

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik
Tübingen
Abteilung Innere Medizin III
Schwerpunkt: Kardiologie und Kreislaufkrankungen**

**„Morphologische und immunhistochemische Analyse
intrakoronarer Thromben von Patienten mit akutem
Myokardinfarkt in Abhängigkeit von der
antiaggregatorischen Therapie“**

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

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

vorgelegt von

Streib, Lisa

2018

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1.Berichterstatter: Privatdozentin Dr. I. Müller

2.Berichterstatter: Privatdozent Dr. P. Ong

Tag der Disputation: 17.07.2018

Diese Arbeit widme ich meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	S.5
1 Einleitung.....	S.7
- 1.1 Das Herz.....	S.7
- 1.2 Arteriosklerose und koronare Herzerkrankung.....	S.7
- 1.3 Der Myokardinfarkt.....	S.11
- 1.4 ADP-Rezeptorblocker.....	S.18
- 1.5 Bone morphogenetic proteins (BMP)	S.21
- 1.6 Histon H3.....	S.25
- 1.7 Toll-like Rezeptor 4 (TLR4)	S.27
- 1.8 Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)	S.29
- 1.9 Myeloperoxidase (MPO)	S.32
- 1.10 Zielsetzung.....	S.37
2 Material und Methoden.....	S.38
- 2.1 Patientenkollektiv.....	S.38
- 2.2 Fixierung der arteriellen Thromben.....	S.38
- 2.3 Hämatoxylin-Eosin-(HE) Färbung.....	S.39
- 2.4 Immunhistochemie.....	S.40
- 2.5 Primäre Antikörper.....	S.42
- 2.6 IgG-Kontrollen.....	S.42
- 2.7 Sekundäre Antikörper.....	S.42
- 2.8 Seren.....	S.43
- 2.9 Reagenzien.....	S.43
- 2.10 Verbrauchsmaterialien.....	S.44
- 2.11 Geräte.....	S.44
- 2.12 Statistik.....	S.45
3 Ergebnisse.....	S.46
- 3.1 Charakteristika der Studienpopulation.....	S.46
- 3.2 Morphologische und immunhistochemische Analyse.....	S.48
- 3.3 Korrelationen nach Spearman mit Schwerpunkt auf der ermittelten Proteinexpression.....	S.58

- 3.4 Signifikanter Unterschied MPO positiver Zellen zwischen Clopidogrel- und Prasugreleinnahme.....	S.61
4 Diskussion.....	S.63
- 4.1 Zusammenfassung der wesentlichen Ergebnisse.....	S.63
- 4.2 Aufbau arterieller Thromben.....	S.63
- 4.3 BMP2, BMP4 und BMP7 bei kardiovaskulären Erkrankungen.....	S.64
- 4.4 Histon H3 bei kardiovaskulären Erkrankungen.....	S.69
- 4.5 TLR4 bei kardiovaskulären Erkrankungen.....	S.71
- 4.6 SDF-1 bei kardiovaskulären Erkrankungen.....	S.75
- 4.7 MPO bei kardiovaskulären Erkrankungen.....	S.78
- 4.8 Klinische Relevanz für die antiaggregatorische Therapie nach Myokardinfarkt.....	S.83
- 4.9 Limitationen dieser Arbeit	S.85
5 Zusammenfassung.....	S.86
6 Literaturverzeichnis.....	S.87
7 Anhang.....	S.94
8 Erklärungen zum Eigenanteil.....	S.101
9 Danksagung.....	S.102
10 Lebenslauf.....	S.103

Abkürzungsverzeichnis

Abcc6 ATP binding cassette subfamily C member 6
ACS acute coronary syndrome= akutes Koronarsyndrom
ADP Adenosindiphosphat
ALK activin receptor-like kinase
AP Angina pectoris
ASS Acetylsalicylsäure
BMP bone morphogenetic protein
BSA bovines Serumalbumin
CXCL12 chemokine (C-X-C motif) ligand 12
DAB Diaminobenzidintetrahydrochlorid
DAMP damage-associated molecular pattern
EKG Elektrokardiogramm
eNOS endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase
ENT equilibrative nucleoside transporter
FGF-2 fibroblast growth factor-2
FSTL1 Follistatin-Like 1
GM-CSF Granulozyten- und Monozyten colony stimulating factor
H₂O₂ Wasserstoffperoxid
HDL high density lipoprotein
HE Hämatoxylin-Eosin
HIF-1 hypoxia-inducible factor-1
HMGB1 high mobility group box 1
HOCl hypochlorige Säure
IL Interleukin
KHK koronare Herzerkrankung
LCA left coronary artery= linke Koronararterie
LDL low density lipoprotein
LPS Lipopolysaccharide
MAPK mitogen aktivierte Proteinkinase
MMP Matrix-Metalloproteinase
MPO Myeloperoxidase

NO Stickstoffmonoxid
NO₂⁻ Nitrit
NO₂ Stickstoffdioxid
NO₂Tyr Nitrotyrosin
NSTEMI Non-ST-Segment-Elevation-Myocardial-Infarction= Nicht-ST-
Hebungsinfarkt
ox-LDL oxidativ modifiziertes LDL
PBS phosphate buffered saline
P-gp Permeabilitäts-Glykoproteintransporter
PTCA perkutane transluminale Koronarangioplastie
RASAL1 RAS Protein Activator Like 1
RCA right coronary artery= rechte Koronararterie
RCX Ramus circumflexus
RIVA Ramus interventricularis anterior
ROS reactive oxygen species = reaktive Sauerstoffspezies
Rp105 radioaktives 105 kDa Protein
SAHA Suberoylanilidhydroxamsäure
SDF-1 stromal cell-derived factor-1
STEMI ST-Segment-Elevation-Myocardial-Infarction= ST-Hebungsinfarkt
TF tissue factor
TGF β transforming growth factor β
TLR4 Toll-like Rezeptor 4
TNF α Tumornekrosefaktor α
VEGF vascular endothelial growth factor

1 Einleitung

1.1 Das Herz

Das Herz bildet als eine Art elektro-chemo-mechanische Maschine das funktionelle Zentrum des Herz-Kreislaufsystems (Böcker et al. 2012; Schmidt, Lang, Heckmann 2010). Das Herz gliedert sich in vier Herzkammern, die von Endokard ausgekleidet werden. Nach außen hin wird es sackförmig von Epikard und Perikard umgeben.

Die Versorgung des Myokards mit Blut über die linke (LCA) und rechte Koronararterie (RCA) entspricht 5 % des Herzzeitvolumens. Über ein sehr dichtes, im Interstitium des Herzens gelegenes Kapillarnetz wird eine ausreichende Sauerstoffversorgung des Myokards gewährleistet (Böcker et al. 2012).

Zur Aufrechterhaltung der Ströme muss das Herz Druck- und Volumenarbeit leisten (Böcker et al. 2012; Schmidt, Lang, Heckmann 2010). Die drei wesentlichen Faktoren, die die Leistungsfähigkeit des Herzens bestimmen, sind das maximale Schlagvolumen, die maximale Herzfrequenz und die maximale Durchblutung der Koronargefäße. Chronische Erkrankungen können diese Faktoren stören und so die Leistungsfähigkeit des Herzens massiv behindern (Schmidt, Lang, Heckmann 2010).

1.2 Arteriosklerose und koronare Herzerkrankung

Die Arteriosklerose führt über eine Wandverdickung zu einem Elastizitätsverlust und einer Einengung des Gefäßlumens. Die wichtigste Unterform ist die Atherosklerose, die durch die Bildung fibröser Plaques und Lipideinlagerungen in der Intima in den elastischen und den großen und mittleren muskulären Arterien gekennzeichnet ist (Böcker et al. 2012).

Atherosklerose stellt eine Hauptursache für Tod und Behinderung der erwachsenen Bevölkerung dar und ist in den Industrienationen bei >65-jährigen für >50 % der Todesfälle verantwortlich (Blich, Miry, et al. 2013; Böcker et al. 2012; Cong, Guangzhi, et al. 2017; Massberg, Steffen, et al. 2006).

Inflammation und oxidativer Stress tragen zur Pathogenese der Atherosklerose bei (Sugiyama, Seigo, et al. 2001; Husted, Steen, et al. 2010; Schiopu, Alexandru, Cotoi, Ovidiu S. 2013; Yin, Yan-Wei, et al. 2014; Wang, Zeneng, et al. 2007). Dyslipidämie in Form eines zu hohen low density lipoprotein-(LDL)Spiegels oder eines zu niedrigen high density lipoprotein-(HDL)Spiegels, Diabetes mellitus, bauchbetonte Adipositas,

eine fettreiche Ernährung, Bewegungsmangel, generalisierte Entzündungserkrankungen oder auch renale Erkrankungen, Rauchen, Luftverschmutzung, arterielle Hypertonie und eine familiäre Disposition können substanziell das kardiovaskuläre Risiko erhöhen (Herold et al. 2015; Mader et al. 2014; Wang, Zeneng, et al. 2007; Böcker et al. 2012; He, J., et al. 2015; Yin, Yan-Wei, et al. 2014). Spallarossa et al. konnten zeigen, dass exzessive Fettaufnahme neben chronischen auch akute, potenziell proatherogene Effekte besitzt (Spallarossa, Paolo, et al. 2008). Eine weitere Rolle spielt das Alter (Böcker et al. 2012; Herold et al. 2015; Mader et al. 2014).

Die Response-to-injury-Hypothese der Atherosklerose legt nahe, dass endotheliale Dysfunktion den ersten Schritt der Atherogenese darstellt (Spallarossa, Paolo, et al. 2008; Böcker et al. 2012; Mallat, Ziad; Tedgui, Alain 2000).

Der beschleunigte Verlust der Endothelzellen und der Zell-Zell-Kontakte sorgen für eine vermehrte Durchlässigkeit für Lipoproteine und andere Plasmabestandteile (Spallarossa, Paolo, et al. 2008). Zudem werden die Endothelzellen, ehe sie eliminiert werden, prokoagulatorisch und binden vermehrt Leukozyten und Thrombozyten (Spallarossa, Paolo, et al. 2008; Bombelli, Thomas; Schwartz, Barbara R.; Harlan, John M. 1999; Massberg, Steffen, et al. 2006; Stellos, Konstantinos, et al. 2008a).

Dies führt zu einem Lipoproteinstrom in die Intima, v.a. von LDL, aus dem dann minimal oxidiertes LDL entstehen kann, das dann in einer inflammatorischen Phase akkumuliert (Böcker et al. 2012). Dies regt die Endothelzellen zur Chemokinproduktion an, welche die Adhäsion und Migration zirkulierender Monozyten in die Arterienwand und ihre Umwandlung in Makrophagen fördern (Böcker et al. 2012; Sugiyama, Seigo, et al. 2001; Teng, Nathaniel, et al. 2017).

Oxidativ modifiziertes LDL (ox-LDL) wird von den in die Intima eingewanderten Makrophagen durch Bindung an Scavengerrezeptoren viel leichter aufgenommen als unverändertes LDL, sodass aus den Makrophagen Schaumzellen entstehen (Böcker et al. 2012; Lau, Denise; Baldus, Stephan 2006; Wang, Zeneng, et al. 2007; Teng, Nathaniel, et al. 2017). Dies gipfelt in der Ulzeration der atheromatösen Plaque, Verkalkung und Plaqueruptur (Böcker et al. 2012; Teng, Nathaniel, et al. 2017). Dabei werden tissue factor (TF) freigesetzt und freies Kollagen exponiert, sodass sich aus adhärenen Thrombozyten und quer vernetztem Fibrin ein Thrombus bildet (Böcker et al. 2012). Abbildung 1 fasst die Vorgänge der Atherosklerose zusammen.

