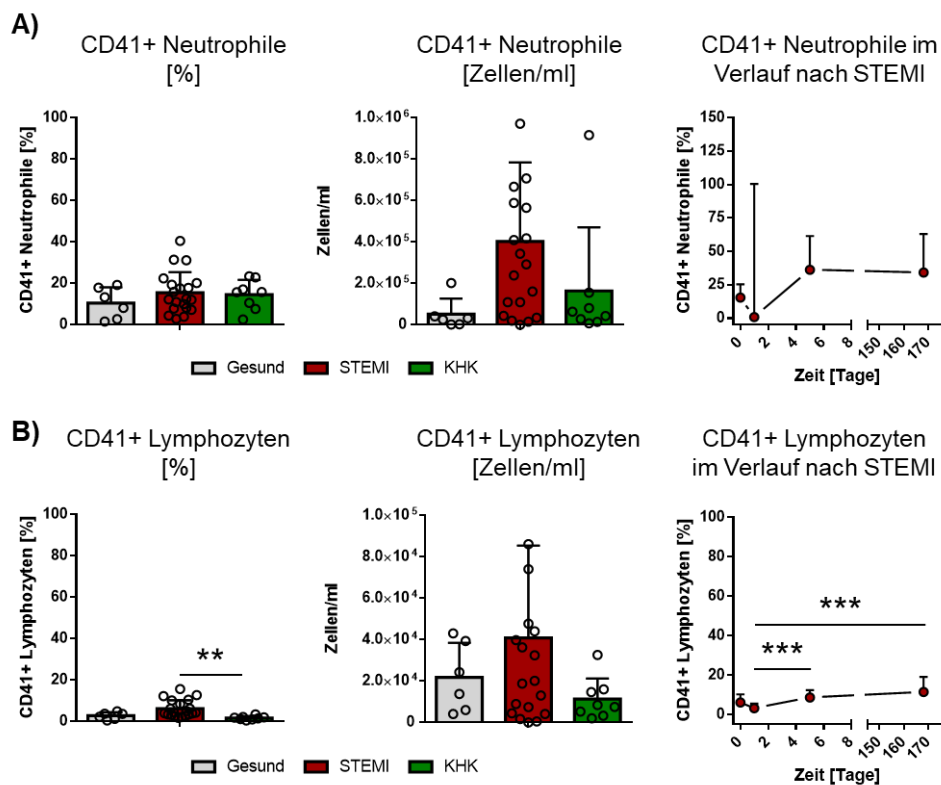


Abbildung 11: Zellzahl pro ml Blut und Anteil der verschiedenen Neutrophilen-CD41-Komplexe und Lymphozyten-CD41-Komplexe im Vollblut im Vergleich. Grau: gesunde Probanden; rot: STEMI-Patienten; grün: KHK-Patienten. Dargestellt ist der MW $\pm$ SD. $n = 5-20$. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,005$. **A:** Zellzahlen pro ml Blut und relative Anteile der CD41-positiven neutrophilen Granulozyten im Blut gesunder Probanden, sowie STEMI- und KHK-Patienten. Dargestellt ist außerdem der relative Anteil der CD41+ Neutrophilen über einen Zeitraum von 6 Monaten nach STEMI. **B:** Zellzahlen pro ml Blut und relative Anteile der CD41-positiven Lymphozyten im Blut gesunder Probanden, sowie STEMI- und KHK-Patienten. Dargestellt ist außerdem der relative Anteil der CD41+ Lymphozyten über einen Zeitraum von 6 Monaten nach STEMI.

4.1.4 STEMI-Patienten haben eine erhöhte Zellzahl von Monozyten und Neutrophilen im Blut

Die vorherigen Analysen zeigten sehr große Zellzahlen vor allem für CD41 positive Monozyten. Es sollten daher die Zellzahlen der Monozyten, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten der Blutproben bestimmt werden. Abbildung 12 A zeigt die Zellzahl der Neutrophilen (links), Monozyten (mitte) und Lymphozyten (rechts) pro Milliliter humanem Blut bei gesunden Probanden, KHK-Patienten, STEMI-Patienten. Es fällt auf, dass vor allem die Anzahl von Neutrophilen und Monozyten im Blut bei STEMI erhöht ist. So liegen die Monozyten bei STEMI-Patienten bei $275.126 \text{ Zellen/ml} \pm 205.109 \text{ Zellen/ml}$ und die neutrophilen Granulozyten bei $2,7 \times 10^6 \text{ Zellen/ml} \pm 2,4 \times 10^6 \text{ Zellen/ml}$. Die Lymphozyten hingegen zeigen nur sehr leichte Mengenänderungen zwischen den Versuchsgruppen. Bei Proben von KHK-Patienten sind lediglich die Neutrophilen in ihrer Zellzahl erhöht.

Da sich die verschiedenen Subtypen der Monozyten in ihren Funktionen deutlich unterscheiden, wurden auch diese näher untersucht (siehe Abbildung 12 B). Der Anteil der nicht-klassischen Monozyten an den Monozyten ist im Blut bei STEMI am höchsten ($p < 0,05$), während die klassischen Monozyten bei STEMI-Proben deutlich niedriger ($p < 0,05$) sind als bei Blutproben gesunder Probanden und KHK-Patienten. Die intermediären Monozyten haben bei allen Proben den geringsten Anteil und sind vergleichbar. Ein Unterschied zwischen KHK-Patienten und gesunden Probanden kann hier nicht festgestellt werden.

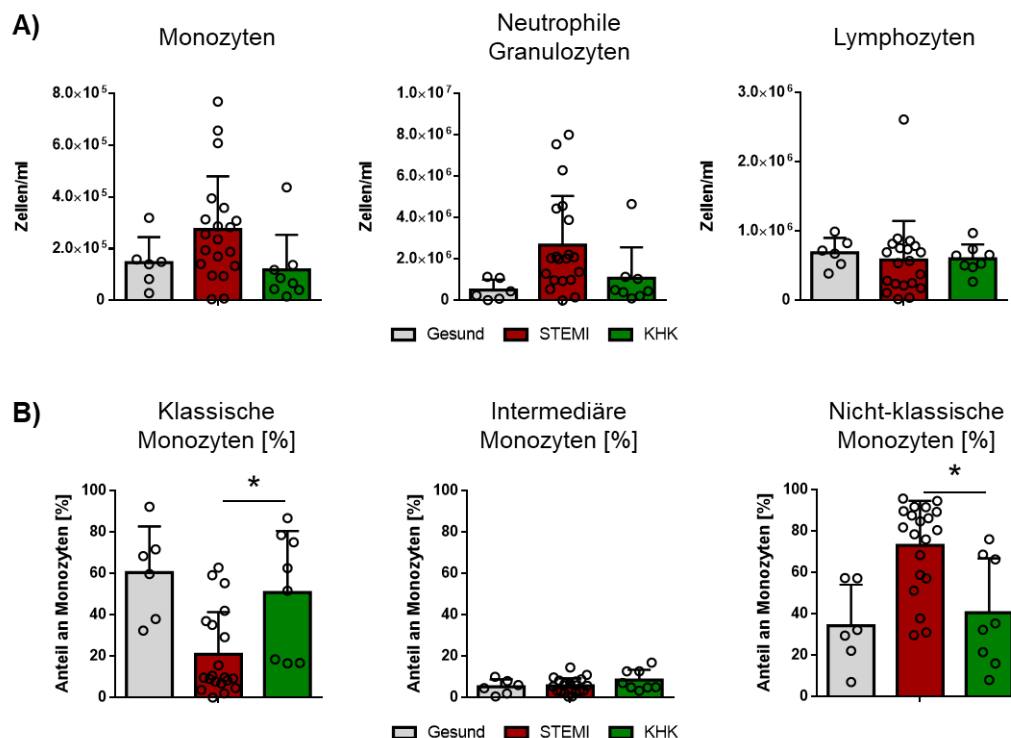


Abbildung 12: Zellzahl pro ml Blut und Anteil der verschiedenen Immunzellen im Vollblut im Vergleich. Grau: gesunde Probanden; rot: STEMI-Patienten; grün: KHK-Patienten. Dargestellt ist der MW $\pm$ SD. $n = 5-20$. * $p \leq 0,05$. **A:** Zellzahlen pro ml der Monozyten (links), Neutrophilen Granulozyten (mitte) und Lymphozyten (rechts) in Zellen/ml Blut bei den verschiedenen Probanden/Patienten. **B:** Relative Anteile der Monozyten Subtypen an den Monozyten in %.

4.1.5 Mögliche Ursachen der verstärkten Komplexbildung

Auf Grund der verschiedenen mikroskopischen Untersuchungen war davon auszugehen, dass es sich bei den CD41+ Monozyten tatsächlich um Monozyten-Thrombozyten-Komplexe handelt. Nun stellte sich die Frage warum in den Blutproben der STEMI-Patienten eine erhöhte Komplexbildung vorhanden ist. Hier wurden drei mögliche Hypothesen untersucht:

- i. Die Plättchenzahl ist im Verhältnis zu den Monozyten erhöht
- ii. Die Plättchenaktivierung fördert die Bindung an Monozyten
- iii. Auf der Zelloberfläche von Monozyten werden verstärkt Moleküle exprimiert, die die Bindung an Plättchen fördern.

i. Die Anzahl der Thrombozyten ist im Verhältnis zu den Monozyten erhöht

Zunächst sollte als mögliche Ursache der Komplexbildung die Plättchenzahl und ihr Verhältnis zur Monozytenzahl untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden die Plättchen durchflusszytometrisch analysiert. Abbildung 13 zeigt Anzahl der Thrombozyten bei gesunden Probanden, STEMI- und KHK-Patienten, sowie das Verhältnis der Plättchen zu den Monozyten. Die Plättchenzahl pro ml Blut ist vor allem bei KHK-Patienten gegenüber

gesunden Probanden und STEMI-Patienten deutlich erhöht. Jedoch ist hier die Standardabweichung ebenfalls sehr hoch, wodurch der Unterschied nicht statistisch signifikant ist. Ein leichter Anstieg in der Plättchenzahl pro Milliliter ist außerdem für STEMI-Patienten feststellbar.

In Abbildung 13 A, rechts, ist die Plättchenzahl über einen Verlauf von 6 Monaten nach Infarkt dargestellt. Hier ist ein Anstieg nach 24 Stunden feststellbar, welcher über 6 Monate in etwa auf dem gleichen Niveau bleibt. Jedoch ist dieser Anstieg ebenfalls nicht signifikant.

Die Untersuchung der Anzahl der Thrombozyten zeigte, dass bei STEMI-Patienten diese nicht signifikant erhöht ist. Es wurde daher das Verhältnis der Plättchen zu den Monozyten untersucht. Abbildung 13 zeigt, dass das Verhältnis bei STEMI-Proben auf $41,3 \pm 100,1$ ansteigt. Auf Grund der hohen Standardabweichung sind die Unterschiede jedoch nicht signifikant im Vergleich zum Verhältnis bei gesunden Probanden ($20,1 \pm 17,7$). Des Weiteren ist in Abbildung 13 die Veränderung des Verhältnisses über die Zeit nach Infarkt dargestellt. Am ersten Tag nach STEMI steigt das Verhältnis im Blut zunächst an, sinkt jedoch schon am 5. Tag wieder deutlich ab und nach 6 Monaten noch weiter. Die Standardabweichung ist sehr hoch, wodurch keine signifikanten Änderungen feststellbar sind.

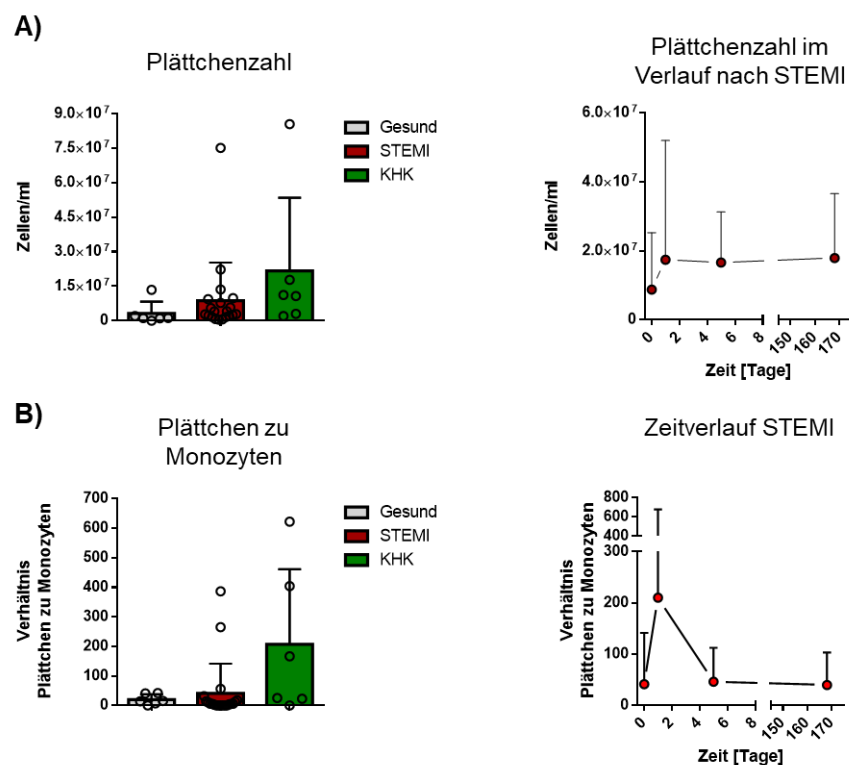


Abbildung 13: Anzahl der Thrombozyten im Blut, sowie das Verhältnis von Plättchen zu Monozyten im Vollblut. Grau: gesunde Probanden; rot: STEMI-Patienten; grün: KHK-Patienten. Dargestellt ist der MW $\pm$ SD. n= 3-20. **A:** Zellzahlen der Plättchen bei den verschiedenen Proben und im Verlauf nach STEMI. **B:** Verhältnis der Plättchen zu Monozyten in Vollblut und im Zeitverlauf nach Myokardinfarkt.

ii. Plättchenaktivierung fördert die Bindung an Monozyten

Weder die Plättchenzahl noch das Plättchen-Monozytenverhältnis konnten eine klare Begründung für die verstärkte Komplexbildung liefern. Es wurde daher die Plättchenaktivierung näher betrachtet und die Komplexbildung bei verschiedenen Aktivierungsstadien näher untersucht. Hierzu wurde die Interaktion der Plättchen aus dem Blut von gesunden Probanden oder STEMI-Patienten mit J774 Makrophagen untersucht. J774 wurden mit 50 μ l bzw. 500 μ l PrP inkubiert. Es stellte sich die Frage, ob man durch Plättchenaktivierung eine gesteigerte Komplexbildung hervorrufen kann. Daher wurden Plättchen von gesunden Probanden isoliert und unstimuliert, oder nach ADP-Aktivierung mit J774 inkubiert (siehe Abbildung 14 A). Bei einer Menge von 50 μ l PrP konnte im prozentualen Anteil Plättchen gebundener J774 kein Unterschied zwischen den aktivierten und nicht aktivierten Plättchen festgestellt werden. Wurde jedoch die 10-fache Menge der Plättchen genutzt, stieg der Anteil der Plättchen gebundenen J774 auf etwa 30 % an, während dieser ohne ADP bei ca. 20 % liegt. Noch deutlicher ist die Änderung der Komplexbildung bei Betrachtung des MFI zu sehen (Abbildung 14 A, rechts). Dieser ist sowohl bei den 50 μ l PrP als auch bei den 500 μ l PrP deutlich höher als bei unstimulierten Plättchen.

Es wurden daher anschließend die Bindungen der Plättchen von STEMI-Patienten an J774 untersucht. Plättchen aus STEMI-Proben, welche in der ersten Katheteruntersuchung nach Infarkt entnommen wurden, haben lediglich einen MFI von $231,0 \pm 307,8$ (siehe Abbildung 14 B, rechts). So steigt der MFI mit PrP von Tag 1 auf ca. $1019 \pm 823,5$ und fällt mit PrP von Tag 5 auf etwa $337 \pm 108,3$. Dieser Anstieg und Abfall mit den Proben verschiedener Zeitpunkte nach Infarkt ist auch in den Anteilen der CD41-positiven Zellen wieder zu finden (Abbildung 14 B, links).

Nachdem mit dem PrP der STEMI Patienten eine Tendenz zur gesteigerten Komplexbildung bei Proben von Tag 1 nach STEMI zu erkennen war, wurde der Aktivierungsstatus der Plättchen mit Hilfe von CD62P bestimmt. Der relative Anteil der aktivierten Plättchen (siehe Abbildung 14 C) ist bei allen Proben ähnlich bei etwa 20 %. Leichte Schwankungen im Anteil der CD62P-positiven Plättchen sind in den ersten 6 Monaten nach Infarkt feststellbar. Der Unterschied ist jedoch nicht statistisch signifikant.

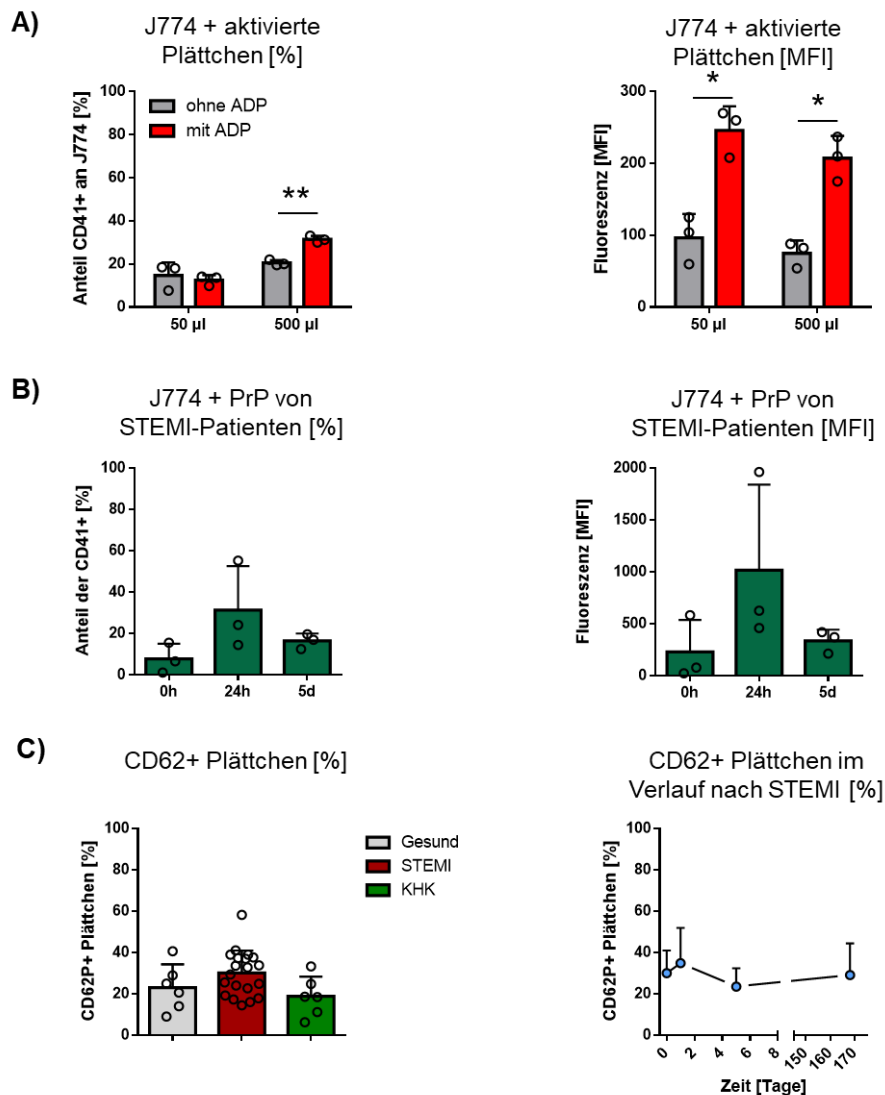


Abbildung 14: Relativer Anteil und mittlere Fluoreszenzintensität von J774 bei Inkubation mit Plättchen. A: Mittlere Fluoreszenzintensität und relativer Anteil von J774-Plättchen-Komplexen bei Verwendung von stimulierten und unstimulierten Plättchen. Dargestellt ist der MW $\pm$ SD. n= 3. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,005$. Links: Anteil der CD41-positiven J774 mit 50 µl und 500 µl Plättchen mit und ohne ADP-Stimulation. Rechts: CD41-MFI von J774 Makrophagen nach Inkubation mit 50 µl und 500 µl Plättchen mit und ohne ADP-Stimulation. **B:** Mittlere Fluoreszenzintensität und relativer Anteil von J774-Plättchen-Komplexen. Dargestellt ist der MW $\pm$ SD. n= 3-7. Links: Anteil der CD41-positiven J774 nach Inkubation mit 500 µl PrP von STEMI-Patienten. Rechts: CD41-MFI der J774 mit 500 µl PrP von STEMI Patienten. **C:** Relative Anteile der CD62P-positiven Plättchen im Vollblut im Vergleich. Grau: gesunde Probanden; rot: STEMI-Patienten; grün: KHK-Patienten. Dargestellt ist der MW $\pm$ SD. n= 3-20.

iii. Untersuchung von Zelloberflächenrezeptoren auf Monozyten

Durch Aktivierung der Plättchen mit ADP konnte eine gesteigerte Komplexbildung hervorgerufen werden. Es sollte jedoch zusätzlich auch die mögliche, gesteigerte Oberflächenexpression der Bindungsfaktoren PSGL-1 und Tissue Factor (TF) auf Monozyten untersucht werden. Beide Oberflächenmarker wurden sowohl bei Monozyten als auch

Plättchen-Monozytenkomplexen untersucht. Tissue Factor zeigt in allen Proben nur sehr geringe mittlere Fluoreszenzwerte (siehe Abbildung 15) und Zellanteile, die sich nicht zwischen Monozyten und Plättchen-Monozytenkomplexen unterscheiden.

