

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

**Histologische und Immunhistochemische Analyse von  
intrakoronaren Aspirationsthromben bei Patienten mit  
Myokardinfarkt und Korrelation mit klinischen Parametern**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Hermann, Annette**

**2022**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. I. Müller

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. A. Straub

Tag der Disputation: 31.05.2022

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Koronare Herzkrankheit</b> .....	<b>1</b>
1.1.1	Definition und Epidemiologie .....	1
1.1.2	Kardiovaskuläre Risikofaktoren .....	2
1.1.3	Endotheliale Dysfunktion und die Entstehung der Atherosklerose .....	3
<b>1.2</b>	<b>Akutes Koronarsyndrom</b> .....	<b>7</b>
<b>1.3</b>	<b>Myokardinfarkt</b> .....	<b>8</b>
1.3.1	Definition und Epidemiologie .....	8
1.3.2	Pathophysiologie des Myokardinfarktes .....	8
1.3.3	Die Entstehung koronarer Thromben und ihre Zusammensetzung .....	12
1.3.4	Klinik und Diagnostik des Myokardinfarktes .....	13
1.3.5	Komplikationen und Prognose .....	16
1.3.6	Therapie des Myokardinfarktes .....	17
<b>1.4</b>	<b>Biomarker</b> .....	<b>20</b>
1.4.1	Macrophage Migration-Inhibitory-Factor.....	20
1.4.2	Gremlin1 .....	22
1.4.3	Transforming-Growth-Factor $\beta$ 1 .....	22
1.4.4	CD105 (Endoglin) .....	24
1.4.5	CD14.....	25
1.4.6	CD68.....	25
1.4.7	CD42b.....	25
1.4.8	S100A4 .....	26
<b>1.5</b>	<b>Zielsetzung</b> .....	<b>26</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>28</b>
<b>2.1</b>	<b>Allgemeine Materialien</b> .....	<b>28</b>
<b>2.2</b>	<b>Das Patientenkollektiv</b> .....	<b>30</b>
<b>2.3</b>	<b>Bestimmung des Thrombenalters</b> .....	<b>31</b>
<b>2.4</b>	<b>Gewinnung und Vorbereitung der Thromben für die Färbungen</b> .....	<b>32</b>
<b>2.5</b>	<b>Hämatoxylin-Eosin-Färbung</b> .....	<b>32</b>
<b>2.6</b>	<b>Immunhistochemische Färbungen</b> .....	<b>35</b>
2.6.1	Prinzip der Immunhistochemie und Durchführung .....	35
2.6.2	Technisches und praktisches Vorgehen zur Auswertung .....	37
<b>2.7</b>	<b>Statistik</b> .....	<b>38</b>

## Inhaltsverzeichnis | II

<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>40</b>
<b>3.1</b>	<b>Beschreibung des Patientenkollektivs</b> .....	<b>40</b>
<b>3.2</b>	<b>Die morphologischen und immunhistochemischen Analysen</b> .....	<b>44</b>
3.2.1	Analyse der erythrozytenreichen Thromben .....	45
3.2.2	Analyse der zellreichen Thromben.....	48
3.2.3	Analyse der fibrotischen Thromben.....	51
3.2.4	Analyse der gemischten Thromben.....	53
3.2.5	Zusammenfassung der morphologischen und immunhistochemischen Auswertung ...	57
<b>3.3</b>	<b>Unterschiede in der Zellexpression koronarer Thromben in Abhängigkeit vom Thrombusalter</b> .....	<b>58</b>
<b>3.4</b>	<b>Explorative Cluster-Analyse</b> .....	<b>61</b>
<b>3.5</b>	<b>Unterschiede in der Zellexpression koronarer Thromben im Hinblick auf klinische Daten und Patientencharakteristika</b> .....	<b>64</b>
3.5.1	Die CD14-Expression in NSTEMI-Patienten .....	64
3.5.2	Die CD105-Expression in Patienten mit Hyperlipoproteinämie .....	65
3.5.3	Die MIF-Expression bei ACE-Hemmer-Vor-medikation .....	65
<b>3.6</b>	<b>Korrelationen nach Spearman hinsichtlich der Proteinexpression</b> .....	<b>68</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>71</b>
<b>4.1</b>	<b>Interpretation der Ergebnisse im aktuellen wissenschaftlichen Kontext</b> .....	<b>73</b>
4.1.1	Die Morphologie intrakoronarer Thromben .....	73
4.1.2	Die „symptom-to-balloon time“ .....	80
4.1.3	Vergleich der Zellexpressionen mit klinischen Parametern.....	85
<b>4.2</b>	<b>Limitationen dieser Arbeit</b> .....	<b>94</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>96</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>7</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>XV</b>
<b>8</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>XVII</b>
<b>9</b>	<b>Erklärung zum Eigenanteil</b> .....	<b>XIX</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>XX</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

ABC	Avidin-Biotin-Complex
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ACS	acute coronary syndrome (Akutes Koronarsyndrom)
ADP	Adenosin-Di-Phosphat
AK	Antikörper
AP	Angina pectoris
Aqua dest.	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosin-Tri-Phosphat
BH <sub>4</sub>	Tetrahydrobiopterin
BMI	Body Mass Index
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BNP	Brain Natriuretic Peptid
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	Cluster of Differentiation
CK	Creatinkinase
CRP	C-reaktives Protein
DAB	Diaminobenzidin
DES	Drug Eluting Stent (Medikamentenbeschichteter Stent)
EF	Ejektionsfraktion
EKG	Elektrokardiogramm
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid (NO)-Synthase
ESC	European Society of Cardiology
E-Selectin	Endothel-Selectin
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting (Durchflusszytometrie)
FSP1	Fibroblasten-spezifisches Protein 1
GF	Gesichtsfeld
GPIb $\alpha$	Glykoprotein Ib $\alpha$
Grem1	Gremlin1
HbA1c	glykosyliertes Hämoglobin
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HDL	High Density Lipoptotein
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HHT1	Hereditäre hämorrhagische Teleangiektasie Typ 1
HI	Herzinsuffizienz

HLP	Hyperlipoproteinämie
i.v.	intravenös
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1
IgG	Immunglobulin G
IL-1 $\beta$ / 6	Interleukin 1 $\beta$ -6
IQR	Interquartilsrange
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	Low Density Lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharid
MCP-1	Monocyte Chemoattractant-Protein-1
MI	Myokardinfarkt
MIF	Macrophage Migration Inhibitory Factor
NO	Stickstoffmonoxid
NSTEMI	Non-ST-Elevation Myocardial Infarction (Nicht-ST-Hebungsinfarkt)
NT-proBNP	N-Terminales- pro-Brain Natriuretic Peptid
ONOO $\cdot$	Peroxynitrit
pAVK	periphere Arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phospat Buffered Saline
PCI	Percutaneous Coronary Intervention (perkutane Koronarintervention)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)
PDE5	Phosphodiesterase-5
PFA	Paraformaldehyd
P-Selectin	Platelet-Selectin
PTA	Perkutane Transluminale Angioplastie
ROC	Receiver Operating Characteristics
ROS	Reactive Oxygen Species (Reaktive Sauerstoffspezies)
S100A4	Anti-Fibroblasten-spezifisches Protein
SD	Standard Deviation (Standardabweichung)
STEMI	ST-Elevation Myocardial Infarction (ST-Hebungsinfarkt)
TGF $\beta$ 1	Transforming Growth Factor $\beta$ 1
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1
vWF	von Willebrand Faktor
WHO	World Health Organization

# 1 Einleitung

Kardiovaskuläre Erkrankungen zählen zu den wichtigsten Volkskrankheiten und sind weltweit die führende Ursache für kardiovaskuläre Todesfälle (1-3). Laut der World Health Organization (WHO) starben 2016 weltweit ca. 17,9 Millionen Menschen an den Folgen kardiovaskulärer Erkrankungen (3). Dies entspricht rund einem Drittel aller weltweiten Todesfälle, wovon 85 % auf Myokardinfarkte und zerebrale Insulte zurückzuführen sind (3). Mehr als drei Viertel der weltweiten kardiovaskulär bedingten Todesfälle ereignen sich in Ländern mit niedrigem und mittlerem Einkommen (3).

Auch wenn europaweit die Mortalitätsrate in den vergangenen 30 bis 40 Jahren immer weiter sank, so verstarben jährlich weltweit etwa 1,8 Millionen Menschen an den Folgen eines akuten Myokardinfarktes (4). In Europa macht dies etwa 20 % der Todesfälle bei beiden Geschlechtern aus, wobei es einen deutlichen West-Ost-Shift zwischen den europäischen Ländern zu geben scheint (5).

Laut Statistischem Bundesamt waren 2018 in Deutschland 36,2 % aller Todesfälle auf Herz-Kreislaufkrankungen zurückzuführen (6). Der akute Myokardinfarkt machte davon einen Anteil von 13,4 % aus (7). Bei Männern war der akute Myokardinfarkt die dritthäufigste (26,9 %) (8), bei Frauen die vierthäufigste Todesursache (19,3 %) (9).

## 1.1 Koronare Herzkrankheit

### 1.1.1 Definition und Epidemiologie

Arteriosklerose ist der Oberbegriff für eine Reihe von Arterienerkrankungen, in deren Folge es durch eine Wandverdickung zu einer Verhärtung der Arterienwand kommt. Daraus resultieren ein Elastizitätsverlust und eine Gefäßlumeneinengung. Die Atherosklerose stellt die wichtigste Form der Arteriosklerose dar. Sie ist eine multifaktorielle Erkrankung und ist durch Lipideinlagerungen und Bildung fibröser Plaques in der Gefäßintima gekennzeichnet (10).

Die Koronare Herzkrankheit (KHK) stellt die Manifestation der Atherosklerose in den Koronararterien dar (11). Ursächlich sind progrediente, atherosklerotische

Plaques, die zu Koronarstenosen führen und den Blutfluss verlangsamen. Dadurch entsteht in den Kardiomyozyten ein Missverhältnis zwischen Sauerstoffbedarf und -angebot (12). Die KHK ist eine chronische Erkrankung, die zwar durch Veränderungen im Lebensstil, durch Kontrolle der Risikofaktoren und durch medikamentöse Prophylaxe maßgeblich beeinflusst werden kann, jedoch insgesamt einer progredienten Entwicklung unterliegt. Sie kann lange einen stabilen Verlauf nehmen oder sogar stumm verlaufen, ehe sie aufgrund eines akuten atherothrombotischen Ereignisses instabil wird (12).

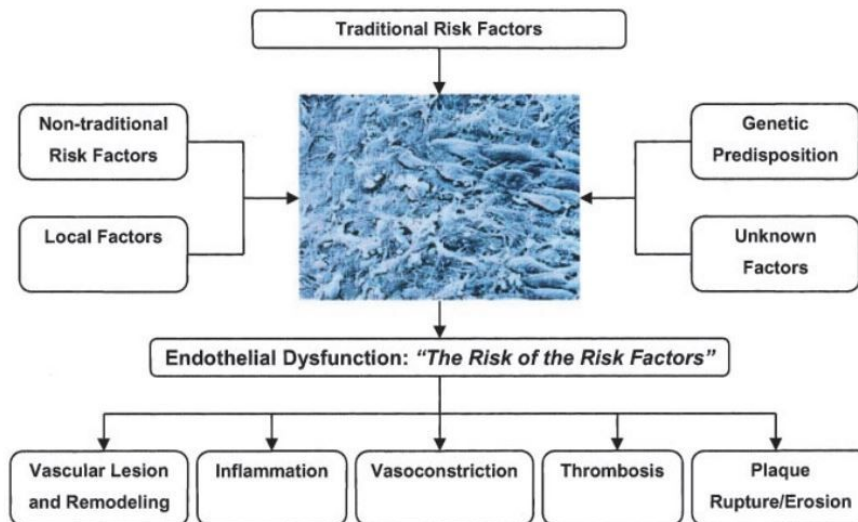
Laut der WHO sterben jedes Jahr weltweit 3,8 Millionen Männer und 3,4 Millionen Frauen an den Folgen einer KHK (2).

### **1.1.2 Kardiovaskuläre Risikofaktoren**

Nikotinabusus, Diabetes mellitus, Hyperlipoproteinämie und arterieller Hypertonus gelten als die klassischen Risikofaktoren für die Entstehung der Atherosklerose und der KHK (13, 14). Laut Khot et al. weisen mindestens 80 % der Patienten mindestens einen dieser klassischen Risikofaktoren auf, unabhängig von Geschlecht, Herkunft oder diagnostizierter KHK. Die frühe Entwicklung einer KHK ist bei Männern mit Nikotinabusus, bei Frauen mit Nikotinabusus und Diabetes mellitus assoziiert (13). Darüber hinaus sind inzwischen viele weitere Risikofaktoren bekannt. Zu den beeinflussbaren Hauptrisikofaktoren zählen Dyslipidämie, arterieller Hypertonus >140/90 mmHg, Diabetes mellitus mit glykosyliertem Hämoglobin A1c (HbA1c) >7 %, Nikotinabusus, Adipositas, Bewegungsmangel und fettreiche Ernährung (14). Auch psychosoziale Faktoren korrelieren laut der INTERHEART-Studie signifikant mit dem Auftreten eines Myokardinfarkts (14). Als nicht beeinflussbare Risikofaktoren gelten das Lebensalter (>65 Jahre), männliches Geschlecht und eine positive Familienanamnese (11, 14). Weitere Risikofaktoren wie chronische Entzündungen mit Erhöhung des C-reaktiven Proteins (CRP) (15, 16), chronische Niereninsuffizienz (17) und Obstruktives Schlafapnoe-Syndrom (18) sind inzwischen bekannt. Auch genetische Veränderungen, die mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko verbunden sind, werden vermutet. Hierzu zählt auch die familiäre Hypercholesterinämie, der ein Low Density Lipoprotein (LDL)-



Rezeptor-Defekt zugrunde liegt (19). Abbildung 1 veranschaulicht den Einfluss der Risikofaktoren auf die Entstehung der Endothelialen Dysfunktion.



**Abbildung 1: Endotheliale Dysfunktion und das Zusammenspiel von Risikofaktoren**

Dargestellt ist der Einfluss verschiedener Risikofaktoren auf die Entstehung der Endothelialen Dysfunktion und deren Auswirkungen auf die Gefäßwand.

(Abbildung aus: Endothelial Dysfunction: A Marker of Atherosclerotic Risk, Bonetti et al., 2002 (20). Verwendung mit Genehmigung von Wolters Kluwer Health, Inc.)

### 1.1.3 Endotheliale Dysfunktion und die Entstehung der Atherosklerose

Die Endotheliale Dysfunktion ist eine systemische Erkrankung (20). Schädigende Einflüsse auf die physiologische Endothelfunktion nehmen eine Schlüsselrolle in der frühen Entwicklung der Atherosklerose ein. Sie sind sowohl für Plaquebildung als auch für das Auftreten späterer Komplikationen ursächlich (21, 22). Endotheliale Dysfunktion ist als unabhängiger Prädiktor signifikant mit einem ungünstigen kardiovaskulären Verlauf assoziiert (1, 20, 23, 24).

Das Endothel stellt eine hochselektive Barriere zwischen dem zirkulierenden Blut und der Gefäßwand dar (23). Die Forschung der vergangenen 30 Jahre hat gezeigt, dass das Gefäßendothel für die Aufrechterhaltung des Gefäßtonus und der vaskulären Homöostase entscheidend ist (20). Als biologisch aktives Gewebe setzt es eine Reihe vasoaktiver Substanzen frei, die den Gefäßtonus und den Umbau der Gefäßwand regulieren (1, 25). Zu den relaxierenden Faktoren zählen Stickstoffmonoxid (NO) und Prostacyclin (26). Zu den konstringierenden Faktoren gehört u.a. Endothelin-1 (26).

Bevor Plaque-Formationen morphologisch in Erscheinung treten, finden bereits atherosklerotische Endothelveränderungen statt (1). Die endotheliale Dysfunktion kann in jedem Stadium der Atheroskleroseentstehung noch beeinflusst werden (1, 27).

Kardiovaskuläre Risikofaktoren sowie chemische und mechanische Stimuli können diese physiologische Funktion des Endothels schädigen und zu pathologischen Veränderungen im Gefäßtonus, zu thrombotischer Dysfunktion, zur Proliferation von glatten Muskelzellen und zur Adhäsion und Migration von Leukozyten führen (23, 28, 29). Die dabei entstehenden reaktiven Sauerstoffradikale (ROS) und der zunehmende oxidative Stress tragen zur weiteren Progression bei (20). Im Verlauf übersteigt diese ROS-Produktion die physiologischen Eliminationsmöglichkeiten des antioxidativen Systems des Körpers. Durch mehrere Mechanismen kommt es zu einer Hemmung des endothelialen Enzyms NO-Synthase (eNOS): Die Sauerstoffradikale reagieren mit dem vorhandenen Stickstoffmonoxid (NO) zu Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) und reduzieren so die vorhandene NO-Konzentration, die für die physiologische Vasodilatation der Koronarien essenziell ist (1). Das  $\text{ONOO}^-$  selbst hat stark oxidierende Eigenschaften und vermindert die NO-Produktion über eine indirekte Hemmung der eNOS (25). Dies geschieht über eine Oxidierung des wichtigsten Co-Faktors der eNOS, Tetrahydrobiopterin ( $\text{BH}_4$ ), zu einem  $\text{BH}_3$ -Radikal (30). Diese Oxidierung von  $\text{BH}_4$  vermindert zum einen die  $\text{BH}_4$ -Bioverfügbarkeit, zum anderen entstehen dabei auch andere Oxidierungsprodukte wie das  $\text{BH}_2$ , von dem man annimmt, dass es mit  $\text{BH}_4$  um die Bindungsstellen der eNOS konkurriert (30). Auch die eNOS selbst reduziert Sauerstoff in Abwesenheit von  $\text{BH}_4$ , was in einer weiteren Produktion von ROS anstatt NO resultiert (25). Die Endothelzellen sind diesem zunehmend mit ROS angereichertem Milieu ausgesetzt und schaffen es nicht mehr, ihre Homöostase aufrechtzuerhalten (1). Es kommt zu einer paradoxen Vasokonstriktion des aus dem Gleichgewicht geratenen Endothels und zu einem veränderten Blutfluss, der die Thrombenbildung begünstigt (28).

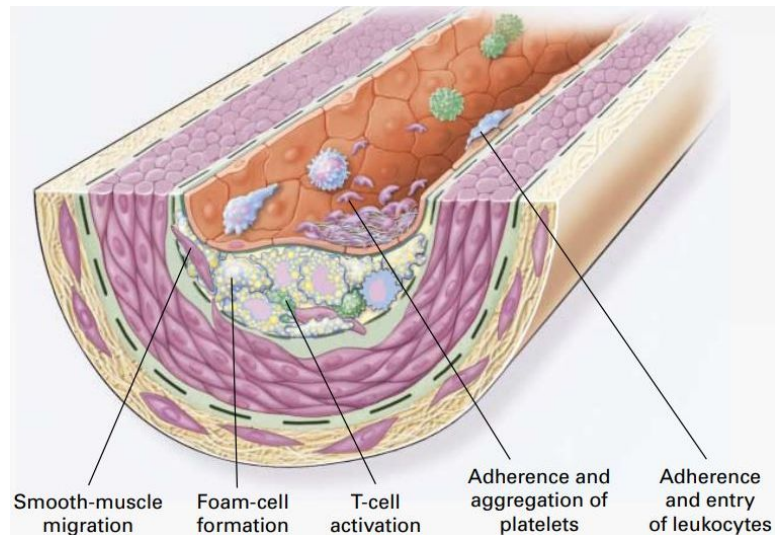
In den späten 1990er Jahren begannen Wissenschaftler allmählich, die KHK nicht als reine Lipidspeicherkrankheit, sondern auch als inflammatorischen

Prozess zu begreifen (31, 32). Die Phasen der Atheroskleroseentstehung sind Bestandteil einer inflammatorischen Antwort auf Gefäßendothel-schädigende Reize (33). Eine erhöhte Membranpermeabilität für Lipoproteine und andere Plasmabestandteile stellt den ersten Schritt in Richtung der Atheroskleroseentstehung dar (33). Die Expression von Adhäsionsmolekülen wie vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), Endothel-Selectin (E-Selectin) und Platelet-Selectin (P-Selectin) an der Endotheloberfläche sind für die folgenden inflammatorischen Vorgänge der Adhäsion, Migration und Akkumulation von Monozyten und T-Zellen verantwortlich (32, 33).

Einwandernde Lipoproteine binden an die Proteoglykane in der Gefäßintima und werden dort gespeichert. In dieser Form sind sie anfälliger für oxidative Modifikationen. Dadurch entsteht Low Density Lipoprotein (LDL) (1).

Von vaskulären Endothelzellen und glatten Muskelzellen werden Zytokine wie monocyte chemoattractant-protein-1 (MCP-1) und Makrophagen-stimulierender Faktor sezerniert. Diese verstärken die Chemotaxis und Adhäsion weiterer Monozyten und deren Differenzierung zu Makrophagen und steigern die Präsentation des stark oxidierten und aggregierten LDL an Scavenger Rezeptoren (10, 32, 34). Die oxidierten Lipide werden von in die Intima eingewanderten Makrophagen aufgenommen und gespeichert. Es entstehen lipidspeichernde Makrophagen, sogenannte Schaumzellen (10, 29, 32). Diese Schaumzellen formatieren sich zu Lipidflecken, sogenannten „fatty streaks“. Darunter versteht man Ansammlungen von Schaumzellen in der Gefäßintima, die von kleinen runden bis ovalen Flecken zu schmalen Reihen und Linien konfluieren (10). Diese „fatty streaks“ bestehen anfangs aus lipidbeladenen Monozyten und Makrophagen mit T-Lymphozyten. Im Verlauf kommt es zu einer Einwanderung und Proliferation von glatten Muskelzellen in die „fatty streaks“ der Intima (32, 34). Die Entstehung dieser „fatty streaks“ ist in Abbildung 2 dargestellt. Das Fortbestehen der inflammatorischen und oxidierenden Stimuli resultiert in fortlaufender Chemotaxis von Makrophagen, Mastzellen und aktivierten T- und B-Zellen durch Zytokine wie Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) und Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (35). Dies erhält und verstärkt die endotheliale Läsion.

Die chronische Inflammation führt zu weiterer Proliferation und Sklerosierung der physiologischerweise sehr dünnen Intima. Die atherosklerotischen Plaques bestehen aus einer fibrösen Kappe und einem zentralen Lipidkern (10). Sie werden durch interstitielle Kollagenfasern zunächst stabil gehalten (35).



**Abbildung 2: Die Entstehung von „fatty streaks“ in der Entwicklung der Atherosklerose**

Das Bild zeigt in einem Gefäßquerschnitt die verschiedenen Schritte der Atheroskleroseentstehung: Eine erhöhte Membranpermeabilität auf dem Boden einer Endothelialen Dysfunktion führt zum Eintritt von Entzündungszellen und Lipoproteinen in die Intima. Nach oxidativen Veränderungen dieser Lipoproteine kommt es zur Aufnahme durch Makrophagen und zur Schaumzellformation. Nach Einwanderung und Proliferation glatter Muskelzellen kommt es zu einer zunehmenden Verdickung der Intima. (Abbildung aus: Atherosclerosis - An Inflammatory Disease, Ross, R.; N Engl J Med, 1999, S.118 (32). Verwendung mit Genehmigung von (32), Copyright Massachusetts Medical Society)

Akkumulierte Mastzellen in der Intima und Adventitia sezernieren unter anderem die mastzellspezifischen Proteasen Chymase und Tryptase sowie Wachstumsfaktoren und Histamin und tragen zur Progression und Destabilisierung dieser bisher stabilen Plaquekappen bei (36). Vulnerable Plaques besitzen eine dünnere fibröse Kappe, einen großen lipidreichen nekrotischen Kern und enthalten wenig Kollagen (29).

Einspritzende fragile Mikrogefäße sind stark mit der Plaqueprogression assoziiert (37). In pathologischen Untersuchungen konnte beobachtet werden, dass diese Neovaskularisationen vermehrt von Leukozyten umgeben waren und möglicherweise deren Eintrittsstellen in die Plaques darstellen (34, 38).

Zusätzliche biomechanische und hämodynamische Faktoren führen schließlich zur Destabilisierung und Plaqueruptur infolge verstärkten Matrixabbaus (29). Vaskuläre Strukturen und Teile des nekrotischen Kerns werden nun dem

zirkulierenden Blut exponiert und es kommt zur Gerinnungsaktivierung und Thrombenbildung (29, 37).

## **1.2 Akutes Koronarsyndrom**

Das Akute Koronarsyndrom (ACS) ist ein Überbegriff für drei verschiedene Krankheitsbilder: der akute ST-Hebungsinfarkt (STEMI), der Nicht-ST-Hebungsinfarkt (NSTEMI) und die instabile Angina pectoris (AP) (39).

Die Einteilung wird basierend auf dem EKG-Befund getroffen. Anhand unterschiedlichen De- und Repolarisationsverhaltens von gesundem und geschädigtem Myokard findet eine Unterscheidung zwischen STEMI und NSTEMI statt (40). Bei beiden Krankheitsbildern zeigt sich ein Anstieg des kardioselektiven Enzyms Troponin, welches durch Gewebsuntergang von Kardiomyozyten seine Funktion als wichtiges Strukturprotein des kardialen kontraktiven Apparates verliert und in die Blutbahn gelangt. Der Hauptunterschied zwischen NSTEMI und STEMI ist das Ausmaß der Obstruktion der betroffenen Koronararterie: Während beim NSTEMI die Koronararterie teilweise verschlossen ist, führt die komplette Obstruktion beim STEMI zu einem totalen Sauerstoffmangel und in Folge zu einem wesentlich größeren Myokardschaden (41). Die instabile AP hingegen zeigt weder Troponinanstieg noch spezifische EKG-Veränderungen (39). Bei der instabilen AP kommt es zwar bereits in Ruhe oder bei minimaler Anstrengung zu einer myokardialen Ischämie, allerdings ist keine komplette Gefäßokklusion und keine akute Schädigung von Kardiomyozyten nachweisbar (39).

Das Leitsymptom des ACS sind länger als 20 Minuten anhaltende retrosternale Beschwerden mit Dyspnoe und ausstrahlendem Charakter in Hals, Unterkiefer und in die Schulter- und Armregion (3, 42). Rein klinisch lassen sich STEMI, NSTEMI und instabile AP nicht voneinander unterscheiden. Vegetative Begleitsymptome wie Übelkeit, Erbrechen, Schwitzen und Panik, aber auch stumme und asymptomatische Verläufe kommen insbesondere bei Diabetikern, älteren Patienten und Frauen häufiger vor (39, 42-44).

Auf pathophysiologischer Ebene kommt es auf dem Boden einer Atherosklerose zu einem Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und -bedarf der

Kardiomyozyten. Bei persistierender Ischämie kommt es nach 20 Minuten zu einer irreversiblen Myokardnekrose und zu einem Myokardinfarkt. Das Ausmaß der Nekrose korreliert mit der Ischämiedauer jenseits dieser Grenze (45).

## **1.3 Myokardinfarkt**

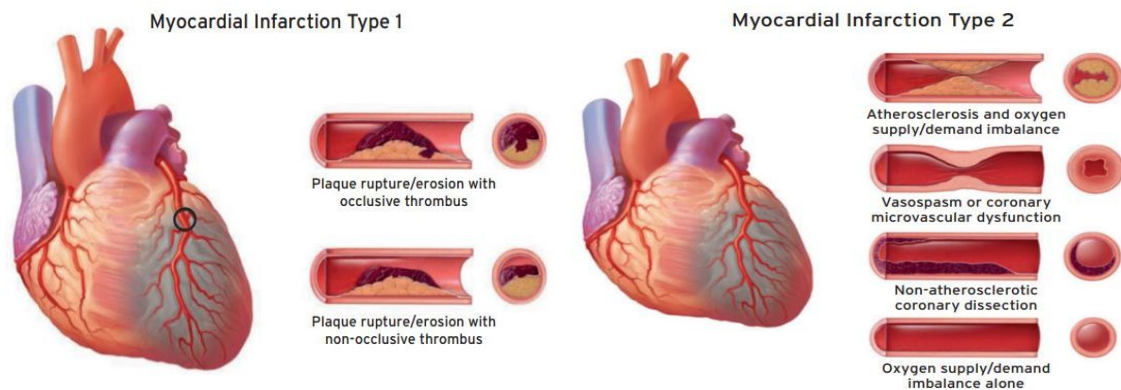
### **1.3.1 Definition und Epidemiologie**

Ein Myokardinfarkt (MI) ist in den Leitlinien der European Society of Cardiology (ESC) von 2018 definiert als ein akuter Myokardschaden, der durch einen Troponinanstieg und/oder -abfall mit mindestens einem Wert oberhalb der 99. Perzentile und zusätzlich mindestens einem der folgenden Kriterien gekennzeichnet ist:

- Symptome der Myokardischämie
- neu auftretende ischämietypische EKG-Veränderungen
- Entwicklung einer pathologischen Q-Zacke im EKG
- Darstellung eines neu diagnostizierten Verlustes von vitalem Myokardgewebe oder neu auftretende regionale Wandbewegungsstörungen in der Bildgebung
- Thrombusnachweis in der Angiographie oder in der Autopsie (42).

### **1.3.2 Pathophysiologie des Myokardinfarktes**

Dem MI liegt der Untergang von Herzmuskelzellen infolge einer zu lange andauernden Sauerstoffunterversorgung des Gewebes zugrunde (46). Wie in Abbildung 3 grafisch dargestellt, ist hierfür in den meisten Fällen die Ruptur einer atherosklerotischen Plaque mit Bildung eines intraluminalen Thrombus ursächlich (Typ1). Auch Ereignisse ohne vorangegangene Plaqueruptur wie Koronarspasmen, Arrhythmien, Hyper- oder Hypotonie sind häufig (Typ 2). Ein Missverhältnis von Sauerstoffangebot und -bedarf führt auf den Boden bereits bestehender Plaques zu einer weiteren Einengung des Gefäßlumens. Aber auch ohne vorbestehende Plaques kann es zu einer Sauerstoffunterversorgung des Gewebes kommen (Abbildung 3) (42).



### Abbildung 3: Ursachen des Myokardinfarkts

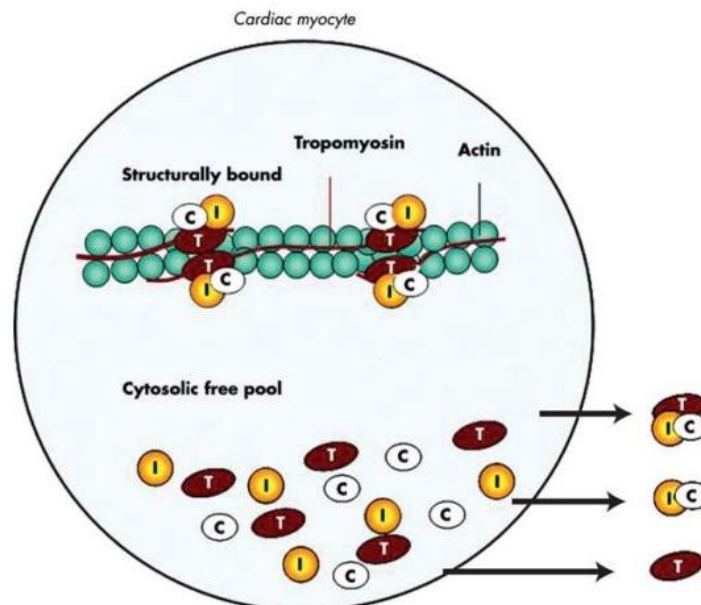
Dargestellt sind verschiedene Typen des Myokardinfarkts. Auf dem Boden atherosklerotischer Gefäßveränderungen kann es zu einer Plaqueruptur mit Bildung eines okklusiven oder nicht okklusiven Thrombus kommen (Typ 1). Eine myokardiale Sauerstoffunterversorgung aufgrund einer Verkleinerung des Gefäßlumens bei Atherosklerose, Koronarspasmen oder -dissektion können ebenfalls zu einem Infarkt führen (Typ 2).

(Abbildung aus: Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction, 2018, ESC Guidelines, S.246-247 (42). Verwendung mit Genehmigung von Oxford University Press)

Diese ischämiebedingten Schäden führen im Tiermodell bereits nach 20 Minuten zu einer irreversiblen Myokardnekrose (47). Elektronenmikroskopisch lassen sich bereits Stunden vor makroskopisch sichtbaren Veränderungen, Schäden nachweisen. Durch die beeinträchtigte oxidative Energiegewinnung und die reduzierte Adenosin-Tri-Phosphat (ATP)-Synthese wird der Energiestoffwechsel auf anaerobe Glykolyse umgestellt (48). Der ATP-Mangel bedingt einen Funktionsverlust des ATP-abhängigen Enzyms  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, was intra- und extrazelluläre Ionenverschiebungen mit Repolarisationsstörungen der Zellmembran und einem Wassereinstrom in die Kardiomyozyten zur Folge hat (48). Es kommt zu einem Auseinanderweichen der Myofibrillen, einem Anschwellen der Mitochondrien und amorphen Verdichtungen der Zellmatrix als Zeichen des Zelluntergangs (47).

Troponin I und T bilden zusammen mit Troponin C den sogenannten Troponin-Komplex und sind elementare myofibrilläre Strukturproteine des kontraktile Apparates des Herzens (siehe Abbildung 4). Sie sind die wichtigsten und sensitivsten Biomarker eines akuten Myokardschadens und kommen ausschließlich dort vor (49, 50). Bei einer Schädigung von Herzmuskelzellen kommt es zu einer Freisetzung dieser Proteine, welche im Serum mit Immunoassays gemessen werden können (46, 49). Ein Anstieg von Troponin I/T

zeichnet sich innerhalb von wenigen Stunden nach der Myokardschädigung ab (51). Bei hochsensitiven Tests ist inzwischen innerhalb der ersten 1 bis 2 h nach Infarktbeginn ein Anstieg nachweisbar (39). Nach ca. 12 h ist Troponin T maximal erhöht. Es folgt eine lange Plateauphase von bis zu 120 h. Eine Normalisierung tritt nach ein bis zwei Wochen ein. Troponin I ist nach ca. 11 h maximal erhöht und fällt anschließend schneller wieder ab (52).



**Abbildung 4: Darstellung des Troponin-Komplexes im Myofilament**

Troponin I und T binden als Komplex zusammen mit Troponin C an Tropomyosin. In gebundener Form sind sie elementare Strukturproteine des kontraktilen Apparates des Herzens. In gelöster Form können sie im peripheren Blut gemessen werden und dienen als wichtigster Marker eines Myokardinfarktes. (Abbildung aus: Troponin elevation in coronary vs. non-coronary disease, S. Agewell et al., European Heart Journal 2011, S. 406 (46). Verwendung mit Genehmigung von Oxford University Press)

Mehrere Studien fanden heraus, dass erhöhte Troponinwerte stark mit der Infarktgröße korrelieren (53-55). Eine ebenso starke negative Korrelation zwischen Troponin I und der Linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) konnte nachgewiesen werden (53).

Es sind auch andere Ursachen bekannt, die zu einer Troponinerhöhung führen können. Differentialdiagnostisch muss u.a. an eine Lungenembolie, Myokarditis, kardiale Dekompensation, Hypertensive Krise, Aortendissektion oder Zustand nach kürzlicher Herzoperation gedacht werden (46, 49). Man geht davon aus, dass erhöhte Troponinwerte im Serum auf eine Myokardnekrose hindeuten. Allerdings werden diese auch gemessen, wenn eine Myokardnekrose als Pathomechanismus für die Troponinfreisetzung als eher unwahrscheinlich



erscheint. Beispielsweise bei herzgesunden Patienten nach extremer körperlicher Anstrengung wie einem Marathonlauf (56), nach atrialem Pacing (57) oder bei Patienten mit stabiler KHK. Dies deutet darauf hin, dass es wahrscheinlich weitere bisher noch nicht verstandene Mechanismen gibt, die zu einer Freisetzung von Troponin in den Kreislauf führen. Die zunehmende Sensitivität der verwendeten Troponinassays im klinischen Alltag erklärt die Zunahme der Patienten mit unspezifisch erhöhten Werten (49, 50, 58). Für die richtige Interpretation ist somit die Dynamik des Anstiegs und Abfalls der Troponinwerte zusammen mit den allgemeinen Kriterien eines Myokardinfarktes entscheidend (59).

Die auf Zellebene ablaufenden Reparaturvorgänge des geschädigten Myokards laufen in drei Phasen ab: die Inflammationsphase, die Proliferationsphase und die Maturationsphase (60). In der Inflammationsphase sezernieren nekrotisch gewordene Kardiomyozyten proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-1 (IL-1) und TNF- $\alpha$ , welche über eine Aktivierung des angeborenen Immunsystems zu einer intensiven Immunantwort führen. Rekrutierte Leukozyten wie neutrophile Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen wandern nach 6 bis 24 h in das geschädigte Myokard ein (48, 61). Nach Interaktion der Leukozyten mit Endothelzellen kommt es zum Übertritt von Neutrophilen und Monozyten ins Gewebe. Die Beseitigung von Zelltrümmern und abgestorbenen Matrixbestandteilen durch Phagozytose aktiviert wiederum antiinflammatorische Kaskaden, supprimiert so die Immunantwort und leitet die Heilungs- oder Proliferationsphase ein. Ab dem 3. bis 7. Tag beginnt die Bildung von Granulationsgewebe (48). Fibroblasten proliferieren zu Myofibroblasten und lagern große Mengen extrazellulärer Matrix in das Infarktareal ab (60, 61). Zusätzlich kommt es zu einer gesteigerten Angiogenese in der zellulär und metabolisch hochaktiven Myokardwunde. Es folgt nach ca. 6 Wochen die Maturationsphase, die durch die Aktivierung antifibrotischer Stoffwechselwege schließlich zur Ausbildung einer Gewebsnarbe führt (61). Im Rahmen dieser Infarktheilung kann es zu ungünstigen Umbauprozessen des Ventrikels kommen. Dieses Remodeling ist eng mit der Entwicklung einer Herzinsuffizienz assoziiert

(61, 62). Ein koordiniert ablaufender Heilungsprozess des Myokards ist daher von großer Bedeutung für den Erhalt der linksventrikulären Funktion (41).

Infarktheilung ist ein sehr komplexer und dynamischer Prozess, bei dem nekrotisches Myokard durch Narbengewebe ersetzt wird. Dieser Prozess wird in großem Umfang von Monozyten gesteuert (41). Basierend auf unterschiedlichen Oberflächenmustern des Lipopolysaccharid (LPS)-Rezeptors Cluster of Differentiation 14 (CD14) und des FcγIII-Rezeptors CD16 können Monozyten in drei verschiedene Subpopulationen eingeteilt werden. Die größte Fraktion mit etwa 90 % nehmen die historisch zuerst beschriebenen und deshalb als klassisch bezeichneten Monozyten ein (CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>-</sup>). Zu den übrigen etwa 10 % gehören eine mittlere Gruppe, die sogenannten 'intermediate' Monozyten (CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>+</sup>) und die nicht-klassischen Monozyten (CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>++</sup>) (41, 63). Ein biphasisches Auftreten der CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>-</sup> und CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>+</sup> Subtypen im peripheren Blut ca. 3 h bzw. 5 bis 6 h nach einem Infarkt deutet zusammen mit einem signifikanten negativen Zusammenhang zwischen dem Peak von CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>-</sup> Monozyten und der kardialen Erholung auf inflammatorisch unterschiedliche und sequentiell ablaufende Funktionen der Monozyten-Subtypen hin (64). Klassische Monozyten scheinen dabei vorwiegend eine wichtige Rolle bei der Phagozytose von nekrotischem Gewebe und Zelltrümmern zu spielen, 'intermediate' und nicht-klassische Monozyten scheinen hingegen proinflammatorische Aufgaben zu haben. Den Monozyten der 'intermediate'-Gruppe wird außerdem auch eine wichtige Rolle bei der Neoangiogenese und der Produktion von ROS zugesprochen (41, 63).

### **1.3.3 Die Entstehung koronarer Thromben und ihre Zusammensetzung**

Koronare Thromben entstehen meist als Abscheidungsthromben durch die Ruptur bestehender atherosklerotischer Plaques oder über Erosionen der Gefäßwand (65). Dem thrombotischen Gefäßverschluss geht ein längerer dynamischer Prozess der Plaqueinstabilität und Thrombusformation voran (66, 67). Wenn die dünne fibröse Kappe instabiler Plaques rupturiert, werden darunter liegende subendotheliale Strukturen wie Kollagen und Gewebefaktor dem

Blutstrom exponiert. Dies triggert die Ansammlung und Aktivierung von Thrombozyten und die Konvertierung von Fibrinogen zu Fibrin (65, 68). In der initialen Phase der Thrombusformation aggregieren aktivierte Thrombozyten mit dem Lipidkern und der Thrombus beginnt sich in das Gefäßlumen vorzuwölben. Gelegentlich kommt es zur spontanen Auflösung und Plaqueheilung. Auch stabile wandständige Thromben kommen vor (68). In anderen Fällen schreitet die Thrombozytenaggregation weiter voran und das Gefäß okkludiert teilweise. Der Thrombus wächst weiter und wird von einem Fibrinnetz stabilisiert. Erythrozyten und Immunzellen aus dem Blutstrom bleiben in dem Fibrinnetz haften. Dadurch verändert sich der zuvor grauweiße Plättchenthrombus und es entsteht ein roter erythrozytenreicher Thrombus (68).