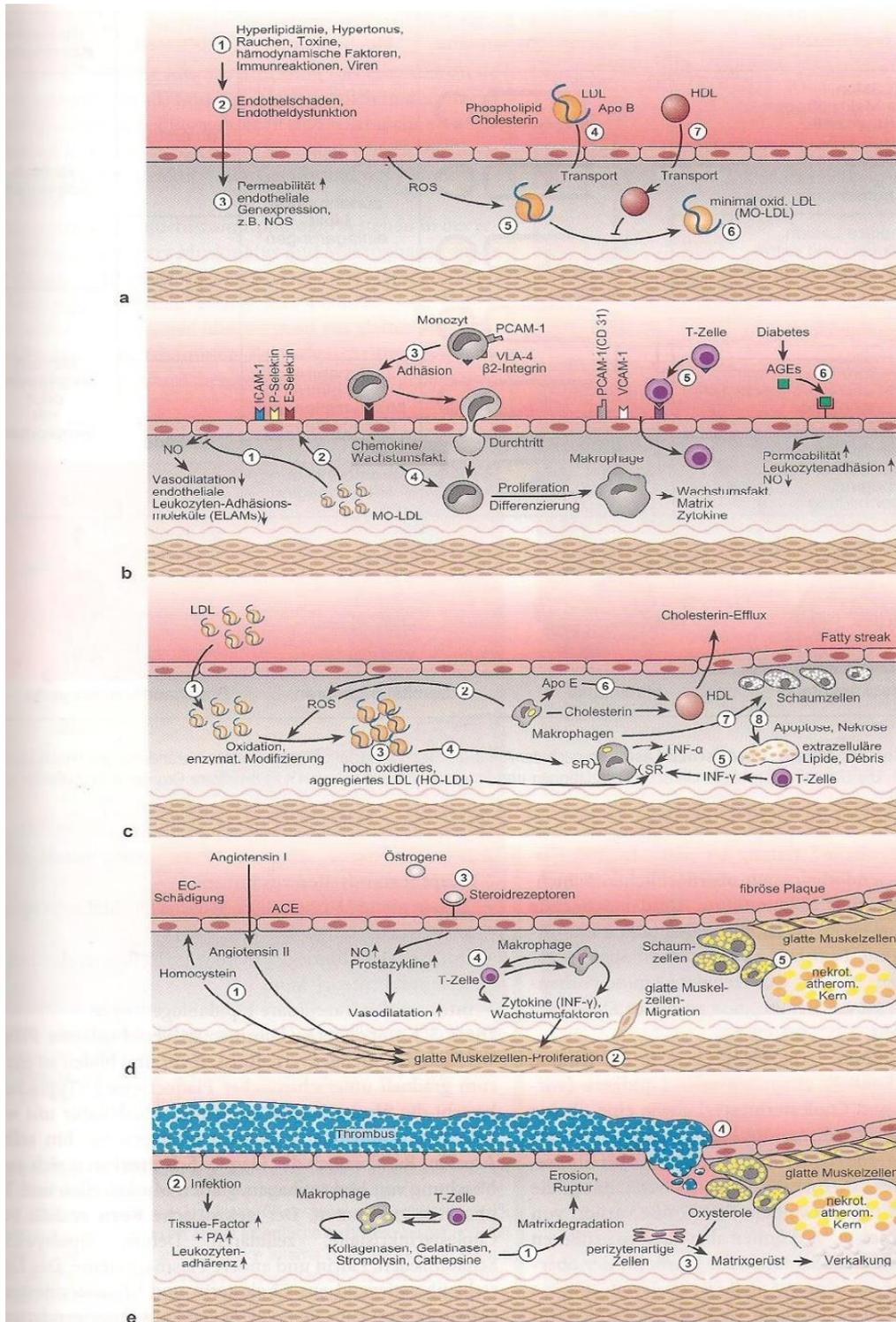


Abbildung 1: Zunächst wirken schädigende Faktoren auf die Gefäßwand ein, die zu vermehrten Durchlässigkeit für Lipoproteine führen, die in eine Schaumzellbildung mündet. Chemotaktische Stoffe führen zu einer Entzündungsreaktion, die in der Entstehung atherosklerotischer Plaques mündet. Die Ruptur dieser Plaques führt über adhärenente Thrombozyten zur Thrombusbildung (Böcker et al. 2012).

Lipidflecken oder fatty streaks stellen die erste Stufe atherosklerotischer Läsionen dar und sind histologisch durch herdförmig akkumulierte, lipidspeichernde Schaumzellen in der Intima gekennzeichnet (Böcker et al. 2012).

Atherosklerotische Läsionen enthalten einen zentralen Lipidkern aus Cholesterin (Böcker et al. 2012; Blich, Miry, et al. 2013), der wahrscheinlich eine Schlüsselrolle in der biomechanischen Destabilisierung der Plaques und in der Thrombogenese spielt (Sugiyama, Seigo, et al. 2001; Blich, Miry, et al. 2013).

Vulnerable Plaques sind gekennzeichnet durch eine dünne Kappe fibrösen Gewebes über einem lipidreichen, metabolisch aktiven Kern und sind mit akutem Koronarsyndrom (ACS) und plötzlichem Herztod assoziiert (Sugiyama, Seigo, et al. 2001; Blich, Miry, et al. 2013; Teng, Nathaniel, et al. 2017), während stabile Plaques eine dicke fibröse Kappe, reichlich extrazelluläre Matrix und glatte Muskelzellen mit einem geringen Fettgehalt aufweisen (Lau, Denise; Baldus, Stephan 2006; Sugiyama, Seigo, et al. 2001).

Makrophagen spielen eine bedeutende Rolle in der Atherogenese (Sugiyama, Seigo, et al. 2001; Böcker et al. 2012; Cong, Guangzhi, et al. 2017; Teng, Nathaniel, et al. 2017). Ihre proinflammatorischen Eigenschaften tragen wahrscheinlich zur Destabilisierung von Atheromen bei, indem sie die Degradierung der extrazellulären Matrix fördern (Sugiyama, Seigo, et al. 2001; Böcker et al. 2012).

Zudem spielt die Apoptose der Makrophagen eine entscheidende Rolle in der Entwicklung eines nekrotischen Kerns der Plaques (Cong, Guangzhi, et al. 2017; Teng, Nathaniel, et al. 2017). Daneben sorgen auch die vermehrte Apoptose glatter Muskelzellen sowie die Neoangiogenese für eine vermehrte Destabilisierung der Plaques (Teng, Nathaniel, et al. 2017).

Hochgradige Verkalkung der Koronararterien erhöht das Risiko für Myokardinfarkte (Böcker et al. 2012). So stellt die koronare Herzerkrankung (KHK), die zum Myokardinfarkt führt, eine Haupttodesursache von Männern und Frauen weltweit, insbesondere in den Industriestaaten, dar (Sanders, Lehanna N., et al. 2016; Ogura, Yasuhiro, et al. 2012; Chen, Jiqui, et al. 2010; Blich, Miry, et al. 2013; Yellon, Derek M.; Hausenloy, Derek J. 2007; Herold et al. 2015; Teng, Nathaniel, et al. 2017).

Die KHK ist die Manifestation der Arteriosklerose in den Herzkranzarterien (Herold et al. 2015; Mader et al. 2014; Böcker et al. 2012; Teng, Nathaniel, et al. 2017). Unter dem

Einfluss lokaler, hämodynamischer Faktoren kommt es auf dem Boden einer endothelialen Funktionsstörung zu einer progredienten Entzündung der Gefäßwand und Obstruktion des Gefäßlumens (Schmidt, Lang, Heckmann, 2010). Aufgrund von flusslimitierenden Stenosierungen der Koronararterien kommt es zu einer unzureichenden Blutversorgung des Myokards und damit zu einem Missverhältnis von Sauerstoffangebot und –bedarf, was als Koronarinsuffizienz bezeichnet wird (Herold et al. 2015; Böcker et al. 2012; Karow, Lang-Roth 2014). Eine stark ausgeprägte Hypoxidose resultiert in Nekrosen im Myokard, die dann von Makrophagen abgebaut und durch Bindegewebe ersetzt werden (Böcker et al. 2012).

Da die LCA sich schnell in den Ramus interventricularis anterior (RIVA) und den Ramus circumflexus (RCX) aufteilt, wird hier oft von drei Gefäßen gesprochen. Je nach Anzahl der stenosierten Gefäße (RCA, LCA, RIVA, RCX) werden deshalb 1-, 2-, 3- oder 4-Gefäßkrankheit unterschieden (Böcker et al. 2012; Herold et al. 2015).

Die KHK bleibt zunächst über Jahrzehnte asymptomatisch, ehe sich infolge einer Myokardischämie Symptome einstellen (Herold et al. 2015; Mader et al. 2014; Karow, Lang-Roth 2014).

Die Angina pectoris (AP) ist durch retrosternal lokalisierte Schmerzen gekennzeichnet und stellt das Leitsymptom der Koronarinsuffizienz dar (Herold et al. 2015).

Die beste Möglichkeit der Behandlung einer KHK ist die Wiederherstellung der Blutversorgung des ischämischen Myokardgewebes (Yang, Jun, et al. 2015).

Betablocker, Nitratre oder lang wirksame Kalziumantagonisten stellen die eine Säule der antianginösen Therapie dar. Daneben kann eine Rekanalisierung verschlossener Gefäße durch invasive Maßnahmen wie Ballondilatation, Stent, Thrombolyse oder Bypassoperation erreicht werden. Die dritte Säule stellt die Prävention kardiovaskulärer Ereignisse durch Acetylsalicylsäure (ASS) und Statine dar (Mader et al. 2014; Herold et al. 2015; Karow, Lang-Roth 2014).

1.3 Der Myokardinfarkt

1.3.1 Epidemiologie des Myokardinfarkts

Der akute Myokardinfarkt, als Hauptkomplikation der koronaren Atherosklerose, ist immer noch eine Haupttodes- und –morbitätsursache weltweit (Van der Pouw Kraan, Tineke CTM, et al. 2014; Yin, Yan-Wei, et al. 2014; Zakharova, Liudmila, et al. 2015;

Vogel, Benjamin, et al. 2015; Cagavi, Esra, et al. 2014; Pallotta, Isabella, et al. 2015).

1.3.2 Ätiologie des Myokardinfarkts

Die Ursache des Myokardinfarkts ist die Unterbrechung der Blutzufuhr zu einem Teil des Herzens, was zu einer irreversiblen myokardialen Nekrose führen kann (Yin, Yan-Wei, et al. 2014; He, J., et al. 2015; Arakawa, Kentaro, et al. 2009; Vogel, Benjamin, et al. 2015; Böcker et al. 2012; Takahashi, Masafumi 2010).

Die meisten Myokardinfarkte werden durch Thrombose auf dem Boden einer rupturierten oder erodierten atherosklerotischen Plaque ausgelöst (Sugiyama, Seigo, et al. 2001; Džumhur, Andrea, et al. 2012; Yunoki, Kei, et al. 2012; Herold et al. 2015; Kondo, Kensuke, et al. 2015; Arakawa, Kentaro, et al. 2009; Sugiyama, Seigo, et al. 2004; Ferrante, Giuseppe, et al. 2010; Niccoli, Giampaolo, et al. 2017).

1.3.3 Einteilung des Myokardinfarkts

Der Myokardinfarkt ist Teil des akuten Koronarsyndroms (ACS). Hierunter fällt der Nicht-ST-Hebungsinfarkt (NSTEMI) mit einem Anstieg von Troponin, aber ohne persistierende ST-Strecken-Hebung, der ST-Hebungsinfarkt (STEMI) mit sowohl einem Troponinanstieg als auch einer ST-Streckenhebung sowie die instabile Angina pectoris, die keinen Troponinanstieg aufweist (Herold et al. 2015; Karow, Lang-Roth 2014; Mader et al. 2014).

1.3.4 Pathogenese des ACS

Patienten mit ACS sind durch eine vermehrte Thrombozytenaktivierung im koronaren Kreislauf gekennzeichnet (Arakawa, Kentaro, et al. 2009; Molero, Laura, et al. 2005; Karow, Lang-Roth 2014; Sadowski, Marcin; Zabczy, Michał; Undas, Anetta 2014). Verschiedene Experimente haben nahegelegt, dass die Interaktion zwischen neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten (Arakawa, Kentaro, et al. 2009; Sadowski, Marcin; Zabczy, Michał; Undas, Anetta 2014) und auch Makrophagen (Sugiyama, Seigo, et al. 2001) sowie Endothelzellen (Sadowski, Marcin; Zabczy, Michał; Undas, Anetta 2014) eine pathophysiologische Bedeutung für das ACS besitzen. Monozyten scheinen an allen Phasen des ACS aktiv beteiligt zu sein und durchlaufen währenddessen phänotypische Veränderungen, die zu ihrer Aktivierung führen (Kashiwagi, Manabu, et al. 2012).

1.3.5 Klinik des Myokardinfarkts

Eine typische Infarktsymptomatik zeigen nur ca. 40 % der betroffenen Patienten (Herold et al. 2015). Das Leitsymptom ist eine intensive, anhaltende Angina pectoris (>20 Minuten) in Form eines schweren, meist retrosternalen Vernichtungsschmerzes (Herold et al. 2015; Karow, Lang-Roth 2014; Böcker et al. 2012; Mader et al. 2014).

Eventuell besteht auch nur ein retrosternales Druckgefühl. 20 % der Myokardinfarkte gehen sogar ohne Schmerzen einher (sogenannte stumme Infarkte), v.a bei älteren Patienten und bei Diabetes mellitus (Herold et al. 2015; Böcker et al. 2012; Mader et al. 2014).

