

Aus der Klinik für Kardiologie und Pneumologie
(Prof. Dr. med. G. Hasenfuß)
im Zentrum Innere Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Stadien-abhängiger Nachweis von CD14⁺- und CD16⁺-Zellen
im humanen Herz- und Milzgewebe nach Myokardinfarkt:
Eine *post-mortem*-Analyse

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Magdalena Schlegel
aus
Göttingen

Göttingen 2014

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. K. Schäfer

2. Berichterstatter/in:

3. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

Die Inhalte der vorliegenden Arbeit wurden publiziert:

Originalarbeiten:

Czepluch FS, **Schlegel M**, Bremmer F, Behnes CL, Hasenfuss G, Schäfer K (2013): Stage-dependent detection of CD14⁺ and CD16⁺ cells in the human heart after myocardial infarction. *Virchows Arch* 463, 459-469

Kongressbeiträge:

Czepluch FS, **Schlegel M**, Bremmer F, Hasenfuß G, Schäfer K (2012): Stadien-abhängiger Nachweis humaner CD14⁺ und CD16⁺ Immunezellen in menschlichem Herzgewebe nach Myokardinfarkt: Eine *post-mortem* Analyse. *Clin Res Cardiol* 101, Suppl 1 (78. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie 2012)

Czepluch FS, **Schlegel M**, Bremmer F, Hasenfuss G, Schaefer K (2012): Stage-dependent detection of CD14⁺ and CD16⁺ immune cells in human heart tissue after myocardial infarction: A post-mortem analysis. *Eur Heart J* 33, Suppl 154 (ESC Congress 2012)

Czepluch FS, Kuschieke H, **Schlegel M**, Müller M, Bernhardt M, Bremmer F, Riggert J, Hasenfuss G, Schaefer K (2012): Krueppel-like factor 4 is downregulated in circulating monocyte subsets of patients with Coronary Artery Disease. *Eur Heart J* 33, Suppl 154 (ESC Congress 2012)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	<i>Myokardinfarkt</i>	1
1.1.1	Inzidenz, Risikofaktoren und Letalität	1
1.1.2	Definition	1
1.1.3	Ätiologie	2
1.1.4	Stadien-Einteilung	2
1.1.4.1	Akuter Myokardinfarkt	2
1.1.4.2	Subakuter Myokardinfarkt	3
1.1.4.3	Alter Myokardinfarkt	3
1.1.5	Prognose	3
1.2	<i>Klassifikation der Monozytensubpopulationen und ihre Bedeutung im Myokardinfarkt</i>	4
1.2.1	Humane Monozyten	4
1.2.2	Murine Monozyten	5
1.3	<i>Die Milz als Speicherorgan für Monozyten und Ort für extramedulläre Monozytopoese</i>	7
1.4	<i>Einfluss verschiedener Faktoren auf den Wundheilungsprozess nach Myokardinfarkt</i> 8	
1.4.1	Osteopontin	8
1.4.2	Krüppel-Like Factor 4	9
1.4.3	CD56	10
1.5	<i>Zielsetzung</i>	10
2	Material und Methoden	12
2.1	<i>Patientenkollektiv</i>	12
2.1.1	Patientenrekrutierung und Datenschutz	12
2.1.2	Ein- und Ausschlusskriterien	12
2.1.3	Gruppeneinteilung	12
2.2	<i>Materialien</i>	14
2.2.1	Geräte und Software	14
2.2.2	Reagenzien	14
2.2.3	Lösungen	15
2.2.4	Puffer	16
2.3	<i>Histologie</i>	16
2.3.1	Herstellung der Paraffinschnitte	16
2.3.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	16
2.3.3	Masson-Trichrom-Färbung	17
2.3.4	Immunhistochemische Färbungen	17

2.4	<i>Tissue Microarray</i>	19
2.4.1	Immunfärbeautomat.....	21
2.5	<i>Quantitative Analyse</i>	22
2.6	<i>Statistik</i>	23
3	Ergebnisse	24
3.1	<i>Patientenkollektiv</i>	24
3.2	<i>Detektion von CD14⁺- und CD16⁺-Zellen während verschiedener Stadien des Myokardinfarktes im Herzen</i>	29
3.3	<i>Detektion von CD14⁺- und CD16⁺-Zellen während verschiedener Stadien des Myokardinfarktes in der Milz</i>	31
3.4	<i>Erhöhte Carboanhydrase IX-Expression im akuten Myokardinfarkt</i>	33
3.5	<i>Erhöhte Kapillaranzahl im akuten Myokardinfarkt</i>	34
3.6	<i>Erhöhter Kollagenanteil im alten Myokardinfarkt</i>	36
3.7	<i>Erhöhte CD56-Expression im alten Myokardinfarkt</i>	38
3.8	<i>Erhöhte Osteopontin-Expression im subakuten Myokardinfarkt</i>	40
3.9	<i>Erhöhte Anzahl Krüppel-Like Factor 4-positiver Zellen im subakuten Myokardinfarkt</i>	41
4	Diskussion	43
4.1	<i>Stadienabhängige Monozytenrekrutierung in das infarzierte Myokardgewebe</i>	43
4.2	<i>Mobilisation von Monozyten aus der Milz während des Myokardinfarktes</i>	46
4.3	<i>Carboanhydrase XI als Marker für kardiale Hypoxie</i>	47
4.4	<i>Angiogenese im akuten Myokardinfarkt</i>	48
4.5	<i>Höchster Fibroseanteil im alten Myokardinfarkt</i>	49
4.6	<i>CD56 als Marker für perifibrotische Areale</i>	50
4.7	<i>Osteopontin als potentiellles Monozytenchemoattraktanz im Myokardinfarkt</i>	51
4.8	<i>Einfluss von Krüppel-Like Factor 4 auf Monozyten und Makrophagen während des Myokardinfarktes</i>	52
4.9	<i>Ausblick</i>	53
5	Zusammenfassung	54
6	Literaturverzeichnis	56
7	Abbildungsverzeichnis	63
8	Tabellenverzeichnis	64

Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Complex
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
ALT	Alanin-Aminotransferase
AMI	akuter Myokardinfarkt
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AT ₁ -Rezeptor	Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-1
BMI	<i>Body Mass Index</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Rinderserumalbumin)
CAIX	Carboanhydrase IX
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CK-MB	<i>Muscle-Brain type</i> der Kreatinkinase
CONTR	Kontrolle
cTN	kardiales Troponin
DC	dendritische Zellen
ECM	extrazelluläre Matrix
EKG	Elektrokardiogramm
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIF-1	<i>Hypoxia-Inducible-Factor 1</i>
IFN- γ	Interferon- γ
IL-10	Interleukin-10
KHK	koronare Herzkrankheit
KLF4	<i>Krüppel-Like Factor 4</i>
LDH	Laktatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
LSAB	<i>Labeled Streptavidin Biotin</i>
M	Molar (mol/l)
MCP-1	<i>Monocyte Chemotactic Protein-1</i>
MDP	Makrophagen/DC-Progenitorzelle
MI	Myokardinfarkt

MPS	mononukleäres Phagozytensystem
MTC	Masson-Trichrom
NCAM	<i>Neural Cell Adhesion Molecule</i>
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
o/n	<i>overnight</i> (über Nacht)
OMI	<i>old myocardial infarction</i> (alter Myokardinfarkt)
OPN	Osteopontin
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCI	<i>Percutaneous Coronary Intervention</i> (perkutane Koronarintervention)
RT	Raumtemperatur
SAMI	subakuter Myokardinfarkt
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor-β</i>
TLR-4	<i>Toll-Like Receptor-4</i>
TM	Thrombomodulin
TMA	<i>Tissue Microarray</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
UMG	Universitätsmedizin Göttingen
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
vWF	von-Willebrand-Faktor
α -CA	α -Carboanhydrase

1 Einleitung

1.1 Myokardinfarkt

1.1.1 Inzidenz, Risikofaktoren und Letalität

Der Myokardinfarkt (MI) ist die häufigste Ursache einer Herzinsuffizienz und stellt damit eine schwerwiegende Erkrankung mit hohem sozioökonomischen Einfluss dar (Nahrendorf et al. 2010). Im Jahr 2011 waren in der Bundesrepublik Deutschland 40,2 % aller Todesfälle auf Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems zurückzuführen, die damit die häufigsten Todesursachen bildeten (Statistisches Bundesamt 2012). Angeführt wurde diese Gruppe von den ischämischen Herzerkrankungen (127.101 Sterbefälle), wovon 55.286 Menschen an einem akuten oder rezidivierenden MI verstarben. Der Altersschwerpunkt der Betroffenen mit letalem Ausgang lag mit 84 % bei den über 65-jährigen, insgesamt waren Männer mit 56 % etwas häufiger betroffen als Frauen. Die Inzidenz der kardiovaskulären Erkrankungen ist weiterhin steigend. Als Grund dafür werden eine alternde Bevölkerung bei allgemeinem Bevölkerungswachstum und zunehmende Risikofaktoren genannt. Hierzu zählen Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, Hyperlipidämie, Rauchen, Übergewicht, Fehlernährung und körperliche Inaktivität (Mendis et al. 2011). Die Letalität des MI, bevor der Betroffene überhaupt das Krankenhaus erreicht, beträgt mehr als 15 %. Etwa der gleiche Anteil an Patienten ver stirbt im weiteren Verlauf innerhalb der ersten 30 Tage nach MI. Bei älteren Patienten (>75 Jahre) ist die Letalität im Vergleich zu jüngeren um etwa das Vierfache erhöht (Dietel et al. 2009).

1.1.2 Definition

Allgemeingültig beschreibt der MI eine Myokardnekrose auf Grund einer prolongierten Ischämie (Mendis et al. 2011). Ein irreversibler Zelltod tritt frühestens 20 min nach Einsetzen der Ischämie auf (Jennings und Ganote 1974). Damit eine Myokardnekrose anhand mikroskopischer Kriterien bei einer Obduktion zu identifizieren ist, müssen weitere zwei bis vier Stunden vergangen sein, abhängig vom Kollateralkreislauf des Ischämiegebietes, persistierender oder intermittierender Koronararterienokklusion, Sensitivität der Kardiomyozyten auf Ischämie, Präkonditionierung und dem individuellen Bedarf an Sauerstoff und Nährstoffen (Thygesen et al. 2007).

Die Myokardnekrose übersetzt sich weiterhin in eine Vielzahl an klinischen, elektrokardiographischen, biochemischen, bildgebenden und pathologischen Kriterien. Ein MI liegt vor, wenn bei erhöhten kardialen Biomarkerwerten (kardiales Troponin [cTN] oder die MB-Fraktion der Kreatinkinase [CK-MB]) mindestens eines der folgenden Merkmale zusätzlich auftritt: klinische Symptome einer Ischämie, neu aufgetretene ST-Streckenhebung oder Linkschenkelblock im Elektrokardiogramm (EKG), Entwicklung eines pathologischen Q im EKG, regionale Wandbewegungsstörungen des Herzmuskels oder verminderte Dickenzunahme der Infarktzone in bildgebenden Verfahren oder Identifikation von Stenosen oder Thromben der Koronararterien in der Angiographie oder Autopsie (Thygesen et al. 2012).

1.1.3 Ätiologie

Ursächlich für den MI ist in der Mehrzahl der Fälle eine koronare Herzkrankheit (KHK). Häufigster Grund für die meist akut einsetzende Ischämie ist der Verschluss eines Koronararterienastes durch eine Koronarthrombose, welche sich fast immer auf dem Boden einer rupturierten arteriosklerotischen Plaque entwickelt (Falk et al. 1995) und von einem Koronarspasmus begleitet sein kann (Davies 2000).

1.1.4 Stadien-Einteilung

Anhand (histo-)pathologischer Kriterien lässt sich der MI in drei verschiedene Stadien unterteilen, nämlich akuter MI (AMI), subakuter MI (SAMI) und alter MI (OMI), wobei die makro- und mikroskopische Erscheinung eines Infarkts von der Überlebensdauer des Patienten nach Einsetzen der Ischämie abhängig ist. Das geschädigte Gewebe unterliegt dabei einer Reihe morphologischer Veränderungen, die die einzelnen Phasen des Wundheilungsprozesses charakterisieren und im Folgenden kurz beschrieben werden sollen (Böcker et al. 2008; Kumar et al. 2010). Der Heilungsprozess kann sich über Wochen oder Monate erstrecken, bis die auf das Myokard wirkenden Kräfte durch eine elastische und derbe Kollagennarbe ausgeglichen sind (Pfeffer und Braunwald 1990).

1.1.4.1 Akuter Myokardinfarkt

Kennzeichnend für den AMI ist eine Koagulationsnekrose, die von einer akuten Entzündungsreaktion begleitet wird. Makroskopisch stellt sich nach etwa zwölf bis 24 Stunden eine rötlichblaue Myokardabblassung dar, verursacht durch stagniertes Blut, welche sich im Verlauf zu einer schärfer abgrenzbaren lehmgelben Nekrose mit hyperämischem Randsaum entwickelt. Lichtmikroskopisch hingegen zeigt sich schon nach etwa vier Stunden ein inter-

stittielles Ödem und innerhalb der ersten 24 Stunden kommt es zur Ausbildung sogenannter *wavy fibers* (engl. für gewellte Muskelfasern), Kernpyknose, gesteigerter Eosinophilie des Zytoplasmas und Kontraktionsbandnekrosen (intrazelluläre Querbänder, bestehend aus dicht gepackten Sarkomeren). Grund für die Muskelzelldeformation ist die fehlende Kontraktionsfähigkeit der Kardiomyozyten bei verbleibender Herzaktion, wodurch es zu einer welligen Stauchung kommt (Böcker et al. 2008; Kumar et al. 2010). Kurz nach Einsetzen der Ischämie exprimieren Endothelzellen vermehrt Adhäsionsmoleküle und führen zusammen mit freigesetzten Chemokinen zu einer Extravasation von neutrophilen Granulozyten in das infarzierten Gewebe, die damit die früheste Leukozytenantwort bilden, gefolgt von Monozyten und Makrophagen (Frangogiannis et al. 2002; Nahrendorf et al. 2007). So dominieren innerhalb der ersten 24 Stunden neutrophile Granulozyten das zelluläre Infiltrat, während es sich ab dem dritten Tag vornehmlich um Monozyten und Makrophagen handelt. Diese bewerkstelligen die Proteolyse und Phagozytose des nekrotischen Gewebes und schaffen damit eine wichtige Voraussetzung für die Bildung von Granulationsgewebe (Böcker et al. 2008; Kumar et al. 2010).

1.1.4.2 Subakuter Myokardinfarkt

Im Stadium des SAMI liegt der Infarktbeginn ca. drei bis 14 Tage zurück und ist gekennzeichnet durch das Vorhandensein von Granulationsgewebe, welches makroskopisch dunkelrot bis bräunlich erscheint. Dieses enthält neu gebildete Kapillaren, welche zunehmend vom Rand der Infarktzone in die Nekrose einsproßen, Fibroblasten und eine lockere Anhäufung extrazellulärer Matrix (ECM), welche sich im Verlauf verdichtet. Eingewanderte Fibroblasten synthetisieren ab der zweiten Woche Kollagenfasern, und die Entzündungszellen verschwinden langsam (Böcker et al. 2008; Kumar et al. 2010).

1.1.4.3 Alter Myokardinfarkt

Nach etwa sechs Wochen ist die Nekrosezone vollständig resorbiert und durch derbes kollagenreiches Narbengewebe ersetzt, was kennzeichnend für den OMI ist. Makroskopisch ist eine grauweiße sog. Schwiele erkennbar (Böcker et al. 2008; Kumar et al. 2010).

1.1.5 Prognose

Prognostisch bedeutsam für den Patienten nach stattgehabtem MI sind vor allem die ersten ein bis zwei Wochen nach dem Ereignis (Nahrendorf et al. 2007; Nahrendorf et al. 2010). In diesem Zeitfenster des Wundheilungsprozesses ist das sich neu bildende Gewebe besonders

vulnerabel gegenüber mechanischem Stress, wie er durch intraventrikulären Druck und myokardiale Kontraktion verursacht wird. Ein unzureichender Heilungsprozess kann im Weiteren zu einer Ausdehnung der Infarktzone, linksventrikulärer Dilatation, Myokardruptur und subsequent zur myokardialen Insuffizienz mit letalem Ausgang führen. Während der ersten zwei Wochen nach MI regulieren vor allem Monozyten und Makrophagen wichtige Reparaturprozesse. Dazu zählt die Beseitigung toten Zellmaterials, Induktion von Gefäßneubildung (Angiogenese) und Neustrukturierung der ECM, wobei sowohl eine unzureichende als auch eine exzessive Monozytenantwort negative Auswirkungen auf den Wundheilungsprozess haben können (Nahrendorf et al. 2007; Nahrendorf et al. 2010).

1.2 Klassifikation der Monozytensubpopulationen und ihre Bedeutung im Myokardinfarkt

Monozyten bilden einen Teil des mononukleären Phagozytensystem (MPS) und repräsentieren Immuneffektorzellen. Sie sind mit einer Reihe an Chemokin- und Pathogen-erkennenden Rezeptoren ausgestattet, die ihre Migration vom Blut zu Orten entzündlichen Geschehens vermitteln. Weiterhin produzieren sie inflammatorische Zytokine, phagozytieren Zellen und toxische Metabolite und sind zur Antigenpräsentation befähigt. Eine besondere Eigenschaft stellt ihre Vermögen dar, sich in dendritische Zellen (DCs) und Makrophagen zu differenzieren. Determiniert sind Migrationsverhalten und Differenzierung unter anderem durch das inflammatorische Milieu und davon ausgehende Stimuli (Serbina et al. 2008). Monozyten entwickeln sich aus Makrophagen/DC-Progenitorzellen (MDPs), einer Untergruppe proliferierender Zellen im Knochenmark, die phänotypische Charakteristika mit anderen myeloiden Vorläuferzellen teilen.

1.2.1 Humane Monozyten

Humane Monozyten lassen sich anhand ihrer Oberflächenexpression von CD14 und CD16 in verschiedene Subpopulationen mit unterschiedlichen funktionellen Eigenschaften unterteilen (Geissmann et al. 2010). Als Erweiterung des Konzepts von Passlick et al., die 1989 nur zwei Subpopulationen beschrieben (Passlick et al. 1989), werden heute drei Subpopulationen unterteilt, nämlich klassische, intermediäre und nicht klassische Monozyten (Ziegler-Heitbrock et al. 2010). Die klassischen Monozyten exprimieren CD14 in hoher Konzentration, jedoch kein CD16 ($CD14^{++}CD16^{-}$, nachfolgend als $CD16^{-}$ -Monozyten bezeichnet). Die intermediären Monozyten zeigen eine hohe Expression von CD14 und

weisen gleichzeitig eine geringe Expression von CD16 auf (CD14⁺⁺CD16⁺). Die nicht klassischen Monozyten sind gekennzeichnet durch eine niedrige Expression von CD14 und eine hohe Expression von CD16 (CD14⁺CD16⁺⁺). Während die klassischen Monozyten die vorherrschende Population im Blut bilden, machen die nicht klassischen Monozyten nur ca. 10 % aller Monozyten aus. Die Monozytensubpopulationen weisen Unterschiede in Migrationsverhalten und Funktion auf. CD16⁺-Monozyten exprimieren u.a. den Chemokinrezeptor CX₃CR1 und werden daher ligandenabhängig durch CX₃CL1 rekrutiert (Ancuta et al. 2003). Erhöhte Zellzahlen lassen sich bei einer Vielzahl inflammatorischer Erkrankungen, unter anderem rheumatoider Arthritis (Kawanaka et al. 2002) oder chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (Hanai et al. 2008) nachweisen und zeigen positive Assoziationen mit Hypercholesterinämie (Rothe et al. 1996) sowie Arteriosklerose und Übergewicht (Rogacev et al. 2010). Hinsichtlich der Zytokinproduktion zeigt sich nach Stimulation von *Toll-Like Receptor-4* (TLR-4) mit Lipopolysaccharid (LPS) eine erhöhte Expression von Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), während das antiinflammatorische Interleukin-10 (IL-10) kaum nachgewiesen werden kann (Belge et al. 2002). CD16⁻-Monozyten hingegen exprimieren CCR2, einen Rezeptor für das inflammatorische *Monocyte Chemoattractic Protein-1* (MCP-1) und können Myeloperoxidase sezernieren (Gordon und Taylor 2005).

1.2.2 Murine Monozyten

In Analogie zu den humanen Monozyten existieren auch im murinen System Subpopulationen, die erstmals von Palframan et al. 2001 beschrieben wurden (Palframan et al. 2001) und durch eine genaue Phänotypisierung und funktionelle Charakterisierung von Geissmann et al. ergänzt wurden (Geissmann et al. 2003). Eine Subpopulation exprimiert das Lymphozytenantigen Ly-6C in hohen Konzentrationen (Ly-6C^{high}) und repräsentiert rund 50 bis 60 % der Monozyten in der Maus, wohingegen die andere Subpopulation Ly-6C nur in geringer Menge aufweist (Ly-6C^{low}). Hinsichtlich ihrer Expression von CCR2 und CX₃CR1 entsprechen die murinen Ly-6C^{high}-Monozyten in großen Teilen den humanen CD16⁻-Monozyten und die Ly-6C^{low}-Monozyten den CD16⁺-Monozyten, obwohl auch einige Unterschiede aufgezeigt werden konnten (Ingersoll et al. 2010). Anhand dieser Erkenntnisse war es möglich, das zeitliche Auftreten und die funktionelle Relevanz der phänotypisch heterogenen Monozyten im murinen MI-Modell zu untersuchen (Nahrendorf et al. 2007; Nahrendorf et al. 2010). Dabei kommt es während des MI zu einem biphasischen Anstieg der Subpopulationen (Abbildung 1). Während der ersten drei Tage nach MI (Phase I) exprimiert

das infarzierte Gewebe vor allem CCL2 und bewirkt damit über CCR2 die ligandenabhängige Rekrutierung von Ly-6C^{high}-Monozyten, zwischen Tag drei und sieben (Phase II) beginnt die CX₃CL1-vermittelte Migration von Ly-6C^{low} Monozyten. Funktionell bewerkstelligen die Ly-6C^{high}-Monozyten vor allem Phagozytose und Proteolyse des nekrotischen Gewebes während der frühen inflammatorischen Phase des MI, indem sie TNF- α , IL-1 β , Myeloperoxidase, Matrixmetalloproteinasen, Cathepsine und Urokinase-Plasminogen-Aktivator sezernieren. Die Ly-6C^{low}-Monozyten hingegen besitzen vor allem reparative und proangiogenetische Eigenschaften während der darauf folgenden proliferativen Phase, was sich u.a. über eine Expression von IL-10, *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β) und *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) äußert (Abbildung 1).

