

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen
Abteilung Innere Medizin III
(Schwerpunkt: Kardiologie und Angiologie)

**Analyse intrakoronarer Thromben nach Thrombusaspiration
aus Patienten mit akutem Myokardinfarkt**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Rauer, Markus Kay
2020

Dekan: Professor Dr. B. J. Pichler

1. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. I. Müller

2. Berichterstatter: Professor Dr. H. Mahrholdt

Tag der Disputation: 29.06.2020

Gewidmet meiner Familie und meinen Kindern

Rufe mich an, so will ich dir antworten und will dir kundtun große und unfassbare
Dinge, von denen du nichts weißt. Jeremia 33, 3

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	4
Abkürzungen	6
Tabellenverzeichnis	8
Abbildungsverzeichnis	9
1 Einleitung.....	12
1.1 Atherosklerose	12
1.2 Der Myokardinfarkt.....	13
1.2.1 Epidemiologie	13
1.2.2 Ätiologie	13
1.2.3 Pathophysiologie.....	14
1.2.4 Therapie allgemein	16
1.2.5 Prognose.....	17
1.3 Die Rolle verschiedener Zellentitäten innerhalb der Atherosklerose	18
1.3.1 Monozyten und Makrophagen.....	18
1.3.2 Vaskuläre glatte Muskelzellen	20
1.3.3 Thrombozyten	21
1.4 Thrombusaufbau	23
1.5 Regenerationsprozesse nach Plaqueruptur und Infarkt	25
1.6 CD14.....	27
1.7 CD42b.....	27
1.8 CD68	28
1.9 Fragestellung	29
2 Methodische Durchführung.....	30
2.1 Patientenkollektiv.....	30
2.2 Verwendete Instrumente und Chemikalien.....	30
2.3 Kultivierung der koronaren Thromben	34
2.4 Histologische Aufarbeitung.....	36
2.5 Digitale Analyse der Aufnahmen aus Zellkultur und Histologie	39

2.6	Statistische Analyse	40
3	Ergebnisse.....	41
3.1	Statistische Ergebnisse des Patientenkollektivs	41
3.2	Ergebnisse der Thrombuskultivierung	46
3.3	Ergebnisse der Histologischen Aufarbeitung	53
4	Diskussion.....	60
4.1	Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse.....	60
4.2	Baseline Charakteristika	61
4.3	Zellkultur	61
4.4	Immunhistochemie.....	63
4.5	Limitationen der Studie.....	64
4.6	Relevanz der Ergebnisse	64
4.7	Schlussfolgerungen.....	65
5	Zusammenfassung	67
6	Literaturverzeichnis.....	69
7	Erklärungen zum Eigenanteil.....	81
8	Danksagung.....	82

Abkürzungen

ACS	<i>acute coronary syndrom / Akutes Koronarsyndrom</i>
AFK	<i>Alb-Fils-Kliniken Göppingen</i>
AP	<i>Angina pectoris</i>
CABG	<i>coronary artery bypass grafting / Bypass Operation</i>
CCL-2	<i>chemokine (c-c motif) ligand 2</i>
cTn	<i>cardial Troponin / kardiales Troponin</i>
CXCL	<i>C-X-C-motif Ligand</i>
DAMP	<i>damage-associated molecular pattern</i>
DAPT	<i>dual anti platelet therapy</i>
DES	<i>Drug eluting Stent</i>
EC	<i>Endothelial Cell / Endothelzellen</i>
EvG	<i>Elastika van Gieson</i>
GPI	<i>Glykosylphosphatidylinositol</i>
GPIb α	<i>Glykoprotein Iba</i>
GRACE	<i>Global Registry of Acute Coronary Events</i>
HE	<i>Hämatoxylin-Eosin</i>
HIER	<i>heat induced epitope retrieval</i>
IAP	<i>Instabile Angina pectoris</i>
IL	<i>Interleukin</i>
ILGF	<i>insulin like growth factor</i>
iNOS	<i>induzierbare NO-Synthase</i>
IRA	<i>infarct related artery</i>
LBP	<i>Lipopolysaccharid-Bindungsprotein</i>
LOX-1	<i>lectin-like oxLDL receptor-1</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharid</i>
MACE	<i>major adverse cardiovascular events</i>
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein-1, monocyte chemoattractant protein-1</i>
M-CSF	<i>macrophages colony stimulating factor</i>
MI	<i>Myokardinfarkt</i>

MMP	<i>Matrixmetalloprotease</i>
NSTEMI	<i>non-ST-Elevation Myocardial Infarction</i>
oxLDL	<i>oxidiertes Low density Lipoprotein</i>
PAR	<i>Protease-aktivierter Rezeptor</i>
PCI	<i>Perkutane Koronarintervention</i>
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PSGL-1	<i>P-Selectin glycoprotein ligand 1</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
SD	<i>Standarddeviation</i>
SDF-1	<i>stromal cell derived factor-1</i>
SEM	<i>scanning electron microscope / Rasterelektronenmikroskop</i>
SMC	<i>smooth muscle cells / glatte Muskelzellen</i>
SR	<i>Scavenger Rezeptor</i>
SR-A	<i>scavenger receptor A</i>
STEMI	<i>ST-Elevation Myocardial Infarction / ST-Hebungsinfarkt</i>
TA	<i>Thrombusaspiration</i>
TASTE	<i>Thrombus aspiration during ST-segment elevation myocardial infarction</i>
TGF- β	<i>transforming growth factor-β</i>
TLR4	<i>Toll-like-receptor-4</i>
TNF	<i>Tumornekrosefaktor</i>
TOTAL	<i>Randomized trial of primary PCI with or without routine manual thrombectomy</i>
UKT	<i>Universitäts Klinikum Tübingen, Universitäts Klinikum Tübingen</i>
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule 1</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
vWF	<i>von-Willebrand-Faktor</i>

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Myokardinfarkttypen und deren Ursache. Nach: Thygesen, K., et al., Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). Circulation, 2018. 138(20): p. e624-e630.	14
Tabelle 2: Verwendete Instrumente	30
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien.....	32
Tabelle 4: Verwendete Antikörper, IgG-Kontrollen und Reagenzien zur Immunhistochemie.....	33
Tabelle 5: Zusammensetzung Kulturmedium	35
Tabelle 6: Kriterien zur Klassifizierung der in Zellkultur sichtbaren Zellen. Das Größenäquivalent 1 E entspricht der Größe eines Erythrozyten.....	35
Tabelle 7: Patientencharakteristika der untersuchten Kohorte. SD = Standarddeviation. 41	
Tabelle 8: Baseline Patientencharakteristika geordnet nach Gruppen basierend auf dem Zeitintervall von Beschwerdebeginn bis Reperfusion, der sog. Symptom-to-Balloon-Time. Die Zeitintervalle wurden folgendermaßen zusammengefasst: < 3 h; 3 – 6 h; > 6 h. Signifikante Unterschiede wurden grau markiert, Unterschiede mit Trend zur Signifikanz unterstrichen dargestellt.....	42

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Mittlerer Tag des größten Zellreichtums der Zellkultur mit Standardfehler nach Gruppen geordnet. Die Gruppeneinteilung der Kulturen erfolgte anhand der Zeitspanne von Beschwerdebeginn der Patienten bis zur Reperfusion, der sogenannten Symptom-to-Balloon-Time, in folgende Gruppen: < 3 h, 3 – 6 h, > 6 h. * = $P \leq 0,05$; n.s. = nicht signifikant..... 47
- Abbildung 2: Zellarten in den Zellkulturen. (A) Erythrozyten; (B) Nicht klassifizierbare Zellen (weiße Pfeile); (C) Makrophagen (schwarze Pfeile); (D) Fibroblasten (Pfeilspitzen)..... 48
- Abbildung 3: Mittlere Anzahl und Standardfehler nicht klassifizierbarer Zellen nach Gruppen geordnet. Die Gruppeneinteilung der Kulturen erfolgte anhand der Zeitspanne von Beschwerdebeginn der Patienten bis zur Reperfusion, der sogenannten Symptom-to-Balloon-Time, in folgende Gruppen: < 3 h, 3 – 6 h, > 6 h. * = $P \leq 0,05$; n.s. = nicht signifikant..... 49
- Abbildung 4: Mittlere Anzahl und Standardfehler der Monozyten nach Gruppen geordnet. Die Gruppeneinteilung der Kulturen erfolgte anhand der Zeitspanne von Beschwerdebeginn der Patienten bis zur Reperfusion, der sogenannten Symptom-to-Balloon-Time, in folgende Gruppen: < 3 h, 3 – 6 h, > 6 h. * = $P \leq 0,05$; n.s. = nicht signifikant..... 50
- Abbildung 5: Mittlere Anzahl und Standardfehler der Makrophagen nach Gruppen geordnet. Die Gruppeneinteilung der Kulturen erfolgte anhand der Zeitspanne von Beschwerdebeginn der Patienten bis zur Reperfusion, der sogenannten Symptom-to-Balloon-Time, in folgende Gruppen: < 3 h, 3 – 6 h, > 6 h. * = $P \leq 0,05$; n.s. = nicht signifikant..... 50
- Abbildung 6: Mittlere Anzahl und Standardfehler der Schaumzellen nach Gruppen geordnet. Die Gruppeneinteilung der Kulturen erfolgte anhand der Zeitspanne von Beschwerdebeginn der Patienten bis zur Reperfusion, der sogenannten Symptom-to-Balloon-Time, in folgende Gruppen: < 3 h, 3 – 6 h, > 6 h. * = $P \leq 0,05$; n.s. = nicht signifikant..... 51

Abbildung 7: Mittlere Anzahl und Standardfehler der Fibroblasten nach Gruppen geordnet. Die Gruppeneinteilung der Kulturen erfolgte anhand der Zeitspanne von Beschwerdebeginn der Patienten bis zur Reperfusion, der sogenannten Symptom-to-Balloon-Time, in folgende Gruppen: < 3 h, 3 – 6 h, > 6 h. * = $P \leq 0,05$; n.s. = nicht signifikant..... 51

Abbildung 8: Mittlere Anzahl und Standardfehler der Endothelzellen nach Gruppen geordnet. Die Gruppeneinteilung der Kulturen erfolgte anhand der Zeitspanne von Beschwerdebeginn der Patienten bis zur Reperfusion, der sogenannten Symptom-to-Balloon-Time, in folgende Gruppen: < 3 h, 3 – 6 h, > 6 h. * = $P \leq 0,05$; n.s. = nicht signifikant..... 52

Abbildung 9: Hämatoxylin-Eosin-Färbung: Repräsentative Ausschnitte der einzelnen Thrombuskategorien. (A) Erythrozytenreicher Thrombus; (B) Thrombozytenreicher Thrombus; (C) Zellinfiltratreicher Thrombus; (D) Matrixreicher Thrombus..... 53

Abbildung 10: Mittlerer prozentualer Anteil und Standardfehler CD42b-positiver Fläche (Marker für Thrombozyten) je Gesichtsfeld (10fach). Einteilung der Thromben in I: Erythrozytenreicher Thrombus; II: Thrombozytenreicher Thrombus; III: Zellinfiltratreicher Thrombus; IV: Matrixreicher Thrombus..... 54

Abbildung 11: Mittlere Anzahl und Standardfehler zellkernhaltiger Zellen je Gesichtsfeld (20fach). Einteilung der Thromben in I: Erythrozytenreicher Thrombus; II: Thrombozytenreicher Thrombus; III: Zellinfiltratreicher Thrombus; IV: Matrixreicher Thrombus..... 55

Abbildung 12: Mittlere Anzahl und Standardfehler CD14 positiver Zellen je Gesichtsfeld (20fach). Einteilung der Thromben in I: Erythrozytenreicher Thrombus; II: Thrombozytenreicher Thrombus; III: Zellinfiltratreicher Thrombus; IV: Matrixreicher Thrombus..... 55

Abbildung 13: Mittlere Anzahl und Standardfehler CD68 positiver Zellen je Gesichtsfeld (20fach). Einteilung der Thromben in I: Erythrozytenreicher Thrombus; II: Thrombozytenreicher Thrombus; III: Zellinfiltratreicher Thrombus; IV: Matrixreicher Thrombus..... 56

Abbildung 14: Mittlerer prozentualer Anteil und Standardfehler violetter Fläche in der Elastika van Gieson Färbung je Gesichtsfeld (10fach). Einteilung der Thromben in I:

Erythrozytenreicher Thrombus; II: Thrombozytenreicher Thrombus; III: Zellinfiltratreicher Thrombus; IV: Matrixreicher Thrombus.....	56
Abbildung 15: Mittlere Anzahl und Standardfehler der kernhaltigen Zellen in der Hämatoxylin-Eosinfärbung pro 20fach Gesichtsfeld in Gruppen nach dem Zeitintervall von Beschwerdebeginn bis Reperfusion, der sogenannten Symptom-to-Balloon-Time, geordnet. n.s. = nicht signifikant.....	57
Abbildung 16: Mittlere Anzahl und Standardfehler der CD14 positiven Zellen pro 20fach Gesichtsfeld in Gruppen nach dem Zeitintervall von Beschwerdebeginn bis Reperfusion, der sogenannten Symptom-to-Balloon-Time, geordnet. n.s. = nicht signifikant.....	58
Abbildung 17: Mittlere Anzahl und Standardfehler der CD68 positiven Zellen pro 20fach Gesichtsfeld in Gruppen nach dem Zeitintervall von Beschwerdebeginn bis Reperfusion, der sogenannten Symptom-to-Balloon-Time, geordnet. n.s. = nicht signifikant.....	58
Abbildung 18: Mittlerer prozentualer Anteil und Standardfehler der CD42b positiven Fläche pro 20fach Gesichtsfeld in Gruppen nach dem Zeitintervall von Beschwerdebeginn bis Reperfusion, der sogenannten Symptom-to-Balloon-Time, geordnet.....	59
Abbildung 19: Mittlerer prozentualer Anteil und Standardfehler der violett gefärbten Fläche pro 20fach Gesichtsfeld in Gruppen nach dem Zeitintervall von Beschwerdebeginn bis Reperfusion, der sogenannten Symptom-to-Balloon-Time, geordnet.....	59

1 Einleitung

1.1 Atherosklerose

Dank Fortschritte der medizinischen Versorgung sowie hygienische Verbesserungen innerhalb der Gesellschaft zeigte sich eine sukzessive Zunahme der durchschnittlichen Lebenserwartung vor allem in den Industrienationen [1]. Waren früher noch Infektionen und Verletzungen die führende Todesursache, rückten spätestens seit dem 20. Jahrhundert vor allem Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems in den Vordergrund [2, 3]. Ursächlich scheint hier besonders der westliche Lebensstil mit Begünstigung eines kardiovaskulären Risikoclusters, dem metabolischen Syndroms, zu sein [4]. Aktuell sind Herz-Kreislauferkrankungen für etwa ein Drittel der Todesfälle in Deutschland verantwortlich und stellen somit die größte Gruppe dieser Ursachen dar [5]. Zusätzlich ergeben sich hieraus auch negative wirtschaftliche Einflüsse, wie etwa durch Verlust produktiver Lebensjahre, was auch weltweit ein Problem darstellt [6]. So verursachten beispielsweise Herzkreislauferkrankungen in den Jahren 2013 bis 2014 in den USA direkte und indirekte Kosten von etwa 330 Milliarden US-Dollar [7]. Die Verbesserung dieser Situation erscheint somit nicht nur aus medizinischer Sicht sinnvoll.

Ursache vieler Herz-Kreislauferkrankungen ist die Atherosklerose eine Unterform der Arteriosklerose. Die Arteriosklerose beschreibt die Verhärtung der Arterien allgemein. Die Atherosklerose hingegen betrifft vornehmlich die Tunica intima sowie media mit Lipidablagerungen, Veränderungen im Wandaufbau resp. der Zellzusammensetzung sowie einer begleitenden Entzündungsreaktion [8]. Ursachen dieser Alteration der Gefäßwände sind wiederum vielschichtig und umfassen beispielsweise oxidativen Stress, Lipidstoffwechselstörungen oder Entzündungsprozesse, welche wiederum durch Risikofaktoren, allen voran dem Rauchen, modifiziert werden [9]. Die genaue Pathogenese wird später exemplarisch anhand des Myokardinfarktes unter 1.2.3 dargestellt. Symptome der Atherosklerose sind häufig für die Betroffenen subklinisch und werden erst durch Major-Komplikationen wie Myokardinfarkt oder Schlaganfall evident, welche für ca. 80 % der kardiovaskulär bedingten Todesfälle verantwortlich sind – etwa ein Drittel treten dabei vor Erreichen des 70. Lebensjahres auf [10-14].

1.2 Der Myokardinfarkt

Man unterscheidet drei Manifestationsformen, welche zum Akuten Koronarsyndrom (ACS) zusammengefasst werden: die instabile Angina pectoris (IAP), den ST-Hebungsinfarkt (STEMI), sowie den non-ST-Hebungsinfarkt (NSTEMI). Als IAP gilt dabei jede neu aufgetretene Angina pectoris Symptomatik (AP) oder eine deutlich zunehmende resp. bei geringerer Belastung auftretende AP mit längerer Symptompersistenz (gewöhnlich > 20 Minuten) ohne infarkttypische EKG-Veränderungen. Der Unterschied der IAP zum NSTEMI liegt laborchemisch auf dem fehlenden Anstieg des kardialen Troponins (cTn), da es hierbei noch zu keinem relevanten Zelluntergang kommt. Für den NSTEMI wird angenommen, dass es nur zur Infarzierung der innersten Myokardschicht kommt, was EKG-morphologisch nicht nachzuweisen ist. Der STEMI ist hingegen sowohl durch einen Troponinanstieg über der Norm sowie eine ST-Hebung im EKG durch einen deutlichen myokardialen Zelluntergang charakterisiert.

1.2.1 Epidemiologie

Das ACS ist eine Major-Komplikation der Atherosklerose. Im Jahr 2016 war es in Deutschland mit ca. 48 700 Todesfällen für die meisten, etwa die Hälfte, der Tode innerhalb der Gruppe der Herz-Kreislauf-bedingten Todesfälle verantwortlich und liegt damit vor dem Schlaganfall mit etwa 17 % der Fälle dieser Gruppe [5].

Die Prävalenz lag laut der „Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland“ (DEGS1) im Untersuchungszeitraum von 2008 bis 2011 in der Altersgruppe von 40 bis 79 Jahren bei insgesamt 4,7 % – aufgeteilt in Frauen 2,5 % und Männer 7 % [15]. Die American Heart Association errechnete, dass etwa alle 40 Sekunden ein US-Amerikaner einen Myokardinfarkt (MI) erleide [7].

Die Verteilung der Subtypen des ACS ist in etwa wie folgt: jeweils ca. 30 % NSTEMI sowie STEMI, ca. 25 % IAP. Die restlichen Prozente teilen sich in andere kardiale sowie nicht kardiale Ursachen auf [16].

1.2.2 Ätiologie

Die Hauptrisikofaktoren für kardiovaskuläre Ereignisse inklusive MI sind suboptimale Ernährung, Rauchen, Hypertension, erhöhter BMI mit stammbetonter Adipositas, Bewegungsmangel, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie, Luftverschmutzung

sowie Alkohol oder Drogenabusus. Insgesamt ist die Genese aber multifaktoriell aufzufassen. [7, 17-19].

Viele der o.g. Punkte wären dabei durch entsprechende Lebensstilveränderungen vermeidbar. Für den Risikofaktor Rauchen errechneten Yusuf et al. in der „INTERHEART Study“ eines der größten Chancenverhältnisse für einen MI unter allen untersuchten Risikofaktoren [19]. Ernährung wiederum hat einen langfristigen Einfluss durch sekundäre Verursachung anderer o.g. Risiken. So wirken sich Ernährungsgewohnheiten beispielsweise maßgeblich auf den BMI, die Insulinfreisetzung oder über den Natriumhaushalt auf den Blutdruck aus. Laut des „National Health and Nutrition Examination Survey“ haben sich in den USA im Jahr 2012 gerade einmal 1,5 % der über 20-jährigen optimal ernährt [7].

Nach Entstehung des Infarktes werden fünf verschiedene Entitäten des MI unterschieden, so sind auch iatrogene Ursachen eines MI möglich (Typ 4 und 5). In Tabelle 1 sind diese Formen und ihre jeweilige Genese aufgeführt.

Tabelle 1: Myokardinfarkttypen und deren Ursache. Nach: Thygesen, K., et al., Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). Circulation, 2018. 138(20): p. e624-e630.

Infarkttyp	Ursache
Typ 1	Atherosklerotische Plaqueruptur oder -erosion mit intraluminale Thrombose und / oder distaler Embolisation, spontaner MI
Typ 2	Ischämischer Myokardschaden aufgrund insuffizienten Sauerstoffangebots bei erhöhtem Sauerstoffbedarf ohne Plaqueruptur
Typ 3	Kardialer Tod mit Symptomen eines MI sowie evtl. vorausgegangenen ischämischen EKG-Veränderungen
Typ 4	Interventionsbezogener Myokardschaden
4a	In Zusammenhang mit perkutaner Koronarintervention (PCI) ≤ 48 h nach Intervention
4b	Durch Stentthrombose nach vorangegangener PCI
4c	Durch (In-)stent Restenose im Kontext einer PCI
Typ 5	Im Zusammenhang mit Bypass Operation (CABG)

1.2.3 Pathophysiologie

Dem Myokardinfarkt geht ein längerer atherosklerotischer Entstehungsprozess voraus, welcher z.T. – durch maternale Risikofaktoren ausgelöst – bereits in utero be-

ginnen kann [20]. Es wird angenommen, dass es aufgrund von Stressoren, wie Dyslipoproteinämie, pathologischen Scherkräften oder proinflammatorischen Mediatoren zu einer Änderung der Oberflächenzusammensetzung der Endothelzellen (EC), sowie der Permeabilität des Endothels kommt, was das Anheften von Leukozyten beispielsweise über VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1) begünstigt [14, 21]. Eine wichtige pathophysiologische Stellung nimmt hier oxidiertes Low density Lipoprotein (oxLDL) ein. Aufgenommen über Scavenger Rezeptoren (SR) wie SR-A, CD36 oder LOX-1 (lectin-like oxLDL receptor-1) führt es zur Akkumulation von Cholesterinestern und oxidativem Stress des Endoplasmatischen Retikulums (ER) [22-25]. Hierdurch werden etwa die Differenzierung von Makrophagen zu Schaumzellen sowie proinflammatorische Pathways innerhalb der Zellen unterstützt [24-29]. Letzteres kann über die Aktivierung von NF- κ B wiederum zur Apoptose der entsprechenden Zellen, wie etwa den Endothelzellen, führen, was letztlich in eine gesteigerte Endotheldysfunktion sowie Inflammation mündet [29, 30]. Die Aufnahme von oxLDL über SR unterhält und verstärkt sich dabei selbst. So führt zum einen der Uptake von oxLDL über LOX-1, sowie das dadurch bedingte proinflammatorische Milieu zur verstärkten Expression des SR und höherer oxLDL-Aufnahmekapazität [31, 32]. Weiter wirkt oxLDL chemotaktisch auf Monozyten und verstärkt die Ausschüttung endothelialer Chemokine wie MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), was zur weiteren Migration monoklonaler Zellen führt.

Weiter wird eine Änderung der Zusammensetzung der Extrazellulärmatix (ECM), welche das Endothel abluminal umschließt, mit Überschuss an LDL angenommen [14]. Über endo- und parakrine Prozesse werden so weitere Entzündungs- und Immunzellen angelockt [33]. Wichtige Effektorzellen sind Monozyten, welche nach Migration in das Subendothel zu Gewebsmakrophagen differenzieren und sich weiter, durch die Aufnahme von Lipoproteinen (insbesondere oxLDL s.o.), zu Schaumzellen entwickeln [6, 29]. Hieraus ergeben sich makroskopisch sichtbare gelbliche Streifen in den Gefäßwänden – die „fatty streaks“ [29, 31]. Weitere Bedeutung besitzen glatte Muskelzellen (SMC), welche durch die Produktion von Kollagen, Elastin oder anderen ECM-Bestandteilen zur Bildung der fibrösen Kappe der Plaque beitragen [6, 34]. Mit zunehmendem Wachstum der Läsion durch Migration, Proliferation sowie Produktion von

ECM und vermehrter Aufnahme von Lipoproteinen kommt es gehäuft zum Zelltod insbesondere von Schaumzellen innerhalb der Plaque, sowie zu unzureichenden Aufräumprozessen, wodurch Intrazellulärbestandteile (DAMP-Moleküle) und bereits phagozytierte Lipoproteine im Atherom akkumulieren, was die Begleitentzündung unterhält [35, 36]. Es bilden sich „Nekroptose“-Regionen, welche auch „necrotic core“ genannt werden. Zusätzlich kommt es durch Makrophagen und SMC zur Ausschüttung von Matrixmetalloproteasen (MMPs), welche die stabilisierenden ECM Bestandteile, wie Kollagene aufzulösen vermögen. Die Plaque wird hierdurch biomechanisch instabil und rupturgefährdet [8, 35]. Die Stabilität der Plaque verhält sich proportional zur Dicke der fibrösen Kappe [34]. Ruptur-Prädilektionsstellen sind v.a. die Schulterregionen dieser Kappe [6, 34, 37, 38]. Für die klinischen Erscheinungsformen STEMI, NSTEMI sowie IAP des ACS scheint die Plaquekonfiguration entscheidend zu sein. So konnten Ino et al. [39] mittels intravaskulären Ultraschalls sowie optischer Kohärenztomographie in Patienten mit STEMI eine höhere Rate an dünnwandigen fibrösen Kappen, sogenannten „thin-cap fibroatheroma“ und eine häufigere Plaqueruptur mit großer Rupturhöhle nachweisen. Hierdurch wird potentiell mehr thrombogenes Material freigelegt. Zusätzlich befand sich die Ruptur häufiger entgegengesetzt zum Blutstrom, was sich hämodynamisch ebenfalls nachteilig auswirken kann [39].