1.3.6 Diagnostik des Myokardinfarkts

Neben einer unspezifischen Erhöhung der Entzündungsparameter findet sich im Labor eine Erhöhung von Troponin I und T, die herzmuskelspezifisch sind und daher die entscheidenden Marker zum Nachweis eines Herzinfarkts darstellen (Herold et al. 2015). Es gilt jedoch zu beachten, dass eine Troponinerhöhung auch bei Herzinsuffizienz, Lungenembolie, hypertensiver Krise, Myokarditis, etc. auftreten kann (Karow, Lang-Roth 2014; Herold et al. 2015).

Innerhalb der ersten 24 Stunden kann der Elektrokardiogramm (EKG)-Befund negativ sein, weshalb zum Ausschluss eines Myokardinfarktes zwei EKGs im Abstand von 24 Stunden durchgeführt werden sollten (Herold et al. 2015).

Als ST-Hebung gilt eine Hebung der ST-Strecke $\geq 0,1$ mV in zwei zusammenhängenden Extremitätenableitungen bzw. $\geq 0,2$ mV in zwei zusammenhängenden Brustwandableitungen oder aber ein neu aufgetretener Linksschenkelblock mit infarkttypischen Symptomen (Herold et al. 2015; Karow, Lang-Roth 2014; Mader et al. 2014).

Goldstandard der Diagnostik stellt die Linksherzkatheteruntersuchung dar (Herold et al. 2015), die die Messung von Drücken und Volumina in den Ventrikeln sowie in den großen Blutgefäßen, die Bestimmung von Herzzeitvolumen und Ejektionsfraktion und die Identifikation von Stenosen und Verschlüssen der Koronararterien erlaubt (Schmidt, Lang, Heckmann 2010; Herold et al. 2015).

1.3.7 Therapie des Myokardinfarkts

Beim akuten Infarkt sind, um schnelle Handlungsbereitschaft zu gewährleisten, Venenzugang, EKG-Überwachung, Defibrillationsbereitschaft und laufende Blutdruck-

und Pulskontrollen von zentraler Bedeutung (Herold et al. 2015; Mader et al. 2014). Außerdem sollten Nitrate verabreicht werden und bei Sättigungsabfall unter 95% eine Sauerstoffgabe erfolgen (Herold et al. 2015; Karow, Lang-Roth 2014; Mader et al. 2014). Bei starken Schmerzen sollten diese mit Morphin i.v. gestillt werden (Herold et al. 2015; Karow, Lang-Roth 2014; Mader et al. 2014).

In der Prähospitalphase sollte darüberhinaus eine antithrombozytäre Therapie eingeleitet werden. Diese sollte aus Heparin und einer dualen Plättchenhemmung bestehen (Herold et al. 2015; Karow, Lang-Roth 2014). Zur dualen Plättchenhemmung wird ASS mit einem Adenosindiphosphat(ADP)-Rezeptorblocker kombiniert. Als ADP-Rezeptorblocker werden Ticagrelor, Prasugrel oder Clopidogrel eingesetzt (Herold et al. 2015; Karow, Lang-Roth 2014; Mega JL, Simon T 2015).

Bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt verbessert die schnellst mögliche Wiederherstellung eines antegraden Flusses in der verschlossenen Koronararterie durch Thrombolyse oder perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA) die linksventrikuläre Ejektionsfraktion und senkt dabei die Mortalität, was gegenwärtig die wirksamste Therapie darstellt (Hillis, L. David; Lange, Richard A. 2006; Ding, Hua-Sheng, et al. 2013; Yellon, Derek M.; Hausenloy, Derek J. 2007; Van Den Akker, F.; De Jager, S. C. A.; Sluijter, J. P. G. 2013; Van der Pouw Kraan, Tineke CTM, et al. 2014; Yang, Jun, et al. 2015; Ogura, Yasuhiro, et al. 2012). Die Therapie der Wahl zur Reperfusion ist die primäre PTCA in Form einer Ballondilatation und/oder Stentimplantation (Böcker et al. 2012; Herold et al. 2015; Karow, Lang-Roth 2014; Schmidt, Lang, Heckmann 2010).

Die PTCA erbringt bei einem Zeitintervall <2 h seit Symptombeginn den größten Nutzen (Herold et al. 2015; Karow, Lang-Roth 2014; Boersma, Eric, et al. 1996) und kann hier die Mortalität signifikant senken (Boersma, Eric, et al. 1996).

Distale Embolisation atherosklerotischen Materials während einer primären PTCA bei STEMI ist eine wichtige Ursache nicht erfolgreicher Reperfusion und kann durch Thrombusaspiration erfolgreich verhindert werden (Kramer, Miranda CA, et al. 2008).

Daneben kann als zweite Wahl, möglichst innerhalb von 30 Minuten nach Erstkontakt, eine Fibrinolyse mit Streptokinase, Alteplase, Reteplase oder Tenecteplase durchgeführt werden (Herold et al. 2015; Karow, Lang-Roth 2014). Abbildung 2 zeigt die Effektivität einer Thrombolyse in Abhängigkeit vom Therapiebeginn.

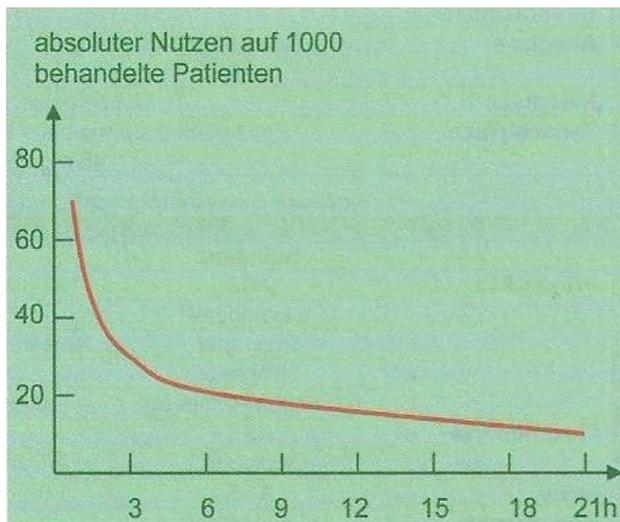


Abbildung 2 Eine Senkung der Sterblichkeit durch Thrombolyse ist nur bei einem Zeitintervall von 12 Stunden gegeben (Karow, Lang-Roth 2014).

Die Restenose bleibt ein kritischer Faktor bei der langfristigen Wirksamkeit der PTCA. Sie ist häufig durch Neointimabildung und die Bildung extrazellulärer Matrix gekennzeichnet (Karper, Jacco C., et al. 2013). Medikamenten beschichtete Stents senken dabei im Vergleich zu unbeschichteten die Rate der Restenose (Mauri, Laura, et al. 2014).

Zur Prophylaxe einer koronaren Rethrombose wird ASS lebenslang und der ADP-Rezeptorblocker über 12 Monate eingenommen (Herold et al. 2015; Karow, Lang-Roth 2014; Mauri, Laura, et al. 2014).

Zu den Medikamenten, die bei Postinfarktpatienten die Prognose verbessern, gehören auch Betablocker ohne intrinsische Aktivität, z.B. Metoprolol (Herold et al. 2015; Karow, Lang-Roth 2014; Hillis, L. David; Lange Richard A. 2006).

Für alle Patienten wird zudem eine medikamentöse Cholesterinsenkung empfohlen (Herold et al. 2015; Karow, Lang-Roth 2014). ACE-Hemmer können ungünstige strukturelle Umbauvorgänge im Anschluss an einen Myokardinfarkt erfolgreich vermindern (Herold et al. 2015; Karow, Lang-Roth 2014).

Da die myokardiale Reperfusionsschädigung durch die inflammatorisch induzierte Apoptose von Kardiomyozyten vermittelt wird, könnten antiapoptotische und antiinflammatorische Medikamente die Größe eines Myokardinfarktes wirksam senken

(Yellon, Derek M.; Hausenloy, Derek J. 2007; Yang, Jun, et al. 2015; Van Den Akker, F.; De Jager, S. C. A.; Sluijter, J. P. G. 2013).

In den letzten Jahren haben sich viele Studien mit der Stammzelltransplantation als neue Behandlungsstrategie zur myokardialen Reparatur nach Infarkt befasst (Zakharova, Liudmila, et al. 2015; Li, Yongjun, et al. 2013; Cagavi, Esra, et al. 2014; Van Den Akker, F.; De Jager, S. C. A.; Sluijter, J. P. G. 2013; Chang, Sung-A., et al. 2008; Li, Ning; Pasha, Zeeshan; Ashraf, Muhammad 2014; Wang, Yabin, et al. 2014; Behfar, Atta, et al. 2002; Pallotta, Isabella, et al. 2015; Wang, Mei, et al. 2015; Ghadge, Santhosh K., et al. 2011; Takahashi, Masafumi 2010), sind jedoch auf einige Schwierigkeiten gestoßen (Li, Yongjun, et al. 2013; Behfar, Atta, et al. 2002; Pallotta, Isabella, et al. 2015; Wang, Yabin, et al. 2014). So überleben schätzungsweise weniger als 10 % der Stammzellen, die ins Herz implantiert werden (Wang, Yabin, et al. 2014; Cross, Daisy P.; Wang, Chun 2011; Pallotta, Isabella, et al. 2015; Suzuki, Gen, et al. 2011).

1.3.8 Komplikationen des Myokardinfarkts

In 95-100% der Fälle kommt es zu Herzrhythmusstörungen (Herold et al. 2015; Böcker et al. 2012). Kammerflimmern ist hierbei für 80% der plötzlichen Todesfälle bei Myokardinfarkt verantwortlich (Herold et al. 2015).

Die Anpassungsvorgänge nach Myokardinfarkt münden entweder in einen hämodynamisch günstigen Zustand (Karow, Lang-Roth 2014) oder führen durch den Abbau der Matrix, die Apoptose von Kardiomyozyten und der Bildung avaskulären Narbengewebes zu einer Wandverdickung und zu einem dilatativen Umbau (Karow, Lang-Roth 2014; Purcell, Brendan P., et al. 2012; Uematsu, Manabu, et al. 2015; Zakharova, Liudmila, et al. 2015). Dies beeinträchtigt letztlich die kardiale Kontraktionskraft und führt auf diese Weise zu ventrikulären Arrhythmien, Herzversagen und erhöhter Mortalität (Purcell, Brendan P., et al. 2012; Uematsu, Manabu, et al. 2015; Zakharova, Liudmila, et al. 2015).

1.3.9 Pathophysiologische Vorgänge bei Myokardinfarkt

20-30 Minuten nach einer kompletten Obstruktion einer Koronararterie sind die endogenen Protektionsmechanismen des Herzmuskels erschöpft und es kommt zum irreversiblen Untergang von Kardiomyozyten. Es kommt zur Akkumulation toxischer Metabolite, die eine zelluläre Nekrose im ischämischen Gebiet auslöst und sich klinisch

in Form eines Herzinfarkts manifestiert (Schmidt, Lang, Heckmann 2010; Vogel, Benjamin, et al. 2015; Böcker et al. 2012; Sanders, Lehanna N., et al. 2016).

Inflammation spielt eine Schlüsselrolle im ACS (Ferrante, Giuseppe, et al. 2010; Molero, Laura, et al. 2005) und scheint eine der Hauptursachen für endotheliale Dysfunktion zu sein (Molero, Laura, et al. 2005).

Die unkontrollierte Freisetzung von Zellbestandteilen aus dem Kern und dem Zytoplasma induziert endotheliale Adhäsionsproteine, Zytokine und Chemokine, die eine Kaskade der Inflammation und Reparatur auslösen. Nach 6-24 Stunden kommt es zum Einwandern von Entzündungszellen, v.a. neutrophiler Granulozyten und Monozyten aus dem hyperämischen Randsaum in die Myokardnekrose (Vogel, Benjamin, et al. 2015; Sanders, Lehanna N., et al. 2016; Böcker et al. 2012; Yellon, Derek M.; Hausenloy, Derek J. 2007; Pallotta, Isabella, et al. 2015). Die infiltrierenden Monozyten differenzieren sich dann zu proinflammatorischen Makrophagen, die tote Zellen und Matrixüberreste phagozytieren und Proteasen freisetzen, die die extrazelluläre Matrix abbauen (Pallotta, Isabella, et al. 2015; Vogel, Benjamin, et al. 2015; Sanders, Lehanna N., et al. 2016; Böcker et al. 2012).