Der Hauptbestandteil von Thromben ist Fibrin, das Endprodukt der Gerinnungskaskade. Weitere Bestandteile sind in abnehmender Reihenfolge Thrombozyten, Erythrozyten, Cholesterinkristalle und Leukozyten (67). Der Fibringehalt steigt mit zunehmendem Thrombusalter an, der Thrombozytengehalt nimmt hingegen ab (67, 69). Silvain et al. wiesen bei Patienten innerhalb der ersten Stunde nach Symptombeginn sogenannte „frische“ thrombozytenreiche Thromben nach. Bei Patienten mit einer Ischämiezeit >3 h fanden sich „ältere“ fibrin- und erythrozytenreiche Thromben (67, 68). Neutrophile und Monozyten infiltrierten den Thrombus bereits innerhalb der ersten 3 h nach Symptombeginn. B- und T-Lymphozyten-Infiltrate waren hingegen erst in Thromben >6 h in signifikant höherer Zahl vorhanden (69).

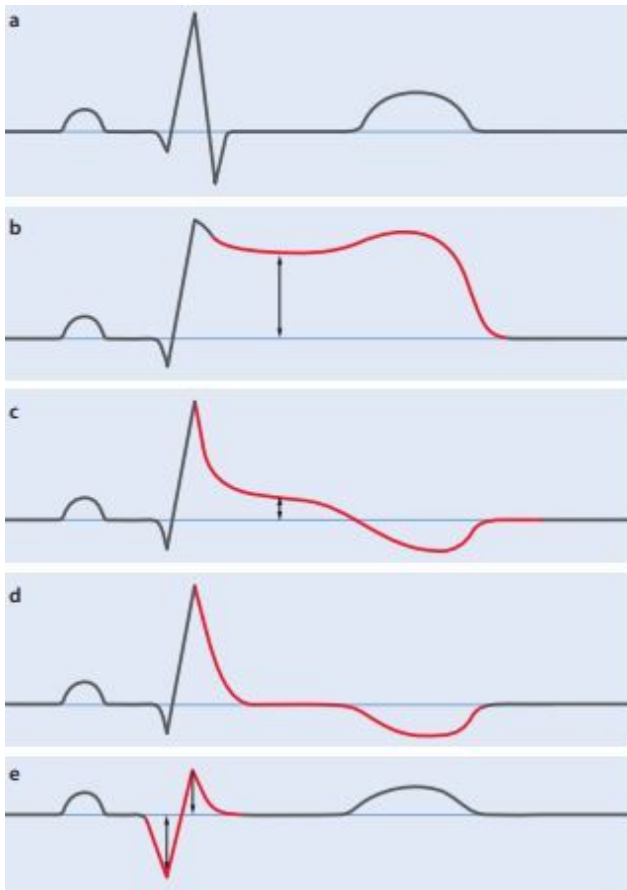
#### **1.3.4 Klinik und Diagnostik des Myokardinfarktes**

Nur ca. 40 % der Patienten zeigten in der MONICA-Studie eine typische Infarktsymptomatik (70). Typische Infarktsymptome, die durch eine Dysbalance zwischen Sauerstoffversorgung und -angebot des Myokards entstehen, sind anhaltende, retrosternale AP-Beschwerden mit Dyspnoe, ausstrahlendem Charakter in Hals, Unterkiefer und in die Schulter- und Armregion (3, 42). Bis zu 20 % der Herzinfarkte verlaufen „stumm“ oder zeigen eine unspezifische Symptomatik mit Übelkeit, Erbrechen oder Abgeschlagenheit (3). Insbesondere bei Diabetikern, älteren Patienten und Frauen zeigen sich vermehrt atypische Symptome (43, 59).

Zur Diagnostik des Myokardinfarktes gehört neben einer fokussierten Anamnese und körperlichen Untersuchung die rasche Durchführung eines 12-Kanal-EKGs (71). Diese sollte schnellstmöglich, spätestens aber innerhalb von 10 Minuten nach Erstkontakt mit dem Patienten durchgeführt werden: Bei nicht eindeutigen oder unspezifischen Befunden wird eine Reevaluation empfohlen (59).

Man unterscheidet den ST-Hebungsinfarkt (STEMI) vom Nicht-ST-Hebungsinfarkt (NSTEMI). Anhand des charakteristischen EKG-Verlaufs lassen sich verschiedene Infarktstadien des STEMI unterscheiden. Diese sind in unterschiedlichem De- und Repolarisationsverhalten von gesunden und verletzten Myokardanteilen begründet (40). Neu aufgetretene Veränderungen der ST-Strecke in zwei aufeinanderfolgenden Ableitungen in V2 und V3  $\geq 0,25$  mV bei Männern  $< 40$  Jahren,  $\geq 0,2$  mV bei Männern  $> 40$  Jahren und  $\geq 0,15$  mV bei allen Frauen, unabhängig vom Alter, und in allen übrigen Ableitungen  $\geq 0,1$  mV sind beweisend für einen STEMI (42). Ein neu aufgetretener Linksschenkelblock mit infarkttypischer Klinik ist ebenfalls als STEMI zu werten, der Patient muss in beiden Fällen schnellstmöglich einer Reperfusionstherapie zugeführt werden (42, 59).

Nur Minuten nach dem Infarktbeginn zeichnen sich akute ST-Hebungen ab, die einen akuten Verletzungsstrom des Gewebes abbilden (40). Abbildung 5 stellt die Infarktstadien im EKG in chronologischer Reihenfolge dar. Die ST-Strecke geht unmittelbar aus dem absteigenden R, dem J-Punkt, ab und verschmilzt kuppelförmig mit der T-Welle (Abbildung 5b). Stunden bis Tage nach dem Infarkt kommt es allmählich zu einer Absenkung der ST-Hebungen, einer R-Reduktion bzw. einem Verlust. Die T-Welle negativiert sich als Zeichen einer gestörten und verzögerten Repolarisation des geschädigten Myokards (Abbildung 5c). Das Folgestadium nach einigen Wochen ist charakterisiert durch wieder normale ST-Streckenverläufe, eine vergrößerte Q-Zacke und eine verkleinerte R-Zacke (Abbildung 5d). Nach Wochen bis Monaten bleibt zuletzt ein tiefes und breites Q und eine dauerhaft verkleinerte R-Zacke nachweisbar (Abbildung 5e) (40, 72). Das EKG bei einem NSTEMI kann bei über 30 % der Patienten unauffällig sein, aber auch ST-Streckensenkungen, Veränderungen der T-Welle oder vorübergehende ST-Hebungen zeigen (39).



**Abbildung 5: Infarktstadien des ST-Hebungsinfarktes im EKG**

a) stellt ein normales EKG dar. b) Die ST-Strecke geht unmittelbar aus dem aufsteigenden R ab und verschmilzt kuppelförmig mit der T-Welle (ST-Hebung). c) Nach Stunden bis Tagen senkt sich die ST-Strecke allmählich ab. Es kommt zu einer R-Reduktion bzw. einem Verlust (hier nicht abgebildet) und einer Negativierung der T-Welle. d) Nach Wochen normalisieren sich die ST-Streckenverläufe. e) Wochen bis Monate nach dem Infarkt persistieren eine tiefe Q-Zacke und eine verkleinerte R-Zacke. (Abbildung von S.Rohrbach, H.-M. Piper, aus Physiologie des Menschen, 32.Auflage, Brandes/Lang/Schmitt, 2019, S. 209 (40). Abbildung mit Genehmigung von Springer Nature)

Bei nahezu der Hälfte der Patienten ist bei Krankenhausaufnahme noch kein über die Norm erhöhtes Troponin nachweisbar (73). Die für das Troponin typische Kinetik zeigt sich je nach Sensitivität des angewendeten Assays erst nach 1 bis 3 h und korreliert mit der Ischämiezeit und der Menge des gefährdeten Myokards (73). Eine Bestimmung der herzspezifischen Serummarker sollte daher mittels hochsensitiven Immunoassays möglichst zeitnah nach Aufnahme und nach 1 bis 2 h erneut erfolgen. Eine schnellstmögliche Reperfusionstherapie darf bei starkem klinischen Verdacht auf einen STEMI und noch nicht vorliegenden laborchemischen Resultaten jedoch keinesfalls verzögert werden (42, 53, 59). Bildgebende Verfahren wie die Echokardiographie liefern bereits unmittelbar nach dem ischämischen Ereignis Hinweise auf Funktionsstörungen wie Akinesie,

regionale Wandbewegungsstörungen und linksventrikuläre Funktionsstörungen, oft noch bevor Biomarker angestiegen oder EKG-Veränderungen aufgetreten sind (39, 59, 71, 74). Zeitgleich können relevante Differentialdiagnosen wie eine Rechtsherzbelastung bei Lungenembolie, Aortenstenose oder Aortendissektion untersucht werden (74).

### **1.3.5 Komplikationen und Prognose**

Die ersten 30 Tage nach Myokardinfarkt bergen für den Patienten das höchste Risiko eines plötzlichen Herztodes (75-77). Frühkomplikationen treten gehäuft in den ersten 48 h auf. Die häufigste Todesursache sind maligne Rhythmusstörungen. Kammerflimmern stellt hierbei die häufigste Todesursache dar (78). Das Risiko für ventrikuläre Arrhythmien bleibt auch nach Erreichen der Klinik deutlich erhöht und wird vom Ausmaß des Myokardschadens, von rezidivierenden Ischämien und von Elektrolytentgleisungen beeinflusst (75). Rhythmusstörungen treten bei etwa 20 % der Patienten auf und sind mit einer schlechten Prognose assoziiert (79).

Die Entwicklung einer Herzinsuffizienz (HI), gekennzeichnet durch eine verminderte Herzauswurfleistung, gilt als der aussagekräftigste Prädiktor für eine erhöhte Mortalität. In epidemiologischen Studien zeigte sich, dass ca. 40 % der Infarktpatienten eine reduzierte LVEF aufweisen und das Mortalitätsrisiko bei einer Postinfarkt-HI um das 3 bis 4fache erhöht ist (80). Zudem haben Patienten, die bei Krankenhausaufnahme oder im Laufe des Aufenthaltes eine Herzinsuffizienz aufweisen bzw. entwickeln, ein deutlich erhöhtes Risiko für ungünstige Verläufe mit Wandruptur, Herzkreislaufstillstand, Schlaganfall, Ventrikuläre Arrhythmien, Reinfarkt oder plötzlichem Herztod (80, 81). Im Durchschnitt waren die Patienten mit HI älter, häufiger weiblich und litten unter mehr Komorbiditäten als Patienten ohne HI (81-83).

Die Natriuretischen Peptide Brain Natriuretic Peptid (BNP) und N-Terminales-pro-brain Natriuretic Peptid (NT-proBNP) besitzen eine gute Evidenz für die Diagnostik und das Therapiemonitoring der HI (84). Fortbestehend hohe Werte trotz optimaler Therapie sind mit einer schlechten Prognose assoziiert (84).

Wanamaker et al. fanden heraus, dass Patienten mit niedrigen oder nicht messbaren Troponinwerten bei Krankenhausaufnahme eine insgesamt bessere Prognose und eine geringere Mortalität über einen Beobachtungszeitraum von 6 Jahren aufwiesen. Hingegen hatten Patienten, die bereits bei Aufnahme erhöhte Troponinwerte zeigten, eine deutlich erhöhte Mortalität (73).

Spätkomplikationen wie die Ausbildung eines Herzwandaneurysmas mit Thrombenbildung, Ruptur, arterielle Embolien, Arrhythmien oder Frühperikarditis treten in der Regel erst mehr als 48 h nach einem MI auf (78). Ein Postmyokardinfarkt-Syndrom in Form einer abakteriellen Herzbeutelentzündung kann Tage bis Wochen nach dem Infarkt ereignis auftreten (78).

Verglichen mit der Gesamtbevölkerung konnte insbesondere für Diabetiker, ältere Patienten und Patienten mit fortbestehenden kardiovaskulären Risikofaktoren eine erhöhte Mortalität nachgewiesen werden (85-87).

Die Langzeitprognose ist somit u.a. abhängig von der LVEF, vom Auftreten höhergradiger Rhythmusstörungen, von der Anzahl der betroffenen Gefäße, vom Fortbestehen der Risikofaktoren und der optimalen medikamentösen Therapie. Die deutliche Verbesserung sowohl im Akut- als auch im Langzeitüberleben stehen in Zusammenhang mit verbesserten Behandlungsoptionen, erhöhter Sensibilisierung für atypischen Verläufe und intensivierter Frühbehandlung (88).

### **1.3.6 Therapie des Myokardinfarktes**

Die präklinische Therapie stellt die entscheidende Phase für Outcome und Mortalität nach einem MI dar (89). Die Verdachtsdiagnose muss innerhalb von 10 Minuten nach Erstkontakt mittels 12-Kanal-EKG gesichert werden (59). Bei nicht eindeutigen Befunden und weiterhin bestehendem klinischem Verdacht auf eine Myokardischämie muss die EKG-Diagnostik wiederholt und ggf. um weitere Ableitungen ergänzt werden (39, 59). Nach der Erstversorgung sollte der zügige Transport in eine Klinik mit Herzkatheterlabor erfolgen, in leichter Oberkörperhochlagerung und unter Defibrillationsbereitschaft (59). Ein engmaschiges Monitoring der Vitalwerte dient der schnellen Erfassung von Rhythmusstörungen und Änderungen des Patientenzustandes (78). Bei Hypertonien und rezidivierender Angina pectoris ist nach Anlage eines

Venenzugangs die Gabe von Nitraten unter Berücksichtigung der Kontraindikationen (Systole < 90 mmHg und Einnahme von Phosphodiesterase 5 (PDE5) -Inhibitoren) und bei Bedarf eine Analgesie mit Morphin i.v. indiziert. Bei erniedrigter Sauerstoffsättigung unter 90 % soll Sauerstoff verabreicht werden. Ein routinemäßige Sauerstoffgabe wird jedoch nicht empfohlen und wird sogar als schädlich erachtet (90, 91).

Darüber hinaus wird bei Diagnosestellung bereits präklinisch eine antikoagulatorische Therapie mit Heparin und einer Plättchenaggregationshemmung mit Acetylsalicylsäure (ASS) begonnen. Bei gesicherter EKG-Diagnose mit entsprechender Klinik kann in Einzelfällen, jedoch erst nach Rücksprache mit dem Herzkatheterlabor, auch eine duale Plättchenaggregationshemmung in Betracht kommen. Hierzu kommen je nach Risikoprofil des Patienten Adenosindiphosphat (ADP)-Rezeptorblocker wie Ticagrelor, Prasugrel oder Clopidogrel zur Anwendung (59).

Die Primäre Perkutane Intervention (PCI) innerhalb von 12 h nach Symptombeginn ist bei Patienten mit STEMI die Therapie der Wahl (59, 89). Innerhalb von <60 Minuten nach Diagnosestellung sollten STEMI-Patienten in einem PCI-Krankenhaus der Diagnostik zugeführt werden. Muss der Patient erst in ein PCI-Krankenhaus verlegt werden, so sollte eine Zeitspanne von <90 Minuten bis zur PCI nicht überschritten werden, da die PCI mit einer relativen Reduktion der 30-Tages-Mortalität um 37 % im Vergleich zur alleinigen innerklinischen Fibrinolyse assoziiert ist (59, 92). Hier ist die Zeitspanne von Diagnosestellung bis zum Erreichen des nächsten Herzkatheterzentrums für die weiteren Therapieschritte entscheidend. Wenn eine primäre PCI nicht in <2 h durchgeführt werden kann, ist in Einzelfällen der medikamentöse Abbau des Blutgerinnsels, die sogenannte Fibrinolyse, eine wichtige Reperfusionstrategie (59). Diese Entscheidung sollte präklinisch jedoch stets unter strenger Risiko-Nutzen-Abwägung für den Patienten und nach Rücksprache mit dem Herzkatheterzentrum erfolgen. Falls die Fibrinolyse als Reperfusionstrategie gewählt wird, so ist die Applikation des Fibrinolyse-Bolus innerhalb von 10 Minuten nach Diagnosestellung zu verabreichen. Die Wirksamkeit der Lysetherapie muss in einem Zeitfenster von 60 bis 90 Minuten reevaluiert werden



(59).

Die Koronarangiographie beim NSTEMI sollte abhängig von der Risikokonstellation des Patienten innerhalb von 2 bis 72 h nach Ereignis erfolgen, da es auch bei erfolgreicher Lyse in bis zu 25 % der Fälle zu Reokklusionen kommen kann (39). Die Zahl der frühzeitig durchgeführten PCIs ist von 1995 bis 2015 um 51 % gestiegen, was zu einer Mortalitätssenkung um ca. 11 % bei Patienten mit NSTEMI beigetragen hat (39).

Die duale Antithrombozytäre Therapie zur Prophylaxe einer Restenose nach primärer PCI und Stentimplantation besteht für 12 Monate aus einem potenten ADP-Rezeptorblocker plus ASS lebenslang (39, 59). Sogenannte Drug-Eluting-Stents (DES) verhindern durch ihre Beschichtung eine übermäßige Intimahyperplasie, was das Risiko einer In-Stent-Restenose in den letzten Jahren um ca. ein Drittel gesenkt hat (93, 94).

Die notfallmäßige Bypass-Operation kommt für Patienten mit ungünstigen anatomischen Verhältnissen, einem großen gefährdeten Myokardareal oder im kardiogenen Schock in Frage. Die nicht-notfallmäßige Bypass-Operation wird bei kardial stabilisierten Patienten nach individuellem Risiko festgelegt (59).

Insbesondere bei Patienten mit einer HI nach Infarkt ist eine intensivierete medikamentöse Therapie indiziert, um die Langzeit-Mortalität zu senken. In vielen Studien konnte der positive Effekt von Betablockern, Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE) -Hemmern, Angiotensin-II-Inhibitoren und Aldosteron-Antagonisten belegt werden. (80, 81, 83).

ACE-Hemmer und Angiotensin-II-Inhibitoren wirken antihypertensiv, schützen vor ungünstigem Remodeling des linken Ventrikels und zeigten in vielen Studien eine signifikante Reduktion der Mortalität und Morbidität (95-98).

Auch Betablocker verbessern die Mortalität nach MI mit linksventrikulärer Dysfunktion. Im Verlauf treten bis zu 25 % weniger kardiale Ereignisse auf (99). Allerdings zeigte sich dieser Benefit nicht bei Patienten im akuten Herzversagen, daher sollte die Eindosierung erst bei stabiler Hämodynamik erfolgen (100).

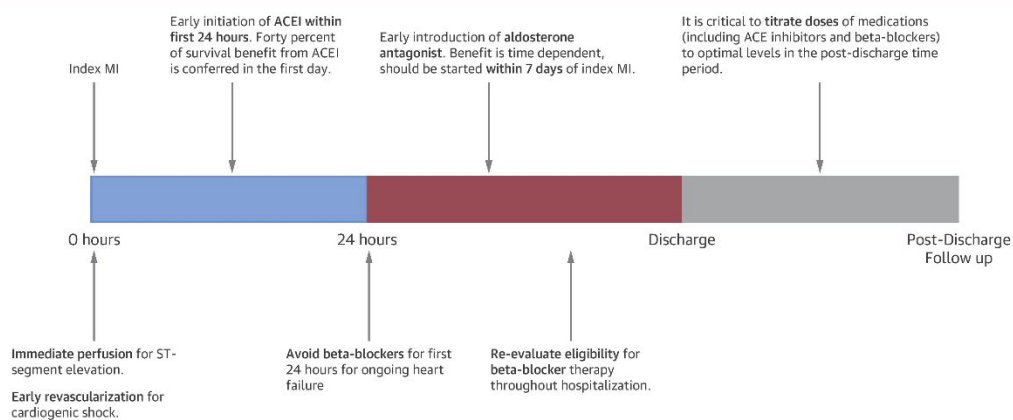
Auch die Aldosteronantagonisten Eplerenon und Spironolacton reduzieren Morbidität und Mortalität bei Patienten mit linksventrikulärer Dysfunktion und HI

(101, 102).

Alle Patienten sollten außerdem eine cholesterinsenkende Medikation mit Statinen erhalten (103). In mehreren Studien konnte die Sterblichkeitsrate um bis zu 25 % gesenkt werden. Außerdem tragen Statine nachweislich zur Plaquestabilisierung bei (104, 105).

In Abbildung 6 ist die zeitliche Abfolge der medikamentösen Herzinsuffizienz-Therapie dargestellt.

### CENTRAL ILLUSTRATION: Time-Dependent Therapies for Post-Myocardial Infarction Heart Failure



Bahit, M.C. et al. *J Am Coll Cardiol HF*. 2018;6(3):179-86.

#### Abbildung 6: Medikamentöse Therapie bei Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt

Abgebildet ist die schematische Darstellung der optimierten Herzinsuffizienz-Therapie nach einem Infarkt im zeitlichen Verlauf. Es wird empfohlen, ACE-Hemmer innerhalb der ersten 24 h zu beginnen. Betablocker sollten frühestens nach 24 h und erst nach hämodynamischer Stabilisierung des Patienten eindosiert werden. Es wird empfohlen, Aldosteronantagonisten innerhalb der ersten Wochen zu beginnen. Die medikamentöse Einstellung sollte möglichst im klinischen Setting erfolgen.

Abkürzungen: ACEI= ACE-Inhibitor, MI= Myokardinfarkt

(Abbildung aus: Post-Myocardial Heart-Failure, Bahit et al., *JACC*, Vol.6, 2018 (83). Mit Genehmigung von Elsevier)

## 1.4 Biomarker

Mit dem Ziel, die Zusammensetzung intrakoronarer Thromben genauer zu untersuchen, wurden für diese Arbeit die im Folgenden molekularen Marker für immunhistochemische Färbungen ausgewählt.

### 1.4.1 Macrophage Migration-Inhibitory-Factor

Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) ist ein proinflammatorisches Zytokin, das in den 1960er Jahren erstmals beschrieben und in der Zwischenzeit vielfach erforscht wurde (106-110). MIF moduliert die Funktion von Makrophagen

und T-Zellen und spielt in der Regulation der angeborenen Immunantwort auf Infektionen eine große Rolle. Insbesondere in der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen nimmt MIF eine Schlüsselfunktion ein (108). Die dadurch hervorgerufene Immunreaktion unterstützt die Entwicklung und Verschlechterung inflammatorischer Krankheitsbilder wie der Sepsis und einer Reihe autoimmunologischer Erkrankungen (107).

Es wird in der Hypophyse produziert und von verschiedenen Immun- und endokrinen Zellen exprimiert. Auch in epithelialen Grenzgeweben wie Lunge, Haut und Gastrointestinaltrakt, welche in direktem immunologischem Kontakt mit der Umwelt stehen, wurde MIF nachgewiesen. Dies unterstreicht die wichtige Rolle des Zytokins bei der körpereigenen Immunantwort auf Infektionen und Stress (107).

MIF reguliert die Expression des Toll-like-Rezeptors 4 (TLR4), einem Signalmolekül des Rezeptorkomplexes für die Erkennung von Bakterien, von Makrophagen hoch. Nach Exposition mit mikrobiellen Produkten wie LPS oder proinflammatorischen Zytokinen wie TNF und Interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) kommt es zu einer schnellen Freisetzung von MIF durch Makrophagen (106, 107). Nachdem MIF ins Gewebe oder in die Blutbahn sezerniert wurde, wirkt es proinflammatorisch und fördert die Immunantwort durch Aktivierung von Makrophagen und T-Zellen.

In einer Pilotstudie von Müller et al. wurden in ACS-Patienten signifikant höhere MIF-Plasmaspiegel als in Patienten mit stabiler KHK und gesunden Probanden nachgewiesen (109, 110). Erhöhte MIF-Werte waren mit erhöhten Entzündungsparametern wie CRP und IL-6 assoziiert und korrelierten mit der Freisetzung von Troponin I (110). Erhöhte MIF-Werte waren zudem mit höheren Monozytenzahlen assoziiert. Patienten mit angiographisch nachgewiesenen Plaquerupturen wiesen interessanterweise gegenüber Patienten mit ACS aufgrund flusslimitierender Stenosen signifikant höhere MIF-Spiegel auf. Dies deutet auf eine wichtige Rolle dieses Zytokins bei der Plaquentstehung und -destabilisierung hin.

Die Analyse intrakoronarer Thromben von Patienten nach MI ist daher hinsichtlich der Expression von MIF ein wichtiges Ziel dieser Arbeit.

### **1.4.2 Gremlin1**

Gremlin1 (Grem1) ist ein endogener Antagonist von MIF (111, 112). Immunhistochemische in vitro-Studien wiesen eine starke Expression von Grem1 in Monozyten und Makrophagen in atherosklerotischen Plaques nach (112).

Müller et al. lieferten interessante Hinweise auf Interaktionen von Grem1. In ihrer Studie hemmte Grem1 die MIF-induzierte Ausschüttung des Zytokins TNF- $\alpha$  aus Makrophagen, indem es mit hoher Affinität an MIF bindet (111, 112). Im Tiermodell schwächt Grem1 das Voranschreiten atherosklerotischer Gefäßveränderungen ab, indem es die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen hemmt und die Cholesterolaufnahme von Makrophagen reduziert (111).

In einer weiteren klinischen Studie von Müller et al. wiesen Patienten mit ACS im Vergleich zu gesunden Probanden und Patienten mit stabiler AP die jeweils höchsten Plasmaspiegel an Grem1 und MIF auf. Das Verhältnis von Grem1 zu MIF zeigte sich hierbei in der Gruppe der ACS-Patienten am niedrigsten. Dieser Quotient aus Grem1/MIF war mit dem Auftreten eines ACS assoziiert und korrelierte mit der Thrombuslast (109). Diese Ergebnisse legen eine neutralisierende Wirkung von Grem1 gegenüber dem proinflammatorischen und prothrombotisch wirkenden MIF bei KHK-Patienten nahe. Eine Dysbalance zwischen Grem1 und MIF steht im Verdacht eine Plaquevulnerabilität und somit den Übergang in ein ACS zu begünstigen.

Aufgrund dieser bereits nachgewiesenen Effekte des Proteins war es für die vorliegende Arbeit von Interesse, ob Grem1 in intrakoronaren Thromben exprimiert wird.

### **1.4.3 Transforming-Growth-Factor $\beta$ 1**

Die Mitglieder der Transforming-Growth-Factor  $\beta$  (TGF $\beta$ )-Familie vermitteln viele Zell-Zell-Interaktionen während der kardialen Embryonalentwicklung und spielen bei der Zelldifferenzierung, bei Inflammations- und Reparaturvorgängen eine entscheidende Rolle (113, 114).

TGF $\beta$ 1 ist in der extrazellulären Matrix lokalisiert (115). Es erfüllt wichtige Funktionen im Rahmen der Inflammation und der Angiogenese. Es reguliert die Entstehung von Granulationsgewebe, wirkt beim Remodeling der

Extrazellulärmatrix mit und ist essentiell an der Reepithelialisierung von Wunden beteiligt (116). Neben vielen anderen Mediatoren wird TGF $\beta$  von Makrophagen sezerniert und fördert die Produktion extrazellulärer Matrixkomponenten durch die Aktivierung von Fibroblasten (117). Aktivierte Fibroblasten wiederum produzieren große Mengen Extrazellulärmatrix und Proteine, die den Ab- und Umbau der extrazellulären Matrix steuern (118). Neben der bedeutenden Funktion bei der Wundheilung kann die ungehemmte Aktivierung und Akkumulation von Fibroblasten auch zu gegenteiliger Wirkung führen. Ist das Gewebe über einen längeren Zeitraum entzündlichen Bedingungen ausgesetzt, so kann es zur Entwicklung einer Gewebsfibrose kommen (118, 119). Diese profibrotischen Effekte von TGF $\beta$  werden durch Wechselwirkungen mit anderen Signalwegen und durch epigenetische Veränderungen positiv und negativ reguliert (119).

Die Aktivierung des TGF $\beta$ -Signalwegs in Folge eines Myokardinfarktes scheint einen regulierenden Einfluss auf den entstandenen Myokardschaden, die ablaufenden inflammatorischen Prozesse und die Reparationsvorgänge auszuüben (60, 114). Obwohl eine Narbenbildung das Herz zunächst vor frühen Komplikation wie einer Ruptur schützt, so ist Infarktheilung auch eng mit ungünstigen kardialen Umbauvorgängen verknüpft, die zu einer Dilatation und Dysfunktion führen können (114). Die Hochregulation von TGF $\beta$  nach einem Myokardinfarkt ist im Tiermodell vielfach erforscht worden (120). Dabei konnte gezeigt werden, dass TGF $\beta$  sowohl im intra- als auch im extrazellulären Raum vorhanden ist. Starke immunhistochemische Färbungen wurden außer in der Nebennierenrinde auch in Megakaryozyten, anderen Zellen des Knochenmarks und in Kardiomyozyten und Makrophagen gefunden (120). Auch in anderen Studien ist TGF $\beta$  vorwiegend in Kardiomyozyten oder in der extrazellulären Matrix nachgewiesen worden (114).

Für diese Arbeit war es vor allem von Interesse, ob TGF $\beta$  außerhalb von Kardiomyozyten in organisierten koronararteriellen Thromben vorkommt und ob es einen Zusammenhang mit der fibrotischen Umstrukturierung von Thromben gibt.

#### **1.4.4 CD105 (Endoglin)**

CD105, auch als Endoglin bekannt, ist ein Oberflächenprotein und ein Co-Rezeptor des TGF $\beta$ -Rezeptor-Komplexes. Es bindet verschiedene Mitglieder der TGF $\beta$ -Familie, darunter TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 3, Aktivin-A und verschiedene Bone Morphogenetic Proteins (BNP) wie BMP-2, BMP-7 und BMP-9 (121, 122). Dieser Komplex aus Rezeptor und TGF $\beta$ -Ligand ist in viele physiologische und pathologische zelluläre Differenzierungsschritte involviert (118, 122).

In niedrigen Konzentrationen wird es von ruhenden Endothelzellen exprimiert. Eine starke Expression zeigt sich hingegen in vaskulären Endothelzellen bei der Angiogenese von Tumorgefäßen, in entzündetem Gewebe, bei Gefäßverletzungen und während der Embryogenese (122, 123). CD105 ist ein spezifischer Marker für proliferierende Endothelzellen. In verschiedenen Malignomen wird Endoglin in peri- und intratumoralen Gefäßen exprimiert. Sein Vorkommen in soliden Tumoren ist für das Patienten-Outcome von hohem prognostischem Wert und mit einer erhöhten Mortalität assoziiert (122). Auch nach einer Ischämie der Nieren und des Herzens wird Endoglin in Endothelzellen überexprimiert. Aus in vitro- und in vivo-Versuchen im Mausmodell ist bekannt, dass Hypoxie die Transkription bestimmter Gene induziert. Diese Gene regulieren unter anderem Immunzellen, die bei gesteigerter Transkription wiederum vermehrt CD105 exprimieren (124). So exprimieren Monozyten während deren Differenzierung zu Makrophagen CD105 (118). Eine Überexpression findet auch in vaskulären glatten Muskelzellen von atherosklerotischen Plaques statt, während in normalen glatten Muskelzellen keine erhöhte Expression nachgewiesen werden konnte. In kardialen Fibroblasten fördert die erhöhte Expression von CD105 die profibrogene Wirkung von Angiotensin II. Auch andere Gewebe, die fibrotische Veränderungen durchlaufen, zeigen eine CD105-Überexpression (118, 123). Allerdings bestehen über die pro- oder antifibrotischen Mechanismen des Proteins bisher keine wissenschaftlich eindeutigen Erkenntnisse, so dass aktuell davon ausgegangen wird, dass die unterschiedliche Wirkung zell- oder gewebespezifisch ist (118).

Die Funktionen von CD105 sind vielfältig und komplex. Seine Beteiligung bei diversen inflammatorischen Vorgängen, sowohl bei der Aktivierung und

Differenzierung von Monozyten als auch das Vorkommen in atherosklerotischen Plaques und seine Beteiligung am fibrotischen Gewebsumbau, werfen die Frage nach der Expression von CD105 in koronararteriellen Thromben nach einem ischämischen Myokardinfarkt auf.

#### **1.4.5 CD14**

CD14 ist ein Protein, das auf der Zelloberfläche von Monozyten und Makrophagen exprimiert wird. Es fungiert zusammen mit dem TLR4-Rezeptor als Co-Rezeptor für die Erkennung von LPS in der Membran von gramnegativen Bakterien. Die Bindung von LPS führt durch eine Sekretion von Mediatoren und Zytokinen aus Makrophagen und Monozyten zu einer Aktivierung und Verstärkung der angeborenen Immunabwehr (125, 126).

Verschiedene Monozyten-Subtypen charakterisieren sich durch unterschiedliche Oberflächenmuster. Der mit 90 % weitaus größte Teil von ihnen gehört zu den sogenannten klassischen Monozyten und exprimiert CD14 (41, 63). Deshalb wurde CD14 in dieser Arbeit als Zellmarker für Monozyten und Makrophagen verwendet.

#### **1.4.6 CD68**

CD68 ist ein transmembranöses Glykoprotein, das in zytoplasmatischen Granula und im Zytoplasma von verschiedenen Geweben nichthämatopoetischen Ursprungs, wie Leber und Niere, zu finden ist. Auch auf der Zelloberfläche von Makrophagen, Monozyten sowie neutrophilen und basophilen Granulozyten und auf großen Lymphozyten ist es nachweisbar (127).

In der Immunhistochemie wird CD68 als Zellmarker für Makrophagen verwendet.

#### **1.4.7 CD42b**

CD42b, auch als Glycoprotein Ib  $\alpha$  (GPIb  $\alpha$ ) bekannt, ist ein Oberflächenmembranprotein von Thrombozyten, das aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten besteht. Der Komplex aus CD42a und CD42b dient im Endothel als Rezeptor für den Von-Willebrand-Faktor (vWF) und ist ein Hauptbestandteil der Oberfläche von Thrombozyten und Megakaryozyten (128). Daher wurde es für diese Arbeit als immunhistochemischer Marker für Thrombozyten ausgewählt.

#### **1.4.8 S100A4**

S100A4, oder auch als Fibroblast-specific protein (FSP1) bezeichnet, wird sowohl von normalen Bindegewebszellen, als auch von Tumorzellen sezerniert. In den letzten Jahren gewann es in der molekularen Tumorforschung zunehmend an Bedeutung, da es bei verschiedensten Tumorarten die Neovaskularisation fördert und so zum Tumorwachstum beiträgt (129, 130). Eine Überexpression von S100A4 scheint bei einigen Tumorarten mit einer schlechteren Prognose und einem hohen Metastasierungsrisiko einherzugehen (129).

Darüber hinaus spielt S100A4 bei vielen pathologischen Prozessen von nicht-onkologischen Erkrankungen, wie beispielsweise der Gewebsfibrose, eine wichtige Rolle (131). Außer von Tumorzellen wird S100A4 auch von Fibroblasten, Makrophagen, Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten exprimiert. S100A4 verbessert die Beweglichkeit von Makrophagen, Neutrophilen und Leukozyten und fördert die Rekrutierung und Chemotaxis dieser inflammatorischen Zellen zur Regulierung der Inflammation (131).

S100A4 gilt als spezifischer Fibroblasten-Marker. Es stimuliert Fibroblasten zur Sekretion von Fibronectin und Kollagen, bildet so die Strukturkomponenten der Extrazellulärmatrix und fördert deren Ablagerung im Gewebe (131).

Für diese Arbeit wurde S100A4 zur immunhistochemischen Färbung von Fibroblasten und fibrotischen Anteilen innerhalb der koronaren Thromben verwendet.

Neuere Forschungsergebnisse deuten außerdem auf eine relevante kardioprotektive Funktion von S100A4 im ischämiegeschädigten Myokard hin. Diese Überexpression scheint das Myokard nach einem Infarkt zu schützen und die Pumpfunktion zu verbessern (132).

### **1.5 Zielsetzung**

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen mit etwa einem Drittel die weltweit führende Todesursache dar (1-3). Somit tragen sie nicht nur in großem Umfang zur Morbidität und Mortalität der Bevölkerung bei, sondern verursachen auch erhebliche Kosten im Gesundheitswesen (133). Aller Voraussicht nach wird die zunehmende Alterung der Bevölkerung zu einem weiteren Anstieg



kardiovaskulärer Erkrankungen führen (134).

Aus zahlreichen Studien ist bekannt, dass Inflammation eine entscheidende Rolle bei der Bildung und Auflösung von venösen Thromben spielt (135-137). Auch in der Entstehung und Progression der Atherosklerose sowie der Destabilisierung von Plaques haben Entzündungszellen und ihre Chemokine entscheidenden Einfluss (31-33). Über die Entstehung koronarer Thromben ist hingegen vergleichsweise wenig bekannt (138). Bereits viele Jahre bevor es zum thrombotischen Verschluss einer Koronararterie kommt, beginnen pathologische Prozesse in Form von Risikofaktoren auf das noch intakte Endothel einzuwirken (20-22). Die daraus resultierende endotheliale Dysfunktion ist prinzipiell noch reversibel, wenn die auslösenden Faktoren rechtzeitig beseitigt werden. Anhaltende inflammatorische Vorgänge können Plaquebildung und im Verlauf Plaqueruptur und Thrombose zur Folge haben (1, 35).

Das Ziel dieser Arbeit ist es daher, die koronararterielle Thrombusentstehung, die Zusammensetzung und das Alter intrakoronarer Thromben hinsichtlich inflammatorischer Vorgänge zu analysieren.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Allgemeine Materialien

**Tabelle 1: Geräte**

Stoppuhr (Carl Roth GmbH+Co.KG, Modell Nr. TR118)
pH-Meter (HANNA-Instruments, Art.-Nr. AHI9124)
Magnetrührer (IKAMAG®RET-GS)
Mikrowelle (Severin, Art.-Nr. MW 7809)
Vortexer (IKA®MS 3 basic, Ident-Nr. 0003617000)
Waage (Denver Instruments)
Wasseraufbereitungsanlage (Thermo Scientific TKA Genpure)
Pipetten (Eppendorf)
Plattformschüttler (Heidolph)
Mikroskop (Nikon Optishot-2)
Kamera (Nikon Digital Sight DS-U1)
Sterilbank (Thermo Electron Corporation, HERAsafe HS18)

**Tabelle 2: Allgemeine Verbrauchsmaterialien**

SuperFrost®Plus Objektträger (R.Langenbrinck)
Ethanol 99 % vergällt mit MEK (v/v) (liquid production GmbH)
Aqua dest.
PBS-Tablets (Gibco)
ROTI®Histol (Carl Roth, Art-Nr. 6640.1)
ROTI®Histokitt (Carl Roth, Art.-Nr. 6638.2)
Pipetten weich (Ratiolab, Art.Nr. 2600131)
Fettstift (Science Services Circle Writer Liquid Blocker)
Cellstar®Tubes 50 ml (Greiner bio-one)
Safe-Lock Tubes 0,5 ml (Eppendorf, Art.-Nr. 0030121023)
Safe-Lock Tubes 1,5 ml (Eppendorf, Art.-Nr. 0030120086)
Duran®Laborflaschen, 500ml, 1000ml (DURAN Group GmbH, Art.-Nr. 218014459, 218015455)
Pipettenspitzen 200µl (SARSTEDT)

Pipettenspitzen Blau 1000 µl (Ratiolab)
Pipettenspitzen, 10µl, farblos (Biozym Scientific GmbH)
Deckgläser 24x50 mm Stärke 0,13-0,16mm (R.Langenbrinck, Art.-Nr. 01-2450/1)
Deckgläser 24x60mm Stärke 0,13-0,16mm (R.Langenbrinck, Art.-Nr. 01-2460/1)
Deckgläser 24x40mm (Menzel-Gläser, Art.-Nr. BB024040A1)

**Tabelle 3: Zusätzliche Verbrauchsmaterialien zur Fixierung der Thromben**

Steriles Skalpell (Pfm medical Art.-Nr. 200130023)
Pasteur-Plast Pipetten, 2,0 ml, graduert, sterilisiert (Ratiolab®, Bestellnr. 2655135)
Paraformaldehyd (Merck, Art.-Nr. 818715)
Gewebeeinbettungsmedium (Paraplast Plus®, Roth, Bestellnr. X881.2), Roth

**Tabelle 4: Reagenzien zur Herstellung des Schaumzellmediums**

500 ml RPMI 1640 Medium (Gibco)
+ 5 ml Penicillin/Streptomycin 1 % (Gibco)
+ 5 ml MEM Non-Essential Amino Acids Solution 1 % (100X) (Gibco)
+ 5 ml Natriumpyruvat 1 % (Gibco)
+ 5 ml L-Glutamin 1 % (Gibco)
+ 100 ml humanes Serum 20 % (aus hausinterner Blutbank)

**Tabelle 5: zusätzliche Verbrauchsmaterialien für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Mayers Hämalaun-Lösung (Merck, Art.-Nr. 1092490500, Verdünnung 1:5)
Eosin G 50g (Carl Roth, Art.-Nr. 7089.1)

**Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien und Reagenzien für immunhistochemische Färbungen**

Tween®20 for synthesis (Merck, Art.-Nr. 8221840500)
Citrat acid (SIGMA ALDRICH, Art.-Nr. 251275)
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (AppliChem, APA3901.1000)
AnalaR NORMAPUR Methanol 2,5l (VWR Chemicals, 20.847.307)
Albumin Fraction V (pH 7) (AppliChem, APA1391.0250)
Protein Block serum Free (Dako)
Hydrogen peroxid 30 % (EMSURE, 1072092500)
Streptavidin HRP (Dako, P0397)
Liquid DAB + Substrate Chromogen System (Dako, K3468)
Mayers Hämalaunlösung (Merck, Art.-Nr. 1092490500)

**Tabelle 7: Die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper und durchgeführte Kontrollen**

<b>Primärantikörper</b>	<b>Hersteller, Art.Nr.</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>IgG-Kontrolle</b>	<b>Biotinylierter Sekundärantikörper Verdünnung 1:300</b>
<b>Gremlin1</b> polyclonal rabbit AK 0,5 mg/ml	Abnova, PAB14845	1:40	Rabbit 15 mg/ml, X0936 von Dako	Polyclonal Goat-anti- Rabbit IgG, E 0432 von Dako
<b>MIF(N18)</b> polyclonal goat IgG 0,2 mg/ml	Santa Cruz, sc-48241	1:100	Goat I 5000 von Vector	Polyclonal Rabbit-anti- Goat IgG, E0466 von Dako
<b>TGFβ1</b> polyconal Goat IgG 0,2 mg/ml	Santa Cruz, sc-146-g	1:50	Goat I 5000 von Vektor	Polyclonal Rabbit-anti- Goat IgG, E0466 von Dako
<b>CD105 (H300)</b> polyconal rabbit IgG 0,2 mg/ml	Santa Cruz, sc-20632	1:25	Rabbit 15 mg/ml, X0936 von Dako	Polyclonal Goat-anti- Rabbit IgG E 0432 von Dako
<b>CD42b (C20)</b> polyclonal goat IgG 0,2 mg/ml	Santa Cruz, sc-7070	1:100	Goat I 5000 von Vector	Polyclonal Rabbit-anti- Goat IgG, E0466 von Dako
<b>CD68 (KP1)</b> Monoclonal mouse IgG 0,2 mg/ml	Santa Cruz, sc-20060	1:200	Mouse sc-2025 200 µg/0,5 ml	Polyclonal Rabbit-anti- Mouse E0464 von Dako
<b>S100A4</b> polyclonal Goat-IgG 0,5 mg/ml	Biorbyt, orb19362	1:800	Goat I 5000 von Vector	Polyclonal Rabbit-anti- Goat -IgG, E0466 von Dako
<b>CD14</b> Polyclonal goat IgG 0,5 mg/ml	Biorbyt, orb19177	1:50	Goat I 5000 von Vector	Polyclonal Rabbit-anti- Goat IgG, E0466 von Dako

## 2.2 Das Patientenkollektiv

Die Studie wurde im Einklang mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Vor Studienbeginn lag das Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen vor (Ethik-Nummer 474/2014 BO2). Alle Studienteilnehmer gaben ihre schriftliche Einverständniserklärung zur Teilnahme an der Studie.