1.2.4 Therapie allgemein

Ziel des therapeutischen Vorgehens sollte neben der erfolgreichen Reperfusion eine Minimierung der Verzögerung selbiger durch optimierte Behandlungsalgorithmen sein. Prähospital sollte die Arbeitsdiagnose binnen zehn Minuten gestellt und bei Möglichkeit einer PCI innerhalb der ersten zwei Stunden diese umgehend angestrebt werden, andernfalls kommt eine Lysetherapie in Betracht, welche innerhalb weiterer zehn Minuten nach STEMI-Diagnose einzuleiten ist [40]. Eine erste Thrombozytenaggregationshemmung ist mit ASS durchzuführen, wird eine PCI angestrebt ist zusätzlich ein P2Y₁₂-Hemmer sowie unfraktioniertes Heparin, alternativ Enoxaparin oder Bivalirudin indiziert und sollte spätestens zum Zeitpunkt der PCI gegeben werden. Parallel sollte präklinisch bereits eine symptomatische Therapie erfolgen. Hierzu sind Benzodiazepine als Anxiolytika oder Opiate zur Analgesie mögliche Therapieoptionen. Die Sauerstoffgabe ist bei SaO₂ < 90 % vorgesehen [40-42]. Ist eine PCI im o.g. Zeit-

fenster verfügbar, sollte ein radialer Zugang etabliert und die Stenosestelle mittels Zweitgenerations-Drug-eluting-stent (DES) versorgt, sowie eine möglichst vollständige Revaskularisierung, auch der nicht Infarkt beteiligten Arterien (IRA), angestrebt werden [40]. Letzterer Punkt scheint einen Vorteil in Bezug auf das allgemeine kardiovaskuläre Risiko sowie die Verhinderung von relevanten kardiovaskulären Ereignissen (MACE) zu haben [43-47]. Eine routinemäßige Thrombusaspiration (TA) wurde in der aktuellen ESC Leitlinie von 2017 aufgrund der Ergebnisse der TASTE und TOTAL-Studien verlassen [40, 48-50]. Hier zeigte sich kein Benefit der Thrombektomie in beiden Studien. Hingegen aber eine leichte Zunahme der Schlaganfallrate in der TOTAL-Studie [48-50].

Nach erfolgreicher Lyse resp. PCI schließt sich eine Sekundärprophylaxe mittels Statin und dualer Plättchenhemmung (DAPT) mit ASS und P2Y₁₂-Hemmer für mindestens zwölf Monate an. ASS wird anschließend gemeinsam mit dem Statin lebenslang administriert. Eine Änderung des Lebensstils hinsichtlich Nikotinabstinenz, sowie moderater körperlicher Aktivität sollten mit dem Patienten besprochen und er dazu motiviert werden. Yudi et al. konnten in einer Kohortenstudie mit fast 10 000 Teilnehmern zeigen, dass fortgesetztes Rauchen mit einem 80-prozentigen Risiko schlechteren Überlebens assoziiert war [51].

1.2.5 Prognose

Durch Verbesserung von Patienteninformation – v.a. im Hinblick auf Symptomererkennung [52], sowie Diagnostik, Therapie – konnte die Mortalitätsrate nach MI gesenkt werden [53]. Wichtig ist es bereits zu Beginn Risikopatienten zu identifizieren, welche eine höhere Komplikationsrate aufweisen könnten, da diese Subgruppe einen größeren Benefit aggressiverer Therapieregime aufweist [54, 55]. Das GRACE-Register, eine multinationale Erhebung an mehr als insgesamt 100 000 Patienten über zehn Jahre diene als Datenquelle mehrerer Risiko-Scores, sowie der Prognoseabschätzung. So konnte Granger et al. eine Sterblichkeit während des initialen Krankenhausaufenthaltes von etwa 5 % zeigen, wovon fast 22 % während der ersten 24 h auftraten [55], als auch eine Langzeitmortalität im Follow-up von ca. 7 % binnen zwei Jahren [56]. In einer kleineren neuseeländischen Kohorte mit einem Follow-up von vier Jahren an über 1 100 Teilnehmern zeigte sich eine Krankenhausmortalität von 7,5 % und weitere

Mortalitätsraten von 12,1 % binnen sechs und ca. 15 % binnen zwölf Monaten sowie 19 % nach zwei, 25 % nach drei und ca. 39 % nach vier Jahren [57].

Die GRACE-Daten dienten als Grundlage zweier Risikoscores: einem Risikoscore zur Ermittlung der unmittelbaren Sterblichkeit im Krankenhaus sowie dem „GRACE hospital discharge risk score“. Prognostische Marker für ersteren sind: die Killip-Klassifikation für Herzinsuffizienz, das Alter, der systolische Blutdruck, Herzstillstand und initiales Kreatinin. Es sind zwischen 1 und max. 291 Punkte insgesamt möglich, welche für insgesamt 20 Wahrscheinlichkeitsgruppen stehen, die von einer Chance noch im Krankenhaus zu versterben von $\leq 0,2$ % bis >52 % reichen [55]. Für den 6-Monats Mortalitätsscore, für den Tang et al. sogar eine Validität bis zu vier Jahre nach primärem MI zeigen konnten [57] gelten ebenfalls als Risikofaktoren: Alter, systolischer Blutdruck sowie initiales Kreatinin. Zusätzlich aber auch: anamnestische Herzinsuffizienz, früherer MI, Ruhepuls, ST-Senkung im initialen EKG, erhöhte Herzenzyme und nicht durchgeführte PCI [58]. Die mögliche Gesamtpunktzahl reicht von 1 bis 263 Punkte, wobei das Mortalitätsrisiko binnen sechs Monaten nach MI einem Nomogramm zu entnehmen ist.

1.3 Die Rolle verschiedener Zellentitäten innerhalb der Atherosklerose

1.3.1 Monozyten und Makrophagen

Makrophagen ($M\Phi$) nehmen eine Schlüsselrolle in Entstehung, Progression aber auch Regression atherosklerotischer Läsionen ein [59, 60]. Zirkulierende, aus dem Knochenmark stammende Monozyten werden durch Chemokine wie beispielsweise MCP-1/CCL-2 (chemokine (c-c motif) ligand 2), IL-8 (Interleukin-8), oder läsional vorhandenes apoB-Lipoprotein angelockt [61, 62], über endotheliale Adhäsionsmoleküle wie VCAM-1 haften sie zunächst am Endothel, um dann in das läsionale Subendothel zu migrieren [60, 63]. Schließlich differenzieren sie sich, u.a. durch den Einfluss von M-CSF (macrophages colony stimulating factor), $IFN-\gamma$ (Interferon gamma), c-x-c-motif Liganden aus Thrombozyten, wie CXCL-4 und Interleukinen, zu Gewebsmakrophagen [59, 60, 64-67]. Getriggert durch ihre Umgebung sind sie in der Lage eine Vielzahl an Morphologien und damit verbundenen Funktionen anzunehmen [59, 67, 68]. Sie sind insbesondere über inflammatorische Prozesse eng mit der Dynamik athero-

sklerotischer Plaques verbunden [59]. Dominiert die Monozytenrekrutierung in frühen Stadien noch die Makrophagenakkumulation und somit das Läsionswachstum, so ist ab fortgeschrittenen Stadien v.a. die Proliferation von M Φ selbst dafür wesentlich [69], welche über das Mikroenvironment aber auch Chemokine gesteuert wird [59]. Hier scheinen IL-4, sowie SR-A (scavenger receptor A) starke Proliferationsmediatoren zu sein [70].

Mögliche Phänotypen der M Φ können M1 oder M2 sein, welche noch weiter in M2 a - c unterteilt werden können [59, 60, 66]. Zusätzlich sind noch weitere Phänotypen bekannt, mit Verweis auf die entsprechenden Arbeiten [59, 60, 71]. Die Einteilung der Phänotypen geht auf in vitro Versuche zurück und ist eher prototypisch zu sehen [59, 67]. In realiter sind diese Unterschiede nicht so klar zu erwarten. Der proinflammatorische M1-Phänotyp produziert über die induzierbare NO-Synthase (iNOS) relevante Mengen an NO, sowie über die NADPH-Oxidase reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und zeichnet sich durch Sekretion von entzündungsfördernden Mediatoren wie IL-1 β , IL-12 und TNF- α (Tumornekrosefaktor- α) sowie CCL-2 zur Chemotaxis weiterer Monozyten aus [59]. Zusätzlich werden Proteasen sekretiert, die über Hämorrhagie innerhalb der Plaque oder auch durch Auflösung der fibrösen Kappe zur Instabilität der Läsion mit möglicher Fissur, Ruptur etc. beitragen können [59, 72]. Der M2-Phänotyp bildet gewissermaßen das antiinflammatorische Pendant. Er sekretiert antientzündliche Mediatoren, wie IL-10 und TGF- β , weist eine große Phagozytoseleistung durch Expression von SR auf und ist am Gewebsremodelling beteiligt [67].

Die Phagozytose ist eine wesentliche Funktion dieser Zellentität insgesamt. Über SR werden beispielsweise oxidiertes Low density Lipoprotein (oxLDL) und apoptotische Zellen internalisiert, über Endosom-Lysosomen degradiert und das enthaltene Cholesterin über weitere Pathways metabolisiert. Dabei kann es, über mehrere Zwischenschritte als Lipidtropfen zwischengespeichert, Ausgangspunkt der proinflammatorischen Schaumzellbildung – oder über Cholesterinexporter an Apolipoprotein A-1 oder HDL abgegeben werden [14, 59]. Akkumuliert freies Cholesterin im Cytosol, löst dies Stress im Endoplasmatischen Retikulum (ER) aus, was zur inflammatorischen Aktivierung der M Φ oder auch zum Zelltod führen kann [27, 28]. SR dienen nicht nur der Internalisierung von Lipoprotein und Debris. So moderiert SR-A beispielsweise eben-

falls die Signaltransduktion, sowie die Apoptose der M Φ . Weiter scheint CD36 (SR-B3) an der Entwicklung des „necrotic core“ fortgeschrittener Atherosklerose, sowie der Zellausbreitung und Attachment beteiligt zu sein [67, 73-75]. Auf diese Weise haben diese beiden Rezeptortypen einen wichtigen Einfluss auf die Läsionsprogression [76].

Die Nekrose innerhalb der Plaque, welche zur deren Instabilität beiträgt [59], unterhält über die Entzündung das fortschreitende Wachstum, gleichzeitig scheint die Phagozytoseleistung der M Φ mit zunehmender Größe der Läsion insuffizient, sodass dieser Vorgang perpetuiert [77, 78]. Andererseits führt ein Proliferationsarrest, eine geordnete Efferozytose sowie eine verminderte Rekrutierung resp. die Emigration läSIONaler M Φ zu einer atherosklerotischen Regression [59, 69, 79]

1.3.2 *Vaskuläre glatte Muskelzellen*

Vaskuläre glatte Muskelzellen (VSMC) sind gemeinsam mit den vorangestellten M Φ wichtige Zellentitäten innerhalb atherosklerotischer Läsionen [36, 37]. Dabei besitzen sie bezogen auf deren Dynamik sowohl progressive als auch reparative resp. stabilisierende Funktionen [36]. Sie proliferieren hauptsächlich aus einer VSMC-Subpopulation der Tunica media [37] und migrieren in die Intima [34, 80-82]. VSMC können von der bereits differenzierten Form ausgehend noch weitere Differenzierungen annehmen [37, 83, 84], was Transdifferenzierung oder auch Phänotyp-Switching genannt wird [83]. Man unterscheidet mehrere distinkte Differenzierungsmöglichkeiten, wie kontraktile, synthetisierende oder auch M Φ -ähnliche VSMC [34, 37, 85]. Topografisch ist die kontraktile Form der Tunica media zuzuordnen und exprimiert die klassischen Marker, wie MYH11 oder auch ACTA2 (α -SMA) [37]. Die synthetisierenden VSMC sind in den Atheroskleroseläsionen resp. der Intima zu finden [34]. Letztere zeichnen sich ultrastrukturell durch einen höheren Anteil an rauem ER sowie Golgi-Apparate aus, kontraktile Elemente, wie MYH11 oder ACTA2, können zuweilen nicht nachweisbar sein [34, 36, 81, 82]. Diese synthetisierenden VSMC produzieren Kollagen, Elastin und andere Extrazellulärpartikel als Hauptbestandteile der Läsion [34]. Kommt es zur Ruptur der Plaque können VSMC an dieser Stelle akkumulieren und durch ECM-Produktion eine größere Ruptur verhindern. Gleichzeitig erfolgt die Aktivierung von Thrombozyten über vWF mit Kollagen sowie der plasmatischen Gerinnung und letztlich das Läsionswachstum [13, 36]. Zusätzlich sind kontraktile VSMC luminal der fibrö-

sen Kappe zu finden, welche einen stabilisierenden Effekt haben könnten [83]. M Φ -ähnliche VSMC sind in der Lage M Φ -Marker, wie CD68, zu exprimieren und Inflammation zu begünstigen [37, 83]. Dabei ist das Genexpressionsmuster dieser Zellen deutlich verschieden zu klassischen Monozyten oder M Φ [86]. Ihre Phagozytosefähigkeit ist im Vergleich zu aktivierten M Φ reduziert, was die Progression des „necrotic core“, durch ungenügende Clearance alter Zellbestandteile etc. begünstigt [37]. Shankman et al. konnten durch Abstammungsuntersuchungen („Lineage tracing“) mithilfe epigenetischer Muster zeigen, dass insgesamt 38% der CD68/ACTA2-doppelpositiven Zellen innerhalb fortgeschrittener atherosklerotischer Läsionen VSMCs zuzuordnen sind [87]. Insgesamt wurden Rolle, Funktion sowie der Anteil der VSMC an der Atheroskleroseprogression resp. -stabilisierung aufgrund der möglichen Alteration innerhalb der klassischen VSMC-Markermuster, in der Vergangenheit vermutlich unterbewertet [81, 82].

1.3.3 Thrombozyten

Thrombozyten entstehen aus Megakaryozyten durch Abspaltung ihres Zytoplasmas über spezialisierte Zellmembranen [88]. Es wird angenommen, dass aus einem Megakaryozyten ca. 1 000 bis 3 000 Thrombozyten entstehen können [89]. Wichtige physiologische Aufgaben erfüllen Thrombozyten klassischerweise in der Hämostase, wohingegen sie pathophysiologisch für die Thrombusformation und damit assoziierte Krankheitsbilder entscheidende Bedeutung besitzen [21, 89-91]. Trotz ihres kernlosen Zustandes sezernieren sie eine Vielzahl an Stoffen, welche sowohl beispielsweise aus zytoplasmatischen α -, δ - und λ -Granula stammen [92, 93], aber auch über vorhandene mRNA synthetisiert werden können [94]. Damit kommunizieren sie in vielfältiger Weise mit den umliegenden Zellen und nehmen auf ihre Umgebung Einfluss [21, 89, 95]. Erst mit voranschreitender Forschung und Einführung neuer Untersuchungsmethoden wird mehr und mehr ersichtlich, welche Bedeutung diesen Zellen zukommt.

In Bezug auf die Atherosklerose scheinen Thrombozyten bereits sehr früh in die Pathogenese einbezogen zu sein. So konnten in Tierexperimenten mit Atherosklerosesuszeptiblen ApoE^{-/-} Mäusen gezeigt werden, dass Thrombozyten bereits vor Auftreten atherosklerotischer Läsionen am arteriellen Endothel adhären waren [96]. Es wird davon ausgegangen, dass proinflammatorische Mediatoren aber auch Dyslipidämie

oder Hypertension Endothelzellen zur Expression von Adhäsionsmolekülen veranlassen [6]. Während der Adhäsion der Thrombozyten unterscheidet man chronologisch mehrere Stadien: das Kleben, das Rollen sowie letztlich die feste Adhäsion [21]. Selektine scheinen wichtige endotheliale Interaktionspartner während der frühen Adhäsion zu sein, welche mit GPIb/IX/V oder PSGL-1 (P-Selectin glycoprotein ligand 1) der Plättchen interagieren und infolge dessen eine Aktivierung auslösen [21, 97, 98]. Für den ersten Kontakt über GPIb α ist diese Aktivierung noch nicht erforderlich [99] – siehe dazu auch 1.7. Liegt die ECM bereits frei, wie bei rupturierten atherosklerotischen Plaques, geschieht dieser erste Kontakt etwa über vWF und GPIb/IX/V [100]. Die spätere feste Adhäsion aktivierter Thrombozyten wird beispielsweise über GPIIb/IIIa zu vWF gewährleistet [101].

Mit Aktivierung der Thrombozyten folgt die Sezernierung von prothrombotischen Faktoren und Koagulantien, welche eine Plättchenrekrutierung und weitere Thrombusbildung unterhalten [21]. Außerdem wird eine Vielzahl von Zytokinen, Mediatoren, sowie Mikropartikeln ausgeschüttet, welche zu Chemotaxis, Proliferation oder auch Perpetuation der Inflammation führen [21, 102]. Thrombozyten wird zusätzlich auch ein Einfluss in der Regeneration nach Infarkt zugeschrieben [103] – siehe dazu 1.5. Bezogen auf die erstgenannten Punkte kommt es etwa durch IL-1b aus Thrombozyten zur Ausschüttung von MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) durch Endothelzellen [104], was wiederum eine Schlüsselrolle in der Rekrutierung von Monozyten und Makrophagen in die atherosklerotische Läsion darstellt [62, 105] – siehe dazu auch 1.3.1. Wie Makrophagen sind auch Thrombozyten in der Lage MMPs zu sekretieren, was zur möglichen Destabilisierung der Plaque beitragen kann [106-108]. Das Chemokin CXCL-4 (auch Platelet factor 4, PF4 genannt) besitzt eine angiostatische Wirkung durch Inhibierung der Proliferation growth-factor-stimulierter Endothelzellen [109]. Weiter hemmt es die Apoptose von Monozyten und fördert die Differenzierung in M Φ [110]. Weiter ist CXCL-4 in der Lage, durch Inhibierung der LDL-Aufnahme über den LDL-Rezeptor oder auch durch direkte Bindung an oxLDL und konsekutive Steigerung der Aufnahme desselben in Makrophagen über SR und folgende Umwandlung in Schaumzellen (siehe 1.3.1), das inflammatorische Environment zu begünstigen [29, 111]. Der c-c motif ligand 5 (CCL-5) triggert die Adhäsion sowie

Diapedese von Monozyten und fördert damit die Plaqueprogression [112]. CXCL-12, auch SDF-1 (stromal cell derived factor-1) genannt, wirkt wiederum positiv auf die läSIONALE Regeneration ein durch Rekrutierung von endothelialen Progenitorzellen sowie Vorläuferzellen der glatten Muskelzellen (SMC) aus dem Knochenmark hin zu den arteriellen Thromben [113], wobei sich letzteres sowohl pro- als auch regressiv auf die Atherogenese auswirken kann – siehe dazu auch 1.3.2. Durch Aktivierung von GPIIb/IIIa etwa durch Kollagen kommt es zur Sekretion des CD40 Liganden (CD40L) [107, 114]. Bindet dieser an CD40, welches auf Endothelzellen aber auch Makrophagen zu finden ist, kommt es zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie IL-8 oder MCP-1 mit der konsekutiven Rekrutierung weiterer Monozyten oder auch der Expression von Adhäsionsmolekülen wie VCAM-1 oder ICAM-1 auf Endothelzellen [115]. Zusätzlich stimuliert CD40L über Bindung an den Partner CD40 die Sekretion von MMPs durch VSMC oder Makrophagen [21] und ist im Zusammenspiel mit SDF-1 an der Rekrutierung von Progenitorzellen verantwortlich [21, 113, 116, 117].

Insgesamt ist der Einfluss durch Thrombozyten auf atherosklerotische Läsionen vielseitig und umfasst weit mehr, als die reine Thrombusbildung. Insgesamt wurden Rolle und Funktion von Thrombozyten – auch in Entzündungsprozessen oder etwa als Teil des angeborenen Immunsystems lange unterschätzt [21, 95, 118].

1.4 Thrombusaufbau

Die Bildung intrakoronarer Thromben geschieht durch Plaqueruptur oder Erosion mit nachfolgender Freilegung thrombogener Strukturen der atherosklerotischen Läsion [10, 34]. Dabei scheinen die meisten Ereignisse zunächst klinisch stumm zu bleiben, insbesondere bei Plaqueeerosionen [14]. Durch Ergebnisse von Autopsiestudien liegt eine Progression des intrakoronaren Thrombuswachstums in Phasen, welche sich in einem schichtweisen Aufbau widerspiegelt, nahe [10]. Hierbei kann man wandständige, die Ruptur versiegelnde, von Lumen-okklusiven Thromben unterscheiden, wobei in der Genese dieser distinkten Formen die Menge an exponierten thrombogenen Material, das Verhältnis von thrombotischen zu fibrinolytischen Faktoren im Blut sowie lokale Störungen der Hämodynamik wie etwa Turbulenzen wichtig zu sein scheinen [10].

Insgesamt kann man chronologisch frische, weiße Plättchenthromben von fibrinreichen Intermediärthromben sowie von v.a. unter Stase auftretenden, erythrozytenreichen Stagnationsthromben unterscheiden [8]. Silvain et al. haben dazu eine prospektive Untersuchung an intrakoronaren Thromben durchgeführt. Das Material wurde durch Thrombusaspiration während primärer PCI von insgesamt 45 Patienten gewonnen und mittels Rasterelektronenmikroskop (SEM) untersucht. Dabei wurde u.a. der Oberflächenanteil an Thrombozyten, Erythrozyten, Fibrin, Cholesterinkristallen und Leukozyten beurteilt. Es wurden frische Thromben mit > 30 % Thrombozyten- und < 70 % Fibringehalt und ältere mit < 30 % Thrombozyten- und > 70 % Fibrin definiert. Weiter wurden drei Zeitintervalle zwischen Symptombeginn und primärer PCI festgelegt: < 3 h, 3 h < t < 6 h und > 6 h. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Zusammensetzung der Thromben bezogen auf die Zeit zwischen Symptombeginn und PCI hinsichtlich des ersten und letzten Zeitintervalls. Rechnerisch führte jede zusätzliche Stunde bis zur PCI zu einer Verdopplung der Rate an fibrinreichen Thromben und zu einer Halbierung des Plättchengehaltes, wobei als Limitation die ausschließliche Untersuchung der Thrombusoberfläche anzuführen ist [119]. Die Ergebnisse wurden in einer Folgestudie erneut bestätigt [120].

Eine weitere zeitliche Einteilung lieferten Rittersma et al. [121], welche von manchen Autoren als Goldstandard für die Abschätzung des Thrombusalters angesehen wird [122] und sich dabei auf Ergebnisse der Arbeiten von Murakami et al. [123] und Henriques de Gouveia et al. [124] stützt. Dazu wurden die Thromben von 211 Patienten, welche eine primäre PCI aufgrund eines STEMI erhielten und mittels Thrombusaspiration und ggf. Ballonangioplastie resp. Stenteinlage behandelt wurden, untersucht. Die Symptompersistenz betrug dabei weniger als sechs Stunden. Es zeigten sich frische Thromben, welche jünger als einen Tag definiert wurden mit geschichteten Aufbau aus Thrombozyten, Erythrozyten, Fibrin und Granulozyten; sogenannte lytische Thromben, mit einem geschätzten Alter zwischen einem und fünf Tagen mit Kolliquationsnekrosen sowie Kernauflösung der Granulozyten; sowie organisierte Thromben, welche älter als fünf Tage geschätzt wurden. Diese zeigten SMC sowie teils extrazelluläre Matrix und das Einsprossen von Kapillaren.

Die Häufigkeitsverteilung der Kategorien zeigte sich in der Studienpopulation wie folgt: 49 % frische Thromben, 35 % lytische Thromben, 9 % organisierte Thromben und 7 % gemischt frisch sowie organisiert [121].

Inflammatorische Zellen, als Zeichen der beginnenden Organisation, können bereits binnen drei Stunden nach Symptombeginn im Thrombus nachgewiesen werden und nehmen mit der Zeit zu [125]. Fuijkschot et al. [122] untersuchte deren Anteil in den von Rittersma [121] vorgeschlagenen chronologischen Thrombuskategorien. Dabei konnten in allen drei Kategorien etwa Neutrophile sowie Monozyten / Makrophagen gefunden werden, wobei letztere beispielsweise ihre höchste Dichte in lytischen sowie organisierten Thromben besaßen [122].

Interessanterweise sind nicht nur Zellen des angeborenen, sondern ebenso des erworbenen Immunsystems zu finden sowie undifferenzierte Zellen [125].

Vor dem Hintergrund, dass viele koronare, thrombotische Ereignisse klinisch stumm bleiben und das Thrombuswachstum phasenweise verlaufen kann [12, 13], ergibt sich letztlich eine gewisse Unsicherheit bezüglich absoluter Altersangaben der Thromben [119, 122].