Ab dem 3.-7. Tag bildet sich im Rahmen einer proliferativen und Reifungsphase Granulationsgewebe (Böcker et al. 2012; Sanders, Lehanna N., et al. 2016; Pallotta, Isabella, et al. 2015), das aus proliferierenden Zellen, v.a. Endothelzellen, die neue Kapillaren bilden, und Myofibroblasten, die Kollagen und andere Matrixproteine freisetzen, besteht (Sanders, Lehanna N., et al. 2016; Pallotta, Isabella, et al. 2015; Böcker et al. 2012). Innerhalb von sechs Wochen reift der Infarkt zu einer dichten Narbe (Sanders, Lehanna N., et al. 2016; Böcker et al. 2012; Van Den Akker, F.; De Jager, S. C. A.; Sluijter, J. P. G. 2013; Li, Yongjun, et al. 2013).

Die Reperfusion nach Ischämie stellt die Gewebeoxygenierung wieder her, kann jedoch selbst zu zusätzlicher Apoptose von Kardiomyozyten, einem größeren Infarktgebiet und einem inflammatorischen Prozess führen, was als myokardiale Ischämie-Reperfusionsschädigung bezeichnet wird (Ding, Hua-Sheng, et al. 2013; Yellon, Derek M.; Hausenloy, Derek J. 2007; Van der Pouw Kraan, Tineke CTM, et al. 2014; Yang, Jun, et al. 2015; Chen, Jiqui, et al. 2010; Xie, Min, et al. 2014; Ogura, Yasuhiro, et al. 2012; Van Den Akker, F.; De Jager, S. C. A.; Sluijter, J. P. G. 2013; Stellos, Konstantinos, et al. 2008a). Die Reperfusion zieht die koordinierte Aktivierung einer

Zytokinkaskade, den Einstrom inflammatorischer Zellen und die Aktivierung neutrophiler Granulozyten nach sich, die vermutlich für den weiteren Schaden verantwortlich sind, indem sie eine Reihe von Enzymen und anderen Faktoren freisetzen (Chen, Jiqui, et al. 2010; Uematsu, Manabu, et al. 2015; Ogura, Yasuhiro, et al. 2012; Biasucci, Luigi M., et al. 1996). Makrophagen sind dabei eine der Hauptzellen, die während myokardialer Ischämie und Reperfusion proinflammatorische Zytokine ausschütten (Ogura, Yasuhiro, et al. 2012) und sind essenziell für die Heilung nach Myokardinfarkt (Van Den Akker, F.; De Jager, S. C. A.; Sluijter, J. P. G. 2013; Vogel, Benjamin, et al. 2015).

Deshalb liegt das Interesse u.a auf der Phase der Reperfusion als mögliches Ziel der Kardioprotektion, um das Risiko des Herzversagens nach Myokardinfarkt zu senken (Yellon, Derek M.; Hausenloy, Derek J. 2007; Ogura, Yasuhiro, et al. 2012).

Obwohl dieser inflammatorische Effekt nach Myokardinfarkt schon jahrzehntelang bekannt ist, sind bislang keine Behandlungsoptionen verfügbar, die diese inflammatorische Antwort wirksam kontrollieren (Van Den Akker, F.; De Jager, S. C. A.; Sluijter, J. P. G. 2013; Xie, Min, et al. 2014).

1.3.10 Prognose des Myokardinfarkts

Die Prognose des Myokardinfarkts ist weiterhin nicht allzu gut. 30-40% der Patienten versterben bereits am ersten Postinfarkttag (Herold et al. 2015; Böcker et al. 2012).

Ventrikuläre Arrhythmien stellen die Haupttodesursache bei Myokardinfarkt dar (Mollenhauer, Martin, et al. 2017).

Insgesamt beträgt so die Letalität in den ersten 4 Wochen nach Myokardinfarkt etwa 50%. Die Gefahr tödlicher Arrhythmien ist unmittelbar nach Infarkt am größten, sodass das Überleben entscheidend von der schnellen Verfügbarkeit einer effektiven Therapie abhängt (Herold et al. 2015). Auch eine geringe systolische Funktion beeinflusst die Prognose negativ (Xie, Min, et al. 2014; Herold et al. 2015).

1.4 ADP-Rezeptorblocker

Durch Inhibition der P2Y₁₂-Rezeptoren kann eine Hemmung der ADP-abhängigen Thrombozytenaktivierung erreicht werden (Karow, Lang-Roth 2014; Mega JL, Simon T 2015; Wallentin, Lars, et al. 2009). Tabelle 1 stellt die Unterschiede der drei großen ADP-Rezeptorblocker gegenüber.

Tabelle 1 (Karow, Lang-Roth 2014; Mega JL, Simon T 2015)

Freiname	Clopidogrel	Prasugrel	Ticagrelor
Handelsname	Iscover®, Plavix®	Efient®	Brilique®
Wirkstoffklasse	Thienopyridin	Thienopyridin	Cyclopentyltriazolopyrimidin
Effekt	irreversibel	irreversibel	reversibel
Aktivierung	Prodrug, limitiert durch Metabolisierung	Prodrug, <u>nicht</u> limitiert durch Metabolisierung	aktive Substanz
Wirkbeginn (50% Hemmung der Plättchenaggregation)	2-4 h	30 min	30 min
Wirkdauer	3-10 Tage	5-10 Tage	3-4 Tage
Interaktion mit dem Permeabilitäts-Glykoproteintransporter (P-gp)	Ja	Nein	Ja (schwacher Inhibitor)

Während Clopidogrel und Prasugrel irreversible Hemmer der P2Y₁₂-Rezeptoren darstellen, bewirkt Ticagrelor eine reversible Hemmung (Karow, Lang-Roth 2014; Mega JL, Simon T 2015; Husted, Steen, et al. 2010), weshalb die Wirkung bei Ticagrelor schneller nachlässt als bei den Thienopyridinen. Ein weiterer Unterschied besteht in der Tatsache, dass es sich bei Clopidogrel und Prasugrel um Prodrugs handelt, die erst mittels Biotransformation aktiviert werden müssen, während Ticagrelor bereits die aktive Substanz verkörpert (Mega JL, Simon T, 2015; Mega, JL, et al. 2009; Karow, Lang-Roth 2014; Wallentin, Lars, et al. 2009). Prasugrel und Ticagrelor zeichnen sich darüber hinaus durch einen rascheren Wirkbeginn aus (Karow, Lang-Roth 2014; Mega JL, Simon T 2015). Prasugrel und Ticagrelor weisen dabei weniger Variabilität zwischen verschiedenen Patienten auf als Clopidogrel. Viele Studien haben die Beziehung zwischen Trägern einer CYP2C19 Loss-of-function-Allelen und einem

höheren Risiko großer kardiovaskulärer Ereignisse bei Patienten, die aufgrund eines ACS oder einer Stentimplantation mit Clopidogrel behandelt wurden, betont. Nach der Resorption werden 85 % des Clopidogrels durch Esterasen in eine inaktive Carbonsäure hydrolysiert (Mega JL, Simon T 2015). Die verbliebenen 15 % des Clopidogrels durchlaufen einen zweischrittigen Oxidationsprozess zu seinem aktiven Metaboliten, einem Thiolderivat (Karow, Lang-Roth 2014; Mega JL, Simon T 2015). Der transiente aktive Thiolmetabolit bindet spezifisch und irreversibel an den P2Y₁₂ Rezeptor.

Im Gegensatz dazu wird Prasugrel nach schneller und ausgeprägter Resorption durch intestinale Carboxylesterasen zu einem Thiolactonzwischenmetaboliten hydrolysiert (Mega JL, Simon T 2015), der in einer einschrittigen Oxidation zum aktiven Metaboliten umgewandelt wird (Kazui, Miho, et al. 2010; Mega JL, Simon T 2015; Karow, Lang-Roth 2014), dessen maximale Plasmakonzentration bereits nach 30 Minuten erreicht wird (Karow, Lang-Roth 2014).

Die aktiven Metaboliten von Clopidogrel und Prasugrel sind äquipotent. Die schnellere und besser vorhersehbare Wirkung von Prasugrel rührt hauptsächlich von einer stärkeren Resorption und höheren Bioverfügbarkeit des aktiven Metaboliten (Mega JL, Simon T 2015).

Ticagrelor ist das erste orale Cyclopentyltriazolopyrimidin, das den P2Y₁₂-Rezeptor inhibiert und für eine geringe interindividuelle Variabilität der antithrombozytären Wirkung sorgt (Mega JL, Simon T 2015; Wallentin, Lars, et al. 2009). Anders als die Thienopyridine bindet Ticagrelor nicht an die ADP-Bindungsstelle, sondern an eine separate Stelle und blockiert so den G-Protein gekoppelten Signalweg (Mega JL, Simon T 2015).

Da der Metabolismus von Ticagrelor durch CYP3A4 und CYP3A5 vermittelt wird, sollte die Komedikation von Ticagrelor mit potenten CYP3A4-Inhibitoren und – induktoren vermieden werden (Mega JL, Simon T 2015; Karow, Lang-Roth 2014). Daneben ist Ticagrelor auch ein Substrat und schwacher Inhibitor des Permeabilitätsglykoproteins (P-gp), weshalb bei Veränderungen in der Ticagrelortherapie bei P-gp-Substraten mit engem therapeutischem Fenster, wie Digoxin, Plasmaspiegelkontrollen durchgeführt werden sollten (Mega JL, Simon T 2015).

Als Nebenwirkung treten insbesondere Blutungen auf. Diese Blutungsneigung kann

durch Kombination mit Antikoagulantien noch verstärkt werden (Karow, Lang-Roth 2014).

1.5 Bone morphogenetic proteins (BMP)

BMPs gehören zur evolutionär konservierten transforming growth factor β (TGF β) Superfamilie sekretierender Liganden, die für zahlreiche Entwicklungsprozesse benötigt werden und eine zentrale Rolle in der Regulation des Zellmusters, der Differenzierung, Proliferation und Apoptose in der Embryogenese spielen (Sanders, Lehanna N., et al. 2016; Li, Ning; Pasha, Zeeshan; Ashraf, Muhammad 2014; DeGeorge Jr, Brent R., et al. 2008; Behfar, Atta, et al. 2002; Wu, Xueping, et al. 2014; Cagavi, Esra, et al. 2014; Pachori, Alok S., et al. 2010).

Die BMP Signalwege werden durch kombinierte Aktivierung von Typ I und Typ II Serin-/Threoninkinasezeptoren vermittelt. BMPs binden an Typ I und Typ II Rezeptoren als Dimer, was zur Phosphorylierung und Aktivierung des Typ I Rezeptors durch seinen Typ II Partner führt. Die aktivierten Typ I Rezeptoren phosphorylieren wiederum Smad1/5/8, welche mit Smad4 einen heterooligomeren Komplex bilden. Als Reaktion auf BMPs wandern Smads in den Kern und aktivieren die Transkription bestimmter Gene. Smads sind intrazelluläre Signalmoleküle, die intrazelluläre Signalwege der TGF β Superfamilie vermitteln (Sanders, Lehanna N., et al. 2016; Yuan, Shi-Min; Jing, Hua. 2010; Wu, Xueping, et al. 2014; Pallotta, Isabella, et al. 2015; Merino, David, et al. 2016). Abbildung 3 zeigt die Wirkungsweise der BMP-Rezeptoren.

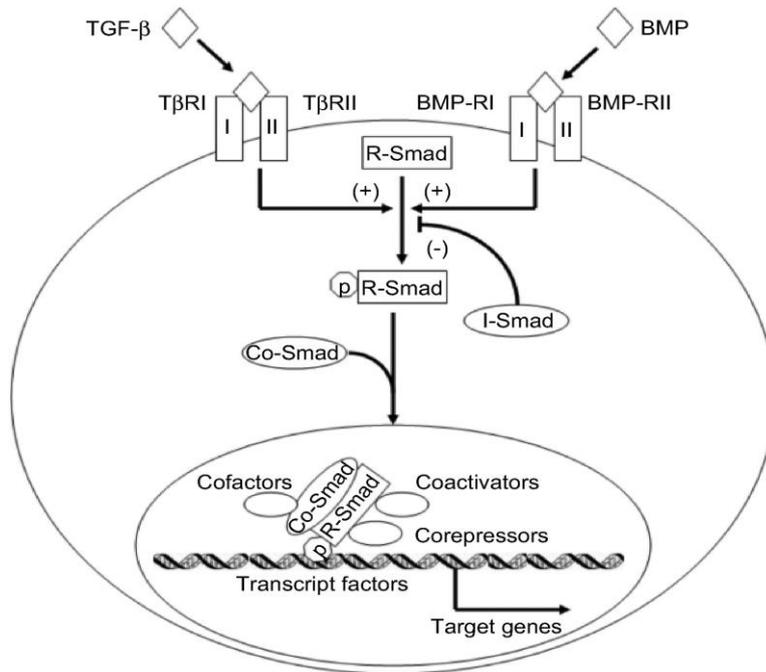


Abbildung 3 Die kombinierte Aktivierung von Typ I und II Rezeptoren führt zur Phosphorylierung der Smads, die im Kern die Expression bestimmter Gene vermitteln (Yuan, Shi-Min; Jing, Hua 2010).