In der Zeit zwischen 2012 und 2015 wurden am Universitätsklinikum Tübingen 27 intrakoronare Thromben von Patienten mit Myokardinfarkt mittels Aspiration in der Herzkatheteruntersuchung gewonnen. Die Diagnose eines STEMI oder eines NSTEMI wurde nach klinischer Präsentation, Veränderungen im EKG und

Erhöhung des Troponinwertes gestellt.

Neben der Thrombenaspiration und der morphologischen und immunhistochemischen Aufarbeitung der gewonnenen intrakoronaren Thromben wurden klinische Daten der Patienten zum Zeitpunkt des Myokardinfarktes erhoben. Diese umfassten neben allgemeinen Daten wie Geschlecht, Alter und Body Mass Index (BMI) auch Laborparameter wie Hämoglobinwert (Hb), Leukozyten- und Thrombozytenzahl, CRP, Troponin, Creatinkinase (CK), Gerinnungsparameter, Blutfettwerte und HbA1c. Auch echokardiographische Untersuchungen wie die EF als Parameter für die Pumpfunktion des Herzens sowie vorbestehende Begleiterkrankungen, kardiovaskuläre Risikofaktoren und relevante Medikation bei Aufnahme wurden erhoben. Anhand der Ergebnisse der Herzkatheteruntersuchung fand eine Einteilung nach Schweregrad der betroffenen Herzkranzgefäße statt (Ein-, Zwei- oder Drei-Gefäß-Erkrankung). Außerdem wurde der Beginn der klinischen Symptomatik und der Zeitraum bis zur Intervention und Thrombusaspiration (im Weiteren als „symptom-to-balloon time“ bezeichnet) ermittelt, um so das Thrombenalter bestimmen zu können.

### **2.3 Bestimmung des Thrombenalters**

Um den ungefähren Zeitpunkt des akuten Schmerzereignisses, und somit den Beginn des okklusiven Gefäßverschlusses, zu bestimmen, wurde die Zeit des akuten Schmerzereignisses im Patientenaktenarchiv recherchiert. Es erfolgte eine eingehende Recherche nach Aufnahmeanamnese, Einweisungsunterlagen des Hausarztes und Notarztprotokollen. Es stellte sich heraus, dass der Zeitpunkt der Rekanalisation im digitalen Dokumentationssystem des Herzkatheterlabors genau festgehalten war. Der akute Schmerzbeginn war hingegen bei 32 % der Patienten zeitlich nicht eindeutig eruierbar. Daher wurde im nächsten Schritt versucht, diesen teils ungenauen Okklusionsbeginn mittels weiterer klinischer Parameter genauer einzugrenzen. Anhand der zusätzlichen Kriterien der Dynamik des Troponinverlaufs, der Beurteilung des EKGs und der bereits bekannten „symptom-to-balloon time“ wurden vordefinierte Thrombenalter-Gruppen gebildet (0-6 h, 7-24 h und >24 h) und die einzelnen Thromben anhand der genannten Kriterien zugeordnet. Hierzu wurde eine genauere Analyse der EKGs der Patienten mit STEMI durchgeführt und neben dem Bild eines akuten

STEMIs ein subakuter Verlauf unterschieden. Dieser subakute Verlauf zeigt im Gegensatz zu einem akuten STEMI einen Verlust der R-Zacke mit noch bestehenden Hebungen aus der aufsteigenden S-Zacke, eine zunehmende Absenkung der ST-Strecke oder auch eine T-Negativierung. Dieser subakute Verlauf ist als Zwischenstadium zwischen einem akuten und einem alten Infarkt einzuordnen. Eine allmähliche Absenkung der ST-Hebungen und ein zunehmender R-Verlust sind Zeichen der gestörten und verzögerten Repolarisation des geschädigten Myokards (40). Die EKG-Veränderungen bei einem NSTEMI wurden hingegen als unauffällig und unspezifisch beschrieben.

## **2.4 Gewinnung und Vorbereitung der Thromben für die Färbungen**

Nach der Aspiration wurden die Thromben in ein 2 ml-Röhrchen mit 1,5 ml Schaumzellmedium (Herstellung siehe Tabelle 4) gebracht und bei Ankunft im Labor mit einem sterilen Skalpell halbiert. Die eine Hälfte wurde im Verlauf für durchflusszytometrische Analysen aufbereitet, die jedoch nicht Bestandteil dieser Arbeit waren. Die andere Hälfte wurde zur Entwässerung in 4%iges Paraformaldehyd (PFA) gegeben. Die Entwässerung erfolgte in folgenden Schritten: zunächst 2,5 h in Formalin, anschließend 1 h in 70%igem Isopropanol. Über Nacht wurden die Thromben in 80%igem Isopropanol gelagert. Am folgenden Tag setzte sich die Entwässerung für 1 h in 95%igem Isopropanol, dann zweimal jeweils 1 h in 100%igem Isopropanol und zweimal 1 h in ROTI®Histol fort. Zuletzt wurden die Thromben 2 h in Paraffin gebadet. Nachdem die Thromben für ca. 24 h bei Raumtemperatur entwässert worden waren, wurden sie in Paraffin eingebettet, mit dem Mikrotom in 4 µm-dünne Scheiben geschnitten und für die folgenden Färbungen auf einen Objektträger aufgebracht.

## **2.5 Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung ist eine weit verbreitete Färbemethode für morphologische Untersuchungen und dient der Unterscheidung verschiedener Gewebestrukturen. Bei der Färbung mit Hämatoxylin-Eosin nach Mayer nehmen Zellkerne eine dunkelblaue bis dunkelviolette Farbe an, wodurch diese von verschieden blass bis kräftig rot- und orange gefärbtem Fasergeflecht des

Bindegewebes differenziert werden können. Zellplasma stellt sich rosa bis rot dar, Erythrozyten hingegen mehr orangefarben (139).

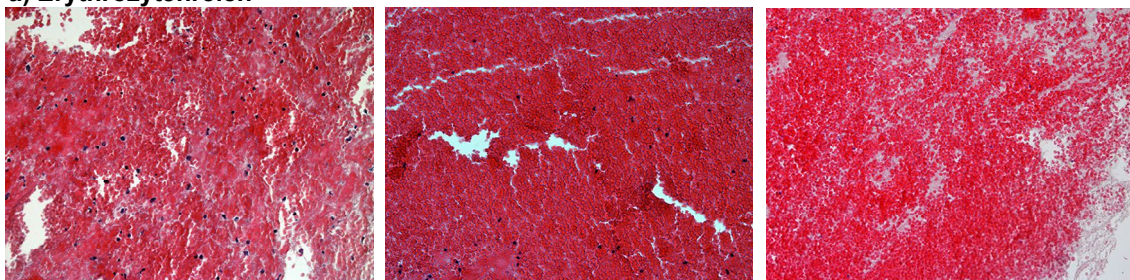
Die Schnitte wurden zunächst in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert, um sie für die folgenden Färbungen zurück in ein wässriges Milieu zu überführen. Hierzu wurden sie zunächst zweimal 10 Minuten in ROTI®Histol gebadet. Im Anschluss wurden sie der Reihe nach jeweils 5 Minuten in 100%, 96%, 90%, 80% und 70%igem Isopropanol eingelegt. Anschließend wurden die Schnitte 5 Minuten in destilliertem Wasser (Aqua dest.) gebadet. Es folgte der erste fünfminütige Färbeschritt in Mayers-Hämalaun. Nach kurzem Ausspülen unter Leitungswasser wurden die Schnitte 15 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Danach wurde der zweite Schritt der Färbung durchgeführt. Die Schnitte wurden 3 Minuten in 1%igem Eosin gefärbt. Nach erneutem kurzen Auswaschen in Aqua dest. wurden die Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe entwässert. Anschließend wurden sie 3 Minuten zum Entwachsen in ROTI®Histol getaucht. Im letzten Schritt wurden sie zum Schutz vor Ausbleichung mit dem Einschlussmittel ROTI®-Histokitt eingedeckt und konnten nach kurzer Trockenzeit mikroskopiert werden.

Die Schnitte wurden unter dem Mikroskop Optishot 2 von Nikon mit Hilfe der Software NIS Elements BR 3.2 von Nikon in 10-, 20- und 40-facher Vergrößerung fotografiert. Anhand der sich darstellenden Morphologie erfolgte die Einteilung in verschiedene Gruppen: vorwiegend erythrozytenreiche, vorwiegend zellreiche (kernhaltige), vorwiegend fibrotische und vorwiegend gemischte Thromben. Ausschlaggebend für die Gruppenzuordnung war der dominierende histologische Eindruck bei der mikroskopischen Betrachtung.

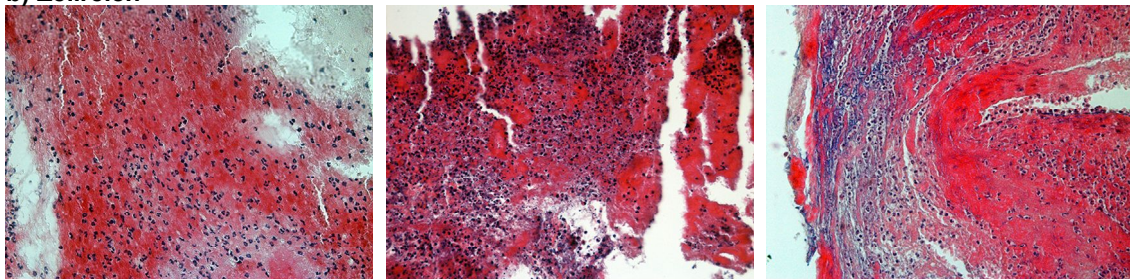
Exemplarische HE-Färbungen der unterschiedlichen Morphologien sind in Abbildung 7 abgebildet. Bei den jüngeren erythrozytenreichen Thromben zeigt sich zwischen teils einzelnen violett gefärbten Zellkernen ein weitestgehend flächiges Bild rot bis orangerot gefärbter Erythrozyten. Auch Thrombozyten in geringerer, nicht dominierender Anzahl sind nachweisbar (Abbildung 7a). Zellreiche Thromben zeigen viele violett-blau gefärbte Zellkerne von unterschiedlichen Immunzellen, umgeben von einer rot-orange gefärbten Matrix aus Erythrozyten und hellrot gefärbtem Zellplasma (Abbildung 7b). Unter den

noch älteren amorph-fibrotischen Thromben sieht man eine vermehrte Vakuolisierung des Zytoplasmas. Diese ist in hellen weiß-rosa Bereichen um die Zellkerne sowie einer angedeutete Verdichtung und Fragmentierung einzelner Zellkerne erkennbar. Sie sind von stark rot gefärbten straßenartig verlaufenden Bindegewebigen Fasergeflechten umgeben (Abbildung 7c). Bei den bereits organisierten Thromben gemischter Morphologie sind sowohl zellreiche Areale, als auch rot-orangefarbene Bereiche mit Erythrozyten und hellrosafarbene Bindegewebsstränge zu erkennen (Abbildung 7d).

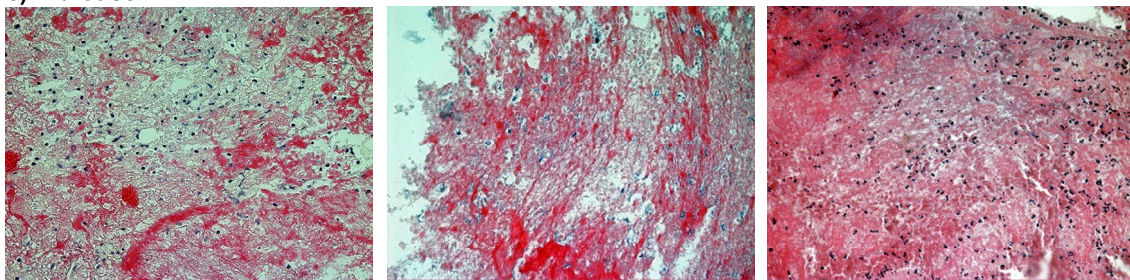
**a) Erythrozytenreich**



**b) Zellreich**



**c) Fibrotisch**



**d) Gemischt**

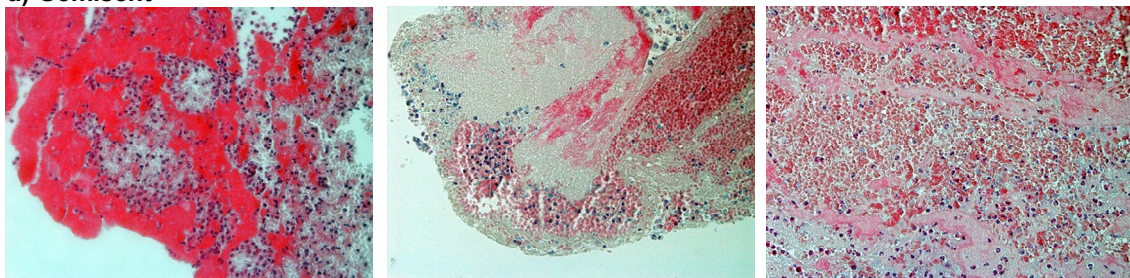


Abbildung 7: Hämatoxylin-Eosin-Färbungen von Thromben unterschiedlicher Morphologie



Die Abbildungen zeigen exemplarische HE-Färbungen unterschiedlich alter Thromben in der 20-fachen Vergrößerung: a) erythrozytenreiche Thromben: weitestgehend flächiges Bild rot bis orangerot gefärbter Erythrozyten. b) zellreiche Thromben: deutlich violett-blau gefärbte Zellkerne, umgeben von einer rot-orange gefärbten Matrix aus Erythrozyten. c) amorph-fibrotische Thromben: vermehrte Vakuolisierung, Verdichtung und Fragmentierung einzelner Zellkerne. d) gemischte Thromben zeigen erythrozytenreiche, zellreiche und bindegewebsreiche Areale (Mikroskop: Optishot 2 von Nikon, Software NIS Elements BR 3.2 von Nikon).

## 2.6 Immunhistochemische Färbungen

### 2.6.1 Prinzip der Immunhistochemie und Durchführung

Das Prinzip der Immunhistochemie beruht auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion und ermöglicht den Nachweis von Antigenen in Gewebeschnitten. Dieser Nachweis beruht auf dem Bindungsvermögen eines bestimmten Antikörpers (AK) zu einer bestimmten Bindungsstelle des Antigens, dem sogenannten Epitop. Nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip kommt es zu einer spezifischen Bindung zwischen AK und Epitop. Diese Bindung kann mit Hilfe eines Detektionssystems sichtbar gemacht werden (140).

Prinzipiell unterscheidet man zwei verschiedene Detektionsmethoden: Bei der direkten Methode bindet ein markierter AK das Antigen und wird so auf direkte Weise nachgewiesen. Bei direkt markierten AKs kann es jedoch auch zur Anbindung der Marker im antigenbindenden Bereich oder in der Nähe kommen, wodurch die Antigenbindung behindert werden kann. Im Gegensatz zu unmarkierten AKs weisen markierte AKs deshalb eine schwächere Bindungsaffinität auf. Bei der indirekten Methode bindet ein nicht markierter Primär-AK das Antigen und ein zweiter, markierter Sekundär-AK bindet wiederum den Primär-AK, wodurch dieser sichtbar gemacht wird.

Für diese Arbeit wurde die indirekte Nachweismethode mittels biotinylierter Sekundär-AK gewählt. Biotin zeigt eine sehr starke Affinität zu Avidin und Streptavidin. Avidin ist ein aus vier identischen Untereinheiten bestehendes Glycoprotein aus dem Hühnereiweiß, an das jeweils ein Biotinmolekül binden kann. Streptavidin ist ein Protein bakteriellen Ursprungs und verfügt über dem Avidin ähnliche Eigenschaften. Das Biotinmolekül ist dabei so klein, dass es die Funktion von Avidin und Streptavidin nicht beeinträchtigt. Dieses Vorgehen wird als die Avidin-Biotin-Complex (ABC)-Methode bezeichnet. Diese Makromoleküle, bestehend aus einem Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplex, binden an den biotinylierten Sekundär-AK. Dies hat zur Folge, dass eine größere Anzahl von

Peroxidase-Markermolekülen, an den Ort des Antigens gelangen und es zu einer Signalamplifikation kommt. Durch Zugabe des für diese Arbeit verwendeten Farbstoffes Diaminobenzidin (DAB) wird durch die Bindung des DAB an die Peroxidase des ABC-Komplexes schließlich eine Färbung sichtbar. Der biotinylierte Sekundär-AK richtet sich gegen die jeweilige Spezies, aus der der Primär-AK stammt.

Die für diese Arbeit verwendeten Schnitte wurden zunächst zur Entparaffinierung zweimal 10 Minuten in ROTI®Histol eingelegt und anschließend in absteigender Alkoholreihe gebadet. Diese bestand aus einem Bad von zweimal 10 Minuten in 100%igem Isopropanol, 5 Minuten in 95%igem Isopropanol, 5 Minuten in 70%igem Isopropanol und kurze Zeit in destilliertem Wasser (Aqua dest.). Im Anschluss daran wurden die Schnitte 15 Minuten zur Antigen-Demaskierung in Citratpuffer mit einem pH von 6 in einer handelsüblichen Mikrowelle zum Kochen gebracht. Nach Laboreingang waren die Thromben in PFA fixiert worden. Dabei kommt es zu Vernetzungsreaktionen der Membranproteine im Gewebe mit Formaldehydmolekülen, wodurch der spätere Zugang des Primär-AK zum Antigen erschwert wird. Durch Erhitzen und sogenannte Retrieval-Lösungen wie Citratpuffer, können diese fixierungsbedingten Vernetzungen aufgebrochen und das Epitop dem AK wieder zugänglich gemacht werden (140).

Nach der Demaskierung folgte eine mindestens 15-minütige Abkühlphase. Die Schnitte wurden dazu dreimal 3 Minuten in 0,05%igem Tween-phosphat buffered saline (PBS) gewaschen. Dieser Vorgang reduziert die Oberflächenspannung im Präparat. Tween-PBS hat die Fähigkeit, nichtspezifische Bindungen und Protein-Protein-Interaktionen während des Waschschrilles zu reduzieren. Um die endogene Peroxidase im Thrombusgewebe zu hemmen und später falsch positive Signale auszuschließen, wurden die Schnitte im folgenden Schritt 15 Minuten in 3%igem Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) bei Dunkelheit inkubiert. Es folgten erneute Waschvorgänge in Tween-PBS 0,05 % und in PBS. Auf einem Objektträger befanden sich zwischen drei und fünf Schnitte desselben Thrombus. Diese wurden mit einem Fettstift umkreist und so für die Färbungen voneinander getrennt. Zur Reduktion unspezifischer Proteinbindungen wurde für mindestens 30 Minuten jeweils ein Tropfen eines serumfreien Proteinblocks auf die einzelnen

umkreisten Schnitte gegeben.

Nun wurde der entsprechende Primär-AK zur Inkubation in 1%igem bovinem Serumalbumin (BSA 1 %) für mindestens eine Stunde oder über Nacht auf den Schnitt pipettiert. Pro verwendetem primärem AK wurden eine Isotyp-Kontrolle mit Immunglobulin G (IgG) und eine Reagenzienkontrolle mit PBS als Negativkontrollen durchgeführt (siehe Tabelle 7).

Nach mehreren Waschgängen in 0,05%igem Tween-PBS wurde der biotinylierte Sekundär-AK auf die Schnitte aufgebracht und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde erneut fünfmal 2 Minuten ausgewaschen, bevor für weitere 30 Minuten ein Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplex zur Biotinylierung aufgebracht wurde.

Die Waschgänge mit Tween-PBS wurden erneut fünfmal 2 Minuten wiederholt. Als nächstes wurde ein Tropfen der Diaminobenzidin (DAB)+Chromogen-Lösung mit 1 ml des mitgelieferten Substratpuffers (Firma Dako) vermischt und auf die Schnitte pipettiert. Die Schnitte mit den aufgebrachten Primär-AKs färbten sich nach wenigen Minuten braun.

Nun wurden die Schnitte für 3 Minuten in ein Bad mit Mayers Hämalaun gebracht. Anschließend erfolgte das Bläuen unter laufendem Leitungswasser für 5 bis 10 Minuten. Abschließend wurden die Objektträger zur schonenden Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe erneut wie folgt gebadet: jeweils 5 Minuten in 70%, 80%, 95%igem, zweimal in 100%igem Isopropanol und abschließend zweimal 10 Minuten in ROTI®histol. Vor der Mikroskopie wurden die Objektträger mit Eukitt eingedeckelt und nach kurzer Trockenphase unter dem Mikroskop Optishot 2 von Nikon mit Hilfe der Software NIS Elements BR 3.2 von Nikon in verschiedenen Vergrößerungen (5-fach, 10-fach, 20-fach, 40-fach) und an unterschiedlichen Bereichen im Thrombus fotografiert. Die verwendeten Antikörper, die Kontrollen und die durchgeführten Verdünnungen sind in Tabelle 7 benannt.

### **2.6.2 Technisches und praktisches Vorgehen zur Auswertung**

Die Auswertung der Fotos wurde jeweils in der 20-fachen Vergrößerung mit dem wissenschaftlichen Bildverarbeitungsprogramm ImageJ Software von Wayne Rasband durchgeführt.

Grem1, TGFβ1 und MIF zeigten in den immunhistologischen Färbungen sowohl

flächige Färbungen als auch Färbungen von einzelnen Zellen. Deshalb erfolgte die Auswertung zunächst semiquantitativ. Anhand der sichtbaren Färbung wurden die Thromben nach Expression den Gruppen keine, geringe, mittelstarke und starke Expression zugeordnet. Um einen repräsentativen Gesamtüberblick über den jeweiligen Thrombus zu haben, wurden pro Thrombus jeweils drei unterschiedliche Gesichtsfelder bewertet. Ein Gesichtsfeld (GF) entspricht dabei einem kompletten Bildausschnitt (Foto) unter dem Mikroskop.

Die Expression der Proteine und Zellmarker CD14, CD68, MIF, CD105 und TGF $\beta$ 1 wurde mittels Zellzählung aus jeweils fünf unterschiedlichen GFs ermittelt.

Der Thrombozytenmarker CD42b und der Fibroblastenmarker S100A4 präsentierten sich in der Immunhistologie flächig gefärbt. Daher wurde zur Bestimmung der Expression die Fläche in Prozent des Gesamtschnittes ausgemessen. Die Flächenmessung erfolgte für jeweils drei unterschiedliche GFs.

## **2.7 Statistik**

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe der Statistik- und Analyse-Software SPSS Statistics von IBM Version 26 durchgeführt. Die Testung auf Normalverteilung erfolgte mittels Shapiro-Wilk-Test.

Da bei kleinen Gruppengrößen Ausreißer stärker ins Gewicht fallen, wurden sowohl normal- als auch nicht normalverteilte Daten mit Median und der Interquartilsrange (IQR) mit der 25. und 75. Perzentile angegeben.

Gruppenvergleiche wurden durchgeführt, um statistisch signifikante Unterschiede zwischen verschiedenen Patientengruppen zu finden. Metrische, nicht normal verteilte Daten wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test für zwei Gruppen oder mit dem Kruskal-Wallis-Test für mehr als zwei Gruppen gerechnet. Kategoriale Variablen mit 2x2 Kategorien wurden mit dem Fishers Test, kategoriale Variablen mit >2x2 Kategorien mit dem Chi-Quadrat-Test analysiert. Für multiples Testen innerhalb einer Stichprobe wurde eine Korrektur nach Bonferroni durchgeführt. Für das Signifikanzniveau wurde ein Wert von < 0,05 als statistisch signifikant festgelegt.

Um die Abhängigkeit von Daten untereinander zu untersuchen, wurden

Korrelationen durchgeführt. Die Berechnung erfolgte bei vorwiegend nicht normalverteilten Daten mit der Spearman-Korrelation. Als Maß für die Korrelation wurde der Korrelationskoeffizient  $r$  und der dazugehörige  $p$ -Wert angegeben.

Es wurde eine explorative Analyse mittels einer receiver operating characteristics (ROC)-Kurve durchgeführt, um eine mögliche Gruppeneinteilung der „symptom-to-balloon time“ zu finden. Diese Analyse zeigt in einem Koordinatensystem die Sensivität gegen die Spezifität aufgetragen. Ein annähernd der Winkelhalbierenden entsprechender Verlauf zeigt an, dass die Diskriminierungsfähigkeit des Parameters als eher gering zu bewerten ist.

Als weiteres exploratives Analyseverfahren wurde eine Clusteranalyse durchgeführt. Darunter versteht man ein Verfahren zur Entdeckung von Ähnlichkeitsstrukturen innerhalb eines Datenpools. Die Daten wurden in zwei sich ähnelnden Gruppen zusammengefasst. Die Ähnlichkeitsmerkmale wurden definiert als die in der Immunhistochemie ermittelten Zellzahlen und -flächen. Die Clusteranalyse diente dem initialen Zweck herauszufinden, inwieweit sich die Daten innerhalb der zwei Gruppen voneinander unterscheiden, um mögliche neue, signifikant unterschiedliche Gruppen in den Daten zu eruieren.

Die grafischen Darstellungen entstanden mit dem Programm GraphPad Prism 6 der GraphPad Software Inc.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Beschreibung des Patientenkollektivs

In die Auswertung dieser Arbeit gingen insgesamt 27 koronare Thromben von 27 Patienten mit der Diagnose eines MI ein. Für die folgende statistische Analyse wurde eine Fallzahl von 27 Thromben definiert.

74,1 % (n=20) der Patienten waren männlich, 25,9 % (n=7) waren weiblich. Das durchschnittliche Alter bei Aufnahme ins Krankenhaus lag bei 64 Jahren.

Einen STEMI erlitt mit 85,2 % (n=23) die Mehrheit der Patienten. Bei 14,8 % (n=4) zeigte sich ein NSTEMI.

78,3 % (n=18) der Patienten mit STEMI hatten im EKG einen akuten Verlauf mit signifikanten ST-Hebungen und bei 21,7 % (n=5) zeigte sich ein subakuter Verlauf.

Normalgewichtig mit einem BMI von 18,5–24,9 waren 25,9 % (n=7) der Patienten. Das restliche Kollektiv wies einen BMI von über 25 auf, wobei der größte Teil mit 44,4 % (n=13) sich im präadipösen BMI-Bereich befand.

In der Herzkatheteruntersuchung zeigte sich bei 33,3 % (n=9) der Patienten eine Ein-Gefäß-KHK, bei 14,8 % (n=4) eine Zwei-Gefäß-KHK und bei 44,4 % (n=12) eine Drei-Gefäß-KHK. Bei 7,4 % (n=2) der Patienten war zum Zeitpunkt der Herzkatheteruntersuchung keine hämodynamisch relevante Koronarstenose nachweisbar.

Bezüglich der kardiovaskulären Vorerkrankungen wiesen 74,1 % (n=20) einen arteriellen Hypertonus und 70,4 % (n=19) eine Dyslipidämie auf. Eine Anamnese mit Nikotinabusus hatten 66,7 % (n=18), 48,1 % (n=13) hatten in der Vorgeschichte bereits einen Myokardinfarkt erlitten.

Der Großteil des Kollektivs wies eine mindestens leichtgradig reduzierte EF auf.

In Tabelle 8 ist eine detaillierte Beschreibung des Patientenkollektivs aufgeführt.

**Tabelle 8: Patientencharakteristika**

Die Tabelle fasst die Eigenschaften des Patientenkollektivs hinsichtlich des Alters, des Geschlechts, des Infarkttypus, der kardiovaskulären Risikofaktoren und der Vorerkrankungen deskriptiv zusammen. Angegeben ist jeweils die Anzahl n an Patienten, die Prozentzahl und der Mittelwert mit SD.

(Abkürzungen: BMI= Body Mass Index, STEMI= ST-Hebungsinfarkt, NSTEMI= Nicht ST-Hebungsinfarkt, pAVK= periphere arterielle Verschlusskrankheit, KHK= Koronare Herzkrankheit, EF= Ejektionsfraktion)

<b>Gesamtkollektiv N = 27</b>			
		<b>n</b>	<b>%</b>
<b>Geschlecht</b>	männlich	20	74,1
	weiblich	7	25,9
		<b>M ± SD</b>	
<b>Alter</b>	in Jahren	64,3 ± 13,2	
<b>BMI</b>	in kg/m <sup>2</sup>	26,8 ± 3,6	
		<b>n</b>	<b>%</b>
<b>Normalgewicht</b>	BMI 18,5-24,9	7	25,9
<b>Präadipositas</b>	BMI 25,0-29,9	12	44,4
<b>Adipositas Grad I</b>	BMI 30,0-34,9	6	22,2
<b>Adipositas Grad II</b>	BMI 35,0-39,9	1	3,7
<b>Infarkttyp</b>	STEMI	23	85,2
	NSTEMI	4	14,8
<b>Koronare Herzerkrankung</b>	1-Gefäß-KHK	9	33,3
	2-Gefäß-KHK	4	14,8
	3-Gefäß-KHK	12	44,4
	Keine KHK	3	7,4
<b>Kardiovaskuläre Risikofaktoren und Vorerkrankungen</b>	Arterielle Hypertonie	20	74,1
	Dyslipidämie	19	71,4
	Diabetes mellitus	3	11,1
	Nikotinabusus	18	66,7
	Familienanamnese	10	37
	Niereninsuffizienz	6	22,2
	pAVK	5	18,5
	Vorhofflimmern	4	14,8
	Z.n. Myokardinfarkt	13	48,1
<b>Echokardiographische Pumpfunktion</b>	LV EF >55%	2	7,4
	LV EF 45-54%	11	40,7
	LV EF 30-44%	12	44,4
	LV EF <30%	2	7,4

Tabelle 9 zeigt die Aufnahmemedikation der Patienten. Bei Klinikaufnahme war bei 74,1 % (n=20) der Patienten ASS bereits in der Dauermedikation enthalten oder vom Notarzt präklinisch verabreicht worden. Eine Vormedikation mit Cumarinen und Ticagrelor erhielten jeweils 7,4 % (n=2), Clopidogrel nahmen 11,1 % (n=3) ein. Eine antihypertensive Medikation mit ACE-Hemmern oder Sartanen erhielten jeweils 18,5 % (n=5) der Patienten. Eine Medikation mit Diuretika erfolgte bei 25,9 % (n=7) der Patienten. Betablocker nahmen 25,9 % (n=7), Cholesterinsenker 22,2 % (n=6) der Patienten ein. Tabelle 9 stellt die Aufnahmemedikation des Patientenkollektivs in deskriptiver Weise dar.

**Tabelle 9: Aufnahmemedikation**

Aufgeführt ist die Aufnahmemedikation, die der Primär- und Sekundärprophylaxe von kardiovaskulären Erkrankungen dient. Angegeben ist jeweils die Anzahl n an Patienten und die Angabe in Prozent. (Abkürzungen: ASS=Acetylsalicylsäure, ACE=Angiotensin-Converting-Enzyme)

Aufnahmemedikation	n	%
ASS	20	74,1
Marcumar	2	7,4
Clopidogrel	3	11,1
Prasugrel	0	0,0
Ticagrelor	2	7,4
ACE-Hemmer	5	18,5
Sartane	5	18,5
Betablocker	7	25,9
Kalziumkanalblocker	3	11,1
Aldosteron-Antagonisten	2	7,4
Andere Diuretika	5	18,5
Statine	6	22,2
Orale Antidiabetika	3	11,1

Sowohl der initiale Troponinwert bei Aufnahme als auch der maximal erhöht gemessene Troponinwert im Verlauf lagen bei allen Patienten über der 99. Perzentile von 0,05 µg/L. Auch die CK war im Median mit 808 (IQR 384-1667) U/L über den Referenzbereich erhöht nachweisbar. Entzündungsparameter wie Leukozytenzahl und CRP waren ebenfalls über den Referenzbereich erhöht. Die Lipidwerte zeigten sich leicht über die Norm erhöht. Statistisch signifikant waren die Ergebnisse jedoch nicht. Bei dieser Studie handelt es sich um eine



retrospektive Analyse, bei der nicht jeder Wert für das gesamte Patientenkollektiv erhoben wurde. Deshalb gibt es bezüglich der einzelnen Laborparameter Unterschiede bei der Angabe der Anzahl n. In Tabelle 10 sind die Werte im Einzelnen zusammengefasst.

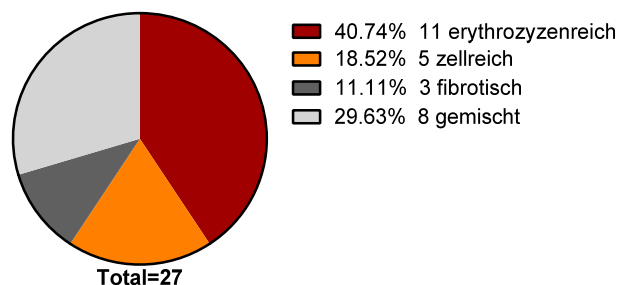
**Tabelle 10: Laborparameter des Patientenkollektivs**

Die Tabelle zeigt die Laborparameter der Patienten mit den jeweiligen Referenzwerten. Die im Shapiro-Wilk-Test normalverteilten Laborparameter sind mit einem vorangestellten x gekennzeichnet und kursiv gedruckt. Nicht normalverteilte Laborparameter sind nicht gesondert markiert. Die Anzahl der erhobenen Werte ist mit N angegeben. Da es sich um eine retrospektive Analyse handelt, wurde nicht jeder Laborwert für das gesamte Patientenkollektiv erhoben. Desweiteren ist hier bei insgesamt kleinen Gruppengrößen sowohl der Mittelwert mit der Standardabweichung (SD) als auch der Median mit der Interquartilsrange (IQR) aufgeführt, um die Verteilung der Daten besser abzubilden.

Laborwert	Referenzwerte	N	Mittelwert + SD	Median (IQR)
Troponin initial	<0,05 µg/L	27	50,4 ± 72,9	20,4 (3,9-60,0)
Troponin max.		27	123,5 ± 118,3	77,8 (27,0-186,2)
CK	Männer <190 U/L Frauen <170 U/L	27	1331 ± 1675	808 (384-1667)
<i>xLeukozyten</i>	Männer 3800-10.300 1/µl Frauen 4100-11.800 1/µl	27	15.309 ± 5435	15.690 (10.410-19.850)
CRP initial	<0,5 mg/dl	26	2,3 ± 3,5	0,4 (0,2-2,8)
CRP max.		26	7,4 ± 8,4	3,6 (0,7-11,3)
<i>xHb</i>	Männer 14-18 g/dl Frauen 12-16 g/dl	27	13,5 ± 1,8	14 (12,3-14,7)
Thrombozyten	150-450 Tausend//µl	27	255,5 ± 106,6	211 (186-292)
INR	1	26	1,8	1,1 (1,0-1,3)
PTT	<40 sec	26	70 ± 55	34 (24-115)
<i>xCholesterin</i>	130-190 mg/dl	17	178,9 ± 42,8	169 (146,5-205)
<i>xHDL</i>	Männer >35 mg/dl Frauen >45 mg/dl	18	43,6 ± 8,9	44 (35-50)
<i>xLDL</i>	< 115 mg/dl	19	127 ± 79,3	111 (90 140)
Triglyceride	<200mg /dl	20	107,2 ± 47,3	102 (73-130)
HbA1c	4,5-6,2 %	8	6 ± 0,5	6,1 (5,5-6,3)

### 3.2 Die morphologischen und immunhistochemischen Analysen

Anhand der sich vorwiegend unter dem Mikroskop darstellenden Morphologie in der HE-Färbung erfolgte die Einteilung der Thromben in vier verschiedene morphologische Gruppen (Abbildung 8). Diese Einteilung gibt den zeitlichen Verlauf der Thrombenentstehung wieder. Erythrozytenreiche Thromben sind nach den relativ frischen thrombozytenreichen Thromben ebenfalls jüngeren Alters (ca. 3-6 h alt) (65, 67). Zellreiche Thromben weisen neben Erythrozyten auch eine zunehmende Zahl infiltrierender Immunzellen auf (Alter >6 h) (69, 138). Fibrotische Thromben zeigen Zeichen einer Nekrose mit zunehmender Fragmentierung und Auflösung des Zellkerns (Alter >24 h) (141). Gemischte Thromben weisen die Komponenten aller Morphologie-Gruppen zu unterschiedlichen Anteilen auf und haben zusätzlich organisierte Bereiche. Diese Thromben sind mit mehreren Tagen die morphologisch ältesten (141). Frische und vorwiegend thrombozytenreiche Thromben deuten auf ein Thrombusalter <1 h hin (65, 67, 68). Solche Thromben fanden sich bei dem hier untersuchten Kollektiv nicht. Allerdings waren Thrombozyten in allen Gruppen mikroskopisch sichtbar. Ihr Anteil an der Gesamtthrombusfläche betrug im Median zwischen 31 % bei den gemischten und 61 % bei den fibrotischen Thromben.



**Abbildung 8: Einteilung der Thromben nach Morphologie**

Das Kreisdiagramm zeigt die Einteilung der Thromben in die morphologischen Gruppen. Der größte Anteil der Thromben ist mit ca. 40,7 % (n=11) vorwiegend erythrozytenreich. Knapp 18,5 % (n=5) sind vorwiegend zellreich und knapp 11 % (n=3) fibrotisch. Ca. 29,6 % (n=8) der Thromben weisen Anteile aller morphologischen Gruppen auf und werden daher als gemischt beschrieben.

Die Einteilung der immunhistochemischen Färbungen wurde wie in Kapitel 2.6.2 beschrieben vorgenommen: Grem1, TGF $\beta$ 1 und MIF färbten sowohl flächige Bereiche als auch einzelne Zellen an. Hinsichtlich dieser unterschiedlichen

Expression von Grem1, TGF $\beta$ 1 und MIF wurden drei Gruppen gebildet: geringe, mittlere und starke Expression. Tabelle 11 stellt diese semiquantitative Auswertung im Überblick dar.

**Tabelle 11: Zellmorphologie der semiquantitativ ausgewerteten Färbungen**

Die Expression von Gremlin1, TGF $\beta$ 1 und MIF nach morphologischen Gruppen ist in deskriptiver Weise dargestellt. Angegeben ist jeweils die Anzahl n der Thromben und in Klammern die relative Häufigkeit in Prozent.

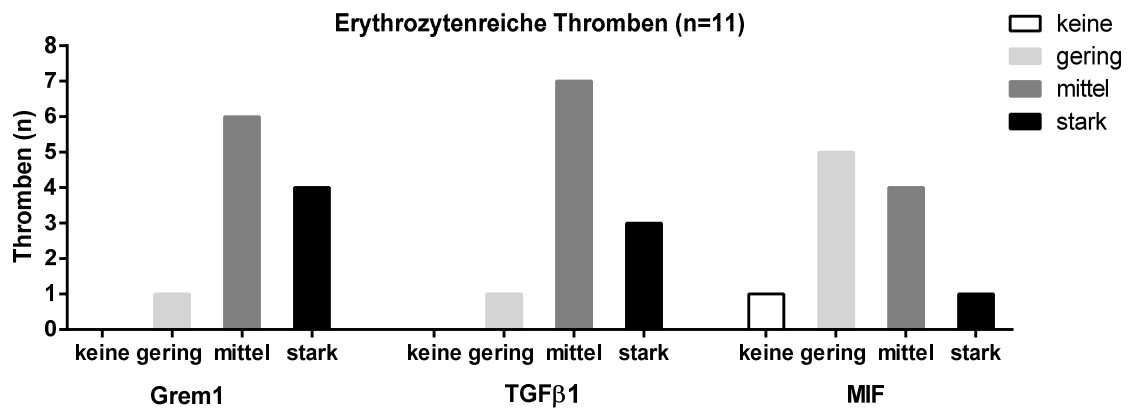
			Erythrozyten reich	Zellreich	Fibrotisch	Gemischt	Gesamt
<b>Gremlin 1</b>	geringe Färbung	n (%)	1 (9,1)	0 (0,0)	1 (33,3)	2 (25,0)	4 (14,8)
	mittlere Färbung	n (%)	6 (54,5)	3 (60,0)	1 (33,3)	3 (37,5)	13 (48,1)
	starke Färbung	n (%)	4 (36,4)	2 (40,0)	1 (33,3)	3 (37,5)	10 (37,0)
<b>TGF<math>\beta</math>1</b>	geringe Färbung	n (%)	1 (9,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (7,0)
	mittlere Färbung	n (%)	7 (63,6)	3 (60,0)	2 (66,7)	5 (62,5)	17 (63,0)
	starke Färbung	n (%)	3 (27,3)	2 (40,0)	1 (33,3)	3 (37,5)	9 (33,3)
<b>MIF</b>	keine Färbung	n (%)	1 (9,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (3,8)
	geringe Färbung	n (%)	5 (45,5)	1 (20,0)	0 (0,0)	2 (25,0)	8 (30,8)
	mittlere Färbung	n (%)	4 (36,4)	4 (80,0)	0 (0,0)	6 (75,0)	14 (53,8)
	starke Färbung	n (%)	1 (9,1)	0 (0,0)	2 (100)	0 (0,0)	3 (11,5)

Des Weiteren wurden die CD14-, CD68-, MIF-, CD105- und TGF $\beta$ 1-Färbungen mittels Zellzählungen pro GF ausgewertet. Die flächig verteilten Färbungen von CD42b und S100A4 wurden als Fläche des Gesamthrombus gemessen. Alle Auswertungen erfolgten in der 20-fachen Vergrößerung.