1.5 Regenerationsprozesse nach Plaqueruptur und Infarkt

Durch die Plaqueruptur und das konsekutive Freilegen thrombogener Strukturen kommt es, wie in 1.2.3 und 1.3.3 beschrieben zur Akkumulation verschiedener Zellen und zur Ausschüttung diverser Mediatoren am Ort der Läsion bzw. downstream, was zur Mobilisation von Progenitorzellen (u. a. CD34+) aus dem Knochenmark und peripherer Nischen führt [103, 116]. Wichtige Interaktionspartner stellen hierbei Thrombozyten dar, welche eine zentrale Rolle in der Regulation der Progenitorzellen und damit verbundener Prozesse, wie Rekrutierung, Adhäsion und Differenzierung aber auch letztlich Regeneration oder Atheroskleroseprogression, einnehmen [103, 126]. So sekretieren Plättchen nach Aktivierung und Anheften am Läsionsort Chemokine und Cytokine wie SDF-1 oder CD-40L [21, 113, 116], welche zur Rekrutierung der Progenitorzellen beitragen [117] aber auch Lipidabkömmlinge wie Lysophosphatidat oder Sphingosin-1-phosphat können hierbei eine Rolle spielen [127].

Aus durchflusszytometrischen Untersuchungen ist bekannt, dass Vorläuferzellen keine Adhäsionsmoleküle wie etwa GPIb/IX/V oder GPVI für beispielsweise Kollagen oder ähnliche subendotheliale Matrixbestandteile exprimieren, jedoch α_4 -Integrin, β -Integrine und PSGL-1, welche allerdings in vitro keine stabile Adhäsion zu vorgenannten Strukturen aufzubauen vermögen [113, 126]. Daub et. al konnte zeigen, dass CD34+ Zellen unter statischen Bedingungen nicht an Kollagen Typ I allein haften können, jedoch an immobilisierten Plättchen [126]. Dies legt eine wichtige Rolle der Thrombozyten in der Vermittlung der Adhäsion zwischen CD34+ Zellen und den entsprechenden Zielstrukturen am Läsionsort nahe [103, 126]. Der Kontakt zwischen Plättchen und Progenitorzellen wird über P-Selectin der Plättchen sowie PSGL-1 der CD34+ Zellen sowie über Integrine vermittelt [126, 128, 129]. Dass Vorläuferzellen koronar in vivo vorkommen, konnten Li et. al zeigen. Hier wurden koronare Thromben auf den Gehalt von CD31+ Endothelzellen, welche den Stammzellmarker CD34 exprimierten untersucht – in 98 % aller koronaren Thromben waren diese nachweisbar [130].

Sind nun Vorläuferzellen zum Läsionsort rekrutiert worden und adhärent, kommt es zur Differenzierung selbiger. Hierfür sind die vorherrschenden Mediatoren sowie das lokale Mikroenvironment entscheidend [103]. Wichtige Protagonisten sind hier erneut Thrombozyten. Durch die Sekretion diverser Wachstumsfaktoren wie VEGF (vascular endothelial growth factor), PDGF (platelet derived growth factor), TGF- β (transforming growth factor- β) oder ILGF (insulin like growth factor) [21, 131, 132] sowie oben beschriebene Lipidderivate [127] können die CD34+ Progenitorzellen verschiedene Differenzierungswege einschlagen [103]. So konnten Asahara et. al Differenzierungen von CD34+ Vorläuferzellen zu Endothelzellen in vitro nachweisen [133]. Daub et. al zeigten, dass CD34+ Zellen in Anwesenheit von Plättchen und entsprechendem Mikromilieu eine Differenzierung in Endothelzellen sowie Zellen der Makrophagen-/Schaumzelllinie vornehmen können. Weiter konnten Hu et. al nachweisen, dass Zellen, welche das Stammzellantigen Sca-1 (stem cell antigen-1) zeigten, bei Inkubation mit PDGF typische Marker für SMC, wie beispielsweise ACTA2 (α -SMA) oder auch MYH11, exprimierten, welche vorher nicht nachweisbar waren. Je nach vorherrschendem Mikromilieu (pro- resp. antiinflammatorisch) können diese differenzierten

Zellen, wie in 1.3.1 und 1.3.2 beschrieben ambivalent auf die Progression der Atherosklerose wirken.

Für regenerative Prozesse ist jedoch nicht die Morphologie oder etwaige Marker allein, sondern die entsprechende Funktion der Zellen entscheidend. So konnte für CD34⁺ Zellen eine Rekrutierung in ischämische Myokardbereiche sowie eine Differenzierung in Endothelzellen und Myokardzellen mit konsekutiver Verbesserung der kardialen Funktion nachgewiesen werden [103, 132, 134].

1.6 CD14

CD14 ist ein 53 kDa schweres Membranprotein, welches auf Mononuklearen Zellen insbesondere Monozyten, teils aber auch Makrophagen zu finden ist. Es besitzt einen GPI-Anker (Glykosylphosphatidylinositol) mit dem es in der Plasmalemma befestigt ist [135]. Dem gegenüber existiert auch eine lösliche Form (sCD14 – soluble CD14), welche primär CD14-negative Zellen, wie endo- oder epitheliale Zellen zu aktivieren vermag [136]. CD14 ist ein Marker, welcher häufig zur Identifikation von Monozyten verwendet wird, auch wenn Zell-Subtypen bekannt sind, welche nur geringe Mengen dieses Markers exprimieren [137].

Gemeinsam mit dem Lipopolysaccharid (LPS)-Bindungsprotein (LBP) moderiert es die durch gram-negative Bakterien-LPS-getriggerte Aktivierung von Abwehrzellen [135, 138]. Dabei bindet LPS an LBP, welches LPS mit CD14 in Kontakt bringt. CD14 wiederum erleichtert den Kontakt zwischen LPS und den Toll-like-receptor-4 (TLR4) und moduliert die LPS Erkennung [139]. Am Ende des Pathway, welcher Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B mit einschließt, steht die Aktivierung der Transkription der Zielgene, welche für Proinflammatorische Zytokine und Typ I Interferone kodieren [140].

1.7 CD42b

CD42b, ebenso bekannt als Glykoprotein Ib α (GPIb α), ist ein ca. 135 kDa schweres Membranprotein, welches mit etwa 15 000 bis 25 000 Kopien pro Zelle ausschließlich auf Thrombozyten zu finden ist [141, 142]. Es gehört gemeinsam mit GPIb β , GPV und GPIX zum sogenannten GPIb-IX-V Komplex, der die von-Willebrand-Faktor (vWF)

vermittelte Aktivierung der Thrombozyten auslöst [143]. Dabei sind aber auch weitere mögliche Bindungspartner wie beispielsweise Thrombin, Faktor XI und XII, P-Selectin oder MAC-1 beschrieben worden [98, 144-147].

Die Interaktion von GPIb α und vWF erfolgt auch an nicht aktivierten Thrombozyten [148]. Die Dynamik dieser Interaktion gilt als äußerst schnell und kurz [101, 149], was als Voraussetzung der Bindung auch unter hohen Flussgeschwindigkeiten, wie in atherosklerotisch veränderten Gefäßen, gelten könnte [142, 150-152]. Die Interaktion der vorbeschriebenen Partner ist für das Rollen der Thrombozyten an Endothel oder Kollagen entscheidend. Die Interaktion führt zur Aktivierung von GPIIb/IIIa, welches vWF oder auch Fibrogen bindet und zur Thrombozytenaggregation führt [101, 153]. Weiter dient GPIb α als Cofaktor der Thrombozytenaktivierung und Degranulation via G-Protein gekoppelten Protease-aktivierten Rezeptoren PAR-1 und PAR-4 [141]. Die Aktivierung der Plättchen führt außerdem zur proteolytischen Abspaltung von Rezeptortodomänen – dem sogenannten „ectodomain shedding“, bei dem auch Teile der Glykoproteine GPIb α , GPV und GPVI frei werden. Das nun lösliche sGPIb α wird auch als Glycocalicin bezeichnet und ist auch in normalem Plasma zu finden [154, 155]. Erhöhte Level zeigen u.a. eine vermehrte Thrombozytendestruktion an, wie sie beispielsweise bei der Immunthrombozytopenie auftreten können [156].

Ein Mangel kann das hereditäre Bernard-Soulier-Syndrom, eine extrem seltene autosomal rezessive Erkrankung, welche mit prolongierten Blutungen, vergrößerten Thrombozyten und normal bis erniedrigten Thrombozytenzahlen einhergeht, sein [157].

1.8 CD68

CD68 ist ein transmembranäres Glykoprotein, welches von myeloiden, als auch nicht myeloiden Zellentitäten, wie beispielsweise B- oder T-Lymphozyten exprimiert werden kann [158-160]. Mengenmäßig kommt es auf Makrophagen mit etwa 5000 CD68-Molekülen pro Zelle am häufigsten vor und wird dort als Antigen für immunbasierte Färbereaktionen traditionell eingesetzt [161, 162]. Intrazellulär ist es auf Endolysosomen zu finden und gehört mit weiteren Vertretern zur Gruppe der lysosomal assoziierten Membranproteine, den sogenannten LAMPs und wird alternativ als

LAMP-4 bezeichnet [163, 164]. Zwischen beiden Lokalisationen vermag es schnell transportiert zu werden [165].

CD68 ist in vitro in der Lage modifiziertes LDL zu binden und wird als oxLDL-Rezeptor den SR zugeordnet, wo es als Typ D Scavenger Rezeptor klassifiziert wird [166-169]. Ebenso können apoptotische Zellen von Makrophagen über CD68 erkannt werden [166, 168, 169]. In vivo Ergebnisse dieser Bindungsfähigkeit sind noch ausstehend [166]. Eine wesentliche Rolle bei der Internalisierung oxidierten LDLs wird CD68 jedoch nicht zugerechnet, eher besitzt es wohl eine Bedeutung im lysosomalen LDL-Processing [167, 170]. Dennoch führt die oxLDL-Exposition der Makrophagen zu einer up-Regulation des Proteins [171] ebenso die inflammatorische Aktivierung [172, 173]. Womit CD68 auch als Marker für aktivierte Makrophagen gilt [172, 174].

1.9 Fragestellung

Nach derzeitigem Stand der Forschung ist unklar, inwieweit intrakoronare Thromben im und nach akutem Myokardinfarkt eine aktive Rolle bei der Inflammation und Regeneration des akut geschädigten Myokards spielen. Deshalb erfolgte in der vorliegenden Arbeit eine Kultivierung solcher intrakoronarer Thromben, gewonnen durch Thrombusaspiration während PCI bei akutem Myokardinfarkt. Hierbei soll neben dem morphologischen Aufbau die Proliferations- und Differenzierungsfähigkeit von verschiedenen Zelltypen des Thrombus untersucht werden. Nach unserer Kenntnis wurde ein solcher experimenteller Ansatz bisher von anderen Gruppen noch nicht durchgeführt. Analysen fixierter Thromben bezüglich der Komposition erfolgten bereits in geringer Anzahl von anderen Arbeitsgruppen (siehe dazu etwa Ribeiro et al. 2016 [175]), mit jeweils unterschiedlichen immunhistochemischen Untersuchungen und Fragestellungen.

Ziel dieser Arbeit ist es sowohl durch Beobachtung der vitalen Thrombusanteile in der Zellkultur, als auch der histologischen Untersuchung der Thromben ein besseres Verständnis bezüglich der Abläufe in den Thromben und eventuell deren Funktion zu erhalten, welche mit der Thrombusformation einhergehen und diese in Zusammenhang mit den klinischen Parametern der Patienten bringen zu können.

2 Methodische Durchführung

2.1 Patientenkollektiv

Für die hier vorliegende, experimentelle Arbeit konnten Gewebeproben im Zeitraum vom 06.10.2014 bis einschließlich 26.01.2016 von insgesamt 32 Patienten mit ACS durch Thrombusaspiration im Rahmen der Perkutanen Koronarintervention (PCI) gesammelt und untersucht werden. Dabei wurden die Untersuchungen bei 27 der Patienten im Herzkatheterlabor des Universitätsklinikums Tübingen (UKT) und fünf in der entsprechenden Einrichtung der Alb-Fils-Kliniken Göppingen (AFK) durchgeführt. Bei allen Patienten wurde eine Aufklärung bezüglich der Verwendung von biologischem Material im Rahmen von Studien vorgenommen und die Einwilligung dazu eingeholt. Die Untersuchungen dieser Arbeit unterliegen der Einwilligung der Ethik-Kommission des UKT (270/2011BO1).

2.2 Verwendete Instrumente und Chemikalien

Sämtliche in dieser Arbeit benutzten Instrumente, Chemikalien und Antikörper sind in Tabelle 2 - Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 2: Verwendete Instrumente

Instrument	Typbezeichnung	Hersteller
6 Well Zellkulturplatten	Falcon® Multiwell 6 Well, Tissue Culture Plate	Corning Incorporated, Corning, USA
96 Well Zellkulturplatten	costar® 96 Well Cell Culture Cluster	Corning Incorporated, Kennebunk, USA
Autoklav		WESA AG, Eupen, Belgien
Brutschrank	CO ₂ INCUBATOR MCO-18AIC	SANYO Electric Biomedical Co., Ltd., Oizumi-Machi, Japan
Deckgläser	Deckgläser 24 x 60 mm	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen
Durchflusszytometer	BD FACSCalibur™ Flow Cytometer	BD Biosciences, San Jose, USA
Fettstift	CIRCLE WRITER FINE	Science Services GmbH, München

Instrument	Typbezeichnung	Hersteller
Kälteplatte	Typ 70000	MEDAX Nagel GmbH, Kiel
Kanülen	BD Microlance™ 3	Becton, Dickinson and Company Limited, Drogheda, Ireland
Magnetrührer	IKAMAG® RET-GS	Janke & Kunkel GmbH & Co. KG, Staufen i. Br.
	IKAMAG® RCT	Janke & Kunkel GmbH & Co. KG, Staufen i. Br.
Mikrotom	JUNG MULTICUT 2025	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch
Mikrotomklingen	S35 „Fine“	FEATHER Safety Razer Co., Ltd., Osaka, Japan
Mikrowelle	MW 7809	SEVERIN Elektrogeräte GmbH, Sundern
Mikroskope	LB30T	Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar
	Diaphot	Nikon GmbH, Düsseldorf
	Optiphot-2	Nikon GmbH, Düsseldorf
	Axiovert 200	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Neubauer Zählkammer	C-Chip Neubauer Improved – DHC-N01	NanoEnTek Inc., Seoul, Korea
Objektträger	SuperFrost® Plus Objektträger	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen
Paraffinspender	Typ 71000	MEDAX Nagel GmbH, Kiel
Paraffinstreckbad	Typ 25900	MEDAX Nagel GmbH, Kiel
Paraffinwärmebad	Typ 72000	MEDAX Nagel GmbH, Kiel
Pasteur-Pipetten, steril	Pasteur-Plast Pipetten 2 ml, graduert, 155mm, steril	Ratiolab GmbH, Dreieich
Pasteur-Pipetten, unsteril	Pasteur-Plast Pipetten 2,5 ml, graduert, 150mm, unsteril	Ratiolab GmbH, Dreieich
pH-Messgerät	HI 9025 microcomputer pH meter	HANNA instruments Inc., Woonsocket, USA
Pipetten	eppendorf Research (verschiedene Volumina)	Eppendorf AG, Hamburg
	eppendorf Reference (verschiedene Volumina)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen	Spitzen, 10µl, farblos	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
	Pipettenspitzen 200µl	SARSTEDT Aktiengesellschaft & Co., Nümbrecht
	ratiolab® Pipettenspitzen Blau 100-1200µl	Ratiolab GmbH, Dreieich

Instrument	Typbezeichnung	Hersteller
Pipettierhelfer	accu-jet® pro	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Röhrchen	FALCON® 5ml Rundbodenröhrchen, Polystyrol	Corning Science México S.A. de C.V., Reynosa, Mexiko
	CELLSTAR® TUBES, in verschiedenen Volumina, PP, graduated, conical bottom, blue screw cap, sterile	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
	EPPENDORF TUBES® Safe-Lock Tubes 1.5mL	Eppendorf AG, Hamburg
Reinstwasseranlage	TKA-GenPure	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold
Sicherheitswerkbank	HS 18	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold
Stangenpipetten	costar® Stripette® (in verschiedenen Volumina)	Corning Incorporated, Corning, USA
Stoppuhr	TR118	Oregon Scientific France S.A.R.L., Belleville, Frankreich
Taumelschüttler	REAX 3	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Vortexgeräte	IKA® MS 3 basic	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
	VF2	Janke & Kunkel GmbH & Co. KG, Staufen i. Br.
Waage	BD ED 200	SARTORIUS AG, Göttingen
Wärme-, Trockenschrank	Heraeus T6030	Heraeus, Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold
Wasserbad	M20	LAUDA DR. R. WOBSEER GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Wasserbadthermostat	MS/2	LAUDA DR. R. WOBSEER GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Zentrifugen	Universal 32 R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
	Heraeus MULTIFUGE 1 s	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
	Heraeus MULTIFUGE 3S+	Fisher Scientific GmbH, Schwerte

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	CAS-Nummer	Hersteller ^{a)}
Acid Fuchsin	3244-88-0	SI

Chemikalie	CAS-Nummer	Hersteller ^{α)}
Citronensäure	77-92-9	SI
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline Modified, without calcium chloride and magnesium chloride		SI
Eisessig, AnalaR NORMAPUR	64-19-7	VI
Eosin G (C.I. 45380)		RO
Ethanol 99% vollständig vergällt		SP
Formaldehyd-Lösung 4,0%, neutral gepuffert, mit Methanol stabilisiert		FI
Hämatoxylinlösung A nach Weigert		RO
Hämatoxylinlösung B nach Weigert		RO
L-Glutamine 200mM (100X), gibco®		LI
Mayers Hämalaulösung		ME
MEM NEAA (100X), gibco®		LT
Methanol, AnalaR NORMAPUR	67-56-1	VI
Paraplast PLUS		RO
PBS-Tablets		LI
Penicillin-Streptomycin		SI
Pikrinsäure-Lösung (1,2%)		UA
Roti®-Histol		RO
Roti®-Histokitt		RO
Resorcin-Fuchsin nach Weigert (Elastin-Fuchsin-Lsg.)		WA
Sodium Pyruvate		SI
Salzsäure, ROTIPURAN® ≥25%, p.a., ISO		RO
tri-Natriumcitrat – Dihydrat	6132-04-3	AC
Triton™ X-100	9002-93-1	SI
Trypan Blue solution 0,4%	72-57-1	SI
Tween® 20	9005-64-5	ME
Wasserstoffperoxid 30%, EMSURE® ISO		ME

α) Hersteller der Chemikalien: AC = AppliChem GmbH, Darmstadt; FI = Otto Fischer GmbH & Co. KG, Saarbrücken; LI = Life Technologies Corporation, Paisley, UK; LT = Life Technologies Corporation, Grand Island, USA; ME= Merck KGaA, Darmstadt; RO = Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe; SI = SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim; SP = SAV-LIQUID PRODUCTION GmbH, Flintsbach; UA = Universitätsapotheke Tübingen, Tübingen; VI = VWR International S.A.S, Fontenay-sous-Bois, Frankreich ;WA = Waldeck GmbH & Co. KG, Münster.

Tabelle 4: Verwendete Antikörper, IgG-Kontrollen und Reagenzien zur Immunhistochemie.

Antikörper, IgG-Kontrollen, Reagenzien; Katalognummer	verwendete Verdünnung	Hersteller ^{β)}
Anti - CD14; orb19177	1 : 100 & 1 : 125	BI

Antikörper, IgG-Kontrollen, Reagenzien; Katalognummer	verwendete Verdünnung	Hersteller ⁶⁾
Anti - CD42b; sc-7070	1 : 300	SC
Anti - CD68; sc-20060	1 : 50	SC
Biotinylated Link Universal; K0690		DA
Goat IgG; I-5000	1 : 1000	VE
Liquid DAB+ Substrate Chromogen System; K3468		DA
Mouse IgG; sc-2025	1 : 100	SC
Protein Block Serum-Free Ready-To-Use; X0909		DA
Streptavidin/HRP; P0397	1 : 500	DA

⁶⁾ Hersteller der Antikörper bzw. IgG-Kontrollen: BI = Biobyte Ltd., Cambridge, UK; DA = Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark; SC = Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg; VE = Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA

2.3 Kultivierung der koronaren Thromben

Die humanen Thromben wurden durch Aspiration im Rahmen einer PCI gewonnen und in RPMI-Medium (RPMI-Medium, gibco® Fisher Scientific GmbH, Schwerte) gefüllten Röhrchen zur weiteren Untersuchung ins Labor gebracht. Lag ein größerer Zeitabstand zwischen Probengewinnung und Weiterbehandlung vor, wie z. B. bei nächtlicher Intervention, wurden die Thromben bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank zwischengelagert. Der Transport des Materials aus Göppingen wurde bei Umgebungstemperatur durchgeführt.

Die Thromben wurden im ersten Schritt zusammen mit dem Transportmedium in eine 6-Well-Kulturplatte überführt und darin mittels zweier Kanülen hälftig aufgeteilt bzw. portioniert, wenn es sich um mehrere Fragmente handelte. Es wurde darauf geachtet jeweils zwei in Größe und makroskopischer Morphologie gleichwertige Portionen zu erhalten. War die Gesamtheit der Teile des thrombotischen Materials *prima vista* kleiner als ein Stecknadelkopf, wurde auf eine Teilung zugunsten der Zellkultur verzichtet, da die daraus resultierenden Hälften als zu klein für eine suffiziente histologische Aufarbeitung erachtet wurden. Anschließend wurde der für die Histologie vorgesehene Teil in vier prozentiger Formaldehydlösung fixiert. Die anderen Teile wurden mittels steriler Pasteurpipette aus der Kulturplatte in ein Well einer 96-Well-Kulturplatte transferiert, das noch vorhandene Transportmedium abpipettiert und

durch 150 µl frisches Kulturmedium (Zusammensetzung siehe Tabelle 5) ersetzt. Die weitere Inkubation für insgesamt 14 Tage erfolgte ebenfalls bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank.

Tabelle 5: Zusammensetzung Kulturmedium

Zusatzstoff	Hersteller ^{v)}
RPMI 1640 Medium	GI
humanes Serum 20%	BT
Penicillin-Streptomycin (10 000 U/10 mg/mL)	SI
L-Glutamin 200 mM (100X)	GI
MEM NEAA (100X)	GI
Sodium Pyruvat 100 mM	SI

^{v)}Hersteller der Zusatzstoffe: BT = Blutbank der Uniklinik Tübingen, GI = gibco®, Fisher Scientific GmbH, Schwerte; SI = SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim

An sechs Beobachtungszeitpunkten: den Tagen zwei, vier, sechs, neun, zwölf und vierzehn, erfolgte die morphologische Analyse der Zellkulturen. Dazu wurden die Proben unter dem Mikroskop (Axiovert 200, Fa. Zeiss) in ein-, zwei- und vierhundertfacher Vergrößerung begutachtet. Das Augenmerk lag auf dem Auswandern von Zellen aus dem Thrombus, der Zellvermehrung innerhalb der Kultur und der Ausbildung verschiedener Zellmorphologien. Anschließend erfolgte die Fotodokumentation repräsentativer Ausschnitte in o. g. Vergrößerungen. Es wurde dann mithilfe der Aufnahmen für jede Zellkultur der jeweilige Tag der höchsten Zelldichte ermittelt und protokolliert.

In den Zellkulturen waren verschiedene Zelltypen sichtbar, welche sich in Größe, äußerer Form und sichtbaren inneren Strukturen, wie dem Zellkern, unterschieden. Die Größe wurde der Einfachheit halber als Äquivalenzgröße bezogen auf den Durchschnitt der Erythrozyten beurteilt. Die weiteren Kriterien, welche zur Klassifizierung der Zellen festgelegt wurden, sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Kriterien zur Klassifizierung der in Zellkultur sichtbaren Zellen. Das Größenäquivalent 1 E entspricht der Größe eines Erythrozyten.

Zelltyp	Größenäquivalent	Äußere Form	Innere Strukturen
Erythrozyten	1 E	rund	bikonkav, zellkern-

Zelltyp	Größenäquivalent	Äußere Form	Innere Strukturen
			los
Nicht klassifizierbare Zellen	≤ 1 E	rund bis oval	nicht sichtbar
Monozyten	1,5 – 2 E	rundoval	sichtbarer Zellkern, große Kernplasma- relation
Makrophagen	2 – 3 E	oval bis keulenförmig, teils mit Pseudopodien	sichtbarer Zellkern, Kernplasmarelation kleiner als bei Monozyten
Schaumzellen	> 3 E	oval	sichtbarer Zellkern, kleine Kernplasma- relation, teils mehrkernig
Fibroblasten	> 3 E	spindelförmig meist mit langen dünnen Ausläufern, im Verbund netzartig erscheinend	sichtbarer Zellkern, ausgewogene Kernplasmarelation
Endothelzellen	> 3 E	breitflächig, plattenförmig	sichtbarer Zellkern, kleine Kernplasma- relation

2.4 Histologische Aufarbeitung

Zur histologischen Untersuchung wurden die Thrombusteile in Paraffin eingebettet. Dazu wurden sie, wie oben beschrieben, für mindestens zweieinhalb Stunden in Formalin fixiert, in aufsteigender Alkoholreihe je eine Stunde in 70 %, 80 %, 95 % und schließlich zweimal eine Stunde in 99,9 % Ethanol (Fa. SAV-LIQUID PRODUCTION) entwässert. Anschließend folgte für ebenfalls zweimal eine Stunde die Entfernung des Ethanols durch Roti®-Histol (Fa. Carl Roth) und schließlich die Paraffinierung mittels Paraplast PLUS (beide: Fa. Carl Roth) im Wärmeschrank (Heraeus T6030, Fa. Thermo Electron) bei 60° C für 120 Minuten. In kleinen Metallmulden wurde dann etwas Paraffin vorgelegt, die vorbehandelten Thromben dann auf das Paraffin gelegt und mit weiterem Paraffin übergossen (Paraffinspender Typ71000, Fa. MEDAX Nagel) und abgekühlt (Kälteplatte Typ 70000, Fa. MEDAX Nagel). Die so entstandenen Blöcke wurden zum besseren Lösen aus der Mulde kurz im Gefrierschrank (handelsübliche Geräte) bei

-20° C abgekühlt. Es wurden dann mittels Mikrotoms (JUNG MULTICUT 2025, Fa. Leica) fünf Mikrometer dünne Schnitte hergestellt. Diese wurden nun in warmem Wasser gestreckt (Paraffinstreckbad Typ 25900, MEDAX Nagel), um dann auf Objektträger (SuperFrost® Plus, Fa. R. Langenbrinck) aufgezogen zu werden. Anschließend folgte eine Trocknungsphase über Nacht in senkrechter Lagerung bei Raumtemperatur.