Außerdem wirken die BMPs auch über Wnt Signalwege und die Aktivierung der mitogen aktivierten Proteinkinase (MAPK) (Yuan, Shi-Min; Jing, Hua. 2010).

BMP Signalwege werden im extrazellulären Raum durch eine große Zahl Antagonisten moduliert, wie Noggin (Sanders, Lehanna N., et al. 2016; Behfar, Atta, et al. 2002; Poggio, Paolo, et al. 2013; Pachori, Alok S., et al. 2010), Dorsomorphin (Pachori, Alok S., et al. 2010) und Chordin. Gremlin 2 hemmt *in vitro* BMP2 und BMP4 und kann auf diese Weise die inflammatorische Antwort modulieren (Sanders, Lehanna N., et al. 2016). Follistatin-Like 1 (FSTL1) bindet an BMP4, antagonisiert so seine Wirkung und vermindert dadurch die Schädigung durch Hypoxie und Reperfusion (Ogura, Yasuhiro, et al. 2012). Auch ATP binding cassette subfamily C member 6 (Abcc6) übt vermutlich über die Hemmung der BMP4 und BMP9 Signalwege einen kardioprotektiven Effekt aus (Mungrue, Imran N., et al. 2011).

BMPs spielen außerdem eine wichtige Rolle im Laufe verschiedener Stadien der kardialen Entwicklung (Sanders, Lehanna N., et al. 2016; Li, Ning; Pasha, Zeeshan; Ashraf, Muhammad 2014; DeGeorge Jr, Brent R., et al. 2008; Yuan, Shi-Min; Jing, Hua. 2010; Behfar, Atta, et al. 2002; Cagavi, Esra, et al. 2014; Wu, Xueping, et al. 2014;

Pallotta, Isabella, et al. 2015; Pachori, Alok S., et al. 2010; Xu, Xingbo, et al. 2015a; Merino, David, et al. 2016), darunter die Entwicklung des Endokardkissens (Sanders, Lehanna N., et al. 2016; Wu, Xueping, et al. 2014; Pachori, Alok S., et al. 2010), die frühe, kardiogene Differenzierung des Mesoderms (Sanders, Lehanna N., et al. 2016; Pallotta, Isabella, et al. 2015) sowie die embryonalen myokardiale Differenzierung (Sanders, Lehanna N., et al. 2016; Cagavi, Esra, et al. 2014; Wu, Xueping, et al. 2014). BMP4 fördert die myokardiale Proliferation in der Embryogenese und wird in den entsprechenden Entwicklungsstufen der Herzmuskelentwicklung exprimiert (Pachori, Alok S., et al. 2010; Cagavi, Esra, et al. 2014). BMP4 reguliert beispielsweise die Apoptose und Proliferation der mesenchymalen und myokardialen Gewebe im sich entwickelnden Ausflusstrakt (Pachori, Alok S., et al. 2010).

BMP2 ist ein pro-Überlebens- und damit antiapoptotischer Faktor (DeGeorge Jr, Brent R., et al. 2008; Li, Ning; Pasha, Zeeshan; Ashraf, Muhammad 2014; Yuan, Shi-Min; Jing, Hua. 2010) und beeinflusst über vascular endothelial growth factor (VEGF) Signalwege den Prozess der Angiogenese (Li, Ning; Pasha, Zeeshan; Ashraf, Muhammad 2014). *In vitro* stimuliert BMP2 die Proliferation humaner Aortenendothelzellen (Li, Ning; Pasha, Zeeshan; Ashraf, Muhammad 2014). BMP2 kann zudem die Kontraktilität von Kardiomyozyten steigern (Pallotta, Isabella, et al. 2015).

BMP2 induziert die Expression rein kardialer Transkriptionsfaktoren für die Differenzierung sowohl embryonaler als auch adulter Stammzellen und verstärkt auf diese Weise deren kardiale Differenzierung (Behfar, Atta, et al. 2002; Chang, Sung-A., et al. 2008; DeGeorge Jr, Brent R., et al. 2008). BMP2 lässt sich somit als Induktor des kardialen Genprogramms bezeichnen (Behfar, Atta, et al. 2002).

Die Expression potenter proosteogener Faktoren, darunter BMP2, -4 und -7, durch die interstitiellen Aortenklappenzellen vermittelt außerdem die Initiierung und Progression der pathologischen Aortenklappenkalzifizierung (Poggio, Paolo, et al. 2013; Song, Rui, et al. 2015).

BMP4 fördert die Bildung vaskulärer Netzwerke und induziert activin receptor-like kinase (ALK)1, der wiederum durch BMP9 aktiviert wird. Die Aktivierung von ALK1 stellt ein zentrales Element der Angiogenese und Endothelzelldifferenzierung dar (Jumabay, Medet, et al. 2012).

BMP4 besitzt sowohl proinflammatorische (Ogura, Yasuhiro, et al. 2012) als auch proapoptotische Wirkungen (Ogura, Yasuhiro, et al. 2012; Mungrue, Imran N., et al. 2011; Pachori, Alok S., et al. 2010). BMP4 kann auch die Apoptose bei myokardialen Umbauvorgängen fördern. Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass die eng verwandten Liganden BMP2 und BMP4 eine Hochregulation von Signalwegen des oxidativen Stresses und der inflammatorischen Antwort in Endothelzellen verursachen können, was eine Bedeutung für die Inflammation bei Atherosklerose nahelegt (Pachori, Alok S., et al. 2010).

BMP7 übt seine kardioprotektiven Effekte möglicherweise über die Steuerung der Sekretion antiinflammatorischer Zytokine aus. Zudem fördert BMP7 die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen und hemmt die Tumornekrosefaktor α (TNF α) induzierte Apoptose von Kardiomyozyten durch Hochregulation von Interleukin(IL)-10.

Urbina P und Singla DK fanden heraus, dass BMP7 durch die Förderung der Differenzierung von Monozyten zu M2 Makrophagen und der Sekretion antiinflammatorischer Mediatoren ungünstige Umbauvorgänge bei prädiabetischer Kardiomyopathie abschwächt.

So führte eine BMP7 Behandlung zu einer abgeschwächten Apoptose der Kardiomyozyten, einer verminderten Fibrose und zu einer verbesserten kardialen Funktion (Urbina, Princess; Singla, Dinender 2014).

BMP7 wirkt dem fibrogenetischen Effekt des TGF β 1 aus Makrophagen entgegen (Wang, Mei, et al. 2015; Xu, Xingbo, et al., 2015a; Xu, Xingbo, et al. 2015b; Merino, David, et al. 2016) durch das Zusammenspiel von durch SMAD Proteine vermittelten, intrazellulären Signalwegen.

Schließlich konnten auch Hinweise geliefert werden, dass die Zugabe von exogenem rekombinanten BMP7, das bereits zur systemischen Gabe bei komplizierten Frakturen eingesetzt wird, die Umwandlung endothelialer zu mesenchymaler Strukturen und die experimentelle endokardiale Fibroelastose in Ratten effektiv verbessert (Xu, Xingbo, et al. 2015a).

In humanen koronaren Endothelzellen führt TGF β 1 zu einer abnormen Methylierung der RAS Protein Activator Like 1 (RASAL1) Promotoren, vermehrter endothelialer zu mesenchymaler Transition und damit vermehrter Fibrose. Im Mausmodell konnte

BMP7 über eine erhöhte RASAL1 Expression die Marker der endothelialen zu mesenchymalen Transition sowie die kardiale Fibrose senken (Xu, Xingbo, et al. 2015b).

Dies könnte eine neue Behandlungsstrategie der kardialen Fibrose darstellen (Xu, Xingbo, et al. 2015a; Xu, Xingbo, et al. 2015b).

Die Aortenstenose führt zu ungünstigen linksventrikulären Umbauvorgängen in Form von konzentrischer Hypertrophie und interstitieller und perivaskulärer Fibrose, die auf ein Ungleichgewicht zwischen den TGF β 1- und den BMP7-Signalwegen zurückzuführen sind. BMP7 senkt die TGF β induzierte Hypertrophie und schützt vor ungünstigen linksventrikulären Umbauvorgängen und sorgt so für einen besseren Erhalt der linksventrikulären Ejektionsfraktion (Merino, David, et al. 2016).

1.6 Histon H3

Histone kommen in Eukaryoten ubiquitär vor (Thatcher, Thomas H.; Gorovsky, Martin A. 1994; Vogel, Benjamin, et al. 2015) und spielen eine wichtige Rolle in der Struktur und Funktion des Chromatins und damit der DNA Replikation und Transkription (Thatcher, Thomas H.; Gorovsky, Martin A. 1994).

Das Nukleosom besteht aus DNA, die um ein Histonoktamer gewickelt ist, das aus je zwei H2A, H2B, H3 und H4 besteht (Thatcher, Thomas H.; Gorovsky, Martin A. 1994; Vogel, Benjamin, et al. 2015). H2A und H2B bilden ein Dimer und H3 und H4 ein weiteres (Thatcher, Thomas H.; Gorovsky, Martin A. 1994).

Aktuelle Studien zeigen die Beteiligung epigenetischer Mechanismen, wie Histonmodifikationen, an der Pathophysiologie zahlreicher Erkrankungen, wie Schlaganfall, myokardiale Ischämie und Reperfusion, Thrombose und Sepsis (Vogel, Benjamin, et al. 2015; Schiano, Concetta, et al. 2015). Histonmodifikationen spielen eine Rolle bei der Reaktion von Endothelzellen auf Hypoxie und Scherstress, bei der Angiogenese und in der endogenen Erholung nach Myokardinfarkt (Schiano, Concetta, et al. 2015).

Histonproteine werden z.B. durch reversible Acetylierung von ϵ -Aminogruppen von Lysinresten reguliert, was zu einer offenen Chromatinstruktur führt und auf diese Weise transkriptionalen Aktivatoren Zugang zur DNA gewährt, während die Deacetylierung eine Schwächung der Genexpression hervorruft (Thatcher, Thomas H.; Gorovsky,

Martin A. 1994; Xie, Min, et al. 2014; Zakharova, Liudmila, et al. 2015; Schiano, Concetta, et al. 2015).

Die Histonacetylierung wird durch Histonacetyltransferasen katalysiert (Schiano, Concetta, et al. 2015; Xie, Min, et al. 2014), die Histondeacetylierung durch Histondeacetylasen (Schiano, Concetta, et al. 2015; Xie, Min, et al. 2014; Zakharova, Liudmila, et al. 2015). Analog dazu wird die Histonmethylierung durch Histonmethyltransferasen reguliert (Schiano, Concetta, et al. 2015).

Histondeacetylasen regulieren ein breites Spektrum zellulärer Mechanismen (Zakharova, Liudmila, et al. 2015; Xie, Min, et al. 2014).

So stimuliert die Hemmung der Histondeacetylasen in embryonalen Stammzellen durch Trichostatin-A die Myogenese und angiogenetische Signalwege (Schiano, Concetta, et al. 2015). Ein weiterer Histondeacetylaseinhibitor ist z.B. Mocetinostat, der über die Acetylierung von Histon H3 für die Hochregulation der Expression von kardialen und Stammzellgenen sorgen kann (Zakharova, Liudmila, et al. 2015).

Das am besten charakterisierte, endotheliale Gen, das kardiovaskulär eine Rolle spielt und durch Histonmodifikation reguliert wird, ist NOS3, das für die endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS) kodiert. Die eNOS wird in vaskulären Endothelzellen reichlich exprimiert, während sie in vaskulären glatten Muskelzellen durch zellspezifische Unterschiede der Histonmodifikationen transkriptionell unterdrückt wird.

Tatsächlich führt die Inkubation von Zellen mit sowohl Simvastatin als auch Fluvastatin zur Blockade von oxLDL bedingten Histonmodifikationen, was zur Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen beiträgt (Schiano, Concetta, et al. 2015).

Die Histonmethylierung könnte bei der Apoptose von Makrophagen bei der Bildung instabiler Plaques eine Rolle spielen. Es zeigte sich, dass in fortgeschrittenen atherosklerotischen Plaques eine veränderte Methylierung in H3K4 und H3K9 beobachtet werden kann (Cong, Guangzhi, et al. 2017).