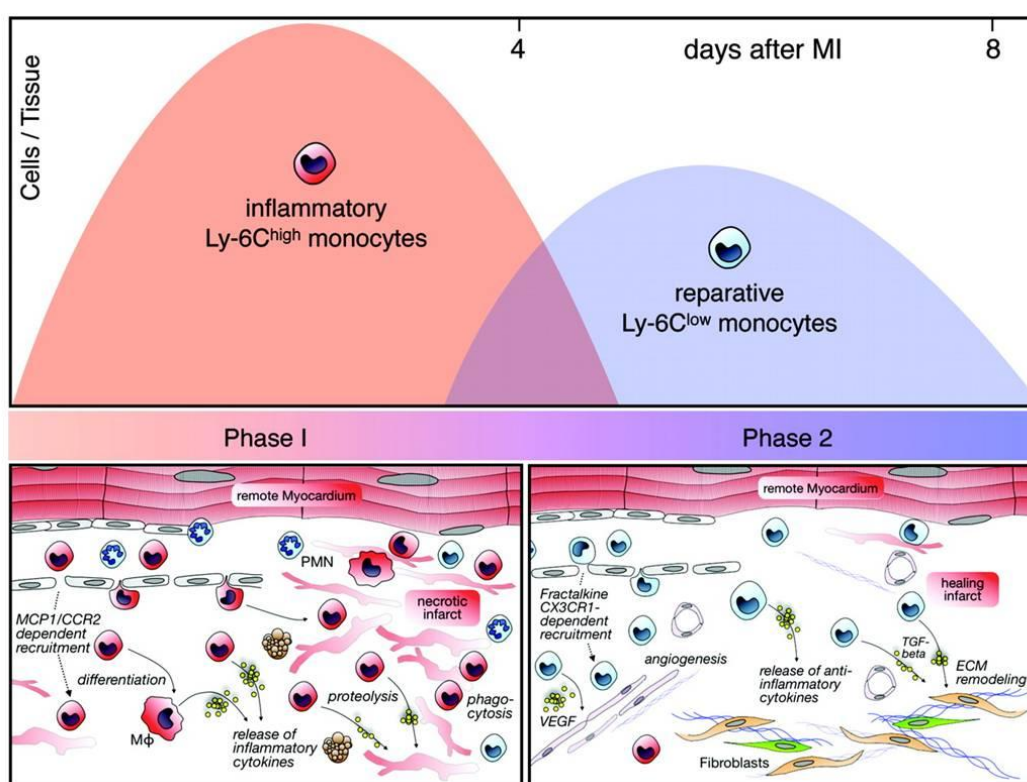


Abbildung 1: Biphasischer Monozytenanstieg nach Myokardinfarkt in der Maus

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Monozytenrekrutierung nach MI und im unteren Teil die funktionelle Relevanz der Monozytensubpopulationen im Wundheilungsprozess. MCP1 bedeutet *monocyte chemoattractant protein 1*; CCR2, *C-C chemokine receptor type 2*; PMN, polymorphnukleärer Neutrophiler; M Φ , Makrophagen; CX3CR1, *CX3C chemokine receptor 1*; VEGF *vascular endothelial growth factor*, TGF- β , *transforming growth factor-beta* und ECM, extrazelluläre Matrix. (Nahrendorf et al. 2010 S. 2439).

Die Rolle der Monozytensubpopulationen im humanen und murinen System wird unterschiedlich interpretiert. So nimmt Ziegler-Heitbrock an, dass es sich bei den CD16⁺-Monozyten um inflammatorische Zellen handelt (Ziegler-Heitbrock 2007), während Nahrendorf et al. die murinen Ly-6C^{high}-Monozyten, die den humanen CD16⁻-Monozyten entsprechen, als proinflammatorisch deklariert (Nahrendorf et al. 2010).

Während des humanen MI zeigen Patienten analog zum Mausmodell einen ähnlichen biphasischen Anstieg der im Blut zirkulierenden Monozyten, beginnend mit den CD16⁻-Monozyten, die ihr Maximum an Tag 2,6 nach MI erreichen, gefolgt von den CD16⁺-Monozyten mit Spitzenwerten an Tag 4,8 (Tsujioka et al. 2009). Die funktionelle Relevanz der Monozytensubpopulationen wurde bisher nur anhand des prognostischen Wertes der im Blut zirkulierenden Monozyten nach MI ermittelt. Tsujioka et al. konnten zeigen, dass die Anzahl an CD16⁻-Monozyten im Blut negativ mit der Grad der Erholung in Bezug auf die linksventrikuläre Ejektionsfraktion sechs Monate nach AMI assoziiert ist (Tsujioka et al. 2009). Weiterhin zeigte sich nach erfolgreich durchgeführter perkutaner Koronarintervention (PCI) eine signifikant negative Korrelation zwischen der koronaren Flussgeschwindigkeitsreserve und CD16⁻-Monozyten (Ikejima et al. 2010). In einer Studie von Liu et al. konnte gezeigt werden, dass nach Stentimplantation die Anzahl an CD16⁻-Monozyten bei Patienten mit Restenose signifikant höher war als bei Patienten ohne Restenose (Liu et al. 2010). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine gesteigerte Anzahl oder Aktivität der CD16⁻-Monozyten negative Konsequenzen für den Wundheilungsprozess haben könnte, wohingegen den CD16⁺-Monozyten möglicherweise protektive Eigenschaften zukommen. Ungeklärt bleibt allerdings, ob es analog zum Mausmodell auch im humanen MI-Gewebe zu einer biphasischen Rekrutierung der Monozytensubpopulationen in das infarzierte Gewebe kommt und welche funktionelle Relevanz den einzelnen Subpopulationen dabei zukommt.

1.3 Die Milz als Speicherorgan für Monozyten und Ort für extramedulläre Monozytopoese

Derzeit wird postuliert, dass sich im Blut zirkulierende Monozyten irreversibel in DCs oder Makrophagen umwandeln, sobald sie in das Gewebe einwandern (Gordon und Taylor 2005; Mosser und Edwards 2008). Aktuelle Studien im Mausmodell zeigen hingegen, dass Monozyten auch undifferenziert in größeren Mengen in der roten Pulpa der Milz gespeichert und im Falle einer Entzündungsreaktion rasch ins Blut ausgeschüttet werden können (Swirski

et al. 2009). Dabei sitzen die Monozyten zu Haufen gruppiert, bestehend aus 20 bis 50 Zellen, in der subkapsulären roten Pulpa der Milz. Diese Zellen unterscheiden sich von den kürzlich beschriebenen „Eisen-rezyklierenden rote-Pulpa Makrophagen“ oder „Marginalzonen-Makrophagen“ (Mebius und Kraal 2005) und zeigen die gleiche Morphologie wie die im Blut zirkulierenden Monozyten. Im Falle eines AMI verlassen sie die Milz, um über den Blutstrom das infarzierte Gewebe zu erreichen. Studien im Maus- und Rattenmodell konnten zeigen, dass 40 bis 70 % der während der ersten Stunden in das ischämische Myokard rekrutierten Monozyten aus der Milz stammen (Swirski et al. 2009). Beeinflusst wird die Bereitstellung der Monozyten aus dem Milzreservoir über Angiotensin II, was über den monozytären Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-1 (AT₁-Rezeptor) unter anderem zur Umstrukturierung ihres Zytoskeletts und Chemotaxis-induzierter Migration führt (Kintscher et al. 2001). Ein drastischer Anstieg an myeloiden Vorläuferzellen in der Milz nach MI könnte weiterhin auf eine extramedulläre Monozytopoese in der Milz hindeuten, getriggert durch IL-1 β , um den kontinuierlichen Bedarf zu decken und das Milzreservoir wieder aufzufüllen. So kommt es während einer Entzündungsreaktion zu einem initialen Abfall der Monozytenzahl in der Milz, die aber innerhalb einer Woche wieder ihren Ausgangswert erreicht (Leuschner et al. 2012). Inwieweit die Erkenntnisse aus dem murinen System auf die humane Situation übertragbar sind, ist unbekannt. So liegen derzeit keine Studien über die Proliferationsrate von in der Milz ansässigen Monozyten während eines MI vor.

1.4 Einfluss verschiedener Faktoren auf den Wundheilungsprozess nach Myokardinfarkt

1.4.1 Osteopontin

Bei Osteopontin (OPN) handelt es sich unter anderem um ein Monozyten-Chemoattraktanz, das maßgeblich am kardialen Heilungsprozess nach MI beteiligt ist. Es wurde erstmals im Jahr 1985 beschrieben, nachdem es aus der Knochenmatrix von Rindern isoliert wurde (Franzen und Heinegard 1985) und daher seinen Namen erhielt. Als Syntheseort im Herzen werden Kardiomyozyten, mikrovaskuläre Endothelzellen und Fibroblasten angesehen (Singh et al. 1995). Das ECM-Protein reguliert über die Bindung verschiedener Zelloberflächenrezeptoren wichtige Vorgänge des myokardialen Umbaus nach MI (Singh et al. 2010). Seine Interaktion mit transmembranären Integrinen (Rodrigues et al. 2007) und dem Adhäsionsmolekül CD44 (Weber et al. 1996), welches u.a. auf Monozyten exprimiert wird, aktiviert

eine Vielzahl von Signaltransduktionswegen und vermittelt Zelladhäsion, Migration, Proliferation, Zellstruktur und Apoptose. Hinsichtlich der Funktion als Monozyten-Chemoattraktanz konnte bei OPN-defizienten Mäuse eine herabgesetzte Monozytenrekrutierung nach Hinterlaufischämie beobachtet werden (Wittig et al. 1999). OPN-Expression im MI wurde erstmals von Murry et al. im Rattenmodell beschrieben (Murry et al. 1994), wobei die infiltrierenden Makrophagen als Syntheseort angesehen wurden. Funktionell spielt OPN vor allem während der frühen inflammatorischen Phasen nach MI eine Rolle, indem es die Proliferation und Migration von Makrophagen, glatten Muskelzellen und Endothelzellen beeinflusst (Komatsubara et al. 2003). OPN-defiziente Mäuse nach Koronarligation zeigten eine vermehrte linksventrikuläre Dilatation, verursacht durch Infarktexpansion, Dilatation des nicht infarzierten Myokards und reduzierte Kollagenakkumulation (Trueblood et al. 2001). Während des humanen MI wurden erhöhte OPN-Konzentrationen im Plasma gemessen (Coskun et al. 2006) und es zeigte sich eine Assoziation zwischen erhöhten OPN-Werten und der Restenoserate nach perkutaner Koronar-intervention (Kato et al. 2006).

1.4.2 Krüppel-Like Factor 4

Neben OPN scheint auch der Zinkfinger-Transkriptionsfaktor *Krüppel-Like Factor 4* (KLF4) eine wichtige Rolle bei Monozytendifferenzierung (Feinberg et al. 2007) und -funktion (Feinberg et al. 2005) zu spielen und Gewebsentwicklung und Zellproliferation maßgeblich zu beeinflussen (Atkins und Jain 2007). Erstmals wurde die Expression von KLF4 in den Epithelzellen von Darm und Haut beschrieben (Shields et al. 1996; Garrett-Sinha et al. 1996) und ein systemischer Verlust dieses Faktors resultierte in neonatalem Tod durch die fehlende Funktion der Hautbarriere (Segre et al. 1999). Funktionell vermittelt KLF4 unter anderem eine Zellantwort auf proinflammatorische Signale in humanen Makrophagen (Feinberg et al. 2005). Induziert wird die Expression von KLF4 durch Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Interferon- γ (IFN- γ), LPS und TNF- α (Chen et al. 2000; Chen et al. 2002; Nickenig et al. 2002; Feinberg et al. 2005). Auch in Endothelzellen konnte eine Induktion von KLF4 durch inflammatorische Stimuli und Scherspannung beobachtet werden und eine Überexpression von KLF4 resultierte in der Sekretion antiinflammatorischer und antithrombotischer Faktoren, wie endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) und Thrombomodulin (TM) (Hamik et al. 2007). Weiterhin spielt KLF4 als Promotor für der Entwicklung muriner Ly-6C^{high}- und Ly-6C^{low}-Monozyten eine wichtige Rolle. Eine KLF4-Defizienz führte dabei zu einer herabgesetzten Expression von CCR2 und einem Verlust der inflammatorischen Monozyten (Alder et al. 2008). Darüber hinaus beeinflusst KLF4 eine Reihe von Genen, die den M1- und M2-

Phänotyp von Makrophagen charakterisieren, indem es über bestimmte molekulare Mechanismen die M2-Makrophagen induziert und die proinflammatorischen M1-Makrophagen inhibiert (Liao et al. 2011). Über die Funktion von KLF4 im Herzen ist zurzeit noch wenig bekannt. Kardiovaskulärer Stress, Nachlasterhöhung und damit verbundene kardiale Hypertrophie führen zu einer erhöhten Expression von KLF4 in den Kardiomyozyten. Diese Überexpression reguliert verschiedene Prozesse und kompensiert damit eine Zunahme der Hypertrophie (Liao et al. 2010).

1.4.3 CD56

Einen Marker für den Verlust von Zell-Zell-Kontakten stellt CD56 dar (Kanno und Saffitz 2001; Kanno et al. 2003), auch *Neural Cell Adhesion Molecule* (NCAM) genannt. Dabei handelt es sich um ein Membran-assoziiertes Glykoprotein und Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie. Es vermittelt die Zell-Zell-Adhäsion und spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Regeneration des Nervensystems (Maness und Schachner 2007). Über die Bedeutung von CD56 im Herzen ist aktuell wenig bekannt, jedoch konnte eine vermehrte Expression im Rahmen der ischämischen Herzkrankheit beim Menschen (Gattenlohner et al. 2003), im murinen MI sowie in der linksventrikulären Hypertrophie im Rattenmodell (Nagao et al. 2010) beobachtet werden. Hinsichtlich der Funktion wurde bei CD56-defizienten Mäusen eine verminderte Zellproliferation und erhöhter Zelltod bei metabolischem Stress festgestellt (Nagao et al. 2010).

1.5 Zielsetzung

Angesichts der wichtigen Bedeutung von Monozyten für den kardialen Wundheilungsprozess nach MI und der limitierten Anwendbarkeit von Tiermodellen auf den Menschen war es Ziel der Studie, das zeitliche Auftreten von CD14⁺- und CD16⁺- Zellen im humanen Herz- und Milzgewebe sowie ihre funktionelle Relevanz während verschiedenen Phasen des MI zu evaluieren.

Tiermodelle konnten zeigen, dass es während eines MI zu einem biphasischen Anstieg von Monozytensubpopulationen im infarzierten Gewebe kommt und diese unterschiedliche, d. h. proinflammatorische und reparative, Eigenschaften besitzen (Nahrendorf et al. 2007; Nahrendorf et al. 2010). Rekrutiert werden die Monozyten hierbei vornehmlich aus der Milz,

welche als wichtiges Speicherorgan für undifferenzierte Monozyten (Swirski et al. 2009) und Ort extramedullärer Monozytopoese (Leuschner et al. 2012) identifiziert wurde.

Neben CD14⁺- und CD16⁺-Zellen sollten verschiedenen Biomarker des Wundheilungsprozesses betrachtet und mögliche Korrelationen überprüft werden. Von Interesse waren diesbezüglich insbesondere OPN, KLF4 und CD56, welche sich in der Literatur als relevante Faktoren für Infarktheilung erwiesen haben. Da die zeitlich und räumlich koordinierte Expression von Zytokinen, Zelladhäsionsmolekülen und extrazellulären Matrixproteinen die verschiedenen Infarktphasen maßgeblich beeinflusst, sollten weiterhin Ischämieausdehnung, Angiogenese und Fibrosierung im Herzen betrachtet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

2.1.1 Patientenrekrutierung und Datenschutz

In die Studie wurden retrospektiv insgesamt 45 Patienten aufgenommen, die im Zeitraum zwischen Juni 2005 und Juli 2009 verstorben und nach ihrem Tod in der Abteilung Pathologie der Universitätsmedizin Göttingen (UMG) obduziert worden waren. Hierbei handelte es sich sowohl um Patienten, die an den Folgen eines MI als auch an einer nicht-kardialen Ursache verstorben sind. Im Rahmen der Obduktion, in die die Angehörigen zuvor eingewilligt hatten, wurden routinemäßig Gewebeproben der Patienten asserviert. In der vorliegenden Studie konnte so auf bereits existierende Paraffinblöcke von Herz- und Milzgewebe zurückgegriffen und diese für die histologische Evaluation verwendet werden. Zur Erstellung einer klinischen Datenbank wurden die jeweiligen Patientenakten aus dem Zentralarchiv der UMG und Krankenhäusern im Landkreis Göttingen angefordert und ausgewertet. Auch relevante Informationen aus den Sektionsprotokollen wurden hierbei erfasst. Für die Studie lag ein positives Ethikvotum (Antragsnummer: 8/7/10) der UMG vor und sie steht im Einklang mit den Prinzipien der Deklaration von Helsinki. Um den Datenschutz der Patienten zu gewährleisten, wurde während der gesamten Studie pseudonymisiert vorgegangen.

2.1.2 Ein- und Ausschlusskriterien

Wichtige Voraussetzung für die Aufnahme der Patienten in die Studie war die mikroskopisch gute Beschaffenheit der Präparate. Ausschlusskriterien waren entzündliche Herzerkrankungen sowie eine systemische immunsuppressive Behandlung. Ausschlusskriterien für die Aufnahme in die Kontrollgruppe bildeten zudem hochgradige hypertrophe und fibrotische Veränderungen der Ventrikel, entzündliche Herzerkrankungen sowie maligne Erkrankungen der weißen Blutzellen und Stammzelltransplantation.

2.1.3 Gruppeneinteilung

Die Zuordnung der Patienten zu den vier Gruppen AMI, SAMI, OMI und CONTR erfolgte durch die Abteilung Pathologie (Dr. med. Felix Bremmer) anhand etablierter makro- und mikroskopischer Kriterien am Herzen (Kumar et al. 2010). Zur mikroskopischen Beurteilung

wurden Hämatoxylin-Eosin (HE)-Schnitte betrachtet (Abbildung 2). Den AMI kennzeichnete das Vorhandensein einer Koagulationsnekrose mit interstitiellem Ödem, gewellten Muskelfasern, fehlenden Zellkernen und gesteigerter Eosinophilie sowie eingewanderten Leukozyten. Der SAMI wurde anhand von Granulationsgewebe mit einer lockeren Anhäufung von ECM und noch bestehendem Zellinfiltrat identifiziert. Der OMI präsentierte sich durch derbes Bindegewebe ohne zelluläres Infiltrat. Im CONTR-Gewebe sollten keine pathologischen Veränderungen sichtbar sein. Als problematisch bei der Gruppeneinteilung erwies sich, dass die Übergänge zwischen einzelnen Infarktstadien oft fließend waren und auch kleinere Reinfarkte dazu führten, dass in einigen Gewebeblöcken mehrere Stadien gleichzeitig auszumachen waren. Dieser Aspekt musste bei der histologischen Evaluation besonders berücksichtigt werden.

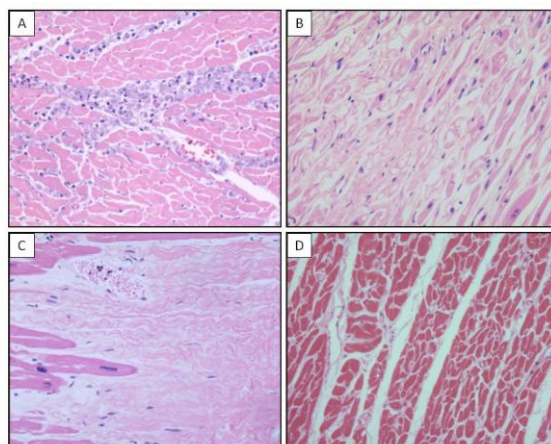


Abbildung 2: Stadien-Einteilung des Myokardinfarktes anhand morphologischer Kriterien im HE-Schnitt

Die Mikrofotografien zeigen jeweils ein repräsentatives Bild für AMI (A), SAMI (B), OMI (C) und CONTR (D). Die Stadien-Einteilung erfolgte anhand der oben beschriebenen histologischen Kriterien. Vergrößerung x 200.

2.2 Materialien

2.2.1 Geräte und Software

Tabelle 1: Geräte und Software

Gerät/ Software	Firma
Arrayer Booster	Alphelys SAS, Plaisir, F
GraphPad Prism, Version 5.01	GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA
Image-Pro Plus, Version 4.5.0.29	Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA
Manueller Tissue Arrayer MTA-1	Alphelys SAS, Plaisir, F
Mikroskop (Olympus BX51)	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, D
Paraffin-Ausgießstation Tissue Block Dispenser PAG12	Medite, Burgdorf, D
Paraffin-Streckbad 1052	GFL GmbH, Burgwedel, D
Rotationsmikrotom RM2165	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, D
SPSS Statistics, Version 19	IBM Deutschland Research & Development GmbH, Böblingen, D
TMA Designer 2, Version 1.0.0.8	Alphelys SAS, Plaisir, F

2.2.2 Reagenzien

Tabelle 2: Reagenzien

Artikel	Artikel-Nr.	Firma
ABC Kit	PK-6110	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA
Acid-Fuchsin	F8129	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
AEC Substrate Kit	00-2007	Invitrogen Corporation, Camarillo, CA
Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse, Detection System	K5005	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, D
Antibody Diluent	S3022	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, D
Biebrich-Scarlet	B6008	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
BSA (Bovines Serum Albumin)	A7906	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Eisenchlorid	23.648-9	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Eisessig	1.000063.1000	Merck KGaA, Darmstadt, D
Eosin Y Alcoholic	6766007	Thermo Shandon, Pittsburgh, USA
Ethanol	1009831000	Merck KGaA, Darmstadt, D
Fast Red	N-8002	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Formalin	252549	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Gills Hämatoxylinlösung	6765997	Thermo Fisher Scientific Germany, Braunschweig, D
Goat Serum (Normal)	X0902	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, D
H ₂ O ₂ 30 %	55760	Otto Fischer GmbH & Co. KG, Saarbrücken, D
Hämatoxylin	1.043.020.100	Merck KGaA, Darmstadt, D
Histomount	9999122	Thermo Fisher Scientific Germany, Braunschweig, D
Immu-Mount	9990402	Thermo Fisher Scientific Germany, Braunschweig, D
Mayers Hämatoxylinlösung	MHS32-1L	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D

Artikel	Artikel-Nr.	Firma
Methanol	1.06009.2500	Merck KGaA, Darmstadt, D
Natronlauge	1.09136.1000	Merck KGaA, Darmstadt, D
PBS, 10x	70011-063	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Phosphomolybdensäure	P7390	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Phosphotungstensäure	P6395	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Pikrinsäure-Lösung, gesättigt	P6744-1GA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Salzsäure	1.09911.0001	Merck KGaA, Darmstadt, D
Sodium citrate tribasic dihydrate	S4641-500G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Solvent Blue 43	531251	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Triton X-100	S3426	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Trizma-Base	T6066	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Xylol	9713.3	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, D
Zinkformalin	6764255	Thermo Shandon, Pittsburgh, USA

2.2.3 Lösungen

Tabelle 3: Lösungen

Lösung	Menge	Reagenz
Anilinblau-Lösung	2,5 g	Solvent Blue 43
	2 ml	Eisessig
	auf 100 ml	Aqua dest.
Biebrich-Scharlachrot-Säurefuchsin-Lösung	90 ml	Biebrich-Scarlet (1 %, in Aqua dest.)
	10 ml	Acid-Fuchsin (1 %, in Aqua dest.)
	1 ml	Eisessig
Bouin´s Fixative	750 ml	Pikrinsäure-Lösung, gesättigt
	250 ml	Formalin
	50 ml	Eisessig
Essigsäure, 1 %	1 ml	Eisessig
	auf 100ml	Aqua dest.
Phosphomolybdic-Phosphotungstic-Lösung	5 g	Phosphomolybdensäure
	5 g	Phosphotungstensäure
	auf 200 ml	Aqua dest.
Weigerts-Eisen-Hämatoxylin-Lösung	<u>Lösung A</u>	
	1 g	Hämatoxylin
	auf 100 ml	Ethanol (95 %, in Aqua dest.)
	<u>Lösung B</u>	
	4 ml	Eisenchloridlösung (29 %, in Aqua dest.)
	1 ml	Konzentrierte Salzsäure
	auf 100 ml	Aqua dest.
A:B	1:1 (zeitnah ansetzen)	

2.2.4 Puffer

Tabelle 4: Puffer

Puffer	Menge	Reagenz
Citrat-Puffer, 0,01 M, pH 6,0	2,1 g	Sodium citrate tribasic dihydrate
	auf 1000 ml	Aqua dest.
	pH auf 6,0 titrieren	Salzsäure
PBS, 1x	100 ml	PBS, 10 x
	auf 1000 ml	Aqua dest.
TBS, 0,05 M, pH 7,6	6,1 g	Tris base
	auf 1000 ml Aqua dest.	
	pH auf 7,6 titrieren	Salzsäure

2.3 Histologie

2.3.1 Herstellung der Paraffinschnitte

Die Gewebeproben wurden nach Entnahme über 24 Stunden in 10 %iger Formaldehydlösung fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms wurden 5 bis 8 µm dicke Schnitte hergestellt und auf silanisierte Objektträger aufgetragen. Die Schnitte wurden anschließend im Wärmeschrank bei 40 °C getrocknet.