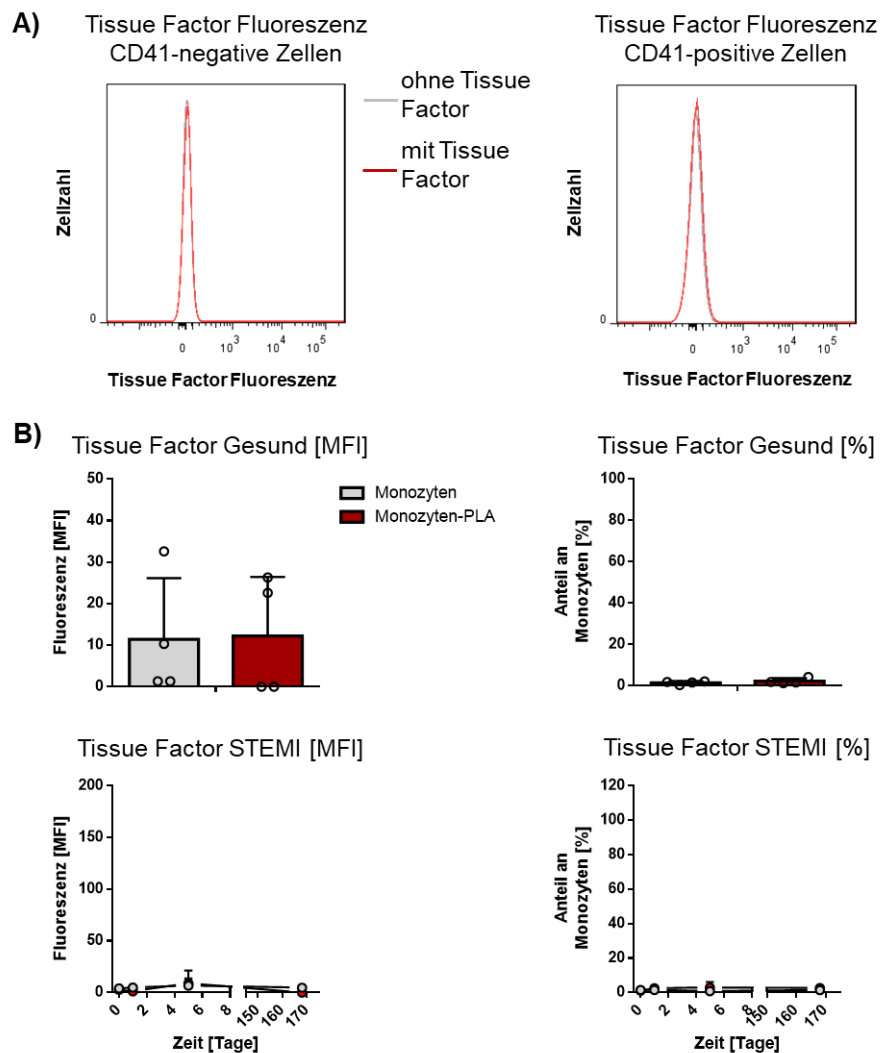


Abbildung 15: Oberflächenexpression von Tissue Factor auf Monozyten im Vollblut gesunder Probanden und STEMI-Patienten. Dargestellt ist der MW $\pm$ SD. $n = 4$. **A:** Histogramme der Tissue Factor-Fluoreszenz bei Monozyten (links) und Plättchen-Monozytenkomplexen (rechts) von STEMI-Patienten. Rot: mit Tissue Factor; grau: ohne Tissue Factor. **B:** Oben: MFI und Anteil des Tissue Factor bei gesunden Probanden in Monozyten und Plättchen-Monozytenkomplexen. Unten: MFI und Anteil des Tissue Factor bei STEMI Patienten in Monozyten und PMA.

In Abbildung 16 sind die Fluoreszenzintensitäten der PSGL-1-Expression auf Monozyten und PMA dargestellt. Der prozentuale Anteil der PSGL-1-positiven Zellen liegt bei allen Proben bei nahezu 100 %. Der MFI beträgt bei gesunden Probanden $6001,8 \pm 1101,7$ für die Monozyten und $6588,5 \pm 913,6$ für Monozyten-Plättchenkomplexe. Der MFI liegt bei den STEMI-Proben zunächst bei $4960,1 \pm 1781,4$ bzw. $5411,3 \pm 1535,6$ (PMA) und steigt nach 24 Stunden an. An Tag 5 nach Infarkt ist der MFI besonders hoch und steigt auf $7547,9 \pm 595,0$ bei den Monozyten

und $8472,3 \pm 203,9$ bei den Monozyten-Plättchenkomplexen an. In den 6 Monaten nach Infarkt sinkt er wieder ab und ähnelt dem Ausgangswert. Einen signifikanten Unterschied im MFI des PSGL-1 zwischen den Patientengruppen gibt es nicht. Auch zwischen den jeweiligen Monozyten und den PMA ist kein signifikanter Fluoreszenzunterschied zu erkennen.

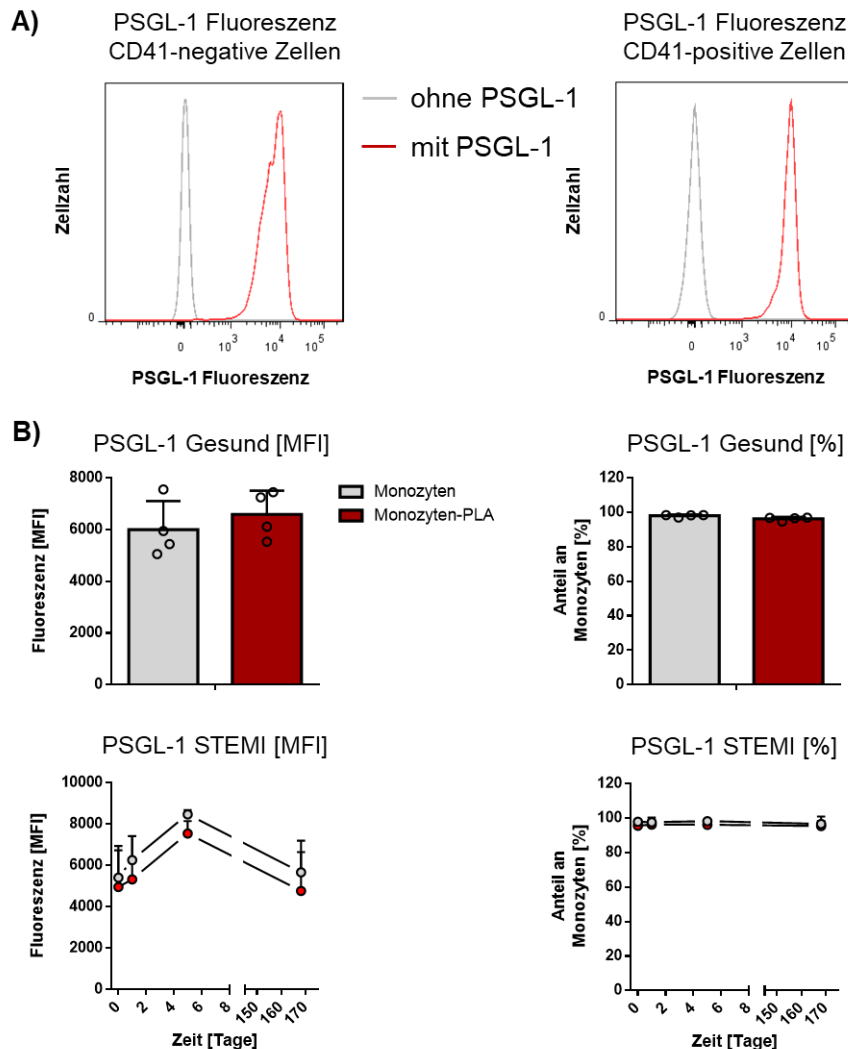


Abbildung 16: Oberflächenexpression von PSGL-1 im Vollblut gesunder Probanden und STEMI-Patienten. Dargestellt ist der MW $\pm$ SD. $n = 3 - 4$. **A:** Histogramme der PSGL-1-Fluoreszenz bei Monozyten (links) und Plättchen-Monozytenkomplexen (rechts) von STEMI-Patienten. Exemplarisch sind Histogramme von Monozyten an Tag 1 nach einem Myokardinfarkt gezeigt. Rot: mit PSGL-1; grau: ohne PSGL-1. **B:** Oben: MFI und Anteil des PSGL-1 bei gesunden Probanden in Monozyten und Plättchen-Monozytenkomplexen. Unten: MFI und Anteil des PSGL-1 bei STEMI Patienten in Monozyten und PMA.

4.1.6 PMAs zeigen eine gesteigerte Migration

Es gibt Hinweise darauf, dass die Interaktion von Thrombozyten mit Monozyten zu einer Änderung der Funktionalität der Monozyten führt⁵⁹. Daher wurden im nächsten Schritt zum einen die Migration und zum anderen die Oberflächenexpression von zwei Markern zur Antigenpräsentation (MHC-I/MHC-II) untersucht.

Migrationseigenschaften von Monozyten und Plättchen-Monozytenkomplexen

Um die Migrationseigenschaften von Monozyten und Plättchen-Monozytenkomplexen zu untersuchen, wurde das Boyden-Kammersystem mit MCP-1 als Chemoattraktant genutzt. MCP-1 bindet an CCR2, wodurch die Migration von Monozyten stimuliert wird⁶⁰. Es wurden erneut Monozyten von gesunden Probanden, sowie STEMI-Patienten verglichen. Zur Vergleichbarkeit wurde der Anteil der CD41-positiven Zellen vor und nach Migration untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 dargestellt. Bei gesunden Probanden lag der Anteil der MPAs an den Monozyten bei durchschnittlich $18,0 \% \pm 11,4 \%$. Migrierte Zellen zeigen jedoch einen CD41-Anteil von $90,3 \% \pm 11,0 \%$, während er bei den nicht-migrierten Zellen bei $39,8 \% \pm 14,0 \%$ lag.

Der Anteil der CD41-positiven Zellen war bei den Proben der STEMI-Patienten unmittelbar nach Infarkt bereits vor der Migration deutlich höher ($72,6 \% \pm 7,5 \%$) und änderte sich nach der Migration nicht. Abbildung 17 ist zudem zu entnehmen, dass die Anteile sich auch bei den Proben nach 24 Stunden und 5 Tagen zwischen den migrierten und nicht-migrierten Zellen nicht signifikant verändern.

Zudem wurde exemplarisch die Migration der Plättchen bei Stimulation durch MCP-1 untersucht, um zu überprüfen, ob die Zellen möglicherweise auf Grund der Migration Komplexe eingegangen sind, oder ob die Komplexe bereits vor Migration bestand hatten. Die Zahl der migrierten Plättchen ist deutlich geringer im Vergleich zur Zellzahl der nicht-migrierten Zellen.

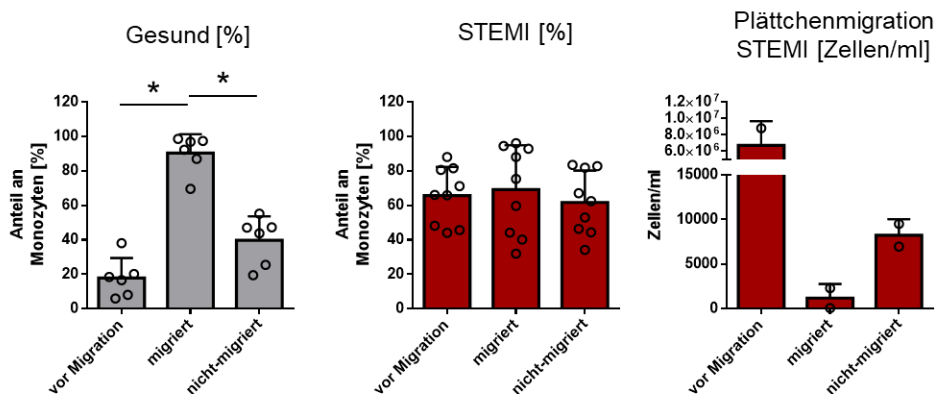


Abbildung 17: Migrationseigenschaften der Monozyten-Plättchenkomplexe und Plättchen bei Verwendung von MCP-1. Es wurden Proben gesunder Probanden und STEMI-Patienten genutzt. Dargestellt ist jeweils der Anteil bzw. die Zellzahl/ml der CD41-positiven Zellen vor und nach Migration. Dargestellt ist der MW $\pm$ SD. n= 2 - 9. * p $\leq$ 0,05.

Oberflächenexpression von MHC-I und MHC-II

Schließlich wurde die Oberflächenexpression von MHC-I und MHC-II analysiert, welche nach Aktivierung der Monozyten durch beispielsweise $\text{TNF-}\alpha$ stärker auf der Zelloberfläche exprimiert werden⁶¹.

Der prozentuale Anteil MHC-I positiver Monozyten beträgt nahezu 100 % bei allen Proben (siehe Anhang). Gesunde Probanden zeigen bei den Monozyten einen MFI von 3310 ± 1301 und bei PMA von 3589 ± 1405 (siehe Abbildung 18). Bei den Blutproben direkt nach STEMI, lag dieser bei $1976 \pm 769,3$ und $2371 \pm 796,7$. Bei jenen von Tag 5 stieg der MFI an. Hier ist zudem ein deutlicher Unterschied zwischen den Monozyten und den Plättchen-Monozyten zu erkennen, welcher jedoch nicht signifikant ist. Im Blut 6 Monate nach Infarkt erreicht der MFI niedrigere Werte von 2827 ± 1131 und 3372 ± 1456 .

Im Gegensatz zum MHC-I liegt der Anteil der MHC-II positiven Monozyten bei etwa 60 – 70 % (siehe Anhang). Wie bereits die Zellanteile, variiert auch die MFI der einzelnen Proben (siehe Abbildung 18). Bei den gesunden Probanden und den Proben unmittelbar nach Infarkt zeigen Plättchen-Monozytenkomplexe deutlich höhere MFI-Werte (Gesund: 4726 ± 4024 ; STEMI 0 h: 3256 ± 3215) als jene der Monozyten (Gesund: $1209 \pm 449,6$; STEMI 0 h: $1225 \pm 911,6$). Bei den übrigen Proben liegt der MFI der Monozyten und PMA jeweils auf einem ähnlichen Niveau. Außerdem sind diese den Werten der Monozyten von gesunden Probanden recht ähnlich. Wie bereits bei den Analysen zu MHC-I, sind auch die Unterschiede bei MHC-II nicht signifikant.

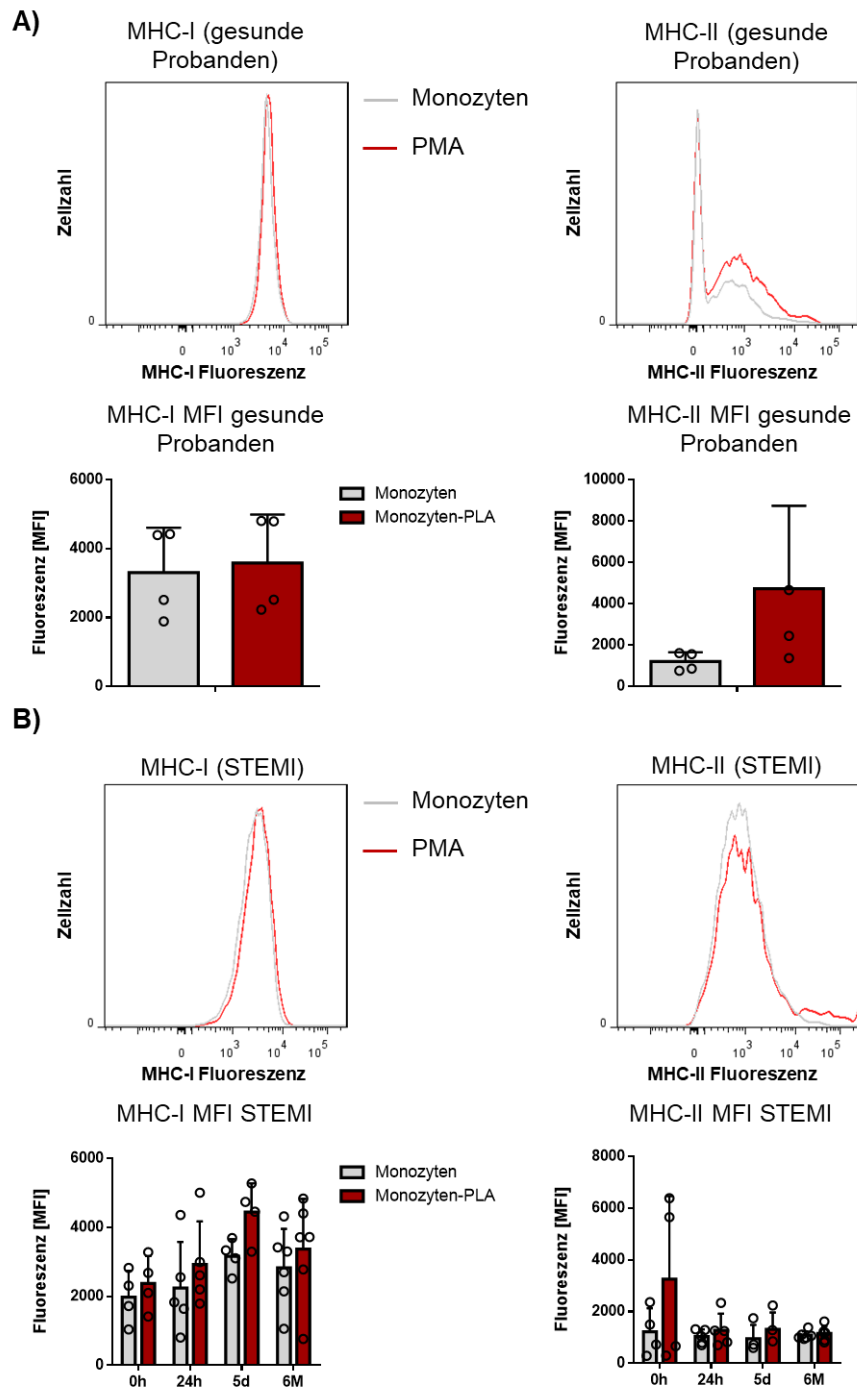


Abbildung 18: Oberflächenexpression von MHC-I und MHC-II Molekülen bei Monozyten und Monozyten-Plättchenkomplexen bei gesunden Probanden und STEMI-Patienten. Dargestellt ist der MW $\pm$ SD. n= 3 - 6. **A:** Mittlere Fluoreszenzintensität von MHC-I und MHC-II bei Monozyten und Monozyten-Plättchenkomplexen bei gesunden Probanden. Oben: Histogramme der MHC-Fluoreszenz bei gesunden Probanden. Rot: Plättchen-Monozytenkomplexe; grau: Monozyten. Unten: MHC-I und MHC-II MFI der Monozyten und Monozyten-PLA bei gesunden Probanden. **B:** Mittlere Fluoreszenzintensität der Zelloberflächenexpression von MHC-I und MHC-II Molekülen bei Monozyten und Monozyten-Plättchenkomplexen bei STEMI-Patienten. Oben: Histogramme der MHC-Fluoreszenz bei STEMI-Patienten. Rot: Plättchen-Monozytenkomplexe; grau: Monozyten. Unten: MHC-I und MHC-II MFI der Monozyten und Monozyten-PLA bei STEMI-Patienten.