Phosphoryliertes Histon 3 ist ein etablierter Marker für den mitotischen Index der Kardiomyozyten (Li, Yongjun, et al. 2013; Sur, Swastika, et al. 2016; Bai, Chen-Guang, et al. 2008).

Histone und damit das Chromatin sind extrem zytotoxisch, wenn sie aus sterbenden Zellen freigesetzt werden (Vogel, Benjamin, et al. 2015). Zirkulierende, extrazelluläre

Histone im Plasma konnten bei Patienten mit septischem Schock detektiert werden und tragen zu endothelialer Dysfunktion, kardialer Dysfunktion, Organversagen und Tod bei (Kalbitz, Miriam, et al. 2015).

Die Histone H2A/B, H3 und H4 führten dosisabhängig zum Zelltod ventrikulärer Myozyten neugeborener Ratten. Die positiv geladenen Histone verursachen die direkte Schädigung der Zellmembran durch elektrostatische Wechselwirkung mit negativ geladenen Phospholipiden (Vogel, Benjamin, et al. 2015).

Darüber hinaus beeinträchtigten Histone in Mäuseherzen die linksventrikulären Drücke und lösten Sinusbradykardie oder linksventrikulären Bigeminus aus. Außerdem führten hohe Histonkonzentrationen zu einer Bindung von Annexin V an Kardiomyozyten, was einen Prädiktor für Apoptose darstellt (Kalbitz, Miriam, et al. 2015).

1.7 Toll-like Rezeptor 4 (TLR4)

TLR4 ist ein Mitglied der pattern recognition Rezeptor Familie (Tapp, L. D., et al. 2013; Karper, Jacco C., et al. 2013; Avlas, Orna, et al. 2016).

TLR4 besitzt zahlreiche Liganden, darunter Hitzeschockproteine, Fibronectin, exogene Lipopolysaccharide (LPS), high mobility group box 1 (HMGB1), reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und trans-Fettsäuren (Tapp, L. D., et al. 2013; Kashiwagi, Manabu, et al. 2012; Bastiaansen, Antonius JNM, et al. 2014; Karper, Jacco C., et al. 2013; Avlas, Orna, et al. 2016; Kondo, Kensuke, et al. 2015; Van der Pouw Kraan, Tineke CTM, et al. 2014). Das TLR4-Gen befindet sich auf Chromosom 9 und besteht aus vier Exons und drei Introns, während andere Quellen von nur drei Exons berichten (Džumhur, Andrea, et al. 2012; Yin, Yan-Wei, et al. 2014).

Er spielt mittels bakteriellen, endotoxininduzierten, inflammatorischen Antworten eine Schlüsselrolle im Prozess der angeborenen Immunantwort (Kashiwagi, Manabu, et al. 2012; Tapp, L.D., et al. 2013; Yin, Yan-Wei, et al. 2014; Van der Pouw Kraan, Tineke CTM, et al. 2014; Bastiaansen, Antonius JNM, et al. 2014; Karper, Jacco C., et al. 2013; Avlas, Orna, et al. 2016; Wang, Xian-tao, et al. 2017). Die Aktivierung von TLR4 führt zu einem MyD88-abhängigen NF κ B-Signalweg, der zu inflammatorischer Gentranskription und zur Freisetzung inflammatorischer Zytokine, darunter das proatherogene TNF α und IL-17, sowie Matrix abbauender Metalloproteasen führt (Bastiaansen, Antonius JNM, et al. 2014; Ding, Hua-Sheng, et al. 2013; Schioppa,

Alexandru; Cotoi, Ovidiu S. 2013; Van der Pouw Kraan, Tineke CTM, et al. 2014; Yin, Yan-Wei, et al. 2014; Kondo, Kensuke, et al. 2015). Als ein proinflammatorischer Mediator reguliert HMGB1 nach Bindung an TLR Adhäsionsmoleküle, Zytokine und Chemokine herauf (Bastiaansen, Antonius JNM, et al. 2014). TLR4 spielt so eine Schlüsselrolle bei der Aktivierung inflammatorischer Signalwege bei ACS (Yin, Yan-Wei, et al. 2014; Kashiwagi, Manabu, et al. 2012).

Die Thrombozytenaktivierung wird gefolgt von einer HMGB1/TLR4 abhängigen Herunterregulation des Hepatozytenwachstumsfaktorrezeptors MET auf mesenchymalen Stammzellen und inhibiert so die zelltodabhängige Migrationsantwort mesenchymaler Stammzellen (Vogel, Sebastian, et al. 2014).

TLR4 spielt aber auch bei der Pathogenese der Atherosklerose eine Rolle und wird bei Myokardinfarkt hochreguliert (Džumhur, Andrea, et al. 2012; Kashiwagi, Manabu, et al. 2012; Tapp, L. D., et al. 2013; Yin, Yan-Wei, et al. 2014; Alexandru; Cotoi, Ovidiu S. 2013). TLR4 wird in atherosklerotischen Plaques aus Koronararterien im Vergleich zur gesunden Gefäßwand vermehrt exprimiert (Yin, Yan-Wei, et al. 2014; Džumhur, Andrea, et al. 2012; Kashiwagi, Manabu, et al. 2012).

Akzessorische Moleküle spielen eine Schlüsselrolle für die Signalwirkung der Tolllikerezeptoren, wie z.B. das radioaktive 105 kDa Protein (Rp105), das einen spezifischen, negativen Regulator der TLR4 Signalwege darstellt und so die TLR4 vermittelte inflammatorische Antwort hemmt (Yang, Jun, et al. 2015; Bastiaansen, Antonius JNM, et al. 2014; Karper, Jacco C., et al. 2013). RP 105 besitzt zudem antiapoptotische Eigenschaften (Yang, Jun, et al. 2015).

TLR4 löst über verschiedene TLR4-abhängige Signalwege Apoptosekaskaden aus, darunter die HMGB1-TLR4-Achse (Ding, Hua-Sheng, et al. 2013), der NFκB-Signalweg (Wang, Xian-tao, et al. 2017) und MAPK abhängige Signalwege (Yang, Jun, et al. 2015). Apoptose wird von Zytokinen wie TNF α und IL-6 reguliert, die durch TLR4 und seine Signalwege, darunter c-Jun N-terminale Kinasen, p38Kinasen und der NFκB-Signalweg während der myokardialen Ischämie-Reperfusionsschädigung, verstärkt werden können (Ding, Hua-Sheng, et al. 2013; Yang, Jun, et al. 2015).

Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung von HMGB1 aus Thrombozyten an TLR4 zur Entwicklung proinflammatorischer Wirkungen mesenchymaler Stammzellen führt mit erhöhter Produktion proinflammatorischer Mediatoren und auf diese Weise der

durch mesenchymale Stammzellen vermittelten Kardioprotektion entgegenwirkt (Vogel, Sebastian, et al. 2014).

S100A8 und S100A9 sind endogene Liganden für TLR4 und korrelieren mit dem Ausmaß der koronaren Atherosklerose. In der Gefäßwand triggert die S100A8/A9-Bindung an TLR4 die Aktivierung von Phagozyten und die Sekretion inflammatorischer Zytokine, was wiederum die Phagozytenrekrutierung verstärkt und zu beschleunigter Atherogenese führt (Schiopu, Alexandru; Cotoi, Ovidiu S. 2013).

Monozyten sind Schlüsselregulatoren der Arteriogenese und werden durch die Bindung endogener Liganden an TLR4 aktiviert, was zur Freisetzung proarteriogener Mediatoren führt (Kashiwagi, Manabu, et al. 2012; Bastiaansen, Antonius JNM, et al. 2014).

Der exogene TLR4 Ligand Lipopolysaccharid stimuliert die Kollateralenbildung, indem er die Rekrutierung der Monozyten an die entsprechenden Stellen verstärkt (Karper, Jacco C., et al. 2013; Bastiaansen, Antonius JNM, et al. 2014).

Die durch die Bindung von LPS an TLR4 entstehende, inflammatorische Reaktion löst die Neointimabildung aus und beschleunigt damit die Atherogenese (Karper, Jacco C., et al. 2013).

1.8 Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)

Bei stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (CXCL12) handelt es sich um ein CXC Chemokin, das über die Bindung an CXCR4 die Hochregulation z.B. von Matrixmetalloproteasen und Adhäsionsmolekülen vermittelt und so eine Vielzahl zellulärer Funktionen wie das Homing von Stammzellen, Chemotaxis, Adhäsion, Zellmigration und –differenzierung reguliert (Uematsu, Manabu, et al. 2015; Hu, Xiaofeng, et al. 2007; Chatterjee, M.; Gawaz, M. 2013; Elmadbouh, I., et al. 2007; Jujo, Kentaro, et al. 2010; Proulx, Cindy, et al. 2007; Zamani, Maedeh, et al. 2015; Stellos, Konstantinos, et al. 2008b; Ghadge, Santhosh K., et al. 2011; Stellos, Konstantinos, et al. 2008a). Bei der Bindung von SDF-1 an CXCR4 kommt es zur Dimerisierung des Rezeptors und zur Aktivierung von Proteinkinase C, Jak/Stat und NFκB-Signalwegen (Stellos, Konstantinos, et al. 2008a). SDF-1 besitzt zwei wichtige Isoformen: SDF1-α und SDF1-β, die durch alternatives Splicing aus dem selben Gen entstehen (Ghadge, Santhosh K., et al. 2011; Stellos, Konstantinos, et al. 2008a). SDF1-α umfasst 3 Exons, die ein Protein von 89 Aminosäuren ergeben,

während SDF1- β 4 Exons umfasst, die ein Protein von 93 Aminosäuren ergeben. V.a. SDF-1 α spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese des Myokardinfarkts (Ghadge, Santhosh K., et al. 2011). Es spielt zudem eine wichtige Rolle bei der Hämatopoese, Kardiogenese und Vaskulogenese in der embryonalen Entwicklung (Ghadge, Santhosh K., et al. 2011; Stellos, Konstantinos, et al. 2008a). Daneben besitzt SDF-1 α auch eine antifibrotische Wirkung (Ghadge, Santhosh K., et al. 2011). Auch über seinen zweiten Rezeptor CXCR7 reguliert es die Migration von Stamm- und Vorläuferzellen (Ghadge, Santhosh K., et al. 2011; Stellos, Konstantinos, et al. 2008a).

Der CXCR4 Antagonist AMD3100 vermittelt die reversible Blockade der SDF-1/CXCR4-Achse (Jujo, Kentaro, et al. 2010; Abbott, J. Dawn, et al. 2004; Stellos, Konstantinos, et al. 2008a).

In atherosklerotischen Plaques wird SDF-1 hochreguliert (Abbott, J. Dawn, et al. 2004; Stellos, Konstantinos, et al. 2008a). Die durch das niedermolekulare SDF-1 α induzierte Stammzellmigration fördert die kardiale Regeneration durch verschiedene Mechanismen (Zamani, Maedeh, et al. 2015; Cross, Daisy P.; Wang, Chun 2011).

Durch verstärkte Rekrutierung zirkulierender endothelialer Vorläuferzellen und direkter Wirkung auf die erhöhte Sekretion von VEGF aus endothelialen Zellen (Zamani, Maedeh, et al. 2015; Ghadge, Santhosh K., et al. 2011; Stellos, Konstantinos, et al. 2008a) soll es die Angiogenese induzieren (Zamani, Maedeh, et al. 2015; Ghadge, Santhosh K., et al. 2011; Stellos, Konstantinos, et al. 2008a; Proulx, Cindy, et al. 2007; Thevenot, Paul T., et al. 2010).

Die SDF-1 Expression steigt unter hypoxischen Bedingungen (Hu, Xiaofeng, et al. 2007; Chaterjee, M.; Gawaz, M. 2013; He, Jing, et al. 2015) und verbessert so die periphere Rekrutierung von Progenitorzellen und Stammzellen zu den Orten einer Gefäß- und Gewebeschädigung (Hu, Xiaofeng, et al. 2007; Chaterjee, M.; Gawaz, M. 2013; Ceradini, Daniel J., et al. 2004; Uematsu, Manabu, et al. 2015). Die SDF-1 Genexpression wird durch den Transkriptionsfaktor hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) in Endothelzellen reguliert, was zu selektiver *in vivo* Expression von SDF-1 in ischämischem Gewebe in direktem Verhältnis zur Verminderung des Sauerstoffpartialdruckes führt.