2.3.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Bei der HE-Färbung handelt es sich um eine histologische Routinefärbung, die als Übersichtsfärbung zur morphologischen Beurteilung der Gewebeschnitte vor Anfertigung der immunhistochemischen Färbungen diene. Hämatoxylin färbt Zellkerne und Zytoplasmabestandteile, die reich an rauem endoplasmatischem Retikulum sind, blauviolett. Andere Zytoplasmaanteile sowie Kollagenfasern werden durch Eosin rot gefärbt.

Zunächst wurden die Präparate für 3 x 5 min in Xylol entparaffiniert und anschließend zur Rehydrierung in eine absteigende Ethanolreihe überführt. Nach 8-minütiger Inkubation mit Mayers Hämatoxylinlösung wurden die Präparate für 15 min in Leitungswasser gebläut und anschließend kurz mit destilliertem Wasser (Aqua dest.) gespült. Es folgte für 5 sec die Inkubation mit Eosin und abermaliges Spülen mit Aqua dest. In aufsteigender Alkoholreihe wurden die Präparate dehydriert, für 5 min in Xylol geklärt und eingedeckt.

2.3.3 Masson-Trichrom-Färbung

Bei der Masson-Trichrom (MTC)-Färbung handelt es sich um eine Bindegewebsfärbung, die zur Evaluation des Kollagenanteils dient. Die Kollagenfasern des Bindegewebes erscheinen dabei tiefblau, zelluläre Bestandteile hingegen in verschiedenen Rottönen.

Die entparaffinierten und in Aqua dest. überführten Präparate wurden über Nacht (o/n) unter dem Abzug in *Bouin's Fixative* nachfixiert und anschließend unter laufendem Leitungswasser gewaschen. Der erste Färbvorgang erfolgte für 10 min in Weigert's-Eisen-Hämatoxylin-Lösung. Nach einem weiteren Waschvorgang in Leitungswasser für 10 min und Spülen mit Aqua dest. wurden die Präparate für 10 min mit Biebrich-Scharlachrot-Säurefuchsin-Lösung inkubiert und anschließend wiederholt gespült. Zum Differenzieren wurde Phosphomolybdic-Phosphotungstic-Lösung verwendet und das Ergebnis unter dem Mikroskop kontrolliert. In Anilinblau-Lösung wurden die Präparate für 8 min gegengefärbt, mit Aqua dest. gespült und in 1 %iger Essigsäure für 5 min abermals differenziert. Als letzter Schritt erfolgte das Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe und Eindecken mit *Histomount*.

2.3.4 Immunhistochemische Färbungen

Wie auch bei den Nativfärbungen erfolgte als erster Schritt das Entparaffinieren in Xylol und Wässern in absteigender Alkoholreihe und Aqua dest. Zur Blockierung der endogenen Peroxidase wurden die Präparate für jeweils 10 min mit 3 %igem H_2O_2 in Methanol inkubiert und anschließend für 5 min in Aqua dest. gespült. Im Fall der vWF-Färbung erfolgte nun die Permeabilisierung in 0,05 %igem Triton-X für 10 min. Mittels Hitzedemaskierung in 0,01 molarem (M) Citrat Puffer (pH 6) für 6 min bei 800 W in der Mikrowelle wurden die durch Formalinfixierung verursachten Aldehydvernetzungen aufgehoben, um die spezifischen Antigene für den Primärantikörper zugänglich zu machen. Anschließend wurden die Präparate zum Abkühlen für 20 min bei Raumtemperatur (RT) im Citrat-Puffer belassen. Als nächster Schritt wurden die Präparate mit 10 % *Normal Goat Serum* in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) für 30 min bei RT inkubiert, um elektrostatische Ladungen abzusättigen und unspezifische Anfärbungen zu vermeiden. Anschließend folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (siehe Tabelle 5). Die Verdünnung der Antikörper, sofern keine unverdünnte Anwendung, erfolgte mit *Antibody Diluent*, welches Hintergrund-reduzierende Komponenten besitzt.

Tabelle 5: Verwendete Primärantikörper

CAIX bezeichnet Carboanhydrase IX; CD, *Cluster of differentiation*; KLF4, *Krüppel-like factor 4*; NCAM, *Neural Cell Adhesion Molecule*; OPN, Osteopontin; vWF, von-Willebrand-Faktor; o/n, über Nacht.

Verwendeter Primärantikörper	Klon	Firma (Artikel-Nr.)	Konzentration	Inkubationsdauer
CA IX (H-120)	H-120	Santa Cruz (sc-25599)	1:20	60 min RT
CD16 [2H7], prediluted	2H7	Abcam (ab74512)	unverdünnt	o/n 4°C
Ki-67	K-2	Zytomed (MSK018)	1:50	60 min RT
KLF4	Polyklonal	Abcam (ab72543)	1:50	o/n 4°C
NCAM (CD 56)	123C3	Invitrogen 18-0152 (1ml)	1:50	30 min RT
NCL-CD14-223	p3-NS1-Ag4-1	Novocastra (NCL-CD14-223)	1:50	60 min RT
NCL-O-PONTIN	OP3N	Novocastra	1:50	o/n 4°C
von-Willebrand-Faktor	Polyklonal	DAKO (A0082)	1:100	o/n 4°C

Nach Ablauf der angegebenen Inkubationsdauer wurden die Präparate für 3 x 5 min in 1 x PBS gewaschen, um nachfolgend mit dem biotinylierten Sekundärantikörper (siehe Tabelle 6) inkubiert zu werden.

Tabelle 6: Verwendete Sekundärantikörper

CAIX bezeichnet Carboanhydrase IX; CD, *Cluster of differentiation*; KLF4, *Krüppel-Like Factor 4*; NCAM, *Neural Cell Adhesion Molecule*; OPN, Osteopontin; vWF, von-Willebrand-Faktor.

Färbung	Verwendeter Sekundärantikörper	Firma (Artikel-Nr.)	Konzentration	Inkubationsdauer
CAIX KLF-4 vWF	Goat-anti-rabbit	Invitrogen (B2770)	1:100	60 min RT
CD14 CD16 OPN NCAM (CD56)	Goat-anti-mouse	Invitrogen (B2763)	1:100	60 min RT

Nach abermaliger Waschung in PBS wurden die Präparate für 30 min bei RT mit Avidin-Biotin-Complex (ABC) inkubiert. Hierbei nutzt man die starke Affinität von Avidin zu Biotin, wobei ABC mittels einer freien Biotin-Bindungsstelle an den biotinylierten Brückenantikörper bindet. Nach wiederholter Waschung in PBS wurde 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) auf die Schnitte gegeben, welches als Chromogen fungiert. Die an ABC gekoppelte Peroxidase bewirkt einen rotbraunen Farbumschlag des Chromogens, der lichtmikroskopisch kontrolliert wurde. Nach maximal 20 min wurde erneut in PBS gewaschen und durch dreimaliges Eintauchen in Gills Hämatoxylin gegengefärbt. Unter fließendem Leitungswasser wurden die Präparate gebläut und anschließend mit wässrigem Eindeckmedium eingedeckt. Als Negativkontrollen wurden stets Präparate mitgeführt, die an Stelle des Primärantikörpers nur mit *Antibody Diluent* inkubiert wurden.

2.4 Tissue Microarray

Ein *Tissue Microarray* (TMA) besteht aus einem Paraffinblock, in dem zahlreiche Gewebeproben verschiedener Herkunft in Form von Stanzzyklindern nebeneinander angeordnet sind (Abbildung 3). Allgemein besteht der Vorteil dieser Methode darin, dass auf einem Objektträger mit nur einmaliger Applikation eines Antikörpers zahlreiche Proben untersucht werden können und jedes Präparat unter genau denselben Bedingungen behandelt wird. Im vorliegenden Projekt eignete sich diese Methode aus dem Grund, dass mit der Stanze gezielt Zylinder aus dem zu repräsentierenden Infarktareal entnommen werden konnten, was die Orientierung erleichterte und ermöglichte, dass die zu analysierenden Färbungen einer Gewebeprobe in exakt demselben Areal miteinander verglichen werden konnten. Des

Weiteren konnten alle Proben desselben Infarktstadiums zur Vergleichbarkeit untereinander auf einem Objektträger dargestellt werden.

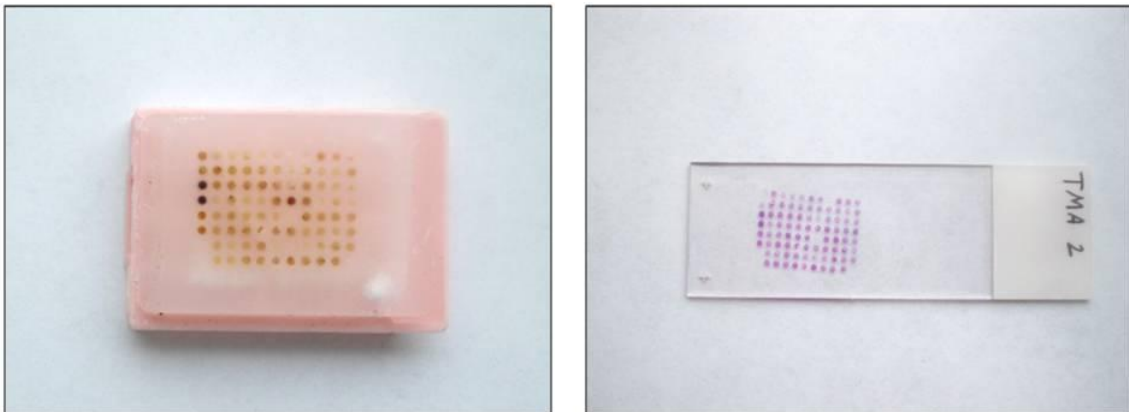


Abbildung 3: Tissue-Microarray

Dargestellt sind der *Tissue-Microarray* (links) und der korrespondierende HE-Schnitt (rechts). Bei dem *Tissue-Microarray* handelt es sich um Gewebestücken verschiedener Präparate, die nach einem festgelegten Schema nebeneinander angeordnet sind.

Da das Risiko bestand, dass durch den Stanzvorgang nicht immer exakt das gewünschte Areal getroffen wird, wurden zur Sicherheit drei Stenzen pro Gewebeprobe entnommen. Es wurden insgesamt drei TMAs angefertigt, wobei jeweils Gewebestücken gleicher Infarktstadien auf einem separaten Paraffinblock angeordnet wurden. Jeder Paraffinblock erhielt außerdem Gewebe von Patienten aus der CONTR-Gruppe sowie Referenzgewebe von Gallenblase, Milz, Leber, Darm und Niere.

Zur Vorbereitung auf den eigentlichen Stanzvorgang wurden auf den vorhandenen HE-Schnitten jeweils drei repräsentative Areale markiert, aus denen später die Gewebezylinder entnommen werden sollten. Mit Hilfe eines Software-Programms wurde das spätere Design der TMAs geplant. Dabei wurde die Anordnung der Stenzen sowie deren Größe und Abstand zueinander definiert und die Koordinaten des entstandenen Rasters mittels eines Speichermediums auf den Tissue-Arrayer (Abbildung 4) übertragen. Nach Einsetzen eines Paraffin-Leerblocks (Empfängerblock) erfolgte der eigentliche Stanzvorgang, bei dem sich die Halterung der Stenzen anhand des zuvor festgelegten Schemas automatisch justiert. Mit der einen Stanze wird jeweils ein Loch in den Empfängerblock gestanzt, mit der anderen die zuvor markierte Gewebeprobe aus dem Spenderblock entnommen und in das Loch des Empfängerblocks platziert.

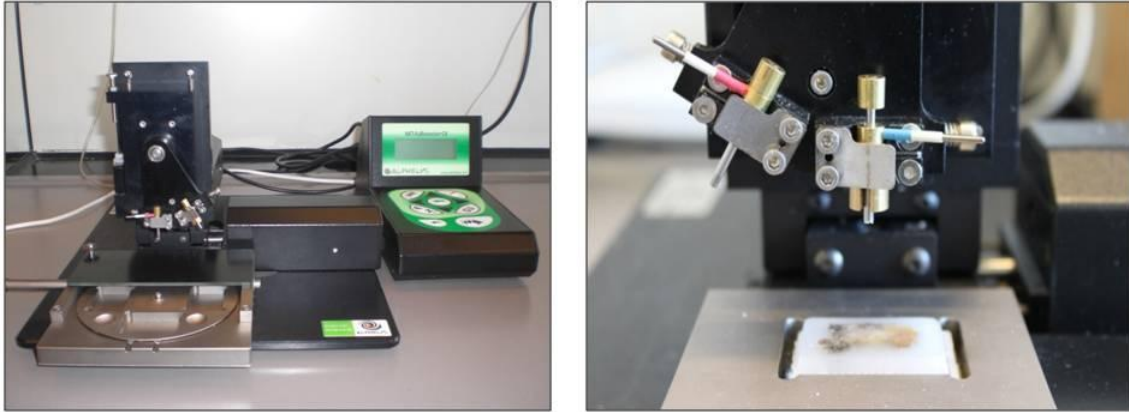


Abbildung 4: Tissue-Arrayer

Dargestellt sind der Tissue Arrayer (links) und Stanzenhalterung mit Spenderblock (rechts).

Nachdem alle Stanzen positioniert waren, wurde der TMA für 30 min in einem Wärmeschrank bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde mit Hilfe eines Objektträgers leichter Druck von oben auf den Paraffinblock ausgeübt, um die Stanzen in eine Ebene zu bringen. Anschließend wurde der Boden eines Ausgießförmchens dünn mit flüssigem Paraffin befüllt und der TMA eingesetzt. Es erfolgte ein erneutes Erwärmen auf einer Wärmeplatte für 5 min bei 65 °C. Abschließend kühlte der TMA auf einer Kühlplatte ab. Diese Vorgänge dienten dazu, eine bessere Verbindung zwischen den einzelnen Gewebestanzen und dem umgebenden Paraffinblock zu bewirken. Die TMAs wurden mit einem Schlittenmikrotom in 5 µm dicke Schnitte geschnitten, auf Objektträger aufgetragen und in einem Wärmeschrank bei 37 °C getrocknet.

2.4.1 Immunfärbeautomat

Die immunhistochemischen Färbungen der TMAs erfolgten mittels eines vollautomatisierten Immunfärbeautomaten der Abteilung Pathologie. Dieses Verfahren ermöglicht ein hohes Maß an Standardisierung und es wird eine höhere Konstanz der Farbqualität erzielt. Nach der Entparaffinierung für 3 x 5 min in Xylol und Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe und Aqua dest. erfolgte eine hitzeinduzierte Epitopdemaskierung der Präparate durch 40-minütiges Kochen in Citratpuffer (pH 6). Anschließend wurden die Gewebeschnitte für 10 min in Eiswasser eingestellt und nach Abkühlen für 5 min mit BSA 2 % inkubiert. Als Primärantikörper wurden die in Tabelle 5 aufgelisteten Antikörper verwendet, wobei Konzentration und Inkubationsdauer beibehalten wurden. Nach Ablauf der Inkubationsdauer

wurden die Präparate für 5 min in Tris Buffered Saline (TBS)-Puffer (pH 7,4) gewaschen, um folgend mit dem biotinylierten Zweitantikörper für 20 min inkubiert zu werden. Beruhend auf der Labeled Streptavidin Biotin (LSAB)-Methode folgte nach einem weiteren Waschvorgang die Inkubation mit Streptavidin Alkaline Phosphatase für 20 min. Anschließend wurde die Präparate abermals gewaschen, für 20 min mit dem als Chromogen fungierenden *Fast Red* inkubiert und für 2 min in Aqua dest. gewässert. Für die Gegenfärbung wurden die Gewebeschnitte für 45 sec in Hämalun nach Mayer eingestellt. Als letzter Schritt erfolgte die Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe und Xylol und die Präparate wurden eingedeckt.

2.5 Quantitative Analyse

Die quantitativen Analysen wurden in Arealen durchgeführt, welche repräsentativ für das festgelegte Infarktstadium waren. Hierbei wurden die in Abschnitt 1.1.4 *Stadien-Einteilung* aufgeführten Kriterien zur Hilfe gezogen. Bei den CONTR wurde darauf geachtet, dass keine pathologischen Veränderungen in den zu analysierenden Arealen zu finden waren. Die Färbungen wurden morphometrisch analysiert, unter Verwendung der *Image-Pro Plus Software*. Für alle Analysen wurde das zu untersuchende Gewebe (d. i. AMI, SAMI, OMI, CONTR) zunächst mikroskopisch identifiziert und in gewünschter Vergrößerung in 5 verschiedenen Einstellungen fotografiert. Für MTC, CD56, CAIX und OPN wurde der proportionale Anteil angefärbter Strukturen in jeweils 5 für das Infarktstadium repräsentativen Bildern gemessen. Hierbei wurde eine Vergrößerung von x 200 gewählt, für OPN x 100. Die Anzahl KLF4⁺-Zellen wurde in 5 verschiedenen Bildern (x 200) ausgezählt, hierbei wurde darauf geachtet, nur kernhaltige Zellen zu erfassen. Im Falle der vWF-Färbung, wurde die Kapillar- und Arteriolenanzahl in 5 Bildern (x 200) ausgezählt. Kapillaren wurden als eine singuläre Schicht flacher Endothelzellen identifiziert, wohingegen Arteriolen als eine Struktur mit einem inneren Diameter $\geq 10 \mu\text{m}$ und durch die bestehende charakteristische Schichtung, Endothel, Tunica media (bestehend aus mindestens einer Schicht glatter Muskelzellen) und Tunica adventitia, identifiziert wurden. CD14⁺- und CD16⁺-Zellen im Herzen, welche sich in der Färbung rot darstellten, wurden in einem $0,5 \times 0,5 \text{ cm}^2$ großen repräsentativen Areal ausgezählt. Hierbei wurden nur die mononukleären Zellen erfasst. In der Milz wurden die CD14⁺- und CD16⁺-Zellen durch die Quantifizierung des proportionalen Anteils angefärbter Strukturen in 5 verschiedenen Bildern (x 400) in der subkapsulären roten Pulpa erfasst. Die Anzahl an Ki67⁺-Zellen wurde in 5 verschiedenen Bildern (x 200) in der subkapsulären roten Pulpa der Milz ausgezählt.

2.6 Statistik

Die statistischen Analysen wurden mit der *SPSS*- (Version 19) und der *GraphPad Prism Software* (Version 5.01) durchgeführt. Zur graphischen Darstellung wurde die *GraphPad Software Prism Software* verwendet. Alle Tests waren zweiseitig und verwendeten ein Signifikanzniveau von 0,05. Um kontinuierliche Variablen auf das Vorliegen einer Normalverteilung zu testen, wurde der modifizierte Kolmogorov-Smirnov-Test (Lilliefors Test) verwendet. Weiterhin wurden kontinuierliche Variablen als Median mit dem zugehörigen Interquartilsabstand [25. Perzentile; 75. Perzentile] dargestellt und mit dem Kruskal-Wallis-Test, gefolgt von dem Dunn's Multiple Comparison-Test verglichen. Kategoriale Variable wurden als ganze Zahlen mit der zugehörigen Prozentzahl dargestellt und mit dem exakten Test nach Fisher verglichen. Für die Analyse von Korrelationen wurde der Spearman Rho-Korrelationskoeffizient verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Patientenkollektiv

Insgesamt konnten 45 Patienten in die Studie aufgenommen werden, die zwischen Juni 2005 und Juli 2009 verstorben und nach ihrem Tod in der Abteilung Pathologie der UMG obduziert worden waren. Nach histologischer Evaluation wurden 37 Patienten mit stattgehabtem MI den drei Gruppen AMI, SAMI und OMI zugeteilt, nämlich 11 Patienten der AMI- (55 % männlich; medianes Alter, 66 Jahre), 10 der SAMI- (80 % männlich; 73 Jahre) und 16 der OMI-Gruppe (75 % männlich; 79 Jahre). In die CONTR-Gruppe wurden 8 Patienten ohne pathologische myokardiale Veränderungen (75 % männlich; 35 Jahre) aufgenommen. Innerhalb der Infarktstadien waren hinsichtlich des Alters keine signifikanten Unterschiede festzustellen. Die CONTR-Gruppe wies mit einem medianen Alter von 35 Jahren die jüngsten Patienten auf und unterschied sich damit signifikant von SAMI ($p < 0,01$) und OMI ($p < 0,001$). Die Patientencharakteristika sind in Tabelle 7 dargestellt. Keine statistischen Unterschiede konnten bezüglich der Verteilung des Geschlechts, Größe, Gewicht und Body Mass Index (BMI) gesehen werden.

Tabelle 7: Patientencharakteristika

Anhand makro- und mikroskopischer Kriterien am Herzen erfolgte eine Gruppeneinteilung der Patienten in akuter (AMI), subakuter (SAMI) und alter Myokardinfarkt (OMI) sowie Kontrolle (CONTR). Die Werte sind als Median [25 %-Quartil; 75 %-Quartil] oder Anzahl (n) der Patienten (%) dargestellt. BMI bezeichnet Body Mass Index. Für Körpergewicht und BMI konnten bei 5 Patienten keine Angaben dazu in den Krankenakten gefunden werden.