Die Ergebnisse werden im Folgenden nach der morphologischen Einteilung nacheinander dargestellt.

### 3.2.1 Analyse der erythrozytenreichen Thromben

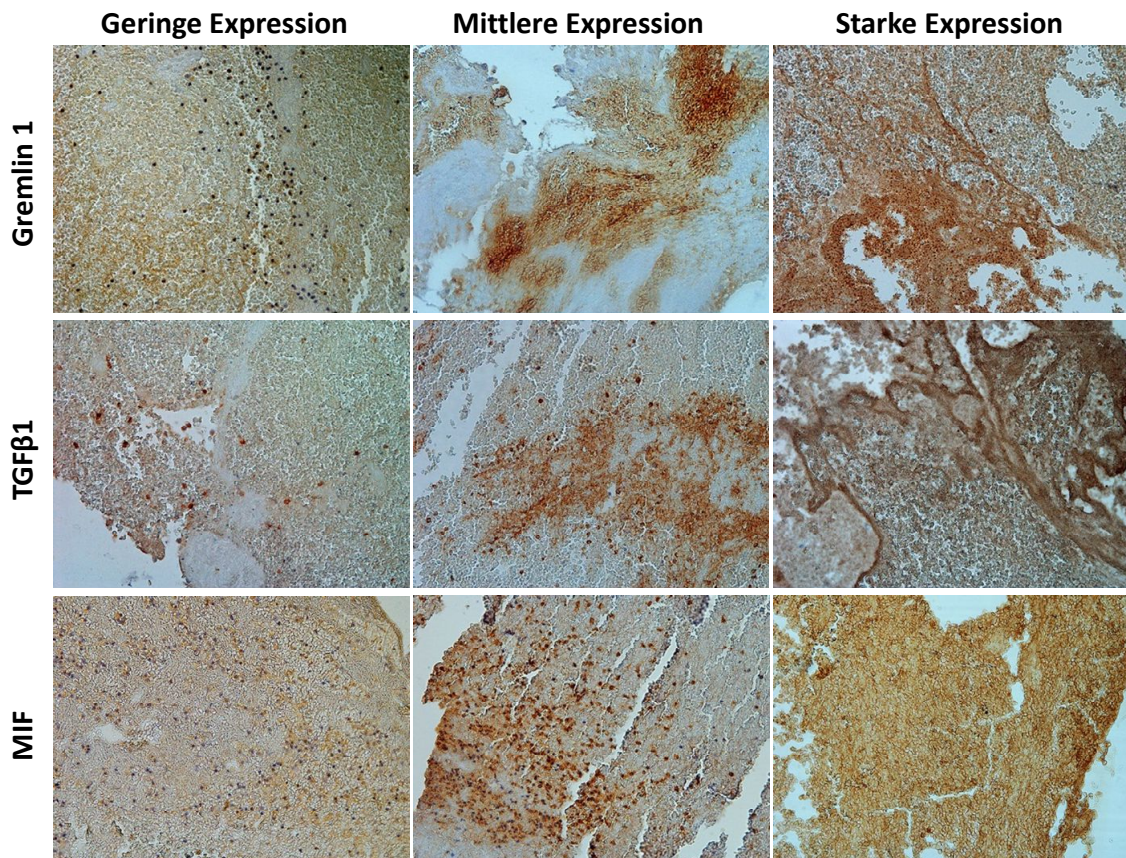
Unter den elf Thromben erythrozytenreicher Morphologie befand sich einer mit einer geringen Grem1-Expression, sechs wiesen eine mittlere und vier eine starke Expression auf. Bei TGF $\beta$ 1 zeigte ein Thrombus eine schwache Expression, sieben eine mittlere und drei Thromben wiesen eine starke TGF $\beta$ 1-Expression auf. Die MIF-Expression war in fünf Thromben gering, in vier Thromben mittel und bei einem Thrombus stark ausgeprägt (Abbildung 9).



**Abbildung 9: Semiquantitative Auswertung der Expression von Grem1, TGFβ1 und MIF bei Thromben mit erythrozytenreicher Morphologie**

Die Grafik zeigt die semiquantitative Auswertung der elf erythrozytenreichen Thromben in den Gruppen mit geringer, mittlerer und starker Expression für die Färbungen von Grem1, TGFβ1 und MIF. Grem1 und TGFβ1 haben die meisten Thromben mit mittlerer und starker Expression. MIF hingegen zeigt die meisten Thromben mit geringer Färbung.

In Abbildung 10 sind exemplarische Färbungen von Grem1, TGFβ1 und MIF in unterschiedlicher Ausprägung abgebildet.



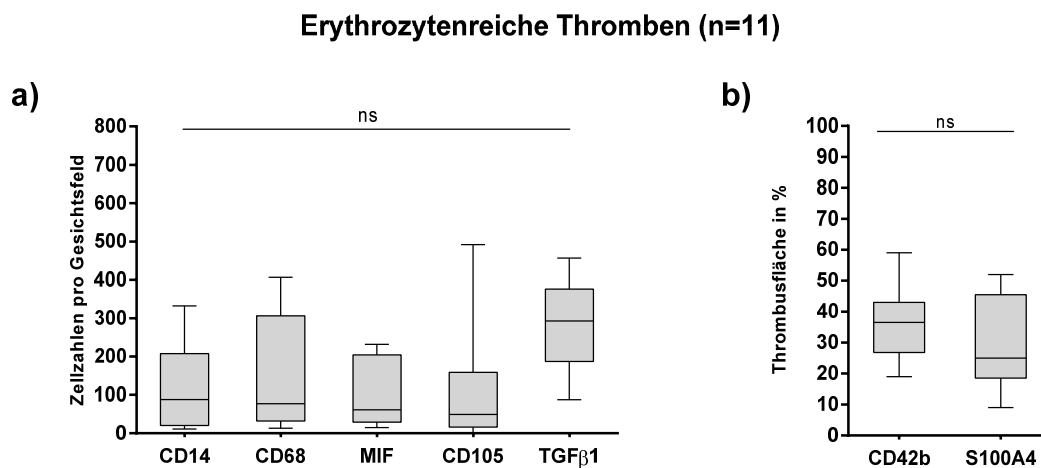
**Abbildung 10: Repräsentative immunhistochemische Färbungen von Grem1, TGFβ1 und MIF in unterschiedlicher Expression bei erythrozytenreichen Thromben**

Die Fotos wurden in 20-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop Optishot 2 von Nikon mit Hilfe der Software NIS Elements BR 3.2 von Nikon fotografiert.

Die TGF $\beta$ 1-Zellzahlen pro GF zeigten sich im Median mit 293 (IQR 187-376) als die am häufigsten exprimierte Zellen in erythrozytenreichen Thromben. Die anderen Zellmarker färbten sich zu etwa gleichen, vergleichsweise niedrigen Anteilen an: CD14 mit 88 (IQR 20-207) Zellen pro GF, CD68 mit 77 (IQR 32-306) Zellen pro GF, MIF mit 61 (IQR 29-204) Zellen pro GF und CD105 mit 49 (IQR 16-159) Zellen pro GF.

Die mit dem Thrombozytenmarker CD42b angefärbte Fläche lag im Median bei 37 % (IQR 27-43). Mit dem Fibroblastenmarker S100A4 färbte sich in derselben Thrombus-Gruppe eine Fläche von 25 % (IQR 19-46).

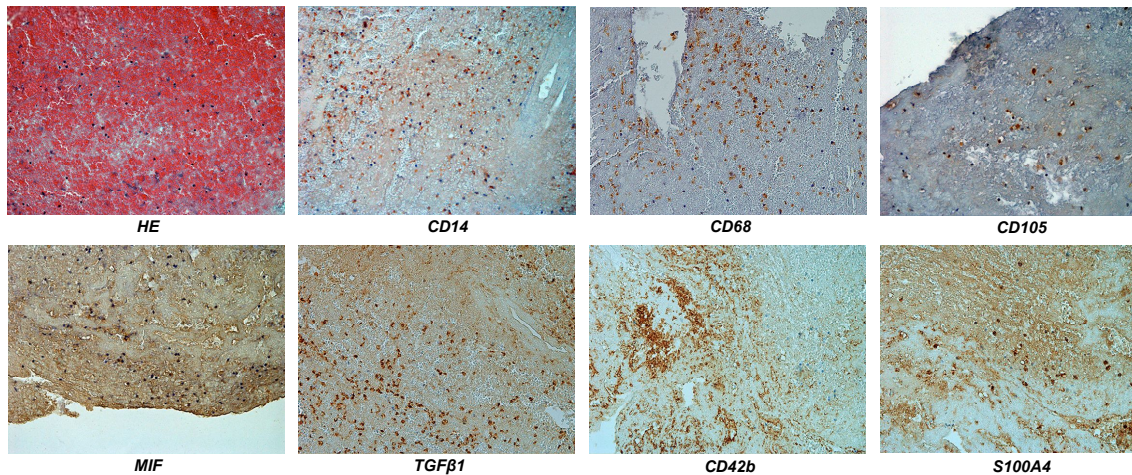
Nachfolgende Grafiken zeigen die Ergebnisse der immunhistochemischen Auswertung (Abbildung 11) und exemplarische Färbungen eines erythrozytenreichen Thrombus (Abbildung 12).



**Abbildung 11: Vergleich der gefärbten Zellzahlen und Flächen innerhalb der Gruppe der erythrozytenreichen Thromben**

a) Die Whisker-Plots bilden den Median mit IQR der CD14-, CD68-, MIF-, CD105- und TGF $\beta$ 1-positiven Zellen pro Gesichtsfeld in der 20-fachen Vergrößerung innerhalb der Gruppe der erythrozytenreichen Thromben (n=11) ab. Die Whisker zeigen dabei den minimalen und maximalen Wert an. Die TGF $\beta$ 1-Zellzahlen pro Gesichtsfeld sind die am häufigsten exprimierte Zellen in erythrozytenreichen Thromben. Die anderen gefärbten Zellen sind zu etwa gleich großen Teilen zu finden. Nach Shapiro-Wilk-Test liegt keine Normalverteilung der Daten vor. Die Testung mittels Kruskal-Wallis-Test ergibt keine statistisch signifikanten Unterschiede.

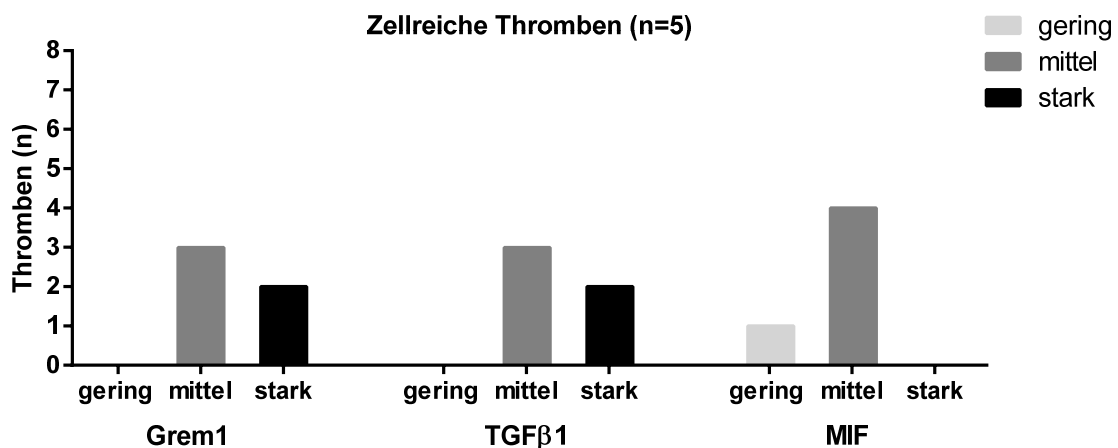
b) Die Whisker-Plots stellen den Median mit den minimalen und maximalen Werten der CD42b- und S100A4-positiv gefärbten Thrombusfläche innerhalb der erythrozytenreichen Thromben in Prozent dar. Nach Shapiro-Wilk-Test liegt eine Normalverteilung der Daten vor. Die Testung mittels Kruskal-Wallis-Test zeigt keine statistisch signifikanten Unterschiede.



**Abbildung 12: Exemplarische Darstellung immunhistochemischer Färbungen eines Thrombus mit erythrozytenreicher Morphologie**  
 Abgebildet sind exemplarische Fotos der HE-Färbung und der immunhistochemischen Färbungen eines erythrozytenreichen Thrombus von CD14, CD68, MIF, CD105, TGFβ1, CD42b und S100A4 in der 20-fachen Vergrößerung (Mikroskop: Optishot 2 von Nikon, Software NIS Elements BR 3.2 von Nikon).

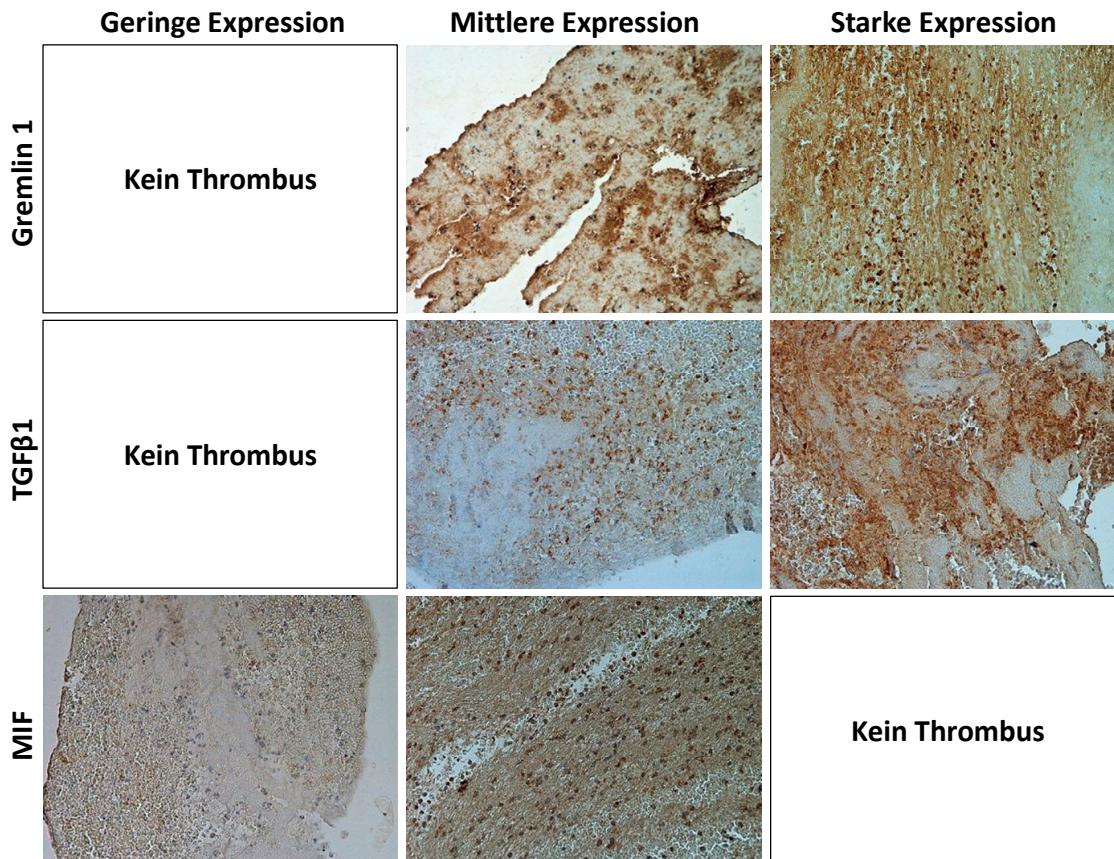
### 3.2.2 Analyse der zellreichen Thromben

Bei den fünf zellreichen Thromben exprimierten drei Thromben Grem1 in mittelstarker Ausprägung, zwei wiesen eine starke Grem1-Expression auf. Für TGFβ1 zeigte sich dasselbe Verteilungsmuster. MIF wurde in einem von fünf zellreichen Thromben gering exprimiert, in vier Thromben zeigte sich eine mittlere Färbung (Abbildung 13).



**Abbildung 13: Semiquantitative Auswertung der Expression von Grem1, TGFβ1 und MIF bei Thromben mit zellreicher Morphologie**  
 Die Grafik zeigt die semiquantitative Auswertung der fünf zellreichen Thromben in den Gruppen mit geringer, mittlerer und starker Expression für Grem1, TGFβ1 und MIF. Grem1 und TGFβ1 weisen gleich viele Thromben in der Gruppe der mittleren und starken Expression auf. MIF wird vorwiegend mittelstark exprimiert.

Abbildung 14 zeigt exemplarische immunhistochemische Färbungen von Grem1, TGF $\beta$ 1 und MIF in unterschiedlicher Ausprägung. Nicht alle Expressionsgruppen waren bei jeder Färbung vertreten und sind daher durch leere Felder gekennzeichnet.



**Abbildung 14: Repräsentative immunhistochemische Färbungen von Grem1, TGF $\beta$ 1 und MIF in unterschiedlicher Expression bei zellreichen Thromben**

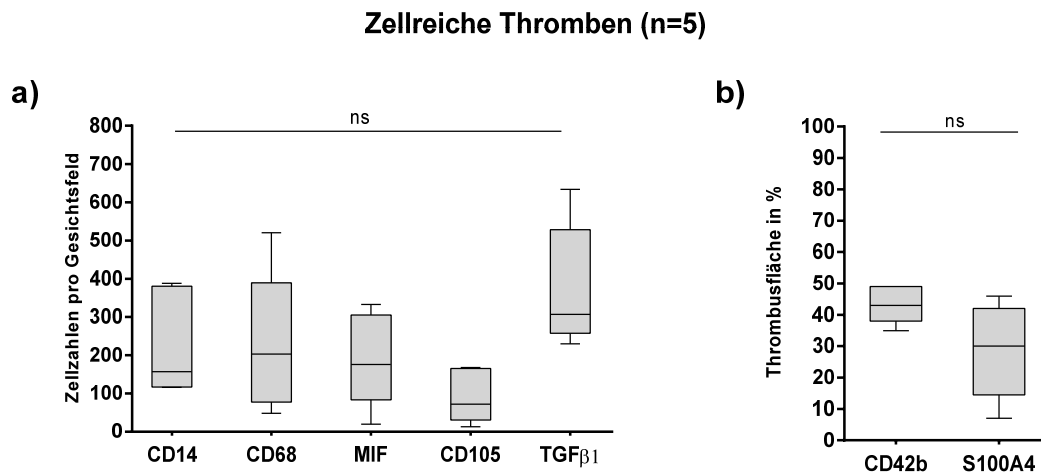
Die Fotos wurden in 20-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop Optishot 2 von Nikon mit Hilfe der Software NIS Elements BR 3.2 von Nikon aufgenommen. Die drei Expressionsstufen waren, wie in Abbildung 13 bereits dargestellt, nicht für alle Färbungen vorhanden.

TGF $\beta$ 1 war im Median mit 307 (IQR 258-528) Zellen pro GF der am häufigsten exprimierte Marker in zellreichen Thromben. Der am zweithäufigsten exprimierte Marker war CD68 mit 203 (IQR 78-390) Zellen pro GF. MIF wurde in 176 (IQR 83-305) Zellen pro GF exprimiert, CD14 in 157 (IQR 117-381) Zellen pro GF. CD105 wies mit im Median 72 (IQR 31-166) Zellen pro GF die niedrigste Expression innerhalb der Gruppe der zellreichen Thromben auf.

Die mit dem Thrombozytenmarker CD42b angefärbte Fläche der betrachteten Bildausschnitte lag im Median bei 43 % (IQR 38-49). Mit dem Fibroblastenmarker

S100A4 konnte in derselben Thrombus-Gruppe eine Fläche von 30% (IQR 15-42) angefärbt werden.

Nachfolgend sind die Expression der gefärbten Marker und exemplarische Färbungen eines zellreichen Thrombus dargestellt (Abbildung 15, Abbildung 16).

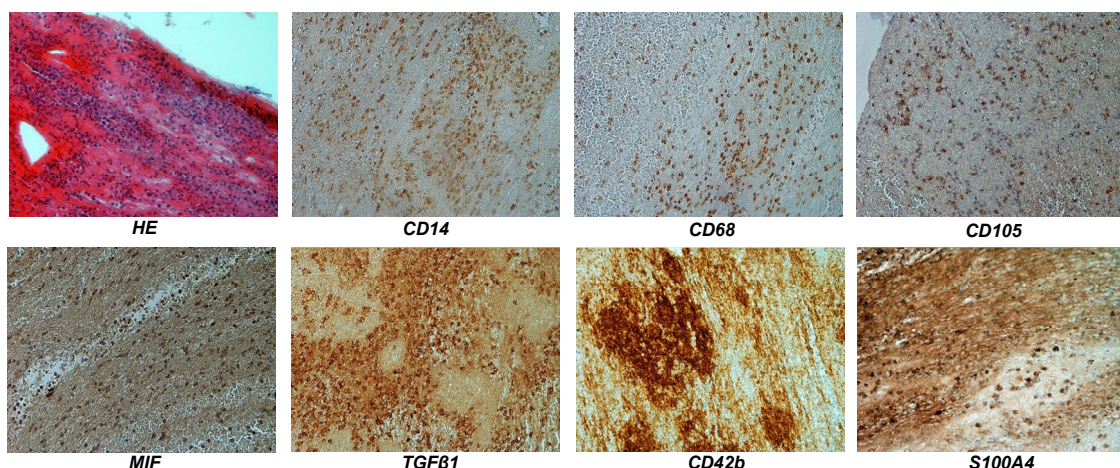


**Abbildung 15: Vergleich der gefärbten Zellzahlen und Flächen innerhalb der Gruppe der zellreichen Thromben**

a) Die Whisker-Plots bilden den Median mit IQR der CD14-, CD68-, MIF-, CD105- und TGFβ<sub>1</sub>-positiven Zellen pro Gesichtsfeld in der 20-fachen Vergrößerung innerhalb der Gruppe der zellreichen Thromben (n=5) ab. Die Whisker zeigen dabei den minimalen und maximalen Wert an.

TGFβ<sub>1</sub>-exprimierende Zellen sind auch in den zellreichen Thromben die am häufigsten exprimierten Zellen. Gefolgt von CD68-, MIF- und CD14-exprimierenden Zellen. Nach Shapiro-Wilk-Test liegt keine Normalverteilung der Daten vor. Die Testung mittels Kruskal-Wallis-Test zeigt keine statistisch signifikanten Unterschiede.

b) Die Whisker-Plots stellen den Median mit IQR der CD42b- und S100A4-positiv gefärbten Thrombusfläche innerhalb der zellreichen Thromben in Prozent dar. Nach Shapiro-Wilk-Test liegt eine Normalverteilung der Daten vor. Die Testung mittels Kruskal-Wallis-Test zeigt keine statistisch signifikanten Unterschiede.



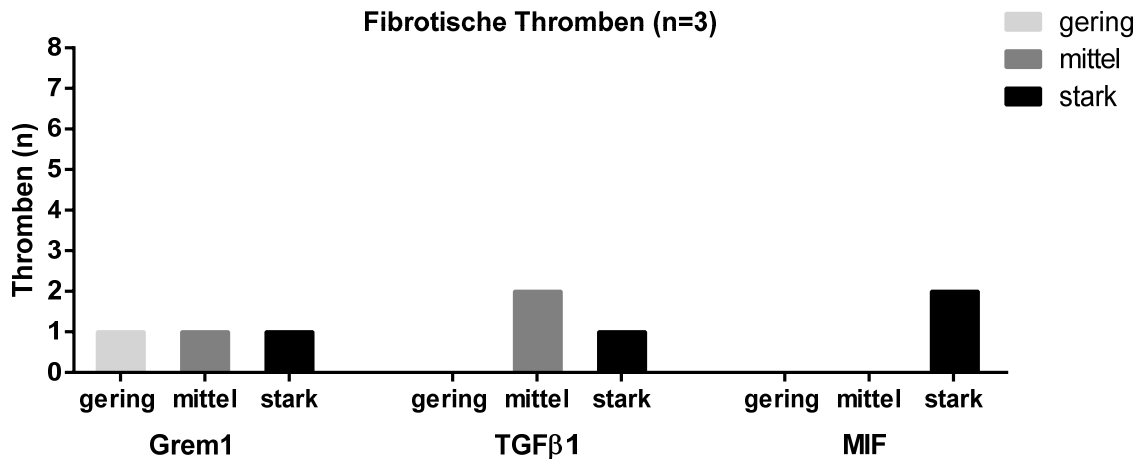
**Abbildung 16: Exemplarische Darstellung immunhistochemischer Färbungen eines Thrombus mit zellreicher Morphologie**

Abgebildet sind exemplarische Fotos der HE-Färbung und der immunhistochemischen Färbungen von CD14, CD68, MIF, CD105, TGFβ<sub>1</sub>, CD42b und S100A4 in der 20-fachen Vergrößerung (Mikroskop: Optishot 2 von Nikon, Software NIS Elements BR 3.2 von Nikon).



### 3.2.3 Analyse der fibrotischen Thromben

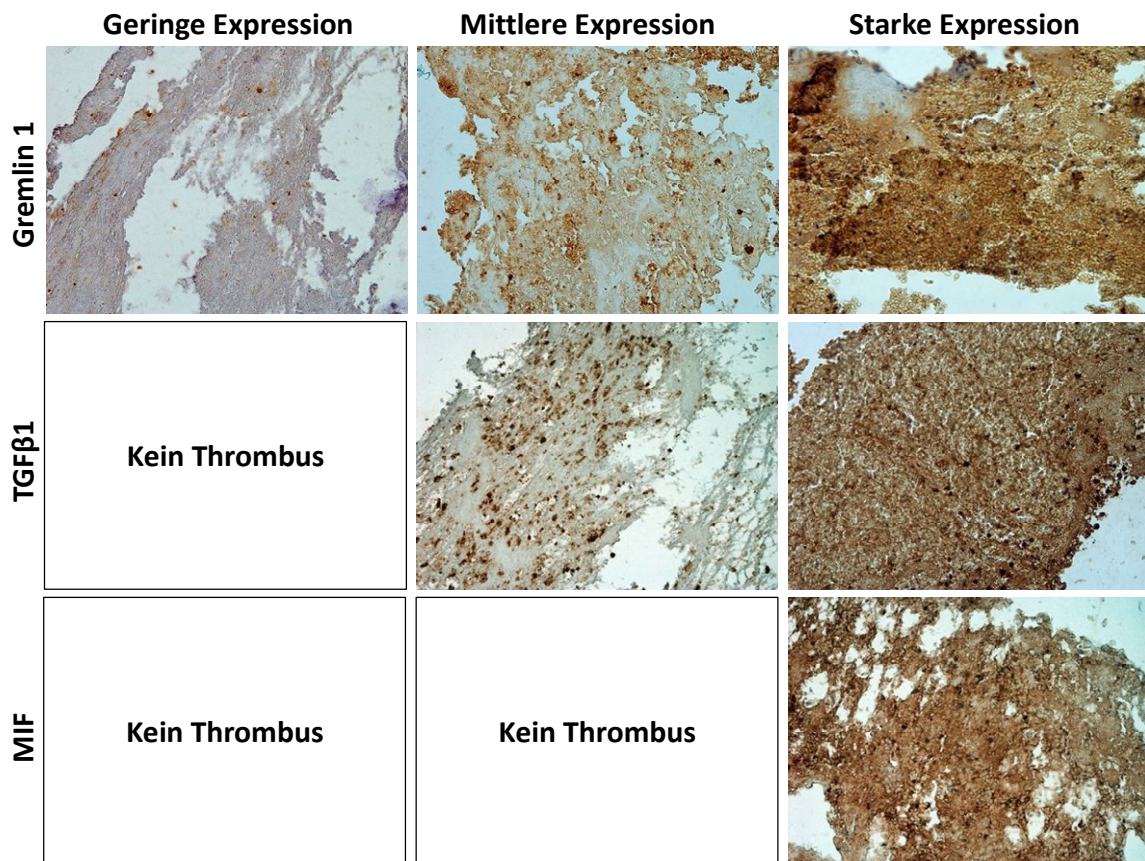
Bei den drei fibrotischen Thromben zeigte sich jeweils ein Thrombus mit einer geringen, einer mittleren und ein Thrombus mit einer starken Grem1-Färbung. TGF $\beta$ 1 wurde in zwei Thromben mittelstark und in einem Thrombus stark exprimiert. MIF zeigte in zwei Thromben eine starke Expression (Abbildung 17).



**Abbildung 17: Semiquantitative Auswertung der Expression von Grem1, TGF $\beta$ 1 und MIF bei Thromben mit fibrotischer Morphologie**

Die Grafik gibt die semiquantitative Auswertung der drei fibrotischen Thromben in den Gruppen mit geringer, mittlerer und starker Expression für die Färbungen von Grem1, TGF $\beta$ 1 und MIF wieder. Die meisten der Thromben zeigten eine mittlere bis starke Färbung. Zu beachten ist die mit drei Thromben sehr kleine Gruppengröße.

Die nachfolgende Abbildung zeigt exemplarische Färbungen von Grem1, TGF $\beta$ 1 und MIF in unterschiedlicher Expression (Abbildung 18).



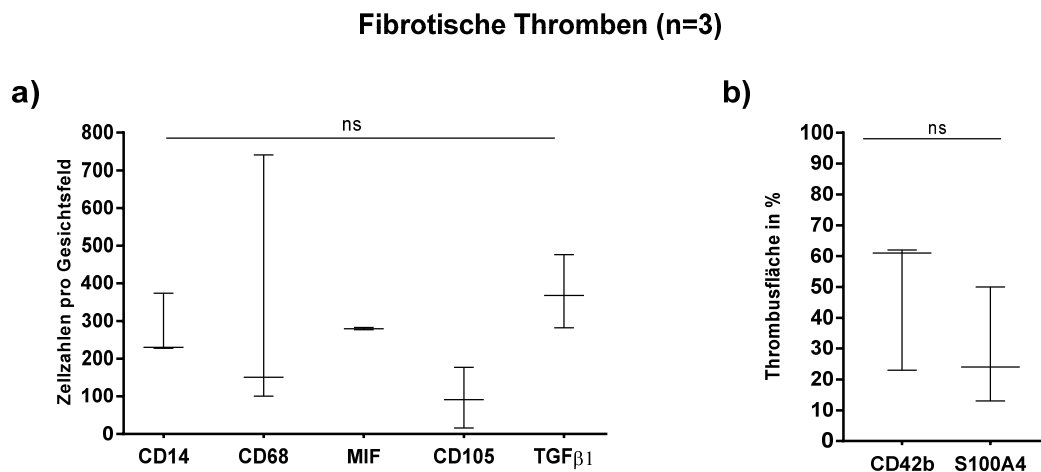
**Abbildung 18: Repräsentative immunhistochemische Färbungen von Gremlin 1, TGFβ1 und MIF in unterschiedlicher Expression bei fibrotischen Thromben**

Die Fotos wurden in 20facher Vergrößerung unter dem Mikroskop Optishot 2 von Nikon mit Hilfe der Software NIS Elements BR 3.2 von Nikon fotografiert. Die drei Expressionstufen gering, mittel und stark waren wie in Abbildung 17 bereits dargestellt nicht für alle Färbungen vorhanden.

TGFβ1 wies auch bei den drei fibrotischen Thromben mit einem Median von 368 (IQR 282-476) die meisten Zellen pro Gesichtsfeld auf. Für MIF konnte mit 280 (IQR 277-283) eine größere Zellzahl als in den anderen morphologischen Gruppen gemessen werden. Auch die höchste Zahl an CD14-positiven Zellen wurden mit 230 (IQR 228-374) Zellen pro Gesichtsfeld bei den fibrotischen Thromben gezählt.

Die mit dem Thrombozytenmarker CD42b angefärbte Fläche lag im Median bei 61 % (IQR 23-62). Mit dem Fibroblastenmarker S100A4 färbte sich in derselben Thrombus-Gruppe eine Fläche von 24 % (IQR 23-50). Zu berücksichtigen ist, dass die morphologische Gruppe der fibrotischen Thromben mit drei Thromben sehr klein ist.

In Abbildung 19 und Abbildung 20 sind die Expression der gefärbten Marker und exemplarische Färbungen eines fibrotischen Thrombus dargestellt.

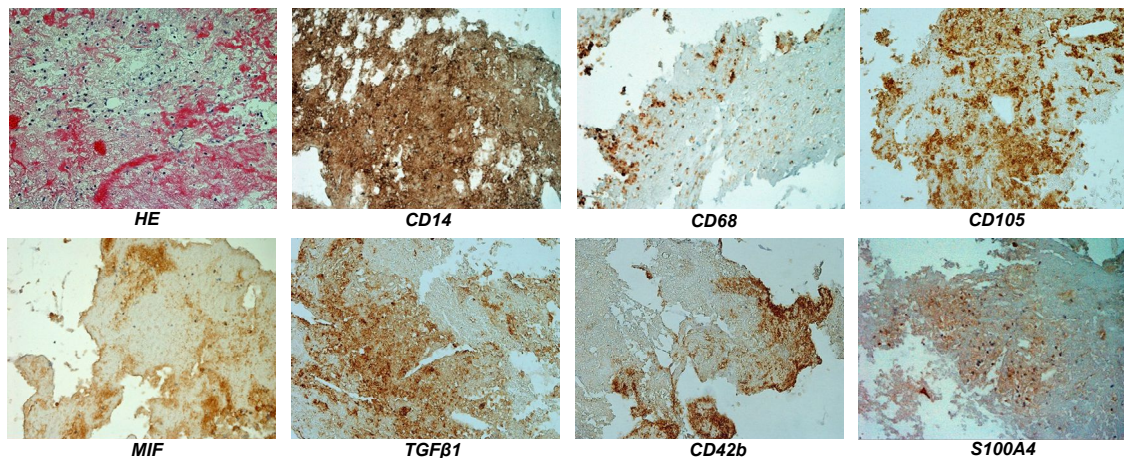


**Abbildung 19: Vergleich der gefärbten Zellzahlen und Flächen innerhalb der Gruppe der fibrotischen Thromben**

a) Die Grafik bildet den Median mit IQR der CD14-, CD68-, MIF-, CD105- und TGFβ1-positiven Zellen pro Gesichtsfeld in der 20-fachen Vergrößerung innerhalb der Gruppe der fibrotischen Thromben (n=3) ab. Die Whisker zeigen dabei den minimalen und maximalen Wert an. TGFβ1 weist die meisten Zellen pro Gesichtsfeld auf, gefolgt von MIF- und CD14-positiven Zellen.

b) Die Whisker-Plots geben den Median und die IQR der CD42b- und S100A4-positiv gefärbten Thrombusfläche innerhalb der fibrotischen Thromben in Prozent an.

Bei insgesamt nur drei Thromben in der Gruppe der fibrotischen Thromben ist keine Normalverteilung anzunehmen. Die Testung mittels Kruskal-Wallis-Test zeigt keine statistisch signifikanten Unterschiede.



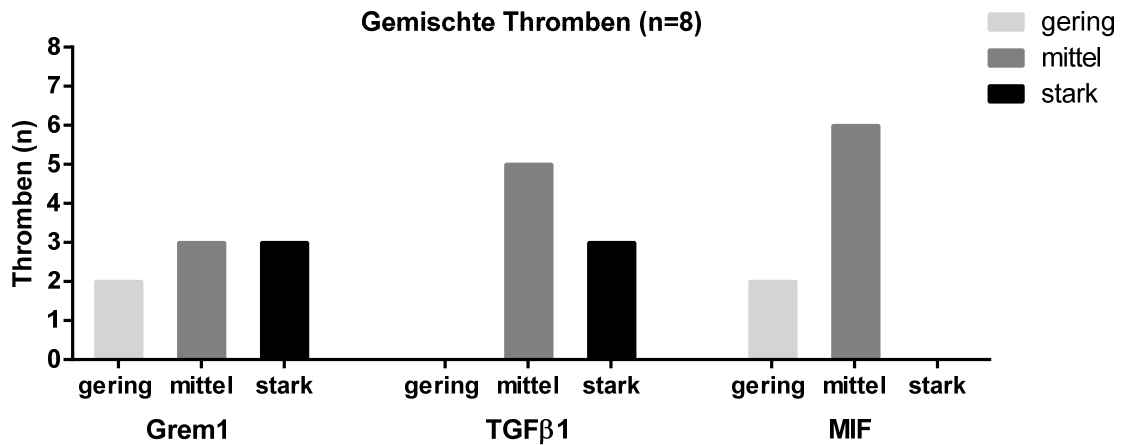
**Abbildung 20: Exemplarische Darstellung immunhistochemischer Färbungen eines Thrombus mit fibrotischer Morphologie**

Abgebildet sind exemplarische Fotos der HE-Färbung und der immunhistochemischen Färbungen von CD14, CD68, MIF, CD105, TGFβ1, CD42b und S100A4 in der 20-fachen Vergrößerung (Mikroskop: Optishot 2 von Nikon, Software NIS Elements BR 3.2 von Nikon).

### 3.2.4 Analyse der gemischten Thromben

Untersucht wurden acht gemischte Thromben, von denen zwei eine geringe, drei eine mittelstarke und drei eine starke Grem1-Färbung aufwiesen. TGFβ1 zeigte fünf mittelstarke und drei starke Färbungen. Bezüglich MIF waren zwei der

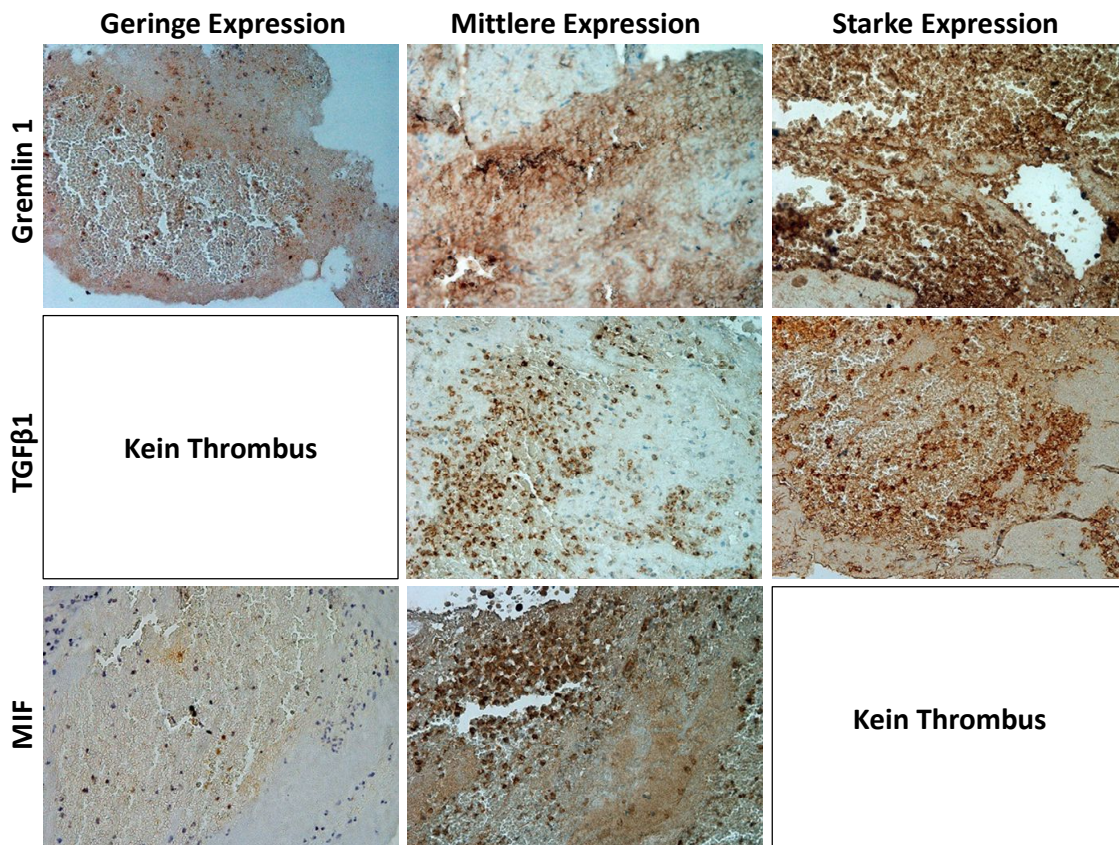
Thromben gering gefärbt, die restlichen sechs Thromben exprimierten MIF in mittelstarker Ausprägung (Abbildung 21).



**Abbildung 21: Semiquantitative Auswertung der Expression von Grem1, TGFβ1 und MIF bei Thromben mit gemischter Morphologie**

Die Grafik gibt die semiquantitative Auswertung der neun Thromben gemischter Morphologie in den Gruppen mit geringer, mittlerer und starker Expression für die Färbungen von Grem1, TGFβ1 und MIF wieder. Die Expression von Grem1 war über die Expressions-Gruppen annähernd gleich verteilt. TGFβ1 und MIF wiesen zum überwiegenden Teil eine mittlere Expression auf.