SDF-1 spielt eine wichtige Rolle in der Rekrutierung von Stammzellen und Vorläuferzellen (Uematsu, Manabu, et al. 2015; Ceradini, Daniel J., et al. 2004; Hu,

Xiaofeng, et al. 2007; Stellos, Konstantinos, et al. 2008b; Ghadge, Santhosh K., et al. 2011; Stellos, Konstantinos, et al. 2008a).

SDF-1 und sein Rezeptor CXCR4 bilden wohl eine parakrine oder autokrine Achse in kardialen Myozyten, die durch Prækonditionierung und hypoxische Stimuli aktiviert wird, wodurch es zur Rekrutierung antiapoptotischer Kinasen kommt. Diese Förderung des antiapoptotischen Programms verleiht Schutz vor ischämischem oder Reperfusionsschaden (Hu, Xiaofeng, et al. 2007). Der antiapoptotische Effekt wird über einen PI-3-Kinase/Akt-Signalweg vermittelt (Stellos, Konstantinos, et al. 2008a). SDF-1 α ist zudem in die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten verwickelt (Proulx, Cindy, et al. 2007)

Thrombozyten stellen eine Hauptquelle von SDF-1 α dar und speichern es als Teil ihres α -Granula-Sekretoms (Chatterjee, M.; Gawaz, M. 2013; Massberg, Steffen, et al. 2006; Uematsu, Manabu, et al. 2015). Werden die Thrombozyten aktiviert, verbessert sich die Oberflächenexpression und die Freisetzung von SDF-1 α . Die Interaktion zwischen SDF-1 α und CXCR4 reguliert die Megakaryopoese und die Funktion zirkulierender Thrombozyten. Zustände, die mit vermehrter Thrombozytenaktivität einhergehen, z.B. Schlaganfall, Diabetes, septische und systemische Inflammation, können die SDF-1 α -Expression erhöhen (Chatterjee, M.; Gawaz, M. 2013).

Thevenot et al. konnten die Effektivität von SDF-1 α auf die Reduzierung von Mastzellen und die vermehrte Rekrutierung von Stammzellen zeigen, was zu einer beschleunigten Wundheilung führte. Die Reduktion der Mastzellen führte zu einer verminderten, inflammatorischen Zellantwort und zu einer vermehrten Angiogenese (Thevenot, Paul T., et al. 2010).

Nach Myokardinfarkt wird SDF-1 im geschädigten Gewebe natürlicherweise hochreguliert (Chatterjee, M.; Gawaz, M. 2013; Purcell, Brendan P., et al. 2012). Jedoch kann die Aktivierung von Exopeptidasen und Matrix-Metalloproteinase (MMP)-2 bei inflammatorischer Stoffwechsellage SDF-1 α erniedrigen, sodass das Homing von Stamm- und Progenitorzellen ins infarzierte Myokard nicht suffizient ablaufen kann (Purcell, Brendan P., et al. 2012; Stellos, Konstantinos, et al. 2008a). Es wurde u.a. versucht, dies durch alternative Formen medikamentöser Applikation zu umgehen, die eine langfristige Wirkung des SDF-1 α ermöglichen (Cross, Daisy P.; Wang, Chun 2011; Zamani, Maedeh, et al. 2015).

1.9 Myeloperoxidase (MPO)

Die Myeloperoxidase (MPO) ist ein hochkationisches Protein (Teng, Nathaniel, et al. 2017; Ferrante, Giuseppe, et al. 2010; Spallarossa, Paolo, et al. 2008; Lau, Denise; Baldus, Stephan, 2006; Sugiyama, Seigo, et al. 2001), das in den azurophilen Granula von neutrophilen Granulozyten und Monozyten gespeichert wird (Ferrante, Giuseppe, et al. 2010; Lau, Denise; Baldus, Stephan 2006).

MPO spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese inflammatorischer vaskulärer Erkrankungen wie Atherosklerose (Spallarossa, Paolo, et al. 2008; Lau, Denise; Baldus, Stephan 2006; Sugiyama, Seigo, et al. 2001; Sugiyama, Seigo, et al. 2004; Wang, Zeneng, et al. 2007; Teng, Nathaniel, et al. 2017; Stamboul, Karim, et al. 2017) und KHK (Wang, Zeneng, et al. 2007; Lau, Denise; Baldus, Stephan 2006; Biasucci, Luigi M., et al. 1996; Sugiyama, Seigo, et al. 2004). MPO im Plasma ist zudem mit einem höheren kardiovaskulären Risiko assoziiert (Rathnayake, Nilminie, et al. 2015; Sugiyama, Seigo, et al. 2004).

Das reife Enzym ist ein etwa 140-kDa schweres, hämhaltiges Homodimer, wobei jedes Monomer aus einer schweren Untereinheit (55–64 kDa) und einer leichten Untereinheit (10–15 kDa) besteht (Lau, Denise; Baldus, Stephan 2006; Teng, Nathaniel et al. 2017). Abbildung 4 zeigt die dreidimensionale Struktur der MPO.

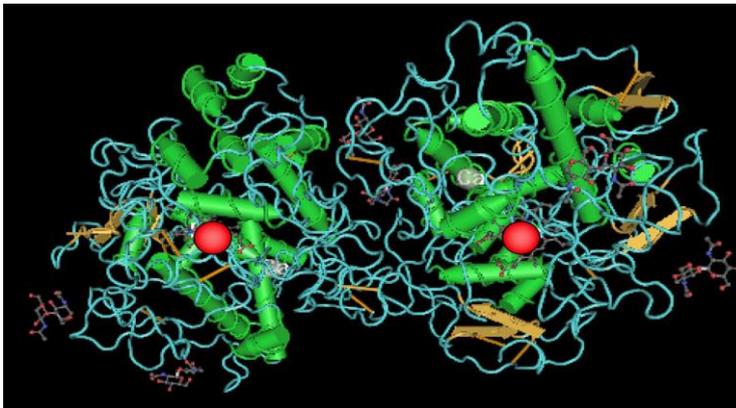


Abbildung 4 Die MPO ist aus einem Homodimer aufgebaut und setzt sich aus zwei Hämezentren (rot), α -Helices (grün) und β -Faltblättern (ocker) zusammen (Lau, Denise; Baldus, Stephan 2006)

Die Sekundärstruktur von MPO ist im Wesentlichen α -helikal, wobei jedes Monomer aus einem zentralen Kern mit 5 Helices und der Hämgruppe besteht (Lau, Denise; Baldus, Stephan 2006).

Makrophagen haben die Fähigkeit, MPO zu synthetisieren, verloren, können es jedoch per Endozytose ganzer neutrophiler Granulozyten oder direkt aufnehmen (Lau, Denise; Baldus, Stephan 2006). Dabei spielt der Granulozyten- und Monozyten colony stimulating factor (GM-CSF) eine wichtige Rolle in der Regulierung der Speicherung von MPO während der Differenzierung von Monozyten in Makrophagen (Sugiyama, Seigo, et al. 2001; Teng, Nathaniel, et al. 2017).

Durch Oxidation kann MPO außerdem latente Formen von Matrixmetalloproteinasen aktivieren (Rathnayake, Nilminie, et al. 2015; Teng, Nathaniel, et al. 2017; Mollenhauer, Martin, et al. 2017; Sugiyama, Seigo, et al. 2001; Sugiyama, Seigo, et al. 2004; Lau, Denise; Baldus, Stephan 2006) und ihre Inhibitoren inaktivieren (Rathnayake, Nilminie, et al. 2015; Teng, Nathaniel, et al. 2017; Sugiyama, Seigo, et al. 2001; Lau, Denise; Baldus, Stephan 2006).

MPO wurde lange Zeit hauptsächlich als bakterizides Enzym betrachtet, das mit dem angeborenen Immunsystem in Verbindung steht (Lau, Denise; Baldus, Stephan 2006; Rathnayake, Nilminie, et al. 2015; Mollenhauer, Martin, et al. 2017).

Spätere Beobachtungen haben jedoch u.a. gezeigt, dass MPO auch an der Regulation der Zellhomöostase beteiligt ist (Lau, Denise; Baldus, Stephan 2006; Teng, Nathaniel, et al. 2017).

Das komplette, sogenannte MPO-System besteht neben MPO auch aus Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und oxidierbaren Kofaktoren. In seinem Grundzustand liegt das Eisen als MPO-Fe(III) vor. In der Gegenwart von H_2O_2 wird es dann oxidiert (Lau, Denise; Baldus, Stephan 2006; Teng, Nathaniel, et al. 2017). Bei der Oxidation durch H_2O_2 wird MPO in das kurzlebige Redoxintermediat Compound I umgewandelt, das bereitwillig eine Vielzahl von Substraten oxidiert (Spallarossa, Paolo, et al. 2008; Lau, Denise; Baldus, Stephan 2006; Ferrante, Giuseppe, et al. 2010; Zhang, Renliang, et al. 2002; Teng, Nathaniel, et al. 2017).

Die durch MPO katalysierte Oxidation von Chlorid führt durch Reduktion von H_2O_2 zur Bildung der hypochlorigen Säure (HOCl) (Spallarossa, Paolo, et al. 2008; Rathnayake, Nilminie, et al. 2015; Lau, Denise; Baldus, Stephan 2006; Sugiyama, Seigo, et al. 2004; Sugiyama, Seigo, et al. 2001; Zhang, Renliang, et al. 2002; Teng, Nathaniel, et al. 2017).

HOCl kann rasch nach seiner Bildung mit anderen Molekülen reagieren (Sugiyama, Seigo, et al. 2001; Lau, Denise; Baldus, Stephan 2006) und spielt eine wichtige Rolle in der Atherogenese (Sugiyama, Seigo, et al. 2001; Spallarossa, Paolo, et al. 2008; Lau, Denise; Baldus, Stephan 2006).

HOCl kann als metallunabhängiges Oxidationsmittel in vivo dienen (Sugiyama, Seigo, et al. 2004; Sugiyama, Seigo, et al. 2001; Ferrante, Giuseppe, et al. 2010). Neben Halogeniden kann das Compound I auch zahlreiche organische und anorganische Substrate oxidieren und bildet dabei Compound II (MPO-Fe(IV)=O) (Lau, Denise; Baldus, Stephan 2006; Teng, Nathaniel, et al. 2017). Der zweite Schritt im Peroxidasezyklus ist die Reduktion von Compound II zum Ausgangszustand (Lau, Denise; Baldus, Stephan 2006). Abbildung 5 fasst die katalytischen Zyklen der MPO zusammen.

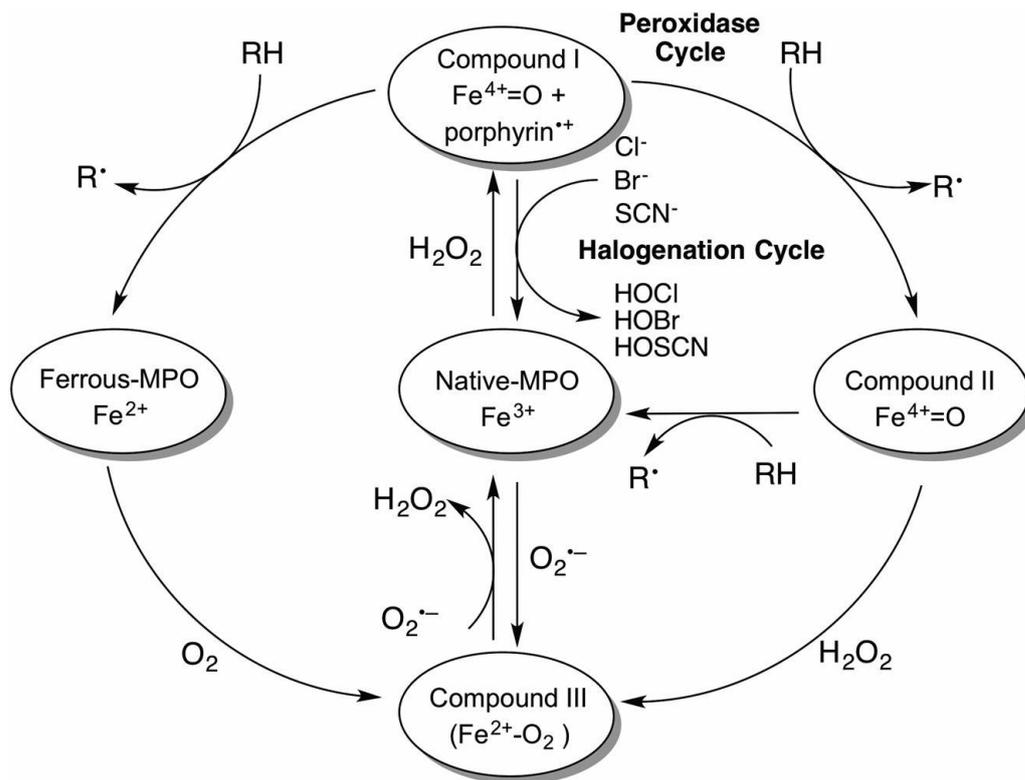


Abbildung 5 MPO liegt in seiner Grundform als Fe³⁺ vor, das mit H₂O₂ zum Compound 1 oxidiert wird, der entweder im Halogenierungszyklus Halogenide oxidieren kann oder im Peroxidasezyklus weiter zum Compound 2 reagiert (Teng, Nathaniel, et al. 2017).