An den vollständig getrockneten Paraffinschnitten wurden sowohl zwei histologische Routinefärbungen (Hämatoxylin-Eosin (HE) und Elastika van Gieson (EvG)), als auch immunhistochemische Spezialfärbungen durchgeführt. Letztere richteten sich gegen die Antigene CD 14, CD 42b und CD 68. Allen Färbungen ging die Entparaffinierung mittels Roti®-Histol für je zweimal zehn Minuten und anschließender absteigender Alkoholreihe in 99,9 %, 96 %, 80 % und 70 % Ethanol bis schließlich Aqua dest. für jeweils fünf Minuten voraus.

Zur HE-Färbung wurden die entparaffinierten Schnitte fünf Minuten in Mayers Hämalanlösung (Merck) getaucht, 15 Minuten unter fließendem Wasser gebläut und drei Minuten in Eosin G 1 % (Fa. Carl Roth) gegengefärbt. Das Eosin war „zum Abbruch des alkalischen Bläuens“ [176] mit einem Tropfen Eisessig (Fa. VWR International) versetzt. Danach wurden die Schnitte für fünf Sekunden in aufsteigender Alkoholreihe (70 %, 80 %, 96 %) und für zweimal fünf Minuten in 99,9 % Ethanol entwässert, um schließlich für zuerst weitere fünf Sekunden, dann für 3 Minuten in Roti®-Histol für die Eindeckelung vorbereitet zu werden. Die Eindeckelung erfolgte mittels Roti®-Histokitt (Fa. Carl Roth) und Deckgläsern der Firma R. Langenbrinck. Die Zellen wiesen in dieser Färbung bläuliche Zellkerne und blassrotes Zytoplasma auf, Bindegewebe erschien blassrot.

Für die Elastika van Gieson Färbung wurden die vorbereiteten Schnitte direkt aus 70 % Ethanol der absteigenden Alkoholreihe für dreißig Minuten in Resorcinfuchsin nach Weigert (Fa. Waldeck) gegeben, dann dreimal in 80 % Ethanol gespült und daraufhin für zehn Minuten in Hämatoxylin nach Weigert, bestehend aus den Hämatoxylinlösungen A und B zu gleichen Teilen (beide Fa. Carl Roth) inkubiert. Die so behandelten Schnitte wurden dann kurz in Aqua dest. gespült und danach für etwa drei Sekunden kurz in Salzsäure-Alkohol getaucht (HCl 25 %ig (Salzsäure ROTIPURAN®, Fa. Carl Roth) in Ethanol 70 % im Verhältnis 1 : 24). Danach schloss sich der Bläuungsvor-

gang für zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser an. Hiernach erfolgte für zwei Minuten die Inkubation in Picrofuchsin, bestehend aus Säurefuchsin 2 % (Fa. SIGMA-ALDRICH) und Pikrinsäure (1,2 %) (Universitätsapotheke des UKT) im Verhältnis 1 : 20. Anschließend erfolgte die erneute Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe und Eindeckelung (s. o.). Zellkerne erschienen hier schwärzlich, Bindegewebe rötlich und Elastische Fasern violett.

Den immunhistochemischen Färbungen ist nach der Entparaffinierung das sogenannte heat induced epitope retrieval (HIER) vorausgegangen. Die Färbungen selbst wurden nach der Labeled-Streptavidin-Biotin-Methode (LSAB) durchgeführt. Dazu wurden die entparaffinierten Schnitte in citratgepuffertes Aqua dest. (pH 6) gegeben (tri-Natriumcitrat-Dihydrat 0,1 M (Fa. AppliChem) und Citronensäure 0,1 M (Fa. SIGMA-ALDRICH) im Verhältnis 50 : 9, anschließende Verdünnung mit Aqua dest. im Verhältnis 1 : 10). Der Citratpuffer samt Schnitten wurde dann mittels Mikrowelle (MW-7809, Fa. Severin) zum Kochen gebracht und dann bei etwa 280 Watt für 15 Minuten gekocht und dann langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Nun folgte ein dreimaliges Waschen in PBS (Aqua dest. und PBS Tablets, Life Technologies Corporation, Paisley, UK) mit 0,05% Tween (Tween® 20, Merck KGaA, Darmstadt) für jeweils zwei Minuten. Als nächster Schritt schloss sich ein 15 minütiges Bad in drei prozentigem Wasserstoffperoxid (30 % Wasserstoffperoxid (EMSURE® ISO, Merck KGaA, Darmstadt) und Methanol (VWR International S.A.S, Fontenay-sous-Bois, Frankreich) im Verhältnis 1 : 10) unter Lichtabschluss zur Hemmung der endogenen Peroxidase an. Nun wurde erneut dreimal à zwei Minuten in PBS gewaschen. Auf den Objektträgern wurden die Paraffinschnitte nun mit einem Fettstift (CIRCLE WRITER FINE, Science Services GmbH, München) umkreist. Es folgte die Blockierung unspezifischer Bindungen mittels serumfreien Protein Blocks (Protein Block Serum-Free Ready-To-Use; X0909 Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark) durch zehn minütige Inkubation mit anschließendem Abgießen. Nun wurden die entsprechenden primären Antikörper in ihrer jeweiligen Konzentration mit den so vorbehandelten Schnitten über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. Parallel wurden Isotypkontrollen in gleicher Konzentration und PBS-Kontrollen mitdurchgeführt. Am nächsten Tag folgte, nach Abgießen, ein erneuter dreimaliger Waschvorgang à zwei Minuten in PBS. Es wurde nun mit dem

sekundären Antikörper (Biotinylated Link Universal; K0690, Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark) für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und nach Abgießen für weitere 30 Minuten mit dem Streptavidin-Peroxidase-Konjugat inkubiert. Es wurde erneut dreimal à zwei Minuten in PBS gewaschen. Nun wurde die Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB)-Chromogen-Lösung frisch hergestellt. Dazu wurde das Liquid DAB+ Substrate Chromogen System (K3468, Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark) verwendet. Es wurde 1 mL des enthaltenen Substratpuffers vorgelegt und ein Tropfen des DAB+ Chromogens zugegeben. Nun wurde mittels Pasteurpipette ein Tropfen dieser Lösung auf die Schnitte gegeben und damit bis zum Einsetzen einer makroskopisch sichtbaren Braunfärbung, maximal jedoch zehn Minuten, inkubiert. Anschließend wurde in Leitungswasser gewaschen. Es schloss sich hieran eine Gegenfärbung mit Mayers Hämalaunlösung (Merck KGaA, Darmstadt) für drei Minuten mit darauffolgendem Bläuen unter Leitungswasser für weitere zehn Minuten an. Die Schnitte wurden nun, wie bereits oben beschrieben entwässert und eingedeckelt.

Die histologischen Schnitte wurden anschließend mikroskopisch analysiert und fotodokumentiert (Optiphot-2, Nikon GmbH, Düsseldorf).

2.5 Digitale Analyse der Aufnahmen aus Zellkultur und Histologie

Die Auswertung der Aufnahmen aus Zellkultur und Histologie erfolgte digital mithilfe des Programmes ImageJ (ImageJ, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). Sämtliche folgende Angaben zu den Thromben beziehen sich auf die jeweiligen digitalen Aufnahmen. Zur Bestimmung der Zellzahlen der Zellkultur wurden die Schwarz-Weiß-Aufnahmen der repräsentativen Zellkulturausschnitte mändelförmig durchgemustert und die enthaltenen Zellen mittels Punktmarkierung je nach Morphologie (siehe Tabelle 6) farblich kodiert. Anschließend erfolgte die automatische Zählung der verschiedenen Farbpunkte als Zellzahlen, die Berechnung derer Mittelwerte je Kultur und die Dokumentation der Ergebnisse. Die Zellzählung der farbigen Aufnahmen der repräsentativen Ausschnitte der histologischen Schnitte wurde in gleicher Weise durchgeführt. Die Zellen wurden dabei allerdings schwarz bzw. weiß markiert, um etwaige Zählartefakte durch die Farbaufnahmen zu vermeiden. Zur Bestimmung der positiven Flächenanteile der anti-CD42b und Elastika van Gieson Fär-

bung wurden nach Reset des programminternen Maßstabes sämtliche Ränder der sichtbaren Thrombusanteile in den Aufnahmen umfahren und die daraus resultierende Fläche bestimmt. Anschließend erfolgte die Konturierung der im Falle der anti-CD42b Färbung entsprechend braunen resp. violetten Fläche in der EvG-Färbung mit Bestimmung der jeweiligen Fläche. Es folgte die Berechnung des prozentualen Anteils der positiven Fläche an der Gesamtfläche und die Ermittlung der Mittelwerte für jeden Thrombus.

2.6 *Statistische Analyse*

Die statistische Analyse der Daten wurde mittels IBM® SPSS® Statistics in der Version 24 (IBM Corporation, USA) ausgewertet. Deskriptiv statistische Ergebnisse in Form von Balkendiagrammen werden in dieser Arbeit, sofern nicht anders deklariert, als Mittelwerte mit Standardfehler angegeben. Diese wurden mithilfe von Microsoft® Excel für Mac, Version 15.33 (Microsoft Corporation, USA) erstellt. Es erfolgte eine einfaktorielle analysis of variance (ANOVA) für metrische Daten inklusive Post-Hoc-Test nach Bonferroni nach vorhergehender Prüfung auf Homogenität der Stichproben mittels Levene-Tests. Nominal- und ordinalskalierte Daten wurden mittels Chi-Quadrat-Test auf Signifikanz untersucht. Es wurde ein Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Statistische Ergebnisse des Patientenkollektivs

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 32 Patienten mit ACS untersucht. Das mittlere Alter der Patienten betrug 61,3 Jahre (Standarddeviation 15,8 Jahre). Die Mehrheit der Untersuchten (81 Prozent) waren männlich und über 90 Prozent aller Patienten erlitten einen ST-Hebungsinfarkt. Bei drei der Untersuchten war ein vorangegangener N-/STEMI zu ermitteln und sechs Patienten erhielten bereits früher eine Koronarintervention. Die häufigsten kardiovaskulären Risikofaktoren, welche in der Gruppe der Untersuchten zu finden waren, sind: Bluthochdruck (46,9 %), Hyperlipoproteinämie (46,9 %) und aktueller oder stattgehabter Nikotinabusus (43,8 %). Es erfolgte im Vorfeld der Koronarintervention fast ausnahmslos ein Loading mittels ASS und Heparin (beide 96,9 %). Zur Thrombozytenaggregationshemmung wurde in absteigender Häufigkeit Prasugrel (46,9 %), Clopidogrel (18,8 %) und Ticagrelor (9,4 %) verwendet. Weitere Punkte sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Patientencharakteristika der untersuchten Kohorte. SD = Standarddeviation.

Charakteristikum		n = 32	
Demographie	Alter in Jahren – Mittelwert (SD)	61,3	(15,8)
	Geschlecht – männlich – n (%)	26	(81,3)
Vitalparameter	Herzfrequenz – Mittelwert (SD)	80,9	(24,4)
	Blutdruck mmHg – systolisch	118	(26,6)
	Blutdruck mmHg – diastolisch	72	(12,2)
	Infarkttyp – STEMI – n (%)	29	(90,6)
	3-Gefäß KHK	13	(40,6)
Kardiovaskuläre Vorerkrankungen	Z.n. STEMI/NSTEMI – n (%)	3	(9,4)
	Z.n. PTCA/Stent – n (%)	6	(18,8)
	Vorhofflimmern – n (%)	2	(6,3)
Kardiovaskuläre Risikofaktoren	Arterieller Hypertonus – n (%)	15	(46,9)
	Nikotinabusus – n (%)	14	(43,8)
	Diabetes mellitus – n (%)	6	(18,8)
	Familiäre Vorbelastung	4	(12,5)
	Hypercholesterinämie – n (%)	8	(25)
	Hyperlipoproteinämie – n (%)	15	(46,9)

Charakteristikum	n = 32	
	Adipositas – n (%)	4 (12,5)
Loading Präparate	ASS – n (%)	31 (96,9)
	Heparin – n (%)	31 (96,9)
	Prasugrel – n (%)	15 (46,9)
	Clopidogrel – n (%)	6 (18,8)
	Ticagrelor – n (%)	3 (9,4)
Zeit von Beschwerdebeginn bis Reperfusion in Stunden	Minimum	1
	Maximum	168
	1. Quartil	2,2
	2. Quartil	4,6
	3. Quartil	13,5

Die Patienten wurden je nach Zeitintervall von Beschwerdebeginn bis Reperfusion, der sogenannten Symptom-to-Balloon-Time, in drei Gruppen eingeteilt. Die Intervalle der Gruppen wurden unter Berücksichtigung des ersten und dritten Quartils dieses Parameters und im Hinblick auf ganzzahlige Werte gewählt und sind: kleiner drei Stunden, drei bis sechs Stunden und größer sechs Stunden.

In Tabelle 8 sind die Baseline Charakteristika der untersuchten Patientenkohorte bezogen auf die jeweiligen Gruppen der Symptom-to-Balloon-Time mit entsprechenden P-Werten für die Gruppenunterschiede aus der einfaktoriellen ANOVA aufgeführt. Für den Infarkttyp STEMI und den initialen Troponinwert bei Aufnahme besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen mit $P = 0,007$ und $P = 0,023$. Weiterhin zeigt sich ein Trend zur Signifikanz zwischen den Gruppen für einen stattgehabten STEMI respektive NSTEMI mit $P = 0,089$ und der präinterventionellen Administration von Amiodaron mit $P = 0,068$. Alle weiteren Items sind der unten aufgeführten Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 8: Baseline Patientencharakteristika geordnet nach Gruppen basierend auf dem Zeitintervall von Beschwerdebeginn bis Reperfusion, der sog. Symptom-to-Balloon-Time. Die Zeitintervalle wurden folgendermaßen zusammengefasst: < 3 h; 3 – 6 h; > 6 h. Signifikante Unterschiede wurden grau markiert, Unterschiede mit Trend zur Signifikanz unterstrichen dargestellt..

Charakteristikum	< 3 h (n = 11)	3 – 6 h (n = 8)	> 6 h (n = 13)	P
Demographie				
Alter in Jahren	61,6	66,9	57,5	0,435
Geschlecht – männlich	9 (81,8)	7 (87,5)	10 (76,9)	0,832

Charakteristikum	< 3 h (n = 11)	3 – 6 h (n = 8)	> 6 h (n = 13)	P
Klinische Parameter				
Herzfrequenz min-1	89,3	82,1	73,2	0,276
Sinusrhythmus	6 (60,0)	6 (75,0)	12 (92,3)	0,242
Blutdruck systolisch in mmHg	114,8	124,3	115,3	0,717
Blutdruck diastolisch in mmHg	72,4	70,4	72,5	0,924
Infarkttyp – STEMI – n (%)	11 (100)	5 (62,5)	13 (100)	0,007
BMI in kg/m ²	25,4	26,4	27,5	0,530
Koronarangiographische Daten				
Infarktbezogene Arterie – RCA – n (%)	7 (63,6)	7 (87,5)	12 (92,3)	0,175
Infarktbezogene Arterie – LAD – n (%)	10 (90,9)	7 (87,5)	11 (84,6)	0,898
Infarktbezogene Arterie – LCX – n (%)	3 (27,3)	6 (75,0)	7 (53,8)	0,114
3-Gefäß-KHK – n (%)	3 (27,3)	4 (50,0)	6 (46,2)	0,530
Initialer Stenosegrad in Prozent	99,8	100,0	99,7	0,230
TIMI-Flow 0 vor Intervention	10 (90,9)	8 (100)	11 (91,7)	0,688
TIMI-Flow I vor Intervention	1 (9,1)	0 (0)	1 (8,3)	0,688
TIMI-Flow I nach Intervention	0 (0)	0 (0)	1 (7,7)	0,566
TIMI-Flow II nach Intervention	1 (10,0)	1 (12,5)	0 (0)	0,566
TIMI-Flow III nach Intervention	9 (90,0)	7 (87,5)	9 (90,0)	0,566
Embolisation distal der Ballondilatation	1 (9,1)	1 (12,5)	1 (8,3)	0,950
Keine Stentimplantation	0 (0)	1 (12,5)	0 (0)	0,423
Stentimplantation in RCA	3 (27,3)	4 (50,0)	6 (50,0)	0,423
Stentimplantation in LAD	7 (63,6)	2 (25,0)	4 (33,3)	0,423
Stentimplantation in LCX	1 (9,1)	1 (12,5)	1 (7,7)	0,423
Ejektionsfraktion in Prozent	42,7	40,0	47,15	0,166
Kardiovaskuläre Vor- und Nebenerkrankungen				
Z.n. STEMI/NSTEMI	0 (0)	0 (0)	3 (23,1)	0,089
Z.n. ACVB	0 (0)	0 (0)	0 (0)	.
Z.n. PTCA/Stent	2 (18,2)	1 (12,5)	3 (23,1)	0,832
Z.n. Schrittmacherimplantation	1 (9,1)	0 (0)	0 (0)	0,373
Z.n. Lungenarterienembolie	1 (9,1)	0 (0)	0 (0)	0,373
Vorhofflimmern	1 (9,1)	2 (25,0)	1 (7,7)	0,464
Herzinsuffizienz	11 (100)	8 (100)	13 (100)	.
NYHA – Klasse I – n (%)	6 (54,5)	3 (37,5)	6 (46,2)	0,972
NYHA – Klasse II – n (%)	3 (27,3)	2 (25,0)	3 (23,1)	0,972
NYHA – Klasse III – n (%)	1 (9,1)	2 (25,0)	3 (23,1)	0,972
NYHA – Klasse IV – n (%)	1 (9,1)	1 (12,5)	1 (7,7)	0,972
COPD – n (%)	1 (9,1)	0 (0)	0 (0)	0,373

Charakteristikum	< 3 h (n = 11)	3 – 6 h (n = 8)	> 6 h (n = 13)	P
Kardiovaskuläre Risikofaktoren				
Arterieller Hypertonus	4 (36,4)	1 (12,5)	5 (38,5)	0,677
Nikotinabusus	3 (27,3)	2 (25,0)	7 (53,8)	0,601
Diabetes mellitus	1 (9,1)	2 (25,0)	3 (23,1)	0,189
Familiäre Vorbelastung	1 (9,1)	0 (0)	3 (23,1)	0,480
Hypercholesterinämie	3 (27,3)	1 (12,5)	4 (30,8)	0,908
Hyperlipoproteinämie	6 (54,5)	2 (25,0)	7 (53,8)	0,209
Adipositas	2 (18,2)	1 (12,5)	1 (7,7)	0,835
Niereninsuffizienz	2 (18,2)	0 (0)	2 (15,4)	0,415
Medikation bei Aufnahme				
Antithrombozytäre Therapie				
ASS	10 (90,9)	8 (100)	13 (100)	0,373
Prasugrel	5 (45,5)	2 (25,0)	8 (61,5)	0,263
Clopidogrel	2 (18,2)	3 (37,5)	1 (7,7)	0,236
Ticagrelor	0 (0)	2 (25,0)	1 (7,7)	0,176
Abciximab	1 (9,1)	0 (0)	1 (7,7)	0,694
Eptifibatid	0 (0)	0 (0)	1 (7,7)	0,470
Antikoagulanzen				
Heparin	10 (90,9)	8 (100)	13 (100)	0,373
NM-Heparine	0 (0)	0 (0)	0 (0)	.
Fondaparinux	0 (0)	0 (0)	2 (15,4)	0,210
Marcumar	0 (0)	0 (0)	0 (0)	.
Rivaroxaban	11 (100)	8 (100)	13 (100)	.
Bivalirudin	2 (18,2)	1 (12,5)	3 (23,1)	0,832
Antiemetika				
Ondansetron	2 (18,2)	1 (12,5)	3 (23,1)	0,832
Dimenhydrinat	2 (18,2)	1 (12,5)	4 (30,8)	0,577
Metoclopramid	1 (9,1)	1 (25,0)	2 (15,4)	0,898
Analgetika				
Morphin	7 (63,6)	7 (87,5)	6 (46,2)	0,164
Ibuprofen	0 (0)	0 (0)	1 (7,7)	0,470
Diclofenac	0 (0)	0 (0)	1 (7,7)	0,470
Novaminsulfon	0 (0)	0 (0)	2 (15,4)	0,210
Sedativa				
Diazepam	1 (9,1)	1 (12,5)	1 (7,7)	0,934
Midazolam	1 (9,1)	2 (25,0)	3 (23,1)	0,595

Charakteristikum	< 3 h (n = 11)	3 – 6 h (n = 8)	> 6 h (n = 13)	P
Antihypertensiva				
α – Blocker	1 (9,1)	1 (12,5)	0 (0)	0,460
β - Blocker	3 (27,3)	3 (37,5)	4 (30,8)	0,892
Calciumkanalantagonisten	1 (9,1)	1 (12,5)	1 (7,7)	0,934
ACE-Hemmer	4 (36,4)	2 (25,0)	3 (23,1)	0,751
Sartane	1 (9,1)	0 (0)	1 (7,7)	0,694
Molsidomin	1 (9,1)	0 (0)	0 (0)	0,373
Weitere Präparate				
Amiodaron	2 (18,2)	3 (37,5)	0 (0)	<u>0,068</u>
Suprarenin	1 (9,1)	2 (25,0)	0 (0)	0,162
Diuretika	2 (18,2)	3 (37,5)	2 (15,4)	0,460
Aldosteronantagonisten	1 (9,1)	0 (0)	3 (23,1)	0,274
Statine	3 (27,3)	1 (12,5)	5 (38,5)	0,437
Protonenpumpeninhibitoren	2 (18,2)	0 (0)	4 (30,8)	0,214
Pantozol	0 (0)	0 (0)	2 (15,4)	0,210
Glukokortikoide	1 (9,1)	1 (12,5)	4 (30,8)	0,348
Laborwerte bei Aufnahme				
Leukozyten μl^{-1}	14247	11976	12955	0,536
Erythrozyten $\text{M} \cdot \mu\text{l}^{-1}$	4,72	4,68	4,54	0,779
Hb $\text{g} \cdot \text{dl}^{-1}$	14,4	14,4	13,7	0,534
Thrombozyten $\text{K} \cdot \mu\text{l}^{-1}$	280,3	202,6	262,3	0,317
INR	1,06	1,09	1,10	0,848
PTT sek	62,8	82,0	57,5	0,602
CK-MB initial $\text{U} \cdot \text{l}^{-1}$	391	1191	756	0,408
CK-MB max. $\text{U} \cdot \text{l}^{-1}$	3146	3040	1201	0,118
Troponin initial $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$	14,6	17,8	147,5	0,023
Troponin max. $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$	1304,7	124,3	184,5	0,291
CRP initial $\text{mg} \cdot \text{dl}^{-1}$,36	,43	1,83	0,243
CRP max. $\text{mg} \cdot \text{dl}^{-1}$	3,34	5,35	5,92	0,534
PCT $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$,195	,093	,085	0,673
Cholesterin $\text{mg} \cdot \text{dl}^{-1}$	196,7	170,3	177,1	0,462
HDL $\text{mg} \cdot \text{dl}^{-1}$	40,0	32,8	44,3	0,414
LDL $\text{mgd} \cdot \text{l}^{-1}$	134,4	106,5	126,0	0,456
Triglyceride $\text{mg} \cdot \text{dl}^{-1}$	115,2	128,0	137,0	0,893

3.2 Ergebnisse der Thrombuskultivierung

Das Thrombusmaterial wurde, wie unter 2.3 dargestellt, bearbeitet und untersucht. In der mikroskopischen Verlaufsbeobachtung zeigte sich, dass die verschiedenen Thromben eine inhomogene Dynamik bezüglich des Auftretens verschiedener morphologischer Zelltypen und deren Auswanderung aus dem Thrombus aufwiesen. Insbesondere differierten die Zeitpunkte, an denen der Zenit der beobachtbaren Zellen auftrat. Drei Kulturen wiesen über einen Zeitraum von 14 Tagen keinerlei vitale Zellen auf. Drei Kulturen zeigten ausschließlich Erythrozyten: zwei davon nur wenige und die dritte sehr viele Erythrozyten. Bis auf die letztgenannte stammten diese fünf Kulturen von Patienten mit einer Symptom-to-Balloon-Zeit < 3 h. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Zellkulturen aus Gruppe 1 (Symptom-to-Balloon-Time kleiner drei Stunden) und Gruppe 2 (Symptom-to-Balloon-Time gleich drei bis kleiner sechs Stunden) mit $P = 0,007$, sowie zwischen Gruppe 1 und Gruppe 3 (Symptom-to-Balloon-Time größer sechs Stunden) mit $P < 0,001$. Die einfaktorielle ANOVA ergab ebenfalls für den Gruppenvergleich einen signifikanten Unterschied der Mittelwerte ($3,64 \pm 1,38$; $8,88 \pm 1,03$; $11,15 \pm 0,64$; $P < 0,001$). In Abbildung 1 wurden die Mittelwerte dieser Zeitpunkte mit dazugehörigen Standardfehlern bezogen auf die jeweilige Symptom-to-Balloon-Time-Gruppe gegenübergestellt.