Abbildung 22 zeigt exemplarische Färbungen von Grem1, TGFβ1 und MIF in unterschiedlicher Expression. Die drei Expressionsstufen zeigten sich, wie in Abbildung 21 bereits dargestellt, nicht bei allen Färbungen und sind daher durch leere Felder gekennzeichnet.



**Abbildung 22: Repräsentative immunhistochemische Färbungen von Gremlin 1, TGFβ1 und MIF in unterschiedlicher Expression bei gemischten Thromben**

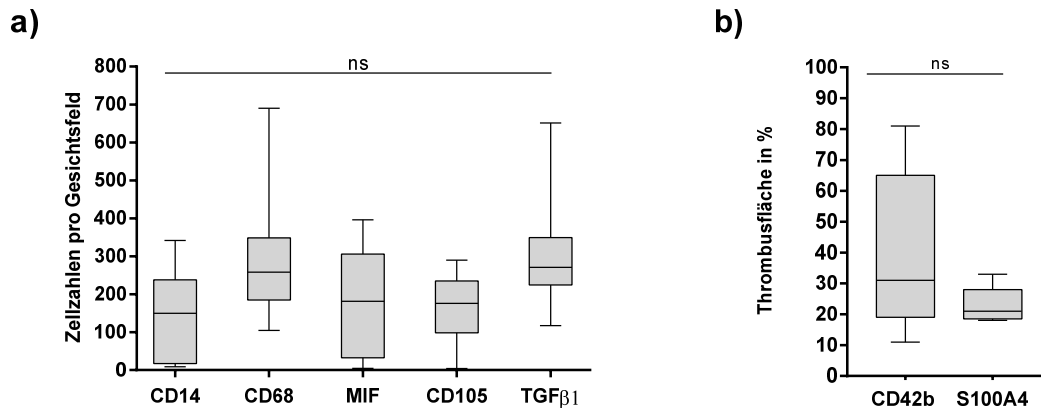
Die Fotos wurden in 20-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop Optishot 2 von Nikon mit Hilfe der Software NIS Elements BR 3.2 von Nikon angefertigt. Die drei Expressionsstufen gering, mittel und stark waren nicht für alle Färbungen vorhanden.

Die TGFβ1-Zellzahlen pro GF wiesen mit einem Median von 271 (IQR 225-349) die höchste Expression von den gefärbten Markern auf. Die Zahl CD68-positiver Zellen war mit 259 (IQR 185-349) ebenfalls hoch. MIF und CD105 zeigten sich mit 182 (IQR 32-306) für MIF und mit 176 (IQR 98-235) für CD105 ungefähr gleich stark gefärbt. CD14 wies mit 150 (IQR 17-238) die geringste Zellzahl pro GF in den gemischten Thromben auf.

Die mit CD42b angefärbte Thrombusfläche lag bei den neun gemischten Thromben im Median bei 31 % (IQR 19-65). Bei S100A4 färbte sich im Median eine Thrombusfläche von 21 % (IQR 19-28) des Gesamthrombus an.

Abbildung 23 und Abbildung 24 zeigen die Verteilung der verschiedenen Marker in der Gruppe der gemischten Thromben und exemplarische Färbungen eines gemischten Thrombus.

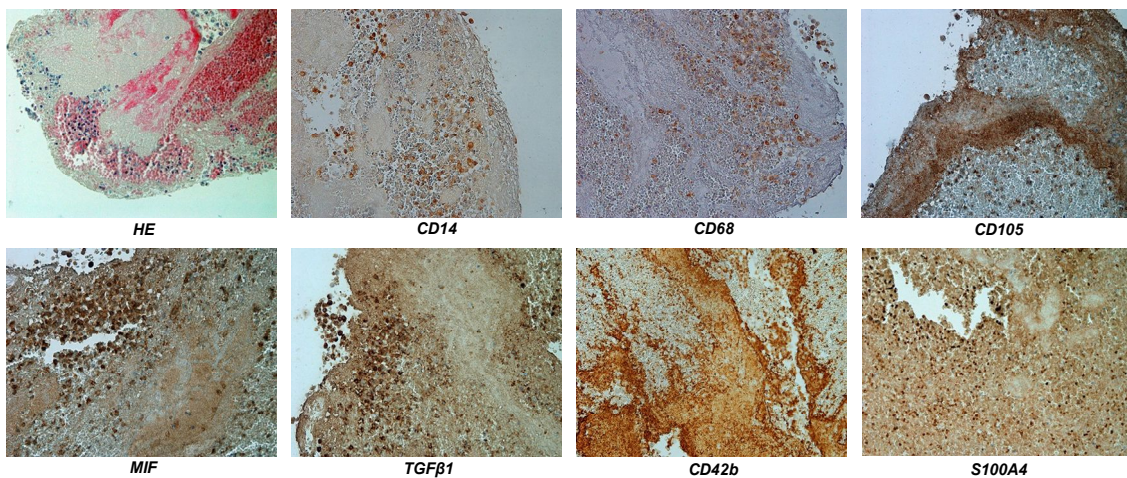
## Gemischte Thromben (n=8)



**Abbildung 23: Vergleich der gefärbten Zellzahlen und Flächen innerhalb der Gruppe der gemischten Thromben**

a) Die Whisker-Plots bilden den Median mit IQR der CD14-, CD68-, MIF-, CD105- und TGFβ1-positiven Zellen pro Gesichtsfeld in der 20-fachen Vergrößerung innerhalb der Gruppe der gemischten Thromben (n=9) ab. Die Whisker zeigen dabei den minimalen und maximalen Wert an. Den größten Anteil an gefärbten Zellen weisen TGFβ1 und CD68 auf. Nach-Shapiro-Wilk Test liegt keine Normalverteilung der Daten vor. Die Testung mittels Kruskal-Wallis-Test zeigt keine statistisch signifikanten Unterschiede.

b) Die Whisker-Plots stellen den Median mit IQR der CD42b- und S100A4-positiv gefärbten Thrombusfläche innerhalb der gemischten Thromben in Prozent dar. Nach Shapiro-Wilk-Test liegt eine Normalverteilung der Daten vor. Die Testung mittels Kruskal-Wallis-Test zeigt keine statistisch signifikanten Unterschiede.



**Abbildung 24: Exemplarische Darstellung immunhistochemischer Färbungen eines Thrombus mit gemischter Morphologie**

Abgebildet sind exemplarische Fotos der HE-Färbung und der immunhistochemischen Färbungen von CD14, CD68, MIF, CD105, TGFβ1, CD42b und S100A4 in der 20-fachen Vergrößerung (Mikroskop: Optishot 2 von Nikon, Software NIS Elements BR 3.2 von Nikon).

### 3.2.5 Zusammenfassung der morphologischen und immunhistochemischen Auswertung

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass für CD14, CD68, MIF, CD105 und TGF $\beta$ 1 vorwiegend eine gut abgrenzbare Färbung von einzelnen Zellen in den immunhistochemischen Färbungen zu sehen ist, während CD42b und S100A4 eher eine flächige Färbung zeigen. Die zu jedem Antikörper mitgeführten PBS-Kontrollen zeigten keine Färbung. Unter dem Mikroskop waren sie blass-blau. Die IgG-Kontrollen waren ebenfalls blass-blau (siehe auch unter Kapitel 2.6.1).

Betrachtet man die Verteilung der CD14-positiven Zellen innerhalb der verschiedenen Morphologie-Gruppen, so fällt auf, dass sich die meisten CD14-positiven Zellen in der Gruppe der älteren fibrotischen Thromben anfärben, während die jüngeren erythrozytenreichen Thromben die geringste CD14-positive Färbung aufweisen [Median mit IQR, Fibrotisch 230 (IQR 228-374), n=3, vs. Erythrozytenreich mit 88 (IQR 20-207), n=10; p= 0,099 im Kruskal-Wallis-Test].

Die meisten CD68-positiven Zellen konnten in der Gruppe der morphologisch ältesten gemischten Thromben gezählt werden. Die jüngeren erythrozytenreichen Thromben färbten sich hingegen im Median geringer an [Gemischt 259 (IQR 185-349), n=8, vs. Erythrozytenreich 77 (IQR 32-306), n=11; p= 0,153 im Kruskal-Wallis-Test].

MIF war bei den fibrotischen Thromben im Median am stärksten exprimiert, bei den erythrozytenreichen Thromben am schwächsten [Fibrotisch 280 (IQR 277-283), n=2, vs. Erythrozytenreich 61 (IQR 29-204), n=11; p=0,228 im Kruskal-Wallis-Test].

Die Expression von CD105 zeigte sich bei den gemischten Thromben am stärksten und bei den erythrozytenreichen Thromben am niedrigsten [Gemischt 176 (IQR 98-235), n=8, vs. Erythrozytenreich 49 (IQR 16-159), n=11; p=0,325 im Kruskal-Wallis-Test].

TGF $\beta$ 1 zeigte in allen morphologischen Gruppen eine hohe Zahl an gefärbten Zellen. Der höchste Anteil findet sich bei den fibrotischen Thromben, der niedrigste bei den Thromben mit gemischter Morphologie [Fibrotisch (IQR 368

(282-476), n=3, vs. Gemischt 271 (IQR 225-349), n=8; p=0,51 im Kruskal-Wallis-Test)].

Die durch CD42b gefärbte Fläche war bei den fibrotischen Thromben am größten, bei den gemischten Thromben am geringsten [Fibrotisch 61 % (IQR 23-62), n=3, vs. Gemischt, 31 % (IQR 19-65), n=7; p=0,478 im Kruskal-Wallis-Test].

Die größte Expression von S100A4 konnte in der Gruppe der zellreichen Thromben nachgewiesen werden. Die kleinste Fläche an S100A4 exprimierten die gemischten Thromben [Zellreich 30 % (IQR 15-42), n=5, vs. Gemischt mit 21 % (IQR 19-28), n=5; p=0,808 im Kruskal-Wallis-Test].

Signifikante Unterschiede in der Verteilung der Zellen hinsichtlich der Morphologie konnten nicht nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der Auswertung sind in Tabelle 12 dargestellt.

**Tabelle 12: Expression der gefärbten Marker in den vier Morphologie-Gruppen**

Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der statistischen Auswertung bezüglich der Zellexpression innerhalb der definierten Morphologie-Gruppen Erythrozytenreich, Zellreich, Fibrotisch und Gemischt. Bei vorwiegend nicht normalverteilten Daten wird der Median mit IQR angegeben. Die statistische Auswertung wurde mittels Kruskal-Wallis-Test durchgeführt, ein p-Wert von <0,05 wurde als statistisch signifikant definiert.

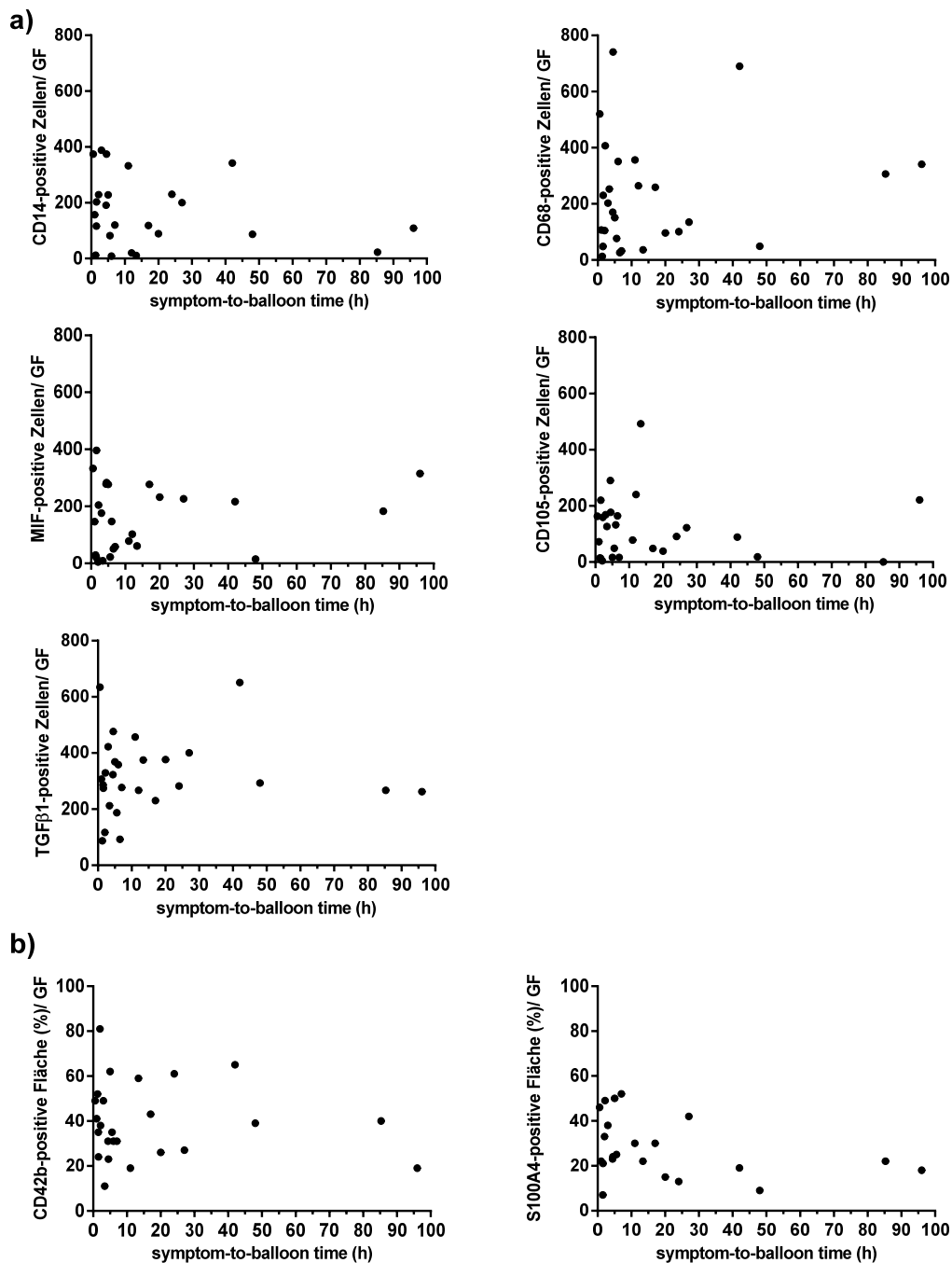
	Erythrozytenreich		Zellreich		Fibrotisch		Gemischt		p-Wert
	n	Median (IQR)	n	Median (IQR)	n	Median (IQR)	n	Median (IQR)	
<b>CD14</b>	10	88 (20-207)	5	157 (117-381)	3	230 (228-374)	6	150 (17-238)	0,099
<b>CD68</b>	11	77 (32-306)	5	203 (78-390)	3	151 (101-741)	8	259 (185-349)	0,153
<b>MIF</b>	11	61 (29-204)	5	176 (83-305)	2	280 (277-283)	8	182 (32-306)	0,228
<b>CD105</b>	11	49 (16-159)	5	72 (31-166)	3	91 (16-177)	8	176 (98-235)	0,325
<b>TGFbeta</b>	11	293 (187-376)	5	307 (258-528)	3	368 (282-476)	8	271 (225-349)	0,51
<b>CD42b</b>	10	37 (27-43)	5	43 (38-49)	3	61 (23-62)	7	31 (19-65)	0,478
<b>S100A4</b>	9	25 (19-46)	5	30 (15-42)	3	24 (13-50)	5	21 (19-28)	0,808

### 3.3 Unterschiede in der Zellexpression koronarer Thromben in Abhängigkeit vom Thrombusalter

Die nachfolgenden Streudiagramme zeigen die Verteilung der Zellzahlen und -flächen, aufgetragen nach der „symptom-to-balloon time“, der Zeit von Symptombeginn bis zur Thrombusaspiration. Zu sehen ist im Wesentlichen eine Häufung der Thromben im Bereich <10 h mit einzelnen Ausreißern (siehe Abbildung 25). Ein Zusammenhang zwischen der Expression der für die immunhistochemischen Färbungen gewählten Marker und der „symptom-to-



balloon time“ ist nicht nachweisbar. Die „symptom-to-balloon time“ lag im Median bei 6,0 h (IQR 2,2- 20,0).



**Abbildung 25: Verteilung der Zellzahlen und -flächen nach „symptom-to-balloon time“ (in h)**

Die abgebildeten Streudiagramme zeigen die Verteilung der gefärbten Zellzahlen und Flächen der einzelnen Thromben nach „symptom-to-balloon time“ in Stunden.

a) zeigt die Verteilung von CD14-, CD68-, MIF-, CD105- und TGFβ1-positiven Zellen pro Gesichtsfeld nach „symptom-to-balloon time“.

b) zeigt die Verteilung der CD42b- und S100A4-positiv gefärbten Flächen in Prozent pro Gesichtsfeld.

Zu sehen ist sowohl in a) als auch in b) eine Häufung der Thromben mit einer „symptom-to-balloon time“ <10 h. Einzelne Thromben weisen deutliche Ausreißer auf. Zusammenfassend zeigt sich jedoch kein Zusammenhang zwischen der Expression der gewählten Marker und der „symptom-to-balloon time“.

Um festzustellen, ob es einen Schwellenwert für die „symptom-to-balloon time“ gibt, wurde eine explorative ROC-Analyse durchgeführt. Diese zeigte in einem Koordinatensystem, in dem die Sensivität gegen die Spezifität aufgetragen ist, einen annähernd der Winkelhalbierenden entsprechenden Verlauf. Dies weist auf eine niedrige Diskriminierungsfähigkeit des Parameters „symptom-to-balloon time“ hin. Es ergibt sich für keinen der gemessenen Werte eine statistisch aussagekräftige Konstellation von Wertepaaren bezüglich Sensitivität und Spezifität. Die optimale Kombination von Wertepaaren lag bei jeweils 50 % Sensitivität und Spezifität. Dies zeigt, dass es für die vorliegenden Daten keinen oder eher einen zufällig auftretenden Zusammenhang zwischen der Expression der gemessenen Zellen und der „symptom-to-balloon time“ zu geben scheint.

Wie im Kapitel 2.3 beschrieben, war die genaue Eingrenzung dieses Zeitraums zum Teil ungenau eruierbar. Deswegen wurde anhand der Kriterien der bekannten „symptom-to-balloon time“, der Dynamik des Troponinverlauf und der EKGs eine Einteilung des Thrombenalters in die Gruppen 0-6 h, 6-24 h und >24 h vorgenommen. Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede für die Zellexpression von CD14, CD68, MIF, CD105, TGF $\beta$ 1, CD42b und S100A4 innerhalb der definierten Gruppen für das Thrombusalter ermittelt werden. Tabelle 13 zeigt die Ergebnisse dieser Auswertung.

**Tabelle 13: Expression der gefärbten Marker nach Thrombenalter-Gruppen 0-6 h, 7-24 h und >24 h**

Die Tabelle zeigt die Expression von CD14, CD68, MIF, CD105, TGF $\beta$ 1, CD42b und S100A4 innerhalb der definierten Altersgruppen 0-6 h, 7-24 h und >24 h. Bei nicht normalverteilten Daten ist der Median mit IQR angegeben. Die statistische Auswertung wurde mittels Kruskal-Wallis-Test durchgeführt, ein p-Wert von <0,05 wurde als statistisch signifikant definiert. Nach Bonferroni-Korrektur bei multiplem Testen zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

	<b>0-6 h (n=16)</b> <b>Median (IQR)</b>	<b>7-24 h (n=6)</b> <b>Median (IQR)</b>	<b>&gt;24 h (n=5)</b> <b>Median (IQR)</b>	<b>p-Werte</b>
<b>CD14 Zellzahlen</b>	200 (102-286)	69 (11-343)	109 (56-194)	1
<b>CD68 Zellzahlen</b>	143 (48-247)	308 (203-397)	107 (99-324)	0,82
<b>MIF Zellzahlen</b>	117 (21-264)	125 (74-291)	208 (155-294)	1
<b>CD105 Zellzahlen</b>	106 (16-167)	148 (71-303)	72 (20-156)	0,82
<b>TGF<math>\beta</math>1 Zellzahlen</b>	290 (193-392)	367 (258-501)	282 (265-342)	1
<b>CD42b Fläche [%]</b>	35 (27-52)	43 (25-54)	40 (23-51)	1
<b>S100A4 Fläche [%]</b>	25 (20-46)	30 (24-42)	18 (14-22)	0,258

### 3.4 Explorative Cluster-Analyse

Um festzustellen, ob und bezüglich welcher immunhistologischer Zellexpressionen es Unterschiede gibt, wurde eine explorative Cluster-Analyse durchgeführt. Die Daten wurden dabei in zwei sich ähnelnden Gruppen zusammengefasst. Die Ähnlichkeitsmerkmale wurden definiert als die in der Immunhistochemie ermittelten Zellzahlen und -flächen.

Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Clustern für die CD14-Zellzahlen [Cluster 1 mit 116 (IQR 82-120), n=14, vs. Cluster 2 mit 229 (IQR 193-366), n=13; p=0,033 im Mann-Whitney-U-Test nach Bonferroni-Korrektur]. Ebenso signifikant war der Unterschied für MIF [Cluster 1 mit 58 (IQR 20-146), n=14, vs. Cluster 2 mit 229 (IQR 188-282), n=13; p=0,0009 im Mann-Whitney-U-Test nach Bonferroni-Korrektur].

Im weiteren Verlauf zeigte sich für CD14 ein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich des Infarkttypus (p=0,034 im Mann-Whitney-U-Test). Für MIF konnte ein grenzwertig signifikanter Unterschied bei der Vormedikation mit ACE-Hemmern gefunden werden (p=0,051, Erläuterungen hierzu im nächsten Kapitel 3.5). Tabelle 14 führt diese Ergebnisse und die Ergebnisse der Clusteranalyse hinsichtlich der Thrombenmorphologie und der „symptom-to-balloon time“ im Detail auf.

Bezüglich der Geschlechterverteilung, des Alters, der EKG-Veränderungen, der Vorerkrankungen des Patientenkollektivs und der Vormedikation gab es innerhalb der beiden Cluster keine statistisch signifikanten Unterschiede (siehe Tabelle 15, Tabelle 16).

Auch in der Auswertung der Laborparameter zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Clustern (Tabelle 17).

**Tabelle 14: Die explorative Cluster-Analyse bezüglich der immunhistochemischen Färbungen, der Thrombusmorphologie und der „symptom-to-balloon time“**

Die abgebildete Tabelle stellt die Ergebnisse der explorativen Datenanalyse nach Clustern dar. Angegeben ist der Median mit IQR und die Anzahl n mit Angabe in Prozent. Der verwendete statistische Test ist mit dem p-Wert zusammen angegeben. Für die immunhistochemischen Färbungen mit CD14 und MIF sind statistisch signifikante Unterschiede zwischen Cluster 1 und Cluster 2 nachweisbar. CD14 wird in Cluster 2 signifikant häufiger exprimiert als in Cluster 1 (mit  $p=0,033$  im Mann-Whitney-U-Test nach Bonferroni-Korrektur). MIF wird in Cluster 2 signifikant mehr exprimiert als in Cluster 1 (mit  $p=0,0009$  im Mann-Whitney-U-Test nach Bonferroni-Korrektur).

	Cluster 1 (N=13)		Cluster 2 (N=14)		p-Wert
	Median (IQR)		Median (IQR)		
<b>Färbungen [Zellzahlen]</b>					
CD14	116 (82-120)		229 (193-366)		<b>0,033</b> Mann-Whitney
CD68	49 (36-107)		268 (156-492)		0,165 Mann-Whitney
CD105	48 (16-72)		141 (49-175)		1 Mann-Whitney
MIF	58 (20-146)		229 (188-282)		<b>0,0009</b> Mann-Whitney
TGFβ1	286 (230-307)		388 (325-471)		0,066 Mann-Whitney
<b>Färbungen [Fläche in %]</b>					
CD42b	39 (35-43)		35 (25-49)		1 Mann-Whitney
S100A4	22 (9-30)		27 (21-45)		1 Mann-Whitney
	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	
<b>Gremlin1 Färbung semiquantitativ</b>					
gering	2	15,4	2	14,3	1 Fisher Test
mittel	7	53,8	6	42,9	1 Fisher Test
stark	4	30,8	6	42,9	1 Fisher Test
<b>Thrombusmorphologie</b>					
Eryreich	6	46,2	5	35,7	1 Fisher Test
Zellreich	3	23,1	2	14,3	1 Fisher Test
Gemischt	4	30,8	4	28,6	1 Fisher Test
Fibrotisch	0	0,0	3	21,4	1 Fisher Test
<b>'symptom-to-balloon time'</b>					
0-6 Stunden	8	61,5	8	57,1	1 Fisher Test
7-24 Stunden	4	30,8	2	14,3	1 Fisher Test
> 24 Stunden	1	7,7	4	28,6	1 Fisher Test

**Tabelle 15: Die explorative Cluster-Analyse bezüglich der Patientencharakteristika**

Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der explorativen Datenanalyse nach Clustern. Abgebildet sind der Median mit IQR und die Anzahl n mit Angabe in Prozent. Der verwendete Test wird zusammen mit dem p-Wert angegeben. Hinsichtlich Alter, Geschlecht, EKG-Veränderungen und Vorerkrankungen des Patientenkollektivs zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede.

	Cluster 1 (N=13)		Cluster 2 (N=14)		p-Wert
	Median (IQR)		Median (IQR)		
<b>Alter [Jahre]</b>	72 (55-81)		62,5 (52-71)		1 Mann-Whitney
	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	
<b>Geschlecht</b>					
Männlich	7	53,8	13	92,9	1 Fisher Test
Weiblich	6	46,2	1	7,1	1 Fisher Test
<b>EKG-Veränderungen</b>					
Akuter STEMI	11	84,6	7	50	1 Fisher Test
Subakuter STEMI	2	15,4	3	21,4	1 Fisher Test
NSTEMI	0	0,0	4	28,6	1 Fisher Test
<b>Vorerkrankungen</b>					
Arterielle Hypertonie	11	84,6	9	64,3	1 Fisher Test
Hypercholesterinämie	9	69,2	10	71,4	1 Fisher Test
Diabetes mellitus Typ 2	1	7,7	2	14,3	1 Fisher Test
Nikotinabusus	9	69,2	9	64,3	1 Fisher Test

**Tabelle 16: Die explorative Cluster-Analyse bezüglich der Vormedikation**

Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der explorativen Datenanalyse nach Clustern hinsichtlich der bei Krankenhausaufnahme bestehenden Vormedikation des Patientenkollektivs. Abgebildet ist die Anzahl n mit Angabe in Prozent. Der verwendete Test wird mit dem p-Wert zusammen angegeben. Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Clustern.

		Cluster 1 (N=13)		Cluster 2 (N=14)		p-Wert
		<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	
<b>ASS</b>	Ja	11	84,6	9	64,3	1 Fisher Test
	Nein	2	15,4	5	35,7	
<b>Clopidogrel</b>	Ja	1	7,7	2	14,3	1 Fisher Test
	Nein	12	92,3	12	85,7	
<b>Ticagrelor</b>	Ja	2	15,4	0	0	1 Fisher Test
	Nein	11	84,6	14	100	
<b>ACE-Hemmer</b>	Ja	5	38,5	0	0	0,528 Fisher Test
	Nein	8	61,5	14	100	
<b>Sartane</b>	Ja	2	15,4	3	21,4	1 Fisher Test
	Nein	11	84,6	11	78,6	
<b>Betablocker</b>	Ja	4	30,8	3	21,4	1 Fisher Test
	Nein	9	69,2	11	78,6	
<b>Statin</b>	Ja	2	15,4	4	28,6	1 Fisher Test
	Nein	11	84,6	10	71,4	
<b>Antidiabetika</b>	Ja	1	7,7	2	14,3	1 Fisher Test
	Nein	12	92,3	12	85,7	

**Tabelle 17: Die explorative Cluster-Analyse bezüglich der Laborwerte**

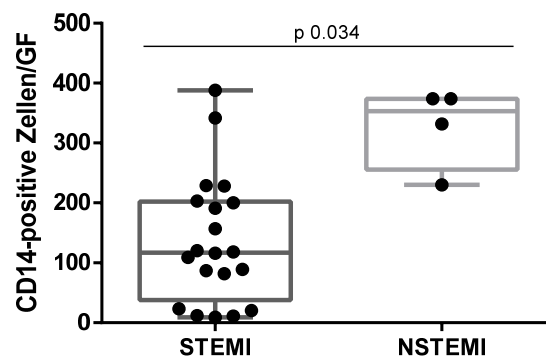
Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der explorativen Datenanalyse nach Clustern hinsichtlich der gemessenen Laborwerte. Abgebildet ist der Median mit IQR. Der verwendete Test wird mit dem p-Wert zusammen angegeben. Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Clustern.

	Cluster 1 (N=13)	Cluster 2 (N=14)	p-Wert
Laborwerte	Median (IQR)	Median (IQR)	
Leukozyten [1/ $\mu$ l]	12.210 (11.080-26.360)	16.850 (12.322-19.993)	1 Mann-Whitney
Hb initial [g/dl]	13,8 (12,3-14,5)	14,2 (12,3-14,7)	1 Mann-Whitney
Thrombozyten [1000/ $\mu$ l]	194 (167-211)	274 (202-312)	1 Mann-Whitney
Troponin initial [mg/dl]	36,2 (0,08-60)	25,3 (8,13-94,35)	1 Mann-Whitney
Troponin max. [mg/dl]	139,3 (77,8-314,6)	51,4 (20,3-234,6)	1 Mann-Whitney
CK gesamt [U/l]	666 (97-2155)	1111 (729-1765)	1 Mann-Whitney
CRP initial [mg/dl]	0,41 (0,2-7,0)	0,68 (0,23-7,74)	1 Mann-Whitney
CRP max. [mg/dl]	9,38 (2,22-24,0)	3,6 (0,75-10,36)	1 Mann-Whitney

### 3.5 Unterschiede in der Zellexpression koronarer Thromben im Hinblick auf klinische Daten und Patientencharakteristika

#### 3.5.1 Die CD14-Expression in NSTEMI-Patienten

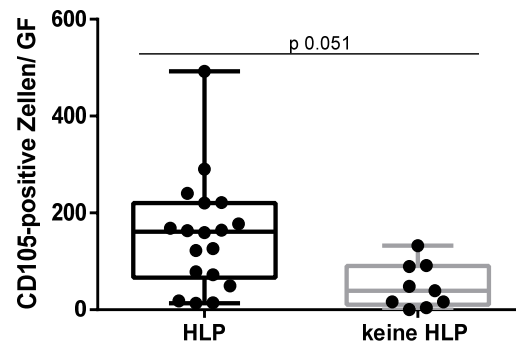
Bezüglich des Infarkttypus zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied in der Expression des Monozytenmarker CD14. Die vier Thromben von Patienten mit NSTEMI wiesen gegenüber den 20 Thromben von Patienten mit STEMI eine signifikant höhere CD14-Expression auf [353 (IQR 256-374) vs. 117 (IQR 38-202),  $p=0,034$  im Mann-Whitney-U-Test] (Abbildung 26).

**Abbildung 26: CD14-Expression nach Infarkttyp**

Die Boxplots stellen die unterschiedliche CD14-Expression bei Patienten mit STEMI (n=20) und NSTEMI (n=4) dar. Abgebildet ist der Median mit der IQR und dem minimalen und maximalen Wert. Die NSTEMI-Patienten weisen statistisch signifikant mehr CD14-positive Zellen pro Gesichtsfeld auf als STEMI-Patienten [(353 (256-374) vs. 117 (38-202),  $p=0,034$  im Mann-Whitney-U-Test].

### 3.5.2 Die CD105-Expression in Patienten mit Hyperlipoproteinämie

Bei Patienten mit einer Hyperlipoproteinämie (HLP) zeigte sich gegenüber Patienten ohne HLP für CD105 kein signifikanter Unterschied. Jedoch war ein annähernd signifikanter Trend im Patientenkollektiv mit HLP nachweisbar [mit HLP 161 (IQR 66-220) vs. ohne HLP 39 (IQR 10-90),  $p=0,051$  im Mann-Whitney-U-Test] (Abbildung 27).

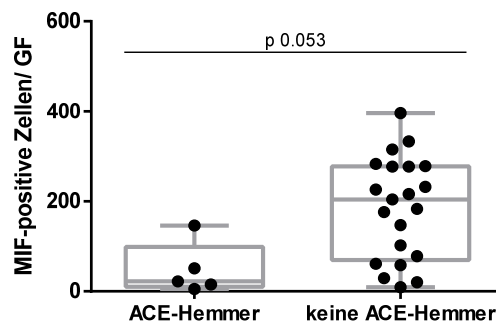


**Abbildung 27: Expression von CD105 bei Hyperlipoproteinämie (HLP)**

Die Grafik zeigt die unterschiedliche CD105-Expression bei Patienten mit ( $n=18$ ) und ohne ( $n=9$ ) Hyperlipoproteinämie bei Aufnahme im Krankenhaus. Dargestellt ist der Median mit IQR und der minimale und maximale Wert. Es zeigt sich eine nicht signifikante Mehrexpression von CD105-positiven Zellen bei Patienten mit Hyperlipoproteinämie [mit HLP 161 (IQR 66-220) vs. ohne HLP 39 (IQR 10-90),  $p=0,051$ ].

### 3.5.3 Die MIF-Expression bei ACE-Hemmer-Vormedikation

Patienten mit ACE-Hemmer-Vormedikation exprimierten im Median weniger MIF als Patienten ohne entsprechende Medikation [22 (IQR 10-99) vs. 204 (IQR 70-278),  $p=0,053$  im Mann-Whitney-U-Test]. Es konnte auch hier kein statistisch signifikanter Unterschied in Richtung Mehrexpression nachgewiesen werden, jedoch zeigte sich ein deutlicher Trend (Abbildung 28).



**Abbildung 28: Expression von MIF bei Einnahme von ACE-Hemmern**

Die Abbildung stellt die unterschiedliche MIF-Expression bei Patienten mit einer ACE-Hemmer-Vormedikation ( $n=5$ ) gegenüber Patienten ohne ACE-Hemmer-Vormedikation ( $n=21$ ) dar. Dargestellt ist der Median mit der IQR und der minimale und maximale Wert. Der Unterschied ist statistisch nicht signifikant, deutet jedoch einen Trend an [Medikation mit ACE-Hemmer 22 (IQR 10-99) vs. ohne 204 (IQR 70-278),  $p=0,053$  im Mann-Whitney-U-Test].

Für alle weiteren analysierten Zellfärbungen zeigten sich keine Unterschiede in der Geschlechterverteilung oder im Patientenalter. Auch für Begleiterkrankungen und Vormedikation ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Die folgenden Tabellen zeigen eine Übersicht über die Auswertungen (Tabelle 18, Tabelle 19, Tabelle 20, Tabelle 21).

**Tabelle 18: Die Zellexpression nach Geschlecht**

Tabellarisch dargestellt ist die Expression der verschiedenen Biomarker nach Geschlechtern. Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden. Die Ergebnisse wurden mittels Mann-Whitney-U-Test analysiert und sind als Median mit IQR angegeben. Eine Bonferroni-Korrektur bei multiplen Testen wurde vorgenommen.

	n	Weiblich Median (IQR)	n	Männlich Median (IQR)	p-Wert
<b>CD14</b>	6	65 (11-175)	18	196 (89-335)	0,61
<b>CD68</b>	7	101 (26-259)	20	216 (98-352)	0,62
<b>MIF</b>	6	107 (51-147)	21	183 (40-276)	1
<b>CD105</b>	7	91 (48-164)	20	124 (23-175)	1
<b>TGFbeta1</b>	7	282 (92-358)	20	308 (267-417)	1
<b>CD42b</b>	6	48 (39-60)	19	35 (24-49)	0,62
<b>S100A4</b>	4	22 (15-28)	18	25 (19-43)	1

**Tabelle 19: Die Zellexpression nach Alter**

Tabellarisch dargestellt ist die Expression der verschiedenen Biomarker nach Alter >50 und <50 Jahre. Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden. Die Ergebnisse wurden mittels Mann-Whitney-U-Test analysiert und sind als Median mit IQR angegeben. Eine Bonferroni-Korrektur bei multiplen Testen wurde vorgenommen.

	n	>50 Jahre Median (IQR)	n	<50 Jahre Median (IQR)	p-Wert
<b>CD14</b>	20	174 (94-307)	4	53 (21-173)	1
<b>CD68</b>	23	151 (49-351)	4	247 (115-296)	1
<b>MIF</b>	22	162 (46-277)	4	143 (42-343)	1
<b>CD105</b>	23	91 (18-164)	4	135 (12-235)	1
<b>TGFbeta1</b>	23	323 (262-400)	4	267 (207-272)	0,66
<b>CD42b</b>	22	39 (27-54)	3	35 (24-40)	1
<b>S100A4</b>	19	24 (18-42)	3	22 (21-25)	1



**Tabelle 20: Die Zellexpression nach Vorerkrankungen**

Die Tabelle führt die Ergebnisse der Zellexpression bezüglich kardiovaskulärer Erkrankungen der Patienten auf. Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden. Es zeigte sich eine statistisch nicht signifikante Mehrexpression von CD105 in Patienten mit HLP. Die Ergebnisse wurden mittels Mann-Whitney-U-Test analysiert und sind als Median mit IQR wiedergegeben. Eine Bonferroni-Korrektur bei multiplem Testen wurde vorgenommen.

Vorerkrankung	n (%)	Färbungen Median (IQR)						
		CD14	CD68	MIF	CD105	TGFbeta1	CD42b	S100A4
<b>Arterielle Hypertonie</b>	<b>20 (74,1)</b>	120 (85-229)	121 (48-319)	147 (24-266)	124 (17-167)	315 (225-376)	35 (27-49)	25 (19-45)
<b>keine Arterielle Hypertonie</b>	<b>7 (25,9)</b>	203 (23-332)	264 (230-356)	200 (96-307)	89 (48-220)	274 (267-457)	42 (23-62)	22 (18-30)
p-Wert		1	0,5	1	1	1	1	1
<b>Diabetes mellitus</b>	<b>3 (11,1)</b>	374 (87-374)	520 (49-471)	283 (15-333)	163 (18-177)	476 (293-634)	39 (23-49)	24 (9-46)
<b>kein Diabetes mellitus</b>	<b>24 (88,9)</b>	120 (55-229)	160 (82-296)	147 (51-232)	90 (22-167)	284 (238-373)	37 (27-54)	23 (19-38)
p-Wert		1	1	1	1	0,58	1	1
<b>Nikotin</b>	<b>18 (66,7)</b>	200 (82-332)	200 (70-369)	176 (28-277)	124 (40-167)	326 (206-414)	35 (26-56)	28 (22-43)
<b>kein Nikotin</b>	<b>9 (33,3)</b>	109 (55-194)	107 (73-285)	161 (69-220)	72 (17-195)	282 (267-341)	40 (27-47)	20 (14-34)
p-Wert		1	1	1	1	1	1	1
<b>HLP</b>	<b>19 (71,4)</b>	174 (83-306)	187 (49-345)	124 (27-279)	161 (66-220)	300 (250-406)	35 (23-47)	24 (20-39)
<b>keine HLP</b>	<b>8 (28,6)</b>	119 (56-229)	151 (99-329)	200 (80-266)	39 (10-90)	282 (249-372)	43 (31-64)	26 (16-46)
p-Wert		1	1	1	<b>0,051</b>	1	0,44	1

**Tabelle 21: Tabellarische Darstellung der Zellexpression bezüglich der Vormedikation**

Die Tabelle zeigt die Zellexpression bezüglich der bei Aufnahme in die Klinik bestehenden Dauermedikation der Patienten. Die Ergebnisse wurden mittels Mann-Whitney-U-Test ermittelt und sind als Median mit IQR angegeben, eine Bonferroni-Korrektur bei multiplem Testen wurde vorgenommen. Für die Expression von MIF fand sich in der Gruppe der Patienten ohne ACE-Hemmer-Vormedikation eine nicht signifikante Mehrexpression.

Vormedikation	n (%)	Färbungen Median (IQR)						
		CD14	CD68	MIF	CD105	TGFbeta1	CD42b	S100A4
<b>ASS</b>	<b>20 (74,1)</b>	118 (51-337)	230 (77-356)	147 (51-277)	132 (48-177)	307 (230-422)	39 (25-51)	24 (19-33)
<b>kein ASS</b>	<b>7 (25,9)</b>	191 (116-228)	143 (61-232)	183 (20-277)	54 (14-125)	284 (270-357)	33 (28-56)	23 (13-50)
p-Wert		1	1	1	1	1	1	1
<b>ACE-Hemmer</b>	<b>5 (18,5)</b>	87 (82-157)	77 (48-106)	22 (10-99)	49 (11-118)	187 (105-300)	40 (36-71)	24 (12-31)
<b>kein ACE-Hemmer</b>	<b>22 (81,5)</b>	191 (56-281)	242 (100-352)	204 (70-278)	124 (33-188)	326 (267-406)	35 (25-51)	24 (19-43)
p-Wert		1	0,218	0,053	1	0,32	1	1
<b>Sartan</b>	<b>5 (18,5)</b>	116 (61-283)	170 (31-431)	278 (25-324)	163 (14-256)	286 (175-479)	35 (25-51)	21 (10-40)
<b>kein Sartan</b>	<b>22 (81,5)</b>	157 (82-230)	177 (91-317)	147 (55-229)	90 (34-165)	300 (258-382)	39 (26-57)	25 (21-39)
p-Wert		1	1	1	1	1	1	1
<b>Betablocker</b>	<b>7 (25,9)</b>	89 (11-191)	96 (48-351)	147 (22-278)	132 (39-290)	358 (286-376)	35 (31-49)	23 (13-30)
<b>kein Betablocker</b>	<b>20 (74,1)</b>	200 (98-281)	217 (102-332)	176 (51-277)	90 (17-167)	280 (238-392)	40 (24-54)	27 (20-41)
p-Wert		1	1	1	1	1	1	1
<b>Statin</b>	<b>6 (22,2)</b>	150 (65-374)	256 (61-575)	281 (27-320)	170 (40-238)	293 (162-516)	33 (22-50)	24 (21-36)

<b>kein Statin</b>	<b>21</b> <b>(77,8)</b>	139 (71-229)	151 (73-285)	147 (53-224)	89 (17-162)	293 (267-376)	39 (27-59)	22 (17-40)
p-Wert		1	1	1	1	1	1	1
<b>Ca-Kanalblocker</b>	<b>3</b> <b>(11,1)</b>	302 (230-374)	101 (26-520)	192 (51-333)	163 (91-164)	282 (92-634)	55 (49-61)	30 (13-46)
<b>kein Ca-Kanalblocker</b>	<b>24</b> <b>(88,9)</b>	119 (67-228)	187 (82-332)	162 (36-266)	84 (17-175)	300 (263-376)	35 (26-49)	24 (20-37)
p-Wert		0,63	1	1	1	1	1	1
<b>Antidiabetika</b>	<b>3</b> <b>(11,1)</b>	374 (87-374)	520 (49-741)	283 (15-333)	163 (18-177)	476 (293-634)	39 (23-49)	24 (9-46)
<b>keine Antidiabetika</b>	<b>24</b> <b>(88,9)</b>	120 (53-229)	161 (82-296)	147 (51-232)	90 (22-167)	284 (238-373)	37 (27-54)	24 (19-39)
p-Wert		1	1	1	1	0,58	1	1

### 3.6 Korrelationen nach Spearman hinsichtlich der Proteinexpression

Um die Abhängigkeit der ermittelten Daten voneinander zu untersuchen, wurden Korrelationsanalysen durchgeführt. Die Berechnung erfolgte bei vorwiegend nicht normalverteilten Daten mit der Spearman-Korrelation. Als Maß für die Korrelation wird der Korrelationskoeffizient  $r$  und der dazugehörige  $p$ -Wert angegeben.