4.2 Plättchen-Leukozytenkomplexe im prädiabetischen Mausmodell

In den vorausgegangenen Analysen wurde eine deutliche Erhöhung der Plättchen-Monozytenkomplexe in Blutproben von STEMI-Patienten beobachtet. Die Komplexe zeigten zudem eine höhere Migration in Richtung von MCP-1. Die Auswirkungen der Komplexbildung und der einhergehenden Funktionsänderung auf die akute Entzündung und den Heilungsprozess nach einem akuten Myokardinfarkt, kann jedoch nicht beim Menschen untersucht werden. Auf Grund der Aktivitätsänderung der Monozyten und der erhöhten Anzahl von Plättchen-Monozytenkomplexen wird vermutet, dass die Komplexe einen negativen Einfluss auf die Infarktheilung haben können.

Patienten mit Diabetes, die einen Myokardinfarkt erleiden zeigen über die Zeit eine schlechtere Herzfunktion, bis hin zum Herzversagen⁶². Zudem finden sich bei Diabetikern eine höhere Anzahl aktivierter Plättchen und höhere PLAs im Blut^{63,64}. Um zu untersuchen welchen Einfluss diese auf die Heilung nach Infarkt haben, wurden daher die Plättchen-Monozytenkomplexe im Blut von prädiabetischen C57BL/6 Mäusen untersucht. Es wurde eine Gruppe über die gesamte Zeit mit stark fetthaltigem Futter ernährt (DD-Tiere) und so ein Prädiabetes induziert⁶⁵, während eine zweite Gruppe mit gewöhnlichem Futter ernährt wurde (KonDD). Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Blut der Mäuse über 9 Wochen durchflusszytometrisch hinsichtlich ihrer Immunzelländerungen untersucht, und anschließend eine Ischämie/Reperfusion in der linken Koronararterie (LAD) induziert. Die Immunzellen wurden über einen Zeitraum von 21 Tagen nach Infarkt weiterhin durchflusszytometrisch, hinsichtlich ihrer Zellzahl im Blut untersucht. Während der gesamten Zeit wurden außerdem Herzfunktionsmessungen mittels MRT durchgeführt.

4.2.1 Die Plättchen-Monozytenkomplexe steigen nach Infarkt an

Die Plättchen-Monozytenkomplexe waren bei den STEMI-Patienten deutlich erhöht im Vergleich zu jenen bei KHK-Patienten. Nach 9 Wochen der spezifischen Fütterung beträgt der Anteil der CD41-positiven Monozyten bei den DD-Tieren $11,7 \% \pm 6,7 \%$, während jener bei den Kontrolltieren bei $17,8 \% \pm 11,2 \%$ liegt. Im Verlauf nach Infarkt schwanken die Werte etwas, bis sie nach 21 Tagen bei $27,4 \% \pm 4,9 \%$ bei den KonDD-Tieren liegen und bei $20,9 \% \pm 3,9 \%$ bei den DD-Tieren ($p = 0,05$). Die Zellzahlen der CD41-Komplexe steigen bei beiden Gruppen an. Die Zellzahlen der DD-Tiere schwanken im Verlauf etwas, liegen einen Tag nach Infarkt jedoch bei $653.430 \text{ Zellen/ml} \pm 805.703 \text{ Zellen/ml}$ und somit auf einem ähnlichen Niveau wie die der KonDD-Tiere. Nach 21 Tagen haben die CD41-Monozyten-Komplexe ihre Höchstwerte erreicht und liegen bei $1,7 \times 10^6 \text{ Zellen/ml} \pm 719.071 \text{ Zellen/ml}$ bei

den DD-Tieren und $2,1 \times 10^6$ Zellen/ml $\pm 1,0 \times 10^6$ Zellen/ml bei den Kontrolltieren. Abbildung 19 A macht deutlich, dass es innerhalb der Tiergruppen einige signifikante Unterschiede gibt. Die DD-Tiere sind sowohl im CD41-Anteil als auch bei den absoluten Zellzahlen zwischen 9 Wochen nach Infarkt und 7 Tagen nach Infarkt signifikant verschieden. Zudem gibt es bei den Zellzahlen Unterschiede bei den DD-Tieren zwischen 9 Wochen und 21 Tagen nach Infarkt und einem Tag und 21 Tagen nach Infarkt. Die CD41 positiven Monozyten steigen bei diesen Tieren im Verlauf nach Infarkt an. Die Kontrolltiere zeigen im Verlauf keinerlei signifikante Unterschiede.

Zusätzlich zum Plättchenmarker CD41, wurde auch der Marker für aktivierte Plättchen (CD62P) untersucht. Die Monozyten-CD62P-Komplexe haben über den gesamten Untersuchungszeitraum nur einen sehr kleinen Anteil an den Monozyten. So findet sich im Blut der Mäuse beider Gruppen zu Beginn lediglich ein Anteil von etwa 1 %. Dieser steigt im Verlauf bei den prädiabetischen Tieren auf $4,4 \% \pm 4,5 \%$ an, bleibt bei den Kontrolltieren jedoch bei $1,9 \% \pm 0,4 \%$. Trotz der geringen Werte gibt es einen signifikanten Unterschied bei den DD-Tieren in den Werten von Tag 3 und Tag 21 nach Infarkt. Betrachtet man die absoluten Zellzahlen der CD62P-Komplexe pro ml Blut, lässt sich hingegen bei beiden Gruppen ein deutlicher Anstieg erkennen. Über die Zeit schwanken die Komplexe etwas, steigen jedoch bei den DD-Tieren 21 Tage nach Infarkt auf 215.880 Zellen/ml ± 72.072 Zellen/ml an. Bei den Kontrolltieren sind 162.000 Zellen/ml ± 111.928 Zellen/ml von den Monozyten-CD62P-Komplexen vorhanden. Auch bei diesen Messungen lassen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den prädiabetischen Tieren und den Kontrolltieren feststellen. Wie in Abbildung 19 A dargestellt, gibt es jedoch signifikante Anstiege bei den DD-Tieren nach 9 Wochen und 21 Tagen nach Infarkt, sowie nach 3 Tagen und 21 Tagen nach Infarkt. Die Kontrolltiere zeigen einen signifikanten Anstieg zwischen den Werten von Tag 1 und Tag 21 nach Infarkt.

Die Anteile der Monozyten-CD41 Komplexe an den gesamten Monozyten ändern sich nur leicht im Verlauf nach Infarkt. Es wurden daher zusätzlich die Neutrophilen-Komplexe analysiert. Die CD41- und CD62P-positiven Neutrophilen sind in Abbildung 19 B dargestellt. Es lässt sich feststellen, dass die Anteile der Komplexe an den Neutrophilen nur sehr gering sind und Anteile von mehr als 2 % im Verlauf der Untersuchungen nicht erreicht werden. Zu Beginn der Messungen sind 14.760 Zellen/ml ± 29.856 Zellen/ml bei den DD-Tieren und 19.200 Zellen/ml ± 55.465 Zellen/ml bei den Kontrolltieren von den Neutrophilen-CD41-Komplexen vorhanden. An Tag 3 nach Infarkt hat die Zellzahl ihren höchsten Wert bei den DD-Tieren erreicht (100.500 Zellen/ml ± 151.468 Zellen/ml). Die Zellzahl im Blut der Kontrolltiere ist etwas niedriger, erreicht jedoch auch an Tag 3 ihren Maximalwert. Bei beiden

Tiergruppen sinken die Zellzahlen im weiteren Verlauf deutlich ab und sind nach 21 Tagen niedriger als zu Beginn der Untersuchungen. Die Zellzahlen bei den Neutrophilen-CD62P Komplexen sind im Blut der Tiere noch deutlich geringer als die der Neutrophilen-CD41 Komplexe. Trotz des sehr niedrigen Anteils CD41-positiver Neutrophiler, ist ein signifikanter Abfall der Werte von Tag 3 nach Infarkt zu Tag 21 nach Infarkt bei den Kontrolltieren zu beobachten. Dieser Abfall ist auch bei den Zellzahlen signifikant.

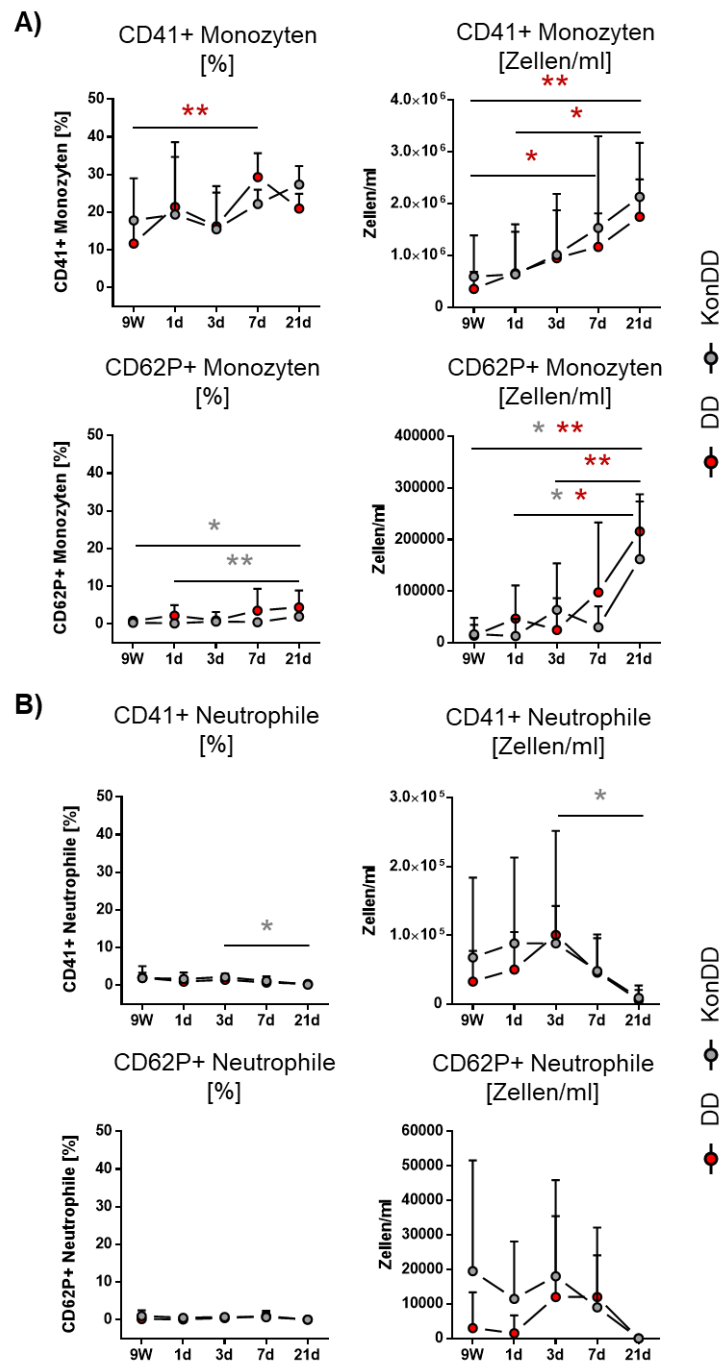


Abbildung 19: Monozyten- und Neutrophilenkomplexe bei den verschiedenen Mausgruppen im Verlauf nach Infarkt. Grau: Kontrolltiere; rot: DD-Tiere. Dargestellt ist der MW $\pm$ SD. n= 4-15. *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; rote Sterne: Unterschiede zwischen DD-Proben; graue Sterne: Unterschiede zwischen KonDD-Proben. **A:** Zellzahl und Anteil der verschiedenen Monozyten-CD41- und CD62P-Komplexe im Blut bei DD-Tieren und Kontrolltieren. **B:** Zellzahl und Anteil der verschiedenen Neutrophilen-CD41- und CD62P-Komplexe im Blut bei DD-Tieren und Kontrolltieren.

4.2.2 Die Monozytenzahl im Blut steigt nach Infarkt an

Die Anteile der verschiedenen Komplexe ändern sich im Verlauf der Untersuchungen nicht, jedoch die Zellzahlen pro ml Blut. Es kann daher von deutlichen Änderungen der Neutrophilen-

und Monozytenzahlen ausgegangen werden. Die Zellzahlen wurden auf Grund dessen im nächsten Schritt untersucht.

So sinkt die Zahl der Monozyten im Blut der DD-Tiere an Tag 1 nach Infarkt von $3,3 \times 10^6$ Zellen/ml $\pm 3,3 \times 10^6$ Zellen/ml zunächst ab und steigt an Tag 21 nach Infarkt auf $8,4 \times 10^6$ Zellen/ml $\pm 3,6 \times 10^6$ Zellen/ml an. Gleichzeitig steigt die Zahl bei den Kontrolltieren von $2,0 \times 10^6$ Zellen/ml $\pm 1,1 \times 10^6$ Zellen/ml auf $5,5 \times 10^6$ Zellen/ml ± 768.968 Zellen/ml an.

Die Neutrophilen zeigen nach Infarkt einen deutlichen Anstieg in ihrer Zellzahl (siehe Abbildung 20 A, rechts). Bereits einen Tag nach Infarkt sind deutlich mehr Neutrophile im Blut zu verzeichnen. In den folgenden Tagen nach Infarkt sinken die Neutrophilen bei den Kontrolltieren wieder ab, steigen zwischen 7 Tagen und 21 Tagen nach Infarkt jedoch wieder an ($4,7 \times 10^6$ Zellen/ml $\pm 2,0 \times 10^6$ Zellen/ml). Bei den DD-Tieren hingegen steigt die Neutrophilenzahl in den ersten Tagen nach Infarkt noch weiter an. Bis zum 21. Tag nach Infarkt fällt die Neutrophilenzahl bei Tieren mit fettreicher Diät jedoch wieder ab. Wie in Abbildung 20 A zu sehen, gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen den DD- und den KonDD-Tieren. Jedoch gibt es innerhalb der Tiergruppen im Verlauf der Zeit einige signifikante Änderungen. So ist beispielsweise bei beiden Tiergruppen der Anstieg der Monozyten zwischen Tag 1 und Tag 21 nach Infarkt signifikant. Bei den Neutrophilen hingegen ist lediglich der Anstieg von 9 Wochen zu 3 Tagen nach Infarkt bei den Kontrolltieren signifikant.

Abbildung 20 B zeigt die Änderungen in den Monozytensubpopulationen im Verlauf nach Infarkt. Während die klassischen Monozyten nach 9 Wochen einen Anteil von etwa 26 % an den Monozyten haben, liegen die übrigen Monozytengruppen bei etwa 37 %. In den folgenden Tagen nach Infarkt durchlaufen die Anteile einige Schwankungen, bis schließlich an Tag 21 22,7 % $\pm 6,4$ % klassische Monozyten, 44,4 % $\pm 8,8$ % nicht-klassische Monozyten und 30,9 % ± 4 % intermediäre Monozyten bei den prädiabetischen Tieren vorhanden sind. Die Anteile bei der Kontrollgruppe sind ähnlich. Zwischen den Tiergruppen sind keine signifikanten Unterschiede feststellbar und auch die Änderungen über die Zeit sind bis auf einen signifikanten Unterschied bei den intermediären Monozyten der DD-Tiere (1 Tag und 7 Tage nach Infarkt) nicht signifikant.

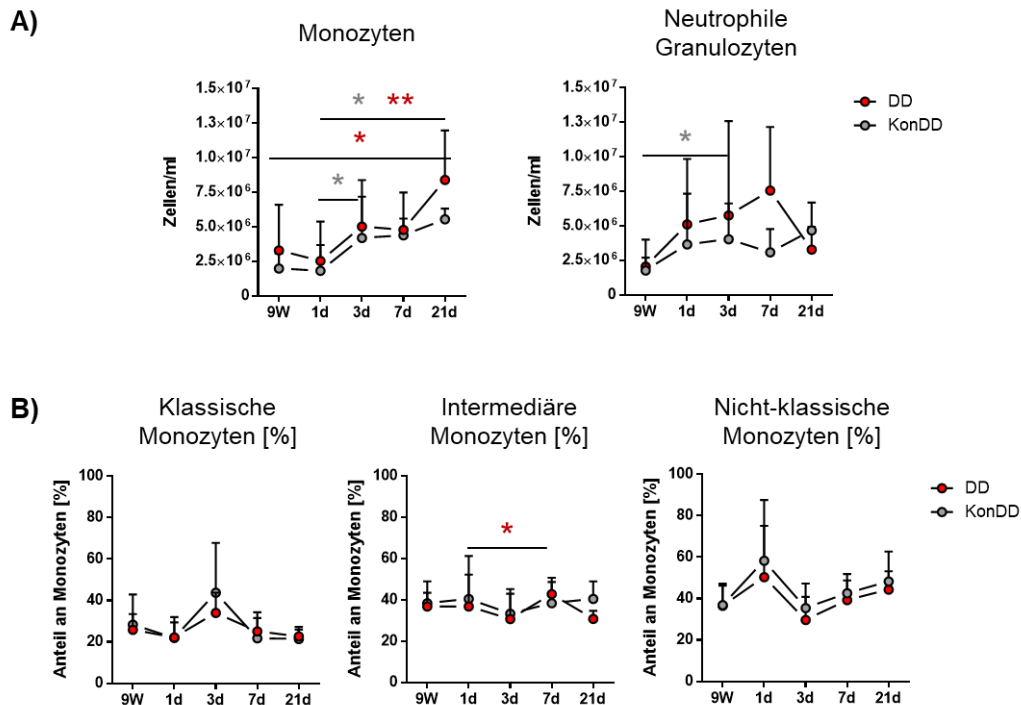


Abbildung 20: Monozyten, Neutrophile Granulozyten und Monozytensubpopulationen im Vollblut im Vergleich nach Infarkt. Grau: Kontrolltiere; rot: prädiabetische Tiere. Dargestellt ist der MW ± SD. n= 4-15. *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; rote Sterne: Unterschiede zwischen DD-Proben; graue Sterne: Unterschiede zwischen KonDD-Proben. **A:** Zellzahlen pro ml der Monozyten (links) und neutrophilen Granulozyten (rechts) in Zellen/ml Blut bei den verschiedenen Tieren im Zeitverlauf. **B:** Relative Anteile der Monozytensubtypen an den Monozyten in % bei den verschiedenen Gruppen über die gesamte Versuchsdauer.

4.2.3 Analyse des Blutzuckerwertes vor und nach einem Myokardinfarkt

Nach 9 Wochen der Fütterung wurde experimentell durch Abbinden der LAD eine Myokardischämie mit anschließender Reperfusion induziert. Zudem wurde das Gewicht und die Glukosetoleranz der Tiere ermittelt. 9 Wochen nach Fütterung lag das Gewicht der DD-Tiere bei einem durchschnittlichen Wert von $33,6 \text{ g} \pm 6,7 \text{ g}$, während das der KonDD-Tiere bei $31,5 \text{ g} \pm 4,8 \text{ g}$ lag (siehe Abbildung 21). Nach Induktion des Infarktes sank das Gewicht in der Kontrollgruppe und lag nur noch bei $24,3 \text{ g} \pm 1,2 \text{ g}$ an Tag 3 nach Infarkt. Das Gewicht der DD-Tiere lag zu diesem Zeitpunkt hingegen bei $37,6 \text{ g} \pm 0,8 \text{ g}$ ($p < 0,0001$). Mit der Zeit stieg das Tiergewicht in beiden Gruppen an, bis es bei den DD-Tieren an Tag 21 nach Infarkt bei $38,9 \text{ g} \pm 5,4 \text{ g}$ lag und bei den KonDD-Tieren bei $29,7 \text{ g} \pm 2,1 \text{ g}$ ($p = 0,0017$). Der Übersicht halber sind in der Abbildung lediglich die Signifikanzen zwischen den Gruppen dargestellt, es gibt jedoch auch innerhalb der Gruppen im Zeitverlauf signifikante Unterschiede.