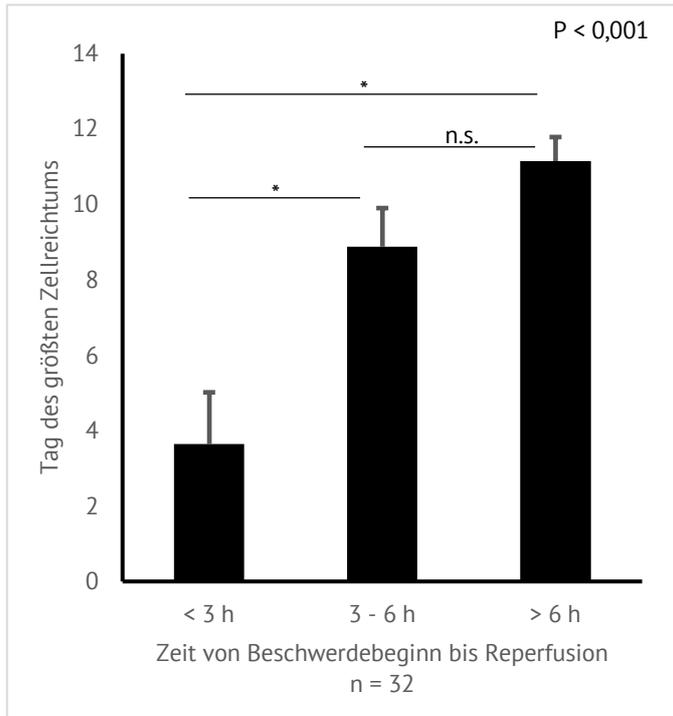


Abbildung 1: Mittlerer Tag des größten Zellreichtums der Zellkultur mit Standardfehler nach Gruppen geordnet. Die Gruppeneinteilung der Kulturen erfolgte anhand der Zeitspanne von Beschwerdebeginn der Patienten bis zur Reperfusion, der sogenannten Symptom-to-Balloon-Time, in folgende Gruppen: < 3 h, 3 - 6 h, > 6 h. * = $P \leq 0,05$; n.s. = nicht signifikant.

In der morphologischen Untersuchung der Zellkulturen lag das Augenmerk auf dem Auswandern von Zellen aus dem Thrombus und der Zellvermehrung innerhalb der Kultur sowie auf der Ausbildung unterschiedlicher Zellmorphologien. So konnten, wie unter Kapitel 2.3 skizziert, sieben im Aussehen verschiedene Zelltypen beobachtet werden, welche dem Erscheinen nach als Erythrozyten, nicht klassifizierbare (möglicherweise noch undifferenzierte) Zellen, Monozyten, Makrophagen, Schaumzellen, Fibroblasten und Endothelzellen klassifiziert werden konnten. Exemplarische Aufnahmen sind Abbildung 2 zu entnehmen.

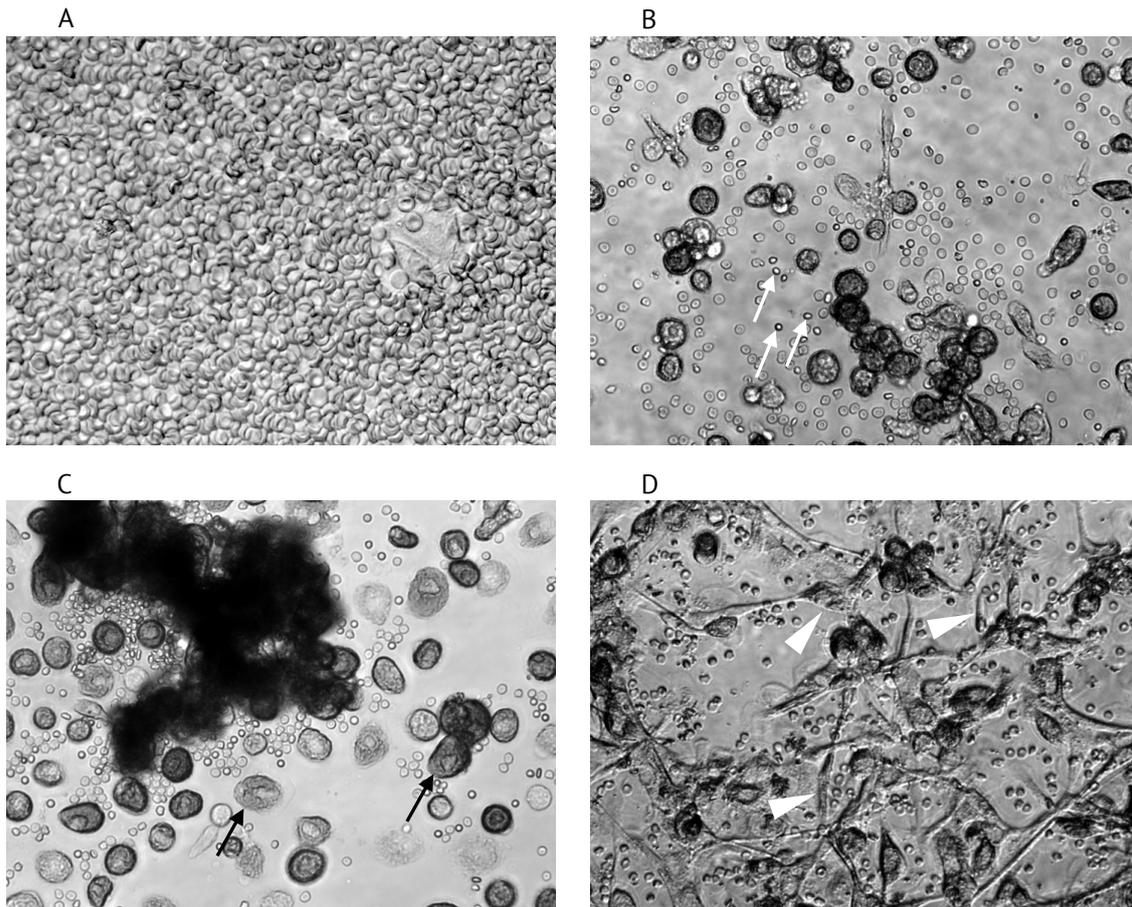


Abbildung 2: Zellarten in den Zellkulturen. (A) Erythrozyten, Gesichtsfeld 40fach; (B) Nicht klassifizierbare Zellen (weiße Pfeile), Gesichtsfeld 20fach; (C) Makrophagen (schwarze Pfeile), Gesichtsfeld 20fach; (D) Fibroblasten (Pfeilspitzen), Gesichtsfeld 40fach.

Es zeigte sich für den Gruppenvergleich der nicht klassifizierbaren Zellen über allen drei Symptom-to-Balloon-Gruppen ein signifikanter Unterschied der Mittelwerte ($19,27 \pm 7,95$; $290,38 \pm 157,97$; $15,08 \pm 6,23$) mit $P = 0,018$ (siehe Abbildung 3). Innerhalb der Gruppen ergab sich jeweils ein signifikantes Ergebnis zwischen Gruppe 1 (Symptom-to-Balloon-Time < 3 h) und Gruppe 2 (3 – 6 h) ($P = 0,039$) und zwischen Gruppe 2 und Gruppe 3 (> 6 h) ($P = 0,028$).

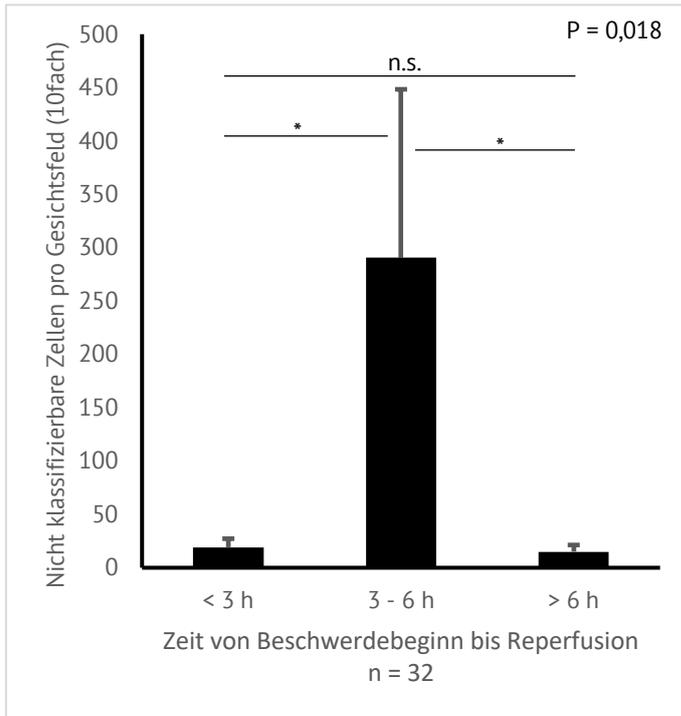


Abbildung 3: Mittlere Anzahl und Standardfehler nicht klassifizierbarer Zellen nach Gruppen geordnet. Die Gruppeneinteilung der Kulturen erfolgte anhand der Zeitspanne von Beschwerdebeginn der Patienten bis zur Reperfusion, der sogenannten Symptom-to-Balloon-Time, in folgende Gruppen: < 3 h, 3 - 6 h, > 6 h. * = $P \leq 0,05$; n.s. = nicht signifikant.

Bei Betrachtung der Monozyten zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied der Mittelwerte über alle drei Beschwerdedauergruppen ($25,09 \pm 13,47$; $730,75 \pm 438,51$; $93,54 \pm 71,09$) mit $P = 0,047$. Im Einzelgruppenvergleich konnte keine Signifikanz bezüglich des Wachstums von Monozyten in der Zellkultur nachgewiesen werden. Allerdings zeigten sich zwischen den Gruppen 1 (< 3 h) und 2 (3 - 6 h) sowie 2 (3 - 6 h) und 3 (> 6 h) eine Tendenz zur Signifikanz mit $P = 0,069$ respektive $P = 0,098$ (siehe Abbildung 4). Für Makrophagen ergaben sich keine signifikanten Ergebnisse in der ANOVA zwischen den Gruppen ($16,82 \pm 11,60$; $243,00 \pm 135,20$; $81,62 \pm 36,68$) ($P = 0,073$). Allerdings zeigt sich ein Trend zur Signifikanz zwischen Gruppe 1 (< 3 h) und 2 (3 - 6 h) mit $P = 0,076$ (siehe Abbildung 5). Bei der statistischen Untersuchung aller weiteren Zellarten konnten keine weiteren signifikanten Unterschiede gefunden werden. Die entsprechenden Werte sind den Abbildungen Abbildung 6 - Abbildung 8 zu entnehmen.

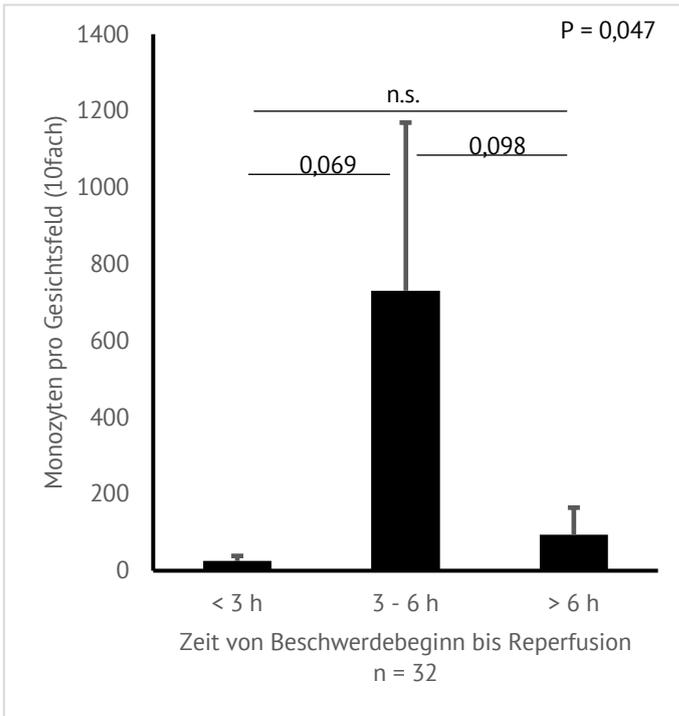


Abbildung 4: Mittlere Anzahl und Standardfehler der Monozyten nach Gruppen geordnet. Die Gruppeneinteilung der Kulturen erfolgte anhand der Zeitspanne von Beschwerdebeginn der Patienten bis zur Reperfusion, der sogenannten Symptom-to-Balloon-Time, in folgende Gruppen: < 3 h, 3 - 6 h, > 6 h. * = $P \leq 0,05$; n.s. = nicht signifikant.

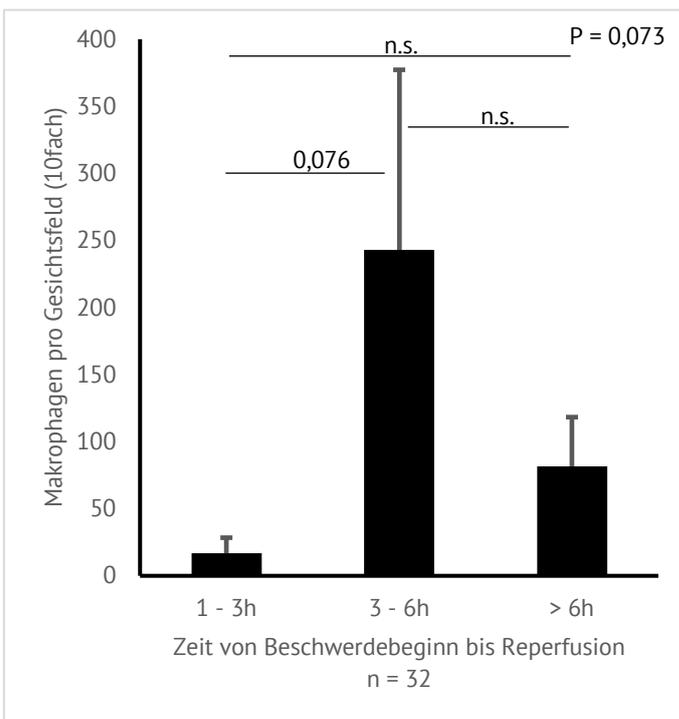


Abbildung 5: Mittlere Anzahl und Standardfehler der Makrophagen nach Gruppen geordnet. Die Gruppeneinteilung der Kulturen erfolgte anhand der Zeitspanne von Beschwerdebeginn der Patienten bis zur Reperfusion, der sogenannten Symptom-to-Balloon-Time, in folgende Gruppen: < 3 h, 3 - 6 h, > 6 h. * = $P \leq 0,05$; n.s. = nicht signifikant.

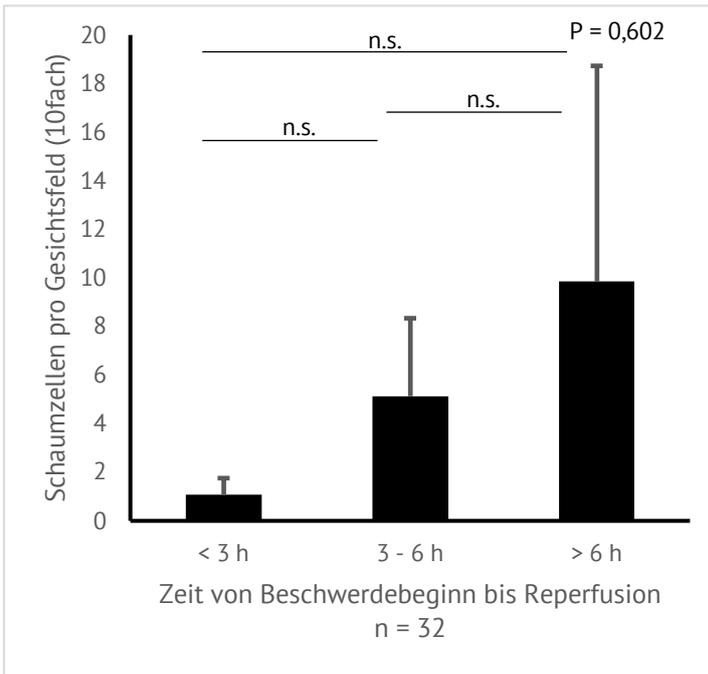


Abbildung 6: Mittlere Anzahl und Standardfehler der Schaumzellen nach Gruppen geordnet. Die Gruppeneinteilung der Kulturen erfolgte anhand der Zeitspanne von Beschwerdebeginn der Patienten bis zur Reperfusion, der sogenannten Symptom-to-Balloon-Time, in folgende Gruppen: < 3 h, 3 - 6 h, > 6 h. * = $P \leq 0,05$; n.s. = nicht signifikant.

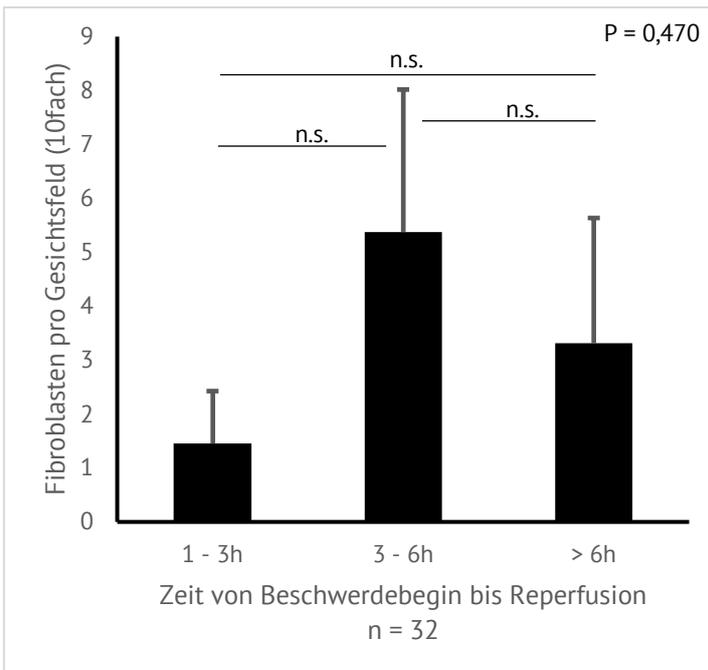


Abbildung 7: Mittlere Anzahl und Standardfehler der Fibroblasten nach Gruppen geordnet. Die Gruppeneinteilung der Kulturen erfolgte anhand der Zeitspanne von Beschwerdebeginn der Patienten bis zur Reperfusion, der sogenannten Symptom-to-Balloon-Time, in folgende Gruppen: < 3 h, 3 - 6 h, > 6 h. * = $P \leq 0,05$; n.s. = nicht signifikant.

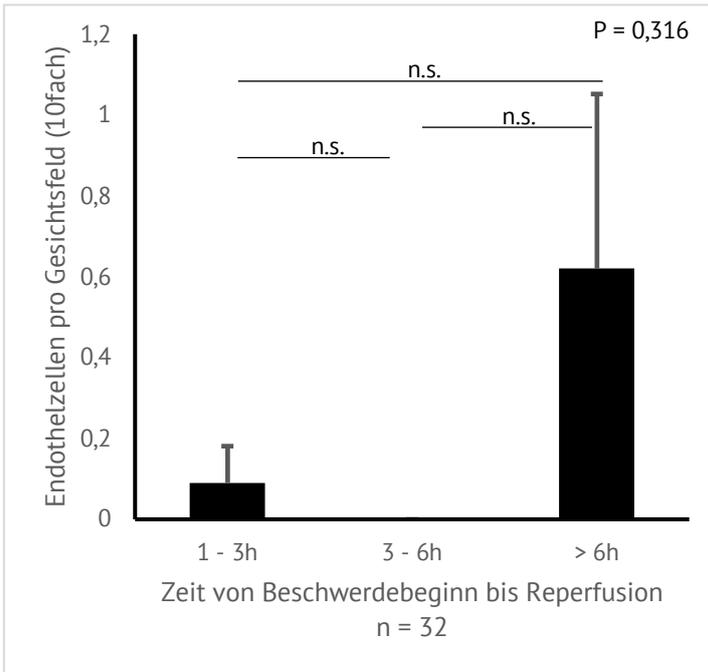


Abbildung 8: Mittlere Anzahl und Standardfehler der Endothelzellen nach Gruppen geordnet. Die Gruppeneinteilung der Kulturen erfolgte anhand der Zeitspanne von Beschwerdebeginn der Patienten bis zur Reperfusion, der sogenannten Symptom-to-Balloon-Time, in folgende Gruppen: < 3 h, 3 - 6 h, > 6 h. * = $P \leq 0,05$; n.s. = nicht signifikant.

3.3 Ergebnisse der Histologischen Aufarbeitung

Eine histologische Untersuchung war größenbedingt bei 16 der 32 untersuchten Thromben möglich. Zu Beginn wurde eine Übersichtsfärbung mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) an den Schnitten aller koronaren Thromben durchgeführt. Es zeigte sich, dass der Thrombusaufbau mikroskopisch vier verschiedenen Mustern folgte. So gab es erythrozytenreiche, thrombozytenreiche, zellinfiltratreiche und matrixreiche Thromben. Repräsentative mikroskopische Aufnahmen sind der Abbildung 9 zu entnehmen.

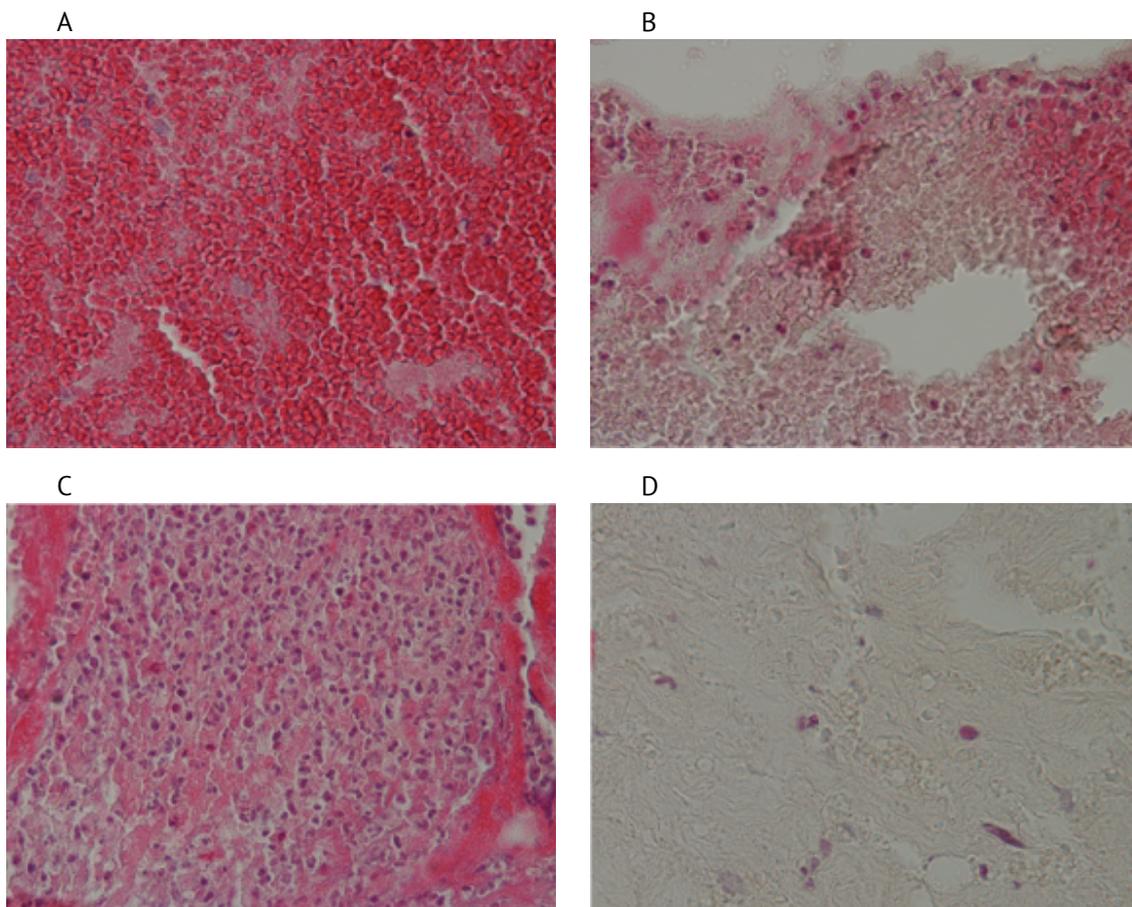


Abbildung 9: Hämatoxylin-Eosin-Färbung: Repräsentative Ausschnitte der einzelnen Thrombuskategorien. (A) Erythrozytenreicher Thrombus, Gesichtsfeld 40fach; (B) Thrombozytenreicher Thrombus, Gesichtsfeld 40fach; (C) Zellinfiltratreicher Thrombus, Gesichtsfeld 40fach; (D) Matrixreicher Thrombus, Gesichtsfeld 40fach.

Basierend auf dieser Beobachtung wurden die Thromben einzeln, entsprechend ihres Aufbaus in der HE-Färbung, einer dieser Thrombuskategorien zugeordnet. Die Schnitte wurden anschließend zur genaueren Analyse der Zusammensetzung mittels anti-CD42b, anti-CD14, anti-CD68, und Elastika van Gieson gefärbt. Dabei zeigte die Kategorie Thrombozytenreicher Thrombus den höchsten mittleren, prozentualen Anteil an CD42b positiver Fläche (28,3 %) im Bezug zur Gesamtfläche (siehe Abbildung 10). Die Kategorie Zellinfiltratreicher Thrombus wies sowohl für die kernhaltigen Zellen in der HE-Färbung (734,7 Zellen) als auch für die CD14 (211,2 Zellen) und CD68 (451 Zellen) positiven Zellen die höchste mittlere Anzahl je 20fach Gesichtsfeld auf (siehe Abbildung 11 -Abbildung 13). In der Elastika van Gieson Färbung konnte für die Kategorie Matrixreicher Thrombus der größte mittlere Anteil violetter Fläche (40,4 %) im Bezug zur Gesamtfläche ermittelt werden (siehe Abbildung 14). Die Häufigkeitsverteilung der verschiedenen Thrombuskategorien lautet: jeweils 25 % Erythrozytenreicher und Thrombozytenreicher Thrombus; 37,5 % Zellinfiltratreicher Thrombus und 12,5 % Matrixreicher Thrombus.