	AMI (n=11)	SAMI (n=10)	OMI (n=16)	CONTR (n=8)	p-Wert
Alter (Jahre)	66,00 [52,00; 78,00]	72,50 [57,00; 80,75]	78,50 [72,25; 71,00]	35,00 [30,25; 40,50]	< 0,001
Männlich, n (%)	6 (54,5)	8 (80,00)	12 (75,0)	6 (75,0)	0,601
Größe (m)	1,71 [1,63; 1,80]	1,68 [1,63; 1,70]	1,72 [1,66; 1,75]	1,75 [1,66; 1,80]	0,193
Gewicht (kg)	87,50 [81,50; 94,25]	79,50 [72,25; 90,75]	72,50 [63,75; 85,75]	91,00 [62,75; 98,50]	0,128
BMI (kg/m ²)	29,75 [27,30; 35,20]	28,10 [26,63; 30,80]	25,15 [21,93; 29,08]	28,60 [21,60; 32,03]	0,145

Um die Gruppen bezüglich Nierenfunktion, kardialen Biomarkern und Entzündungsstatus zu vergleichen, wurden die zuletzt abgenommenen Laborwerte erhoben, maximal eine Woche vor dem Tod. Es konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich Nierenfunktion und Entzündungsstatus, gemessen an CRP und Leukozyten, festgestellt werden. Die höchsten CK- und CK-MB-Werte ließen sich mit einem Median von 1964 U/L und 107,7 U/l in der AMI-Gruppe beobachten, welche sich (hoch-)signifikant von der OMI Gruppe unterschieden ($p < 0,001$ und $p < 0,01$). Die Laktatdehydrogenase (LDH) war mit einem Median von 898,0 U/l ebenfalls am stärksten im AMI erhöht.

Tabelle 8: Laborparameter

Anhand makro- und mikroskopischer Kriterien am Herzen erfolgte eine Gruppeneinteilung der Patienten in akuter (AMI), subakuter (SAMI) und alter Myokardinfarkt (OMI) sowie Kontrolle (CONTR). CK bezeichnet Kreatinkinase; CK-MB, *Muscle-Brain type* der Kreatinkinase; CRP, C-reaktives Protein; IQR, Interquartilsabstand ($= [25\% \text{-Quartil}; 75\% \text{-Quartil}]$); LDH, Laktatdehydrogenase. Für Kreatinin und Leukozyten konnten 6 Werte nicht den Krankenakten entnommen werden; für Harnstoff, CK und CK-MB 7 sowie für LDH 14. CK und CK-MB konnten für die CONTR-Gruppe aufgrund zu vieler fehlender Werte nicht ausgewertet werden.

Laborparameter	AMI	SAMI	OMI	CONTR	p-Wert
	Median [IQR]	Median [IQR]	Median [IQR]	Median [IQR]	
Kreatinin (mg/dl)	1,7 [0,9; 3,3]	1,7 [0,9; 2,8]	1,4 [1,0; 2,0]	3,6 [0,8; 3,9]	0,612
Harnstoff (mg/dl)	44,0 [19,0; 49,0]	56,5 [20,8; 75,3]	47,0 [24,0; 76,0]	33,0 [9,0; 66,0]	0,917
LDH (U/l)	898,0 [444,3; 8328]	632,0 [299,0; 861,0]	290,0 [223,0; 503,8]	691,5 [501,5; 3077]	<0,05
CK (U/l)	1964 [375,0; 3229]	182,0 [54,5; 1059]	58,0 [19,0; 95,0]	-	<0,001
CK-MB (U/l)	107,0 [50,5; 450,5]	42,0 [21,5; 70, 0]	21, 0 [12, 0; 43, 0]	-	<0,01
CRP (mg/l)	87,4 [10,6; 126,4]	123,5 [14,9; 228,3]	19,2 [15,5; 110,0]	165,4 [72,9; 252,2]	0,151
Leukozyten ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	15,3 [8,7; 16,4]	12,6 [11,3; 16,9]	14,4 [9,0; 19,1]	9,6 [6,6; 22,1]	0,820

Patienten aus der AMI- und SAMI-Gruppe verstarben an den direkten Konsequenzen ihres (sub)akuten MI. Patienten aus der OMI-Gruppe verstarben an Herz- und Lungenversagen. Patienten aus der CONTR-Gruppe verstarben an den Folgen eines malignen Tumors (n=3), am hämophagozytotischen Syndrom im Rahmen einer Malaria (n=1), Pneumonie (n=1), Lungenarterienembolie (n=1) oder Leberversagen (n=2). Tabelle 9 beschreibt das Patientenkollektiv hinsichtlich kardiovaskulärer Risikofaktoren, Vorerkrankungen und

Medikation. Die Medikation ist dem letzten verfügbaren Medikamentenplan des jeweiligen Patienten entnommen.

Tabelle 9: Kardiovaskuläre Risikofaktoren, Vorerkrankungen und Medikation

Anhand makro- und mikroskopischer Kriterien am Herzen erfolgte eine Gruppeneinteilung der Patienten in akuter (AMI), subakuter (SAMI) und alter Myokardinfarkt (OMI) sowie Kontrolle (CONTR). Die Werte sind als Anzahl (%) der Patienten dargestellt. Die Angaben wurden den jeweiligen Patientenakten entnommen und entsprechen der letzten verfügbaren Dokumentation vor dem Tod. ACE-Hemmer bezeichnet Angiotensin Converting Enzyme-Hemmer; KHK, Koronare Herzkrankheit; pAVK, periphere Arterielle Verschlusskrankheit.

	AMI n (%)	SAMI n (%)	OMI n (%)	CONTR n (%)	p-Wert
Kardiovaskuläre Risikofaktoren					
arterieller Hypertonus	6 (54,5)	8 (80,0)	13 (81,3)	0 (0,00)	<0,001
Diabetes mellitus	1 (9,09)	1 (10,0)	7 (43,8)	0 (0,00)	0,072
Hyperlipidämie	1 (9,09)	1 (10,0)	7 (43,8)	0 (0,00)	0,072
Rauchen	3 (27,3)	1 (10,0)	5 (31,3)	1 (12,5)	0,584
Vorerkrankungen					
bakterielle Infektion	2 (18,2)	4 (40,0)	7 (43,8)	4 (50,0)	0,463
KHK					
1-Gefäß-KHK	0 (0,00)	2 (20,0)	1 (6,3)	0 (0,00)	0,239
2-Gefäß-KHK	4 (36,4)	0 (0,00)	3 (18,8)	0 (0,00)	0,07
3-Gefäß-KHK	2 (18,2)	6 (60,0)	6 (37,5)	0 (0,00)	<0,05
Herzrhythmusstörungen	1 (9,09)	2 (20,0)	6 (37,5)	0 (0,00)	0,118
Kardiomyopathie	3 (27,3)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (12,5)	0,064
instabile Angina pectoris	0 (0,00)	1 (10,0)	1 (6,25)	0 (0,00)	0,630
Herzinsuffizienz	0 (0,00)	1 (10,0)	10 (62,5)	0 (0,00)	<0,001
Apoplex	1 (9,09)	3 (30,0)	3 (18,8)	0 (0,00)	0,316
pAVK	0 (0,00)	2 (20,0)	6 (37,6)	0 (0,00)	<0,05
Pneumonie	2 (18,2)	3 (30,0)	9 (56,3)	4 (50,0)	0,196

	AMI n (%)	SAMI n (%)	OMI n (%)	CONTR n (%)	p-Wert
Vorerkrankungen					
Lungenarterienembolie	3 (27,3)	0 (0,00)	3 (18,8)	2 (25,0)	0,371
Lungenödem	4 (36,4)	3 (30,0)	4 (25,0)	2 (25,0)	0,923
akutes Nierenversagen	6 (54,5)	5 (50,0)	1 (6,25)	3 (37,5)	<0,05
Medikation					
Acetylsalicylsäure	5 (45,5)	2 (20,0)	7 (43,8)	0 (0,00)	0,092
Clopidogrel	4 (36,4)	2 (20,0)	1 (6,25)	0 (0,00)	0,098
ACE-Hemmer/ Sartan	1 (9,09)	3 (30,0)	6 (37,5)	1 (12,5)	0,300
Beta-Blocker	6 (54,5)	4 (40,0)	7 (43,8)	1 (12,5)	0,310
Diuretikum	6 (54,5)	4 (40,0)	10 (62,5)	3 (37,5)	0,579
Insulin	4 (36,4)	4 (40,0)	4 (25,0)	4 (50,0)	0,660
Orales Antidiabetikum	0 (0,00)	0 (0,00)	2 (12,5)	0 (0,00)	0,285
Opioidanalgetikum	3 (27,3)	3 (30,0)	2 (12,5)	3 (37,5)	0,534
Glukokortikoid	3 (27,3)	3 (30,0)	1 (6,25)	1 (12,5)	0,347
Cumarinderivat	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (6,25)	0 (0,00)	0,603
Heparin	6 (54,5)	4 (40,0)	5 (31,3)	4 (50,0)	0,638
Antibiotikum	4 (36,4)	5 (50,0)	10 (66,7)	5 (62,5)	0,791
Antiarrhythmikum	5 (45,5)	3 (30,0)	4 (25,0)	0 (0,00)	0,293

Tabelle 10 liefert Informationen über Gefäß- und Herzstatus des Patientenkollektivs, die im Rahmen der Obduktion ermittelt wurden und den Sektionsprotokollen zu entnehmen waren. Sowohl die klinischen Diagnosen als auch die Ergebnisse der Obduktion ergaben, dass keine arteriosklerotischen Veränderungen innerhalb der Herzkrankarterien sowie weitere Manifestation der Arteriosklerose (pAVK, ischämischer Schlaganfall) in der CONTR-Gruppe zu finden waren. Weiterhin ließen sich in der genannten Gruppe arterieller Hypertonus, Diabetes mellitus und Hyperlipidämie als Hauptrisikofaktoren für die Manifestation der Arteriosklerose nicht nachvollziehen. Bezüglich des Herzgewichtes unterschieden sich die Gruppen signifikant voneinander ($p < 0,05$) und es zeigten sich positive Korrelationen mit linker Kammerwandstärke ($r = 0,412$, $p < 0,01$) sowie Patientenalter ($r = 0,322$, $p < 0,05$).

Tabelle 10: Kardiale Anamnese anhand der Sektionsprotokolle

Anhand makro- und mikroskopischer Kriterien am Herzen erfolgte eine Gruppeneinteilung der Patienten in akuter (AMI), subakuter (SAMI) und alter Myokardinfarkt (OMI) sowie Kontrolle (CONTR). Die Werte sind als Anzahl (%) der Patienten oder Median [25 %-Quartil; 75 %-Quartil] dargestellt. Die Angaben entstammen den jeweiligen Sektionsprotokollen. Es fehlten 3 Werte für die linke und 7 Werte für die rechte Kammerwandstärke.

	AMI	SAMI	OMI	CONTR	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	p-Wert
Allgemeine Arteriosklerose (hochgradig)	2 (18,2)	5 (50,0)	14 (87,5)	0 (0,00)	<0,01
Koronararteriosklerose (hochgradig)	7 (63,6)	7 (70,0)	13 (81,3)	0 (0,00)	<0,01
Dilatation linker Ventrikel (hochgradig)	7 (63,6)	4 (40,0)	6 (37,5)	0 (0,00)	<0,05
	Median [IQR]	Median [IQR]	Median [IQR]	Median [IQR]	p-Wert
Herzgewicht (g)	510 [420; 585]	510 [430; 558]	525 [408; 685]	330 [292; 458]	<0,05
Kammerwandstärke links (mm)	18,0 [15,0; 20,0]	17,5 [16,3; 20,8]	16,5 [15,0; 19,8]	16,0 [14,0; 18,0]	0,250
Kammerwandstärke rechts (mm)	5,0 [4,0; 7,0]	4,0 [4,0; 5,0]	4,5 [4,0; 5,0]	5,0 [4,0; 6,0]	0,520

3.2 Detektion von CD14⁺- und CD16⁺-Zellen während verschiedener Stadien des Myokardinfarktes im Herzen

Zur quantitativen Evaluation CD14⁺- und CD16⁺-Zellen im Herzen während verschiedener Stadien des MI wurde eine immunhistochemische Färbung für beide Oberflächenproteine durchgeführt (Abbildung 5 a und b). Es ließ sich ein (nicht signifikanter) Anstieg der CD14⁺-Zellen im SAMI beobachten, wohingegen die geringste Zellzahl im OMI auszumachen war (Abbildung 5 c). Ähnliche Beobachtungen konnten hinsichtlich der CD16⁺-Zellen gemacht werden, wo sich ebenfalls ein (nicht signifikanter) Anstieg im SAMI zeigte (Abbildung 5 d).

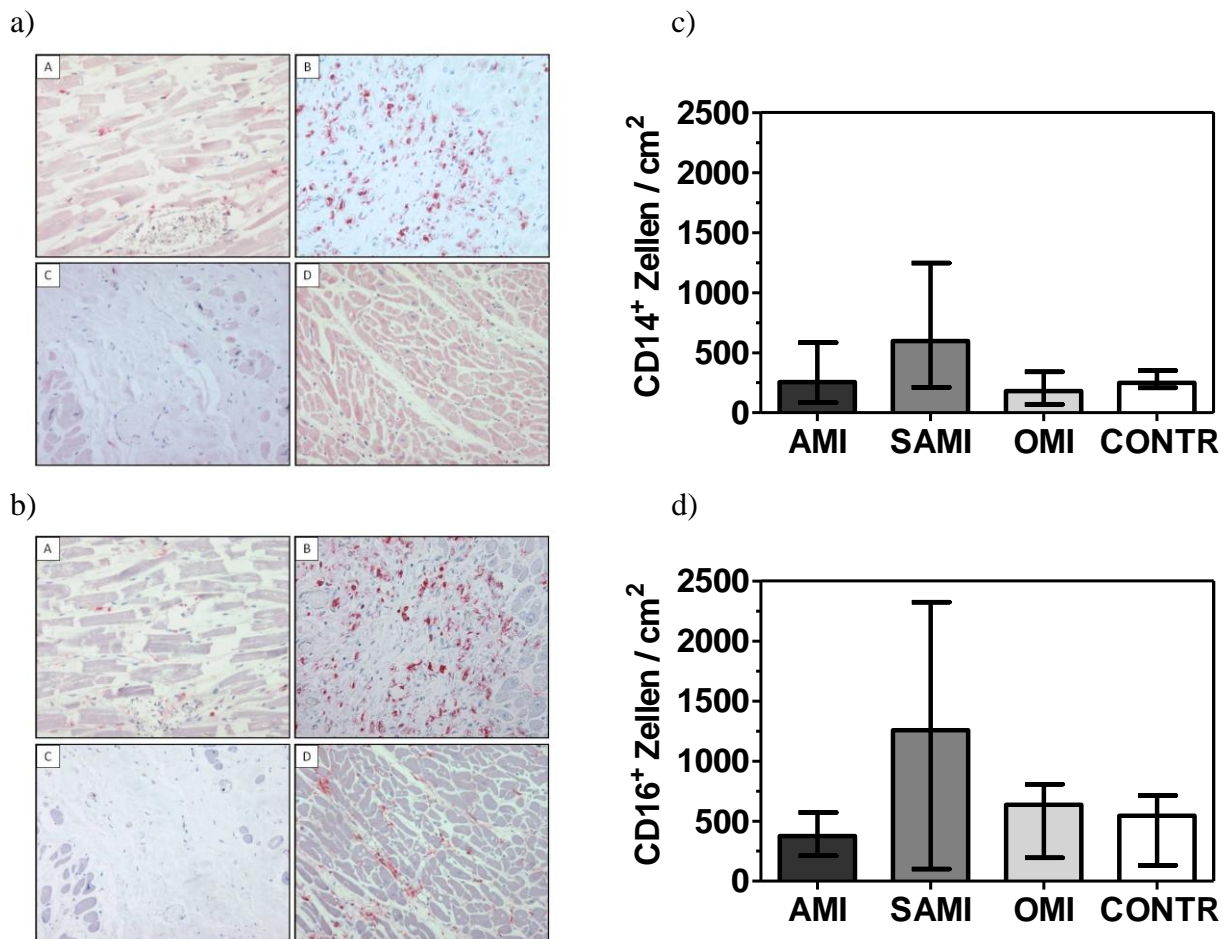


Abbildung 5: CD14⁺- und CD16⁺-Zellen im Herzen

Zur quantitativen Evaluation CD14⁺- und CD16⁺-Zellen im Herzen wurde eine immunhistochemische Färbung von CD14 (a) und CD16 (b) durchgeführt. Die Mikrofotografien zeigen jeweils ein repräsentatives Bild für AMI (A), SAMI (B), OMI (C) und CONTR (D). Das rote Signal kennzeichnet CD14⁺- bzw. CD16⁺-Zellen (Vergrößerung x 200). Die Ergebnisse der quantitativen Analyse von CD14 (c) und CD16 (d) sind als Median und Interquartilsabstand dargestellt.

Insgesamt war eine absolut höhere Anzahl CD16⁺-Zellen verglichen mit den CD14⁺-Zellen nachzuweisen. Um auszuschließen, dass neutrophile Granulozyten, welche ebenfalls CD16 auf ihrer Oberfläche exprimieren, das Ergebnis maßgeblich beeinflussen, wurden diese anhand ihrer charakteristischen Morphologie (u.a. gelappter Zellkern) in den vier Gruppen ausgezählt. Dabei ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Weiterhin zeigte sich eine positive Korrelation zwischen den CD16⁺- und CD14⁺-Zellen ($r=0,366$; $p<0,05$, Abbildung 6).

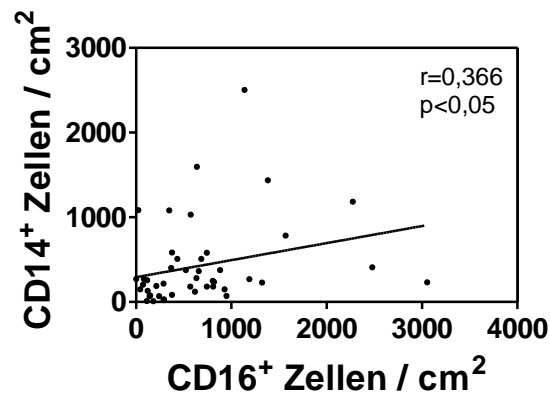


Abbildung 6: Positive Korrelation zwischen CD16⁺- und CD14⁺-Zellen im Herzen

Korreliert wurde die Werte der Gruppen AMI, SAMI, OMI und CONTR.

3.3 Detektion von CD14⁺- und CD16⁺-Zellen während verschiedener Stadien des Myokardinfarktes in der Milz

Wie im Herzen wurde auch in der Milz eine quantitative Evaluation CD14⁺- und CD16⁺-Zellen mittels Immunhistochemie durchgeführt (Abbildung 7 a und b). Bedingt durch die eingeschränkte Verfügbarkeit des Milzgewebes, konnten die Analysen nur an Untergruppen von Patienten mit AMI (n=7), SAMI (n=5), OMI (n=9) und der CONTR-Gruppe (n=3) durchgeführt werden. Hierbei lag der Fokus auf der subkapsulären roten Pulpa, da an dieser Stelle die Monozyten im Mausmodell in Clustern akkumulieren (Swirski et al. 2009). Verglichen mit der CONTR-Gruppe, ließ sich eine reduzierte Anzahl CD14⁺- und CD16⁺-Zellen während des AMI in der Milz finden (Abbildung 7 d und e), auch wenn die Werte stark variierten und sich nach statistischer Analyse keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ergaben. Weiterhin ließ sich keine Korrelation zwischen Herz- und Milzgewebe im Hinblick auf die Anzahl CD14⁺- oder CD16⁺-Zellen feststellen. Eine Anordnung der Monozyten in Clustern war ebenfalls nicht zu beobachten. Um die Proliferationsrate in der subkapsulären roten Pulpa zu evaluieren, wurde eine immunhistochemische Färbung zur Detektion von Ki67 durchgeführt (Abbildung 7 c), ein Antigen, das sowohl während der G₁-, S- und G₂-Phase eines Zellteilungszyklus als auch während der Mitose im Zellkern exprimiert wird, jedoch nicht in ruhenden Zellen der G₀-Phase (Gerdes et al. 1983; Gerdes et al. 1984). Dabei zeigten sich nicht signifikant erhöhte Zellzahlen während SAMI und OMI, verglichen mit AMI und CONTR (Abbildung 7 f).

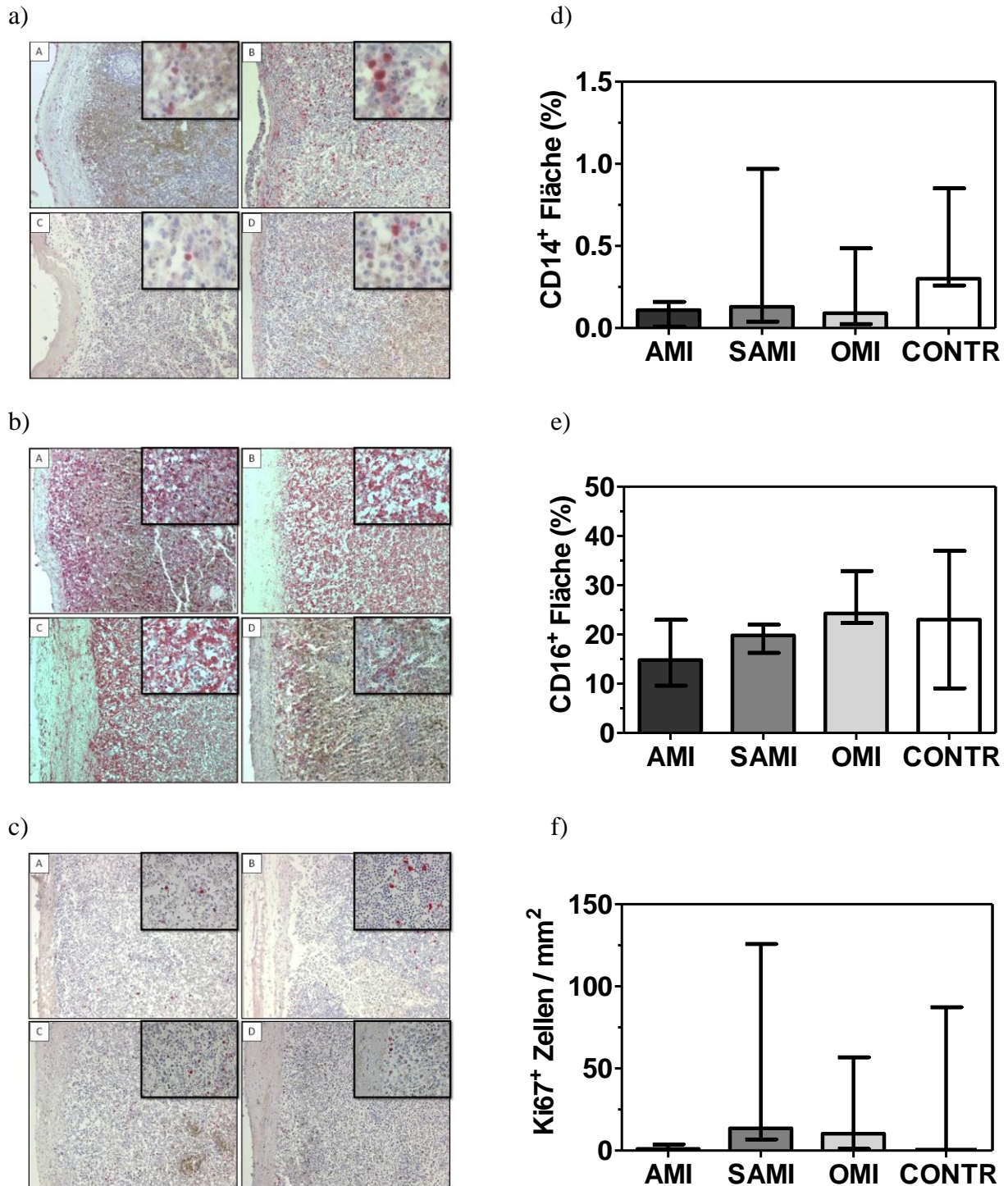


Abbildung 7: CD14⁺-, CD16⁺- und Ki67⁺-Zellen in der Milz

Dargestellt ist die immunhistochemische Färbung für CD14 (a), CD16 (b) und Ki67 (c) in der subkapsulären roten Pulpa der Milz. Die Mikrofotografien zeigen jeweils ein repräsentatives Bild für AMI (A), SAMI (B), OMI (C) und CONTR (D) (Vergrößerung x 100, Detailvergrößerung x400). Die Ergebnisse der quantitativen Analyse von CD14 (d), CD16 (e) und Ki67 (f) sind als Median und Interquartilsabstand dargestellt.