Neben dem Gewicht wurde der Blutzuckerwert der Tiere im nüchternen Zustand gemessen. In den 9 Wochen nach der Fütterung liegt der Wert bei den DD-Tieren bei $207,2 \text{ mg/dl} \pm 24 \text{ mg/dl}$, während der Wert bei den Kon-DD Tieren bei $149,6 \text{ mg/dl} \pm 32,8 \text{ mg/dl}$ lag

($p = 0,0017$). An Tag 3 nach Infarkt war der Wert in beiden Gruppen gesunken (siehe Abbildung 21 Mitte). So lag der Nüchternwert bei den DD-Tieren bei $157,8 \text{ mg/dl} \pm 38,3 \text{ mg/dl}$. An Tag 21 post MI war der Wert der DD-Tiere wieder auf $171,5 \text{ mg/dl} \pm 17,2 \text{ mg/dl}$ angestiegen, wohingegen die Kontrolltiere bei $120 \text{ mg/dl} \pm 10 \text{ mg/dl}$ lagen ($p = 0,0007$).

Die Glukosetoleranz der verschiedenen Gruppen wurde 21 Tagen nach Infarkt ermittelt. Mit $180,6 \text{ mg/dl} \pm 22,3 \text{ mg/dl}$ lag der Wert für die DD-Tiere deutlich über dem der Kontrolltiere ($p = 0,0005$). Nach 15 Minuten erreichten beide Tiergruppen ein Maximum (DD: $414,6 \text{ mg/dl} \pm 83,4$; KonDD: $281,3 \text{ mg/dl} \pm 62,5$; $p = 0,019$) und sank im Anschluss wieder ab, bis nach 120 Minuten der Wert für die DD-Tiere bei $235,9 \text{ mg/dl} \pm 51,7 \text{ mg/dl}$ lag und bei den KonDD-Tieren bei $178,3 \text{ mg/dl} \pm 29,9 \text{ mg/dl}$. Die signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen sind in Abbildung 21 dargestellt. Signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen sind auch vorhanden, jedoch nicht abgebildet.

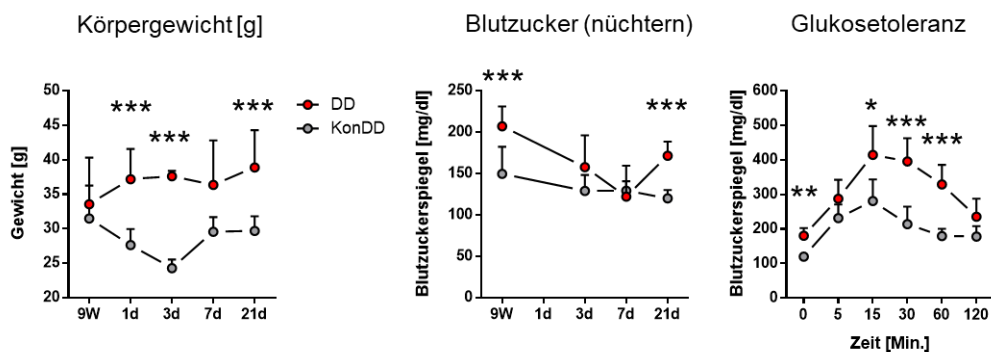


Abbildung 21: Körpergewichte [g], und Blutzuckerwerte [mg/dl] der beiden Mausgruppen nach Infarkt. Grau: Kontrolltiere; rot: DD-Tiere. Dargestellt ist der MW $\pm$ SD. $n = 3-15$. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,005$. Links: Gewicht der Mäuse in g über die zu verschiedenen Zeitpunkten post MI. Mitte: Blutzuckerwert der nüchternen Mäuse in mg/dl Blut bei den verschiedenen Tieren nach Infarkt. Rechts: Glukosetoleranztests 21 Tage post MI. Die Werte der verschiedenen Tiergruppen sind in mg/dl angegeben.

4.2.4 DD-Tiere haben keine erhöhte Anzahl von Herzimmunzellen

Es wurden auch die Immunzellen im Herzen nach Infarkt näher untersucht, um herauszufinden, wie die Anteile dieser im infarzierten Herz sind. Ein Teil der Tiere wurde dazu an Tag 4 nach Infarkt getötet, die Herzen entnommen, gewogen und verdaut, ehe die Immunzellen durchflusszytometrisch bestimmt wurden.

Zur Berechnung der Immunzellen wurden zuvor das Herzgewicht ermittelt. In Abbildung 22, links, ist zu entnehmen, dass das Gewicht der Herzen beider Tiergruppen durchschnittlich bei etwa 245 mg lag.

Abbildung 22 rechts zeigt die Herzzimmunzellen pro mg. Es wurden Neutrophile, Monozyten, Makrophagen und Monozyten-differenzierte Makrophagen durchflusszytometrisch bestimmt. Bei beiden Tiergruppen sind die Makrophagen die größte Population. So sind bei den DD-Tieren 9.319 Zellen/mg $\pm$ 9.715 Zellen/mg und bei den KonDD-Tieren 16.083 Zellen/mg $\pm$ 16.502 Zellen/mg zu finden. Die kleinste Zellgruppe sind die Monozyten mit 886 Zellen/mg bei den prädiabetischen Tieren und 2.885 Zellen/mg bei den KonDD-Tieren. Trotz der großen Unterschiede zwischen den Tiergruppen, sind die Daten nicht signifikant verschieden.

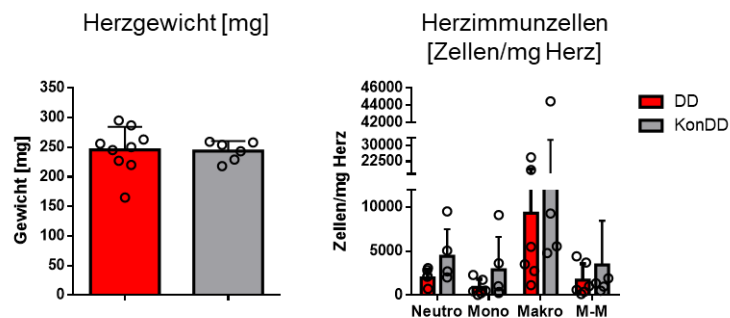


Abbildung 22: Herzgewicht in mg und Zellzahl der Herzzimmunzellen in Zellen/mg bei den beiden Tiergruppen. Grau: Kontrolltiere; rot: prädiabetische Tiere. Dargestellt ist der MW $\pm$ SD. n= 5-6. **links:** Herzgewicht in mg bei den Tieren an Tag 4 nach Infarkt. **rechts:** Immunkzellen des Herzens in Zellen/mg Herz an Tag 4 nach Infarkt. Es wurden Neutrophile Granulozyten (Neutro), Monozyten (Mono), Makrophagen (Makro) und Monozyten-assoziierte Makrophagen (M-M) untersucht.

4.2.5 Diabetische Tiere zeigen einen größeren Myokardinfarkt

In den Humanversuchen und den Mausversuchen wurden steigende Plättchen-Immunzellkomplexe nach Infarkt beobachtet. Der Einfluss dieser auf die Heilung nach Infarkt sollte im Anschluss analysiert werden. Zu diesem Zweck wurden die Mäuse immer wieder in Zusammenarbeit mit Frau Vera Flocke im Magnetresonanztomographen hinsichtlich der Ejektionsfraktion untersucht. Abbildung 23 A zeigt magnetresonanztomografische Bilder im Längs- und Querschnitt einer prädiabetischen Maus. Die obere Reihe zeigt das Herz der Maus vor Beginn der Fütterung, während die zweite Reihe das Herz einen Tag nach Infarkt zeigt. Hier wurde zudem mit Gadolinium-Kontrast gearbeitet, um minder mit Blut perfundierte Areale im Herzgewebe zu erkennen. Im Herzmuskel des linken Ventrikels ist hier ein hellerer, kontrastarmer Bereich zu erkennen, welcher das infarzierte Areal darstellt. Die Untere Reihe zeigt das Herz nach 21 Tagen nach Infarkt. Die Herzmuskelwand scheint dünner als zu Beginn der Untersuchungsreihe und das Lumen des Ventrikels scheint größer.

Die Auswertung der MRT-Untersuchungen ist in Abbildung 23 dargestellt. Am ersten Tag nach Infarkt liegt die linksventrikuläre Ejektionsfraktion der Kontrolltiere bei etwa 44 %, während die der DD-Tiere bei etwa 38,5 % liegt (siehe Abbildung 23 A, links). An Tag 3 nach Infarkt steigt

diese bei beiden Gruppen leicht an, sinkt jedoch nach 21 Tagen auf $33,7 \% \pm 7,8 \%$ bei den KonDD-Tieren bzw. $34,2 \% \pm 14,8 \%$ bei den DD-Tieren. Im Magnetresonanztomographen wurde nicht nur die Ejektionsfraktion bestimmt, sondern, wie in Abbildung 23 A dargestellt, auch die Größe des infarzierten Bereichs an Tag 1 nach Infarkt. Dargestellt wurde dieser mit Hilfe einer Injektion von Gadolinium. Der infarzierte Bereich der Kontrolltiere ist mit $29,4 \% \pm 10,2 \%$ deutlich kleiner als bei den prädiabetischen Tieren ($43,9 \% \pm 10,6 \%$). Weder die Daten zum LGE noch jene zur Ejektionsfraktion zeigen jedoch signifikante Unterschiede.

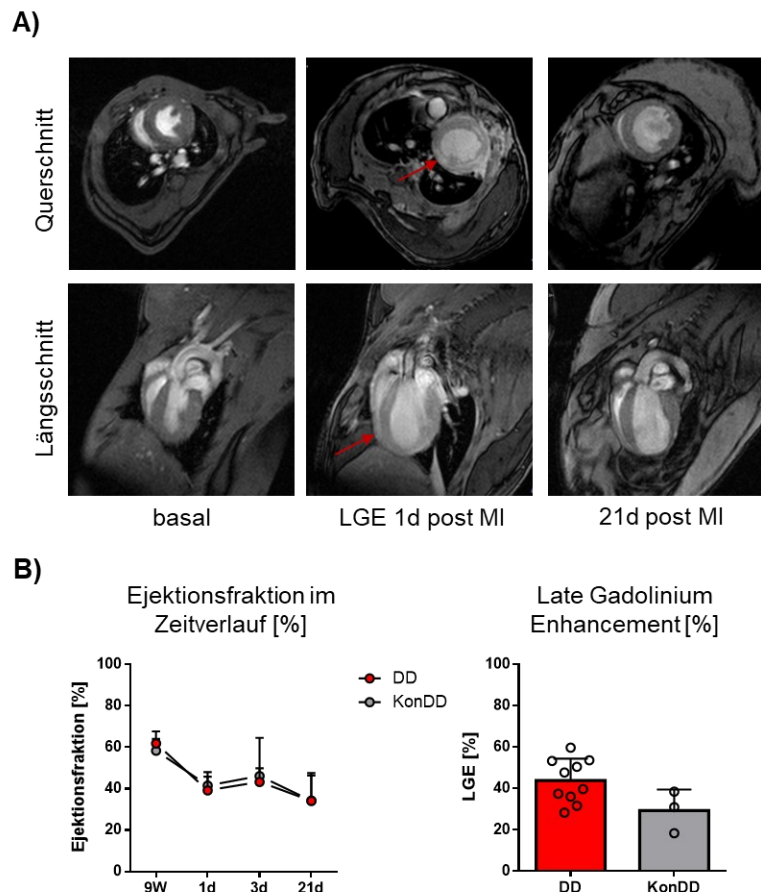


Abbildung 23: Magnetresonanztomographische Messungen der Herzen der Tiere. A: Grafische Darstellung der magnetresonanztomographischen Messungen am Beispiel eines DD-Tiers. Es sind jeweils Quer- und Längsschnitte dargestellt. Obere Reihe: Basalmessungen. Mittlere Reihe: Late Gadolinium Enhancement (LGE) an Tag 1 nach Infarkt. Untere Reihe: 21 Tage nach Infarkt. **B:** links: Ejektionsfraktion der Herzen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infarkt in %. rechts: Die Größe des infarzierten Areals mit Hilfe des Late Gadolinium Enhancements in %. Grau: Kontrolltiere; rot: prädiabetische Tiere. Dargestellt ist der MW $\pm$ SD. n= 3-10.

Um noch einmal ein genaueres Bild der Narbengröße an Tag 21 nach Infarkt zu erhalten, wurden die Tiere an Tag 21 schmerzfrei getötet, die Herzen entnommen und mit einer Gomoris-Färbung gefärbt. Auf diese Weise konnte histologisch der Narbenbereich beider Ventrikel, sowie des gesamten Herzens bestimmt werden. Abbildung 24 A zeigt hierzu je einen Querschnitt eines Herzens aus beiden Tiergruppen. In lila ist das Herzmuskelgewebe zu

sehen, während das Narbengewebe eher grau gefärbt ist. Wie in Abbildung 24 B, links zu erkennen, ist vor allem der linke Ventrikel vom Narbengewebe durchzogen. So sind es bei den Kontrolltieren $18,8 \% \pm 14,3 \%$ und bei den DD-Tieren $21,2 \% \pm 5,5 \%$. Der Anteil des Narbengewebes am gesamten Herz beträgt $12,7 \% \pm 9 \%$ bei den KonDD-Tieren bzw. $15,8 \% \pm 4,6 \%$ bei den DD-Tieren.

Um ein Gefühl zu erhalten, ob die Herzen in ihren Ventrikelanteilen insgesamt vergleichbar sind, wurde zusätzlich der Anteil der Ventrikel an den Herzen bestimmt. Dieser beträgt für den linken Ventrikel bei beiden Gruppen etwa 72% .

Die Untersuchungen zu Narbengröße und Ventrikelanteil zeigen keinerlei signifikante Unterschiede.

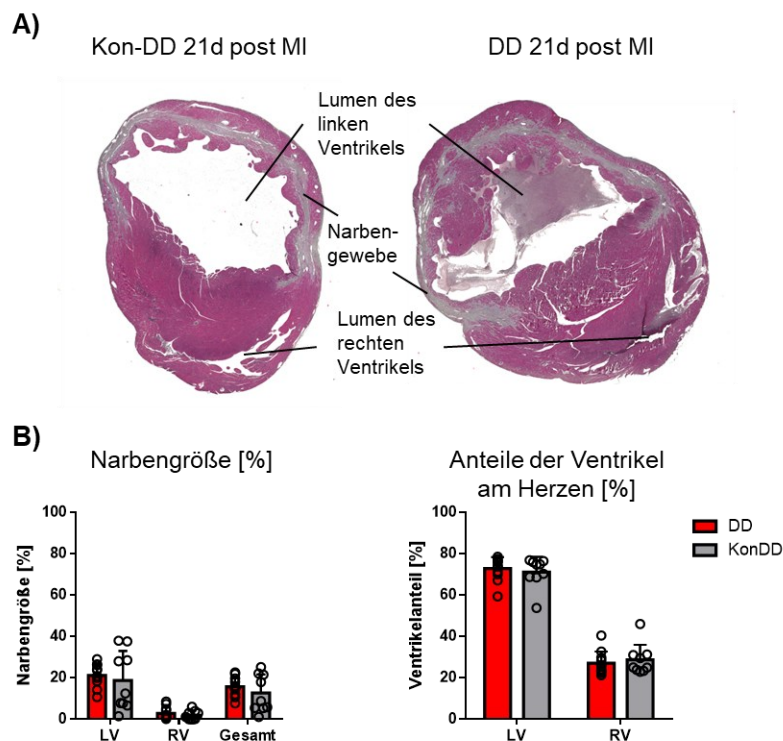


Abbildung 24: Gomori-Färbung zur Bestimmung der Narbengröße. A: Beispielbilder einer Gomori-Färbung beider Tiergruppen 21 Tage nach Infarkt. **B:** Histologische Untersuchungen der Narbengröße und Ventrikelanteile in %. links: Die Narbengröße in rechtem (RV) und linkem (LV) Ventrikel, sowie im gesamten Herz in %. rechts: Die Anteile der beiden Ventrikel am gesamten Herzen in Prozent. Grau: Kontrolltiere; rot: prädiabetische Tiere. Dargestellt ist der MW $\pm$ SD. n= 9-11.

4.2.6 Die Mortalität nach einem Myokardinfarkt ist bei den Kontrolltieren höher

Studien konnten zeigen, dass Diabetespatienten eine höhere Mortalität nach einem akuten Myokardinfarkt haben⁶⁶. Es sollte daher untersucht werden, inwieweit unsere Daten

möglicherweise auf den Menschen übertragbar sind. Hierzu wurde die Mortalitätsrate der Mäuse bestimmt. Es handelte sich um zwei Versuchsreihen. Bei der ersten wurden die Tiere an Tag 4 nach Infarkt schmerzfrei getötet, und die Herzzimmunzellen analysiert. Bei der zweiten Versuchsreihe wurden die Tiere an Tag 21 nach Infarkt schmerzfrei getötet und histologische Schnitte der Herzen angefertigt. Sowohl die Mäuse, welche nach 4 Tagen schmerzfrei getötet wurden, als auch jene, welche bis Tag 21 nach Infarkt leben sollten, zeigen bei den Kontrolltieren eine höhere Mortalität. Wie Abbildung 25 zu entnehmen, lebten bei den 4 Tages-Tieren mit Prädiabetes noch 75 % zum Versuchsende, bei den Kontrolltieren jedoch nur noch 62,5 %. Ähnlich sind die Werte bei den 21-Tage-Tieren. Hier lebten noch 84,6 % (DD-Tiere) bzw. 54,5 % (KonDD-Tiere). Die Mortalitätsunterschiede sind jedoch nicht signifikant.

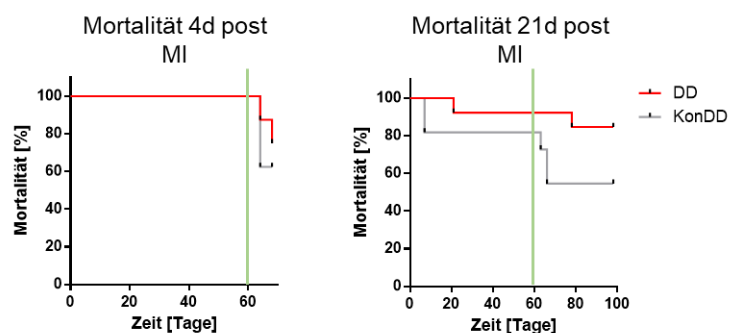


Abbildung 25: Mortalitätsraten der verschiedenen Mäuse in %. Grau: Kontrolltiere; rot: prädiabetische Tiere. n= 8-13. Der Zeitpunkt der Infarktinduktion ist in grün markiert. **links:** Mortalitätsraten der Mäuse, welche bis Tag 4 nach Infarkt untersucht wurden in %. **rechts:** Mortalitätsraten der Mäuse, welche bis Tag 21 nach Infarkt untersucht wurden in %.

4.2.7 DD-Tiere zeigen einen deutlich höheren Blutzuckerwert

Nach Infarkt zeigen sich zwischen den Tiergruppen nur leichte Unterschiede was die Immunzellen und die Infarktgrößen betrifft (siehe 4.2.1, 4.2.2, 4.2.4 und 4.2.5). Um sich ein Bild vom diabetischen Zustand der verschiedenen Tiergruppen machen zu können, bevor ein Infarkt induziert wurde, wurde auch der Blutzuckerspiegel vor diesem ermittelt. Die Messungen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten der Fütterung durchgeführt. Zunächst wurden Basalwerte ermittelt, ohne die Tiere in die Futtergruppen zu unterteilen. Die Tiere wurden erst im Anschluss daran ihren Futtergruppen zugeteilt und darauf geachtet, dass sowohl Gewicht als auch der nüchterne Blutzuckerwert keine Unterschiede aufweisen. In den ersten 9 Wochen steigt das Gewicht sowohl bei den DD-Tieren als auch bei den KonDD-Tieren an (siehe Abbildung 26). Das Gewicht der DD-Tiere erreichte einen durchschnittlichen Wert von $33,6 \text{ g} \pm 6,7 \text{ g}$, während das der KonDD-Tiere bei $31,5 \text{ g} \pm 4,8 \text{ g}$ lag. Die Körpergewichte sind zwischen den Gruppen nicht signifikant verschieden.

Neben dem Gewicht wurde basal der Blutzuckerwert der Tiere im nüchternen Zustand gemessen. Der Nüchtern-Blutzuckerwert der Tiere ist in Abbildung 26 dargestellt und lag in der DD-Gruppe bei $144,3 \text{ mg/dl} \pm 23 \text{ mg/dl}$ und bei den späteren Kon-DD Tieren bei $185,1 \text{ mg/dl} \pm 36,3 \text{ mg/dl}$. In den 9 Woche nach der Fütterung stieg der Wert bei den DD-Tieren deutlich an und lag bei $207,2 \text{ mg/dl} \pm 24 \text{ mg/dl}$, während der Wert bei den Kon-DD Tieren sank und bei $149,6 \text{ mg/dl} \pm 32,8 \text{ mg/dl}$ lag ($p < 0,005$).