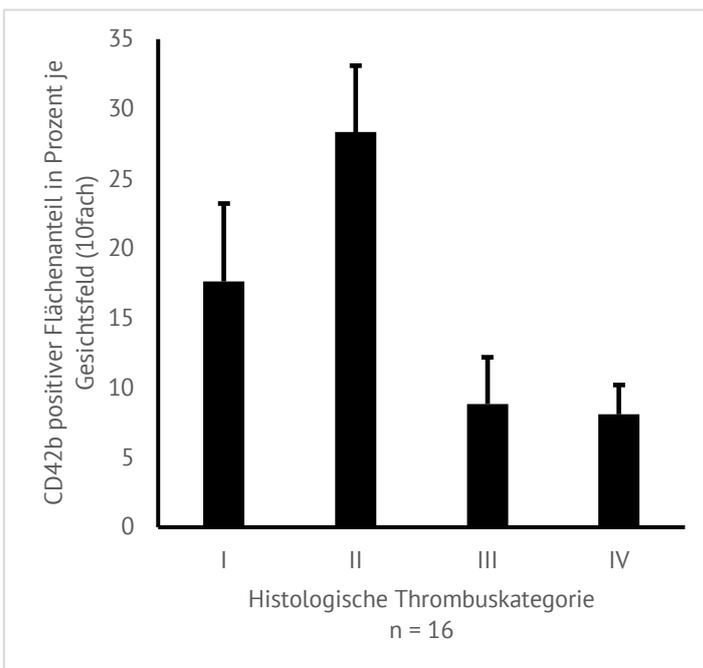


Abbildung 10: Mittlerer prozentualer Anteil und Standardfehler CD42b-positiver Fläche (Marker für Thrombozyten) je Gesichtsfeld (10fach). Einteilung der Thromben in I: Erythrozytenreicher Thrombus; II: Thrombozytenreicher Thrombus; III: Zellinfiltratreicher Thrombus; IV: Matrixreicher Thrombus.

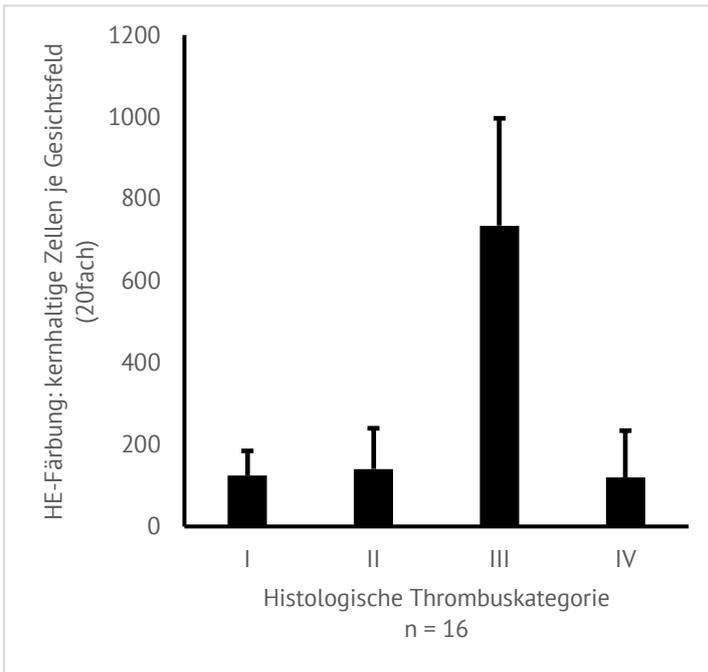


Abbildung 11: Mittlere Anzahl und Standardfehler zellkernhaltiger Zellen je Gesichtsfeld (20fach). Einteilung der Thromben in I: Erythrozytenreicher Thrombus; II: Thrombozytenreicher Thrombus; III: Zellinfiltratreicher Thrombus; IV: Matrixreicher Thrombus.

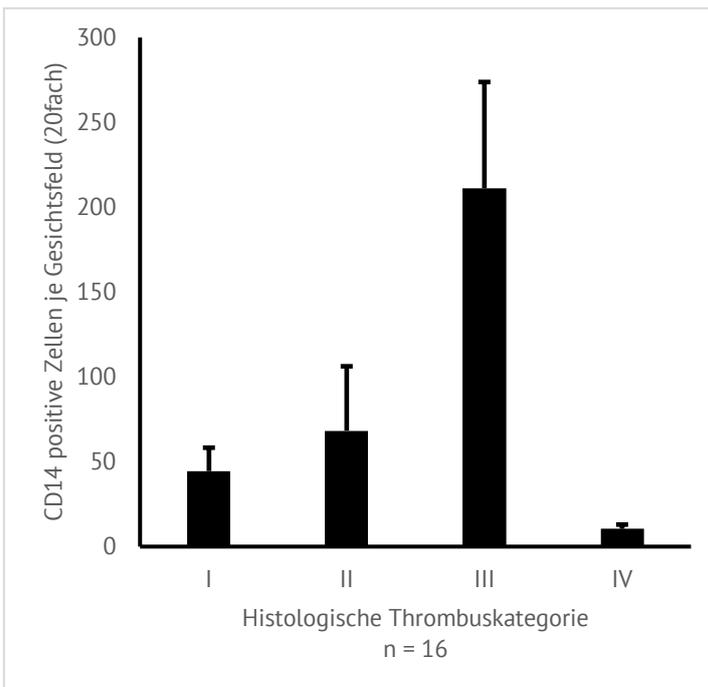


Abbildung 12: Mittlere Anzahl und Standardfehler CD14 positiver Zellen je Gesichtsfeld (20fach). Einteilung der Thromben in I: Erythrozytenreicher Thrombus; II: Thrombozytenreicher Thrombus; III: Zellinfiltratreicher Thrombus; IV: Matrixreicher Thrombus.

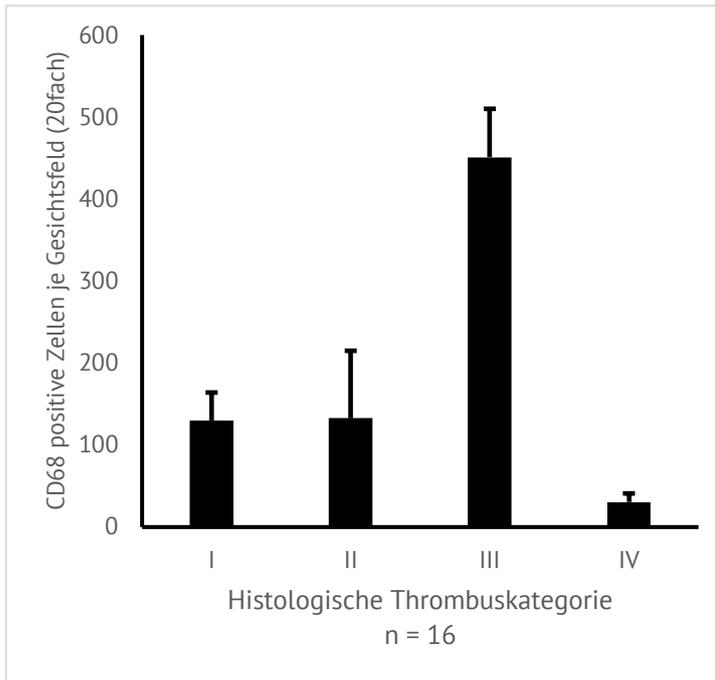


Abbildung 13: Mittlere Anzahl und Standardfehler CD68 positiver Zellen je Gesichtsfeld (20fach). Einteilung der Thromben in I: Erythrozytenreicher Thrombus; II: Thrombozytenreicher Thrombus; III: Zellinfiltratreicher Thrombus; IV: Matrixreicher Thrombus.

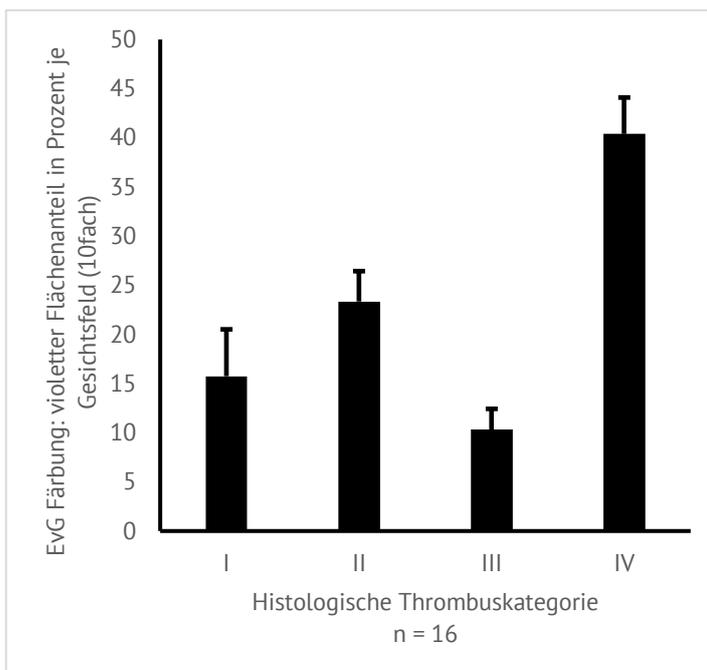


Abbildung 14: Mittlerer prozentualer Anteil und Standardfehler violetter Fläche in der Elastika van Gieson Färbung je Gesichtsfeld (10fach). Einteilung der Thromben in I: Erythrozytenreicher Thrombus; II: Thrombozytenreicher Thrombus; III: Zellinfiltratreicher Thrombus; IV: Matrixreicher Thrombus.

Nach Einteilung der Thrombusschnitte in die oben vorgestellten histologischen Kategorien wurden die Parameter Zellzahl kernhaltiger Zellen in der HE-Färbung, Anzahl CD14 bzw. CD68 positiver Zellen und prozentualer Anteil CD42b positiver bzw. violetter Fläche in der Elastika van Gieson Färbung mittels einfaktorieller ANOVA hinsichtlich der Symptom-to-Balloon-Time analysiert. Dabei zeigte sich ein Trend zur Signifikanz im Gruppenvergleich für die Anzahl kernhaltiger Zellen in der HE-Färbung mit $P = 0,085$ ($912,3 \pm 572,0$; $232,8 \pm 64,1$; $225,6 \pm 88,0$) (siehe Abbildung 15). Die Analyse der Merkmale Anzahl CD14 bzw. CD68 positiver Zellen und prozentualer Anteil CD42b positiver bzw. violetter Fläche in der Elastika van Gieson Färbung ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Die entsprechenden Grafiken sind den Abbildung 16 – Abbildung 19 zu entnehmen.

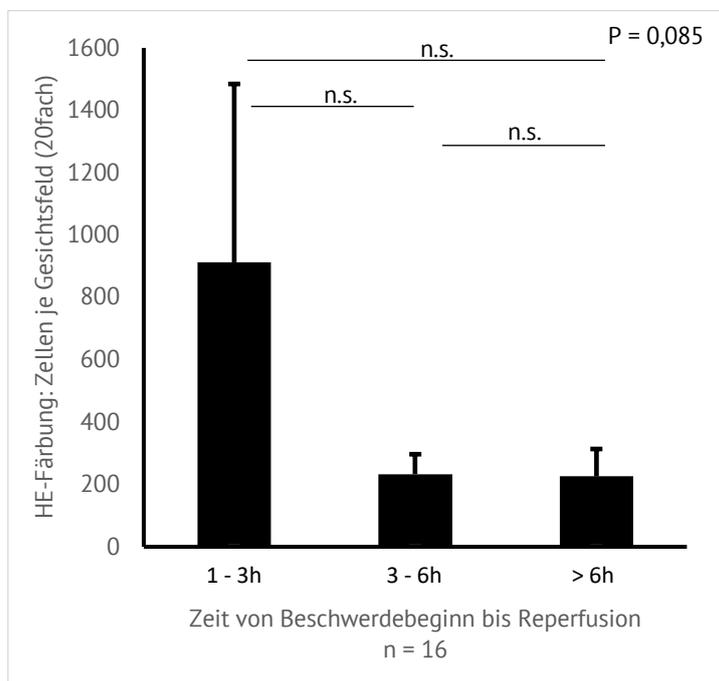


Abbildung 15: Mittlere Anzahl und Standardfehler der kernhaltigen Zellen in der Hämatoxylin-Eosinfärbung pro 20fach Gesichtsfeld in Gruppen nach dem Zeitintervall von Beschwerdebeginn bis Reperfusion, der sogenannten Symptom-to-Balloon-Time, geordnet. n.s. = nicht signifikant.

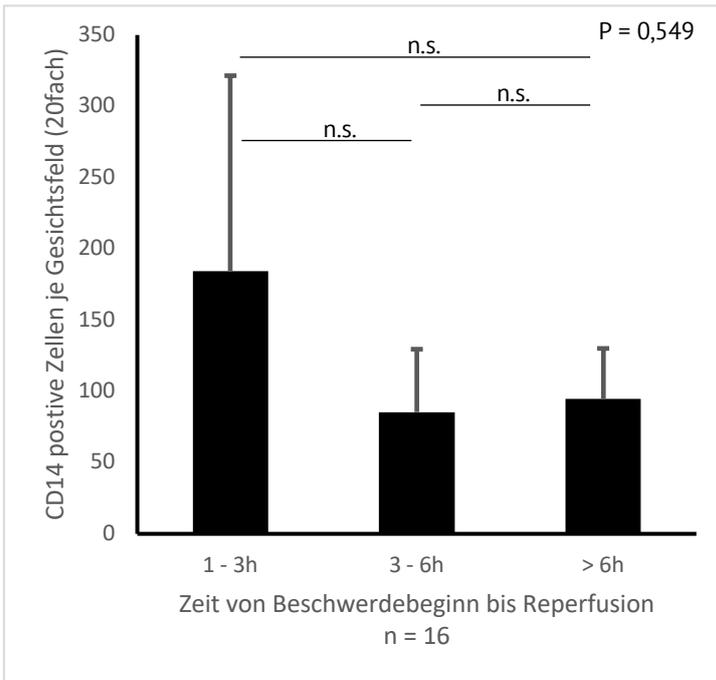


Abbildung 16: Mittlere Anzahl und Standardfehler der CD14 positiven Zellen pro 20fach Gesichtsfeld in Gruppen nach dem Zeitintervall von Beschwerdebeginn bis Reperfusion, der sogenannten Symptom-to-Balloon-Time, geordnet. n.s. = nicht signifikant.

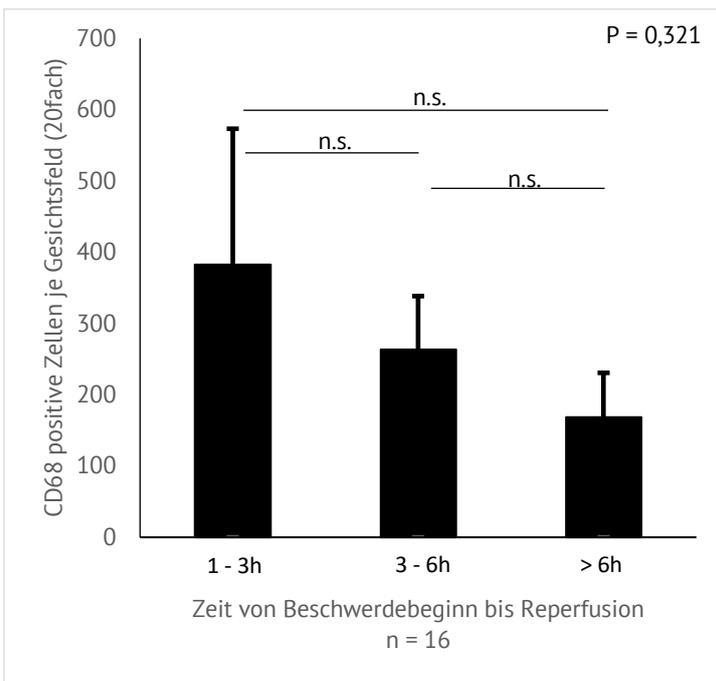


Abbildung 17: Mittlere Anzahl und Standardfehler der CD68 positiven Zellen pro 20fach Gesichtsfeld in Gruppen nach dem Zeitintervall von Beschwerdebeginn bis Reperfusion, der sogenannten Symptom-to-Balloon-Time, geordnet. n.s. = nicht signifikant.

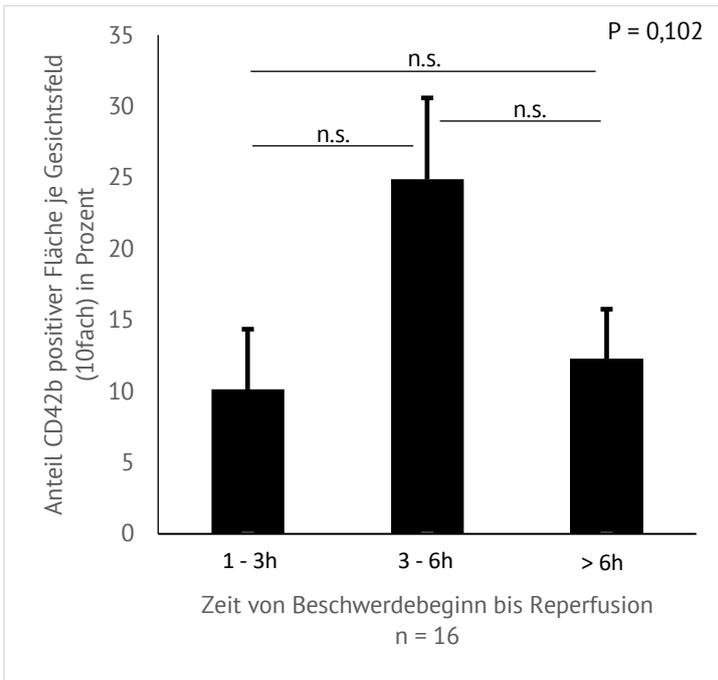


Abbildung 18: Mittlerer prozentualer Anteil und Standardfehler der CD42b positiven Fläche pro 20fach Gesichtsfeld in Gruppen nach dem Zeitintervall von Beschwerdebeginn bis Reperfusion, der sogenannten Symptom-to-Balloon-Time, geordnet.
n.s. = nicht signifikant.

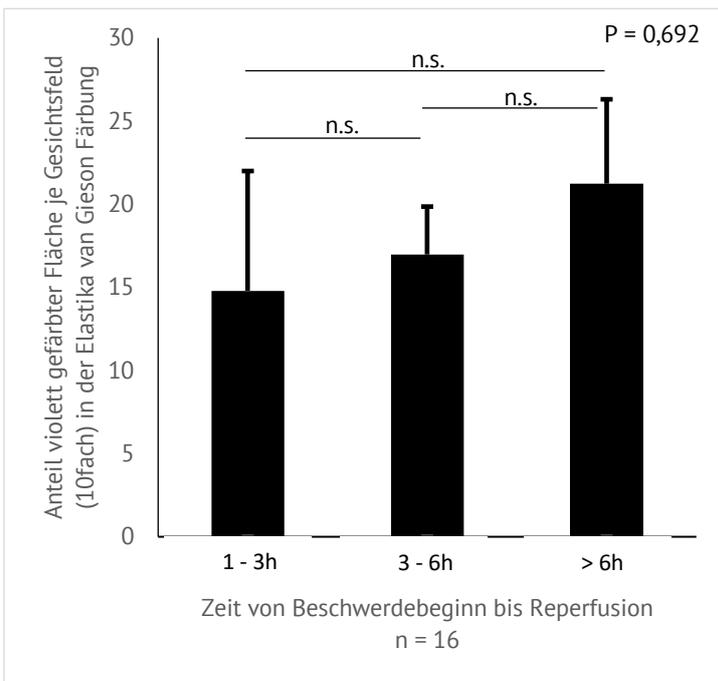


Abbildung 19: Mittlerer prozentualer Anteil und Standardfehler der violett gefärbten Fläche pro 20fach Gesichtsfeld in Gruppen nach dem Zeitintervall von Beschwerdebeginn bis Reperfusion, der sogenannten Symptom-to-Balloon-Time, geordnet.
n.s. = nicht signifikant.

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse

Die statistische Auswertung der klinischen Daten des untersuchten Patientenkollektivs erfolgte nach Einteilung der Patienten nach der jeweiligen Zeit von Symptombeginn bis zur Reperfusion, der sogenannten Symptom-to-Balloon-Zeit. Dabei zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bezüglich des Auftretens eines STEMI, sowie bezüglich des initialen Troponins. Eine Tendenz hin zur Signifikanz, ohne jedoch dieses Niveau zu erreichen zeigte sich für einen STEMI / NSTEMI in der Vorgeschichte, sowie die Einnahme von Amiodaron.

Für die Auswertung der durchgeführten Zellkulturen, nach Einteilung in o.g. Gruppen, ergab sich ein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Zeitpunktes des Zenits der Zellanzahl in den Kulturen. Weiter war ein signifikanter Unterschied in der Anzahl der morphologisch nicht näher klassifizierbaren (möglicherweise noch undifferenzierbaren) Zellen zu sehen, sowie für die Anzahl der Monozyten. Für die Anzahl der Makrophagen konnte dies nicht nachgewiesen werden, wobei hier eine Tendenz zur Signifikanz zu erahnen war. Für alle anderen Zellentitäten ergaben sich keine derartigen Ergebnisse.

Bei Auswertung der immunhistochemischen Schnitte fiel prima vista eine starke Heterogenität der einzelnen Thromben untereinander auf, welche jedoch vier distinkten Mustern zu folgen schien. Dies konnte durch eine quantitative Analyse bezüglich der jeweiligen Komponenten der Thromben bestätigt werden. So zeigten sich besonders erythrozytenreiche, thrombozytenreiche, zellinfiltratreiche sowie matrixreiche Thromben. Die Gruppe des Thrombozytenreichen Thrombus besaß mit etwa 28 % den höchsten Anteil an anti-CD42b positiver Fläche, die Gruppe des Zellinfiltratreichen Thrombus die höchsten Anteile an kernhaltigen Zellen in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung sowie an anti-CD14 und anti-CD68 positiven Zellen und die Gruppe der Matrixreichen Thromben mit etwa 40 % den höchsten Anteil an violetter Fläche in der Elastika-van-Gieson-Färbung. Nach Einteilung der Thromben in die jeweiligen Kategorien erfolgte die Auswertung dieser hinsichtlich der oben beschriebenen Symptom-to-Balloon-Zeit. Hier ergab sich, bezogen auf die Anzahl kernhaltiger Zellen in der

HE-Färbung, eine Tendenz zur Signifikanz, ohne diese jedoch zu erreichen. Für alle anderen Items konnte eine solche nicht festgestellt werden.

4.2 *Baseline Charakteristika*

Die Einweisungsdiagnose, welche zur PCI führte, unterschied sich zwischen den Symptom-to-Balloon-Zeitgruppen signifikant. Dabei kam es bei kurzem (<3 h) sowie längerem Zeitintervall (> 6 h) ausschließlich zu einem STEMI, wohingegen im mittleren Zeitintervall andere ACS-Formen beobachtet werden konnten. Die Ursache für diese Beobachtung bleibt Spekulation und kann u.U. der geringen Fallzahl geschuldet sein. Interessanterweise ist die Mehrzahl der Fälle ein ACS des Subtyps STEMI. Wie Ino et al. zeigen konnten (siehe 1.2.3) sind hierbei häufiger größere Rupturhöhlen zu erwarten, welche potentiell mehr thrombogenes Material und somit eine ggf. schnellere resp. größere Thrombusbildung ermöglichen könnten [39].

Es zeigte sich zusätzlich ein signifikanter Unterschied in der Höhe der initialen Troponinwerte, welche sich proportional zur Symptom-to-Balloon-Zeit verhalten. Dies bestätigt die Funktion des Troponins als Marker kardialer Schäden [177], nach dem Grundsatz: „time is muscle“, nimmt mit fortwährender Ischämie das Ausmaß der kardialen Schädigung weiter zu.

4.3 *Zellkultur*

Die Zellkulturen zeigten ein heterogenes Bild bezogen auf Migration und Proliferation der im Thrombus befindlichen Zellen. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied der Zeitpunkte der Zellmaxima bezogen auf die Symptom-to-Balloon-Zeit. So verhielten sich diese Zeitpunkte in Tagen proportional zur Symptombdauer. Wobei interessanterweise die mittlere Gesamtzellzahl in der Gruppe von 3 – 6 h am höchsten war, gefolgt von > 6 h und am geringsten in der Gruppe < 3 h Symptompersistenz. Wie bereits Rittersma et al. [121] zeigen konnte, bestimmt die Symptombdauer nicht zwangsläufig das Alter der entstandenen Thromben, da sich diese bereits im Vorfeld, etwa bei einer Plaqueerosion oder klinisch stummer Plaqueruptur bilden konnten [13, 14, 34]. Der teils heterogene, schichtweise Aufbau zeigt ältere sowie neu entstandene Abschnitte in den Thromben [10, 119-121]. Damit sind konstante Verlaufsmuster der Kultur ent-

sprechend der Symptombdauer eher unwahrscheinlich und ggf. der geringen Stichprobengröße zuzuschreiben. Interessanterweise gehören fünf der sechs unter 3.2 beschriebenen Thromben, welche keine sichtbaren vitalen Zellen oder nur Erythrozyten aufwiesen in die Gruppe < 3 h Symptompersistenz. Da frische Thromben hauptsächlich Fibrin, Thrombozyten sowie Erythrozyten enthalten [119-121] ist hier sehr junges thrombotisches Material wahrscheinlich. Das Auftreten kernhaltiger Zellen setzt deren Chemotaxis voraus, was bereits eine einsetzende Organisation des Thrombus verdeutlicht. Das zeitliche Intervall scheint dabei jedoch widererwarten kurz zu sein, wie Ramaiola et al. [125] zeigen konnten, sodass vermehrungsfähige Zellen prinzipiell in jeder Gruppe der Symptombdauer möglich sind, was in dieser Arbeit auch beobachtet werden konnte.