Insbesondere zwischen einigen inflammatorischen Biomarkern wie CD14, CD68; MIF und TGF $\beta$ 1 konnten positive Zusammenhänge gefunden werden.

So korrelierte die Anzahl CD14-positiver Zellen positiv mit der Anzahl CD68-positiver Zellen ( $r=0,479$ ,  $p=0,018$ ). Ein ebenso positiver Zusammenhang zeigte sich zwischen CD14 und MIF ( $r=0,499$ ,  $p=0,015$ ). Eine starke positive Korrelation wurde zwischen CD14 und TGF $\beta$ 1 gefunden ( $r=0,602$ ,  $p=0,002$ ). In gleichem Maß korrelierte CD68 stark mit MIF ( $r=0,574$ ,  $p=0,002$ ) und TGF $\beta$ 1 ( $r=0,473$ ,  $p=0,015$ ).

Eine mittlere positive Korrelation konnte für CD105 und die MIF-positiven Zellen gezeigt werden ( $r=0,423$ ,  $p=0,028$ ). Zwischen CD105 und der semiquantitativ ausgewerteten Fläche von Grem1 konnte ein positiver Zusammenhang gefunden werden ( $r=0,414$ ,  $p=0,032$ ).

Die MIF-Zellzahlen korrelierten positiv mit den TGF $\beta$ 1-positiv gefärbten Zellen ( $r=0,473$ ,  $p=0,015$ ).

Bezüglich der „symptom-to-balloon time“ konnte keine signifikante Korrelation mit den analysierten Zellfärbungen gezeigt werden. Dies stützt die Ergebnisse der in

Kapitel 3.3 aufgeführten ROC-Analyse. Diese zeigte, dass es für die vorliegenden Daten keinen Zusammenhang zwischen der Expression der gemessenen Zellen und der „symptom-to-balloon time“ zu geben scheint. Tabelle 22 stellt die Korrelationsmatrix in der Übersicht dar.

**Tabelle 22: Korrelationsmatrix mit den Korrelationskoeffizienten nach Spearman für die Zellfärbungen und die „symptom-to-balloon time“**

Angegeben sind der Korrelationskoeffizient  $r$  und der dazugehörige  $p$ -Wert. Die gelb hinterlegten Felder zeigen signifikante Korrelationen. Im Wesentlichen sind einige signifikante positive Korrelationen zwischen den Biomarkern mit inflammatorischer Bedeutung zu erkennen.

	CD14 (Zellzahl)	CD68 (Zellzahl)	CD105 (Zellzahl)	MIF (Zellzahl)	TGFβ1 (Zellzahl)	CD42b (Fläche)	S100A4 (Fläche)	Gremlin1 (semiquant.)	symptom-to- balloon time
CD14 (Zellzahl)	1								
CD68 (Zellzahl)	$r=0,479$ $p=0,018^*$	1							
CD105 (Zellzahl)	$r=0,196$ $p=0,358$	$r=0,339$ $p=0,084$	1						
MIF (Zellzahl)	$r=0,499$ $p=0,015^*$	$r=0,574$ $p=0,002^{**}$	$r=0,423$ $p=0,028^*$	1					
TGFβ1 (Zellzahl)	$r=0,602$ $p=0,002^{**}$	$r=0,469$ $p=0,014^*$	$r=0,255$ $p=0,199$	$r=0,473$ $p=0,015^*$	1				
CD42b (Fläche)	$r=0,062$ $p=0,778$	$r=-0,223$ $p=0,284$	$r=-0,314$ $p=0,126$	$r=-0,176$ $p=0,411$	$r=0,000$ $p=0,999$	1			
S100A4 (Fläche)	$r=0,377$ $p=0,092$	$r=0,204$ $p=0,364$	$r=-0,18$ $p=0,938$	$r=0,060$ $p=0,798$	$r=0,150$ $p=0,506$	$r=0,122$ $p=0,589$	1		
Gremlin1 (semiquant.)	$r=0,119$ $p=0,581$	$r=-0,088$ $p=0,662$	$r=0,414$ $p=0,032^*$	$r=0,295$ $p=0,144$	$r=0,290$ $p=0,142$	$r=-0,106$ $p=0,616$	$r=0,328$ $p=0,136$	1	
symptom-to-balloon time	$r=-0,250$ $p=0,238$	$r=0,062$ $p=0,760$	$r=-0,005$ $p=0,978$	$r=0,087$ $p=0,672$	$r=0,054$ $p=0,790$	$r=-0,114$ $p=0,586$	$r=-0,323$ $p=0,143$	$r=-0,244$ $p=0,219$	1

Die Leukozytenanzahl im peripheren Blut korrelierte negativ mit der „symptom-to-balloon time“ ( $r=-0,389$ ,  $p=0,045$ ).

Der initial gemessene Troponinwert korrelierte positiv mit der Anzahl CD14-positiver Zellen ( $r=0,451$ ,  $p=0,027$ ) und zeigte eine stark positive Korrelation mit der MIF-Zellzahl ( $r=0,501$ ,  $p=0,009$ ). Außerdem wurde für den maximal erhöht gemessenen Troponinwert eine positive Korrelation mit CD68 gefunden ( $r=0,446$ ,  $p=0,019$ ).

Für die CK zeigte sich ein stark positiver Zusammenhang mit CD14 ( $r=0,509$ ,  $p=0,011$ ) und ein mittlerer Zusammenhang mit MIF ( $r=0,444$ ,  $p=0,023$ ).

Der Cholesterinwert korrelierte positiv mit CD105 ( $r=0,491$ ,  $p=0,045$ ). Das High Density Lipoprotein (HDL) zeigte eine positive Korrelation mit CD105 ( $r=0,537$ ,  $p=0,022$ ) und das LDL zeigte eine starke positive Korrelation mit S100A4 ( $r=0,545$ ,  $p=0,036$ ).

Tabelle 23 gibt diese Korrelationsbeziehungen im Detail wieder.

**Tabelle 23: Korrelationsmatrix mit den Korrelationskoeffizienten nach Spearman bezüglich der Laborparameter und der „symptom-to-balloon time“**

Angegeben sind der Korrelationskoeffizient r und der dazugehörige p-Wert. Die gelb hinterlegten Felder zeigen signifikante Korrelationen. Wesentliche Ergebnisse sind die signifikant positiven Korrelationen zwischen den Entzündungsmediatoren CD14, CD68, CD105 und MIF mit den Myokardnekrose-Markern Troponin und Creatinkinase (CK).

	CD14 (Zellzahl)	CD68 (Zellzahl)	CD105 (Zellzahl)	MIF (Zellzahl)	TGFβ1 (Zellzahl)	CD42b (Fläche)	S100A4 (Fläche)	Gremlin1 (semiquant.)	symptom-to- balloon time
Leukozyten	r=0,175 p=0,414	r=0,099 p=0,624	r=0,104 p=0,606	r=0,267 p=0,187	r=0,011 p=0,957	r=0,050 p=0,811	r=0,131 p=0,562	r=0,306 p=0,120	r=-0,389 p=0,045*
Thrombozyten	r=-0,010 p=0,961	r=0,141 p=0,483	r=-0,078 p=0,697	r=0,144 p=0,482	r=0,002 p=0,993	r=-0,10 p=0,962	r=-0,023 p=0,918	r=0,171 p=0,395	r=-0,208 p=0,299
Hb	r=-0,026 p=0,904	r=0,049 p=0,806	r=0,029 p=0,892	r=-0,277 p=0,171	r=0,101 p=0,616	r=-0,287 p=0,165	r=-0,071 p=0,754	r=-0,077 p=0,703	r=-0,180 p=0,370
Troponin initial	r=0,451 p=0,027*	r=0,084 p=0,678	r=0,234 p=0,239	r=0,501 p=0,009**	r=0,101 p=0,616	r=0,070 p=0,741	r=0,621 p=0,241	r=0,246 p=0,216	r=-0,36 p=0,858
Troponin max.	r=0,159 p=0,458	r=-0,446 p=0,019*	r=-0,122 p=0,545	r=-0,071 p=0,729	r=-0,226 p=0,257	r=0,166 p=0,427	r=0,266 p=0,231	r=0,359 p=0,066	r=-0,417 p=0,030*
CK	r=0,509 p=0,011**	r=-0,002 p=0,993	r=0,169 p=0,398	r=0,444 p=0,023*	r=0,138 p=0,493	r=0,037 p=0,859	r=0,421 p=0,051	r=0,317 p=0,108	r=-0,218 p=0,275
CRP initial	r=0,239 p=0,271	r=0,137 p=0,505	r=0,233 p=0,251	r=0,184 p=0,379	r=0,330 p=0,099	r=0,055 p=0,797	r=-0,266 p=0,245	r=0,094 p=0,648	r=0,079 p=0,702
CRP max.	r=0,243 p=0,264	r=0,115 p=0,575	r=0,130 p=0,528	r=0,097 p=0,645	r=0,058 p=0,779	r=-0,209 p=0,326	r=0,096 p=0,678	r=0,060 p=0,770	r=0,199 p=0,329
Cholesterin	r=0,515 p=0,059	r=0,429 p=0,090	r=0,491 p=0,045*	r=0,185 p=0,477	r=0,452 p=0,069	r=-0,290 p=0,294	r=0,401 p=0,174	r=0,192 p=0,461	r=-0,236 p=0,309
HDL	r=0,136 p=0,629	r=0,157 p=0,533	r=0,537 p=0,022*	r=0,219 p=0,382	r=0,207 p=0,410	r=-0,354 p=0,179	r=-0,014 p=0,961	r=0,271 p=0,276	r=0,423 p=0,080
LDL	r=0,456 p=0,076	r=0,147 p=0,547	r=0,253 p=0,297	r=0,077 p=0,753	r=0,397 p=0,093	r=-0,187 p=0,474	r=0,545 p=0,036*	r=0,035 p=0,583	r=-0,300 p=0,212
Triglyceride	r=0,146 p=0,576	r=0,307 p=0,188	r=0,038 p=0,857	r=0,137 p=0,565	r=-0,144 p=0,546	r=-0,188 p=0,455	r=0,280 p=0,294	r=0,001 p=0,997	r=-0,189 p=0,424

## 4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 27 Aspirationsthromben von Patienten nach Myokardinfarkt mittels HE- und immunhistochemischen Färbungen analysiert. Ziel war es, die Zusammensetzung und das Alter intrakoronarer Thromben hinsichtlich inflammatorischer Vorgänge im zeitlichen Verlauf zu untersuchen. Darüber hinaus wurden klinische Daten des Patientenkollektivs erhoben, um mögliche Unterschiede in der Thrombenbeschaffenheit bei Subgruppen dieses Kollektivs zu untersuchen. Hierzu wurden acht Zellmarker und Proteine ausgewählt, die bei Inflammation, Immunregulation und fibrotischen Umbauvorgängen nachweislich eine wichtige Rolle spielen (CD14, CD68, CD42b, S100A4, MIF, TGF $\beta$ 1, CD105 und Grem1).

CD14 wird als Protein auf der Zelloberfläche von Monozyten exprimiert und dient mit der Erkennung von Membranbestandteilen gramnegativer Bakterien der Aktivierung und Verstärkung der angeborenen Immunabwehr. In den immunhistochemischen Färbungen dient CD14 als Marker für Monozyten (125, 126).

CD68 ist ein Membranprotein der Zelloberfläche von Makrophagen und wird in der Immunhistochemie als Marker für Makrophagen verwendet (127).

CD42b ist ein Oberflächenmembranprotein von Thrombozyten und wurde für diese Arbeit als immunhistochemischer Marker für Thrombozyten verwendet (128).

Das Protein S100A4 wird von Tumorzellen, aber auch von normalen Bindegewebszellen sezerniert und spielt bei Erkrankungen, die mit einer Gewebsfibrose assoziiert sind, eine wichtige Rolle (129, 131). Es stimuliert Fibroblasten zur Sekretion von Strukturkomponenten der Extrazellulärmatrix und fördert deren Ablagerung im Gewebe (131). S100A4 gilt in der Immunhistochemie als spezifischer Fibroblastenmarker. Die Forschungsergebnisse von Doroudgar et al. deuten außerdem auf eine relevante kardioprotektive Funktion von S100A4 im ischämiegeschädigten Myokard hin (132). Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass S100A4-Plasmaspiegel in Patienten nach MI signifikant höher sind und es sich in Zukunft eventuell als

Biomarker für eine Myokardischämie eignen könnte (142).

Das proinflammatorische Zytokin MIF moduliert die Funktion von Makrophagen und T-Zellen und spielt in der angeborenen Immunabwehr eine entscheidende Rolle. Insbesondere in der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen nimmt MIF eine Schlüsselfunktion ein (108). Signifikant höhere MIF-Plasmaspiegel bei ACS-Patienten gegenüber Patienten mit stabiler KHK heben die inflammatorische Bedeutung von MIF im Zusammenhang mit einem MI hervor (110). Auch in der Plaqueentstehung und -stabilisierung scheint es eine wichtige Funktion zu haben (109, 110). Wir analysierten die Expression von MIF in intrakoronaren Thromben, um Erkenntnisse bezüglich des Inflammationsgeschehens bei einem MI zu gewinnen. Dabei interessierten uns mögliche Expressionsunterschiede bei Subgruppen des Patientenkollektivs, die therapeutische Ansatzpunkte darstellen könnten.

TGF $\beta$ 1 ist maßgeblich an der Aktivierung von Fibroblasten beteiligt, die die Produktion und den Um- und Abbau von Extrazellulärmatrix steuern (118). Darüber hinaus scheint die Aktivierung des TGF $\beta$ -Signalwegs einen regulierenden Einfluss auf den entstandenen Myokardschaden, die inflammatorischen Prozesse und die Reparationsvorgänge zu haben (60, 114). TGF $\beta$ 1 konnte vorwiegend in Kardiomyozyten und Makrophagen oder in der Extrazellulärmatrix nachgewiesen werden (114, 120). Bei der vorliegenden Studie war von Interesse, ob TGF $\beta$  auch außerhalb von Kardiomyozyten in organisierten koronararteriellen Thromben vorkommt und ob es einen Zusammenhang mit der fibrotischen Umstrukturierung von Thromben gibt.

CD105, auch als Endoglin bekannt, wird von Monozyten während der Differenzierung zu Makrophagen vermehrt exprimiert und ist zudem ein spezifischer Marker für proliferierende Endothelzellen (118). Seine Expression in peri- und intratumoralen Gefäßen ist mit einer erhöhten Mortalität assoziiert (122). Auch nach einer renalen und kardialen Ischämie exprimieren Endothelzellen vermehrt CD105. In vitro- und in vivo-Versuche im Tiermodell zeigten, dass Hypoxie die Transkription bestimmter immunregulatorischer Gene induziert und zu einer vermehrten Expression führt (124). CD105 wird in vaskulären glatten Muskelzellen von atherosklerotischen Plaques

überexprimiert, während in normalen glatten Muskelzellen keine erhöhte Expression nachgewiesen wurde. Auch andere Gewebe, die fibrotischen Veränderungen unterliegen, zeigen eine CD105-Überexpression (118, 123).

Grem1 ist ein endogener Antagonist von MIF, bindet MIF mit hoher Affinität und hemmt so die TNF- $\alpha$ -Ausschüttung aus Makrophagen (111, 112). Es konnte gezeigt werden, dass ACS-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden und Patienten mit stabiler KHK die höchsten Plasmaspiegel an Grem1 und MIF aufweisen, wobei der Quotient aus Grem1/MIF bei ACS-Patienten am niedrigsten und mit dem Auftreten eines ACS assoziiert war (109). In Tierversuchen konnte Grem1 die Progression atherosklerotischer Gefäßveränderungen abschwächen, indem es zum einen die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen hemmt und zum anderen die Cholesterolaufnahme von Makrophagen reduziert (111). Für die vorliegende Arbeit war daher die Expression von Grem1 in intrakoronaren Thromben von Interesse.

## **4.1 Interpretation der Ergebnisse im aktuellen wissenschaftlichen Kontext**

### **4.1.1 Die Morphologie intrakoronarer Thromben**

Die vorliegende Studie kann keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen der morphologischen Zusammensetzung intrakoronarer Thromben und den analysierten Zellmarkern nachweisen (siehe Kapitel 3.2).

Um die Abhängigkeit der erhobenen Daten untereinander zu untersuchen, wurden Korrelationsanalysen durchgeführt. Signifikante positive Korrelationen zeigen sich hierbei zwischen den verschiedenen inflammatorischen Zellen und Mediatoren wie Monozyten (CD14), Makrophagen (CD68), MIF und TGF $\beta$ 1 (siehe Kapitel 3.6). Diese Zusammenhänge bestätigen unsere Erwartungen und deuten auf ein enges Zusammenspiel dieser Zellen und Proteine bei der Inflammation und Regeneration im Rahmen eines MI hin.

Um die morphologische Zusammensetzung und Organisation koronarer Thromben im zeitlichen Verlauf besser verstehen zu können, wurden die Thromben hinsichtlich ihrer Morphologie eingeteilt in thrombozytenreich, erythrozytenreich, zellreich, fibrotisch und gemischt (siehe Kapitel 2.5, Abbildung

7). Die morphologische Charakterisierung der Thromben orientierte sich dabei am zeitlichen Verlauf der Thrombenentstehung (siehe Kapitel 1.3.3).

Vorwiegend thrombozytenreiche Thromben finden sich in unserer Studie nicht. Vielmehr sind Thrombozyten zu unterschiedlich großen Anteilen Bestandteil aller analysierten Thromben. Dies könnte zum einen dadurch erklärt werden, dass thrombozytenreiche Thromben relativ frisch entstandene Thromben sind und sich die Thrombusbeschaffenheit bis zum Zeitpunkt der Aspiration durch die Infiltration von weiteren Zellen bereits verändert hat (66-68, 73, 143). Zum anderen könnte es sein, dass thrombozytenreiche Thromben aufgrund des sich noch stabilisierenden Fibrinnetzwerkes insgesamt fragiler sind als ältere Thromben und dadurch bei der Katheterpassage leichter beschädigt werden und der Thrombozytenanteil so geringer erscheint.

In der vorliegenden Studie sind die jüngsten Thromben zu ca. 41 % (n=11) vorwiegend erythrozytenreich. Sie weisen, abgesehen von TGF $\beta$ 1, die insgesamt geringste Expression der gefärbten Biomarker auf. Sie enthalten den geringsten Anteil an CD14-, CD68- und MIF-exprimierenden inflammatorischen Zellen wie Monozyten und Makrophagen (siehe Abbildung 11 und Tabelle 12). Dieser im Vergleich zu den Thromben älterer Morphologie geringe Anteil kann durch das kürzere Bestehen des Thrombus erklärt werden. Zum Zeitpunkt der Gefäßokklusion sind im Thrombus weniger Inflammationszellen enthalten, da diese erst mit zunehmender Thrombusorganisation im Fibrinnetz eingefangen werden, bevor schließlich ein roter Thrombus entsteht (68). Später kommt es durch fortlaufende Chemotaxis durch neutrophile Granulozyten zur Rekrutierung weiterer Zellen wie Monozyten und Makrophagen.

In einer Studie von Silvain et al. erwiesen sich frische, thrombozytenreiche Thromben als <1 h alt (67). Silvain et al. konnten in ihrer Studie an 44 intrakoronaren Thromben einen Zusammenhang zwischen den Thrombuskomponenten und der Ischämiezeit nachweisen. Mit ca. 60 % war Fibrin der Hauptbestandteil der Thromben. Thrombozyten, Erythrozyten, Cholesterinkristalle und Leukozyten bildeten die übrigen ca. 40 %. „Frische“ Thromben (<1 h Ischämiezeit), wiesen den größten Thrombozytenanteil auf. Während der Fibrinanteil mit der Zeit zunahm, nahm der Thrombozytenanteil mit



der Zeit ab. Ältere Thromben mit einer Ischämiezeit >6 h zeigten eine fibrin- und erythrozytenreiche Zusammensetzung und wiesen einen geringeren Thrombozytenanteil auf als „frische“ Thromben.

Diese Altersklassifizierung von Silvain et al. entspricht zum Teil auch unserer Beobachtung, dass Thromben <6 h vorwiegend Erythrozyten enthalten (siehe Kapitel 2.5). Die Verteilung von Fibrin wurde in unserer Studie nicht untersucht. Ein Unterschied zu der Studie von Silvain et al. ist, dass sich keine vorwiegend thrombozytenreichen Thromben in unserer Morphologie-Einteilung finden. Die Analyse des Thrombozytenmarkers CD42b zeigt hierzu keine signifikanten Unterschiede zwischen den Morphologie-Gruppen (siehe Tabelle 12). Eine zu erwartende prozentuale Abnahme des Thrombozytenanteils mit dem Alter, wie es in anderen Studien bereits beschrieben wurde, kann unsere Studie daher nicht bestätigen (67, 69). Dieses unerwartete Ergebnis könnte auf eine teilweise Beschädigung der Thromben bei der Aspiration oder der Aufbereitung zurückzuführen sein.

Ein methodischer Unterschied in der Studie von Silvain et al. ist, dass die Oberflächen der Thromben mittels Elektronenmikroskopie untersucht wurden, während in der vorliegenden Arbeit ausschließlich Thrombusschnitte mittels immunhistochemischer und HE-Färbungen lichtmikroskopisch analysiert wurden. Die sehr hohe Auflösung des Elektronenmikroskops ermöglicht Bilder mit höherer Vergrößerung der Thrombenoberflächen, die mit einem Lichtmikroskop physikalisch nicht möglich sind. Der Vorteil der Immunhistochemie liegt wiederum in der gezielten Erkennung bestimmter Antigene in Gewebeschnitten, welche mit Hilfe verschiedener Antikörperfärbungen sichtbar gemacht werden können (140).

In der vorliegenden Studie weist die Gruppe der zellreichen Thromben mit ca. 18,5 % (n=5) eine zunehmende Zellinfiltration auf. Die zellreichen Thromben werden bereits von zunehmend mehr CD14-positiven Monozyten und CD68-positiven Makrophagen infiltriert (siehe Tabelle 12 und Abbildung 7b). Die CD14-Zellzahlen sind in der Gruppe der jüngeren erythrozytenreichen Thromben am niedrigsten und nehmen im Verlauf bei den zellreichen und fibrotischen

Thromben zu. Diese Unterschiede zwischen den Gruppen erreichen jedoch in unserer Studie keine Signifikanz.

Rittersma et al. etablierten eine Methode zur Klassifizierung des Thrombusalters nach histologischen Merkmalen. Danach werden Thromben in frisch, lytisch und organisiert eingeteilt (66, 141). Frische Thromben (< 1 Tag) setzen sich nach Rittersma et al. aus Schichten von Thrombozyten, Fibrin, Erythrozyten und intakten Granulozyten zusammen. Lytische Thromben (1-5 Tage alt) sind durch Areale mit Kolliquationsnekrosen und Karyorrhesis von Granulozyten gekennzeichnet. In organisierten Thromben (>5 Tage) sind einwachsende glatte Muskelzellen mit oder ohne Bindegewebsablagerungen und kapilläre Gefäße zu sehen. Unsere Thromben wurden in Anlehnung an Rittersma et al. eingeteilt (66). Unsere Studie unterscheidet sich von der von Rittersma et al. dahingehend, dass wir CD105 als immunhistochemischen Marker für proliferierende Endothelzellen zum Nachweis einsprossender Gefäße verwendeten. In die organisierten Thromben einwachsende glatte Muskelzellen wurden nicht gesondert gefärbt, sondern anhand bildmorphologischer Merkmale in der HE-Färbung charakterisiert.

In der vorliegenden Studie zeigt die Gruppe der fibrotischen Thromben Zeichen einer Nekrose mit zunehmender Fragmentierung und Auflösung des Zellkerns (Alter >24 h) (Abbildung 7c). Diese als fibrotisch bezeichneten Thromben entsprechen morphologisch der Einteilung ‚lytisch‘ von Rittersma et al. und machen ca. 11 % (n=3) aus.

Die mit knapp 30 % (n=8) große Gruppe der gemischten Thromben zeigt einen deutlich organsierteren Aufbau als die anderen Gruppen und weist Anteile aller Thrombusbestandteile auf (Abbildung 7d). Auch wenn nicht signifikant unterschiedlich, sind hier die meisten CD68-positiven Zellen und gleichzeitig ein geringer Anteil CD14-positiver Zellen nachweisbar (siehe Tabelle 12). Dies könnte unserer Auffassung nach mit der Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen in Zusammenhang stehen und auf eine Art Umkehrpunkt von einer proinflammatorischen Immunantwort zu einer regenerativen Entwicklung in den Thromben hindeuten. Eine statistisch ebenfalls nicht signifikante Zunahme der

CD105-Expression über die Morphologie-Gruppen hinweg könnte mit dieser Zelldifferenzierung zusammenhängen. CD105 wird von Monozyten während der Differenzierung zu Makrophagen vermehrt exprimiert und ist darüber hinaus ein spezifischer Marker für proliferierende Endothelzellen (118).

Monozyten und Makrophagen zeichnen sich durch ihre große morphologische und funktionale Plastizität aus. Monozyten werden als Antwort auf ein ischämisches Ereignis aus dem Knochenmark und der Milz zum Herzen rekrutiert und differenzieren sich dort zu Makrophagen (117, 144). Die kontrolliert und koordiniert ablaufende Aktivierung dieser Zellen ist für eine optimale Infarktheilung essenziell und fördert die Resorption von apoptotischen Zelltrümmern, den Abbau extrazellulärer Matrixkomponenten, die Entstehung von Granulationsgewebe und die Neoangiogenese (117, 144, 145). Man unterscheidet verschiedene Subtypen, die über proinflammatorische Eigenschaften verfügen (M1-Makrophagen) und solche, die antiinflammatorisch und immunregulatorisch wirken (M2-Makrophagen) (117). Eine Unterscheidung ist anhand unserer Methoden nicht möglich. Eine differenziertere durchflusszytometrische Analyse hinsichtlich weiterer spezifischer Oberflächenproteine von Makrophagen könnte hier zur Unterscheidung der verschiedenen Zellentitäten beitragen.

Neben wichtigen Funktionen im Rahmen der Inflammation und der Angiogenese reguliert TGF $\beta$ 1 die Entstehung von Granulationsgewebe, wirkt beim Remodeling der Extrazellulärmatrix mit und ist essenziell an der Reepithelialisierung von Wunden beteiligt (116, 118). TGF $\beta$ 1 spielt hierbei eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von Fibroblasten, welche große Mengen an extrazellulärer Matrix produzieren und deren Ab- und Umbau steuern (118). TGF $\beta$ 1 zeigt in allen vier Morphologie-Gruppen die höchste Anzahl positiv gefärbter Zellen (siehe Tabelle 12).

Der Fibroblastenmarker S100A4 stimuliert Fibroblasten, trägt zur Synthese der Strukturkomponenten der Extrazellulärmatrix bei und fördert deren Ablagerung im Gewebe (131). Ein daher angenommener gleichförmiger Anstieg der S100A4- und der TGF $\beta$ 1-Expression ist in unserer Studie nicht nachweisbar. Vielmehr zeigt sich eine annähernd gleich hohe, nicht signifikant unterschiedliche

Expression über alle Morphologie-Gruppen hinweg. Die gemessene Fläche liegt im Median bei 21-30 % (Tabelle 12).

Dass ältere fibrotische und organisierte Thromben in unserer Studie keinen größeren Anteil an Fibroblasten aufweisen als jüngere Thromben, ist unerwartet. Gründe hierfür könnten auf methodische Ungenauigkeiten zurückzuführen sein, die dazu führen, dass nicht der gesamte Thrombus abgebildet wird. Eine Beschädigung der Thromben bei Aspiration oder Weiterverarbeitung könnte zu einer geringeren Thrombusfläche und veränderten Auswertungsergebnissen führen.

Darüber hinaus deuten die Forschungsergebnisse von Doroudgar et al. auf eine kardioprotektive Wirkung von S100A4 im ischämiegeschädigten Myokard und auf eine Verbesserung der kardialen Pumpfunktion durch S100A4 nach Myokardinfarkt hin (132). Eine Fall-Kontroll-Studie von Gong et al. mit 173 Probanden fand heraus, dass die S100A4-Serumspiegel bei Patienten nach akutem MI signifikant höher sind als die Serumspiegel bei gesunden Kontrollprobanden (142). Sie kamen zu dem Schluss, dass S100A4 in der Zukunft als Biomarker für einen akuten MI in Betracht kommen könnte und dass erhöhte Serumspiegel auf einen Schutzmechanismus des Herzens bei Patienten mit akutem MI hindeuten könnten (142). Bezogen auf die Ergebnisse der S100A4-positiven Thrombusfläche in der vorliegenden Studie, könnte die annähernd gleiche Expression von S100A4 in den vier Morphologie-Gruppen eventuell eine protektive Antwort des Herzens auf das ischämische Myokard darstellen (132). Weitere umfangreichere Studien hierzu sind nötig.

Ab der Gruppe der zellreichen Thromben steigt die Verteilung der CD68-positiven Zellen in nicht signifikanter Weise an und zeigt in der Gruppe der gemischten Thromben die stärkste Expression (siehe Tabelle 12).

Fuijkschot et al. untersuchten den inflammatorischen Zellgehalt in intrakoronaren Thromben bei 113 STEMI-Patienten in Abhängigkeit vom Thrombusalter und konnten damit interessante Einblicke in die involvierten Zelltypen geben (138). Sie charakterisierten die Thromben nach histologischen Merkmalen anhand der Klassifizierungsmethode von Rittersma et al. in frische, lytische und organisierte

Thromben (66). Neutrophile Granulozyten fanden sich in organisierten Thromben signifikant weniger als in frischen und lytischen Thromben. CD68-positive Makrophagen waren hingegen in lytischen Thromben präsenter als in frischen und organisierten Thromben. Die Anzahl der Lymphozyten unterschied sich nicht wesentlich zwischen den Gruppen. Die Thromben jüngerer Patienten (<50 Jahre) enthielten signifikant mehr neutrophile Granulozyten und CD68-positive Monozyten und Makrophagen als die Thromben älterer Patienten. In der Gruppe der lytischen Thromben wiesen Fuijkschot et al. signifikant mehr CD68-positive Zellen nach.

Unsere Ergebnisse stimmen mit Fuijkschot et al. darin überein, dass ältere Thromben mehr CD68-positive Makrophagen enthalten. Sie unterscheiden sich jedoch dahingehend, dass CD68-positive Zellen in unserer Studie ab der Gruppe der zellreichen Thromben ansteigen und in der Gruppe der ältesten gemischten Thromben am meisten exprimiert werden. Da unsere Gruppe der fibrotischen Thromben jedoch nur drei Thromben umfasst und die ausgezählten Zellzahlen dieser drei Thromben eine große Streuung aufweisen (siehe Tabelle 12), sind unsere Ergebnisse mit denen von Fuijkschot et al. bezüglich der fibrotischen Thromben nicht direkt vergleichbar und sollten daher in einem größeren Kollektiv untersucht werden. Ein weiterer Unterschied zu der Studie von Fuijkschot et al. sind zusätzliche immunhistochemische Färbungen weiterer Immunzellen. Fuijkschot et al. färbten zusätzlich neutrophile Granulozyten und Lymphozyten immunhistochemisch an, während wir uns auf Monozyten und Makrophagen konzentrierten.

Eine weitere interessante Studie zur Infiltration von koronaren Thromben durch inflammatorische Zellen stammt von Ramaiola et al. Sie konnte zeigen, dass sich die Infiltration von Leukozyten-Subtypen mit zunehmender „symptom-to-balloon time“ verändert (69). In den Thromben <3 h fanden sich hauptsächlich Thrombozyten und Fibrinogen, während sich in den Thromben >6 h ein geringerer Thrombozytengehalt und signifikant mehr T- und B-Zell-Infiltrate fanden. In den Thromben <3 h waren hingegen kaum Lymphozyten zu finden. Ansammlungen von Neutrophilen und Monozyten waren in jüngeren Thromben bereits vorhanden und blieben auch bei den älteren Thromben in hoher, aber

nicht signifikanter Zahl nachweisbar. Makrophagen waren in >90 % der Thromben zu finden, allerdings ebenfalls ohne signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen.

CD14-positive Monozyten konnten auch in der vorliegenden Studie ab der jüngsten Gruppe der erythrozytenreichen Thromben nachgewiesen werden, allerdings ebenfalls nicht in statistisch signifikanter Zahl. Gleiches gilt für die CD68-positiven Makrophagen (siehe Tabelle 12).

Das durch Makrophagen exprimierte proinflammatorische Zytokin MIF spielt bei der angeborenen Immunabwehr auf Infektionen und der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen eine entscheidende Rolle (107, 108). Nach Kontakt des Immunsystems mit Krankheitserregern oder anderen proinflammatorischen Zytokinen kommt es nach einer raschen Freisetzung von MIF aus Makrophagen ins Gewebe oder in die Blutbahn zur Aktivierung weiterer Immunabwehr (106, 107).

Die MIF-Expression nimmt in der vorliegenden Studie mit zunehmendem morphologischem Thrombusalter zu und fällt in den gemischten Thromben wieder ab, wobei die MIF-Expression sich nicht signifikant zwischen den Morphologie-Gruppen unterscheidet (siehe Tabelle 12). Eine gleichförmige Zunahme der MIF-, CD14- und CD68-Expression in den morphologischen Altersgruppen unterstreicht zusammen mit statistisch signifikanten positiven Korrelationen zwischen diesen verschiedenen Inflammationsmarkern die Rolle von MIF bei der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen.

#### **4.1.2 Die „symptom-to-balloon time“**

Die Analysen unserer Arbeit zeigen keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen der Expression der gefärbten Marker und dem mittels „symptom-to-balloon time“ bestimmten Thrombenalter (siehe Kapitel 3.3).

Da die „symptom-to-balloon time“ bei etwa einem Drittel der Patienten nicht zuverlässig zu bestimmen war, nahmen wir anhand der zusätzlichen Kriterien wie der Troponindynamik, der Beurteilung des EKGs und der teilweise bekannten „symptom-to-balloon time“ eine Einteilung in die drei definierten Thrombenalter-Gruppen 0-6 h, 7-24 h und >24 h vor (siehe Kapitel 2.3). Auch nach Einteilung

der Thromben in die definierten Altersgruppen zur exakteren Bestimmung des Thrombenalters, sind keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen nachweisbar. Eine ebenfalls durchgeführte ROC-Analyse bestätigt, dass es für die vorliegenden Daten keinen Zusammenhang zwischen der Expression der gemessenen Biomarker und der „symptom-to-balloon time“ gibt. Korrelationen zwischen den Markern und der „symptom-to-balloon time“ zeigen ebenfalls keinen Zusammenhang (siehe Kapitel 3.6, Tabelle 22).

Diese Ergebnisse sind unerwartet, da viele pathologische Untersuchungen die Atheroskleroseentstehung und die Entwicklung hin zu einem ACS als inflammatorisches Krankheitsgeschehen beschrieben haben (32-34). Eine Veränderung der inflammatorischen Zellen im okkludierenden Thrombus über die Zeit wäre deshalb unserer Meinung nach zu erwarten gewesen.

Die Bestimmung des Thrombenalters auf Grundlage der „symptom-to-balloon time“ stellte sich in unserer Studie als zu ungenau heraus. Gründe hierfür waren meist stille oder asymptomatische Verläufe. Auch unvollständige Dokumentation in der Patientenakte führten retrospektiv zu Schwierigkeiten, den Zeitpunkt des Symptombeginns genau zu bestimmen. In verschiedenen anderen Studien erwies sich die Klassifizierung des Thrombenalters basierend auf der „symptom-to-balloon time“ und der so geschätzten Ischämiezeit ebenfalls als inadäquat (66, 146, 147). Wir nehmen daher an, dass die Okklusion der betroffenen Koronararterie und der Symptombeginn als zweizeitige Ereignisse zu verstehen sind.

Cannon et al. veröffentlichten im Jahr 2000 eine große multizentrische Studie mit über 27.000 Patienten, die mehr als die Hälfte der PCI-durchführenden Krankenhäuser in den USA umfasste. Untersucht wurde der Zusammenhang zwischen der Krankenhausmortalität nach PCI und der „symptom-to-balloon time“ und der „door-to-balloon time“ (der Zeit von der Krankenhausaufnahme bis zur Intervention) (148). Unerwarteterweise zeigte sich mit zunehmender „symptom-to-balloon time“ kein signifikanter Anstieg der Krankenhausmortalität. Hingegen erhöhte sich die Mortalität mit zunehmender Verzögerung der „door-to-balloon time“ von >2 h signifikant um 40-60 %. Dies erscheint widersprüchlich, da zum einen eine über 20 Minuten dauernde komplette Ischämie zu einer

irreversiblen Myokardnekrose führt und das Ausmaß der Nekrose mit der Ischämiedauer jenseits dieser Dauer steigt (47, 149). Zum anderen ist durch viele epidemiologischen Studien belegt, dass die ersten 30 Tage nach MI das höchste Risiko für einen plötzlichen Herztod darstellen und Frühkomplikationen gehäuft in den ersten Stunden nach dem Infarkt auftreten. (75-77). Das Risiko für ventrikuläre Arrhythmien bleibt für eingewiesene Patienten, die nicht bereits präklinisch versterben, deutlich erhöht und wird unter anderem vom Ausmaß des Myokardschadens, von rezidivierenden Ischämien und von Elektrolytentgleisungen beeinflusst (75). Maligne Rhythmusstörungen wie eine anhaltende Ventrikuläre Tachykardie oder Kammerflimmern treten bei etwa 20 % der Patienten auf und sind mit einer schlechten Prognose assoziiert (79). Dass die „symptom-to-balloon time“ und die Krankenhausmortalität in keinem statistisch signifikanten Zusammenhang stehen, die „door-to-balloon time“ hingegen schon, wirft daher methodische Fragen auf. Der auf der subjektiven Aussage des Patienten basierende Symptombeginn scheint daher ein unpräziser Parameter zu sein.

In einer anderen Studie von Wanamaker et al. wurde der Zusammenhang zwischen dem Troponinwert bei Aufnahme und der Krankenhausmortalität bei Patienten nach primärer PCI aufgrund eines STEMI untersucht (73). Es handelt sich um eine große multizentrische prospektive Studie in einer über 14.000 Patienten umfassenden Kohorte. Sie konnte zeigen, dass die Troponinwerte bei Aufnahme prognostische Aussagekraft für Patienten nach STEMI besitzen. Patienten mit nicht detektierbaren oder noch im Referenzbereich liegenden initialen Troponinwerten wiesen eine deutlich geringere Mortalitätsrate auf als Patienten mit bereits bei Aufnahme erhöhten Troponinwerten (1,8 % vs. 5,1 %). Patienten aus der Gruppe mit den höchsten Troponinwerten bei Aufnahme hatten die höchste innerklinische Mortalitätsrate. Im Gegensatz dazu hatten Patienten mit niedrigen bzw. noch nicht detektierbaren Troponinwerten eine niedrigere Mortalität. Pathophysiologisch ist dies dadurch erklärbar, dass der Infarktbeginn bei Patienten mit biochemisch bereits nachweisbarer Troponinerhöhung länger zurückliegt als bei Patienten mit noch nicht messbaren Troponinwerten. Es ist bekannt, dass Troponin innerhalb von 3 bis 4 h nach der Myokardschädigung



anzusteigen beginnt (51). Die Höhe des Troponins korreliert dabei nachweislich mit der Infarktgröße und der Ischämiezeit, was sich in einer verminderten Überlebensrate zeigt (53-55). In der Studie von Wanamaker et al. stellte sich auch heraus, dass die Bestimmung der Ischämiezeit basierend auf der Patientenanamnese insbesondere für Patienten mit atypischen Verläufen unpräzise ist. Bei über der Hälfte der Patienten konnte der Symptombeginn nicht zuverlässig geschätzt werden (73).