Die Glukosetoleranz der verschiedenen Gruppen, welche in Abbildung 26 zu sehen ist, wurde nach 8 Wochen Fütterung ermittelt. Zunächst wurde hierzu der nüchterne Blutzuckerwert ermittelt und im Anschluss jedem Tier die gleiche Dosis Glukose subkutan injiziert. Die Blutzuckerwerte wurden nach 5, 15, 30, 60 und 120 Minuten ermittelt. Der Kontrollwert der DD-Tiere lag bei $212,1 \text{ mg/dl} \pm 22,7 \text{ mg/dl}$ und der der Kontrollgruppe bei $143 \text{ mg/dl} \pm 15,9 \text{ mg/dl}$ ($p < 0,005$). Beide Gruppen erreichten ihren höchsten Wert nach 15 Minuten. Dieser lag bei den DD-Tieren bei $415,4 \text{ mg/dl} \pm 61 \text{ mg/dl}$ und bei den KonDD-Tieren bei $294 \text{ mg/dl} \pm 35,2 \text{ mg/dl}$ ($p < 0,005$). Abbildung 26 ist zu entnehmen, dass die Werte im Anschluss wieder sanken. Nach 120 Minuten hatten sie bei beiden Gruppen wieder nahezu den ursprünglichen Wert erreicht. So lag der Blutzuckerwert der DD-Tiere bei $239,1 \text{ mg/dl} \pm 47,4 \text{ mg/dl}$ und der Kontrolltiere bei $153,4 \text{ mg/dl} \pm 32,4 \text{ mg/dl}$ ($p < 0,005$).

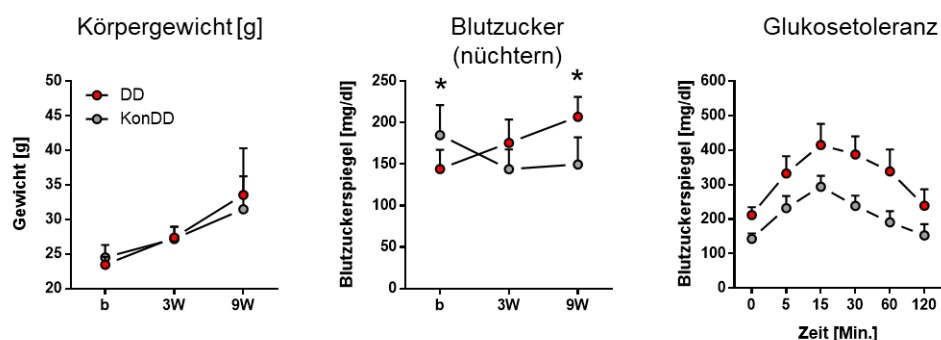


Abbildung 26: Körpergewichte [g], und Blutzuckerwerte [mg/dl] der beiden Mausgruppen ohne Infarkt. Grau: Kontrolltiere; rot: DD-Tiere. NBZ: nüchtern Blutzuckerwert. Dargestellt ist der MW $\pm$ SD. $n = 3-15$. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,005$. Links: Gewicht der Mäuse in g über die Zeit des Versuchs. Mitte: Blutzuckerwert der nüchternen Mäuse in mg/dl Blut bei den verschiedenen Tieren im Zeitverlauf. Rechts: Glukosetoleranztests nach 8 Wochen. Die Werte der verschiedenen Tiergruppen sind in mg/dl angegeben. Die Werte zwischen den Tiergruppen sind zu allen Zeitpunkten signifikant verschieden ($p < 0,005$).

4.2.8 PMA-Anteile sind zwischen den Tiergruppen nicht verschieden

Die Tiergewichte und Blutzuckerwerte zeigen zwischen den Mausgruppen deutliche Unterschiede. Es sollte daher anschließend untersucht werden inwieweit sich die Immunzellen bei den Mäusen verändern. Es wurde den Mäusen daher basal, sowie nach 3 und 9 Wochen der Fütterung Blut abgenommen und durchflusszytometrisch untersucht.

Hierzu wurden bei den Mäusen zunächst die Plättchen-Monozytenkomplexe durchflusszytometrisch analysiert. Wie in Abbildung 27 A dargestellt, liegen die Monozyten-CD41-Komplexe bei beiden Tiergruppen in den Basalmessungen bei etwa 16 % und ändern sich nach 9 Wochen nur leicht. Bei den DD-Tieren beträgt der Anteil nach 9 Wochen $11,7 \% \pm 6,7 \%$, während jener bei den Kontrolltieren auf $17,8 \% \pm 11,2 \%$ ansteigt. Die Gesamtzellzahlen der CD41-Komplexe im Blut steigen bei beiden Gruppen an. So liegen beide Tiergruppen zu Beginn bei etwa 325000 Zellen/ml. Die Zellzahlen der DD-Tiere schwanken im Verlauf etwas, und liegen nach 9 Wochen mit $354.378 \text{ Zellen/ml} \pm 325.700 \text{ Zellen/ml}$ nur etwas höher als zu Beginn. Die CD41+ Monozyten der KonDD-Tiere sind mit $591.230 \text{ Zellen/ml} \pm 798.310 \text{ Zellen/ml}$ deutlich gestiegen nach 9 Wochen. Einen signifikanten Unterschied zwischen den DD- und den KonDD-Tieren gibt es nicht.

Zusätzlich zum Plättchenmarker CD41, wurde auch der Marker für aktivierte Plättchen (CD62P) untersucht. Die Monozyten-CD62P-Komplexe haben über den gesamten Untersuchungszeitraum nur einen sehr kleinen Anteil an den Monozyten. So findet sich im Blut der Mäuse beider Gruppen zu Beginn lediglich ein Anteil von etwa 1 %. Dieser sinkt im Verlauf bei den prädiabetischen Tieren auf $0,3 \% \pm 0,5 \%$ ab, wohingegen der Anteil bei den Kontrolltieren nur etwas geringer abfällt. Betrachtet man die absoluten Zellzahlen der CD62P-Komplexe pro ml Blut, lässt sich hingegen bei beiden Gruppen ein deutlicher Anstieg erkennen. Zu Beginn des Untersuchungszeitraums sind bei den DD-Tieren etwa 9000 Zellen/ml Blut vorhanden, während es bei den KonDD-Tieren mit 21.600 Zellen/ml deutlich mehr sind. Über die Zeit schwanken die Komplexe etwas, steigen jedoch bei den DD-Tieren nach 9 Wochen auf $13.846 \text{ Zellen/ml} \pm 20.984 \text{ Zellen/ml}$ an. Bei den Kontrolltieren sind $16.615 \text{ Zellen/ml} \pm 31.574 \text{ Zellen/ml}$ von den Monozyten-CD62P-Komplexen vorhanden. Auch bei diesen Messungen lassen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den prädiabetischen Tieren und den Kontrolltieren feststellen. Auch innerhalb der Gruppen sind die Veränderungen im Zeitverlauf nicht signifikant.

Die Anteile der Monozyten-CD41 Komplexe an den gesamten Monozyten ändern sich nur leicht im Verlauf nach Infarkt. Es wurden daher zusätzlich Neutrophilen-Plättchen-Komplexe analysiert. Die verschiedenen Komplexe sind in Abbildung 27 B dargestellt. Es lässt sich feststellen, dass die Anteile der Komplexe an den Neutrophilen nur sehr gering sind und Anteile von mehr als 2 % im Verlauf der Untersuchungen nicht erreicht werden. Zu Beginn der Messungen sind $14.760 \text{ Zellen/ml} \pm 29.856 \text{ Zellen/ml}$ bei den DD-Tieren und $19.200 \text{ Zellen/ml} \pm 55.465 \text{ Zellen/ml}$ bei den Kontrolltieren von den Neutrophilen-CD41 Komplexen vorhanden. Nach 9 Wochen sind bei den DD-Tieren mit $32.760 \text{ Zellen/ml} \pm 44.606 \text{ Zellen/ml}$ mehr CD41-Neutrophilekomplexe vorhanden, jedoch

deutlich weniger als bei den Kontrolltieren (67.846 Zellen/ml $\pm$ 115.993 Zellen/ml). Die Daten zu den Neutrophilenkomplexen sind nicht signifikant unterschiedlich.

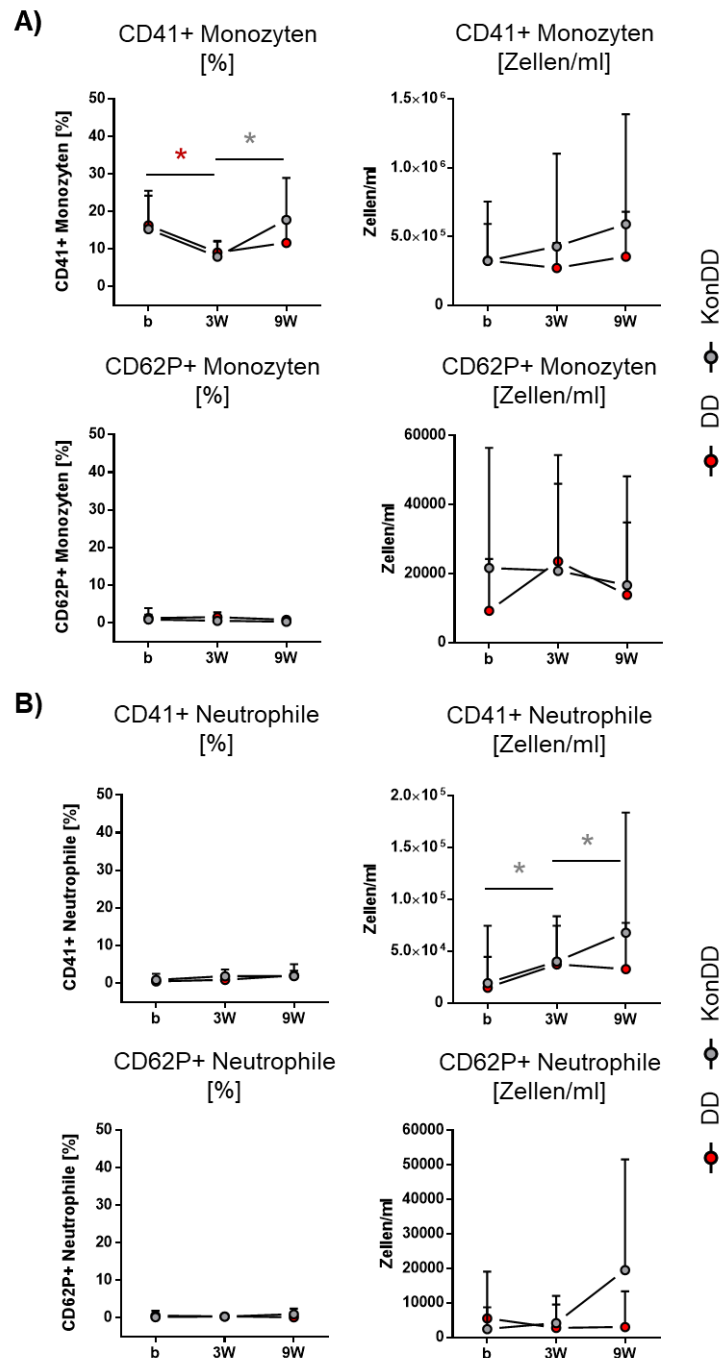


Abbildung 27: Monozytenkomplexe und Neutrophilenkomplexe bei DD und KonDD-Tieren ohne Infarktinduktion. Grau: Kontrolltiere; rot: DD-Tiere. Dargestellt ist der MW $\pm$ SD. n = 4-15. * p $\leq$ 0,05; ** p $\leq$ 0,01. **A:** Zellzahl und Anteil der verschiedenen Monozyten-CD41- und CD62P-Komplexe im Vollblut bei DD-Tieren und Kontrolltieren über 9 Wochen Fütterung. **B:** Zellzahl und Anteil der verschiedenen Neutrophilen-CD41- und CD62P-Komplexe im Vollblut bei prädiabetischen Tieren und Kontrolltieren über 9 Wochen Fütterung.

4.2.9 Die Neutrophilen- und Monozytenzahlen steigen zunächst an

Die relativen Anteile der verschiedenen Komplexe ändern sich im Verlauf der Untersuchungen nicht, jedoch die Zellzahlen pro ml Blut. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass sich die Zellzahlen der Monozyten und Neutrophilen im Versuchsverlauf deutlich ändern, daher wurden diese im nächsten Schritt untersucht.

In Abbildung 28 A ist die Zellzahl der Monozyten im Verlauf der Fütterung dargestellt. So steigt die Zahl der Monozyten im Blut der DD-Tiere von $1,9 \times 10^6$ Zellen/ml $\pm 1,5 \times 10^6$ Zellen/ml auf $3,3 \times 10^6$ Zellen/ml $\pm 3,3 \times 10^6$ Zellen/ml an. Gleichzeitig steigt die Zahl bei den Kontrolltieren von $1,4 \times 10^6$ Zellen/ml ± 574.983 Zellen/ml auf $2,0 \times 10^6$ Zellen/ml $\pm 1,1 \times 10^6$ Zellen/ml an.

Die Neutrophilen steigen zunächst bei beiden Tierpopulationen nur leicht an (siehe Abbildung 28 A, rechts). So sind in Basalmessungen $1,7 \times 10^6$ Zellen/ml $\pm 2,1 \times 10^6$ Zellen/ml bei den DD-Tieren und $1,0 \times 10^6$ Zellen/ml ± 293.333 Zellen/ml bei den Kontrolltieren zu finden. Nach 9 Wochen der Fütterung ist ein leichter Anstieg der Zellzahl der Neutrophile im Blut zu verzeichnen (DD: $2,1 \times 10^6$ Zellen/ml $\pm 2,0 \times 10^6$ Zellen/ml; KonDD: $1,8 \times 10^6$ Zellen/ml ± 920.301 Zellen/ml). Wie in Abbildung 28 A zu sehen, gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen den DD- und den KonDD-Tieren.

Auf Grund der Änderungen der Zellzahl bei den Monozyten, wurden zudem die Monozytensubpopulationen näher analysiert. Dies sollte Aufschluss darüber geben, welche Zellen den Anstieg verursachen. In Abbildung 28 B ist zu sehen, dass alle Subpopulationen starke Schwankungen im Zellanteil an den Monozyten zeigen. In Basalmessungen zeigen sich 28,1 % ± 8 % klassische Monozyten, 41,7 % ± 8 % nicht-klassische Monozyten und 28,2 % $\pm 5,7$ % intermediäre Monozyten bei den DD-Tieren. Nach 9 Wochen ist der Anteil der intermediären Monozyten leicht angestiegen, während die Anteile der anderen Subpopulationen leicht absinken. Wie in Abbildung 28 B zu sehen, sind diese Tendenzen bei den Kontrolltieren sehr ähnlich. Zwischen den Tiergruppen sind keine signifikanten Unterschiede feststellbar, jedoch unterscheiden sich die Anteile der klassischen Monozyten der DD-Tiere in den Basalmessungen von denen 3 Wochen nach Fütterungsbeginn signifikant. Die nicht-klassischen Monozyten der Kontrolltiere sinken signifikant nach 9 Wochen Fütterung ab.

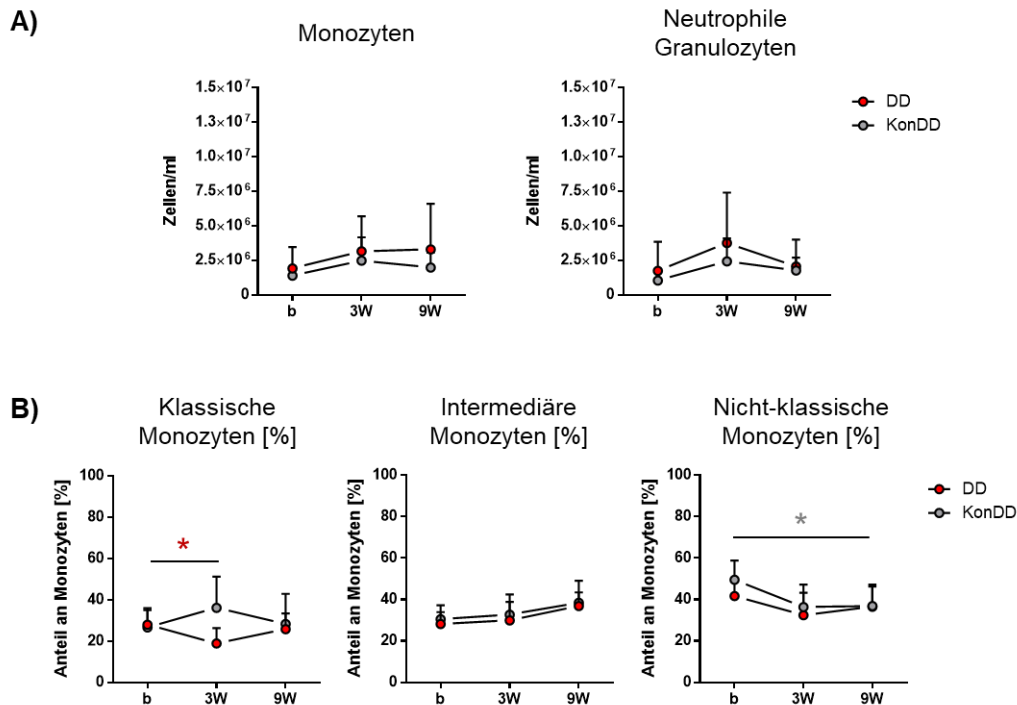


Abbildung 28: Zellzahl pro ml Blut und Anteil der verschiedenen Immunzellen im Vollblut im Vergleich ohne Infarktinduktion. Grau: Kontrolltiere; rot: prädiabetische Tiere. Dargestellt ist der MW $\pm$ SD. $n = 4-15$. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$. **A:** Zellzahlen pro ml der Monozyten (links) und neutrophilen Granulozyten (rechts) in Zellen/ml Blut bei den verschiedenen Tieren im Zeitverlauf. **B:** Relative Anteile der Monozytensubtypen an den Monozyten in % bei den verschiedenen Gruppen über 9 Wochen Fütterung.

4.2.10 Untersuchungen zur Herzfunktion mittels Magnetresonanzbildgebung

Nach Infarkt konnten zunächst leichte Änderungen im LGE bei den Mäusen festgestellt werden. Eine Änderung der Ejektionsfraktion war nicht zu beobachten. Es wurden jedoch trotz dessen magnetresonanztomografische Untersuchungen hinsichtlich der Ejektionsfraktion bei verschiedenen Fütterungen durchgeführt.

Abbildung 29 A zeigt zunächst beispielhafte Bilder eines Herzens einer DD-Maus bei Basalmessungen. Die Ejektionsfraktion der Tiere über einen Zeitraum von 9 Wochen ist in Abbildung 29 B zu sehen. Vor Beginn der Fütterung liegt die linksventrikuläre Ejektionsfraktion bei etwa 60 % und verändert sich nach 9 Wochen nur sehr leicht auf 58,4 % $\pm$ 5,7 % bei den Kontrolltieren und 61,9 % $\pm$ 5,8 % bei den DD-Tieren. Es liegen keinerlei signifikante Unterschiede vor.

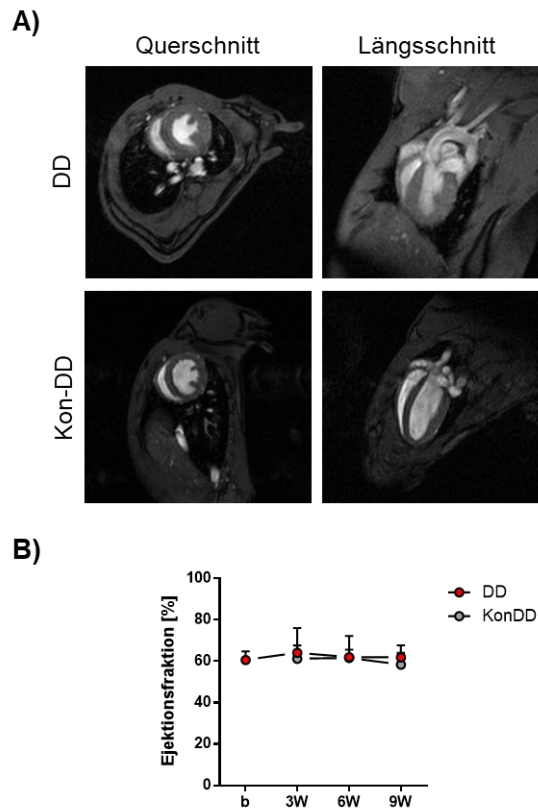


Abbildung 29: Magnetresonanztomographische Messungen der Herzen der Tiere ohne Infarktinduktion. A: Grafische Darstellung der magnetresonanztomographischen Messungen am Beispiel eines DD-Tiers und eines Kon-DD-Tieres bei 9 Wochen der Fütterung. Es ist der Quer- und Längsschnitt dargestellt. **B:** Ejektionsfraktion der Herzen zu verschiedenen Zeitpunkten vor Infarktinduktion in %. Grau: Kontrolltiere; rot: prädiabetische Tiere. Dargestellt ist der MW $\pm$ SD. n= 3-10.