In der Betrachtung der unterschiedlichen morphologischen Zellentitäten zeigte sich ein signifikanter Unterschied der mittleren Anzahl an Monozyten bezogen auf die Symptom-to-Balloon-Zeit mit deutlich größerer Quantität in der Gruppe von 3 – 6 h Symptompersistenz. Ein Trend zur Signifikanz mit $P = 0,073$ zeigte sich bei der mittleren Anzahl an Makrophagen ebenfalls mit deutlich größerer Zellzahl in der mittleren Zeitgruppe. Ein Unterschied ist auch hier, aufgrund der Heterogenität des Materials, welche durch die Thrombusentstehung gegeben ist, nicht zu erwarten gewesen und muss der geringen Stichprobe zugeschrieben werden. Denkbar ist auch, dass zellreiche Plaqueanteile, welche versehentlich mit aspiriert wurden, ihren Weg in die Kultur gefunden haben und das Ergebnis auf diese Weise verfälschen. Das Vorkommen solcher Verunreinigungen des Aspirats wurde etwa auch von Rittersma et al. beschreiben [121].

Insgesamt bestätigen die Ergebnisse der Zellkultur trotz der beschriebenen Unsicherheiten, dass intrakoronare Thromben keineswegs nur aus Plättchen, Fibrin und Erythrozyten bestehen, auch wenn diese Anteile die Majorität bilden [119, 120]. Vielmehr scheinen immunologische Prozesse und deren zelluläre Vertreter [125] involviert zu sein, deren Funktion und Bedeutung noch nicht gänzlich verstanden sind.

4.4 Immunhistochemie

Bereits Silvain et al. [119] konnten in ihrer Studie einen Zusammenhang zwischen Ischämiezeit und Thrombuszusammensetzung nachweisen. So wurden frische thrombozytenreiche Thromben bis zu einer Stunde Ischämiezeit und ältere fibrinreiche Thromben bei über drei Stunden Ischämiezeit gefunden. Dabei wurde der Oberflächenanteil der jeweiligen Komponenten mittels SEM beurteilt. Als frische thrombozytenreiche Thromben galten jene mit Plättchenanteil größer 30 % und Fibringehalt unter 70 %. Als ältere fibrinreiche Thromben solche mit Thrombozytenanteil unter 30 % und Fibringehalt über 70 %. Der Fibringehalt verdoppelte sich mit jeder zusätzlichen Stunde Symptompersistenz, wohingegen sich der Plättchenanteil halbierte. Allerdings wurde nur die Thrombusoberfläche begutachtet. In der vorliegenden Arbeit konnte ein Plättchenanteil in den Thrombusschnitten gefunden werden, welcher im Bereich der o.g. Studie liegt. Der Vergleich der Anteile kernhaltiger Zellen ist jedoch aufgrund der unterschiedlichen Auswertungsmodalitäten nicht möglich.

In dieser Arbeit konnten, durch mikroskopisch deutlich sichtbare Unterschiede bezüglich der Thrombuszusammensetzung, vier verschiedene Thrombuskategorien definiert werden. Die Unterschiede wurden quantitativ unter Zuhilfenahme von immunhistochemischen, sowie histochemischen Färbungen bestätigt. Dabei zeigten sich erythrozyten-, thrombozyten- und zellinfiltratreiche Thromben sowie eine vierte Kategorie, welche besonders viel amorphes Matrixmaterial aufwies. Ein statistischer Zusammenhang der verschiedenen Kompositionen mit der Ischämiezeit konnte nicht nachgewiesen werden. Das kann darin begründet liegen, dass die Thrombusformation häufig einen phasenweisen Verlauf mit prothrombogenen Aufbau und thrombolytischen Abbau zeigen kann und nicht jede Plaqueruptur klinisch evident werden muss [10, 12-14]. Somit ist das genaue Alter der Thromben letztlich nicht exakt bestimmbar. Jedoch kann eine zeitliche Reihenfolge anhand divergenter Thrombuskompositionen festgestellt werden. So sind thrombozytenreiche Thromben die jüngsten Vertreter [119], später, bei stärkerer Stagnation, sind gehäuft Erythrozyten im entstandenen Fibringeflecht zu finden [8, 119]. Durch Chemotaxis werden Effektorzellen des angeborenen Immunsystems angelockt (siehe dazu auch 1.2.3 sowie 1.3.1 – 1.3.3). Der vor-

handene Thrombus organisiert sich infolge dessen mit der Zeit, was mit Abnahme der Zelldichte und Zunahme der extrazellulären Matrix einhergeht [121, 123, 124].

4.5 *Limitationen der Studie*

Die vorliegende Arbeit untersucht eine eher kleinere Studienpopulation, was bereits eine gewisse Limitation darstellt.

Innerhalb der Zellkultur erfolgte eine rein morphologische Auswertung, da die Dynamiken der einzelnen Kulturen bezogen auf Zellmigration aus dem Thrombus und Proliferation teils stark differierten. Der beste Zeitpunkt für eine immunozytochemische Analyse konnte nicht extrapoliert werden. Weiter wäre durch eine solche Analyse der Beobachtungshorizont für die jeweilige Kultur beendet gewesen, was bei größerer Stichprobe sicherlich unproblematisch – in diesem Fall jedoch dem Informationsgewinn abträglich gewesen wäre.

Beim Teilen der frischen Thromben in zwei makroskopisch ähnliche Hälften sind mikroskopische Unterschiede der Teile nicht auszuschließen.

Eine weitere Limitation liegt in der Tatsache, dass die frisch gewonnenen Thromben u.U. nicht direkt fixiert, sondern teils, z. B. bei nächtlicher Aspiration, noch einige Stunden im Brutschrank verbrachten bis zur Aufteilung und Fixation. Hierdurch kann es theoretisch noch zu Änderungen im Thrombusaufbau beispielsweise durch Zellverlust oder -vermehrung gekommen sein.

Eine spezifische Anfärbung und quantitative Auswertung der Erythrozytenanteile an den gesamten Thromben fehlt. Es wurde stattdessen aufgrund des charakteristischen Aussehens ein visueller Ansatz verfolgt.

Letztlich erfolgte die gesamte Auswertung der Fotodokumentation manuell resp. semimanuell mit softwaregestützter Auswertung, was eine gewisse Fehleranfälligkeit nicht ausschließt, aber ebenso Softwarelimitationen in der Zellerkennung überwindet.

4.6 *Relevanz der Ergebnisse*

Herz-Kreislaufkrankungen sind trotz großer Fortschritte in Diagnostik und Therapie weiterhin eine der führenden Ursachen für Mortalität und Morbidität in den westlichen Ländern [5, 6, 11]. Vorangegangener intensiver Forschung ist es zu verdan-

ken, dass innerhalb dieser Erkrankungsgruppe seit Mitte des 20. Jahrhunderts weitreichende Behandlungserfolge mit sinkender Mortalitätsrate zu verzeichnen sind [3]. Mit neuen technischen Möglichkeiten wächst das Verständnis der Pathophysiologie dieser Erkrankungsgruppe immer weiter, welche auf ein diffiziles Zusammenspiel verschiedener Aktionspartner auf zellulärer und subzellulärer Ebene zurückzuführen ist. Dabei sind noch viele Fragen offen. Ziel dieser Arbeit war es einen grundlegenden Einblick in die Komposition der Thromben und die Interaktion der beteiligten Zellen und ggf. Rückschlüsse in Zusammenhang der klinischen Daten zu erhalten.

Ein Novum stellt hierbei die Kultivierung der mittels Thrombusaspiration im Rahmen der PCI gewonnenen Thromben dar. Hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied im Auftreten des Zenits der höchsten Zelldichte. Mit zunehmender Zeit der Symptompersistenz trat dieser entsprechend später auf. Die meisten Zellen waren bei Kulturen mit mittlerer Symptompersistenz feststellbar, wobei nicht näher klassifizierbare und mononukleäre Zellen das Bild dominierten. Letzteres ist in Anbetracht der Pathophysiologie nicht unerwartet, jedoch ersteres. Wobei eine genaue Aussage über die Art dieser nicht näher klassifizierbaren Zellen nicht möglich ist, da nur ein morphologischer Ansatz verfolgt wurde.

Interessanterweise konnten im Gegensatz zu den unter 1.4 genannten Arbeiten vier verschiedene Kategorien der Thromben histologisch gesehen werden, wobei diese nicht durch eine Hauptkomponente, sondern durch die Eigenschaft, eine Komponente in höherem Maße als die Vertreter der jeweils anderen Kategorie aufzuweisen, definiert wurden. Bezogen auf die Zeit von Symptombeginn bis Reperfusion traten bei kurzer Symptompersistenz tendenziell die meisten kernhaltigen Zellen auf.

4.7 Schlussfolgerungen

Intrakoronare Thromben sind weit mehr als Fibrin und Thrombozyten. Sie bestehen aus einem lebendigen Verbund verschiedener Interaktionspartner, welche über eine Vielzahl von Mediatoren, Chemokinen, Liganden und Rezeptoren mit den Zellen vor Ort aber auch entfernt kommunizieren. Dabei scheinen viele der dabei beteiligten Akteure in ihrem Funktionsumfang noch nicht gänzlich verstanden und können teils unterschiedliche Funktionen erfüllen – je nach Mikroenvironment, in welches sie einge-

bunden sind. Die Untersuchung dieser Thromben, insbesondere unfixierter, vitaler Thromben, kann hier wertvolle Erkenntnisse liefern.

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass koronare Thromben aus verschiedenen Zellentitäten aufgebaut sind und damit vorangegangene Arbeiten bestätigen. Zellen in kultivierten Thromben sind in der Lage zu proliferieren und zu differenzieren, dabei bestehen Unterschiede je nach Zeitdauer der Beschwerdepersistenz der Patienten. Die Bedeutung dieser Unterschiede bleibt jedoch noch unklar und sollte in Folgearbeiten weiter untersucht werden. Es ist anzunehmen, dass die Zeit von Symptombeginn bis Reperfusion, obschon relativ sicher zu bestimmen, keine definitive Aussage über das Alter der Thromben zulässt. Die zelluläre Zusammensetzung der Thromben lässt schon eher Rückschlüsse hierzu zu, allerdings mit unzureichender Genauigkeit. Die Etablierung eines entsprechenden Markers oder Messmethode scheint lohnenswert v.a. im Hinblick auf das Alter der eigentlich atherosklerotischen Läsion und somit der Erkrankungsdauer, welche in dieser Arbeit nicht untersucht wurde.

Mehrere Arbeiten haben sich mit der Frage des regenerativen Potentials der zellulären Interaktionspartner beschäftigt, siehe dazu 1.5. Durch Ischämie verlorenes Myokard wird pathophysiologisch narbig umgebaut und steht der Funktionserfüllung nicht zur Verfügung. Durch ein besseres Verständnis nicht nur der Regeneration, sondern auch der Stamm- und Progenitorzellendifferenzierung in diesem Feld – und das Nutzen bereits physiologisch vorhandener regenerativer Ressourcen, wie die Migration undifferenzierter Zellen beispielsweise, könnten sich neue, vielversprechende Behandlungsansätze ergeben. Weitere Forschung scheint hierzu lohnenswert.

5 Zusammenfassung

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen trotz großer Fortschritte noch immer ein großes Gesundheitsproblem der Menschheit dar. Sanken die Mortalitätsraten seit Mitte des 20. Jahrhunderts, so sind dennoch etwa ein Drittel aller Todesfälle in Deutschland durch Herz-Kreislaufkrankungen verursacht [3, 5, 7]. Hieraus ergibt sich die Notwendigkeit, das vorhandene Wissen über Entstehung, Prävention und Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen weiter auszubauen. Als bedeutende Vertreter dieser Erkrankungsgruppe sind der ischämische Schlaganfall sowie die koronare Herzerkrankung mit seiner, bezogen auf die Mortalität, wichtigsten Ausprägung, dem akuten Koronarsyndrom zu nennen [3, 178]. Gemeinsame pathophysiologische Grundlage dieser Erkrankungen bildet die Atherosklerose. Eine Vielzahl an Zellen, Mediatoren, Zytokinen sowie Rezeptoren und Pathways orchestrieren deren Pathogenese, welche sich in einem ständigen Fluss zwischen Progression und Regression, Proinflammation und Antiinflammation befindet.

Die vorliegende Arbeit hat zum Ziel, den Aufbau intrakoronarer Thromben, deren Zellzusammensetzung sowie Variabilität und ggf. Funktion, genauer zu beleuchten, um dadurch neue Einsichten in die Prozesse zu erhalten, welche nach Plaqueruptur bei der Ausbildung von Thromben in den Koronarien ablaufen. Dazu wurden die Thromben von insgesamt 32 Patienten, welche aufgrund eines akuten Myokardinfarkts eine perkutane Koronarintervention erhielten, aspiriert und anschließend kultiviert. Bei entsprechender Größe konnten in der Hälfte der Fälle zusätzlich histologische Untersuchungen durchgeführt werden. Gleichzeitig wurden verschiedene klinische Daten des Studienkollektives gesammelt und analysiert.

Es wurden Auswertungen hinsichtlich der Symptompersistenz, welche durch das Zeitintervall von Beschwerdebeginn bis Reperfusionstherapie definiert wurde, angestellt. Hier zeigte sich ein proportionaler Anstieg der initialen Troponinwerte mit zunehmender Symptombdauer, weiter zeigten sich signifikante Unterschiede bezüglich der ACS Subgruppe. Die Auswertung der Zellkultur erfolgte nach rein morphologischen Kriterien. Es konnten verschiedene Zellarten wie etwa Erythrozyten, Monozyten, Makrophagen oder Schaumzellen sowie nicht näher klassifizierbare (möglicher-

weise noch undifferenzierte) Zellen beobachtet werden. Die Migration sowie Proliferation der enthaltenen Zellen waren zwischen den jeweiligen Kulturen heterogen. Es zeigten sich Unterschiede bezüglich des Zeitpunktes des mittleren Zellzahlmaximums sowie der Anzahl an nicht klassifizierbaren Zellen und Monozyten. In der histologischen Untersuchung waren Unterschiede in der Zellkomposition der Thromben ersichtlich. Diese folgten vier distinkten Mustern in Bezug auf die vorherrschenden Zellentitäten und andere Thrombusbestandteile, welche Hinweise auf das Thrombusalter liefern könnten. Signifikante Unterschiede, bezogen auf die Zeit der Symptompersistenz der Studienteilnehmer, ergaben sich jedoch nicht.

Insgesamt zeigte sich, dass koronare Thromben vitale Gebilde mit einer Vielzahl von Zellentitäten darstellen, deren gegenseitige Beeinflussung komplex und variabel zu sein scheint. Die Dauer der Symptompersistenz lässt keine eindeutigen Rückschlüsse auf das Alter der Thromben zu, da bereits subklinisch thrombotische Ereignisse möglich sind [10, 12-14]. Über die Komposition der koronaren Gerinnsel lässt sich deren Alter mit einer gewissen Ungenauigkeit bestimmen [121]. Zellarten, welche in der vorliegenden Arbeit morphologisch und immunhistochemisch bestimmt werden konnten, waren neben Erythrozyten und Thrombozyten vor allem mononukleäre Zellentitäten, wie Monozyten oder Makrophagen und Schaumzellen, aber auch morphologisch undifferenzierte Zellen. Letzteres scheint besonders für regenerative Prozesse interessant, welche spannende Ansätze zukünftiger Forschung bieten könnten.

6 Literaturverzeichnis

1. Kirkwood, T.B.L., *Why and how are we living longer? Exp Physiol*, 2017. **102**(9): p. 1067-1074.
2. Libby, P., K.E. Bornfeldt, and A.R. Tall, *Atherosclerosis: Successes, Surprises, and Future Challenges. Circ Res*, 2016. **118**(4): p. 531-4.
3. Herrington, W., et al., *Epidemiology of Atherosclerosis and the Potential to Reduce the Global Burden of Atherothrombotic Disease. Circ Res*, 2016. **118**(4): p. 535-46.
4. Grundy, S.M., *Metabolic syndrome pandemic. Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008. **28**(4): p. 629-36.
5. Gestorbene: Deutschland, 2016, Todesursachen. 2018; Available from: <https://www-genesis.destatis.de/genesis/online/>.
6. Libby, P., P.M. Ridker, and G.K. Hansson, *Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. Nature*, 2011. **473**(7347): p. 317-25.
7. Benjamin, E.J., et al., *Heart Disease and Stroke Statistics-2018 Update: A Report From the American Heart Association. Circulation*, 2018. **137**(12): p. e67-e492.
8. Riede, U.-N. and M. Werner, *Allgemeine und Spezielle Pathologie Elektronische Ressource, in Springer-Lehrbuch*. 2017, Springer: Berlin, Heidelberg. p. Online-Ressource (XXVII, 893 S, online resource).
9. Faxon, D.P., et al., *Atherosclerotic Vascular Disease Conference: Writing Group III: pathophysiology. Circulation*, 2004. **109**(21): p. 2617-25.
10. Falk, E., *Coronary thrombosis: pathogenesis and clinical manifestations. Am J Cardiol*, 1991. **68**(7): p. 28B-35B.
11. Chan, M., et al., *Hearts: technical package for cardiovascular disease management in primary health care., WHO, Editor*. 2016, WHO Document Production Services: Geneva, Switzerland. p. 8.
12. Mann, J. and M.J. Davies, *Mechanisms of progression in native coronary artery disease: role of healed plaque disruption. Heart*, 1999. **82**(3): p. 265-8.
13. Burke, A.P., et al., *Healed plaque ruptures and sudden coronary death: evidence that subclinical rupture has a role in plaque progression. Circulation*, 2001. **103**(7): p. 934-40.
14. Libby, P., *Inflammation in atherosclerosis. Nature*, 2002. **420**(6917): p. 868-74.
15. Gosswald, A., et al., *Prevalence of myocardial infarction and coronary heart disease in adults aged 40-79 years in Germany: results of the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1). Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 2013. **56**(5-6): p. 650-5.
16. Goodman, S.G., et al., *The expanded Global Registry of Acute Coronary Events: baseline characteristics, management practices, and hospital*

- outcomes of patients with acute coronary syndromes. *Am Heart J*, 2009. **158**(2): p. 193-201.e1-5.
17. Lloyd-Jones, D.M., et al., Defining and setting national goals for cardiovascular health promotion and disease reduction: the American Heart Association's strategic Impact Goal through 2020 and beyond. *Circulation*, 2010. **121**(4): p. 586-613.
 18. Lim, S.S., et al., A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, 2012. **380**(9859): p. 2224-60.
 19. Yusuf, S., et al., Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet*, 2004. **364**(9438): p. 937-52.
 20. Napoli, C., et al., Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin Invest*, 1997. **100**(11): p. 2680-90.
 21. Gawaz, M., H. Langer, and A.E. May, Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest*, 2005. **115**(12): p. 3378-84.
 22. Kopprasch, S., et al., The pivotal role of scavenger receptor CD36 and phagocyte-derived oxidants in oxidized low density lipoprotein-induced adhesion to endothelial cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004. **36**(3): p. 460-71.
 23. Chen, M., T. Masaki, and T. Sawamura, LOX-1, the receptor for oxidized low-density lipoprotein identified from endothelial cells: implications in endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Pharmacol Ther*, 2002. **95**(1): p. 89-100.
 24. Maiolino, G., et al., The role of oxidized low-density lipoproteins in atherosclerosis: the myths and the facts. *Mediators Inflamm*, 2013. **2013**: p. 714653.
 25. Yu, X.H., et al., Foam cells in atherosclerosis. *Clin Chim Acta*, 2013. **424**: p. 245-52.
 26. Gleissner, C.A., N. Leitinger, and K. Ley, Effects of native and modified low-density lipoproteins on monocyte recruitment in atherosclerosis. *Hypertension*, 2007. **50**(2): p. 276-83.
 27. Huang, L.H., et al., Myeloid Acyl-CoA:Cholesterol Acyltransferase 1 Deficiency Reduces Lesion Macrophage Content and Suppresses Atherosclerosis Progression. *J Biol Chem*, 2016. **291**(12): p. 6232-44.
 28. Thorp, E., et al., Reduced apoptosis and plaque necrosis in advanced atherosclerotic lesions of Apoe^{-/-} and Ldlr^{-/-} mice lacking CHOP. *Cell Metab*, 2009. **9**(5): p. 474-81.
 29. Di Pietro, N., G. Formoso, and A. Pandolfi, Physiology and pathophysiology of oxLDL uptake by vascular wall cells in atherosclerosis. *Vascul Pharmacol*, 2016. **84**: p. 1-7.
 30. Valente, A.J., et al., OxLDL induces endothelial dysfunction and death via TRAF3IP2: inhibition by HDL3 and AMPK activators. *Free Radic Biol Med*, 2014. **70**: p. 117-28.

31. Pirillo, A., G.D. Norata, and A.L. Catapano, LOX-1, OxLDL, and atherosclerosis. *Mediators Inflamm*, 2013. **2013**: p. 152786.
32. Kataoka, H., et al., Expression of lectinlike oxidized low-density lipoprotein receptor-1 in human atherosclerotic lesions. *Circulation*, 1999. **99**(24): p. 3110-7.
33. Hansson, G.K. and L. Jonasson, The discovery of cellular immunity in the atherosclerotic plaque. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009. **29**(11): p. 1714-7.
34. Bentzon, J.F., et al., Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circ Res*, 2014. **114**(12): p. 1852-66.
35. Clarke, M.C. and M.R. Bennett, Cause or consequence: what does macrophage apoptosis do in atherosclerosis? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009. **29**(2): p. 153-5.
36. Bentzon, J.F. and E. Falk, Circulating smooth muscle progenitor cells in atherosclerosis and plaque rupture: current perspective and methods of analysis. *Vascul Pharmacol*, 2010. **52**(1-2): p. 11-20.
37. Bennett, M.R., S. Sinha, and G.K. Owens, Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Circ Res*, 2016. **118**(4): p. 692-702.
38. Katriotis, D.G., J. Pantos, and E. Efsthopoulos, Hemodynamic factors and atheromatic plaque rupture in the coronary arteries: from vulnerable plaque to vulnerable coronary segment. *Coron Artery Dis*, 2007. **18**(3): p. 229-37.
39. Ino, Y., et al., Difference of culprit lesion morphologies between ST-segment elevation myocardial infarction and non-ST-segment elevation acute coronary syndrome: an optical coherence tomography study. *JACC Cardiovasc Interv*, 2011. **4**(1): p. 76-82.
40. Ibanez, B., et al., 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*, 2018. **39**(2): p. 119-177.
41. Stub, D., et al., Air Versus Oxygen in ST-Segment-Elevation Myocardial Infarction. *Circulation*, 2015. **131**(24): p. 2143-50.
42. Hofmann, R., et al., Oxygen therapy in ST-elevation myocardial infarction. *Eur Heart J*, 2018. **39**(29): p. 2730-2739.
43. Smits, P.C., et al., Fractional Flow Reserve-Guided Multivessel Angioplasty in Myocardial Infarction. *N Engl J Med*, 2017. **376**(13): p. 1234-1244.
44. Smits, P., et al., Two year results from the COMPARE-ACUTE trial. *J Am Coll Cardiol*, 2018. **71**: p. A1158.
45. Gershlick, A.H., et al., Randomized trial of complete versus lesion-only revascularization in patients undergoing primary percutaneous coronary intervention for STEMI and multivessel disease: the CvLPRIT trial. *J Am Coll Cardiol*, 2015. **65**(10): p. 963-72.
46. Hassan, A., A. ElGuindy, and D. Antoniucci, Culprit lesion-only versus complete revascularization in patients with STEMI: Lessons learned from PRAMI, CvLPRIT, and DANAMI-3 PRIMULTI. *Glob Cardiol Sci Pract*, 2015. **2015**(5): p. 60.