3.4 Erhöhte Carboanhydrase IX-Expression im akuten Myokardinfarkt

Zur Evaluation der kardialen Hypoxie wurde eine immunhistochemische Färbung zur Detektion des Transmembranproteins CAIX durchgeführt (Abbildung 8 a). Die höchste CAIX-Expression ließ sich im AMI beobachten (AMI: 6,35 % [3,28; 7,55] vs. OMI: 0,44 % [0,0; 1,74] und CONTR: 0,43 % [0,0; 1,08], $p < 0,01$). Auch im SAMI waren die Werte signifikant erhöht (SAMI: 4,45 % [2,64; 5,78] vs. OMI und CONTR, $p < 0,05$). Bei CONTR sowie im OMI konnten nur eine sehr geringe Expression von CAIX ermittelt werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 8 b dargestellt.

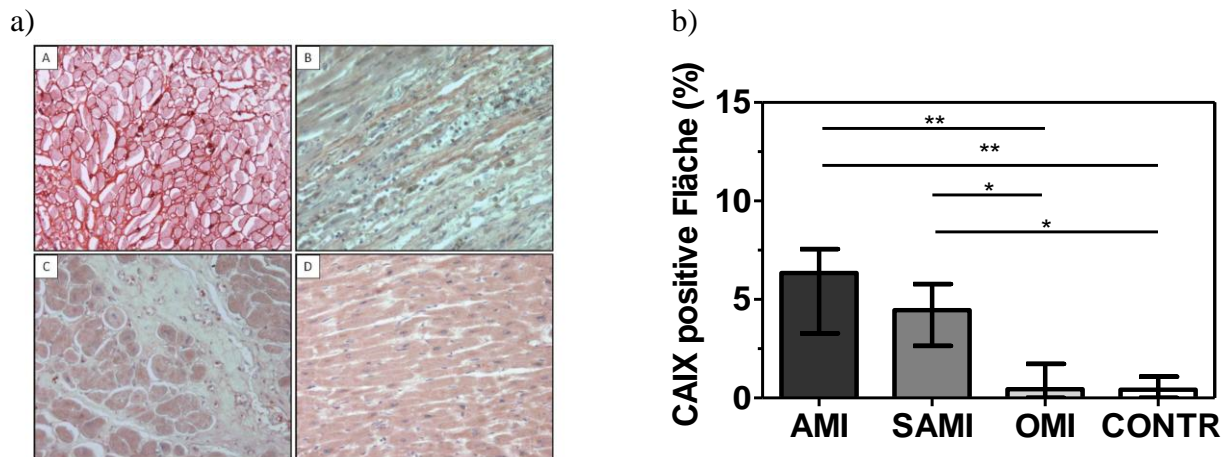


Abbildung 8: Carboanhydrase IX-Expression im Herzen

Dargestellt ist die immunhistochemische Färbung von CAIX (a). Die Mikrofotografien zeigen jeweils ein repräsentatives Bild für AMI (A), SAMI (B), OMI (C) und CONTR (D). Das rote Signalkennzeichnet die CAIX-Expression (Vergrößerung x 200). Die Ergebnisse der quantitativen Analyse sind als Median und Interquartilsabstand dargestellt (b). Signifikante Unterschiede sind als * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ gekennzeichnet.

Weiterhin zeigten sich positive Korrelationen zwischen CAIX-Expression und linker Kammerwandstärke ($r = 0,461$, $p < 0,01$, Abbildung 9).

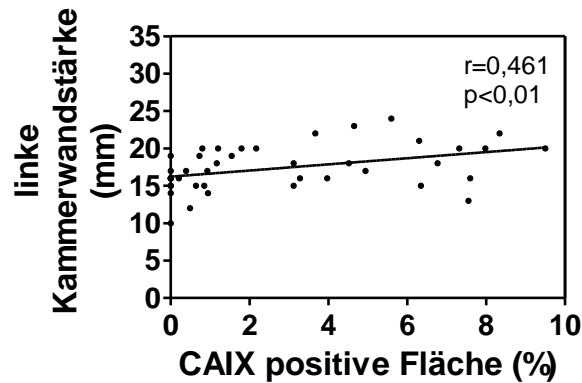


Abbildung 9: Positive Korrelation zwischen Carboanhydrase IX und linker Kammerwandstärke

Korreliert wurde die Werte der Gruppen AMI, SAMI, OMI und CONTR.

3.5 Erhöhte Kapillanzahl im akuten Myokardinfarkt

Zur Quantifizierung der Kapillaren und Arteriolen im Myokardgewebe wurde eine immunhistochemische Färbung zur Detektion des von-Willebrand-Faktors (Abbildung 10) durchgeführt, welcher unter anderem von Endothelzellen exprimiert wird (Pusztaszeri et al. 2006). Die höchste Kapillanzahl konnte im AMI beobachtet werden (AMI: $80,54 /\text{mm}^2$ [29,73; 87,57] vs. OMI: $21,89 /\text{mm}^2$ [4,87; 32,57], $p<0,05$), gefolgt von der CONTR-Gruppe (CONTR: $77,57 /\text{mm}^2$ [35,14; 322,2] vs. OMI, $p<0,01$). Bei der Arterioldichte ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 dargestellt.

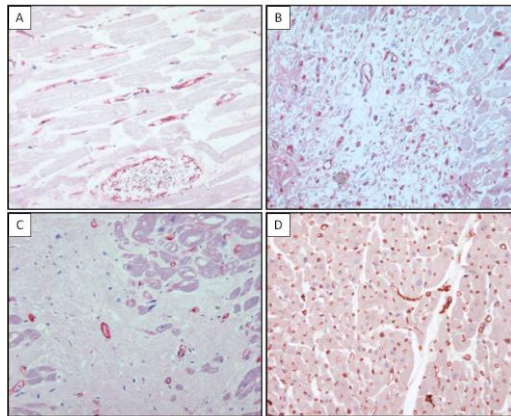


Abbildung 10: Mikrogefäße im Herzen

Die Mikrofotografien zeigen jeweils ein repräsentatives Bild für AMI (A), SAMI (B) OMI (C) und CONTR (D) (Vergrößerung x 200).

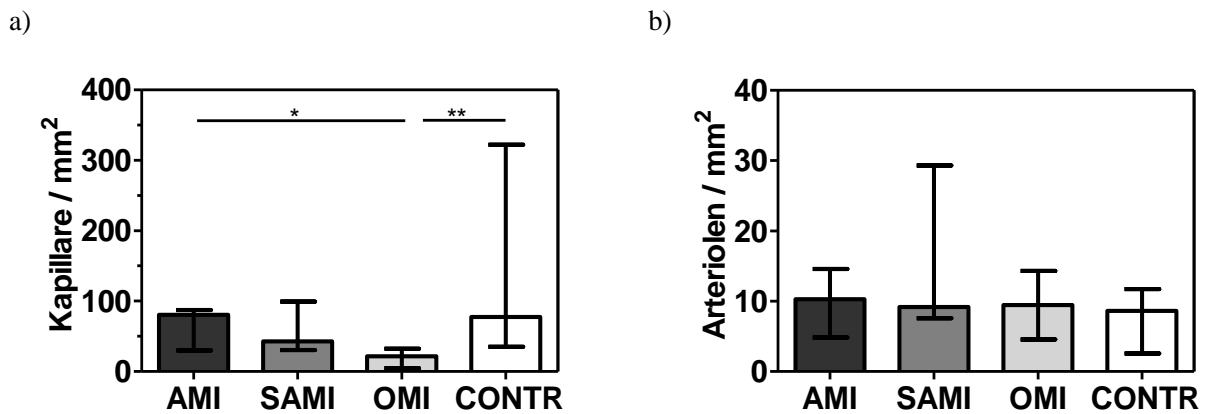


Abbildung 11: Kapillar- und Arterioldichte im Herzen

Ermittelt wurde die Kapillar- (a) und Arterioldichte (b) mittels immunhistochemischer Färbung von vWF. Die Ergebnisse der quantitativen Analyse sind als Median und Interquartilsabstand dargestellt. Signifikante Unterschiede sind als * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ gekennzeichnet.

Weiterhin korrelierte die Kapillardichte negativ mit Patientenalter ($r = -0,416$, $p < 0,01$, Abbildung 12 a) und dem Herzgewicht ($r = -0,332$, $p < 0,05$, Abbildung 12 b).

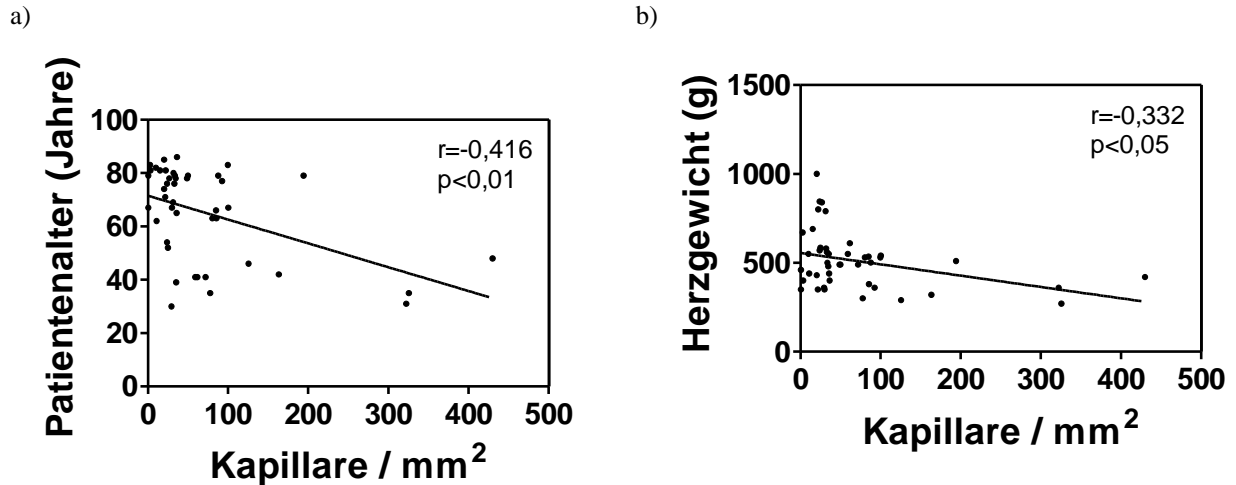


Abbildung 12: Korrelationen mit Kapillardichte

Dargestellt sind die Korrelationen zwischen Patientenalter und Kapillardichte (a) sowie Herzgewicht (b). Korreliert wurde jeweils die Werte der Gruppen AMI, SAMI, OMI und CONTR.

3.6 Erhöhter Kollagenanteil im alten Myokardinfarkt

Zur Evaluation des Kollagenanteils im Herzen wurde eine Masson-Trichrom-Färbung (Abbildung 13 a) durchgeführt, welche Kollagenfasern tiefblau und zelluläre Bestandteile rot anfärbt. Der höchste Kollagenanteil war im OMI zu finden, wohingegen in der CONTR nur wenig Bindegewebe auszumachen war (OMI: 60,19 % [44,34; 67,13] vs. CONTR: 14,69 % [9,21; 21,18], $p < 0,001$). Patienten der AMI- und SAMI Gruppe zeigten im Vergleich zur CONTR höhere Kollagenanteile, jedoch erwiesen sich diese Unterschiede als nicht signifikant. Die Ergebnisse sind in Abbildung 13 b dargestellt.

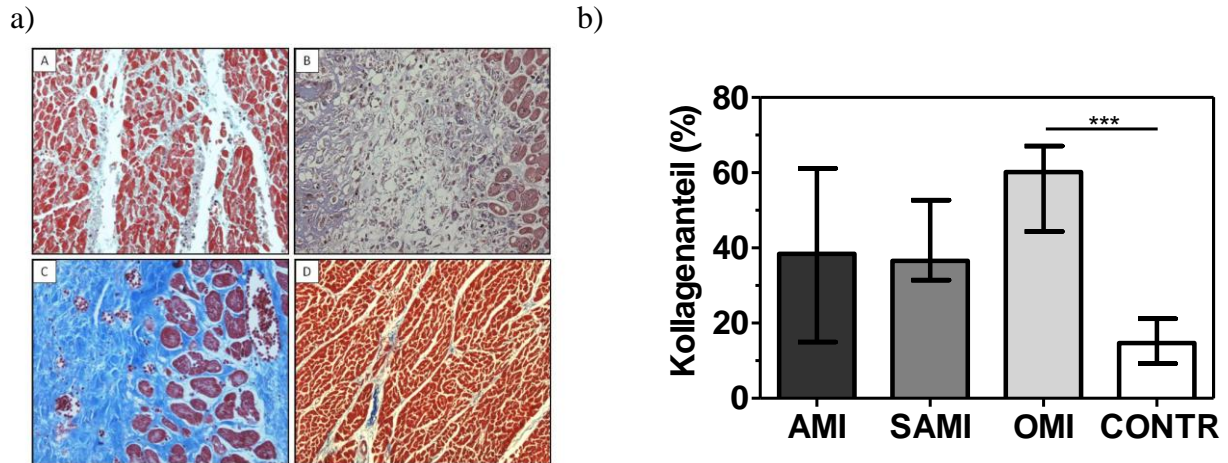


Abbildung 13: Kollagenanteil im Herzen

Zur Evaluation des Kollagenanteils im Herzen wurde eine Masson-Trichrom-Färbung (a) durchgeführt. Die Mikrofotografien zeigen jeweils ein repräsentatives Bild für AMI (A), SAMI (B), OMI (C) und CONTR (D). Rote Strukturen stellen die Herzmuskelzellen dar, blaue Strukturen das Kollagen. Der größte Kollagenanteil ist in Abbildung C zu erkennen, wohingegen in Abbildung D Kollagen nur entlang der Gefäße auszumachen ist (Vergrößerung x 200). Die Ergebnisse der quantitativen Analyse (b) sind als Median und Interquartilsabstand dargestellt. Signifikante Unterschiede sind als * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ gekennzeichnet.

Weiterhin ergaben sich positive Korrelationen zwischen Kollagenanteil und Patientenalter ($r=0,549$, $p<0,001$) sowie Herzgewicht ($r=0,352$, $p<0,05$). Negative Korrelationen hingegen zeigten sich zwischen Kollagenanteil und $CD14^+$ -Zellen ($r=-0,345$, $p<0,05$) sowie Kapillardichte ($r=-0,525$, $p<0,001$). Die Korrelationen sind in Abbildung 14 dargestellt.

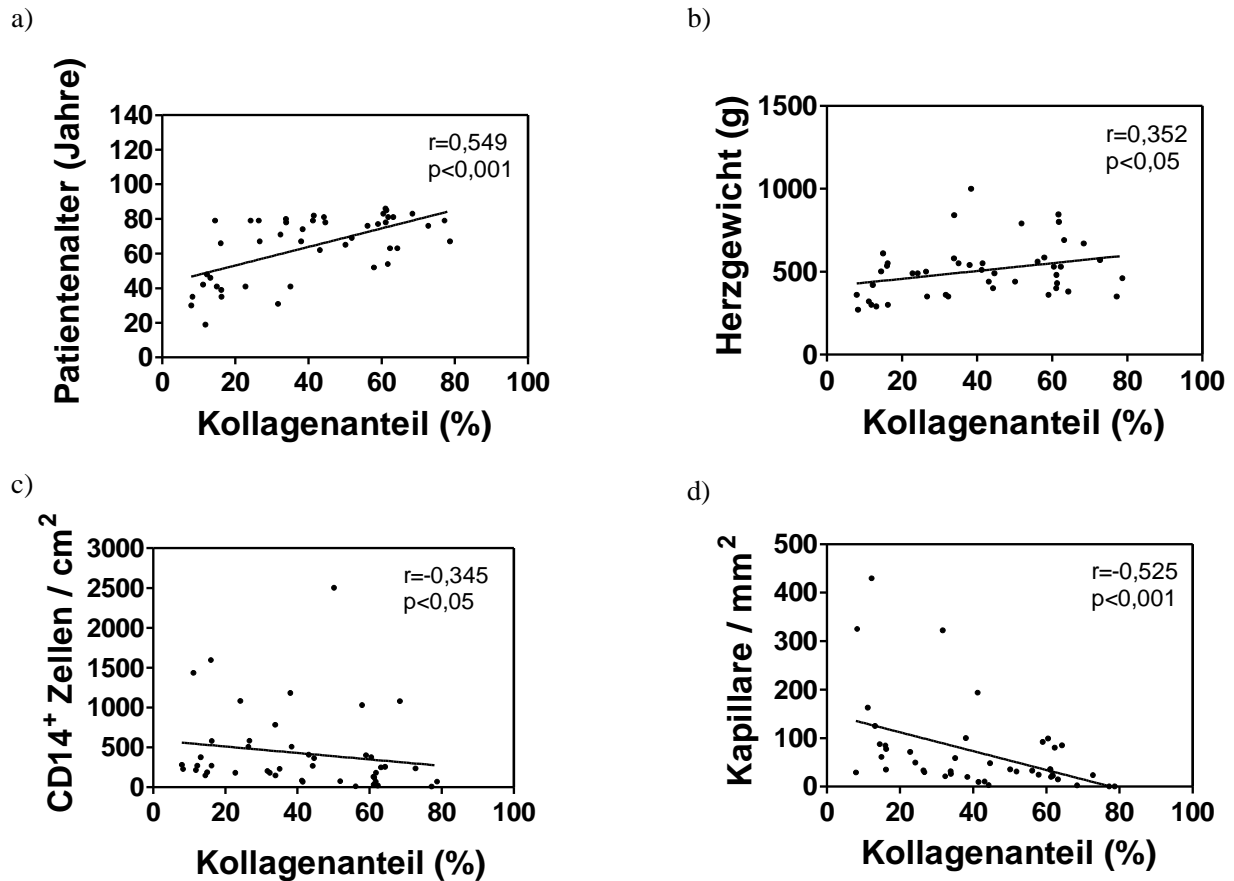


Abbildung 14: Korrelationen mit Kollagenanteil

Dargestellt sind die Korrelationen zwischen Kollagenanteil und Patiententalter (a), Herzgewicht (b), CD14⁺-Zellen (c) sowie Kapillardichte (d). Korreliert wurden die Werte der Gruppen AMI, SAMI, OMI und CONTR.

3.7 Erhöhte CD56-Expression im alten Myokardinfarkt

Nach immunhistochemischer Färbung von CD56 (Abbildung 15 a), einem Adhäsionsmolekül mit kardioprotektiven Eigenschaften (Nagao et al. 2010), zeigte sich vor allem in der Zellmembran von perifibrotischen Kardiomyozyten im OMI ein starkes Signal (OMI: 9,49 % [6,93; 12,98] vs. CONTR: 4,62 % [3,05; 6,18], $p<0,01$). In der CONTR-Gruppe konnte nur eine sehr schwache CD56-Expression detektiert werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 15 b dargestellt.

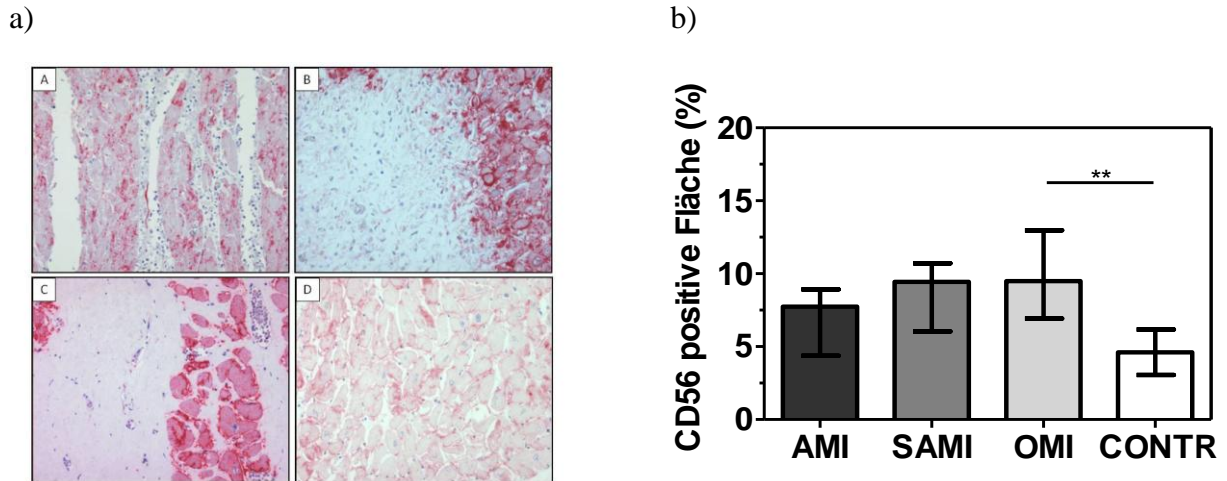


Abbildung 15: CD56-Expression im Herzen

Zur quantitativen Analyse der CD56-Expression wurde eine immunhistochemische Färbung (a) durchgeführt. Die Mikrofotografien zeigen jeweils ein repräsentatives Bild für AMI (A), SAMI (B), OMI (C) und CONTR (D). Das rote Signal kennzeichnet die CD56-Expression (Vergrößerung x 200). Die Ergebnisse der quantitativen Analyse (b) sind als Median und Interquartilsabstand dargestellt. Signifikante Unterschiede sind als * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ gekennzeichnet.