4.3 Plättchen-Leukozytenkomplexe bei Diabetes Mellitus Typ II in Humanblut

Entgegen der ursprünglichen Erwartung, von deutlich größerem Mortalitätsrisiko und schlechterer Ejektionsfraktion bei den prädiabetischen Tieren, konnten nur eine geringfügig schlechtere Ejektionsfraktion und eine bessere Mortalität bei den prädiabetischen Mäusen festgestellt werden. Die Immunzellen der Tiere veränderten sich zwar im Laufe der Zeit, unterschieden sich jedoch nicht zwischen den Kontrolltieren und den prädiabetischen Tieren. Es sollten daher die Immunzellen von kardiologischen Patienten mit bekanntem Diabetes Mellitus näher untersucht werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde sich dabei auf Patientenproben von STEMI-Diabetes beschränkt. Zusätzlich wurde als Kontrollgruppe das Blut von KHK-Patienten mit Diabetes analysiert.

4.3.1 CD41 positive Monozyten sind im Blut von STEMI-Patienten erhöht

Abbildung 30 A zeigt die Zellzahlen und Anteile der Monozyten-CD41-Komplexe bei gesunden Probanden, STEMI-Diabetes- und KHK-Diabetes-Patienten. Bei STEMI-Patienten mit bekanntem Diabetes beträgt der Anteil von CD41-Komplexen an den Monozyten auf $44,3 \% \pm 17,4 \%$, während bei gesunden Probanden lediglich etwa $20,6 \% \pm 10,6 \%$ der Monozyten CD41-positiv sind. Bei KHK-Diabetes-Patienten liegt der Anteil bei etwa $34,9 \% \pm 15,6 \%$. Der Anstieg der Zellen bei gesunden Probanden zu STEMI-Diabetes-Patienten ist signifikant.

Bei der Annahme, dass der Diabetes einen Einfluss auf die Immunzellen und somit auf die Funktionsänderung eben dieser hat, ist davon auszugehen, dass auch der Aktivierungsstatus der Thrombozyten verändert ist. Es wurde daher zusätzlich untersucht, wie stark der Marker für aktivierte Thrombozyten (CD62P) auf den Monozyten vertreten ist. Auch hier ist, wie in Abbildung 30 B zu sehen, der Anteil der Plättchen-Monozytenkomplexe im Blut von STEMI-Diabetes-Patienten höher ($18,6 \% \pm 14,7 \%$), während die KHK-Diabetes-Blutproben ($6,7 \% \pm 5,9 \%$) nahezu auf dem Level der gesunden Probanden ($4,4 \% \pm 3,3 \%$) waren. Hier sind die Anteile der STEMI-Diabetes-Patienten jeweils signifikant erhöht. Die Trends der CD41- und CD62P-Komplexe sind auch in den absoluten Zellzahlen feststellbar (siehe Abbildung 30).

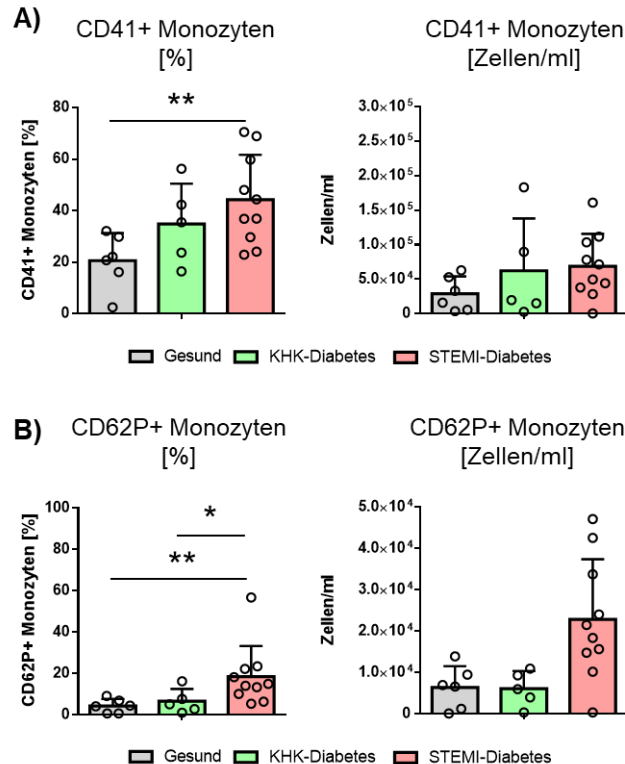


Abbildung 30: Zellzahl und Anteil der Monozyten-Komplexe bei Diabetes im Vollblut im Vergleich. Grau: gesunde Probanden; rosa: STEMI-Diabetes-Patienten; grün: KHK-Diabetes-Patienten. Dargestellt ist der MW $\pm$ SD. n = 5-10. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$. **A:** Zellzahl und Anteil der Monozyten-CD41-Komplexe im Vollblut verschiedener Spender im Vergleich. **B:** Zellzahl und Anteil der Monozyten-CD62P-Komplexe im Vollblut im Vergleich.

Wie bereits bei den vorangegangenen Analysen zum Blut der STEMI- und KHK-Patienten, wurde zudem untersucht, inwieweit die Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten der Diabetes-Patienten mit Thrombozyten interagieren. Der Zellanteil bei Neutrophilen-CD41-Komplexen ist, im Gegensatz zum Anteil von gesunden Probanden, in Proben von STEMI-Diabetes-Patienten etwa doppelt so hoch (24,6 % $\pm$ 15,6 %, siehe Abbildung 31). Die Werte für das Blut von KHK-Diabetes-Patienten sind mit denen der gesunden Probanden vergleichbar. Im Blut von STEMI-Diabetes-Patienten liegt die absolute Zellzahl ein Vielfaches über der der gesunden Probanden (527.896 Zellen/ml $\pm$ 333.185 Zellen/ml bzw. 51.053 Zellen/ml $\pm$ 75.720 Zellen/ml).

Der Anteil CD41-positiver Lymphozyten ist deutlich niedriger als bei den Neutrophilen (siehe Abbildung 31). So ist der Anteil CD41-positiver Lymphozyten mit 5,3 % $\pm$ 1,9 % bei den Blutproben der STEMI-Diabetes-Patienten am höchsten. Bei den absoluten Zellzahlen der Lymphozyten sind deutlich weniger Plättchenkomplexe bei KHK-Diabetes-Proben zu finden als bei den STEMI-Diabetes-Proben.

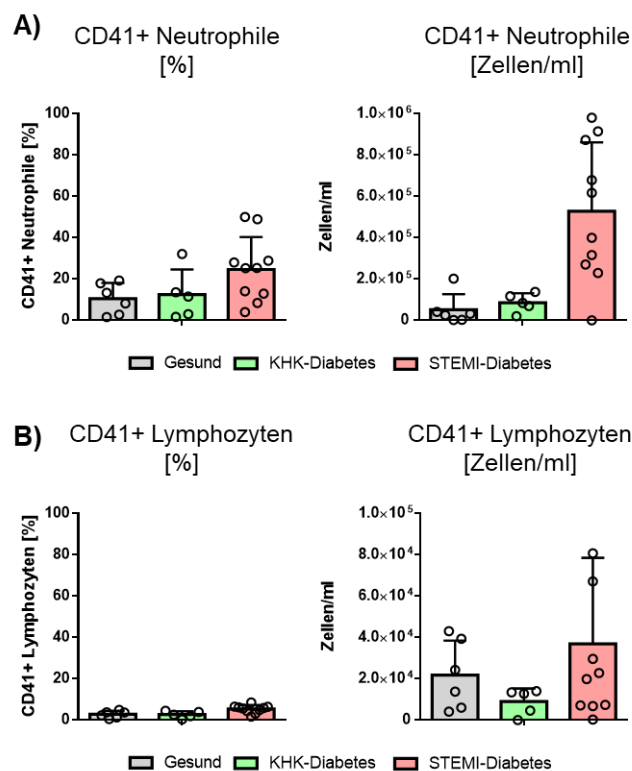


Abbildung 31: Zellzahl pro ml Blut und Anteil der verschiedenen Neutrophilen-CD41-Komplexe und Lymphozyten-CD41-Komplexe bei Diabetes im Vollblut im Vergleich. Grau: gesunde Probanden; rosa: STEMI-Diabetes-Patienten; grün: KHK-Diabetes-Patienten. Dargestellt ist der MW $\pm$ SD. n= 5-10. **A:** Zellzahlen pro ml Blut und relative Anteile der CD41-positiven neutrophilen Granulozyten im Blut gesunder Probanden, sowie STEMI-Diabetes- und KHK-Diabetes-Patienten. **B:** Zellzahlen pro ml Blut und relative Anteile der CD41-positiven Lymphozyten im Blut gesunder Probanden, sowie STEMI-Diabetes- und KHK-Diabetes-Patienten.

4.3.2 STEMI-Diabetes-Patienten haben einen erhöhten Anteil von nicht-klassischen Monozyten im Blut

Die vorherigen Analysen zeigten erneut sehr große Zellzahlen vor allem für CD41 positive Monozyten. Abbildung 32 A zeigt die Zellzahl der Neutrophilen (links), Monozyten (Mitte) und Lymphozyten (rechts) pro Milliliter humanem Blut bei gesunden Probanden, KHK-Diabetes-Patienten und STEMI-Diabetes-Patienten. Es fällt auf, dass im Gegensatz zu den vorherigen Analysen die Monozytenzahl im Blut bei den STEMI-Patienten mit Diabetes nicht erhöht ist. Lediglich die Neutrophilenzahl ist leicht erhöht im Gegensatz zu den Proben von gesunden Probanden und KHK-Diabetes-Patienten.

Abbildung 32 B zeigt zudem die Anteile der Monozyten-Subtypen bei den Patientengruppen. Der Anteil der nicht-klassischen Monozyten an den Monozyten ist im Blut bei STEMI-Diabetes am höchsten (63,5 % $\pm$ 20,9 %), während die klassischen Monozyten bei STEMI-Diabetes-Proben deutlich niedriger (27,8 % $\pm$ 20,4 %) sind als bei Blutproben gesunder Probanden und KHK-Diabetes-Patienten. Die intermediären Monozyten haben bei allen Proben den geringsten Anteil und sind vergleichbar.

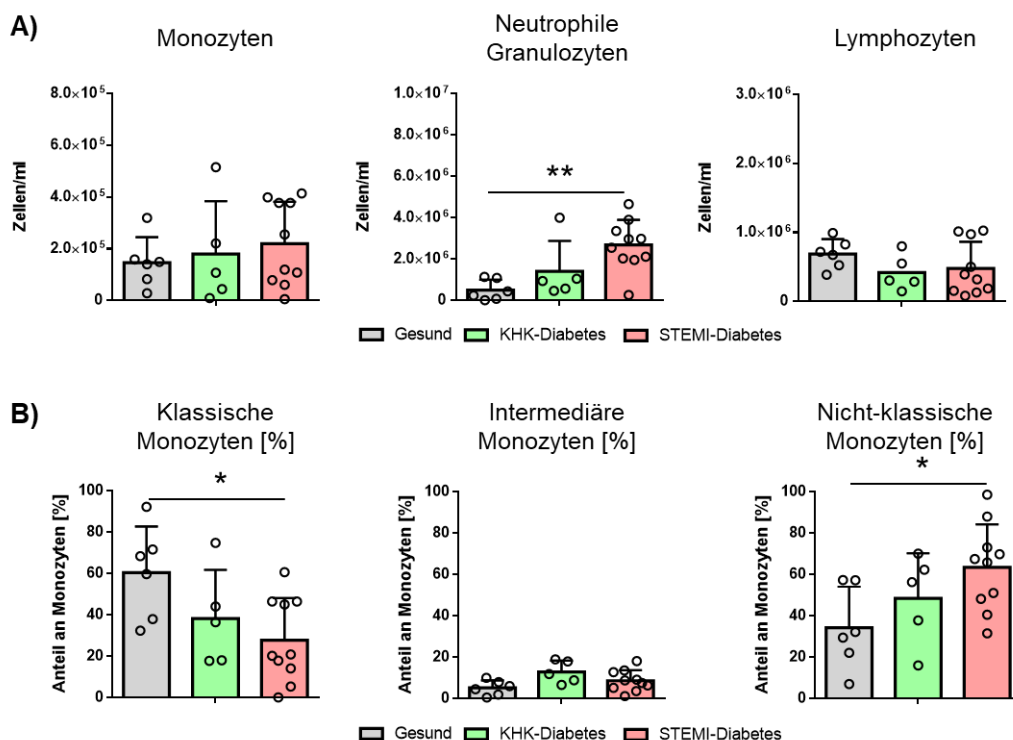


Abbildung 32: Zellzahl pro ml Blut und Anteil der verschiedenen Immunzellen bei Diabetes im Vollblut im Vergleich. Grau: gesunde Probanden; rosa: STEMI-Diabetes-Patienten; grün: KHK-Diabetes-Patienten. Dargestellt ist der MW $\pm$ SD. n= 5-10. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$. **A:** Zellzahlen der Monozyten (links), Neutrophilen Granulozyten (mitte) und Lymphozyten (rechts) in Zellen/ml Blut bei den verschiedenen Probanden/Patienten. **B:** Relative Anteile der Monozyten-Subtypen an den Monozyten in %.

4.3.3 Die Plättchenzahl ist bei Patienten mit KHK und Diabetes erhöht

In den zuvor zu Thrombozyten beschriebenen Analysen konnte eine leicht erhöhte Plättchenzahl bei den KHK-Proben festgestellt werden. Auch das Verhältnis von Plättchenzahl zu Monozyten war nicht signifikant verändert. Diese Analysen wurden auch bei den Blutproben der Diabetespatienten durchgeführt. Die Plättchenzahl pro ml Blut ist vor allem bei KHK-Diabetes-Patienten gegenüber gesunden Probanden und STEMI-Diabetes-Patienten deutlich erhöht, jedoch nicht signifikant. Ein leichter Anstieg in der Plättchenzahl pro Milliliter ist außerdem für STEMI-Diabetes-Patienten feststellbar.

Abbildung 33 zeigt, dass das Verhältnis bei STEMI-Diabetes-Proben auf $52,2 \pm 150,8$ ansteigt. Wie schon bei den KHK-Proben, ist auch das Verhältnis bei den KHK-Diabetes-Proben deutlich erhöht.

Schaut man sich in Abbildung 33 die Plättchen an, welche keine Komplexe mit weiteren Zellen eingegangen sind, ist kein Aktivitätsanstieg im Rahmen des CD62P Markers bei den Diabetesproben festzustellen.

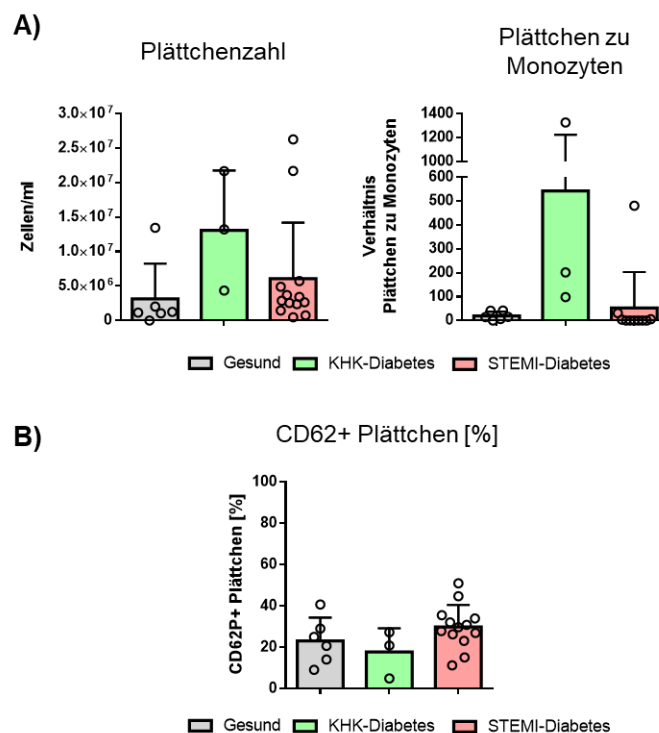


Abbildung 33: Plättchenmenge im Blut, das Verhältnis von Plättchen zu Monozyten im Vollblut und der relative Anteil der CD62P-positiven Plättchen bei Diabetes im Vergleich. Grau: gesunde Probanden; rosa: STEMI-Diabetes-Patienten; grün: KHK-Diabetes-Patienten. Dargestellt ist der MW $\pm$ SD. n= 3-10. **A:** Zellzahlen der Plättchen bei den verschiedenen Proben und Verhältnis der Plättchen zu Monozyten in Vollblut. **B:** Relative Anteile der CD62P-positiven Plättchen im Vollblut im Vergleich.

5. Diskussion

Seit vielen Jahren ist bekannt, dass die Immunzellen in der akuten Phase nach Myokardinfarkt von entscheidender Bedeutung sind. Die verschiedenen Immunzellen migrieren kurz nach Beginn des Infarktes in das entzündete Gewebe ein, entfernen abgestorbene Zellen und Helfen beim Aufbau des Narbengewebes. Eine zu starke Reaktion der Immunzellen kann jedoch gleichzeitig zu einer Beschädigung eigentlich intakter Areale des Herzgewebes führen.

Die Reperfusion einer Koronararterie in Folge eines Infarktes hinterlässt immer auch eine Reperusionsverletzung. So ist die Mortalitätsrate im ersten Jahr nach Infarkt weltweit bei 11 %. Neben dem Zelltod von Kardiomyozyten auf Grund des fehlenden Sauerstoffs, sowie der Reperfusion wird die koronare Mikrovaskulatur geschädigt. Zellbestandteile des rupturierten Plaque gelangen in die Mikrovaskulatur und können zur Mikroembolie führen. Des Weiteren gelangen auf diesem Wege pro-thrombotische und pro-inflammatorische Faktoren in diese Region. Leukozyten, Plättchen und Erythrozyten können in Folge aggregieren und so das Gefäßlumen stark verringern, bis hin zum Verschluss und ein Ödem in der Mikrovaskulatur bilden. Diese Region, welche durch das sogenannte „no-reflow“-Phänomen charakterisiert wird, ist im MRT durch Gadoliniumkontrast sichtbar und wird als Mikrovaskuläre Obstruktion bezeichnet⁶⁷. Eine mikrovaskuläre Obstruktion hat im Gegensatz zum Infarkt kein Sterben von Kardiomyozyten zur Folge, jedoch wird die ventrikuläre Funktion stark beeinträchtigt und kann so zum Tod führen⁶⁸.

Die Funktionalität von Immunzellen wird durch vielfältige Faktoren wie Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren, genetischen Faktoren aber auch der Interaktion mit anderen Zellen beeinflusst. Auf Grund der Interaktionen zwischen den Zellen werden Proteine sekretiert, welche die Funktion der jeweiligen Zellen beeinflussen. So können Plättchen die Degranularisierung von Leukozyten oder ihre Migration durch Endothelzellen begünstigen. Das Ziel dieser Arbeit war es daher, das Auftreten und die Funktionseigenschaften von Plättchen-Leukozyten-Interaktionen näher zu untersuchen. Hierbei sollten die Funktionsänderungen vor allem im Hinblick auf die Heilung nach einem Myokardinfarkt betrachtet werden.