47. Engstrom, T., et al., Complete revascularisation versus treatment of the culprit lesion only in patients with ST-segment elevation myocardial infarction and multivessel disease (DANAMI-3-PRIMULTI): an open-label, randomised controlled trial. *Lancet*, 2015. **386**(9994): p. 665-71.
48. Frobert, O., et al., Thrombus aspiration during ST-segment elevation myocardial infarction. *N Engl J Med*, 2013. **369**(17): p. 1587-97.
49. Ge, J., et al., Thrombus Aspiration for ST-Segment-Elevation Myocardial Infarction in Modern Era: Still an Issue of Debate? *Circ Cardiovasc Interv*, 2017. **10**(10).
50. Jolly, S.S., et al., Randomized trial of primary PCI with or without routine manual thrombectomy. *N Engl J Med*, 2015. **372**(15): p. 1389-98.
51. Yudi, M.B., et al., The prognostic significance of smoking cessation after acute coronary syndromes: an observational, multicentre study from the Melbourne interventional group registry. *BMJ Open*, 2017. **7**(10): p. e016874.
52. Mosca, L., et al., Fifteen-year trends in awareness of heart disease in women: results of a 2012 American Heart Association national survey. *Circulation*, 2013. **127**(11): p. 1254-63, e1-29.
53. Ford, E.S., et al., Explaining the decrease in U.S. deaths from coronary disease, 1980-2000. *N Engl J Med*, 2007. **356**(23): p. 2388-98.
54. D'Ascenzo, F., et al., TIMI, GRACE and alternative risk scores in Acute Coronary Syndromes: a meta-analysis of 40 derivation studies on 216,552 patients and of 42 validation studies on 31,625 patients. *Contemp Clin Trials*, 2012. **33**(3): p. 507-14.
55. Granger, C.B., et al., Predictors of hospital mortality in the global registry of acute coronary events. *Arch Intern Med*, 2003. **163**(19): p. 2345-53.
56. Alnasser, S.M., et al., Late Consequences of Acute Coronary Syndromes: Global Registry of Acute Coronary Events (GRACE) Follow-up. *Am J Med*, 2015. **128**(7): p. 766-75.
57. Tang, E.W., C.K. Wong, and P. Herbison, Global Registry of Acute Coronary Events (GRACE) hospital discharge risk score accurately predicts long-term mortality post acute coronary syndrome. *Am Heart J*, 2007. **153**(1): p. 29-35.
58. Eagle, K.A., et al., A validated prediction model for all forms of acute coronary syndrome: estimating the risk of 6-month postdischarge death in an international registry. *Jama*, 2004. **291**(22): p. 2727-33.
59. Tabas, I. and K.E. Bornfeldt, Macrophage Phenotype and Function in Different Stages of Atherosclerosis. *Circ Res*, 2016. **118**(4): p. 653-67.
60. Ley, K., Y.I. Miller, and C.C. Hedrick, Monocyte and macrophage dynamics during atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011. **31**(7): p. 1506-16.
61. Williams, K.J. and I. Tabas, The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995. **15**(5): p. 551-61.
62. Gerszten, R.E., et al., MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature*, 1999. **398**(6729): p. 718-23.

63. Huo, Y., A. Hafezi-Moghadam, and K. Ley, Role of vascular cell adhesion molecule-1 and fibronectin connecting segment-1 in monocyte rolling and adhesion on early atherosclerotic lesions. *Circ Res*, 2000. **87**(2): p. 153-9.
64. Randolph, G.J., Mechanisms that regulate macrophage burden in atherosclerosis. *Circ Res*, 2014. **114**(11): p. 1757-71.
65. Martinez, F.O., et al., Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J Immunol*, 2006. **177**(10): p. 7303-11.
66. Martinez, F.O., et al., Macrophage activation and polarization. *Front Biosci*, 2008. **13**: p. 453-61.
67. Cybulsky, M.I., C. Cheong, and C.S. Robbins, Macrophages and Dendritic Cells: Partners in Atherogenesis. *Circ Res*, 2016. **118**(4): p. 637-52.
68. Mosser, D.M. and J.P. Edwards, Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(12): p. 958-69.
69. Robbins, C.S., et al., Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis. *Nat Med*, 2013. **19**(9): p. 1166-72.
70. Jenkins, S.J., et al., Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. *Science*, 2011. **332**(6035): p. 1284-8.
71. Boyle, J.J., et al., Coronary intraplaque hemorrhage evokes a novel atheroprotective macrophage phenotype. *Am J Pathol*, 2009. **174**(3): p. 1097-108.
72. Libby, P., Collagenases and cracks in the plaque. *J Clin Invest*, 2013. **123**(8): p. 3201-3.
73. Hazen, S.L., Oxidized phospholipids as endogenous pattern recognition ligands in innate immunity. *J Biol Chem*, 2008. **283**(23): p. 15527-31.
74. Manning-Tobin, J.J., et al., Loss of SR-A and CD36 activity reduces atherosclerotic lesion complexity without abrogating foam cell formation in hyperlipidemic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009. **29**(1): p. 19-26.
75. Park, Y.M., M. Febbraio, and R.L. Silverstein, CD36 modulates migration of mouse and human macrophages in response to oxidized LDL and may contribute to macrophage trapping in the arterial intima. *J Clin Invest*, 2009. **119**(1): p. 136-45.
76. Ricci, R., et al., Requirement of JNK2 for scavenger receptor A-mediated foam cell formation in atherogenesis. *Science*, 2004. **306**(5701): p. 1558-61.
77. Stoneman, V., et al., Monocyte/macrophage suppression in CD11b diphtheria toxin receptor transgenic mice differentially affects atherogenesis and established plaques. *Circ Res*, 2007. **100**(6): p. 884-93.
78. Ridker, P.M., et al., Interleukin-1beta inhibition and the prevention of recurrent cardiovascular events: rationale and design of the Canakinumab Anti-inflammatory Thrombosis Outcomes Study (CANTOS). *Am Heart J*, 2011. **162**(4): p. 597-605.

79. Sayin, V.I., et al., Loss of one copy of *Zfp148* reduces lesional macrophage proliferation and atherosclerosis in mice by activating p53. *Circ Res*, 2014. **115**(9): p. 781-9.
80. Feil, S., F. Hofmann, and R. Feil, SM22alpha modulates vascular smooth muscle cell phenotype during atherogenesis. *Circ Res*, 2004. **94**(7): p. 863-5.
81. Bentzon, J.F., et al., Smooth muscle cells in atherosclerosis originate from the local vessel wall and not circulating progenitor cells in ApoE knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. **26**(12): p. 2696-702.
82. Gomez, D., et al., Detection of histone modifications at specific gene loci in single cells in histological sections. *Nat Methods*, 2013. **10**(2): p. 171-7.
83. Feil, S., et al., Transdifferentiation of vascular smooth muscle cells to macrophage-like cells during atherogenesis. *Circ Res*, 2014. **115**(7): p. 662-7.
84. Owens, G.K., M.S. Kumar, and B.R. Wamhoff, Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev*, 2004. **84**(3): p. 767-801.
85. Thyberg, J., et al., Phenotypic modulation of smooth muscle cells after arterial injury is associated with changes in the distribution of laminin and fibronectin. *J Histochem Cytochem*, 1997. **45**(6): p. 837-46.
86. Vengrenyuk, Y., et al., Cholesterol loading reprograms the microRNA-143/145-myocardin axis to convert aortic smooth muscle cells to a dysfunctional macrophage-like phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015. **35**(3): p. 535-46.
87. Shankman, L.S., et al., KLF4-dependent phenotypic modulation of smooth muscle cells has a key role in atherosclerotic plaque pathogenesis. *Nat Med*, 2015. **21**(6): p. 628-37.
88. Patel, S.R., J.H. Hartwig, and J.E. Italiano, Jr., The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *J Clin Invest*, 2005. **115**(12): p. 3348-54.
89. Ibrahim, H. and N.S. Kleiman, Platelet pathophysiology, pharmacology, and function in coronary artery disease. *Coron Artery Dis*, 2017. **28**(7): p. 614-623.
90. Borst, O., et al., Inhibitory mechanisms of very low-dose rivaroxaban in non-ST-elevation myocardial infarction. *Blood Adv*, 2018. **2**(6): p. 715-730.
91. Davi, G. and C. Patrono, Platelet activation and atherothrombosis. *N Engl J Med*, 2007. **357**(24): p. 2482-94.
92. Blair, P. and R. Flaumenhaft, Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev*, 2009. **23**(4): p. 177-89.
93. Rendu, F. and B. Brohard-Bohn, The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets*, 2001. **12**(5): p. 261-73.
94. Weyrich, A.S., et al., Change in protein phenotype without a nucleus: translational control in platelets. *Semin Thromb Hemost*, 2004. **30**(4): p. 491-8.

95. Mancuso, M.E. and E. Santagostino, *Platelets: much more than bricks in a breached wall. Br J Haematol*, 2017. **178**(2): p. 209-219.
96. Massberg, S., et al., *A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. J Exp Med*, 2002. **196**(7): p. 887-96.
97. Frenette, P.S., et al., *P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo. J Exp Med*, 2000. **191**(8): p. 1413-22.
98. Romo, G.M., et al., *The glycoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P-selectin. J Exp Med*, 1999. **190**(6): p. 803-14.
99. Massberg, S., et al., *Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin. Blood*, 1998. **92**(2): p. 507-15.
100. Kawamura, Y., et al., *Imaging of structural changes in endothelial cells and thrombus formation at the site of FeCl(3)-induced injuries in mice cremasteric arteries. J Atheroscler Thromb*, 2009. **16**(6): p. 807-14.
101. Goto, S., et al., *Characterization of the unique mechanism mediating the shear-dependent binding of soluble von Willebrand factor to platelets. Journal of Biological Chemistry*, 1995. **270**(40): p. 23352-23361.
102. Wang, Z.T., Z. Wang, and Y.W. Hu, *Possible roles of platelet-derived microparticles in atherosclerosis. Atherosclerosis*, 2016. **248**: p. 10-6.
103. Stellos, K., et al., *Platelet interaction with progenitor cells: vascular regeneration or inquiry? Pharmacol Rep*, 2008. **60**(1): p. 101-8.
104. Gawaz, M., et al., *Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. Implications for atherogenesis. Atherosclerosis*, 2000. **148**(1): p. 75-85.
105. Gawaz, M., et al., *Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells. Circulation*, 1998. **98**(12): p. 1164-71.
106. Fernandez-Patron, C., et al., *Differential regulation of platelet aggregation by matrix metalloproteinases-9 and -2. Thromb Haemost*, 1999. **82**(6): p. 1730-5.
107. May, A.E., et al., *Engagement of glycoprotein IIb/IIIa (alpha(IIb)beta3) on platelets upregulates CD40L and triggers CD40L-dependent matrix degradation by endothelial cells. Circulation*, 2002. **106**(16): p. 2111-7.
108. Sawicki, G., et al., *Release of gelatinase A during platelet activation mediates aggregation. Nature*, 1997. **386**(6625): p. 616-9.
109. Maione, T.E., et al., *Inhibition of angiogenesis by recombinant human platelet factor-4 and related peptides. Science*, 1990. **247**(4938): p. 77-9.
110. Scheuerer, B., et al., *The CXC-chemokine platelet factor 4 promotes monocyte survival and induces monocyte differentiation into macrophages. Blood*, 2000. **95**(4): p. 1158-66.
111. Karshovska, E., C. Weber, and P. von Hundelshausen, *Platelet chemokines in health and disease. Thromb Haemost*, 2013. **110**(5): p. 894-902.
112. von Hundelshausen, P., et al., *RANTES deposition by platelets triggers monocyte arrest on inflamed and atherosclerotic endothelium. Circulation*, 2001. **103**(13): p. 1772-7.

113. Massberg, S., et al., *Platelets secrete stromal cell-derived factor 1alpha and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo.* *J Exp Med*, 2006. **203**(5): p. 1221-33.
114. Nannizzi-Alaimo, L., V.L. Alves, and D.R. Phillips, *Inhibitory effects of glycoprotein IIb/IIIa antagonists and aspirin on the release of soluble CD40 ligand during platelet stimulation.* *Circulation*, 2003. **107**(8): p. 1123-8.
115. Henn, V., et al., *CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells.* *Nature*, 1998. **391**(6667): p. 591-4.
116. Rath, D., et al., *Expression of stromal cell-derived factor-1 receptors CXCR4 and CXCR7 on circulating platelets of patients with acute coronary syndrome and association with left ventricular functional recovery.* *Eur Heart J*, 2014. **35**(6): p. 386-94.
117. Yamaguchi, J., et al., *Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization.* *Circulation*, 2003. **107**(9): p. 1322-8.
118. Stocker, T.J., et al., *Small but mighty: Platelets as central effectors of host defense.* *Thromb Haemost*, 2017. **117**(4): p. 651-661.
119. Silvain, J., et al., *Composition of coronary thrombus in acute myocardial infarction.* *J Am Coll Cardiol*, 2011. **57**(12): p. 1359-67.
120. Silvain, J., et al., *Thrombus composition in sudden cardiac death from acute myocardial infarction.* *Resuscitation*, 2017. **113**: p. 108-114.
121. Rittersma, S.Z., et al., *Plaque instability frequently occurs days or weeks before occlusive coronary thrombosis: a pathological thrombectomy study in primary percutaneous coronary intervention.* *Circulation*, 2005. **111**(9): p. 1160-5.
122. Fuijtschot, W.W., et al., *Inflammatory cell content of coronary thrombi is dependent on thrombus age in patients with ST-elevation myocardial infarction.* *J Cardiol*, 2017. **69**(1): p. 394-400.
123. Murakami, T., et al., *Intracoronary aspiration thrombectomy for acute myocardial infarction.* *Am J Cardiol*, 1998. **82**(7): p. 839-44.
124. Henriques de Gouveia, R., et al., *Sudden unexpected death in young adults. Discrepancies between initiation of acute plaque complications and the onset of acute coronary death.* *Eur Heart J*, 2002. **23**(18): p. 1433-40.
125. Ramaiola, I., et al., *Changes in thrombus composition and profilin-1 release in acute myocardial infarction.* *Eur Heart J*, 2015. **36**(16): p. 965-75.
126. Daub, K., et al., *Platelets induce differentiation of human CD34+ progenitor cells into foam cells and endothelial cells.* *FASEB J*, 2006. **20**(14): p. 2559-61.
127. English, D., J.G. Garcia, and D.N. Brindley, *Platelet-released phospholipids link haemostasis and angiogenesis.* *Cardiovasc Res*, 2001. **49**(3): p. 588-99.
128. de Boer, H.C., et al., *Fibrin and activated platelets cooperatively guide stem cells to a vascular injury and promote differentiation towards an*

- endothelial cell phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. **26**(7): p. 1653-9.
129. Lev, E.I., et al., Potential role of activated platelets in homing of human endothelial progenitor cells to subendothelial matrix. *Thromb Haemost*, 2006. **96**(4): p. 498-504.
 130. Li, X., et al., Early onset of endothelial cell proliferation in coronary thrombi of patients with an acute myocardial infarction: implications for plaque healing. *J Thromb Haemost*, 2012. **10**(3): p. 466-73.
 131. Oike, Y., et al., Angiopoietin-related growth factor (AGF) promotes epidermal proliferation, remodeling, and regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(16): p. 9494-9.
 132. Numaguchi, Y., et al., The impact of the capability of circulating progenitor cell to differentiate on myocardial salvage in patients with primary acute myocardial infarction. *Circulation*, 2006. **114**(1 Suppl): p. I114-9.
 133. Asahara, T., et al., Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 1997. **275**(5302): p. 964-7.
 134. Dimmeler, S., A.M. Zeiher, and M.D. Schneider, Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair. *J Clin Invest*, 2005. **115**(3): p. 572-83.
 135. Wright, S.D., et al., Activation of the adhesive capacity of CR3 on neutrophils by endotoxin: dependence on lipopolysaccharide binding protein and CD14. *J Exp Med*, 1991. **173**(5): p. 1281-6.
 136. Frey, E., et al., Soluble CD14 participates in the response of cells to lipopolysaccharide. *Journal of Experimental Medicine*, 1992. **176**(6): p. 1665-1671.
 137. Hudig, D., et al., Properties of human blood monocytes. I. CD91 expression and log orthogonal light scatter provide a robust method to identify monocytes that is more accurate than CD14 expression. *Cytometry B Clin Cytom*, 2014. **86**(2): p. 111-20.
 138. Lee, J., et al., Transfection of CD14 into 70Z/3 cells dramatically enhances the sensitivity to complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Journal of Experimental Medicine*, 1992. **175**(6): p. 1697-1705.
 139. Wright, S.D., et al., CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*, 1990. **249**(4975): p. 1431-3.
 140. Lu, Y.-C., W.-C. Yeh, and P.S. Ohashi, LPS/TLR4 signal transduction pathway. *J Cytokine*, 2008. **42**(2): p. 145-151.
 141. Gardiner, E.E. and R.K. Andrews, Structure and function of platelet receptors initiating blood clotting, in *A Systems Biology Approach to Blood*. 2014, Springer. p. 263-275.
 142. Broos, K., et al., Platelets at work in primary hemostasis. *Blood Rev*, 2011. **25**(4): p. 155-67.
 143. Andrews, R.K., et al., Platelet adhesion receptors and (patho) physiological thrombus formation. *J Histology histopathology*, 2001. **16**(3): p. 969-980.

144. Bradford, H.N., R.A. Pixley, and R.W. Colman, Human factor XII binding to the glycoprotein Ib-IX-V complex inhibits thrombin-induced platelet aggregation. *J Biol Chem*, 2000. **275**(30): p. 22756-63.
145. Li, C.Q., et al., Platelet glycoprotein Ib alpha binds to thrombin anion-binding exosite II inducing allosteric changes in the activity of thrombin. *J Biol Chem*, 2001. **276**(9): p. 6161-8.
146. Simon, D.I., et al., Platelet glycoprotein Iba1 is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J Exp Med*, 2000. **192**(2): p. 193-204.
147. Yun, T.H., et al., Thrombin activation of factor XI on activated platelets requires the interaction of factor XI and platelet glycoprotein Ib alpha with thrombin anion-binding exosites I and II, respectively. *J Biol Chem*, 2003. **278**(48): p. 48112-9.
148. Goto, S., T. Hasebe, and S. Takagi, Platelets: Small in Size But Essential in the Regulation of Vascular Homeostasis—Translation From Basic Science to Clinical Medicine—. *J Circulation Journal*, 2015. **79**(9): p. 1871-1881.
149. Jamasbi, J., et al., Platelet receptors as therapeutic targets: past, present and future. *J Thrombosis haemostasis*, 2017. **117**(07): p. 1249-1257.
150. Goto, S., et al., Distinct mechanisms of platelet aggregation as a consequence of different shearing flow conditions. *J Clin Invest*, 1998. **101**(2): p. 479-86.
151. Yago, T., et al., Platelet glycoprotein Iba1 forms catch bonds with human WT vWF but not with type 2B von Willebrand disease vWF. *J Clin Invest*, 2008. **118**(9): p. 3195-207.
152. Ruggeri, Z.M., et al., Activation-independent platelet adhesion and aggregation under elevated shear stress. *Blood*, 2006. **108**(6): p. 1903-10.
153. Cosemans, J.M., et al., Key role of glycoprotein Ib/V/IX and von Willebrand factor in platelet activation-dependent fibrin formation at low shear flow. *Blood*, 2011. **117**(2): p. 651-60.
154. Gardiner, E.E., et al., Controlled shedding of platelet glycoprotein (GP)VI and GPIb-IX-V by ADAM family metalloproteinases. *J Thromb Haemost*, 2007. **5**(7): p. 1530-7.
155. Collier, B.S., et al., Evidence that glycocalicin circulates in normal plasma. *J Clin Invest*, 1984. **73**(3): p. 794-9.
156. Steffan, A., et al., Glycocalicin in the diagnosis and management of immune thrombocytopenia. *Eur J Haematol*, 1998. **61**(2): p. 77-83.
157. Lopez, J.A., et al., Bernard-Soulier syndrome. *Blood*, 1998. **91**(12): p. 4397-418.
158. Amanzada, A., et al., Identification of CD68(+) neutrophil granulocytes in in vitro model of acute inflammation and inflammatory bowel disease. *Int J Clin Exp Pathol*, 2013. **6**(4): p. 561-70.
159. Gottfried, E., et al., Expression of CD68 in non-myeloid cell types. *Scand J Immunol*, 2008. **67**(5): p. 453-63.

160. Holness, C. and D. Simmons, Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. *Blood*, 1993. **81**(6): p. 1607-1613.
161. Micklem, K., et al., A human macrophage-associated antigen (CD68) detected by six different monoclonal antibodies. *Br J Haematol*, 1989. **73**(1): p. 6-11.
162. van der Kooij, M.A., et al., Human monocyte-derived macrophages express an approximately 120-kD Ox-LDL binding protein with strong identity to CD68. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997. **17**(11): p. 3107-16.
163. Barois, N., et al., MHC class II compartments in human dendritic cells undergo profound structural changes upon activation. *Traffic*, 2002. **3**(12): p. 894-905.
164. Holness, C.L., et al., Macrosialin, a mouse macrophage-restricted glycoprotein, is a member of the lamp/lgp family. *J Biol Chem*, 1993. **268**(13): p. 9661-6.
165. Kurushima, H., et al., Surface expression and rapid internalization of macrosialin (mouse CD68) on elicited mouse peritoneal macrophages. *J Leukoc Biol*, 2000. **67**(1): p. 104-8.
166. Ramprasad, M.P., et al., Cell surface expression of mouse macrosialin and human CD68 and their role as macrophage receptors for oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(25): p. 14833-8.
167. Moore, K.J. and M.W. Freeman, Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. **26**(8): p. 1702-11.
168. Sambrano, G.R. and D. Steinberg, Recognition of oxidatively damaged and apoptotic cells by an oxidized low density lipoprotein receptor on mouse peritoneal macrophages: role of membrane phosphatidylserine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(5): p. 1396-400.
169. Otnad, E., et al., A macrophage receptor for oxidized low density lipoprotein distinct from the receptor for acetyl low density lipoprotein: partial purification and role in recognition of oxidatively damaged cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(5): p. 1391-5.
170. de Beer, M.C., et al., Lack of a direct role for macrosialin in oxidized LDL metabolism. *J Lipid Res*, 2003. **44**(4): p. 674-85.
171. Yoshida, H., et al., Minimally oxidized low-density lipoprotein increases expression of scavenger receptor A, CD36, and macrosialin in resident mouse peritoneal macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998. **18**(5): p. 794-802.
172. O'Reilly, D., et al., Multiple Ets factors and interferon regulatory factor-4 modulate CD68 expression in a cell type-specific manner. *J Biol Chem*, 2003. **278**(24): p. 21909-19.
173. Rabinowitz, S.S. and S. Gordon, Macrosialin, a macrophage-restricted membrane sialoprotein differentially glycosylated in response to inflammatory stimuli. *J Exp Med*, 1991. **174**(4): p. 827-36.

174. da Silva, R.P. and S. Gordon, Phagocytosis stimulates alternative glycosylation of macrosialin (mouse CD68), a macrophage-specific endosomal protein. *Biochem J*, 1999. **338 (Pt 3)**(Pt 3): p. 687-94.
175. Ribeiro, D.R., et al., Thrombosis in ST-elevation myocardial infarction: Insights from thrombi retrieved by aspiration thrombectomy. *World J Cardiol*, 2016. **8**(6): p. 362-7.
176. Carl Roth GmbH + Co. KG, Gebrauchsanweisung Eosin G-Lösung 0,5% wässrig X883. 2014: p. 1.
177. Thygesen, K., et al., Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). *Circulation*, 2018. **138**(20): p. e618-e651.
178. Bernard, R., et al., Nomenclature and criteria for diagnosis of ischemic heart disease. Report of the Joint International Society and Federation of Cardiology/World Health Organization task force on standardization of clinical nomenclature. *Circulation*, 1979. **59**(3): p. 607-9.

7 Erklärungen zum Eigenanteil

Diese Arbeit wurde von Frau PD Dr. Iris Müller und Herrn Prof. Dr. Meinrad Gawaz konzipiert.

Die Thrombusaspiration erfolgte durch ärztliche Mitarbeiter der Kardiologischen Abteilung des Universitätsklinikums Tübingen, sowie der Alb-Fils-Kliniken Göppingen. Die Aufarbeitung der Thromben erfolgte durch die medizinisch-technischen Angestellten des Labor Gawaz Frau Ingrid Epple und Frau Lydia Laptev, sowie in geringerem Umfang nach Anleitung auch durch mich selbst.

Die Zellkultivierungen mit Fotodokumentation wurden nach Anleitung durch Frau Laptev von mir selbstständig durchgeführt. Es erfolgte in Einzelfällen die Vertretung durch Frau Laptev, sowie Frau Joanna Rutka.

Die Immunhistochemischen Färbungen, sowie deren Fotodokumentation wurden nach Anleitung durch Frau Epple von mir selbstständig durchgeführt.

Die Aufarbeitung der Daten erfolgte durch mich, ebenso die für die Arbeit notwendige Literaturrecherche. Die statistische Auswertung geschah durch mich in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Karin Müller.

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Dissertationsschrift ausschließlich durch mich abgefasst und keine weiteren Hilfsmittel, als die angegebenen, verwendet worden sind. Die wörtlich oder inhaltlich aus anderen Arbeiten übernommenen Stellen wurden als solche gekennzeichnet.

8 Danksagung

Ich danke meiner Doktormutter Frau Privatdozentin Dr. Iris Müller und dem ärztlichen Direktor der Medizinischen Klinik III Herrn Professor Dr. Meinrad Gawaz für die Überlassung des Themas sowie die gute Betreuung und konstruktive Kritik bei der Erstellung der vorliegenden Doktorarbeit. Weiter möchte ich mich bei Frau Dr. Karin Müller für die Hilfestellung in vielen Aspekten rund um die Doktorarbeit herum sowie bei der statistischen Auswertung bedanken. Ebenso möchte ich den Mitarbeitern des Labor Gawaz Frau PhD Dr. Madhumita Chatterjee für so manchen Denkanstoß und kritische Reflexion sowie Frau Lydia Laptev, Frau Ingrid Epple und Frau Klaudia Posavec für die Anleitung und Hilfestellung in der praktischen Ausführung bedanken.

Ganz herzlicher Dank geht an meinen lieben Freund und Kommilitonen David Baumann, der parallel zu mir promovierend, alle Phasen einer solchen Arbeit nachvollzogen und mich wann immer nötig unterstützt hat.

In besonderer Weise möchte ich mich aber bei meiner Frau Theresa für so vieles, was man nicht in Worte fassen kann, bedanken: für den Verzicht, die Motivation, die Unterstützung in jeder Lebenslage... Du bist wunderbar – Danke.