Weiterhin korrelierte die CD56-Expression positiv mit dem Kollagenanteil ($r = 0,629$, $p < 0,001$) und negativ mit der Kapillardichte ($r = -0,382$, $p < 0,05$). Die Korrelationen sind in Abbildung 16 dargestellt.

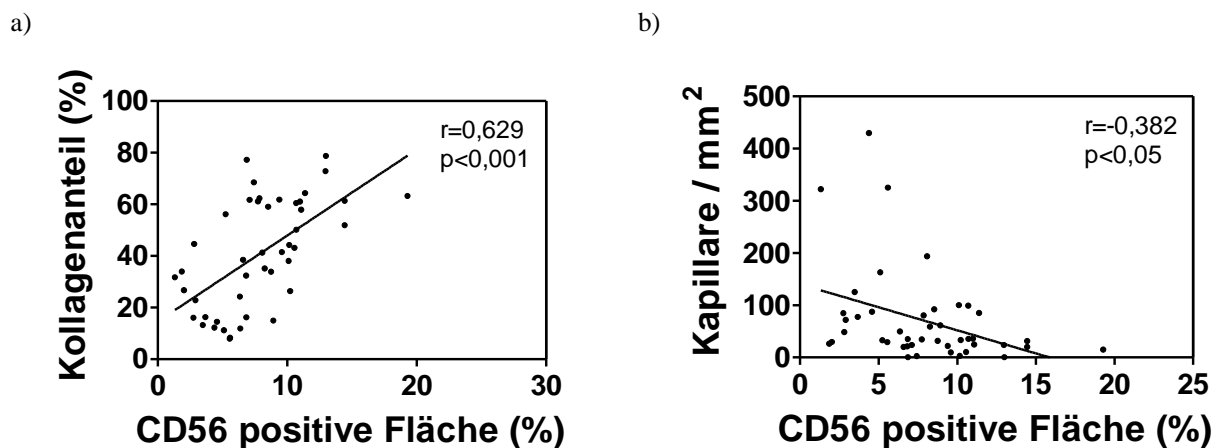


Abbildung 16: Korrelationen mit CD56

Dargestellt sind die Korrelationen zwischen CD56 und Kollagenanteil (a) sowie Kapillardichte (b). Korreliert wurden die Werte der Gruppen AMI, SAMI, OMI und CONTR.

Darüber hinaus ließen sich nur sehr wenige CD56⁺ Zellen, bei denen es sich nicht um Kardiomyozyten handelte, finden. Lediglich bei 3 von 11 Patienten aus der AMI Gruppe (im Mittel 2 pro ausgewerteter Mikrofotografie, Vergrößerung x 200) konnten diese Zellen nachgewiesen werden. Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass NK-Zellen und NKT-Zellen, welche ebenfalls CD56 exprimieren, als Zellpopulation im AMI zu vernachlässigen sind.

3.8 Erhöhte Osteopontin-Expression im subakuten Myokardinfarkt

Zur Ermittlung der OPN-Expression wurde eine immunhistochemische Färbung (Abbildung 17 a) durchgeführt. OPN-positive Signale ließen sich vor allem in der Zellmembran der Kardiomyozyten erkennen. Der höchste Anteil positiv gefärbter Fläche wurde im SAMI detektiert, wohingegen im OMI kaum eine OPN-Expression zu verzeichnen war (SAMI: 2,51 % [1,59; 3,72] vs. OMI: 0,11 % [0,03; 0,94], $p < 0,01$). Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 b dargestellt.

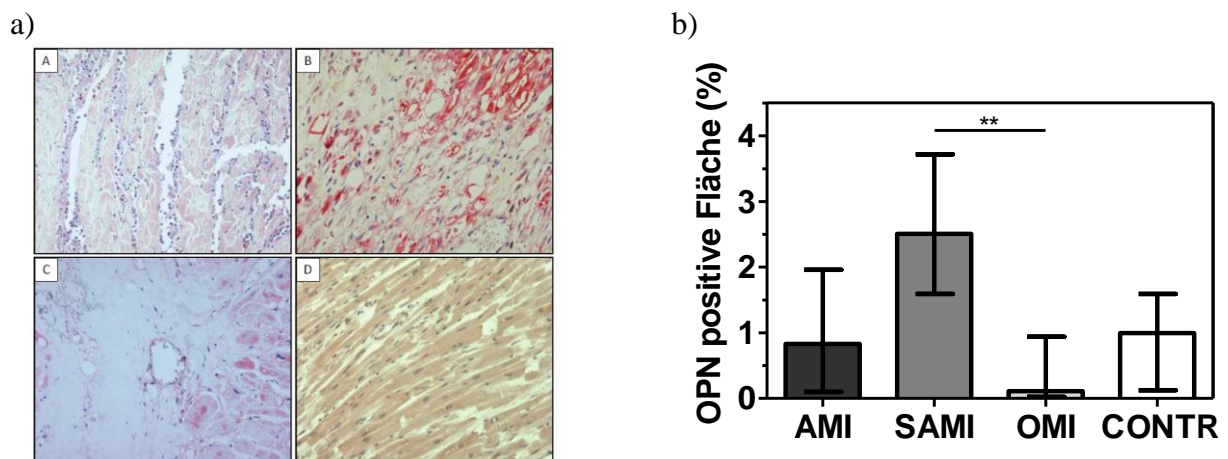


Abbildung 17: Osteopontin-Expression im Herzen

Zur Evaluation der Osteopontin-Expression wurde eine immunhistochemische Färbung (a) durchgeführt. Die Mikrofotografien zeigen jeweils ein repräsentatives Bild für AMI (A), SAMI (B), OMI (C) und CONTR (D). Eine erhöhte OPN-Expression (rotes Signal) lässt sich vor allem in der Zellmembran der Kardiomyozyten in Abbildung B erkennen (Vergrößerung x 200). Die Ergebnisse der quantitativen Analyse (b) sind als Median und Interquartilsabstand dargestellt. Signifikante Unterschiede sind als * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ gekennzeichnet.

3.9 Erhöhte Anzahl Krüppel-Like Factor 4-positiver Zellen im subakuten Myokardinfarkt

Zur Quantifizierung KLF4⁺-Zellen wurde eine immunhistochemische Färbung (Abbildung 18 a) durchgeführt. Dabei wurde eine signifikant erhöhte Zellzahl im SAMI gefunden, während im OMI und in der CONTR kaum KLF4⁺-Zellen zu beobachten waren (SAMI: 16,76 /mm² [9,60; 25,67] vs. OMI: 0,81 /mm² [0,0; 2,70], p<0,001). Die Ergebnisse sind in Abbildung 18 b dargestellt.

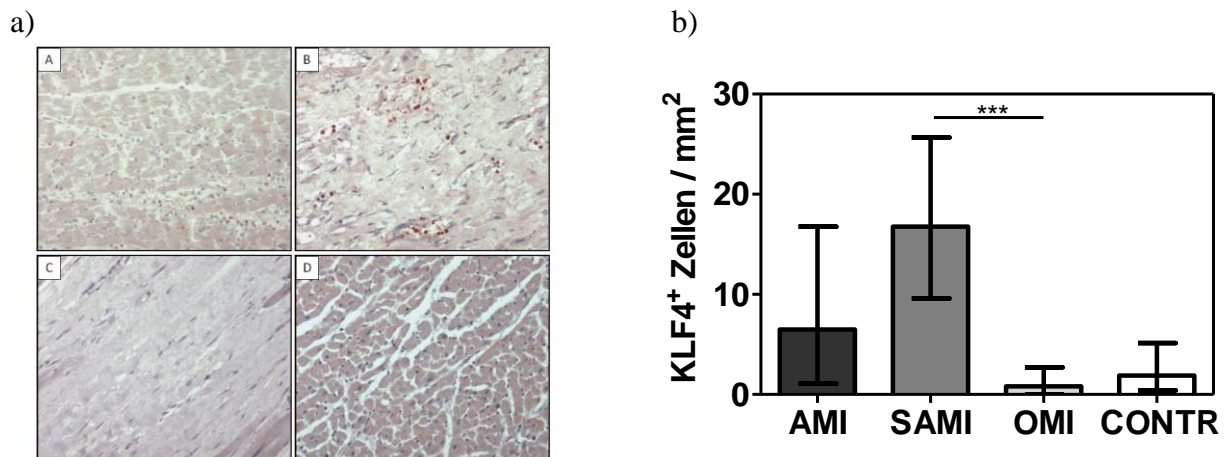


Abbildung 18: KLF4⁺-Zellen im Herzen

Zur quantitativen Evaluation der KLF4⁺-Zellen im Myokard wurde eine immunhistochemische Färbung (a) durchgeführt. Die Mikrofotografien zeigen jeweils ein repräsentatives Bild für AMI (A), SAMI (B), OMI (C) und CONTR (D). Eine erhöhte Anzahl KLF4⁺-Zellen (rotes Signal) ist in Abbildung B zu erkennen (Vergrößerung x 200). Die Ergebnisse der quantitativen Analyse (b) sind als Median und Interquartilsabstand dargestellt. Signifikante Unterschiede sind als *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 gekennzeichnet.

Weiterhin zeigten sich positive Korrelationen zwischen KLF4⁺-Zellen und CD14⁺-Zellen (r=0,300, p<0,05), CAIX (r=0,373, p<0,05), Kapillardichte (r=0,314, p<0,05) sowie OPN-Expression (r=0,443, p<0,01). Eine negative Korrelation hingegen ergab sich zwischen KLF4⁺-Zellen und Kollagenanteil (r=0,378, p<0,05). Die Korrelationen sind in Abbildung 19 dargestellt.

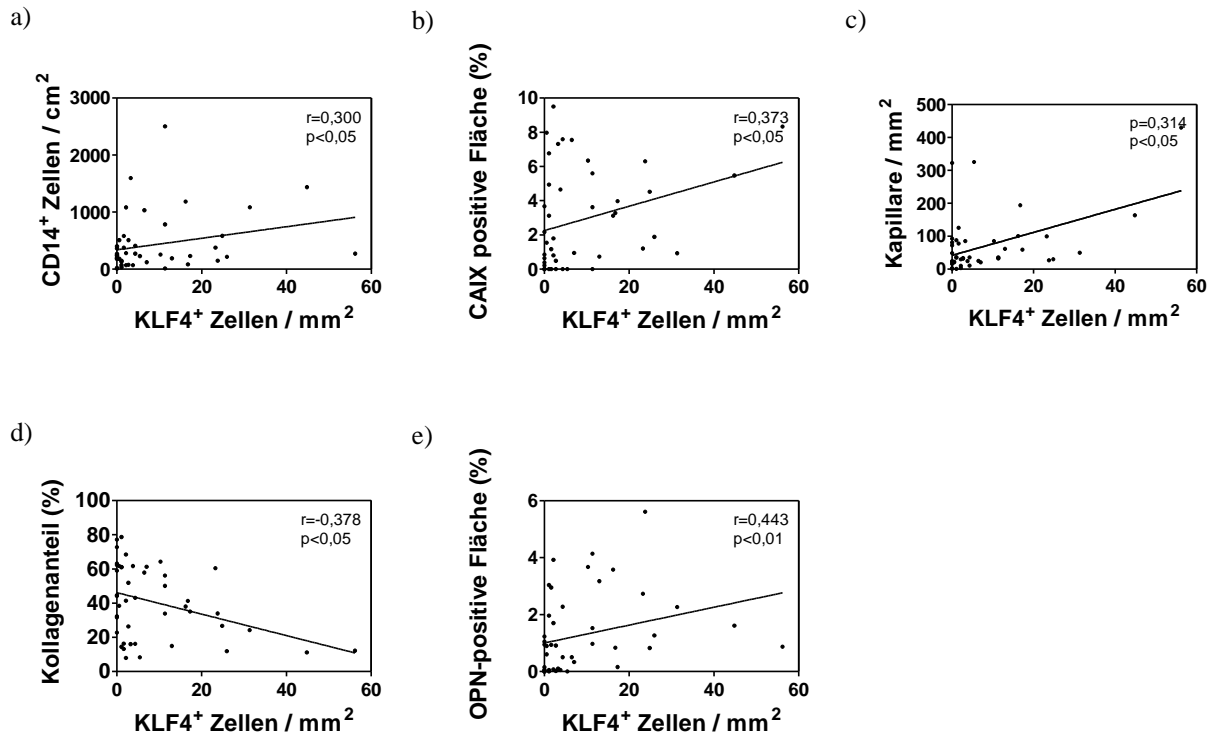


Abbildung 19: Korrelationen mit KLF4⁺-Zellen

Dargestellt sind die Korrelationen zwischen KLF4⁺-Zellen und CD14⁺-Zellen (a), Carboanhydrase IX (CAIX) (b), Kapillardichte (c), Kollagenanteil (d) sowie Osteopontin (OPN) (e). Korreliert wurden die Werte der Gruppen AMI, SAMI, OMI und CONTR.

4 Diskussion

Die Stadien-abhängige Rekrutierung verschiedener Immunzellen in das infarzierte Gewebe nach MI scheint maßgeblichen Einfluss auf den kardialen Wundheilungsprozess zu haben. Bisweilen wurden diese Vorgänge vornehmlich in Tierstudien untersucht, während humane Daten weitestgehend fehlen. Basierend auf der von Nahrendorf et al. formulierten Hypothese, dass im Mausmodell verschiedene Monozytensubpopulationen, welche überwiegend aus der Milz rekrutiert werden (Swirski et al. 2009), für die erfolgreiche Heilung von Bedeutung sind (Nahrendorf et al. 2010), wurde in der vorliegenden *post-mortem*-Analyse versucht, diese These im humanen System zu validieren. Es konnte gezeigt werden, dass CD14⁺- und CD16⁺-Zellen vor allem im SAMI akkumulieren und mit erniedrigten Zellzahlen in der Milz während des AMI einhergehen. Die Analyse verschiedener Biomarker des myokardialen Wundheilungsprozesses ergab eine erhöhte Expression des Hypoxiemarkers CAIX im AMI und SAMI, einhergehend mit einer erhöhten Kapillardichte im AMI. Im OMI zeigte sich ein erhöhter Fibroseanteil, welcher positiv mit der Expression des Zelladhäsionsmoleküls CD56 im perifibrotischen Gewebe korrelierte. Ebenfalls im SAMI zeigten sich eine vermehrte OPN-Expression sowie ein erhöhtes Vorhandensein von KLF4⁺-Zellen. In der vorliegenden Studie wurde erstmals eine Stadien-abhängige Analyse von CD14⁺- und CD16⁺-Zellen in humanem Herz- und Milzgewebe nach MI durchgeführt und mögliche Korrelation mit myokardialen Biomarkern des Wundheilungsprozesses überprüft.

4.1 Stadienabhängige Monozytenrekrutierung in das infarzierte Myokardgewebe

Zahlreiche Tierstudien konnten zeigen, dass verschiedene Monozytenpopulationen eine Rolle im kardialen Wundheilungsprozess spielen (van Amerongen et al. 2007; Frangogiannis et al. 2003; Yano et al. 2006). Nach MI migrieren sie entlang chemotaktischer Gradienten in das infarzierte Gewebe, wo sie Reparatur- und Wundheilungsprozesse induzieren (Frangogiannis et al. 2003). Im Mausmodell ist eine gut koordinierte biphasische Monozytenantwort Voraussetzung für einen adäquaten Wundheilungsprozess nach MI, wobei die Ly-6C^{high}-Monozyten die frühe Phase und die Ly-6C^{low}-Monozyten die späte Phase dominieren (Nahrendorf et al. 2007). Auch wenn kein direkter Vergleich zwischen Mausmodell und humanem System zulässig ist, konnte in der vorliegenden Studie gezeigt werden, dass CD14⁺-

und CD16⁺-Zellen ebenfalls Stadien-abhängig im Herzen nach MI nachweisbar sind. Während sich die Zellzahlen im AMI und OMI nicht merklich von der CONTR unterscheiden, waren im SAMI die Zellzahlen beider Populationen erhöht, ohne jedoch ein statistisch signifikantes Niveau zu erreichen. Bedingt durch das Studiendesign war die zeitliche Abfolge der Monozytenrekrutierung weniger exakt zu definieren. Somit kann aktuell nicht geklärt werden, ob die humanen Monozytensubpopulationen sequentiell in das infarzierte Myokard rekrutiert werden oder ob sie zum gleichen Zeitpunkt erscheinen.

Betrachtet man diesbezüglich die im Blut zirkulierenden Monozyten bei Patienten nach MI, so kommt es zuerst zu einem Anstieg der CD16⁻-Monozyten, gefolgt von den CD16⁺-Monozyten, die ihr Maximum an Tag 4,9 erreichen und sich in den darauf folgenden 12 Tagen relativ konstant verhalten. (Tsujioka et al. 2009). Bisher ist nicht bekannt, ob es sich mit den Monozytensubpopulationen nach MI in Blut und Herzgewebe gleichermaßen verhält oder diese zu unterschiedlichen Zeitpunkten ansteigen. In der vorliegenden Untersuchung standen leider keine Blutproben der Patienten für durchflusszytometrische Untersuchungen zur Verfügung, sodass dieser Fragestellung nicht gesondert nachgegangen werden konnte. Eine erst kürzlich publizierte Studie mit ähnlichem Studiendesign (van der Laan et al. 2013) konnte zeigen, dass während der frühen inflammatorischen Phase vornehmlich CD14⁺-Zellen in das infarzierte Myokard rekrutiert werden und diese im Randbereich des Infarktes akkumulieren. In der darauffolgenden proliferativen Phase konnte hingegen sowohl eine erhöhte Anzahl der CD14⁺CD16⁻- als auch der CD14⁺CD16⁺-Zellen im Infarktkern nachgewiesen werden, was mit dem Ergebnis der vorliegenden Studie in Einklang steht.

Weiterhin zeigte sich in der vorliegenden Studie eine negative Korrelation zwischen der Anzahl an CD14⁺-Zellen und dem Kollagenanteil im Herzen. Dies untermauert die von zahlreichen Publikationen geäußerte Vermutung, dass eine gesteigerte Anzahl oder Aktivität der CD16⁻-Monozyten im Blut nachteilige Konsequenzen für den Wundheilungsprozess nach MI haben könnte. So zeigte sich eine negative Korrelation zwischen der Anzahl im Blut zirkulierender CD16⁻-Monozyten und der linksventrikulären Funktion nach MI, während das Gegenteil für CD16⁺-Monozyten der Fall war (van der Laan et al. 2012). Weiterhin waren hohe gemessene Werte an CD16⁻-Monozyten nach MI positiv mit der Ausdehnung von mikrovaskulären Schäden assoziiert (Ikejima et al. 2010). Die Vermutung, dass CD16⁺-Monozyten hingegen protektive Eigenschaften während des Wundheilungsprozesses besitzen,

konnte in der vorliegenden Studie nicht widergespiegelt werden, so lag beispielsweise keine Korrelation zwischen der Anzahl CD16⁺-Zellen und der Kapillardichte vor. Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass das Gewebe von Patienten mit letalem Ausgang stammt, sodass positive Zeichen eines kardialen Umbauprozesses möglicherweise weniger stark ausgeprägt sein könnten. Dazu hätte es Herzgewebes von Überlebenden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Herzinfarkt bedurft.

Ein Hauptproblem bei der Betrachtung der Monozytensubpopulationen bestand darin, dass nur Paraffin-eingebettete Gewebeproben zur Verfügung standen und damit die Möglichkeit zur Doppelfärbung technisch limitiert war. So wurden nur zwei Monozytensubpopulationen betrachtet. Wir sprachen in diesem Zusammenhang von CD14⁺- und CD16⁺-Zellen, obwohl in der Literatur noch eine dritte pathologisch relevante, doppelpositive Monozytenpopulation beschrieben wird (Ziegler-Heitbrock et al. 2010). Weiterhin weisen alle drei Monozytensubpopulationen wenigstens eine geringe Expression von CD14 auf, sodass mit diesem Marker möglicherweise alle Monozyten erfasst wurden, wohingegen CD16 neben Monozyten auch auf neutrophilen Granulozyten und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) exprimiert wird. Die Existenz von NK-Zellen konnte durch die immunhistochemische Färbung von CD56, das auch als NK-Zellmarker bekannt ist (Nitta et al. 1989), weitestgehend ausgeschlossen werden. Dennoch weisen die hohe Zellzahlen, CD16⁺-Zellen waren im Herzen doppelt so hoch vorhanden wie CD14⁺-Zellen, darauf hin, dass möglicherweise neben Monozyten auch neutrophile Granulozyten bei der Färbung miterfasst wurden. Diese bilden während der ersten 24 Stunden nach MI das vorherrschende Zellinfiltrat, wohingegen Monozyten erst später auftreten und ihre Zellzahlen länger erhöht bleiben (Frangogiannis et al. 2002; Nahrendorf et al. 2007). In der vorliegenden Studie konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Neutrophilenzahlen zwischen den vier Gruppen gefunden werden, sodass ein maßgeblicher Einfluss dieser Zellpopulation auf eine der Infarktgruppen nahezu ausgeschlossen werden kann.

Die erhöhte Anzahl an CD14⁺- und CD16⁺-Zellen im SAMI steht somit im Einklang mit der Vorstellung, dass den Monozyten eine tragende Rolle beim kardialen Wundheilungsprozess zukommt.

4.2 Mobilisation von Monozyten aus der Milz während des Myokardinfarktes

Ergebnisse aus dem murinen MI-Modell legen nahe, dass Monozyten für den myokardialen Wundheilungsprozess vor allem aus der Milz rekrutiert werden, wo eine Akkumulation dieser Zellen zu Clustern in der subkapsulären roten Pulpa beobachtet werden konnte (Swirski et al. 2009; Leuschner et al. 2012). Die quantitative Analyse der CD14⁺- und CD16⁺-Zellen in der Milz während verschiedenen Stadien des humanen MI lieferte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. Hinsichtlich der CD14⁺-Zellen ließen sich innerhalb der Infarktstadien die höchsten Zellzahlen während des SAMI beobachten, hingegen relativ niedrige Zellzahlen während des AMI. Bei den CD16⁺-Zellen war eine stetige Zunahme der Zellzahlen mit fortschreitendem Infarktstadium zu beobachten. Die Anzahl Ki67⁺-Zellen, welche proliferierende Zellen repräsentieren, war im SAMI erhöht.

Jüngste Mausstudien konnten zeigen, dass die Milz als Speicherorgan für undifferenzierte Monozyten dient, welche im Rahmen einer akuten Entzündungsreaktion aus der Milz mobilisiert werden und im betroffenen Gewebe akkumulieren (Swirski et al. 2009). So wurde im murinen MI-Modell ein initialer Abfall der Monozytenzahl in der subkapsulären roten Pulpa der Milz bei gleichzeitig steigenden Zahlen im Blut beobachtet, wenn die Monozyten den Milzspeicher verlassen, um in das infarzierte Myokard zu migrieren (Swirski et al. 2009; Leuschner et al. 2012). Extramedulläre Monozytopoese in der Milz trägt im Mausmodell dazu bei, dass die Zellzahlen innerhalb einer Woche wieder ihren Ausgangswert erreichen, um den kontinuierlich hohen Bedarf am Ort der Inflammation zu decken. Dazu passend konnte gezeigt werden, dass eine Splenektomie nach Koronarligation zu einer reduzierten Monozytenrekrutierung in das infarzierten Gewebe führte, woraus ein gestörter Wundheilungsprozess und Herzversagen resultierte (Leuschner et al. 2012). Auch bei splenektomierten Patienten konnte eine höhere kardiovaskuläre Mortalität beobachtet werden (Robinette und Fraumeni, Jr. 1977), was darauf hindeutet, dass ähnliche Mechanismen auch im Menschen eine Rolle im kardialen Wundheilungsprozess spielen könnten. Inwieweit die Ergebnisse aus dem Mausmodell mit dem humanen System übereinstimmen, ist dennoch ungeklärt und sollte in der vorliegenden Studie beleuchtet werden.