Auch in der vorliegenden Arbeit ist zwischen dem initialen Troponinwert und der „symptom-to-balloon time“ kein statistischer Zusammenhang nachweisbar. Zudem konnte keine signifikante Korrelation der „symptom-to-balloon time“ mit den analysierten Zellfärbungen gefunden werden. Die zusätzlich durchgeführte ROC-Analyse erbrachte für die vorliegenden Daten keinen Zusammenhang zwischen der Expression der analysierten Zellen und der „symptom-to-balloon time“ (siehe Kapitel 3.3). Diese Erkenntnisse bestätigen die Ergebnisse anderer Studien und lassen die Schlussfolgerung zu, dass der Symptombeginn kein klinisch zuverlässiger Parameter für die Bestimmung der Ischämiezeit ist.

Der Troponinverlauf liefert diesbezüglich vielversprechendere Daten. Mahmoud et al. berichteten 2015 in ihrer Studie davon, dass der vom Patienten angegebene subjektive Symptombeginn zeitlich nach dem tatsächlichen biochemischen STEMI-Beginn zu liegen scheint (150). Insbesondere Patientengruppen mit häufigeren atypischen Verläufen, wie Frauen, Diabetiker und ältere Patienten, tragen laut Mahmoud et al. zur Ungenauigkeit des Parameters Symptombeginn bei. Um den biochemischen STEMI-Beginn zu berechnen, erfolgten zur Bestimmung des Troponinspiegels wiederholte Blutabnahmen bei Aufnahme, nach 3 h und nach 6 h. Die Troponinfreisetzung in STEMI-Patienten hat eine berechenbare Kinetik. Einen monoexponentiellen Troponin-Anstieg bei STEMI-Patienten annehmend, wurde daher nach logarithmischer Transformation von Zeit und Troponinwert eine Regressionsgerade durch die steigenden Troponinwerte jedes einzelnen Patienten gelegt. Mittels Extrapolation konnte anschließend auf den Zeitpunkt des initialen Troponinanstiegs geschlossen werden. Davon ausgehend wurde der STEMI-Beginn, der Beginn der koronaren Okklusion, errechnet (150). Mahmoud et al. kamen zu dem interessanten

Ergebnis, dass der vom Patienten berichtete subjektive Symptombeginn mit einem Median von -4,2 h (IQR -11,1 bis -1,9 h) zeitlich nach dem tatsächlichen biochemischen STEMI-Beginn liegt. Dies traf besonders bei älteren Patienten, Patienten mit niedrigem BMI, bei Patienten ohne PCI in der Vorgeschichte und bei Patienten mit residuellem Fluss der betroffenen Koronararterie zu. Die biochemisch bestimmte Ischämiezeit korrelierte in der genannten Studie mit dem Troponin-Spitzenwert und der Mortalität (150). Diese Ergebnisse von Mahmoud et al. liefern eine plausible Erklärung, warum sowohl in der vorliegenden als auch in vorherigen Studien die Bestimmung der Symptombdauer als Indikator für die Ischämiezeit keine überzeugenden Ergebnisse erbracht hat (148, 150-152).

Darüber hinaus konnten verschiedene histologische Studien zeigen, dass eine große Zahl intrakoronarer Thromben von Patienten mit STEMI bereits Tage oder Wochen alt sind, wenn sie per Aspiration oder Thrombektomie geborgen werden (66, 73, 143). Dies steht im Gegensatz zu dem sich meist wenige Minuten oder Stunden zuvor ereigneten akuten Schmerzbeginn des Patienten. Diese Erkenntnisse und die zuvor beschriebene Ungenauigkeit der „symptom-to-balloon time“ legen die Vermutung nahe, dass ein längerer und dynamischer Prozess der Plaqueinstabilität und Thrombusformation vorangeht, bevor es zur Okklusion und Ausbildung von Symptomen kommt.

Eine kleine retrospektive Fallstudie von Henriques de Gouveia et al. an elf innerhalb der ersten Stunde am plötzlichen koronaren Herztod verstorbenen jungen Erwachsenen <35 Jahren zeigte, dass sich die Zusammensetzung der Plaques in jüngeren und älteren Patienten unterscheidet (143). Die Plaques der jüngeren Patienten wiesen eine deutliche Hyperplasie glatter Muskelzellen und dickere und zellreichere Kappen auf. Große Lipidkerne und Thrombusformationen wurden im Vergleich zu Plaques älterer Patienten hingegen deutlich seltener beobachtet. Der überwiegende Teil der Thromben war nicht auf Plaquerupturen, sondern auf Erosionen als unmittelbare Ursache koronarer Thrombenbildung zurückzuführen. Interessanterweise war ein erheblicher Teil dieser Thromben (8 von 11) histologisch bereits organisiert.

Die Erkenntnisse aus den aufgeführten Studien deuten stark auf einen Beginn der Thrombusentstehung bereits Tage bis Wochen vor dem akuten Ereignis hin

(66, 73, 143). Zudem unterstreichen sie die immense Wichtigkeit einer Kontrolle der kardiovaskulären Risikofaktoren und der Aufrechterhaltung bzw. Wiederherstellung einer physiologischen Endothelfunktion, solange diese noch beeinflussbar ist.

#### **4.1.3 Vergleich der Zellexpressionen mit klinischen Parametern**

Neben der Analyse der Thrombenzusammensetzung hinsichtlich inflammatorischer Vorgänge wurden in dieser Studie zusätzlich klinische Daten des Patientenkollektivs erhoben, um mögliche Unterschiede in der Thrombenbeschaffenheit bei Subgruppen des Kollektivs zu untersuchen. Ziel war es, relevante Unterschiede zu entdecken, die für die betroffenen Patientengruppen von therapeutischer Relevanz sein könnten.

##### **4.1.3.1 Die CD14-Expression in NSTEMI-Patienten**

Bei der Analyse der klinischen Parameter zeigt sich, dass Patienten mit NSTEMI signifikant mehr CD14-positive Zellen in den Thromben aufweisen als STEMI-Patienten (siehe Kapitel 3.5, Abbildung 26).

Die Leukozytenzahl, CRP, Troponinwert und CK sind in unserer Arbeit über die Norm erhöht nachweisbar, erreichen jedoch zwischen der STEMI- und NSTEMI-Gruppe keine Signifikanz. Der initial bei Aufnahme gemessene Troponinwert aller Patienten korrelierte außerdem positiv mit der Anzahl der CD14-positiven Monozyten und des proinflammatorischen Zytokins MIF, welches von Monozyten und Makrophagen exprimiert wird (107). Die ebenfalls zu den Herzenzymen zählende, aber nicht herzspezifische CK weist in unseren Thromben eine stark positive Korrelation mit CD14 und MIF auf. Der Troponin-Spitzenwert korreliert hingegen interessanterweise positiv mit der Anzahl der CD68-exprimierenden Makrophagen (siehe Tabelle 23). Diese signifikanten Korrelationen der proinflammatorischen Zellen, Zytokine und Herzinfarktmarker weisen auf ein enges Zusammenspiel der durch die Myokardischämie induzierten inflammatorischen Prozesse bereits kurze Zeit nach Symptombeginn hin.

Montange et al. untersuchten 2012 erstmals den Zusammenhang zwischen im peripheren Blut gemessenen CD14-positiven Zellen, der Infarktgröße und der linksventrikulären EF bei 62 Patienten mit STEMI und NSTEMI (153). Die Anzahl

CD14-positiver Zellen erwies sich in der Gruppe der NSTEMI-Patienten niedriger als in der STEMI-Gruppe, allerdings war dieser Unterschied statistisch nicht signifikant. Ein signifikanter Unterschied konnte zwischen STEMI- und NSTEMI-Patienten bezüglich der Infarktgröße beobachtet werden. Zudem korrelierte bei STEMI-Patienten die CD14-Zellzahl mit der Infarktgröße. In der Gruppe der NSTEMI-Patienten zeigte sich diesbezüglich keine signifikante Korrelation.

Die Ergebnisse von Montange et al. und andere Studien zeigen, dass eine große Ausdehnung des Infarktgebietes mit einer stärkeren inflammatorischen Immunantwort assoziiert ist und infolgedessen auch mit höheren Leukozytenzahlen im peripheren Blut einhergeht (64, 153, 154). Ein nicht nachweisbarer Zusammenhang zwischen den CD14-positiven Zellen und der Infarktgröße oder der linksventrikulären EF könnte in diesem Kontext auf eine geringer ausgeprägte Myokardnekrose und in der Folge auf eine geringer ausgeprägte Inflammationsreaktion bei NSTEMI-Patienten hindeuten (153).

Die Ergebnisse von Montange et al. unterscheiden sich hier allerdings von unseren, die einen signifikanten Unterschied in der CD14-Expression bei Patienten mit NSTEMI zeigen konnten (siehe Kapitel 3.5.1, Abbildung 26). Diese unterschiedlichen Ergebnisse können in unterschiedlichen Methoden begründet liegen.

Infarktheilung ist ein komplexer und dynamischer Prozess, der in großem Umfang von Monozyten beeinflusst wird (41). Infolge eines akuten MI kommt es zu vermehrter chemotaktischer Rekrutierung von Monozyten aus dem Knochenmark zum Ort der Gewebeschädigung. Monozyten tragen so auch zur Heilung des ischämischen Gewebes nach Infarkt bei und können ein ungünstiges Remodeling des linken Ventrikels verhindern (41, 145, 155). Ein koordiniert ablaufender Heilungsprozess ist daher von großer Bedeutung für den Erhalt der linksventrikulären Funktion (41).

Leers et al. untersuchten 2017 erstmals diese Heterogenität von Monozyten bei Patienten mit instabiler AP, STEMI und NSTEMI (41). Dazu untersuchten sie Blutproben von 122 Patienten in der Akutphase des Herzinfarktes mittels Flusszytometrie, um die unterschiedlichen Monozyten-Subtypen zu identifizieren. Sie konnten dabei unterschiedliche immunphänotypische Muster

bei Patienten mit STEMI und NSTEMI beobachten. Leukozyten und insbesondere Monozyten zeigten einen signifikanten Anstieg bei allen ACS-Patienten. Hierbei wiesen die klassischen Monozyten (CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>-</sup>) von NSTEMI-Patienten einen signifikanten Anstieg gegenüber den Patienten mit instabiler AP auf. Bei genauerer immunphänotypischer Analyse zeigte sich bei diesen NSTEMI-Patienten auch eine signifikant höhere CD11b-Expression (41). CD11b ist ein Adhäsionsmolekül an der Oberfläche von Monozyten, das Leukozytenadhäsion und -migration vermittelt (41). Diesen CD11b-positiven Monozyten konnte im Mausmodell eine entscheidende Rolle bei der Genese der Atherosklerose zugeschrieben werden (156). Die erhöhte CD11b-Expression könnte daher nicht direkt mit der akuten Einengung des Gefäßlumens zusammenhängen, sondern Teil einer bereits zuvor chronisch ablaufenden Gefäßerkrankung sein. Dies könnte eine Erklärung für die signifikant höhere CD11b-Expression in NSTEMI-Patienten im Vergleich zu STEMI-Patienten darstellen. Die Entwicklung eines NSTEMI läuft schrittweise und chronisch ab, so dass CD11b-positive Monozyten gehäuft im Blut dieser Patienten gefunden werden (41).

Die Ergebnisse von Leers et al. und Montange et al. bezüglich der CD14-Expression in STEMI- und NSTEMI-Patienten geben einen Einblick in die sehr komplexen Funktionen der Monozyten (41, 153). Unsere und die genannten Studien unterscheiden sich, wie bereits erwähnt, in den angewendeten Methoden. Während sowohl Montange et al. als auch Leers et al. die Flusszytometrie zur Analyse und Differenzierung der im Blut zirkulierenden Monozyten nutzten, führten wir immunhistochemische Analysen von fixierten Thromben durch. Auch wenn sich die Studien hinsichtlich Fragestellung, Methodik, Gruppengrößen u.a. unterscheiden, so können sich gewisse Aspekte in der Gesamtbetrachtung auch ergänzen.

Verglichen mit Montange et al. geben unsere Analysen einen früheren Zeitpunkt des Myokardinfarkts wieder. Wir gehen davon aus, dass die Zellkomponenten unserer Thromben zum überwiegenden Teil die inflammatorische Situation um den Zeitpunkt der Thrombusbildung und Okklusion bis hin zur Aspiration wiedergeben. Dies ist früher, als die flusszytometrischen Analysen bei Aufnahme

des Patienten ins Krankenhaus in den genannten Studien zeigen. Die Immunantwort auf den entstandenen und sich eventuell weiter ausdehnenden Myokardschaden wird erwartungsgemäß zunehmen und mit höheren Leukozytenzahlen im peripheren Blut einhergehen (64, 153, 154). In Anlehnung an Leers et al. vermuten wir, dass die CD14-positiven Monozyten bei NSTEMI-Patienten in unserer Studie auf eine stufenweise und chronisch ablaufende Inflammation im Sinne einer progredienten Atherosklerose bereits vor dem akuten Infarktgeschehen zurückzuführen sind. Diese Annahme ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht belegt und sollte durch ergänzende immunhistochemische Färbungen, wie beispielsweise CD11b und andere Monozyten-Subtypenspezifische Rezeptoren, eingehender erforscht werden.

Ein Eingreifen in das Zusammenspiel der unterschiedlichen Monozyten-Subgruppen könnte unserer Ansicht nach neue therapeutische Strategien eröffnen, um inflammatorische Prozesse zu reduzieren und um einer Progression der Atherosklerose vorzubeugen.

#### 4.1.3.2 **Die CD105-Expression in Patienten mit Hyperlipoproteinämie**

Neben der morphologischen Analyse der intrakoronaren Thromben wurden klinische Daten des Patientenkollektivs erhoben, um Unterschiede in der Thrombenbeschaffenheit bei Subgruppen dieses Kollektivs zu untersuchen. Hierbei zeichnet sich ein Trend in Richtung Mehrexpression von CD105-positiven Zellen bei Patienten mit einer HLP ab. Es kann ein annähernd signifikanter Unterschied zwischen den Patienten mit und ohne HLP festgestellt werden [mit HLP 161 (IQR 66-220) vs. ohne HLP 39 (IQR 10-90),  $p=0,051$  im Mann-Whitney-U-Test] (siehe Kapitel 3.5.2, Abbildung 27). Positive Korrelationen sowohl zwischen der CD105-Zellzahl und dem gemessenen Cholesterin ( $r=0,491$ ,  $p=0,045$ ) als auch zwischen CD105 und HDL ( $r=0,537$ ,  $p=0,022$ ) sind nachweisbar (siehe Tabelle 23). LDL und Triglyzeride korrelieren hingegen nicht mit der CD105-Expression in den untersuchten Thromben.

Die Beteiligung von CD105 an der Aktivierung und Differenzierung von Monozyten, die Expression in atherosklerotischen Plaques sowie beim fibrotischen Gewebsumbau heben die vielfältige inflammatorische Rolle von

CD105 im Rahmen kardiovaskulärer Pathologien hervor (118, 123, 124). Die Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase und des Gefäßtonus sind für die physiologische Endothelfunktion unentbehrlich (20). Schädigende Faktoren wie u.a. Hypertonus, Diabetes mellitus und HLP führen zu einer Endotheldysfunktion, fördern die Atheroskleroseentstehung und bei Fortbestehen auch die Entstehung kardiovaskulärer Komplikationen (21, 22) (siehe Kapitel 1.1.2 und Kapitel 1.1.3).

Blazquez-Medela et al. untersuchten in ihrer Studie den Zusammenhang zwischen löslichem Endoglin (CD105) und kardiovaskulären Veränderungen bei diabetischen und hypertensiven Patienten (157). Sie konnten in ihrer Studie mit 288 Patienten erstmals zeigen, dass CD105-Plasmaspiegel in direktem Zusammenhang mit der Erhöhung von Blutglukosespiegeln, systolischen Blutdruckwerten, dem Pulsdruck, der Pulswellengeschwindigkeit, der Herzfrequenz und linksventrikulärer Hypertrophie stehen. Die Studie kam außerdem zu dem Ergebnis, dass sich die CD105-Spiegel in Abhängigkeit vom zirkadianen Blutdruckprofil unterscheiden. Diabetiker mit und ohne begleitendem Hypertonus wiesen bei pathologischem nächtlichen Blutdruckprofil wie ausbleibendem oder nächtlich starkem Abfall oder Anstieg erhöhte CD105-Spiegel auf. CD105 scheint folglich eine regulierende Funktion auf den Gefäßtonus zu haben. Verschiedene Studien konnten die Überexpression von CD105 mit dem Auftreten eines Hypertonus in Zusammenhang bringen (157-159). Dies kann möglicherweise auf den hemmenden Effekt von löslichem CD105 auf die TGF $\beta$ 1-vermittelte Aktivierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) zurückzuführen sein (158). Die geringere Verfügbarkeit von NO resultiert in einer verminderten Vasodilatation des Gefäßendothels und beeinflusst so negativ die Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase (157).

Blazquez-Medela et al. zeigten in ihrer Studie eine Reihe positiver Zusammenhänge zwischen erhöhten CD105-Spiegeln und klinischen Parametern des untersuchten Kollektivs von Diabetikern und Hypertonikern auf. Sie hoben CD105 als neuen Indikator für Diabetes mellitus -assoziierte vaskuläre Pathologien wie Hypertonus, endotheliale Dysfunktion und hohes kardiovaskuläres Risiko hervor (157).

In unserer Studie kann kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen

vermehrter CD105-Expression in den intrakoronaren Thromben bei Patienten mit Hypertonus (n=20) oder Diabetes mellitus (n=3) gefunden werden. Allerdings liegt der Fokus unserer Studie mehr auf der Zusammensetzung intrakoronarer Thromben bei Patienten nach MI. Diabetes mellitus und Hypertonie stellen hierbei häufige Begleiterkrankungen und relevante kardiovaskuläre Risikofaktoren dar. Unregelmäßigkeiten im Lipidstoffwechsel sind bei Diabetikern häufig und tragen erheblich zu einem erhöhten kardiovaskulären Risiko bei (160, 161). Wir vermuten daher, dass eine erhöhte CD105-Expression in Thromben von Patienten mit HLP mit einer zunehmenden endothelialen Dysfunktion in Verbindung gebracht werden kann.

Vitverova et al. konnten nachweisen, dass erhöhte CD105-Spiegel in Kombination mit einer HLP im Tiermodell zu einer Verschlechterung der endothelialen Dysfunktion in der Aorta und möglicherweise auch zu Veränderungen in der Aktivierung und Regulierung der eNOS führen (159). Hohe CD105-Spiegel könnten demnach als kardiovaskulärer Risikofaktor betrachtet werden (159). Überraschenderweise konnte eine Folgestudie von Vitverova et al. trotz identischer vaskulärer Bedingungen keine strukturellen Veränderungen des Herzens in Bezug auf Hypertrophie, Fibrose oder Inflammation nachweisen (162). Interessanterweise konnten jedoch in beiden genannten Studien Hinweise auf einen reduzierten NO-Metabolismus nach sechsmonatiger Exposition von hohen CD105-Spiegeln und fettreicher Kost gefunden werden (159, 162). Anhand dieser Ergebnisse kann darauf geschlossen werden, dass das Herz gegenüber den Effekten von CD105 in Kombination mit fettreicher Ernährung resistenter zu sein scheint als die Aorta. Interessant für mögliche neue pharmakologische Ansatzpunkte wäre, nach welchem Expositionszeitraum im Tiermodell es zu strukturellen Herzveränderungen kommt, welche Mechanismen das Herz zuvor vor diesen Veränderungen schützen, und ob diese Erkenntnisse auf das menschliche Herz übertragbar sind.

Unsere Studie unterscheidet sich von den genannten Studien von Vitverova et al. vor allem in der Methodik. Während Vitverova et al. Blutproben der Versuchstiere mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) und Westernblot analysierten und Gewebeproben aus Aorta und Herz untersuchten, beschränkten



sich unsere Analysen auf die morphologische und immunhistochemische Analyse intrakoronarer Thromben. Die Expression von CD105 in diesen Thromben kann in nicht signifikanter Weise mit einer HLP in Zusammenhang gebracht werden. Ein deutlicher Trend in Richtung Signifikanz ist dennoch zu erkennen ( $p=0,051$ ) (siehe Abbildung 27). Bei Krankenhausaufnahme nahmen 22,2 % der Patienten ( $n=6$ ) eine Vormedikation mit Statinen ein (siehe Tabelle 9). Dies könnte zu einer geringeren CD105-Expression in den Thromben der Patienten mit HLP führen.

Die Relevanz von CD105 auf das kardiovaskuläre System wird am Beispiel einer Gefäßerkrankung deutlich, die durch Mutationen im Endoglin-Gen verursacht wird. Die sogenannte Hereditäre hämorrhagische Teleangiektasie Typ 1 (HHT1) ist gekennzeichnet durch vaskuläre Dysplasien, häufige Episoden von Epistaxis, mucocutane Teleangiektasien und arteriovenöse Malformationen in Lunge, Gehirn und Gastrointestinaltrakt (163). Niedrige CD105-Spiegel wurden in Patienten mit HHT1 beschrieben (164).

Im Gegensatz dazu scheinen erhöhte Spiegel an löslichem CD105 mit endothelialer Dysfunktion, Hypertonus, Diabetes mellitus, Hyperlipoproteinämie und mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko assoziiert zu sein (157, 159, 162). Weitergehende Forschungen über die genauen Wirkmechanismen des löslichen Endoglins auf die endotheliale Dysfunktion in Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen sind nötig, um neue medikamentöse Therapieansätze zu identifizieren.

#### 4.1.3.3 Die MIF-Expression bei ACE-Hemmer-Vormedikation

Ein annähernd signifikanter Unterschied zwischen der Expression von MIF ist bei Patienten mit ACE-Hemmer-Vormedikation gegenüber Patienten ohne ACE-Hemmer-Vormedikation nachweisbar [mit ACE-Hemmer 22 (IQR 10-99) vs. ohne ACE-Hemmer 204 (IQR 70-278),  $p=0,053$  im Mann-Whitney-U-Test] (siehe Kapitel 3.5.3, Abbildung 28). Die MIF-Zellzahlen korrelieren zudem positiv mit der Anzahl CD14-positiver Zellen ( $r=0,499$ ,  $p=0,015$ ), mit der Anzahl CD68-positiver Zellen ( $r=0,574$ ,  $p=0,002$ ) und mit der Anzahl CD105-positiver Zellen ( $r=0,423$ ,  $p=0,028$ ) (siehe Tabelle 22).

Wir analysierten die Expression von MIF in intrakoronaren Thromben, um das Inflammationsgeschehen nach einem MI besser zu verstehen.

Das proinflammatorische Zytokin MIF ist wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunabwehr. Es nimmt Einfluss auf die Funktion von Makrophagen und T-Zellen und erfüllt insbesondere in der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen eine Schlüsselrolle (108). MIF initiiert die Expression von Signalmolekülen für die Erkennung bakterieller Bestandteile in Monozyten und Makrophagen. Nach Exposition mit LPS oder proinflammatorischen Zytokinen wie TNF und IFN- $\gamma$  kommt es zu einer schnellen Freisetzung von MIF durch Makrophagen (106, 107). Nachdem MIF ins Gewebe oder in die Blutbahn sezerniert wurde, fördert es die Immunantwort durch Aktivierung von weiteren Makrophagen und T-Zellen. Einige Studien untersuchten die proinflammatorischen Effekte von MIF bei Patienten mit ACS (110, 165). Müller et al. untersuchten die MIF-Expression von 286 Patienten mit symptomatischer KHK nach PCI (110). Dabei wiesen ACS-Patienten bereits in der frühen Phase nach dem Infarkt signifikant höhere MIF-Spiegel auf als Patienten mit stabiler KHK und gesunde Probanden. Höhere MIF-Spiegel korrelierten signifikant mit Inflammationsmarkern wie CRP und IL-6 und waren mit höheren Monozytenzahlen im peripheren Blut assoziiert. Zudem waren in Patienten mit ACS aufgrund rupturierter Plaques signifikant höhere MIF-Spiegel nachweisbar als bei Patienten ohne Plaqueruptur. Dies deutet auf eine Beteiligung von MIF an der Plaquentstehung und -destabilisierung hin und könnte MIF als Marker bei der Erkennung der frühen Plaquinestabilität in ACS-Patienten bedeutsam werden lassen (109, 110).

Der positive Zusammenhang zwischen der Anzahl CD14-positiver Zellen und der Anzahl MIF-positiver Zellen in unserer Studie bestätigt die Ergebnisse von Müller et al. Bei Patienten mit hohen MIF-Plasmaspiegeln konnten Müller et al. signifikant höhere Monozytenzahlen im peripheren Blut bestimmen (110). Unsere Ergebnisse weisen keine signifikanten Korrelationen zwischen MIF und CRP auf, jedoch gibt es positive Korrelationen sowohl zwischen CD14 als auch zwischen MIF mit dem initial gemessenen Troponinwert und der CK (siehe Tabelle 23). Das bedeutet, dass Monozyten und MIF bereits kurz nach dem durch Troponin und

CK laborchemisch nachweisbaren Myokardschaden erhöht sind und in der frühen inflammatorischen Phase des MI eine Rolle spielen.

ACE-Hemmer werden zur Senkung der Mortalität und Morbidität für Patienten mit systolischer linksventrikulärer Dysfunktion <40 %, Herzinsuffizienz, arteriellem Hypertonus, Diabetes mellitus und nach einem Myokardinfarkt eingesetzt (59, 84). Sie bewirken über eine Hemmung des Angiotensin-I-umsetzenden Enzyms eine Abnahme der Konzentration von Angiotensin-II. Dadurch kommt es über eine Senkung des Gefäßtonus zu einer Blutdrucksenkung.

Der Benefit des frühzeitigen Beginns einer ACE-Hemmer-Medikation nach einem MI ist zumindest partiell auf sehr potente antiinflammatorische Wirkungen der ACE-Hemmer zurückzuführen (166). Leuschner et al. untersuchten im Mausmodell die Wirkung der ACE-Hemmung nach einem MI. Sie konnten nachweisen, dass nach einem MI die Mobilisierung und Freisetzung von Monozyten aus der Milz durch Gabe des ACE-Hemmers Enalapril verhindert werden kann. Zudem zeigten sich bei ACE-Hemmung deutlich geringere Monozyteninfiltrate im Infarktgebiet. Diese günstigen Effekte konnten sowohl in der Gruppe mit Beginn der Medikation bereits vor dem Infarkt als auch etwas verzögert in der Gruppe mit Medikationsbeginn nach dem Infarkt nachgewiesen werden. Unter Enalapril-Medikation kam es bei insgesamt niedrigeren Zahlen an Entzündungszellen zu einer geringer ausgeprägten Inflammationsreaktion im Infarktgebiet. Dies führte zu einer verbesserten Infarktheilung, günstigem Remodeling des linken Ventrikels und der linksventrikulären EF.

Eine andere interessante Studie zur antiinflammatorischen Wirkung von ACE-Hemmern stammt von Soejima et al.. Sie wiesen in einer klinischen Studie mit 32 Patienten nach, dass nach einem MI bei Gabe des ACE-Hemmers Enalapril erhöhte Plasmaspiegel des monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) zusammen mit der ACE-Aktivität signifikant abfallen (167). MCP-1 ist ein wichtiges Zytokin in der Rekrutierung und Aktivierung von Monozyten im Rahmen inflammatorischer Prozesse wie auch der Atheroskleroseentstehung (34, 167).

In unserer Studie nahmen bereits 18,5 % der Patienten (n=5) ACE-Hemmer als Dauermedikation vor dem MI ein. Die von Leuschner et al. und Soejima et al.

beschriebene Hemmung der proinflammatorisch agierenden Monozyten und ihrer Zytokine scheint sich auch in unserer Studie bezüglich des proinflammatorischen Zytokins MIF abzubilden (siehe Abbildung 28). Allerdings konnte dies nur für eine kleine Gruppe des Kollektivs gezeigt werden (n=5). Es ist daher möglich, dass unsere annähernd signifikanten Ergebnisse bei größeren Fallzahlen statistische Signifikanz erreichen würden.

ACE-Hemmer haben durch ihre antiinflammatorische Wirkung auf Monozyten, das inflammatorisch wirkende Enzym Angiotensin-II und Zytokine wie MCP-1 und MIF nachweislich eine mortalitäts- und morbiditätssenkende Wirkung (165-167). Die günstigen Effekte einer frühzeitigen ACE-Hemmer-Medikation bei kardiovaskulärem Risikoprofil nach einem Infarkt wurde bereits vielfach bestätigt (95-98). Weiterführende Studien zur Auswirkung einer prophylaktischen ACE-Hemmer-Einnahme auf die Hemmung des proinflammatorischen Zytokins MIF sind unseres Wissens bisher nicht veröffentlicht worden und könnten einen neuen Therapieansatz darstellen. Insbesondere das Monitoring kardiovaskulärer Risikopatienten vor dem ersten Myokardinfarkt mittels Bestimmung neuer Biomarker könnte zudem perspektivisch kritische Veränderungen des biologischen Milieus bereits vor dem ersten MI detektieren und zur Einleitung einer entsprechenden Therapie führen.

## **4.2 Limitationen dieser Arbeit**

Die kleine Fallzahl (N=27) und die daraus resultierenden kleinen Gruppengrößen stellen eine Limitation der vorliegenden Arbeit dar.

Bei der Thrombusaspiration kann es je nach Thrombusfestigkeit zur Beschädigung des Thrombus kommen. Einige der in dieser Studie analysierten Thromben waren durch die Bergung in Mitleidenschaft gezogen worden. Uns ist jedoch außer der chirurgischen Thrombektomie und postmortem-Untersuchungen keine bessere Untersuchungsmethode für morphologische Analysen an ganzen Thromben bekannt als deren Aspiration per Katheterverfahren. Über nach distal embolisierte oder als Fragmente geborgene Thrombusteile kann keine Aussage getroffen werden.

Die aspirierten Thromben wurden jeweils zur Hälfte für die vorliegende Arbeit

verwendet. Die anderen Thrombenhälften wurden im Rahmen anderer Projekte analysiert. Eine mikroskopisch inhomogene Verteilung der Zellen innerhalb der Thrombenhälften kann nicht ausgeschlossen werden.

Für einzelne wenige Thromben standen nicht genügend Schnitte zur Verfügung, um alle Marker anzufärben. Um Streuungen innerhalb der Thromben zu berücksichtigen, wären mehrfache Färbungen innerhalb eines Thrombus sinnvoll gewesen. Hier mangelte es jedoch an ausreichend Thrombusmaterial.

Das Auszählen der positiv gefärbten Zellen und das Ausmessen der Flächen wurde manuell mittels des wissenschaftlichen Bildverarbeitungsprogramms ImageJ Software von Wayne Rasband durchgeführt. Dadurch sind prinzipiell Messungenauigkeiten möglich. Durch exemplarisches mehrfaches Auszählen eines Bildausschnittes zeigte sich jedoch keine größere Diskrepanz der Messwerte.

Zusätzlich zur quantitativen Auszählung der einzelnen Zellen erfolgte für Grem1, TGF $\beta$ 1 und MIF eine Einteilung der immunhistochemischen Färbungen auf semiquantitative Weise in definierte Expressiongruppen. Grem1 wurde hierbei nur semiquantitativ ausgewertet. Eine Auswertung anhand metrischer Merkmale wie Zellzahlen oder Flächen hätte unter Umständen zu einer besseren Verwertbarkeit der Daten beigetragen. Doch entschieden wir uns nach dem Vorbild von Silvain et al. für die semiquantitative Auswertung. Silvain et al. hatten 2011 in ihrer Studie zur Thrombuskomposition von 45 koronaren Thromben ein subjektives Evaluationsverfahren angewendet. Die Arbeitsgruppe hatte ein zeitlich wesentlich aufwendigeres Zählverfahren mit einer subjektiven Evaluation eines Bildausschnittes verglichen und war nach der Auswertung von zehn Thromben zu dem Ergebnis gekommen, dass die Variabilität beider Verfahren bezüglich der Thrombuszusammensetzung mit <6 % relativ gering ist (67). Diese Auswertungsmethode erschien daher auch für die vorliegende Arbeit sinnvoll, um Marker mit unterschiedlichen Expressionsmustern auszuwerten.

## 5 Zusammenfassung

Trotz zunehmenden medizinischen Fortschritts gehören kardiovaskuläre Erkrankungen mit etwa einem Drittel zu den führenden Todesursachen weltweit. Sie tragen nicht nur in großem Umfang zu Morbidität und Mortalität der Bevölkerung bei, sondern führen auch zu erheblichen Kosten im Gesundheitswesen. Die zunehmende Bevölkerungsalterung verursacht einen weiteren Anstieg kardiovaskulärer Erkrankungen wie dem ischämischen Insult und der koronaren Herzerkrankung.

Auf pathophysiologischer Ebene ist die endotheliale Dysfunktion für die Entstehung und das Voranschreiten atherosklerotischer Erkrankungen ursächlich. Neben erfolgreichen primär- und sekundärpräventiven Maßnahmen zur frühzeitigen Verhinderung der Thrombusbildung kommt der Entwicklung neuer Therapieansätze, die der Aufrechterhaltung oder Wiederherstellung der endothelialen Balance dienen, eine große Bedeutung zu. Ein tiefgehendes Verständnis der beteiligten proinflammatorischen und regulierenden Zellen und Mediatoren ist hierfür essenziell.

Die Analyse der Zellkomponenten koronarer Thromben gibt Einblick in die inflammatorische Situation zum Zeitpunkt der Thrombusbildung und Okklusion bis hin zur Aspiration. Dies spiegelt nach unserer Auffassung eine frühere Zeitspanne wider als Analysen aus dem peripheren Blut bei Krankenhausaufnahme.

Vor diesem Hintergrund war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, ein besseres Verständnis für den zeitlichen Verlauf der Thrombusentstehung und -zusammensetzung, sowie möglicher Unterschiede zwischen verschiedenen Patientengruppen zu erlangen.

Zu diesem Zweck untersuchten wir 27 Aspirationsthromben von Patienten nach Myokardinfarkt. Zusätzlich zur morphologischen Analyse mittels HE-Färbung entschieden wir uns für die immunhistochemische Färbung von acht Zellmarkern und Proteinen, die bei Inflammation, Immunregulation und fibrotischen Umbauvorgängen nachweislich eine wichtige Rolle spielen (CD14, CD68, CD42b, S100A4, MIF, TGF $\beta$ 1, CD105 und Grem1).

In der morphologischen Auswertung mittels HE-Färbung zeigten sich Thromben unterschiedlicher Morphologie. Wir teilten die Thromben bezüglich der hauptsächlich vorherrschenden Zellen und Bestandteile in vier Gruppen ein, bei denen wir davon ausgingen, dass sie Bezug zur zeitlichen Thrombusentstehung haben. Auch wenn hinsichtlich der gefärbten Biomarker einige Häufungen in der Zusammensetzung zu erkennen sind, konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der morphologischen Zusammensetzung intrakoronarer Thromben und den analysierten Zellmarkern nachgewiesen werden.

Wir konnten zeigen, dass die „symptom-to-balloon time“ kein guter Parameter zur Bestimmung des Thrombenalters ist. Bereits zuvor unerkannt ablaufende thrombotische Gefäßlumeneinengungen können hierfür ursächlich sein. Andere Parameter wie etwa die Anzahl CD14-positiver Monozyten und das proinflammatorische Zytokin MIF sind dagegen auch in unserer Studie bereits in der frühen Phase des Myokardinfarktes erhöht nachweisbar und korrelieren mit anerkannten Markern für Myokardnekrose wie Troponin und CK.

Wir konnten zeigen, dass es zwischen den Entitäten des Myokardinfarktes signifikante Unterschiede in der CD14-Zellexpression gibt. Wir vermuten bei NSTEMI-Patienten eher einen Zusammenhang mit der im Rahmen der Atherosklerose chronisch ablaufenden Inflammationsreaktion und nicht mit dem akuten Infarktereignis.

Annähernd signifikante und klinisch relevante Ergebnisse ergaben sich bezüglich der endothelschädigenden Rolle von CD105 in Patienten mit Hyperlipoproteinämie. Der Zusammenhang zwischen erhöhten Spiegeln löslichen CD105 und Diabetes mellitus- und Hypertonie-assoziierten kardiovaskulären Veränderungen konnte in der Vergangenheit bereits belegt werden.

Ebenfalls bedeutsam erscheint der statistisch nicht signifikante Unterschied in der Expression des proinflammatorischen Zytokins MIF bei einer Vormedikation mit ACE-Hemmern. ACE-Hemmer scheinen neben der vielfach untersuchten antihypertensiven Wirkung inflammatorische Vorgänge im Infarktgebiet zu hemmen und zu einer verbesserten Infarktheilung beizutragen. Diese

antiinflammatorischen Effekte sind für Angiotensin II und MCP-1 bereits beschrieben. Für MIF liegen derzeit diesbezüglich noch keine wissenschaftlichen Publikationen vor.

Zusammenfassend kann ein besseres Verständnis der feingeweblichen Struktur arterieller Thromben zur Entwicklung neuer pharmakologischer Angriffspunkte beitragen, um langfristig Medikamente zur Senkung der Morbidität und Mortalität des ACS zu entwickeln.



## 6 Literaturverzeichnis

1. Matsuzawa Y, Lerman A. **Endothelial dysfunction and coronary artery disease: assessment, prognosis, and treatment.** Coron Artery Dis. 2014;25(8):713-724.
2. World Health Organization. **Deaths from coronary heart disease 2002** [cited 2020 27.Oktober]. Available from: [https://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/en/cvd\\_atlas\\_14\\_deathHD.pdf](https://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/cvd_atlas_14_deathHD.pdf).
3. World Health Organization. **Cardiovascular diseases (CVDs) - Key facts 2017** [updated 17.Mai 2017; cited 2020 16.November]. Available from: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)).
4. Hartley A, Marshall DC, Saliccioli JD, Sikkil MB, Maruthappu M, Shalhoub J. **Trends in Mortality From Ischemic Heart Disease and Cerebrovascular Disease in Europe: 1980 to 2009.** Circulation. 2016;133(20):1916-1926.
5. Townsend N, Wilson L, Bhatnagar P, Wickramasinghe K, Rayner M, Nichols M. **Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update 2016.** Eur Heart J. 2016;37(42):3232-3245.
6. Statistisches Bundesamt. **Todesursachen. Zahl der Todesfälle im Jahr 2018 um 2,4 % gestiegen** 2020 [updated 19.Mai 2020; cited 2020 07.Oktober]. Available from: <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/todesfaelle.html>.
7. Statistisches Bundesamt. **Todesursachen. Die 10 häufigsten Todesfälle durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen** 2020 [updated 19.Mai 2020; cited 2020 07.Oktober]. Available from: <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/sterbefaelle-herz-kreislauf-erkrankungen-insgesamt.html>.
8. Statistisches Bundesamt. **Häufigste männliche Todesursachen** 2018 [updated 19.Mai 2020; cited 2020 07.Oktober]. Available from: <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Grafik/Interaktiv/haeufigste-todesursachen-maennlich.html>.
9. Statistischer Bundesamt. **Häufigste weibliche Todesursachen** 2018 [updated 19.Mai.2020; cited 2020 07.Oktober]. Available from: <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Grafik/Interaktiv/haeufigste-todesursachen-weiblich.html>.
10. Böcker W, Denk H, Heitz P, Höfler G, Kreipe H, Moch H. **Pathologie:** Elsevier; 2012. p. 398-404
11. Gerd Herold und Mitarbeiter. **Innere Medizin.** Köln: Dr. med. Gerd Herold; 2020. p. 237-248.

12. Knuuti J, Wijns W, Saraste A, Capodanno D, Barbato E, Funck-Brentano C, et al. **2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes**. Eur Heart J. 2020;41(3):407-477.
13. Khot UN, Khot MB, Bajzer CT, Sapp SK, Ohman EM, Brener SJ, et al. **Prevalence of conventional risk factors in patients with coronary heart disease**. JAMA. 2003;290(7):898-904.
14. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, 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):937-952.
15. Ridker PM, Rifai N, Rose L, Buring JE, Cook NR. **Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events**. N Engl J Med. 2002;347(20):1557-1565.
16. Albert CM, Ma J, Rifai N, Stampfer MJ, Ridker PM. **Prospective study of C-reactive protein, homocysteine, and plasma lipid levels as predictors of sudden cardiac death**. Circulation. 2002;105(22):2595-2599.
17. Sarnak MJ, Amann K, Bangalore S, Cavalcante JL, Charytan DM, Craig JC, et al. **Chronic Kidney Disease and Coronary Artery Disease: JACC State-of-the-Art Review**. J Am Coll Cardiol. 2019;74(14):1823-1838.
18. Zhang J, Song Y, Ji Y, Song Y, Cai S, Yu Y, et al. **Correlation between coronary artery disease and obstructive sleep apnea syndrome and analysis of risk factors**. Exp Ther Med. 2018;15(6):4771-4776.
19. Nikpay M, Stewart AFR, McPherson R. **Partitioning the heritability of coronary artery disease highlights the importance of immune-mediated processes and epigenetic sites associated with transcriptional activity**. Cardiovasc Res. 2017;113(8):973-983.
20. Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. **Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk**. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2003;23(2):168-175.
21. Anderson TJ, Gerhard MD, Meredith IT, Charbonneau F, Delagrangé D, Creager MA, et al. **Systemic nature of endothelial dysfunction in atherosclerosis**. Am J Cardiol. 1995;75(6):71B-74B.
22. Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, Meredith IT, Knab S, Delagrangé D, et al. **Close Relation of Endothelial Function in the Human Coronary and Peripheral Circulations**. Journal of the American College of Cardiology. 1995;26(5):1235-1241.
23. Reriani MK, Flammer AJ, Jama A, Lerman LO, Lerman A. **Novel functional risk factors for the prediction of cardiovascular events in vulnerable patients following acute coronary syndrome**. Circ J. 2012;76(4):778-783.
24. Kitta Y, Obata JE, Nakamura T, Hirano M, Kodama Y, Fujioka D, et al. **Persistent impairment of endothelial vasomotor function has a negative impact on outcome in patients with coronary artery disease**. J Am Coll Cardiol. 2009;53(4):323-330.