5.1 Die Interaktion zwischen Plättchen und Leukozyten

Die Interaktion der Plättchen und Leukozyten kann entweder als direkte Verbindung zwischen den Zellen vorliegen oder durch den Austausch von verschiedenen löslichen Proteinen oder anderen Molekülen. Das auf den Plättchen am häufigsten zu findende GPIIb/IIIa ist ein Adhäsionsmolekül, welches mit verschiedenen Oberflächenmolekülen der Leukozyten

interagieren kann. Hierzu zählen der von Willebrandfaktor, Fibronektin und Fibrinogen.⁶⁹ Die Interaktion von Plättchen und Leukozyten war schon in den 1980er Jahren bekannt. So konnten Jungi et. al. 1986 feststellen, dass Thrombin-stimulierte Plättchen mit Monozyten und mehrkernigen Leukozyten interagieren, jedoch nicht mit Lymphozyten. Die Tests hierzu wurden zur damaligen Zeit mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer durchgeführt.⁷⁰ Im Jahre 2019 konnte dann die Interaktion der Zellen auch im Elektronenmikroskop nachgewiesen werden. Hierzu wurden die Zellen jedoch ex vivo miteinander inkubiert und anschließend untersucht.⁷¹

In dieser Arbeit wurden vor allem die Interaktionen von Plättchen mit Monozyten näher untersucht. Da in der Durchflusszytometrie, mit welcher die Plättchen-Monozyten-Komplexe meist analysiert werden, keine Aussage darüber getroffen werden kann, ob die Leukozyten intakte Plättchen, oder deren Vesikel oder Exosomen gebunden haben, sollten die Komplexe zuerst mikroskopisch untersucht werden. Zunächst wurden die Komplexe mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen. Bei der Fluoreszenzmikroskopie konnte man deutliche, CD41 positive Zellen erkennen, welche gleichzeitig DAPI negativ waren und an WGA-positiven Zellen lagen. Beide Größen ($12\text{ }\mu\text{m} \pm 1,7\text{ }\mu\text{m}$ bzw. $2,8\text{ }\mu\text{m} \pm 0,7\text{ }\mu\text{m}$) entsprechen jenen, welche in der Literatur zu Monozyten und Plättchen angegeben werden⁷². Es ist daher davon auszugehen, dass es sich um intakte Plättchen handelt, welche an den Monozyten gebunden sind. Um diese genauer zu betrachten wurden jedoch zusätzliche elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Die im Elektronenmikroskop betrachteten Komplexe ähneln den ex vivo durch Escobar et. al. im Jahre 2019 hergestellten Komplexen (siehe Abbildung 7). In vivo befindliche Komplexe liegen jedoch vermutlich nicht als Zwei-Zell-Komplexe vor, sondern eher als vielzellige, größere Komplexe, wie in der oben genannten Abbildung zu sehen. So scheint es, als wäre eine Vielzahl von Monozyten und Plättchen miteinander verbunden. In der Transmissions-Elektronenmikroskopie (siehe Abbildung 8) sind die Zellen ohne Zellkern Plättchen, welche in direkter Verbindung (Pfeil) mit zellkernhaltigen Zellen, den Monozyten, stehen. Sowohl die Plättchen, als auch die Monozyten sehen jenen in der Literatur beschriebenen in elektronenmikroskopischen Aufnahmen sehr ähnlich und sind daher eindeutig zu identifizieren^{73,74}. Es existiert somit eine direkte Plättchen-Monozyten-Interaktion.

Letzte Zweifel, dass es sich bei den bisher zu den Plättchen-Monozyten-Komplexen gemachten Untersuchungen zumeist um Plättchenfragmente handelt, können durch diese Untersuchungen nahezu aufgelöst werden, da keine kleineren Vesikel oder andere Zellbestandteile erkennbar waren. Zudem ist davon auszugehen, dass die direkte Interaktion zwischen den Zellen von großer immunologischer Bedeutung ist.

Im Anschluss daran wurde untersucht, welche Zellen die Komplexe eingehen, also ob es eher Monozyten oder Neutrophile Zellen sind.

Den größten Anteil von komplexgebundenen Zellen zeigen die Monozyten mit etwa 20,6 %, gefolgt von den Neutrophilen mit etwa 12 %. Der Anteil bei den Lymphozyten ist noch deutlich niedriger. Bei den absoluten Zellzahlen gibt es bei den Neutrophilen die höchste Anzahl von Komplexen, was jedoch auf die deutlich höhere Gesamtzellzahl zurückzuführen ist. Der höhere Anteil bei den Monozyten ist laut Literatur teilweise auf die scheinbar stärkere Bindung von Plättchen und Monozyten zurückzuführen.⁵³

Unter den Monozyten machen die klassischen Monozyten den größten Zellanteil mit etwa 60 % und die intermediären Monozyten den niedrigsten mit etwa 5 %. Diese Zahlen sind auch in der Literatur beschrieben²⁹. In der Literatur sind vor allem die klassischen und die intermediären Monozyten in Plättchenkomplexen angegeben.⁵⁰

5.2 Plättchen-Leukozyteninteraktionen bei MI

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, warum die Zellen Komplexe miteinander eingehen. In dieser Arbeit wurden die folgenden 3 Hypothesen untersucht:

- i. Die Plättchenzahl ist im Verhältnis zu den Monozyten erhöht
- ii. Die Plättchenaktivierung fördert die Bindung an Monozyten
- iii. Auf der Zelloberfläche von Monozyten werden verstärkt Moleküle exprimiert, die die Bindung an Plättchen fördern

Untersuchungen mit Blut von gesunden Probanden und STEMI, sowie KHK-Patienten wiesen nicht auf eine gesteigerte Plättchenzahl im Verhältnis zu den Monozyten hin.

Versuche zur zweiten Hypothese mit J774 Monozyten und aktivierten Plättchen lassen vermuten, dass eine Komplexbildung vor allem auf Grund der Plättchenaktivierung zustande kommt. So kam es zu einer verstärkten Interaktion von J774 Makrophagen, wenn die Plättchen zuvor mit ADP aktiviert wurden. Blut von STEMI-Patienten, welches den höchsten Anteil von Plättchen-Leukozytenkomplexen zeigt, zeigt auch einen höheren Anteil von CD62P positiven Plättchen und somit von aktivierten Plättchen. Der höhere Anteil von CD62P positiven Plättchen wurde auch von Shen et. al bereits bei koronarer Herzkrankheit beobachtet. In ihrer Studie zeigen sie, dass CD62P einen möglichen Biomarker für die Pathogenese bei KHK darstellt.⁷⁵

Bei den Monozyten ist zudem das PSGL-1 leicht verstärkt auf den Monozyten, welche an Plättchen gebunden sind, exprimiert, was sich durch einen etwas erhöhten MFI zeigt. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Komplexbildung auf Grund der Aktivierung beider Zellgruppen zustande kommt.

Versuche zum Tissue Factor, welcher von Monozyten exprimiert wird und Signalprozesse beeinflusst, wodurch es zur verstärkten Blutgerinnung kommen kann⁷⁶, zeigten keinerlei Antikörperbindung und sollten daher in zukünftigen Versuchen wiederholt werden.

Auf Grund der Verbindung der Zellen, welche in der Transmissions-Elektronenmikroskopie nachgewiesen werden konnte, ist davon auszugehen, dass die jeweiligen Zellen eine Funktionsänderung durchlaufen. Die Art der Funktionsänderung hängt laut Bournazos et. al. davon ab, ob die Plättchen stimuliert oder unstimuliert sind. So geben sie an, dass stimulierte Plättchen eine höhere Translokation von NF- κ B zum Zellkern der Monozyten bewirken. Dadurch wird die Sekretion von pro-inflammatorischem IL-1 β und TNF- α gefördert.⁵³ Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Funktionsänderung der Monozyten bei Plättchenbindung daher weiter untersucht werden. Abbildung 17 ist zu entnehmen, dass durch die Komplexbildung mit den Plättchen eine gesteigerte MCP-1 gerichtete Migration der Monozyten vorliegt.

Um auszuschließen, dass die Komplexbildung erst nach der Zellmigration geschieht, wurde zudem die MCP-1 gerichtete Migration von Plättchen näher betrachtet. Auf Grund des nur sehr geringen Plättchenanteils in der migrierten Fraktion ist davon auszugehen, dass die Plättchen nicht allein in Richtung MCP-1 migrieren und hierzu die Komplexbildung mit Monozyten nötig ist.

Die gesteigerte Immunantwort durch Monozyten wurde zudem durch Versuche zur Oberflächenexpression von MHC-I und MHC-II untersucht. Sowohl MHC-I als auch MHC-II werden für die Antigenrepräsentation benötigt. T-Zellen erkennen diese Komplexe und beginnen mit der entsprechenden Immunantwort⁶¹. Eine gesteigerte Expression auf der Oberfläche lässt daher auf eine gesteigerte Immunantwort schließen. Während nahezu alle Zellen der gesunden Probanden und der STEMI-Patienten MHC-I positiv waren, stieg die Expression auf den Zellen mit der Zeit nach Infarkt an. Die größte Aktivität ist somit nach 5 Tagen nach Infarkt zu erkennen. Da erst nach einigen Tagen der Höhepunkt, der im infarzierten Areal vorzufindenden Monozyten zu verzeichnen ist, ist die etwas spätere starke Aktivierung durch MHC-I plausibel. Die Expression von MHC-II ist deutlich geringer.

Die Blutproben der STEMI-Patienten zeigen deutlich mehr Immunzellen (Neutrophile Granulozyten und Monozyten), einen deutlich höheren Anteil von Plättchen-

Monozytenkomplexen, sowie eine leicht verstärkte Aktivität der Plättchen. Auf Grund der Erhöhten Anteile und der Funktionsänderungen in den Plättchen-Monozytenkomplexen ist daher davon auszugehen, dass der immunologische Zustand bei STEMI-Patienten von entscheidender Bedeutung für die Heilung ist. Bisher ist die Reperusionsverletzung bei STEMI-Patienten eine sehr häufige Komplikation, deren Eindämmung momentan nur schwierig ist. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass die Thrombozyten einen großen Anteil an der Verletzung haben⁵⁷. Ist in einem entzündlichen Prozess die Komplexbildung außergewöhnlich erhöht, kann es zu einer Überfunktion der Immunzellen im entzündlichen Bereich kommen, wodurch die Heilung beeinträchtigt wird. Die in unseren Untersuchungen gesteigerte Migration als Reaktion auf MCP-1 kann laut Hayashidani et. al. zu einem höheren Risiko von Herzversagen nach Infarkt führen⁷⁷. Zudem ist davon auszugehen, dass ein Teil der detektierten Plättchen-Leukozytenkomplexe im Bereich der Mikrovaskulatur vorkommen und dort möglicherweise einen Reperusionschaden durch Mikrovaskuläre Obstruktion/ „no-reflow“ verursachen.

5.3 Plättchen-Leukozytenkomplexe bei Diabetes und MI

Um genauere Erkenntnisse zu den Immunzellen vor und nach Infarkt zu erhalten, wurden in dieser Arbeit Versuche am Tiermodell und mit Humanblut nach STEMI durchgeführt. Es wurden hierzu zwei Gruppen von Tieren betrachtet. Eine der Tiergruppen bekam normales Futter, während die andere Gruppe eine sogenannte High-Fat-Diet erhielt, um einen prädiabetischen Zustand hervorzurufen. Es ist bekannt, dass schon frühzeitig nach Entstehen eines prädiabetischen Zustandes die Immunzellen eine Veränderung in ihrer Aktivität zeigen⁵⁷ und dass Personen mit Diabetes eine höhere Mortalitätsrate aufweisen⁷⁸.

Da vorgenannten Untersuchungen keine direkten Rückschlüsse auf den Einfluss bei der Heilung ziehen lassen, wurden die Immunzellen der beiden Tiergruppen über die Zeit vor und nach Infarkt beobachtet. Die Zellzahl der Plättchen gebundenen Monozyten steigt mit der Zeit signifikant an. Jedoch gibt es keine Unterschiede zwischen den Tiergruppen. Der Anteil der Plättchen gebundenen Monozyten ist zwischen 9 Wochen und 7 Tagen nach Infarkt signifikant erhöht. Der Anteil der Plättchen gebundenen Neutrophilen hingegen bleibt in etwa gleich über die Zeit.

Sowohl die Monozytenzahl als auch die Neutrophilenzahl steigt direkt nach Infarkt an. Während jedoch die Neutrophilenzahl ab Tag 7 nach Infarkt wieder absinkt, steigt die Monozytenzahl immer weiter an. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Monozyten an der späten Phase nach Infarkt einen höheren Anteil haben und von größerer Bedeutung sind als die Neutrophilen. Die Neutrophilen sind vor allem für die frühe Phase nach Infarkt wichtig.

Neben den Immunzellen im Blut wurden zudem die Immunzellen im Herz an Tag 4 nach Infarkt betrachtet. Wie zuvor bei den Blutimmunzellen konnte hier kein Unterschied zwischen den Kontrolltieren und den prädiabetischen Tieren festgestellt werden. Auch das Herzgewicht ist nahezu identisch. Auf Grund des bei der Organentnahme festgestellten, deutlich höheren Fettanteils bei den prädiabetischen Tieren, wurde ursprünglich von einem höheren Herzgewicht ausgegangen. Versuche zu den Herzzimmunzellen zeigten, dass vor allem Makrophagen im Herzen nach 4 Tagen vorkommen, welche zuvor schon im Herzen vorkamen (siehe Abbildung 22).

Der Bereich des Late Gadolinium Enhancements an Tag 1 nach Infarkt ist bei den Kontrolltieren mit 29,4 % deutlich kleiner als bei den prädiabetischen Tieren. Obwohl keine signifikanten Unterschiede bei den Immunzellen der Tiere sowohl im Blut als auch bei den Herzzimmunzellen festgestellt werden konnten, weisen die prädiabetischen Tiere somit einen größeren infarzierten Bereich auf. Die Ejektionsfraktionen der beiden Tiergruppen nehmen gleichermaßen im Verlauf nach Infarkt ab und liegt nach 21 Tagen noch bei etwa 33 – 34 % bei beiden Tiergruppen. Aufgrund des größeren infarzierten Bereiches wurde an Tag 21 nach Infarkt bei diesen Tieren mit einer erhöhten Narbengröße gerechnet. Doch die Anteile des Narbengewebes am linken Ventrikel betragen gleichermaßen etwa 20 %.

Entgegen der beim Menschen vorkommenden Komplikationen auf Grund eines Diabetes scheint ein prädiabetischer Zustand im Tiermodell keinen negativen Einfluss auf die Heilung nach Infarkt zu haben. Interessanterweise war die Mortalitätsrate der Kontrolltiere nach MI höher als die der prädiabetischen Tiere, was eventuell auf einen schützenden Effekt hinweisen könnte.

Auf Grund der unerwarteten Ergebnisse wurden weitere physiologische Untersuchungen durchgeführt, um ein genaueres Bild zu erhalten. Diese Untersuchungen wurden an Tieren vor Infarktinduktion durchgeführt und begannen noch vor der Futterumstellung. Vor allem der Blutzuckerwert der prädiabetischen Tiere stieg signifikant an nach 9 Wochen Fütterung. Wie bereits nach Infarkt beobachtet, sind die Plättchen-Monozytenkomplexe auch vor der Infarktinduktion nicht signifikant verschieden und schwanken im Verlauf der Fütterung nur leicht. Zudem ändert sich die Ejektionsfraktion während der Fütterung nicht.

Regelmäßige Glukosetoleranztests bestätigten, dass sich die Mäuse in einem prädiabetischen Zustand befanden.

Im Rahmen dieser Untersuchungen kann festgestellt werden, dass das gewählte Mausmodell nicht den Erwartungen auf Grund der in der Literatur beschriebenen höheren Mortalitätsrate

entspricht. Auch die Erwartungen zum Effekt des Infarktes auf die Immunzellen bei den verschiedenen Mausgruppen wurden nicht erfüllt.

Analysen der Immunzellen bei STEMI-Diabetes- und KHK-Diabetes-Patienten zeigten höhere Immunzellanteile bei Plättchen-Monozytenkomplexen im Blut der STEMI-Diabetes-Patienten, welche jedoch geringer sind als bei den STEMI-Patienten der vorherigen Analysen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte der größte Anteil von Plättchen-Monozytenkomplexen im Blut von STEMI-Patienten gefunden werden. Bei diesen sind etwa 62 % der Monozyten an Plättchen gebunden, während es bei gesunden Probanden lediglich etwa 20,6 % als Komplexe vorliegen. Der Anteil ist bei den STEMI-Patienten mit Diabetes entgegen den Erwartungen auf Grund der in der Literatur beschriebenen Hyperreaktivität der Immunzellen nicht höher als bei den STEMI-Patienten ohne Diabetes und mit etwa 44,3 % sogar etwas geringer. Die Zellzahl der Neutrophilen Granulozyten ist bei STEMI-Diabetes-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden erhöht und etwa auf dem gleichen Level wie bei den STEMI-Patienten. Laut Grossmann et. al. sind die Neutrophilen bereits im Blut von Diabetes-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden erhöht⁷⁹. Auch die Monozyten und die Lymphozyten im Blut der Diabetes-Patienten sind erhöht⁷⁹. Dies legt nahe, dass die Immunzellen bei STEMI-Diabetes-Patienten in der größten Anzahl vorzufinden sind, was jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht gezeigt werden konnte. Betrachtet man den Aktivierungsstatus der komplexgebundenen Plättchen, ist auch bei diesen der Anteil unter den STEMI-Proben am höchsten. Etwa 32,8 % der Monozyten sind an aktivierte Plättchen gebunden, jedoch nur 18,6 % der Monozyten der STEMI-Diabetes-Proben. In weiteren Versuchen wurden zudem reine Plättchen aus Humanblut mit Hilfe des CD62P Antikörpers auf ihre Aktivierung hin untersucht. Blut von STEMI-Patienten, welches den höchsten Anteil von Plättchen-Leukozytenkomplexen zeigt, zeigt auch einen höheren Anteil von CD62P positiven Plättchen.

Betrachtet man die vorgenannten Anteile bei den STEMI-Patienten über die Zeit nach Infarkt, lassen sich nur leichte Schwankungen feststellen. Es kommt somit nach einem Infarkt nicht zu einem Absinken der Immunzellzahlen im Blut. Die Aktivität der Immunzellen scheint nach diesen ersten Untersuchungen durchgehend nach einem Infarkt erhöht zu sein. Zumindest während der ersten 6 Monate.

Warum die Immunzellzahl bei STEMI-Patienten ohne Diabetes so stark erhöht sind, sollte in weiteren Untersuchungen zum Beispiel zur Zytokinexpression näher untersucht werden. Es ist denkbar, dass die durchgehende, starke Expression bei Diabetes eine verminderte Reaktion der Immunzellen auf die Zytokine verursacht und somit bei einem Diabetes nach Infarkt weniger Immunzellen im Blut zirkulieren.

5.4 Ausblick

Zusammengefasst konnte mit der Elektronenmikroskopie die direkte Bindung von Plättchen und Monozyten nachgewiesen werden. Diese sind zudem bei STEMI-Patienten deutlich im Blut erhöht und durchlaufen eine Funktionsänderung, wie gesteigerte Migration, PSGL-1 Expression und Antigenpräsentation (MHC-I). Die in der Literatur beschriebene erhöhte Mortalität bei Diabetes Patienten nach einem Myokardinfarkt konnte im Tiermodell nicht nachgewiesen werden. Zudem war die Immunzellzahl sowie der Anteil der Plättchen-Monozytenkomplexe bei STEMI-Diabetes-Patienten deutlich niedriger als bei STEMI-Patienten.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten nach Infarkt deutlich erhöhte Plättchen-Leukozytenkomplexe nachgewiesen werden. Im Humanblut wurden zudem Unterschiede bei Diabetikern und nicht-Diabetikern festgestellt, welche im Mausmodell nicht gezeigt werden konnten. Um den genauen Einfluss der Immunzellen auf die Infarktheilung untersuchen zu können, sollten in Zukunft die Immunzellen, insbesondere die Plättchen-Monozytenkomplexe, mit MRT-Aufnahmen der zugehörigen Patienten über die Zeit nach Infarkt korreliert werden. Zudem könnte man durch Medikamente möglicherweise die Plättchen-Monozyteninteraktion beeinflussen und so die Heilung nach MI verbessern. Nur so lässt sich der Einfluss der Plättchen-Leukozytenkomplexe auf die Heilung endgültig feststellen. Auf Grund der im Rahmen dieser Arbeit erbrachten Ergebnisse, ist jedoch davon auszugehen, dass es vor allem die Komplexbildung ist, welche die Infarktgröße und mögliche Komplikationen bedingt. Zudem sollten noch weitere Untersuchungen zur Funktionsänderung der Immunzellen nach Komplexbildungen durchgeführt werden. Hierbei könnte man vor allem die Zytokinsekretion und die Phagozytose der Zellen analysieren.

Da die Untersuchungen im prädiabetischen Mausmodell keine Unterschiede zur Kontrollgruppe gezeigt haben, wäre zudem eine Analyse mit db-Mäusen möglich, um die Immunzellen und Infarktänderungen bei einem stabilen Diabetes untersuchen zu können.