Zu beachten ist, dass die Verfügbarkeit an Milzgewebe gering war und weiterhin autolytische Prozesse dazu beigetragen haben, dass nicht alle Gewebeproben zur immunhistologischen

Untersuchung geeignet waren. Bei ohnehin schon kleinen Gruppengrößen könnte dies die Aussagekraft der Ergebnisse limitiert und dazu beigetragen haben, dass nur nicht signifikante Veränderungen beobachtet werden konnten. Nichtsdestoweniger ließen sich sowohl bei den CD14⁺- als auch bei den CD16⁺-Zellen nicht signifikant erniedrigte Zellzahlen in der subkapsulären roten Pulpa der Milz während des AMI nachweisen, was sich durch das Auswandern von Monozyten aus der Milz in den Blutstrom erklären ließe. Dem initialen Abfall der Monozytenzahlen folgte ein Anstieg der CD14⁺- und CD16⁺-Zellen im SAMI. Dies könnte durch eine reaktive Monozytopoese in der Milz bedingt sein. Auch ein nicht signifikanter Anstieg von Ki67⁺-Zellen in der subkapsulären roten Pulpa der Milz während des SAMI deutet darauf hin, dass zu diesem Zeitpunkt Proliferation stattfindet. Während diese Ergebnisse weitestgehend im Einklang mit den genannten Mausstudien stehen (Swirski et al. 2009; Leuschner et al. 2012), bestand ein wesentlicher Unterschied darin, dass im vorliegenden Milzgewebe keine Clusteranordnung der Monozyten in der subkapsulären roten Pulpa beobachtet werden konnte. Die Beobachtung sollte in nachfolgenden Studien vielleicht vertiefend untersucht werden.

4.3 Carboanhydrase XI als Marker für kardiale Hypoxie

In der Literatur war CAIX bisher als Marker für Tumorphypoxie bekannt, wo es einen hohen diagnostischen und prognostischen Stellenwert einnimmt (Potter und Harris 2003). In der vorliegenden Untersuchung zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression von CAIX im AMI und leicht erniedrigt im SAMI, wohingegen im OMI und in der CONTR nur eine sehr geringe Menge an CAIX zu beobachten war. Weiterhin konnten positive Korrelationen zwischen CAIX und Kammerwandstärke sowie KLF4⁺-Zellen festgestellt werden.

Eine erste Studie über die Bedeutung von CAIX im Herzen wurde durch Holotnakova et al. veröffentlicht, der an der Ratte zeigen konnten, dass es auch in Fibroblasten und Kardiomyozyten zu einer Hypoxie-induzierten Expression von CAIX kommt. Immunfluoreszenzanalysen zeigten ein deutliches Signal für CAIX in der Plasmamembran von Kardiomyozyten unter hypoxischen Bedingungen, wohingegen in der Kontrollgruppe kein signifikantes Färbesignal erkennbar war (Holotnakova et al. 2008). Da die eben genannte Studie vornehmlich *in vitro* durchgeführt wurde, kann über den zeitlichen Verlauf der CAIX-Expression *in vivo* sowie dessen funktionelle Relevanz im MI bisher nur gemutmaßt werden. Reguliert wird die Transkription des CAIX Gens durch den Transkriptionsfaktor *Hypoxia-*

Inducible-Factor 1 (HIF-1) (Wykoff et al. 2000). Semenza konnte zeigen, dass HIF-1 eines der ersten Gene ist, dessen Transkription unter hypoxischen Bedingungen hochreguliert wird (Semenza 1998). Weiterhin beschrieben Lee et al. erhöhte Konzentrationen von HIF-1 α im infarzierten Gewebe während der frühen Phase des AMI, während im nicht-ischämischen Gewebe kein HIF-1 α detektiert werden konnte (Lee et al. 2000). Diese Erkenntnisse könnten darauf hindeuten, dass auch CAIX bereits während der frühen Phase des AMI exprimiert wird, was sich mit den hier beschriebenen Ergebnissen in Einklang bringen ließe. Svastova et al. zeigten, dass CAIX auch nach Reoxygenierung eine hohe posttranslationale Stabilität aufweist (Svastova et al. 2004), wodurch sich die persistent erhöhten Werte im SAMI erklären ließen. Wie bei Holotnakova et al. zeigte sich auch in der vorliegenden Studie ein deutliches Färbesignal in der Zellwand der Kardiomyozyten. Die positive Korrelation zwischen CAIX-Expression und Kammerwandstärke lässt sich durch eine Hypertrophie des Myokards erklären, welche einen vermehrten Sauerstoffbedarf nach sich zieht, wobei sich die Kapillarisation nur bedingt dem Mehrbedarf anpassen kann. So kommt es etwa ab einem kritischen Herzgewicht von 500 g zu einer relativen Koronarinsuffizienz und damit zu einem relativen Sauerstoffmangel des Myokards (Kumar et al. 2010). Über die Assoziation von CAIX-Expression und dem Vorhandensein von KLF4⁺-Zellen im Herzen lassen sich anhand der aktuellen Studienlage nur wenige Schlüsse ziehen. In der Tumorbilogie konnte diesbezüglich gezeigt werden, dass es unter hypoxischen Bedingungen zu einer HIF-abhängigen Hochregulation von KLF4 kommt (Mathieu et al. 2011).

In der vorliegenden Studie konnte damit eine Stadien-abhängige Hochregulation von CAIX in Kardiomyozyten gezeigt werden, die bereits in der frühen Phase des AMI beginnt. Somit könnte sich CAIX als Marker für kardiale Hypoxie erweisen und seine immunhistochemische Detektion hilfreich für die Klassifikation der Infarktstadien sein.

4.4 Angiogenese im akuten Myokardinfarkt

Die Fähigkeit neue Blutgefäße auszubilden, ist eine Voraussetzung des humanen Myokards, Phasen anhaltender Hypoxie zu überleben und die myokardialen Funktionen aufrechtzuerhalten (Sabia et al. 1992). In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die Anzahl vWF-positiver Kapillaren innerhalb der Infarktstadien vor allem im AMI erhöht ist und eine negative Korrelation zwischen Kapillaranzahl und Kollagenanteil besteht.

Während im gesunden adulten Herzen das Kapillarwachstum limitiert ist, kommt es unter

hypoxischen oder pathologischen Bedingungen, die mit einer erniedrigten Sauerstoffversorgung des Myokards einhergehen, zur Ausbildung neuer Kapillaren (Hudlicka et al. 1992). Ein Faktor, welcher durch Endothelzellstimulation die Neovaskularisation induziert, ist das Signalmolekül VEGF, welches eine HIF-1 regulierte Konsensussequenz in seiner Promotorregion besitzt (Shima et al. 1996). Neben erhöhten Konzentrationen von HIF-1 im infarzierten Gewebe während der frühen Phase des akuten MI beschreiben Lee et al. weiterhin erhöhte Spiegel von VEGF in der initialen Ischämiephase (Lee et al. 2000). Dies könnte als Erklärung für die hohe Kapillardichte im AMI dienen, zumal angenommen werden kann, dass vor Einsetzen der akuten Ischämie bereits Phasen latenten Sauerstoffmangels bestanden haben könnten. Die negative Korrelation zwischen Kapillaranzahl und Kollagenanteil lässt sich dadurch erklären, dass es mit zunehmender Fibrosierung zu einer Obliteration und Atrophie der Kapillaren kommt, sodass am Ende ein zell- und gefäßarmes Narbengewebe vorliegt (Kumar et al. 2010).

4.5 Höchster Fibroseanteil im alten Myokardinfarkt

Ergebnis des kardialen Wundheilungsprozesses nach MI ist die Bildung einer derben Kollagenarbe, um den Verlust der nekrotischen Kardiomyozyten zu kompensieren (Pfeffer und Braunwald 1990). In der vorliegenden Studie zeigten sich nicht signifikant erhöhte Kollagenanteile im AMI und SAMI und ein signifikant erhöhter Kollagenanteil im OMI, wohingegen in der CONTR Bindegewebe lediglich vereinzelt entlang der Gefäßstraßen darzustellen war.

Laut Literatur lässt sich Kollagen bereits ab dem 7. Tag nach MI als zarte Fasern im Granulationsgewebe detektieren (Cleutjens et al. 1995), wodurch sich der leicht erhöhte Kollagenanteil im AMI und SAMI erklären ließe, und erreicht 28 Tage nach MI seinen Höhepunkt (Cleutjens et al. 1995). Dies entspricht dem Stadium des OMI und steht daher in Einklang mit dem dargestellten Ergebnis. Kollagenbildung ist im Rahmen eines MI als Fibrosierung zu interpretieren, welche die exzessive Ablagerung von Kollagen nach inflammatorischem Geschehen beschreibt (Kumar et al. 2010). Eine positive Korrelation zwischen Patientenalter und Kollagenanteil könnte weiterhin darauf hindeuten, dass fibrotische Veränderungen möglicherweise nicht nur auf einen MI zurückzuführen sind, sondern auch altersbedingt vorhanden gewesen sein könnten. Dies ließ sich nicht genauer eruieren, da es auf Grund der Verfügbarkeit von geeignetem Patientenmaterial nicht möglich

war, Infarkt- und Kontrollpatienten bezüglich des Alters und anderer Einflussfaktoren aufeinander abzustimmen. Zusätzlich fand sich eine positive Korrelation zwischen Kollagenanteil und Herzgewicht. Ein erhöhtes Herzgewicht lässt sich möglicherweise auf eine kompensatorische Hypertrophie der überlebenden Kardiomyozyten zurückführen, welche neben der Kollagenbildung einen wichtigen Teil des späten Umbauprozesses nach MI darstellt (Sutton und Sharpe 2000) und mit einer Zunahme des Zellvolumens um bis zu 70 % einhergehen kann (Anversa et al. 1985).

4.6 CD56 als Marker für perifibrotische Areale

Das Glykoprotein CD56 ist an Zellentwicklung, -überleben und -migration beteiligt (Doherty et al. 1991), wobei es auch in Kardiomyozyten produziert wird und ihm kardioprotektive Funktionen zugeschrieben werden (Nagao et al. 2010). In der vorliegenden Untersuchung konnte gezeigt werden, dass CD56 vor allem in den an das Narbengewebe angrenzenden Kardiomyozyten im OMI vermehrt exprimiert wurde, während in den gesunden Kontrollgruppen nur eine schwache Expression in den Disci intercalares der Kardiomyozyten beobachtet werden konnte. Weiterhin korrelierte die CD56-Expression signifikant positiv mit dem Kollagenanteil im Gewebe.

Nagao et al. beschrieben im Mausmodell einen signifikanten Anstieg von CD56 in den an das infarzierten Gewebe angrenzenden Kardiomyozyten sieben Tage nach Koronarligation, während immunhistochemische Analysen in den Kontrollmäusen lediglich eine Anfärbung von CD56 in den Disci intercalares ergaben. Auch 12 Monate nach der Operation konnte ein starkes Signal für CD56 in den residuellen Myozyten im Narbengewebe beobachtet werden (Nagao et al. 2010). Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten auch Gattenlohner et al., die die Expression von CD56 in der ischämischen Kardiomyopathie beim Menschen untersuchten und eine Hochregulation von CD56 in den Kardiomyozyten innerhalb oder angrenzend an ischämisch induziertes Narbengewebe beschreiben. Als Lokalisation der CD56-Expression wurden hierbei die Zellmembran sowie das Zytoplasma genannt. In akut infarzierten Kardiomyozyten hingegen wurde eine Herunterregulation von CD56 beobachtet (Gattenlohner et al. 2003). Die dargestellten Ergebnisse stehen weitestgehend im Einklang mit den beiden genannten Studien und bestätigen, dass CD56 eine lokale Reaktion der Kardiomyozyten auf die Narbenbildung darstellt. Dies wird durch die positive Korrelation zwischen CD56-Expression und Kollagenanteil untermauert. CD56 könnte sich somit als

hilfreicher Marker für Perifibrose in der Klassifikation der Infarktstadien erweisen oder vielmehr den Verlust von Zell-Zell-Interaktion anzeigen, was als möglicher Auslösemechanismus für die CD56-Expression genannt wird (Kanno und Saffitz 2001; Kanno et al. 2003).

4.7 Osteopontin als potentielles Monozytenchemoattraktanz im Myokardinfarkt

Hinsichtlich der Funktion von OPN als Monozytenchemoattraktanz (Wang und Denhardt 2008) wurde das vorliegende Myokardgewebe auf OPN-Expression untersucht. Dabei zeigte sich ein signifikanter Anstieg der OPN-Expression im SAMI, wohingegen im OMI kaum OPN nachzuweisen war.

In der Literatur wurde die OPN-Expression im humanen Herzgewebe erstmals von Murry et al. beschrieben, wobei sich in einem acht Tage alten MI eine erhöhte OPN-Expression in Makrophagen, die Nekroseareale und Granulationsgewebe infiltrierten, zeigte, während im gesunden Herzgewebe nur geringe Mengen an OPN detektiert werden konnten (Murry et al. 1994). Im Rattenmodell war eine erhöhte OPN-Expression an Tag eins und zwei nach MI evident, gefolgt von einer Abnahme an Tag sieben und 14, wobei auch hier die Makrophagen als Syntheseort angesehen wurden. In den Kontrollherzen war kein OPN zu beobachten (Komatsubara et al. 2003). Im Mausmodell gipfelte die OPN-Expression drei Tage nach MI und fiel innerhalb der nachfolgenden 28 Tage allmählich ab. Als Lokalisation zeigten immunhistologische Untersuchungen eine vermehrte Anfärbung von OPN im Interstitium mit Arealen einer stärkeren fokalen Expression (Trueblood et al. 2001). In der vorliegenden Studie wurde die höchste OPN-Expression im SAMI beobachtet, der durch das Vorhandensein von Granulationsgewebe gekennzeichnet ist und zeitlich gesehen mit den Beobachtungen von Murry et al. übereinstimmt. Im Vergleich zu der Ratten- und Mausstudie, wo OPN vor allem innerhalb der ersten drei Tage nach MI erhöht war, wurde in der vorliegenden Studie ein späterer Anstieg der OPN-Expression verzeichnet, wobei einschränkend angemerkt werden muss, dass das Initialereignis in dieser klinischen Studie, im Gegensatz zu Mausstudien, nicht genau festgelegt werden konnte. Morphologisch war das stärkste OPN-Signal in der Zellwand von Kardiomyozyten zu erkennen und weniger, wie in den aufgeführten Studien, in den Makrophagen oder im Interstitium. Dabei war das infarzierte Gewebe nicht gleichmäßig angefärbt, sondern vielmehr waren Zellgruppierungen als einzelne

Areale mit stärkerem Signal zu beobachten. Betrachtet man die Funktion von OPN als Monozytenchemoattraktanz, so konnte in der vorliegenden Studie keine statistisch signifikante Korrelation zwischen der OPN-Expression und der Anzahl an CD14⁺- und CD16⁺-Zellen gefunden werden, wenngleich die beiden Zellpopulationen ebenfalls die höchsten Zellzahlen im SAMI aufwiesen.

4.8 Einfluss von Krüppel-Like Factor 4 auf Monozyten und Makrophagen während des Myokardinfarktes

Der Transkriptionsfaktor KLF4 spielt eine Rolle bei Monozytendifferenzierung (Feinberg et al. 2007) und -funktion (Feinberg et al. 2005). In der vorliegenden Studie war die Anzahl KLF4⁺-Zellen im SAMI hochsignifikant erhöht, wohingegen im OMI und in der CONTR kaum KLF4⁺-Zellen zu finden waren. Weiterhin zeigten sich positive Korrelationen zwischen KLF4⁺-Zellen und CD14⁺-Zellen sowie OPN.

Zwar liegen bisher keine Studien über die Bedeutung von KLF4 im humanen MI vor, jedoch gibt es Erkenntnisse über den Einfluss von KLF4 auf die Differenzierung und Funktion von Monozyten. Feinberg et al. konnten zeigen, dass KLF4 eine Rolle in der Hämatopoese spielt, wo es vornehmlich in Monozyten exprimiert und Stadien-abhängig während der Monozytopoese aktiviert wird (Feinberg et al. 2007). Weiterhin ist KLF4 in der Lage, an den Monozyten-spezifischen CD14-Promotor zu binden und die Transkription von CD14 zu induzieren (Feinberg et al. 2007). Liao et al. berichteten außerdem, dass KLF4 eine regulatorische Funktion bei der Polarisation von M1- und M2-Makrophagen besitzt, wobei es unter Beteiligung von Stat6 und NFκB zu einer Induktion des M2-Phänotyps und zu einer Inhibition des M1-Signaltransduktionsweges kommt (Liao et al. 2011). Weiterhin gibt es Hinweise, dass KLF4 zu einer Unterdrückung proinflammatorischer Gene in den M2-Makrophagen beitragen könnte und die Bildung von iNOS in M1-Makrophagen fördert (Liao et al. 2011).

In der vorliegenden Untersuchung könnte das erhöhte Vorhandensein von KLF4⁺-Zellen im SAMI ein Hinweis dafür sein, dass KLF4 bei der Hemmung der M1-Makrophagen und damit Terminierung der akuten Entzündungsreaktion in der reparativen Phase des Wundheilungsprozesses eine Rolle spielt. Gleichzeitig könnte KLF4 eine Induktion der M2-Makrophagen im SAMI bewirken und damit die reparative Phase einleiten. Die positive Korrelation

zwischen CD14⁺- und KLF4⁺-Zellen ließe sich ebenfalls in Einklang mit der Studie von Feinberg et al. bringen, da eine Expression von CD14 durch KLF4 möglicherweise induziert wird. Genau wie bei den CD14⁺-Zellen fand sich auch hier eine negative Korrelation mit dem Kollagenanteil. Für die positive Korrelation zwischen KLF4⁺-Zellen und OPN gibt es in der Literatur bisher keine Erkenntnisse und die in der vorliegenden Studie erhobenen Daten reichen nicht aus, um einen Zusammenhang herzuleiten.

4.9 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals das zeitliche Auftreten von CD14⁺- und CD16⁺-Zellen in humanem Herz- und Milzgewebe während verschiedener Stadien des Myokardinfarktes untersucht. Vergleichbare Studien existieren bisher nur am Tiermodell und ihre Anwendbarkeit auf den Menschen war limitiert. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Monozyten vor allem während des SAMI im infarzierten Gewebe akkumulieren und eine Rolle im kardialen Wundheilungsprozess spielen, insbesondere bei der Fibrosebildung. Weiterhin gibt es einen Hinweis darauf, dass die eben genannten Monozyten vor allem aus der Milz rekrutiert werden. Obwohl eine morphologische *post-mortem*-Studie nicht die genaue Zellkinetik und funktionelle Relevanz der Monozytensubpopulationen im humanen Myokardinfarkt darlegen kann, legen unsere Befunde jedoch nahe, dass es auch im humanen System zu einer Stadien-abhängigen Mobilisation und Rekrutierung von Monozytensubpopulationen in das infarzierte Gewebe nach MI kommt. Ausgehend von diesen Erkenntnissen sind weitere Studien notwendig, um die zellulären und molekularen Mechanismen der Monozytenmigration, -organisation und -differenzierung zu untersuchen und beteiligte Faktoren zu identifizieren.

5 Zusammenfassung

Monozyten spielen eine wichtige Rolle bei kardiovaskulären Wundheilungsprozessen. Humane Monozyten lassen sich anhand ihrer Oberflächenexpression von CD14 und CD16 in CD14⁺CD16⁻- und CD14⁺CD16⁺-Monozyten unterteilen. In der vorliegenden Studie wurde das räumliche und zeitliche Auftreten von CD14⁺- und CD16⁺-Zellen in humanem Herz- und Milzgewebe nach MI evaluiert und mit verschiedenen Markern des kardialen Wundheilungsprozesses korreliert. Herzgewebe von Patienten, welches im Rahmen einer Obduktion asserviert werden konnte, wurde anhand histopathologischer Kriterien in akuten (AMI; n=11), subakuten (SAMI; n=10) und alten (OMI; n=16) MI oder Kontrollgewebe (CONTR; n=8) unterteilt. Die Verfügbarkeit des humanen Materials bedingte ein retrospektives Studiendesign, sodass zwar das Vorhandensein einzelner Faktoren nachgewiesen werden konnte, nicht aber die Konsequenzen eines Fehlens und damit ihrer Funktion. Anhand immunhistologischer Analysen konnten gezeigt werden, dass CD14⁺- und CD16⁺-Zellen vor allem im SAMI akkumulieren und eine positive Korrelation ($p < 0,05$) zwischen den beiden Zelltypen besteht. In der Milz konnte während des AMI ein nicht signifikanter Abfall der CD14⁺- und CD16⁺-Zellen gefunden werden, erklärbar durch das Auswandern von Monozyten aus der Milz in den Blutstrom hin zum infarzierten Herzen. Dem initialen Abfall der Monozytenzahl folgte ein Anstieg der CD14⁺- und CD16⁺-Zellen während des SAMI, möglicherweise bedingt durch eine reaktive Monozytopoese in der Milz. Auch ein nicht signifikanter Anstieg von Ki67⁺-Zellen in der subkapsulären roten Pulpa der Milz während des SAMI deutet darauf hin, dass zu diesem Zeitpunkt eine vermehrte Zellproliferation stattfindet. CAIX wurde als Marker für kardiale Hypoxie identifiziert, da es vor allem im AMI ($p < 0,01$ vs. OMI und CONTR) und SAMI ($p < 0,05$ vs. OMI und CONTR) zu einer erhöhten Expression kam. Die höchste Kapillardichte war im AMI ($p < 0,05$ vs. OMI) nachzuweisen, übereinstimmend damit, dass Hypoxie einen wichtigen Auslösemechanismus für Angiogenese darstellt. Die Studie bestätigte weiterhin, dass es im OMI ($p < 0,001$ vs. CONTR) zu vermehrter Fibrosebildung im Sinne einer Infarkt Narbe kommt. Parallel zu den Monozytenzahlen war die höchste OPN-Expression im SAMI ($p < 0,01$ vs. CONTR) zu beobachten. Dies legt nahe, dass ein Einfluss auf die Rekrutierung und Stimulation von Monozyten besteht. Ein erhöhtes Vorhandensein von KLF4⁺-Zellen im SAMI ($p < 0,001$ vs. OMI) könnte damit erklärt werden, dass der Transkriptionsfaktor möglicherweise Einfluss auf die

Beendigung der akuten Entzündungsreaktion hat und die reparative Phase einleitet, indem es die dafür verantwortlichen Monozyten-/Makrophagenpopulationen polarisiert. Die höchste CD56-Expression ließ sich im OMI ($p < 0,001$ vs. CONTR) in jenen Kardiomyozyten finden, welche an Narbengewebe angrenzten und korrelierte zudem positiv mit dem Kollagenanteil ($p < 0,001$). Da eine Unterbrechung der Zell-Zell-Interaktion die CD56-Expression induziert, könnte dies als Hinweis für die mechanische Beanspruchung der perifibrotischen Areale interpretiert werden.