25. Muenzel T, Gori T, Bruno RM, Taddei S. **Is oxidative stress a therapeutic target in cardiovascular disease?** *European Heart Journal*. 2010;31:2741–2749.
26. Flammer AJ, Luscher TF. **Three decades of endothelium research: from the detection of nitric oxide to the everyday implementation of endothelial function measurements in cardiovascular diseases.** *Swiss Med Wkly*. 2010;140:w13122.
27. Matsuzawa Y, Sugiyama S, Sugamura K, Sumida H, Kurokawa H, Fujisue K, et al. **Successful diet and exercise therapy as evaluated on self-assessment score significantly improves endothelial function in metabolic syndrome patients.** *Circ J*. 2013;77(11):2807-2815.
28. Chiu JJ, Chien S. **Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives.** *Physiol Rev*. 2011;91(1):327-387.
29. Badimon L, Vilahur G. **Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture.** *J Intern Med*. 2014;276(6):618-632.
30. Rochette L, Lorin J, Zeller M, Guillard JC, Lorgis L, Cottin Y, et al. **Nitric oxide synthase inhibition and oxidative stress in cardiovascular diseases: possible therapeutic targets?** *Pharmacol Ther*. 2013;140(3):239-257.
31. Alexander RW. **Inflammation and coronary artery disease.** *N Engl J Med*. 1994;331(7):468-469.
32. Ross R. **Atherosclerosis--an inflammatory disease.** *N Engl J Med*. 1999;340(2):115-126.
33. Plutzky J. **Inflammatory pathways in atherosclerosis and acute coronary syndromes.** *Am J Cardiol*. 2001;88(8A):10K-15K.
34. Libby P. **Inflammation in atherosclerosis.** *Nature*. 2002;420(6917):868-874.
35. Fioranelli M, Bottaccioli AG, Bottaccioli F, Bianchi M, Rovesti M, Rocchia MG. **Stress and Inflammation in Coronary Artery Disease: A Review Psychoneuroendocrineimmunology-Based.** *Front Immunol*. 2018;9:2031.
36. Bot I, Shi GP, Kovanen PT. **Mast cells as effectors in atherosclerosis.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35(2):265-271.
37. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Finn AV, Gold HK, Tulenko TN, et al. **Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(10):2054-2061.
38. O'Brien KD, McDonald TO, Chait A, Allen MD, Alpers CE. **Neovascular expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in human atherosclerosis and their relation to intimal leukocyte content.** *Circulation*. 1996;93(4):672-682.

39. The Task Force for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC), Authors/Task Force Members: Jean-Philippe Collet \* (Chairperson) (France) HTCG, Emanuele Barbato (Italy), Olivier Barthelemy (France), Johann Bauersachs (Germany), Deepak L. Bhatt (United States of America), Paul Dendale (Belgium), Maria Dorobantu (Romania), Thor Edvardsen (Norway), Thierry Folliguet (France), Chris P. Gale (United Kingdom), Martine Gilard (France), Alexander Jobs (Germany), Peter Junni (Canada), Ekaterini Lambrinou (Cyprus), Basil S. Lewis (Israel), Julinda Mehilli (Germany), Emanuele Meliga (Italy), Be'la Merkely (Hungary), Christian Mueller (Switzerland), Marco Roffi (Switzerland), Frans H. Rutten (Netherlands), Dirk Sibbing (Germany), George C.M. Siontis (Switzerland). **2020 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation.** European Heart Journal. 2020;00:1-79.
40. Ralf Brandes, Florian Lang, Robert F. Schmidt,. **Physiologie des Menschen:** Springer; 2019. p. 207-209.
41. Leers MPG, Stockem C, Ackermans D, Loeffen R, Ten Cate H, Kragten JA, et al. **Intermediate and nonclassical monocytes show heterogeneity in patients with different types of acute coronary syndrome.** Cytometry A. 2017;91(11):1059-1067.
42. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Chaitman BR, Bax JJ, Morrow DA, et al. **Fourth universal definition of myocardial infarction (2018).** European Heart Journal. 2019;40(3):237-269.
43. Masami Kosuge MKK, MD; Toshiyuki Ishikawa, MD; Toshiaki Ebina, MD; Kiyoshi Hibi, MD; Kengo Tsukahara, MD; Masahiko Kanna, MD; Noriaki Iwahashi, MD; Jun Okuda, MD; Naoki Nozawa, MD; Hiroyuki Ozaki, MD; Hideto Yano, MD; Tatsuya Nakati, MD; Ikuyoshi Kusama, MD; Satoshi Umemura, MD. **Differences Between Men and Women in Terms of Clinical Features of ST-Segment Elevation Acute Myocardial Infarction.** Circulation Journal. 2006;70:220-226.
44. Gerd Herold und Mitarbeiter. **Innere Medizin.** Köln: Dr. med. Gerd Herold; 2020. p. 250.
45. Ralf Brandes, Florian Lang, Robert F. Schmidt,. **Physiologie des Menschen:** Springer; 2019. p. 214-215.
46. Agewall S, Giannitsis E, Jernberg T, Katus H. **Troponin elevation in coronary vs. non-coronary disease.** Eur Heart J. 2011;32(4):404-411.
47. Jennings RB, Ganote CE. **Structural changes in myocardium during acute ischemia.** Circ Res. 1974;35 Suppl 3:156-172.
48. Böcker W, Denk H, Heitz P, Höfler G, Kreipe H, Moch H. **Pathologie:** Elsevier; 2012. p. 380-384.
49. Mair J, Lindahl B, Hammarsten O, Müller C, Giannitsis E, Huber K, et al. **How is cardiac troponin released from injured myocardium?** European Heart Journal. 2018;Vol. 7(6) 553–560.
50. Katrukha IA. **Human cardiac troponin complex. Structure and functions.** Biochemistry (Mosc). 2013;78(13):1447-1465.

51. Morrow DA, Cannon CP, Jesse RL, Newby LK, Ravkilde J, Storrow AB, et al. **National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: clinical characteristics and utilization of biochemical markers in acute coronary syndromes.** Clin Chem. 2007;53(4):552-574.
52. Solecki K, Dupuy AM, Kuster N, Leclercq F, Gervasoni R, Macia JC, et al. **Kinetics of high-sensitivity cardiac troponin T or troponin I compared to creatine kinase in patients with revascularized acute myocardial infarction.** Clin Chem Lab Med. 2015;53(5):707-714.
53. Chia S, Senatore F, Raffel OC, Lee H, Wackers FJ, Jang IK. **Utility of cardiac biomarkers in predicting infarct size, left ventricular function, and clinical outcome after primary percutaneous coronary intervention for ST-segment elevation myocardial infarction.** JACC Cardiovasc Interv. 2008;1(4):415-423.
54. Steen H, Giannitsis E, Futterer S, Merten C, Juenger C, Katus HA. **Cardiac troponin T at 96 hours after acute myocardial infarction correlates with infarct size and cardiac function.** J Am Coll Cardiol. 2006;48(11):2192-2194.
55. Licka M, Zimmermann R, Zehelein J, Dengler TJ, Katus HA, Kubler W. **Troponin T concentrations 72 hours after myocardial infarction as a serological estimate of infarct size.** Heart. 2002;87(6):520-524.
56. Shave R, Oxborough D. **Exercise-induced cardiac injury: evidence from novel imaging techniques and highly sensitive cardiac troponin assays.** Prog Cardiovasc Dis. 2012;54(5):407-415.
57. Turer AT, Addo TA, Martin JL, Sabatine MS, Lewis GD, Gerszten RE, et al. **Myocardial ischemia induced by rapid atrial pacing causes troponin T release detectable by a highly sensitive assay: insights from a coronary sinus sampling study.** J Am Coll Cardiol. 2011;57(24):2398-2405.
58. Park KC, Gaze DC, Collinson PO, Marber MS. **Cardiac troponins: from myocardial infarction to chronic disease.** Cardiovasc Res. 2017;113(14):1708-1718.
59. Ibanez B, James S, Agewall S, Antunes MJ, Bucciarelli-Ducci C, Bueno H, 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):119-177.
60. Frangogiannis NG. **The role of transforming growth factor (TGF)-beta in the infarcted myocardium.** J Thorac Dis. 2017;9:S52-S63.
61. Prabhu SD, Frangogiannis NG. **The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis.** Circ Res. 2016;119(1):91-112.
62. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. **Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling.** J Am Coll Cardiol. 2000;35(3):569-582.

63. Zawada AM, Rogacev KS, Schirmer SH, Sester M, Bohm M, Fliser D, et al. **Monocyte heterogeneity in human cardiovascular disease**. Immunobiology. 2012;217(12):1273-1284.
64. Tsujioka H, Imanishi T, Ikejima H, Kuroi A, Takarada S, Tanimoto T, et al. **Impact of heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets on myocardial salvage in patients with primary acute myocardial infarction**. J Am Coll Cardiol. 2009;54(2):130-138.
65. Böcker W, Denk H, Heitz P, Höfler G, Kreipe H, Moch H. **Pathologie**: Elsevier; 2012. p. 180-185
66. Rittersma SZ, van der Wal AC, Koch KT, Piek JJ, Henriques JP, Mulder KJ, 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):1160-1165.
67. Silvain J, Collet JP, Nagaswami C, Beygui F, Edmondson KE, Bellemain-Appaix A, et al. **Composition of coronary thrombus in acute myocardial infarction**. J Am Coll Cardiol. 2011;57(12):1359-1367.
68. Yunoki K, Naruko T, Sugioka K, Inaba M, Itoh A, Haze K, et al. **Thrombus aspiration therapy and coronary thrombus components in patients with acute ST-elevation myocardial infarction**. J Atheroscler Thromb. 2013;20(6):524-537.
69. Ramaiola I, Padro T, Pena E, Juan-Babot O, Cubedo J, Martin-Yuste V, et al. **Changes in thrombus composition and profilin-1 release in acute myocardial infarction**. Eur Heart J. 2015;36(16):965-975.
70. Chambless L, Keil U, Dobson A, Mahonen M, Kuulasmaa K, Rajakangas AM, et al. **Population versus clinical view of case fatality from acute coronary heart disease: results from the WHO MONICA Project 1985-1990. Multinational MONItoring of Trends and Determinants in Cardiovascular Disease**. Circulation. 1997;96(11):3849-3859.
71. Kontos MC, Diercks DB, Kirk JD. **Emergency department and office-based evaluation of patients with chest pain**. Mayo Clin Proc. 2010;85(3):284-299.
72. Gerd Herold und Mitarbeiter. **Innere Medizin**. Köln: Dr. med. Gerd Herold; 2020. p. 251-253.
73. Wanamaker BL, Seth MM, Sukul D, Dixon SR, Bhatt DL, Madder RD, et al. **Relationship Between Troponin on Presentation and In-Hospital Mortality in Patients With ST-Segment-Elevation Myocardial Infarction Undergoing Primary Percutaneous Coronary Intervention**. J Am Heart Assoc. 2019;8(19):e013551.
74. Mahmoud MZ. **Echocardiography in the Evaluation of Chest Pain in the Emergency Department**. Pol J Radiol. 2017;82:798-805.

75. Solomon SD, Zelenkofske S, McMurray JJ, Finn PV, Velazquez E, Ertl G, et al. **Sudden death in patients with myocardial infarction and left ventricular dysfunction, heart failure, or both.** N Engl J Med. 2005;352(25):2581-2588.
76. Zaman S, Kovoov P. **Sudden Cardiac Death Early After Myocardial Infarction Pathogenesis, Risk Stratification, and Primary Prevention.** Circulation. 2014;129(23):2426-2435.
77. Adabag AS, Therneau TM, Gersh BJ, Weston SA, Roger VL. **Sudden Death After Myocardial Infarction.** Jama-J Am Med Assoc. 2008;300(17):2022-2029.
78. Gerd Herold und Mitarbeiter. **Innere Medizin.** Köln: Dr. med. Gerd Herold; 2020. p. 253-254.
79. Newby KH, Thompson T, Stebbins A, Topol EJ, Califf RM, Natale A, et al. **Sustained ventricular arrhythmias in patients receiving thrombolytic therapy - Incidence and outcomes.** Circulation. 1998;98(23):2567-2573.
80. Minicucci MF, Azevedo PS, Polegato BF, Paiva SA, Zornoff LA. **Heart failure after myocardial infarction: clinical implications and treatment.** Clin Cardiol. 2011;34(7):410-414.
81. Gheorghide M, Fonarow GC. **Management of post-myocardial infarction patients with left ventricular systolic dysfunction.** Am J Med. 2007;120(2):109-120.
82. Bahit MC, Lopes RD, Clare RM, Newby LK, Pieper KS, Van de Werf F, et al. **Heart failure complicating non-ST-segment elevation acute coronary syndrome: timing, predictors, and clinical outcomes.** JACC Heart Fail. 2013;1(3):223-229.
83. Bahit MC, Kochar A, Granger CB. **Post-Myocardial Infarction Heart Failure.** JACC Heart Fail. 2018;6(3):179-186.
84. Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, McMurray JJ, Ponikowski P, Poole-Wilson PA, et al. **ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM).** Eur J Heart Fail. 2008;10(10):933-989.
85. Koek HL, Soedamah-Muthu SS, Kardaun JW, Gevers E, de Bruin A, Reitsma JB, et al. **Short- and long-term mortality after acute myocardial infarction: comparison of patients with and without diabetes mellitus.** Eur J Epidemiol. 2007;22(12):883-888.
86. Norgaard ML, Andersen SS, Schramm TK, Folke F, Jorgensen CH, Hansen ML, et al. **Changes in short- and long-term cardiovascular risk of incident diabetes and incident myocardial infarction--a nationwide study.** Diabetologia. 2010;53(8):1612-1619.
87. Johansson S, Rosengren A, Young K, Jennings E. **Mortality and morbidity trends after the first year in survivors of acute myocardial infarction: a systematic review.** BMC Cardiovasc Disord. 2017;17(1):53.

88. Nauta ST, Deckers JW, Akkerhuis M, Lenzen M, Simoons ML, van Domburg RT. **Changes in clinical profile, treatment, and mortality in patients hospitalised for acute myocardial infarction between 1985 and 2008.** PLoS One. 2011;6(11):e26917.
89. Tubaro M, Danchin N, Goldstein P, Filippatos G, Hasin Y, Heras M, et al. **Pre-hospital treatment of STEMI patients. A scientific statement of the Working Group Acute Cardiac Care of the European Society of Cardiology.** Acute Card Care. 2011;13(2):56-67.
90. Fu S, Lv X, Fang Q, Liu Z. **Oxygen therapy for acute myocardial infarction: A systematic review and meta-analysis.** Int J Nurs Stud. 2017;74:8-14.
91. Stub D, Smith K, Bernard S, Nehme Z, Stephenson M, Bray JE, et al. **Air Versus Oxygen in ST-Segment-Elevation Myocardial Infarction.** Circulation. 2015;131(24):2143-2150.
92. Eric Boersma and The Primary Coronary Angioplasty vs. Thrombolysis (PCAT)-2 Trialists' Collaborative Group. **Does time matter? A pooled analysis of randomized clinical trials comparing primary percutaneous coronary intervention and in-hospital fibrinolysis in acute myocardial infarction patients.** European Heart Journal. 2006;27: 779–788.
93. Htay T, Liu MW. **Drug-eluting stent: a review and update.** Vasc Health Risk Manag. 2005;1(4):263-276.
94. Sim DS, Jeong MH. **Development of Novel Drug-Eluting Stents for Acute Myocardial Infarction.** Chonnam Med J. 2017;53(3):187-195.
95. Pfeffer MA, Braunwald E, Moye LA, Basta L, Brown EJ, Jr., Cuddy TE, et al. **Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of the survival and ventricular enlargement trial. The SAVE Investigators.** N Engl J Med. 1992;327(10):669-677.
96. The AIRE Study Group. **Effect of ramipril on mortality and morbidity of survivors of acute myocardial infarction with clinical evidence of heart failure. The Acute Infarction Ramipril Efficacy (AIRE) Study Investigators.** Lancet. 1993;342(8875):821-828.
97. Dickstein K, Kjekshus J, Group OSCotOS. **Effects of losartan and captopril on mortality and morbidity in high-risk patients after acute myocardial infarction: the OPTIMAAL randomised trial. Optimal Trial in Myocardial Infarction with Angiotensin II Antagonist Losartan.** Lancet. 2002;360(9335):752-760.
98. Pfeffer MA, McMurray JJ, Velazquez EJ, Rouleau JL, Kober L, Maggioni AP, et al. **Valsartan, captopril, or both in myocardial infarction complicated by heart failure, left ventricular dysfunction, or both.** N Engl J Med. 2003;349(20):1893-1906.
99. Dargie HJ. **Effect of carvedilol on outcome after myocardial infarction in patients with left-ventricular dysfunction: the CAPRICORN randomised trial.** Lancet. 2001;357(9266):1385-1390.



100. COMMIT (CLOpidogrel and Metoprolol in Myocardial Infarction Trial) collaborative group. **Early intravenous then oral metoprolol in 45 852 patients with acute myocardial infarction: randomised placebocontrolled trial.** Lancet. 2005;366:1622–1632.
101. Pitt B, Remme W, Zannad F, Neaton J, Martinez F, Roniker B, et al. **Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction.** N Engl J Med. 2003;348(14):1309-1321.
102. Hayashi M, Tsutamoto T, Wada A, Tsutsui T, Ishii C, Ohno K, et al. **Immediate administration of mineralocorticoid receptor antagonist spironolactone prevents post-infarct left ventricular remodeling associated with suppression of a marker of myocardial collagen synthesis in patients with first anterior acute myocardial infarction.** Circulation. 2003;107(20):2559-2565.
103. Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S, Albus C, Brotons C, Catapano AL, et al. **2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts)Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR).** Eur Heart J. 2016;37(29):2315-2381.
104. Stenestrand U, Wallentin L, Swedish Register of Cardiac Intensive C. **Early statin treatment following acute myocardial infarction and 1-year survival.** JAMA. 2001;285(4):430-436.
105. Sacks FM, Pfeffer MA, Moyer LA, Rouleau JL, Rutherford JD, Cole TG, et al. **The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators.** N Engl J Med. 1996;335(14):1001-1009.
106. Calandra T, Bernhagen J, Mitchell RA, Bucala R. **The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor.** J Exp Med. 1994;179(6):1895-1902.
107. Calandra T, Roger T. **Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity.** Nat Rev Immunol. 2003;3(10):791-800.
108. Muller, II, Chatterjee M, Schneider M, Borst O, Seizer P, Schonberger T, et al. **Gremlin-1 inhibits macrophage migration inhibitory factor-dependent monocyte function and survival.** Int J Cardiol. 2014;176(3):923-929.
109. Mueller I, Mueller KA, Karathanos A, Schonleber H, Rath D, Vogel S, et al. **Impact of counterbalance between macrophage migration inhibitory factor and its inhibitor Gremlin-1 in patients with coronary artery disease.** Atherosclerosis. 2014;237(2):426-432.
110. Mueller II, Mueller KA, Schoenleber H, A. K, M. S, Jorbenadze R, et al. **Macrophage Migration Inhibitory Factor Is Enhanced in Acute Coronary Syndromes and Is Associated with the Inflammatory Response.** PLoS ONE. 2012;7(6).

111. Beck S, Simmet T, Muller I, Lang F, Gawaz M. **Gremlin-1 C-Terminus Regulates Function of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF)**. *Cell Physiol Biochem*. 2016;38(2):801-808.
112. Muller I, Schonberger T, Schneider M, Borst O, Ziegler M, Seizer P, et al. **Gremlin-1 is an inhibitor of macrophage migration inhibitory factor and attenuates atherosclerotic plaque growth in ApoE<sup>-/-</sup> Mice**. *J Biol Chem*. 2013;288(44):31635-31645.
113. SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY I. **TGFβ1 (V): sc-146** [Datasheet TGFβ1]. [cited 2020 17.Dezember]. Available from: <https://datasheets.scbt.com/sc-146.pdf>.
114. Hanna A, Frangogiannis NG. **The Role of the TGF-beta Superfamily in Myocardial Infarction**. *Front Cardiovasc Med*. 2019;6:140.
115. Chaoyu Ma X-FW. **TGFBI (transforming growth factor, beta-induced, 68kDa)** Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology2009 [cited 2020 20.Dezember]. Available from: <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/TGFBIID42539ch5q31.html>.
116. Valluru M, Staton CA, Reed MW, Brown NJ. **Transforming Growth Factor-beta and Endoglin Signaling Orchestrate Wound Healing**. *Front Physiol*. 2011;2:89.
117. Gombozhapova A, Rogovskaya Y, Shurupov V, Rebenkova M, Kzhyshkowska J, Popov SV, et al. **Macrophage activation and polarization in post-infarction cardiac remodeling**. *J Biomed Sci*. 2017;24(1):13.
118. Schoonderwoerd MJA, Goumans MTH, Hawinkels L. **Endoglin: Beyond the Endothelium**. *Biomolecules*. 2020;10(2).
119. Meng XM, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. **TGF-beta: the master regulator of fibrosis**. *Nat Rev Nephrol*. 2016;12(6):325-338.
120. Thompson NL, Flanders KC, Smith JM, Ellingsworth LR, Roberts AB, Sporn MB. **Expression of transforming growth factor-beta 1 in specific cells and tissues of adult and neonatal mice**. *J Cell Biol*. 1989;108(2):661-669.
121. SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY I. **Endoglin (H-300): sc-20632** [Datasheet CD105]. [cited 2020 18.Dezember]. Available from: <https://datasheets.scbt.com/sc-20632.pdf>.
122. Dallas NA, Samuel S, Xia L, Fan F, Gray MJ, Lim SJ, et al. **Endoglin (CD105): a marker of tumor vasculature and potential target for therapy**. *Clin Cancer Res*. 2008;14(7):1931-1937.
123. Jose M Lopez-Novoa CB. **ENG (endoglin)**. 2012.
124. Li C, Issa R, Kumar P, Hampson IN, Lopez-Novoa JM, Bernabeu C, et al. **CD105 prevents apoptosis in hypoxic endothelial cells**. *J Cell Sci*. 2003;116(Pt 13):2677-2685.

125. Kitchens RL. **Role of CD14 in cellular recognition of bacterial lipopolysaccharides.** Chem Immunol. 2000;74:61-82.
126. Biorbyt Ltd. **Datasheet CD14** [cited 2021 28.März]. Available from: <https://www.biorbyt.com/cd14-antibody-orb19177.html>.
127. SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY I. **CD68 (KP1): sc-20060** [Datasheet CD68]. [cited 2020 17.Dezember]. Available from: <https://datasheets.scbt.com/sc-20060.pdf>.
128. SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY I. **CD42b (C-20): sc-7070** [Datasheet CD42b]. [cited 2020 17.Dezember]. Available from: <https://datasheets.scbt.com/sc-7070.pdf>.
129. Hernandez JL, Padilla L, Dakhel S, Coll T, Hervas R, Adan J, et al. **Therapeutic Targeting of Tumor Growth and Angiogenesis with a Novel Anti-S100A4 Monoclonal Antibody.** Plos One. 2013;8(9).
130. Fei F, Qu J, Zhang M, Li Y, Zhang S. **S100A4 in cancer progression and metastasis: A systematic review.** Oncotarget. 2017;8(42):73219-73239.
131. Fei F, Qu J, Li C, Wang X, Li Y, Zhang S. **Role of metastasis-induced protein S100A4 in human non-tumor pathophysiology.** Cell Biosci. 2017;7:64.
132. Doroudgar S, Quijada P, Konstandin M, Ilves K, Broughton K, Khalafalla FG, et al. **S100A4 protects the myocardium against ischemic stress.** J Mol Cell Cardiol. 2016;100:54-63.
133. Giedrimiene D. KR. **Burden of Cardiovascular Disease (CVD) on Economic Cost. Comparison of Outcomes in US and Europe.** Circulation: Cardiovascular Quality and Outcomes. 2017.
134. Statistisches Bundesamt. **Zukünftige Bevölkerungsentwicklung 2016** [updated 18.Oktober 2018; cited 2020 16.November]. Available from: <https://www.destatis.de/DE/Themen/Querschnitt/Demografischer-Wandel/Aspekte/demografie-bevoelkerungsentwicklung.html>.
135. Chen GY, Nunez G. **Sterile inflammation: sensing and reacting to damage.** Nat Rev Immunol. 2010;10(12):826-837.
136. Saha P, Smith A. **Regulation of sterile inflammation in the natural resolution of venous thrombosis.** Thromb Haemostasis. 2015;114(5):875-875.
137. Byrnes JR, Wolberg AS. **New findings on venous thrombogenesis.** Hamostaseologie. 2017;37(1):25-35.
138. Fuijkschot WW, Groothuizen WE, Appelman Y, Radonic T, van Royen N, van Leeuwen MA, 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):394-400.

139. Merck KGaA. **Mayers Hämalunlösung** 2020 [cited 2020 15.Dezember]. Available from: [https://www.merckmillipore.com/DE/de/product/Mayers-hemalum-solution,MDA\\_CHEM-109249#anchor\\_PDP\\_OverviewTab\\_Product\\_Spezifikationen\\_Spezifikationen](https://www.merckmillipore.com/DE/de/product/Mayers-hemalum-solution,MDA_CHEM-109249#anchor_PDP_OverviewTab_Product_Spezifikationen_Spezifikationen).
140. Lang G. **Histotechnik. Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik**. Wien: Springer; 2013. p. 270-303.
141. Kramer MC, van der Wal AC, Koch KT, Rittersma SZ, Li X, Ploegmakers HP, et al. **Histopathological features of aspirated thrombi after primary percutaneous coronary intervention in patients with ST-elevation myocardial infarction**. *PLoS One*. 2009;4(6):e5817.
142. Gong XJ, Song XY, Wei H, Wang J, Niu M. **Serum S100A4 levels as a novel biomarker for detection of acute myocardial infarction**. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015;19(12):2221-2225.
143. Henriques de Gouveia R, van der Wal AC, van der Loos CM, Becker AE. **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):1433-1440.
144. Fujiu K, Wang J, Nagai R. **Cardioprotective function of cardiac macrophages**. *Cardiovasc Res*. 2014;102(2):232-239.
145. Frantz S, Bauersachs J, Ertl G. **Post-infarct remodelling: contribution of wound healing and inflammation**. *Cardiovascular Research*. 2009;81(3):474-481.
146. Steiner I, Spacek J, Matejkova A, Vojacek J, Bis J, Dusek J. **Histopathology of aspirated thrombi during primary percutaneous coronary intervention in patients with acute myocardial infarction**. *Cardiovasc Pathol*. 2014;23(5):267-271.
147. Carol A, Bernet M, Curos A, Rodriguez-Leor O, Serra J, Fernandez-Nofrerias E, et al. **Thrombus age, clinical presentation, and reperfusion grade in myocardial infarction**. *Cardiovasc Pathol*. 2014;23(3):126-130.
148. Cannon CP, Gibson CM, Lambrew CT, Shoultz DA, Levy D, French WJ, et al. **Relationship of symptom-onset-to-balloon time and door-to-balloon time with mortality in patients undergoing angioplasty for acute myocardial infarction**. *JAMA*. 2000;283(22):2941-2947.
149. Ralf Brandes, Florian Lang, Robert F. Schmidt,. **Physiologie des Menschen**: Springer; 2019. p. 214-215.
150. Mahmoud KD, Hillege HL, Jaffe AS, Lennon RJ, Holmes DR, Jr. **Biochemical Validation of Patient-Reported Symptom Onset Time in Patients With ST-Segment Elevation Myocardial Infarction Undergoing Primary Percutaneous Coronary Intervention**. *JACC Cardiovasc Interv*. 2015;8(6):778-787.
151. McNamara RL, Wang Y, Herrin J, Curtis JP, Bradley EH, Magid DJ, et al. **Effect of door-to-balloon time on mortality in patients with ST-segment elevation myocardial infarction**. *J Am Coll Cardiol*. 2006;47(11):2180-2186.

152. Berger PB, Ellis SG, Holmes DR, Jr., Granger CB, Criger DA, Betriu A, et al. **Relationship between delay in performing direct coronary angioplasty and early clinical outcome in patients with acute myocardial infarction: results from the global use of strategies to open occluded arteries in Acute Coronary Syndromes (GUSTO-IIb) trial.** *Circulation*. 1999;100(1):14-20.
153. Montange D, Davani S, Deschaseaux F, Seronde MF, Chopard R, Schiele F, et al. **The number of circulating CD14(+) cells is related to infarct size and postinfarct volumes in ST segment elevation myocardial infarction but not non-ST segment elevation myocardial infarction.** *Exp Clin Cardiol*. 2012;17(3):131-135.
154. Cannon CP, McCabe CH, Wilcox RG, Bentley JH, Braunwald E. **Association of white blood cell count with increased mortality in acute myocardial infarction and unstable angina pectoris. OPUS-TIMI 16 Investigators.** *Am J Cardiol*. 2001;87(5):636-639, A610.
155. Nahrendorf M, Pittet MJ, Swirski FK. **Monocytes: protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction.** *Circulation*. 2010;121(22):2437-2445.
156. Stoneman V, Braganza D, Figg N, Mercer J, Lang R, Goddard M, et al. **Monocyte/macrophage suppression in CD11b diphtheria toxin receptor transgenic mice differentially affects atherogenesis and established plaques.** *Circ Res*. 2007;100(6):884-893.
157. Blazquez-Medela AM, Garcia-Ortiz L, Gomez-Marcos MA, Recio-Rodriguez JI, Sanchez-Rodriguez A, Lopez-Novoa JM, et al. **Increased plasma soluble endoglin levels as an indicator of cardiovascular alterations in hypertensive and diabetic patients.** *BMC Med*. 2010;8:86.
158. Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, Hanai J, Mammoto T, Kim YM, et al. **Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia.** *Nat Med*. 2006;12(6):642-649.
159. Vitverova B, Blazickova K, Najmanova I, Vicen M, Hyspler R, Dolezelova E, et al. **Soluble endoglin and hypercholesterolemia aggravate endothelial and vessel wall dysfunction in mouse aorta.** *Atherosclerosis*. 2018;271:15-25.
160. American Diabetes Association. **10. Cardiovascular Disease and Risk Management: Standards of Medical Care in Diabetes-2021.** *Diabetes Care*. 2021;44(Suppl 1):S125-S150.
161. Zavaroni I, Dall'Aglio E, Alpi O, Bruschi F, Bonora E, Pezzarossa A, et al. **Evidence for an independent relationship between plasma insulin and concentration of high density lipoprotein cholesterol and triglyceride.** *Atherosclerosis*. 1985;55(3):259-266.
162. Vitverova B, Najmanova I, Vicen M, Tripska K, Sa ICI, Hyspler R, et al. **Long term effects of soluble endoglin and mild hypercholesterolemia in mice hearts.** *PLoS One*. 2020;15(5):e0233725.
163. Govani FS, Shovlin CL. **Hereditary haemorrhagic telangiectasia: a clinical and scientific review.** *Eur J Hum Genet*. 2009;17(7):860-871.

164. Ojeda-Fernandez L, Barrios L, Rodriguez-Barbero A, Recio-Poveda L, Bernabeu C, Botella LM. **Reduced plasma levels of Ang-2 and sEng as novel biomarkers in hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT)**. Clin Chim Acta. 2010;411(7-8):494-499.
165. White DA, Fang L, Chan W, Morand EF, Kiriazis H, Duffy SJ, et al. **Pro-inflammatory action of MIF in acute myocardial infarction via activation of peripheral blood mononuclear cells**. PLoS One. 2013;8(10):e76206.
166. Leuschner F, Panizzi P, Chico-Calero I, Lee WW, Ueno T, Cortez-Retamozo V, et al. **Angiotensin-converting enzyme inhibition prevents the release of monocytes from their splenic reservoir in mice with myocardial infarction**. Circ Res. 2010;107(11):1364-1373.
167. Soejima H, Ogawa H, Yasue H, Kaikita K, Takazoe K, Nishiyama K, et al. **Angiotensin-converting enzyme inhibition reduces monocyte chemoattractant protein-1 and tissue factor levels in patients with myocardial infarction**. J Am Coll Cardiol. 1999;34(4):983-988.

## 7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Endotheliale Dysfunktion und das Zusammenspiel von Risikofaktoren	3
Abbildung 2: Die Entstehung von „fatty streaks“ in der Entwicklung der Atherosklerose .....	6
Abbildung 3: Ursachen des Myokardinfarkts .....	9
Abbildung 4: Darstellung des Troponin-Komplexes im Myofilament.....	10
Abbildung 5: Infarktstadien des ST-Hebungsinfarktes im EKG .....	15
Abbildung 6: Medikamentöse Therapie bei Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt ..	20
Abbildung 7: Hämatoxylin-Eosin-Färbungen von Thromben unterschiedlicher Morphologie.....	34
Abbildung 8: Einteilung der Thromben nach Morphologie .....	44
Abbildung 9: Semiquantitative Auswertung der Expression von Grem1, TGF $\beta$ 1 und MIF bei Thromben mit erythrozytenreicher Morphologie .....	46
Abbildung 10: Repräsentative immunhistochemische Färbungen von Grem1, TGF $\beta$ 1 und MIF in unterschiedlicher Expression bei erythrozytenreichen Thromben .....	46
Abbildung 11: Vergleich der gefärbten Zellzahlen und Flächen innerhalb der Gruppe der erythrozytenreichen Thromben .....	47
Abbildung 12: Exemplarische Darstellung immunhistochemischer Färbungen eines Thrombus mit erythrozytenreicher Morphologie .....	48
Abbildung 13: Semiquantitative Auswertung der Expression von Grem1, TGF $\beta$ 1 und MIF bei Thromben mit zellreicher Morphologie .....	48
Abbildung 14: Repräsentative immunhistochemische Färbungen von Grem1, TGF $\beta$ 1 und MIF in unterschiedlicher Expression bei zellreichen Thromben.....	49
Abbildung 15: Vergleich der gefärbten Zellzahlen und Flächen innerhalb der Gruppe der zellreichen Thromben.....	50
Abbildung 16: Exemplarische Darstellung immunhistochemischer Färbungen eines Thrombus mit zellreicher Morphologie .....	50
Abbildung 17: Semiquantitative Auswertung der Expression von Grem1, TGF $\beta$ 1 und MIF bei Thromben mit fibrotischer Morphologie .....	51
Abbildung 18: Repräsentative immunhistochemische Färbungen von Grem1, TGF $\beta$ 1 und MIF in unterschiedlicher Expression bei fibrotischen Thromben .....	52

Abbildung 19: Vergleich der gefärbten Zellzahlen und Flächen innerhalb der Gruppe der fibro-tischen Thromben .....	53
Abbildung 20: Exemplarische Darstellung immunhistochemischer Färbungen eines Thrombus mit fibrotischer Morphologie .....	53
Abbildung 21: Semiquantitative Auswertung der Expression von Grem1, TGF $\beta$ 1 und MIF bei Thromben mit gemischter Morphologie .....	54
Abbildung 22: Repräsentative immunhistochemische Färbungen von Grem1, TGF $\beta$ 1 und MIF in unterschiedlicher Expression bei gemischten Thromben .....	55
Abbildung 23: Vergleich der gefärbten Zellzahlen und Flächen innerhalb der Gruppe der gemischten Thromben .....	56
Abbildung 24: Exemplarische Darstellung immunhistochemischer Färbungen eines Thrombus mit gemischter Morphologie .....	56
Abbildung 25: Verteilung der Zellzahlen und -flächen nach „symptom-to-balloon time“ (in h) .....	59
Abbildung 26: CD14-Expression nach Infarkttyp .....	64
Abbildung 27: Expression von CD105 bei Hyperlipoproteinämie (HLP) .....	65
Abbildung 28: Expression von MIF bei Einnahme von ACE-Hemmern .....	65



## 8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte.....	28
Tabelle 2: Allgemeine Verbrauchsmaterialien .....	28
Tabelle 3: Zusätzliche Verbrauchsmaterialien zur Fixierung der Thromben.....	29
Tabelle 4: Reagenzien zur Herstellung des Schaumzellmediums .....	29
Tabelle 5: zusätzliche Verbrauchsmaterialien für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....	29
Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien und Reagenzien für immunhistochemische Färbungen .....	29
Tabelle 7: Die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper und durchgeführte Kontrollen .....	30
Tabelle 8: Patientencharakteristika .....	41
Tabelle 9: Aufnahmemedikation .....	42
Tabelle 10: Laborparameter des Patientenkollektivs .....	43
Tabelle 11: Zellmorphologie der semiquantitativ ausgewerteten Färbungen ...	45
Tabelle 12: Expression der gefärbten Marker in den vier Morphologie-Gruppen .....	58
Tabelle 13: Expression der gefärbten Marker nach Thrombenalter-Gruppen 0-6 h, 7-24 h und >24 h .....	60
Tabelle 14: Die explorative Cluster-Analyse bezüglich der immunhistochemischen Färbungen, der Thrombusmorphologie und der „symptom-to-balloon time“ .....	62
Tabelle 15: Die explorative Cluster-Analyse bezüglich der Patientencharakteristika .....	63
Tabelle 16: Die explorative Cluster-Analyse bezüglich der Vormedikation.....	63
Tabelle 17: Die explorative Cluster-Analyse bezüglich der Laborwerte.....	64
Tabelle 18: Die Zellexpression nach Geschlecht.....	66
Tabelle 19: Die Zellexpression nach Alter .....	66
Tabelle 20: Die Zellexpression nach Vorerkrankungen .....	67
Tabelle 21: Tabellarische Darstellung der Zellexpression bezüglich der Vormedikation .....	67

Tabelle 22: Korrelationsmatrix mit den Korrelationskoeffizienten nach Spearman für die Zellfärbungen und die „symptom-to-balloon time“ .....	69
Tabelle 23: Korrelationsmatrix mit den Korrelationskoeffizienten nach Spearman bezüglich der Laborparameter und der „symptom-to-balloon time“ .....	70

## **9 Erklärung zum Eigenanteil**

Diese Arbeit wurde in der Abteilung Innere Medizin III (Schwerpunkt Kardiologie und Angiologie) der Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Tübingen unter der Betreuung von Frau PD Dr. Iris Müller durchgeführt.

Die Konzeption dieser Studie stammt von Herrn Prof. Dr. Meinrad Gawaz (Ärztlicher Direktor und Ordinarius für Innere Medizin und Kardiologie).

Die finanziellen Mittel zur Durchführung dieser Studie wurden von Herrn Prof. Dr. Geisler (stellvertretender Ärztlicher Direktor Innere Medizin III, Kardiologie und Angiologie) eingeworben.

Die Planung der Laborexperimente und deren Interpretation erfolgte durch Frau PD Dr. Iris Müller in Zusammenarbeit mit mir.

Die Thrombusaspiration im Herzkatheterlabor erfolgte durch die diensthabenden ärztlichen Mitarbeiter der Kardiologie. Die Aufarbeitung der Thromben und die Einbettung in Paraffin wurde von den Medizinisch-Technischen Assistentinnen des Labors Frau Lydia Laptev und Frau Ingrid Epple übernommen.

Die HE-Färbungen wurden zum Teil von Markus Rauer und Lisa Streib durchgeführt und von mir ausgewertet. Die immunhistochemischen Färbungen wurden nach Einarbeitung durch Frau Ingrid Epple von mir selbständig durchgeführt und ausgewertet.

Die statistische Aufarbeitung der Daten führte ich nach initialer Einführung in das Programm SPSS durch Frau Dr. Karin Müller selbständig durch. Frau Lina Maria Serna Higuita vom Institut für Klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie stand mir bei der explorativen Datenanalyse und Interpretation der Daten beratend zur Seite.

Ich versichere, die vorliegende Dissertationsschrift selbstständig verfasst und keine weiteren als die von mir angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 30.08.21

Annette Hermann

## 10 Danksagung

Ich bedanke mich bei meiner Betreuerin und Doktormutter Frau PD Dr. Iris Müller, bei Herrn Prof. Dr. Meinrad Gawaz und bei Herrn Prof. Dr. Geisler für die Möglichkeit, meine Dissertation in der Abteilung für Kardiologie und Angiologie abzuschließen und dabei einen interessanten Einblick in die experimentelle Forschungsarbeit zu bekommen. Frau PD Dr. Iris Müller danke ich insbesondere für die wissenschaftliche Betreuung und Begleitung dieser Arbeit.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei den Mitarbeitern des Labors, besonders bei Ingrid Epple und Lydia Laptev, für die Einarbeitung in die Labormethoden und ihre immer freundliche Unterstützung bei allerlei Fragen technischer Art.

Frau Dr. Lina Higuita vom Institut für Epidemiologie und Biometrie der Universität Tübingen danke ich sehr für ihre freundliche und geduldige Art, statistische Sachverhalte einfach zu erklären. Sie stand mir bei der Durchführung der explorativen Datenanalyse zur Seite. Frau Dr. Karin Müller danke ich sehr für die Einführung in die statistische Auswertung mit SPSS und ihre fachliche Unterstützung bei der Auswertung.

Meinen Mitdoktoranden Lisa Streib und Markus Rauer danke ich für die kollegiale Bereitstellung einzelner HE-Färbungen.

Meinen Freunden Marie Matela, Simone Mayer, Anna Friedrichs, Tasja Kälber und Marius Keller danke ich vielfach für die großartige Unterstützung während des Studiums und besonders in der letzten Phase der Fertigstellung dieser Arbeit. Ohne eure motivierenden und aufmunternden Worte wäre diese Arbeit nicht fertig geworden.

Meiner Familie danke ich dafür, dass sie mir den Weg von der Ausbildung durch das Medizinstudium und zur Dissertation ermöglicht hat. Besonders dankbar bin ich meiner Tante Gisela und meiner Cousine Juliane für die Bereitschaft, diese Arbeit Korrektur zu lesen, und für so Vieles mehr.

Zuletzt gilt mein besonderer Dank André: Ich danke dir für dein unendliches Verständnis, den temporären Verzicht auf gemeinsame Freizeitaktivitäten, deine aufmunternden und immer ehrlichen Worte, für dein Formatierungstalent und ganz besonders für unsere wertvolle gemeinsame Zeit.