6. Literaturverzeichnis

1. *The Top 10 Causes of Death*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> (2020).
2. *Cardiovascular Diseases*. https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases#tab=tab_1.
3. Yuan, S. & Rigor, RR. Chapter 2, Structure and Function of Exchange Microvessels. in *Regulation of Endothelial Barrier Function*. (Morgan & Claypool Life Sciences, San Rafael (CA), 2010).
4. Litviňuková, M. *et al.* Cells of the adult human heart. *Nature* **588**, 466–472 (2020).
5. Maddox, T. M. *et al.* Nonobstructive Coronary Artery Disease and Risk of Myocardial Infarction. *JAMA* **312**, 1754 (2014).
6. Hevonoja, T., Penttinen, M. O. & Ala-Korpela, M. Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: Basis for understanding molecular changes in modified LDL. *Biochim. Biophys. Acta*.
7. Gayle, R. B. *et al.* Inhibition of platelet function by recombinant soluble ecto-ADPase/CD39. *J. Clin. Invest.* **101**, 1851–1859 (1998).
8. Roy, C. *et al.* Loss of vascular expression of nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1/CD39 in hypertension. *Purinergic Signal.* **14**, 73–82 (2018).
9. Loppnow, H. & Libby, P. Proliferating or interleukin 1-activated human vascular smooth muscle cells secrete copious interleukin 6. *J. Clin. Invest.* **85**, 731–738 (1990).
10. Hansson, G. K. Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease. *N. Engl. J. Med.* **11** (2005).
11. Arzneimittelkommission Der Deutschen Ärzteschaft (AkdÄ) *et al.* *Nationale VersorgungsLeitlinie Chronische KHK - Langfassung*. (Bundesärztekammer (BÄK); Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV); Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF), 2022). doi:10.6101/AZQ/000491.
12. Mendis, S. *et al.* World Health Organization definition of myocardial infarction: 2008-09 revision. *Int. J. Epidemiol.* **40**, 139–146 (2011).
13. Abbott, J. D., Ahmed, H. N., Vlachos, H. A., Selzer, F. & Williams, D. O. Comparison of Outcome in Patients With ST-Elevation Versus Non-ST-Elevation Acute Myocardial Infarction Treated With Percutaneous Coronary Intervention (from the National Heart, Lung, and Blood Institute Dynamic Registry). *Am. J. Cardiol.* **100**, 190–195 (2007).
14. Anzai, A., Ko, S. & Fukuda, K. Immune and Inflammatory Networks in Myocardial Infarction: Current Research and Its Potential Implications for the Clinic. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 5214 (2022).

15. Peng, Y., Kowalewski, R., Kim, S. & Elkon, K. B. The role of IgM antibodies in the recognition and clearance of apoptotic cells. *Mol. Immunol.* **42**, 781–787 (2005).
16. Yasuda, M. *et al.* The complement system in ischemic heart disease. *Circulation* **81**, 156–163 (1990).
17. Zhou, W. *et al.* Predominant role for C5b-9 in renal ischemia/reperfusion injury. *J. Clin. Invest.* **105**, 1363–1371 (2000).
18. Prabhu, S. D. & Frangogiannis, N. G. The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis. *Circ. Res.* **119**, 91–112 (2016).
19. Mentkowski, K. I., Euscher, L. M., Patel, A., Alevriadou, B. R. & Lang, J. K. Monocyte recruitment and fate specification after myocardial infarction. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **319**, C797–C806 (2020).
20. Poltorak, A. *et al.* Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: Mutations in *Tlr4* Gene. *Science* **282**, 2085–2088 (1998).
21. Rumbaut, R. E. & Thiagarajan, P. *Platelet-Vessel Wall Interactions in Hemostasis and Thrombosis*. (Morgan & Claypool Life Sciences, San Rafael (CA), 2010).
22. Jenne, C. N., Urrutia, R. & Kubes, P. Platelets: bridging hemostasis, inflammation, and immunity. *Int. J. Lab. Hematol.* **35**, 254–261 (2013).
23. Andonegui, G. *et al.* Platelets express functional Toll-like receptor-4. *Blood* **106**, 2417–2423 (2005).
24. Gros, A., Ollivier, V. & Ho-Tin-Noë, B. Platelets in Inflammation: Regulation of Leukocyte Activities and Vascular Repair. *Front. Immunol.* **5**, (2015).
25. Ruiz, F. A., Lea, C. R., Oldfield, E. & Docampo, R. Human Platelet Dense Granules Contain Polyphosphate and Are Similar to Acidocalcisomes of Bacteria and Unicellular Eukaryotes. *J. Biol. Chem.* **279**, 44250–44257 (2004).
26. Ciferri, S. *et al.* Platelets Release their Lysosomal Content In Vivo in Humans upon Activation. *Thromb. Haemost.* **83**, 157–164 (2000).
27. Jung, K. *et al.* Endoscopic Time-Lapse Imaging of Immune Cells in Infarcted Mouse Hearts. *Circ. Res.* **112**, 891–899 (2013).
28. Kapellos, T. S. *et al.* Human Monocyte Subsets and Phenotypes in Major Chronic Inflammatory Diseases. *Front. Immunol.* **10**, 2035 (2019).
29. Sampath, P., Moideen, K., Ranganathan, U. D. & Bethunaickan, R. Monocyte Subsets: Phenotypes and Function in Tuberculosis Infection. *Front. Immunol.* **9**, 1726 (2018).
30. Yan, X. *et al.* Temporal dynamics of cardiac immune cell accumulation following acute myocardial infarction. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **62**, 24–35 (2013).
31. Amulic, B., Cazalet, C., Hayes, G. L., Metzler, K. D. & Zychlinsky, A. Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease. *Annu. Rev. Immunol.* **30**, 459–489 (2012).

32. Summers, C. *et al.* Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol.* **31**, 318–324 (2010).
33. Herrero-Cervera, A., Soehnlein, O. & Kenne, E. Neutrophils in chronic inflammatory diseases. *Cell. Mol. Immunol.* **19**, 177–191 (2022).
34. Bonaventura, A., Vecchié, A., Abbate, A. & Montecucco, F. Neutrophil Extracellular Traps and Cardiovascular Diseases: An Update. *Cells* **9**, 231 (2020).
35. Swirski, F. K. *et al.* Identification of Splenic Reservoir Monocytes and Their Deployment to Inflammatory Sites. *Science* **325**, 612–616 (2009).
36. Ren, G., Michael, L. H., Entman, M. L. & Frangogiannis, N. G. Morphological Characteristics of the Microvasculature in Healing Myocardial Infarcts. *J. Histochem. Cytochem.* **50**, 71–79 (2002).
37. Chen, C.-W. *et al.* Human Pericytes for Ischemic Heart Repair. *Stem Cells* **31**, 305–316 (2013).
38. Smart, N. & Riley, P. R. The epicardium as a candidate for heart regeneration. *Future Cardiol.* **8**, 53–69 (2012).
39. Yeap, X.-Y., Dehn, S., Adelman, J., Lipsitz, J. & Thorp, E. B. Quantitation of Acute Necrosis After Experimental Myocardial Infarction. in *Necrosis* (eds. McCall, K. & Klein, C.) vol. 1004 115–133 (Humana Press, Totowa, NJ, 2013).
40. Hottz, E. D. *et al.* Platelet-monocyte interaction amplifies thromboinflammation through tissue factor signaling in COVID-19. *Blood Adv.* **6**, 5085–5099 (2022).
41. Temme, S. *et al.* Imaging of Thromboinflammation by Multispectral 19F MRI. *Int. J. Mol. Sci.* **26**, 2462 (2025).
42. Chu, A. J. Tissue Factor, Blood Coagulation, and Beyond: An Overview. *Int. J. Inflamm.* **2011**, 1–30 (2011).
43. Mack, A., Vanden Hoek, T. & Du, X. Thromboinflammation and the Role of Platelets. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **44**, 1175–1180 (2024).
44. Schenkel, A. R., Chew, T. W. & Muller, W. A. Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule Deficiency or Blockade Significantly Reduces Leukocyte Emigration in a Majority of Mouse Strains. *J. Immunol.* **173**, 6403–6408 (2004).
45. Salvemini, D., De Nucci, G., Gryglewski, R. J. & Vane, J. R. Human neutrophils and mononuclear cells inhibit platelet aggregation by releasing a nitric oxide-like factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**, 6328–6332 (1989).
46. Larabee, J. L., Shakir, S. M., Barua, S. & Ballard, J. D. Increased cAMP in Monocytes Augments Notch Signaling Mechanisms by Elevating RBP-J and Transducin-like Enhancer of Split (TLE). *J. Biol. Chem.* **288**, 21526–21536 (2013).

47. Elferink, J. G. R. & Vanuffelen, B. E. The role of cyclic nucleotides in neutrophil migration. *Gen. Pharmacol. Vasc. Syst.* **27**, 387–393 (1996).
48. Rauch, U. *et al.* Transfer of tissue factor from leukocytes to platelets is mediated by CD15 and tissue factor. **96**, (2000).
49. Celi, A. *et al.* P-selectin induces the expression of tissue factor on monocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 8767–8771 (1994).
50. Passacquale, G. *et al.* Monocyte-Platelet Interaction Induces a Pro-Inflammatory Phenotype in Circulating Monocytes. *PLoS ONE* **6**, e25595 (2011).
51. Caudrillier, A. *et al.* Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury. *J. Clin. Invest.* **122**, 2661–2671 (2012).
52. Weyrich, A. S. *et al.* Activated Platelets Signal Chemokine Synthesis by Human Monocytes. **10**.
53. Bournazos, S., Rennie, J., Hart, S. P., Fox, K. A. A. & Dransfield, I. Monocyte Functional Responsiveness After PSGL-1–Mediated Platelet Adhesion Is Dependent on Platelet Activation Status. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **28**, 1491–1498 (2008).
54. Gerdes, N. *et al.* Platelet CD40 Exacerbates Atherosclerosis by Transcellular Activation of Endothelial Cells and Leukocytes. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **36**, 482–490 (2016).
55. Lievens, D. *et al.* Platelet CD40L mediates thrombotic and inflammatory processes in atherosclerosis. *Blood* **116**, 4317–4327 (2010).
56. Gleissner, C. A. Macrophage Phenotype Modulation by CXCL4 in Atherosclerosis. *Front. Physiol.* **3**, (2012).
57. Maiocchi, S., Alwis, I., Wu, M., Yuan, Y. & Jackson, S. Thromboinflammatory Functions of Platelets in Ischemia–Reperfusion Injury and Its Dysregulation in Diabetes. *Semin. Thromb. Hemost.* **44**, 102–113 (2018).
58. Collard, C. D. Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Prevention of Ischemia–Reperfusion Injury. **94**, (2001).
59. van Gils, J. M., Zwaginga, J. J. & Hordijk, P. L. Molecular and functional interactions among monocytes, platelets, and endothelial cells and their relevance for cardiovascular diseases. *J. Leukoc. Biol.* **85**, 195–204 (2009).
60. Deshmane, S. L., Kremlev, S., Amini, S. & Sawaya, B. E. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *J. Interferon Cytokine Res.* **29**, 313–326 (2009).
61. Raval, A., Puri, N., Rath, P. C. & Saxena, R. K. Cytokine regulation of expression of class I MHC antigens. *Exp. Mol. Med.* **30**, 1–13 (1998).
62. Shah, A. D. *et al.* Type 2 diabetes and incidence of cardiovascular diseases: a cohort study in 1·9 million people. *Lancet Diabetes Endocrinol.* **3**, 105–113 (2015).

63. Demirtunc, R. *et al.* The relationship between glycemic control and platelet activity in type 2 diabetes mellitus. *J. Diabetes Complications* **23**, 89–94 (2009).
64. Johny, E. *et al.* Platelet Mediated Inflammation in Coronary Artery Disease with Type 2 Diabetes Patients. *J. Inflamm. Res.* **Volume 14**, 5131–5147 (2021).
65. O'Brien, P. D., Sakowski, S. A. & Feldman, E. L. Mouse Models of Diabetic Neuropathy. *ILAR J.* **54**, 259–272 (2014).
66. Colombo, M. G. *et al.* Association of obesity and long-term mortality in patients with acute myocardial infarction with and without diabetes mellitus: results from the MONICA/KORA myocardial infarction registry. *Cardiovasc. Diabetol.* **14**, 24 (2015).
67. Abbas, A. *et al.* Cardiac MR assessment of microvascular obstruction. *Br. J. Radiol.* **88**, 20140470 (2015).
68. Kingma, J. G. Myocardial Infarction: An Overview of STEMI and NSTEMI Physiopathology and Treatment. *World J. Cardiovasc. Dis.* **08**, 498–517 (2018).
69. Rossaint, J., Margraf, A. & Zarbock, A. Role of Platelets in Leukocyte Recruitment and Resolution of Inflammation. *Front. Immunol.* **9**, 2712 (2018).
70. Jungi, T. W., Spycher, M. O., Nydegger, U. E. & Barandun, S. Platelet-Leukocyte Interaction: Selective Binding of Thrombin-Stimulated Platelets to Human Monocytes, Polymorphonuclear Leukocytes, and Related Cell Lines. *Blood* **67**, 629–636 (1986).
71. Escobar, G. *et al.* Pure Platelet-Rich Plasma and Supernatant of Calcium-Activated P-PRP Induce Different Phenotypes of Human Macrophages. *Regen. Med.* **13**, 427–441 (2018).
72. Palmer, L. *et al.* ICSH recommendations for the standardization of nomenclature and grading of peripheral blood cell morphological features. *Int. J. Lab. Hematol.* **37**, 287–303 (2015).
73. Freson, K., Labarque, V., Thys, C., Wittevrongel, C. & Geet, C. V. What's new in using platelet research? To unravel thrombopathies and other human disorders. *Eur. J. Pediatr.* **166**, 1203–1210 (2007).
74. Konecna, B. *et al.* Monocyte exocytosis of mitochondrial danger-associated molecular patterns in sepsis suppresses neutrophil chemotaxis. *J. Trauma Acute Care Surg.* **90**, 46–53 (2021).
75. Shen, L. *et al.* P-selectin (CD62P) and soluble TREM-like transcript-1 (sTLT-1) are associated with coronary artery disease: a case control study. *BMC Cardiovasc. Disord.* **20**, 387 (2020).
76. Peshkova, A. D. *et al.* Activated Monocytes Enhance Platelet-Driven Contraction of Blood Clots via Tissue Factor Expression. *Sci. Rep.* **7**, 5149 (2017).

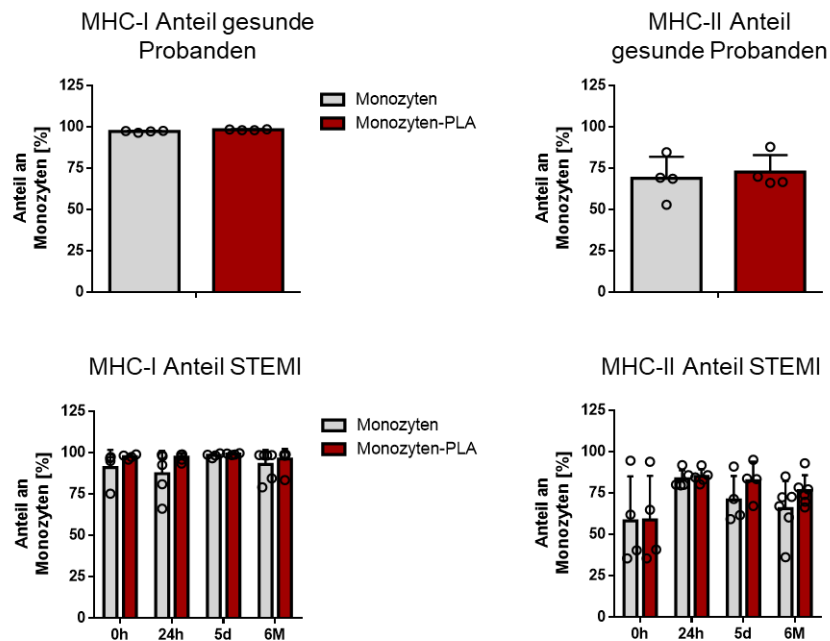
77. Hayashidani, S. *et al.* Anti-Monocyte Chemoattractant Protein-1 Gene Therapy Attenuates Left Ventricular Remodeling and Failure After Experimental Myocardial Infarction. *Circulation* **108**, 2134–2140 (2003).
78. Eurich, D. T. *et al.* Benefits and harms of antidiabetic agents in patients with diabetes and heart failure: systematic review. *BMJ* **335**, 497 (2007).
79. Grossmann, V. *et al.* Profile of the Immune and Inflammatory Response in Individuals With Prediabetes and Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* **38**, 1356–1364 (2015).

7. Publikationsliste

Magnetic resonance reveals early lipid deposition in murine prediabetes as predictive marker for cardiovascular injury - Katja Heller, Vera Flocke, Tamara Straub, Zhaoping Ding, Tanu Srivastava, Melissa Nowak, Florian Funk, Bodo Levkau, Joachim Schmitt, Maria Grandoch, Ulrich Flögel – 2024, in npj imaging, <https://doi.org/10.1038/s44303-024-00044-0>

8. Anhang

Oberflächenexpression von MHC-I und MHC-II



Ergänzende Abbildung 1: Oberflächenexpression von MHC-I und MHC-II Molekülen bei Monozyten und Monozyten-Plättchenkomplexen bei gesunden Probanden und STEMI-Patienten. Dargestellt ist der MW $\pm$ SD. n= 3 - 6. **Oben:** Anteil der von MHC-I und MHC-II positiven Zellen an Monozyten und Monozyten-Plättchenkomplexen bei gesunden Probanden. **Unten:** Anteil der von MHC-I und MHC-II positiven Zellen an Monozyten und Monozyten-Plättchenkomplexen bei STEMI-Patienten. Rot: Plättchen-Monozytenkomplexe; grau: Monozyten.

9. Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei verschiedenen Personen bedanken, die mich während der Anfertigung der Dissertation unterstützt haben.

Ein großer Dank geht an Uli Flögel, der mir die Möglichkeit gab meine Promotion in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen.

Zudem danke ich ganz besonders Sebastian Temme, der mich stets bei fachlichen Fragen, und durch sein vielfältiges Wissen unterstützte.

Herrn Prof. Jürgen Schrader danke ich, für die Möglichkeit die Labore und Geräte des Instituts für Molekulare Kardiologie zu nutzen.

Herrn Prof. Axel Gödecke danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ein großer Dank gilt zudem Frau Prof. Maria Grandoch, Herrn Florian Bönner und Fabian Nienhaus für den fachlichen Austausch.

Frau Annika Zimmermann und Frau Kerstin Friedel aus dem Institut für Translationale Pharmakologie danke ich für die große Unterstützung bei der Anfertigung histologischer Schnitte.

Für Ihre Unterstützung bei der Anfertigung der Elektronenmikroskopischen Aufnahmen danke ich Frau Dr. Ann Kathrin Bergmann von der Core Facility für Elektronenmikroskopie.

Herzlich bedanken möchte ich mich zudem bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Molekulare Kardiologie für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung bei meiner Promotion. Ein großer Dank gilt hier vor allem Frau Vera Flocke, welche mich mit der Anfertigung der MRT-Aufnahmen unterstützte, sowie Dr. Zhaoping Ding, welcher die Infarktinduktion durchführte. Frau Menke, Frau Dr. Kleimann und Herrn Dr. Bouvain danke ich für ihr stets offenes Ohr und ihre positive Art.

Bei den Schwestern des Herzkatheterlabors möchte ich mich für ihre Unterstützung durch Blutproben aus der Klinik bedanken.

Meinen Freunden und meiner Familie danke ich für ihr offenes Ohr, das stete Wiederaufbauen, wenn die Promotionsarbeit mir Steine in den Weg legte, oder das echte Leben andere Pläne bereithielt. Meinem Bruder Marc danke ich für das Korrekturlesen.

Der größte Dank gilt hier meinen Eltern und meinem Ehemann, welche mich bedingungslos unterstützen und auf meinem Weg begleiten. Zudem wäre diese Dissertation wohl ohne euch niemals beendet worden. Ohne euer Zuhören bei Problemen, euer Aufbauen, wenn ich mal

wieder hinschmeißen wollte, oder eure Unterstützung mit den Kindern würde ich nicht dort stehen, wo ich jetzt stehe.

10. Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Ich habe die Stellen gekennzeichnet, welche ich wortwörtlich oder inhaltlich den benutzten Quellen entnommen habe. Die Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen. Ich versichere, dass alle von mir gemachten Angaben wahrheitsgemäß und vollständig sind.

Düsseldorf,
Ort, Datum

Unterschrift