Die vorliegenden Beobachtungen stehen somit einer Übertragung des murinen Modells der myokardialen Wundheilung auf das humane System nicht entgegen und unterstützen die Sicht einer von mehreren Monozytensubpopulationen getragenen Infarktheilung.

6 Literaturverzeichnis

- Alder JK, Georgantas RW, Hildreth RL, Kaplan IM, Morisot S, Yu X, McDevitt M, Civin CI (2008): Kruppel-like factor 4 is essential for inflammatory monocyte differentiation in vivo. *J Immunol* 180, 5645-5652
- Ancuta P, Rao R, Moses A, Mehle A, Shaw SK, Luscinskas FW, Gabuzda D (2003): Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes. *J Exp Med* 197, 1701-1707
- Anversa P, Beghi C, Kikkawa Y, Olivetti G (1985): Myocardial response to infarction in the rat. Morphometric measurement of infarct size and myocyte cellular hypertrophy. *Am J Pathol* 118, 484-492
- Atkins GB, Jain MK (2007): Role of Kruppel-like transcription factors in endothelial biology. *Circ Res* 100, 1686-1695
- Belge KU, Dayyani F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberger M, Frankenberger B, Espevik T, Ziegler-Heitbrock L (2002): The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol* 168, 3536-3542
- Böcker W, Denk H, Heitz PhU, Moch H: Pathologie. 4. Auflage; Urban & Fischer Verlag, München 2008
- Chen ZY, Shie J, Tseng C (2000): Up-regulation of gut-enriched kruppel-like factor by interferon-gamma in human colon carcinoma cells. *FEBS Lett* 477, 67-72
- Chen ZY, Shie JL, Tseng C (2002): STAT1 is required for IFN-gamma-mediated gut-enriched Kruppel-like factor expression. *Exp Cell Res* 281, 19-27
- Cleutjens JP, Kandala JC, Guarda E, Guntaka RV, Weber KT (1995): Regulation of collagen degradation in the rat myocardium after infarction. *J Mol Cell Cardiol* 27, 1281-1292
- Coskun S, Atalar E, Ozturk E, Yavuz B, Ozer N, Goker H, Ovunc K, Aksoyek S, Kes S, Sivri B (2006): Plasma osteopontin levels are elevated in non-ST-segment elevation acute coronary syndromes. *J Natl Med Assoc* 98, 1746-1750
- Davies MJ (2000): The pathophysiology of acute coronary syndromes. *Heart* 83, 361-366
- Dietel M, Suttrop N, Zeitz M: Harrisons Innere Medizin. (Sonderausgabe), 17. Auflage; ABW Wissenschaftsverlag, Berlin 2009
- Doherty P, Ashton SV, Moore SE, Walsh FS (1991): Morphoregulatory activities of NCAM and N-cadherin can be accounted for by G protein-dependent activation of L- and N-type neuronal Ca²⁺ channels. *Cell* 67, 21-33
- Falk E, Shah PK, Fuster V (1995): Coronary plaque disruption. *Circulation* 92, 657-671

- Feinberg MW, Cao Z, Wara AK, Lebedeva MA, Senbanerjee S, Jain MK (2005): Kruppel-like factor 4 is a mediator of proinflammatory signaling in macrophages. *J Biol Chem* 280, 38247-38258
- Feinberg MW, Wara AK, Cao Z, Lebedeva MA, Rosenbauer F, Iwasaki H, Hirai H, Katz JP, Haspel RL, Gray S (2007): The Kruppel-like factor KLF4 is a critical regulator of monocyte differentiation. *EMBO J* 26, 4138-4148
- Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML (2002): The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 53, 31-47
- Frangogiannis NG, Mendoza LH, Ren G, Akrivakis S, Jackson PL, Michael LH, Smith CW, Entman ML (2003): MCSF expression is induced in healing myocardial infarcts and may regulate monocyte and endothelial cell phenotype. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285, H483-H492
- Franzen A, Heinegard D (1985): Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix. *Biochem J* 232, 715-724
- Garrett-Sinha LA, Eberspaecher H, Seldin MF, de Crombrughe B (1996): A gene for a novel zinc-finger protein expressed in differentiated epithelial cells and transiently in certain mesenchymal cells. *J Biol Chem* 271, 31384-31390
- Gattenlohner S, Waller C, Ertl G, Bultmann BD, Muller-Hermelink HK, Marx A (2003): NCAM(CD56) and RUNX1(AML1) are up-regulated in human ischemic cardiomyopathy and a rat model of chronic cardiac ischemia. *Am J Pathol* 163, 1081-1090
- Geissmann F, Jung S, Littman DR (2003): Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 19, 71-82
- Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K (2010): Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 327, 656-661
- Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H (1983): Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 31, 13-20
- Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H (1984): Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 133, 1710-1715
- Gordon S, Taylor PR (2005): Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 5, 953-964
- Hamik A, Lin Z, Kumar A, Balcells M, Sinha S, Katz J, Feinberg MW, Gerzsten RE, Edelman ER, Jain MK (2007): Kruppel-like factor 4 regulates endothelial inflammation. *J Biol Chem* 282, 13769-13779
- Hanai H, Iida T, Takeuchi K, Watanabe F, Yamada M, Kikuyama M, Maruyama Y, Iwaoka Y, Hirayama K, Nagata S (2008): Adsorptive depletion of elevated proinflammatory

- CD14+CD16+DR++ monocytes in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 103, 1210-1216
- Holotnakova T, Ziegelhoffer A, Ohradanova A, Hulikova A, Novakova M, Kopacek J, Pastorek J, Pastorekova S (2008): Induction of carbonic anhydrase IX by hypoxia and chemical disruption of oxygen sensing in rat fibroblasts and cardiomyocytes. *Pflugers Arch* 456, 323-337
- Hudlicka O, Brown M, Egginton S (1992): Angiogenesis in skeletal and cardiac muscle. *Physiol Rev* 72, 369-417
- Ikejima H, Imanishi T, Tsujioka H, Kuroi A, Tanimoto T, Kitabata H, Hirata K, Akasaka T (2010): Effect of human peripheral monocyte subsets on coronary flow reserve in infarct-related artery in patients with primary anterior acute myocardial infarction. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 37, 453-459
- Ingersoll MA, Spanbroek R, Lottaz C, Gautier EL, Frankenberger M, Hoffmann R, Lang R, Haniffa M, Collin M, Tacke F (2010): Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets. *Blood* 115, e10-e19
- Jennings RB, Ganote CE (1974): Structural changes in myocardium during acute ischemia. *Circ Res* 35 Suppl 3, 156-172
- Kanno S, Saffitz JE (2001): The role of myocardial gap junctions in electrical conduction and arrhythmogenesis. *Cardiovasc Pathol* 10, 169-177
- Kanno S, Kovacs A, Yamada KA, Saffitz JE (2003): Connexin43 as a determinant of myocardial infarct size following coronary occlusion in mice. *J Am Coll Cardiol* 41, 681-686
- Kato R, Momiyama Y, Ohmori R, Tanaka N, Taniguchi H, Arakawa K, Kusuhara M, Nakamura H, Ohsuzu F (2006): High plasma levels of osteopontin in patients with restenosis after percutaneous coronary intervention. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, e1-e2
- Kawanaka N, Yamamura M, Aita T, Morita Y, Okamoto A, Kawashima M, Iwahashi M, Ueno A, Ohmoto Y, Makino H (2002): CD14+,CD16+ blood monocytes and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 46, 2578-2586
- Kintscher U, Wakino S, Kim S, Fleck E, Hsueh WA, Law RE (2001): Angiotensin II induces migration and Pyk2/paxillin phosphorylation of human monocytes. *Hypertension* 37, 587-593
- Komatsubara I, Murakami T, Kusachi S, Nakamura K, Hirohata S, Hayashi J, Takemoto S, Suezawa C, Ninomiya Y, Shiratori Y (2003): Spatially and temporally different expression of osteonectin and osteopontin in the infarct zone of experimentally induced myocardial infarction in rats. *Cardiovasc Pathol* 12, 186-194
- Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC: *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. 8. Auflage; Saunders, Philadelphia 2010

- Lee SH, Wolf PL, Escudero R, Deutsch R, Jamieson SW, Thistlethwaite PA (2000): Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction. *N Engl J Med* 342, 626-633
- Leuschner F, Rauch PJ, Ueno T, Gorbatov R, Marinelli B, Lee WW, Dutta P, Wei Y, Robbins C, Iwamoto Y (2012): Rapid monocyte kinetics in acute myocardial infarction are sustained by extramedullary monocytopoiesis. *J Exp Med* 209, 123-137
- Liao X, Haldar SM, Lu Y, Jeyaraj D, Paruchuri K, Nahori M, Cui Y, Kaestner KH, Jain MK (2010): Kruppel-like factor 4 regulates pressure-induced cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 49, 334-338
- Liao X, Sharma N, Kapadia F, Zhou G, Lu Y, Hong H, Paruchuri K, Mahabeleshwar GH, Dalmas E, Venteclef N (2011): Kruppel-like factor 4 regulates macrophage polarization. *J Clin Invest* 121, 2736-2749
- Liu Y, Imanishi T, Ikejima H, Tsujioka H, Ozaki Y, Kuroi A, Okochi K, Ishibashi K, Tanimoto T, Ino Y (2010): Association between circulating monocyte subsets and in-stent restenosis after coronary stent implantation in patients with ST-elevation myocardial infarction. *Circ J* 74, 2585-2591
- Maness PF, Schachner M (2007): Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration. *Nat Neurosci* 10, 19-26
- Mathieu J, Zhang Z, Zhou W, Wang AJ, Heddleston JM, Hubaud A, Stadler B, Choi M, Bar M, Tewari M (2011): HIF Induces Human Embryonic Stem Cell Markers in Cancer Cells. *Cancer Res* 71, 4640-4652
- Mebius RE, Kraal G (2005): Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol* 5, 606-616
- Mendis S, Thygesen K, Kuulasmaa K, Giampaoli S, Mahonen M, Ngu BK, Lisheng L (2011): World Health Organization definition of myocardial infarction: 2008-09 revision. *Int J Epidemiol* 40, 139-146
- Mosser DM, Edwards JP (2008): Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8, 958-969
- Murry CE, Giachelli CM, Schwartz SM, Vracko R (1994): Macrophages express osteopontin during repair of myocardial necrosis. *Am J Pathol* 145, 1450-1462
- Nagao K, Ono K, Iwanaga Y, Tamaki Y, Kojima Y, Horie T, Nishi H, Kinoshita M, Kuwabara Y, Hasegawa K (2010): Neural cell adhesion molecule is a cardioprotective factor up-regulated by metabolic stress. *J Mol Cell Cardiol* 48, 1157-1168
- Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo JL, Libby P, Weissleder R, Pittet MJ (2007): The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med* 204, 3037-3047

- Nahrendorf M, Pittet MJ, Swirski FK (2010): Monocytes: protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction. *Circulation* 121, 2437-2445
- Nickenig G, Baudler S, Muller C, Werner C, Werner N, Welzel H, Strehlow K, Bohm M (2002): Redox-sensitive vascular smooth muscle cell proliferation is mediated by GSKF and Id3 in vitro and in vivo. *FASEB J* 16, 1077-1086
- Nitta T, Yagita H, Sato K, Okumura K (1989): Involvement of CD56 (NKH-1/Leu-19 antigen) as an adhesion molecule in natural killer-target cell interaction. *J Exp Med* 170, 1757-1761
- Palframan RT, Jung S, Cheng G, Weninger W, Luo Y, Dorf M, Littman DR, Rollins BJ, Zweerink H, Rot A (2001): Inflammatory chemokine transport and presentation in HEV: a remote control mechanism for monocyte recruitment to lymph nodes in inflamed tissues. *J Exp Med* 194, 1361-1373
- Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW (1989): Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* 74, 2527-2534
- Pfeffer MA, Braunwald E (1990): Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation* 81, 1161-1172
- Potter CP, Harris AL (2003): Diagnostic, prognostic and therapeutic implications of carbonic anhydrases in cancer. *Br J Cancer* 89, 2-7
- Pusztaszeri MP, Seelentag W, Bosman FT (2006): Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues. *J Histochem Cytochem* 54, 385-395
- Robinette CD, Fraumeni JF, Jr. (1977): Splenectomy and subsequent mortality in veterans of the 1939-45 war. *Lancet* 2, 127-129
- Rodrigues LR, Teixeira JA, Schmitt FL, Paulsson M, Lindmark-Mansson H (2007): The role of osteopontin in tumor progression and metastasis in breast cancer *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev* 16, 1087-1097
- Rogacev KS, Ulrich C, Blomer L, Hornof F, Oster K, Ziegelin M, Cremers B, Grenner Y, Geisel J, Schlitt A (2010): Monocyte heterogeneity in obesity and subclinical atherosclerosis. *Eur Heart J* 31, 369-376
- Rothe G, Gabriel H, Kovacs E, Klucken J, Stohr J, Kindermann W, Schmitz G (1996): Peripheral blood mononuclear phagocyte subpopulations as cellular markers in hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16, 1437-1447
- Sabia PJ, Powers ER, Ragosta M, Sarembock IJ, Burwell LR, Kaul S (1992): An association between collateral blood flow and myocardial viability in patients with recent myocardial infarction. *N Engl J Med* 327, 1825-1831
- Segre JA, Bauer C, Fuchs E (1999): Klf4 is a transcription factor required for establishing the barrier function of the skin. *Nat Genet* 22, 356-360

- Semenza GL (1998): Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis. *Curr Opin Genet Dev* 8, 588-594
- Serbina NV, Jia T, Hohl TM, Pamer EG (2008): Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol* 26, 421-452
- Shields JM, Christy RJ, Yang VW (1996): Identification and characterization of a gene encoding a gut-enriched Kruppel-like factor expressed during growth arrest. *J Biol Chem* 271, 20009-20017
- Shima DT, Kuroki M, Deutsch U, Ng YS, Adamis AP, D'Amore PA (1996): The mouse gene for vascular endothelial growth factor. Genomic structure, definition of the transcriptional unit, and characterization of transcriptional and post-transcriptional regulatory sequences. *J Biol Chem* 271, 3877-3883
- Singh K, Balligand JL, Fischer TA, Smith TW, Kelly RA (1995): Glucocorticoids increase osteopontin expression in cardiac myocytes and microvascular endothelial cells. Role in regulation of inducible nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 270, 28471-28478
- Singh M, Foster CR, Dalal S, Singh K (2010): Osteopontin: role in extracellular matrix deposition and myocardial remodeling post-MI. *J Mol Cell Cardiol* 48, 538-543
- Statistisches Bundesamt (2012, 06.12.2012). „Todesursachen in Deutschland.“ Zugriff am 28.04.2013, https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen2120400117004.pdf;jsessionid=B99BDB0A3E26F387A2833224BFC4B071.cae3?__blob=publicationFile
- Sutton MG, Sharpe N (2000): Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation* 101, 2981-2988
- Svastova E, Hulikova A, Rafajova M, Zat'ovicova M, Gibadulinova A, Casini A, Cecchi A, Scozzafava A, Supuran CT, Pastorek J (2004): Hypoxia activates the capacity of tumor-associated carbonic anhydrase IX to acidify extracellular pH. *FEBS Lett* 577, 439-445
- Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M, Wildgruber M, Cortez-Retamozo V, Panizzi P, Figueiredo JL, Kohler RH, Chudnovskiy A, Waterman P (2009): Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science* 325, 612-616
- Thygesen K, Alpert JS, White HD (2007): Universal definition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 50, 2173-2195
- Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Simoons ML, Chaitman BR, White HD, Katus HA, Apple FS, Lindahl B, Morrow DA (2012): Third universal definition of myocardial infarction. *Eur Heart J* 33, 2551-2567
- Trueblood NA, Xie Z, Communal C, Sam F, Ngoy S, Liaw L, Jenkins AW, Wang J, Sawyer DB, Bing OH (2001): Exaggerated left ventricular dilation and reduced collagen deposition after myocardial infarction in mice lacking osteopontin. *Circ Res* 88, 1080-1087

- Tsujioka H, Imanishi T, Ikejima H, Kuroi A, Takarada S, Tanimoto T, Kitabata H, Okochi K, Arita Y, Ishibashi K (2009): Impact of heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets on myocardial salvage in patients with primary acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 54, 130-138
- van Amerongen MJ, Harmsen MC, van Rooijen N, Petersen AH, van Luyn MJ (2007): Macrophage depletion impairs wound healing and increases left ventricular remodeling after myocardial injury in mice. *Am J Pathol* 170, 818-829
- van der Laan AM, Hirsch A, Robbers LF, Nijveldt R, Lommerse I, Delewi R, van der Vleuten PA, Biemond BJ, Zwaginga JJ, van der Giessen WJ (2012): A proinflammatory monocyte response is associated with myocardial injury and impaired functional outcome in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: monocytes and myocardial infarction. *Am Heart J* 163, 57-65
- van der Laan AM, Ter Horst EN, Delewi R, Begieneman MP, Krijnen PA, Hirsch A, Lavaei M, Nahrendorf M, Horrevoets AJ, Niessen HW (2013): Monocyte subset accumulation in the human heart following acute myocardial infarction and the role of the spleen as monocyte reservoir. *Eur Heart J* [Epub ahead of print]
- Wang KX, Denhardt DT (2008): Osteopontin: role in immune regulation and stress responses. *Cytokine Growth Factor Rev* 19, 333-345
- Weber GF, Ashkar S, Glimcher MJ, Cantor H (1996): Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1). *Science* 271, 509-512
- Wittig B, Seiter S, Schmidt DS, Zuber M, Neurath M, Zoller M (1999): CD44 variant isoforms on blood leukocytes in chronic inflammatory bowel disease and other systemic autoimmune diseases. *Lab Invest* 79, 747-759
- Wykoff CC, Beasley NJ, Watson PH, Turner KJ, Pastorek J, Sibtain A, Wilson GD, Turley H, Talks KL, Maxwell PH (2000): Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Res* 60, 7075-7083
- Yano T, Miura T, Whittaker P, Miki T, Sakamoto J, Nakamura Y, Ichikawa Y, Ikeda Y, Kobayashi H, Ohori K (2006): Macrophage colony-stimulating factor treatment after myocardial infarction attenuates left ventricular dysfunction by accelerating infarct repair. *J Am Coll Cardiol* 47, 626-634
- Ziegler-Heitbrock L (2007): The CD14⁺ CD16⁺ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol* 81, 584-592
- Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, Leenen PJ, Liu YJ, MacPherson G, Randolph GJ (2010): Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 116, e74-e80

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Biphasischer Monozytenanstieg nach Myokardinfarkt in der Maus	6
Abbildung 2: Stadien-Einteilung des Myokardinfarktes anhand morphologischer Kriterien im HE-Schnitt.....	13
Abbildung 3: Tissue-Microarray	20
Abbildung 4: Tissue-Arrayer	21
Abbildung 5: CD14 ⁺ - und CD16 ⁺ -Zellen im Herzen.....	29
Abbildung 6: Positive Korrelation zwischen CD16 ⁺ - und CD14 ⁺ -Zellen im Herzen.....	30
Abbildung 7: CD14 ⁺ -, CD16 ⁺ - und Ki67 ⁺ -Zellen in der Milz	32
Abbildung 8: Carboanhydrase IX-Expression im Herzen.....	33
Abbildung 9: Positive Korrelation zwischen Carboanhydrase IX und linker Kammerwandstärke.....	34
Abbildung 10: Mikrogefäße im Herzen	35
Abbildung 11: Kapillar- und Arterioldichte im Herzen	35
Abbildung 12: Korrelationen mit Kapillardichte	36
Abbildung 13: Kollagenanteil im Herzen	37
Abbildung 14: Korrelationen mit Kollagenanteil.....	38
Abbildung 15: CD56-Expression im Herzen	39
Abbildung 16: Korrelationen mit CD56.....	39
Abbildung 17: Osteopontin-Expression im Herzen	40
Abbildung 18: KLF4 ⁺ -Zellen im Herzen	41
Abbildung 19: Korrelationen mit KLF4 ⁺ -Zellen	42

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte und Software.....	14
Tabelle 2: Reagenzien	14
Tabelle 3: Lösungen	15
Tabelle 4: Puffer.....	16
Tabelle 5: Verwendete Primärantikörper	18
Tabelle 6: Verwendete Sekundärantikörper	19
Tabelle 7: Patientencharakteristika	24
Tabelle 8: Laborparameter	25
Tabelle 9: Kardiovaskuläre Risikofaktoren, Vorerkrankungen und Medikation.....	26
Tabelle 10: Kardiale Anamnese anhand der Sektionsprotokolle	28

Danksagung:

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau **Prof. Dr. med. Katrin Schäfer** für die engagierte Förderung bei der Durchführung unseres Projektes. Sie hat mir die Grundzüge wissenschaftlichen Arbeitens vermittelt und stand mir stets mit Fachwissen und wertvollen Hinweisen zur Seite.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei **Frau Dr. med. Frauke Czepluch** für ihre engagierte Betreuung meiner Dissertation. Sie hat mich allzeit unterstützt, gefördert und mir bei Fragen und Problemen stets eine wichtige Hilfestellung geboten.

Durch Frau Prof. Dr. med. Katrin Schäfer und Frau Dr. med. Frauke Czepluch erhielt ich die Möglichkeit, auf nationalen und internationalen Kongressen Erfahrungen zu sammeln und über die Dissertation hinaus meinen Horizont zu erweitern.

Herrn **Prof. Dr. med. Gerd Hasenfuß** danke ich für die Möglichkeit zur Durchführung meiner Forschungsarbeit in seiner Abteilung.

Herrn **Dr. med. Felix Bremmer** und Herrn **Dr. med. Carl-Ludwig Behnes** aus der Abteilung Pathologie danke ich für die kooperative Zusammenarbeit. Mit kompetenter Unterstützung und der Vermittlung wertvollen Wissens haben sie mich während des Projektes begleitet. Frau **Mercedes Martin-Ortega** danke ich für die freundliche technische Unterstützung. Mit ihrem Erfahrungsschatz hat sie einen wichtigen Beitrag zu unserem Projekt geleistet.

Herrn **David Ellenberger** aus dem Institut für Medizinische Statistik der UMG danke ich für die Durchführung der ersten statistischen Analysen.

Ausdrücklich und von Herzen möchte ich mich bei meiner Arbeitsgruppe bedanken, in der mir jeder Einzelne stets motivierend und als Ansprechpartner zur Seite stand.

Ganz besonders möchte ich dabei Frau **Sarah Barke** für die ausgezeichnete Einarbeitung und Frau **Edith Döring** für die großartige Hilfe bei der Laborarbeit danken.