Ein anderes wichtiges Substrat für MPO Compound I ist Stickstoffmonoxid (NO), das zu Nitrit (NO_2^-) oxidiert wird (Lau, Denise; Baldus, Stephan 2006; Spallarossa, Paolo, et al. 2008). In Gegenwart von MPO und H_2O_2 , wird NO_2^- zu Stickstoffdioxid ($\text{NO}_2\cdot$) oxidiert (Zhang, Renliang, et al. 2002; Lau, Denise; Baldus, Stephan 2006).

Einer der am meisten untersuchten Reaktionen ist die $\text{NO}_2\cdot$ -vermittelte Oxidation von Tyrosin zu Nitrotyrosin (NO_2Tyr) (Zhang, Renliang, et al. 2002; Lau, Denise; Baldus, Stephan 2006), die als Kennzeichen der inflammatorischen Gefäßschädigung betrachtet wird (Lau, Denise; Baldus Stephan 2006).

Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass MPO daran beteiligt ist, die vaskuläre Bioverfügbarkeit von NO zu schwächen (Lau, Denise; Baldus Stephan 2006; Teng, Nathaniel, et al. 2017; Spallarossa, Paolo, et al. 2008; Mollenhauer, Martin, et al. 2017), was zu endothelialer Dysfunktion führt (Teng, Nathaniel, et al. 2017; Spallarossa, Paolo, et al. 2008). Stamboul et al. vermuteten, dass L-Arginin mit MPO und ihren Reaktionsprodukten, u.a. der HOCl, reagiert und auf diese Weise die Bioverfügbarkeit der NO-Synthase senkt (Teng, Nathaniel, et al. 2017; Stamboul, Karim, et al. 2017).

Im subendothelialen Raum der Gefäßwand stellt das Matrixprotein Fibronectin eines der Hauptziele der MPO-abhängigen NO_2Tyr -Bildung dar, wodurch es zur Beeinträchtigung der Fibroblastenmigration und möglicherweise zu proinflammatorischen Effekten kommt (Lau, Denise; Baldus, Stephan 2006).

Zudem konnte Tyrosinnitrierung des Apolipoproteins in HDL Cholesterin, das als antiinflammatorisch und gewebeprotectiv betrachtet wird, beobachtet werden, was zum Verlust seiner antiinflammatorischen Eigenschaften führt (Lau, Denise; Baldus, Stephan 2006; Teng, Nathaniel, et al. 2017).

Die positiv geladene MPO bindet bereitwillig an negativ geladene Bestandteile der extrazellulären Matrix und des Endothels (Sugiyama, Seigo, et al. 2001; Spallarossa, Paolo, et al. 2008; Lau, Denise; Baldus, Stephan 2006).

Die MPO fördert proinflammatorische vaskuläre Eigenschaften (Mollenhauer, Martin, et al. 2017; Lau, Denise; Baldus, Stephan 2006; Sugiyama, Seigo, et al. 2001; Sugiyama, Seigo et al. 2004) und stellt einen wichtigen Marker für eine stattfindende Inflammation dar (Rathnayake, Nilminie, et al. 2015; Husted, Steen, et al. 2010).

MPO kann über die Bildung von ROS prothrombotische Aktivität ausüben (Sugiyama, Seigo, et al. 2004; Yunoki, Kei, et al. 2012; Teng, Nathaniel, et al. 2017) und dient dabei

als einer der Hauptkatalysatoren für die Initiierung der Lipidperoxidation in vivo (Zhang, Renliang, et al. 2002; Sugiyama, Seigo, et al. 2004; Lau, Denise; Baldus, Stephan 2006). MPO ist einer der Signalwege, über die LDL in der Arterienwand modifiziert werden kann (Lau, Denise; Baldus, Stephan 2006; Sugiyama, Seigo, et al. 2001; Wang, Zeneng, et al. 2007; Teng, Nathaniel, et al. 2017; Stamboul, Karim, et al. 2017), was zu einer verstärkten Schaumzellbildung führt (Husted, Steen, et al. 2010; Teng, Nathaniel, et al. 2017; Wang, Zeneng, et al. 2007; Lau, Denise; Baldus, Stephan 2006).

MPO vermittelt auch die koronare, endotheliale Apoptose (Spallarossa, Paolo, et al. 2008; Ferrante, Giuseppe, et al. 2010; Wang, Zeneng, et al. 2007; Teng, Nathaniel, et al. 2017; Sugiyama, Seigo, et al. 2001).

So trägt eine erhöhte postprandiale MPO- und MMP-9-Aktivität zu der durch fettiges Essen induzierten Endothelschädigung und proapoptotischen Wirkung auf Endothelzellen bei (Spallarossa, Paolo, et al. 2008).

HOCl besitzt eine biphasische Wirkung, indem sie Endothelzellen in niedrigen, subletalen Konzentrationen aktiviert (Sugiyama, Seigo, et al. 2004), aber in höheren Konzentrationen den endothelialen Zelltod fördert (Sugiyama, Seigo, et al. 2004; Teng, Nathaniel, et al. 2017). Möglicherweise kann HOCl sowohl über apoptotische als auch onkotoxische Zelltodsignalwege direkt den Zelltod und die Ablösung humaner Endothelzellen auslösen (Sugiyama, Seigo, et al. 2004).

MPO und seine Oxidationsprodukte besitzen proatherogene Eigenschaften (Teng, Nathaniel, et al. 2017; Sadowski, Marcin; Zabczy, Michał; Undas, Anetta 2014) und wurden auch in humanen, atherosklerotischen Läsionen nachgewiesen (Sugiyama, Seigo, et al. 2001; Ferrante, Giuseppe, et al. 2010; Teng, Nathaniel, et al. 2017; Wang, Zeneng, et al. 2007).

HOCl in subletalen Konzentrationen erhöht signifikant die Expression von TF durch Endothelzellen, was einen prothrombotischen Zustand herbeiführt (Sugiyama, Seigo, et al. 2004; Yunoki, Kei, et al. 2012; Teng, Nathaniel, et al. 2017).

Interessanterweise scheinen Raucher einen höheren Gehalt an MPO aufzuweisen (Ferrante, Giuseppe, et al. 2010; Yunoki, Kei, et al. 2012), was zu einer erhöhten Blutviskosität führt (Yunoki, Kei, et al. 2012).

Wang et al. haben berichtet, dass MPO an Orten der Inflammation und in atherosklerotischen Plaques die Bildung von Cyanat aus Thiocyanat und H₂O₂ katalysiert (Teng, Nathaniel, et al. 2017; Wang, Zeneng, et al. 2007). Die Reaktion von Cyanat mit ε-Aminogruppen von Lysinresten führt zu Homocitrullin (Wang, Zeneng, et al. 2007; Teng, Nathaniel, et al. 2017), was in atherosklerotischen Plaques zur Carbamylierung von Proteinen und Lipoproteinen führt.

Die MPO katalysierte Lipoproteincarbamylierung fördert die Proliferation vaskulärer glatter Muskelzellen und löst die Apoptose von Endothelzellen aus (Wang, Zeneng, et al. 2007).

1.10 Zielsetzung

Herzerkrankungen haben mit etwa 30 % einen erheblichen Anteil an der Gesamtsterberate der Bevölkerung (Böcker et al. 2012; Zamani, Maedeh et al. 2015). Durch die Alterung der Bevölkerung wird die Inzidenz ischämischer Herzerkrankungen weiter steigen (He, J., et al. 2015).

Nach Myokardinfarkt spielt die inflammatorische Antwort mit Freisetzung einer Reihe von Chemokinen und Wachstumsfaktoren eine wesentliche Rolle für die Initiierung der Reparaturvorgänge (Van Den Akker, F.; De Jager, S. C. A.; Sluijter, J. P. G. 2013; Van der Pouw Kraan, Tineke CTM, et al. 2014; Vogel, Sebastian, et al. 2014; Rohde, David, et al. 2014; Stellos, Konstantinos, et al. 2008a; Ogura, Yasuhiro, et al. 2012). Daher stellte sich für uns nun die Frage, inwiefern der Aufbau intrakoronarer Thromben einen Einfluss auf die Regeneration nach Myokardinfarkt hat. Zu diesem Zweck wurden sieben Proteine ausgewählt, für die es in der Literatur bereits zahlreiche Nachweise gibt, dass sie eine bedeutende Rolle in der Pathophysiologie des Myokardinfarkts spielen: BMP2, BMP4, BMP7, Histon H3, SDF-1, TLR4 und MPO. Dadurch hoffen wir in Zukunft neue Therapieansätze für die Behandlung des ACS entwickeln zu können.

Die duale Plättchenhemmung mit ASS und den ADP-Rezeptorblockern Ticagrelor, Prasugrel oder Clopidogrel stellt einen wichtigen Bestandteil der Therapie des Myokardinfarkts dar (Herold et al. 2015; Karow, Lang-Roth 2014; Mega JL, Simon T 2015). Aus diesem Grund untersuchten wir außerdem, ob die Wahl der antiaggregatorischen Therapie einen Einfluss auf den Aufbau der intrakoronaren Thromben und die Regeneration nach Myokardinfarkt hat.

2 Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

Im Zeitraum zwischen 2012 und 2015 wurden in Tübingen, Leipzig und Göppingen die arteriellen Thromben von 31 Patienten gesammelt, bei denen anhand des Elektrokardiogramms und des Troponinwertes ein ST-Hebungsinfarkt oder ein Nicht-ST-Hebungsinfarkt diagnostiziert wurde. Patienten mit instabiler Angina pectoris wurden nicht eingeschlossen. Die antiaggregatorische Therapie der Patienten umfasste neben ASS entweder Clopidogrel, Prasugrel oder Ticagrelor.

Die Thromben wurden per Thrombusaspiration im Herzkatheterlabor gewonnen. Anhand des Befundes in der Herzkatheteruntersuchung erfolgte die Einteilung der koronaren Herzkrankheit in Ein-, Zwei- oder Drei-Gefäß-Erkrankung.

Die linksventrikuläre Ejektionsfraktion und der pulmonalarterielle Druck wurden im transthorakalen Echo bestimmt.

Außerdem wurden das Alter zum Zeitpunkt des Infarktes, Geschlecht, BMI, Vorhofflimmern, kardiovaskuläre Risikofaktoren, relevante Begleiterkrankungen und für die Fragestellung relevante Medikamente erfasst.

Die Durchführung der Studie fand im Einklang mit der Deklaration von Helsinki statt und alle Studienteilnehmer haben schriftlich ihr Einverständnis erklärt. Ein Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen lag vor.

2.2 Fixierung der arteriellen Thromben

Die Thromben kamen in Röhrchen mit 1,5 ml Schaumzellmedium an und wurden zunächst im Brutschrank aufbewahrt. Ein 50 ml Falcon mit Schaumzellmedium und L-Glutamin wurde im Wasserbad bei 37°C erwärmt. Die folgenden Schritte wurden unter der Sterilbank durchgeführt. Eine 6-Well-Platte wurde nun mit dem Thrombus aus dem Röhrchen gefüllt. Dann wurden 3-3,5 ml Medium aus dem Falcon in eine 6x1,5 cm Schale der Firma Corning mit einer Petrischale als Unterschale pipettiert. Anschließend wurde der Thrombus mit einem sterilen Skalpell halbiert. Der eine Teil wurde mit einer sterilen Pasteurpipette in das Schaumzellmedium der Corningschale gegeben. Der andere Teil wurde in 4 % PFA zum Zwecke der Entwässerung eingebettet und bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Schale mit dem Thrombus wurde nun 14 Tage im Brutschrank inkubiert. Zur Kontrolle wurden alle 2-3 Tage Fotos davon gemacht.

Danach wurden die Zellen abgelöst, gefärbt und gefacst. Der zweite Teil wurde in Paraffin eingebettet und im Folgenden als Material verwendet.

Tabelle 2

L-Glutamine solution 200 mM, solution, sterile-filtered, BioXtra, suitable for cell culture	Sigma-Aldrich G7513
6-Well-Platte	Falcon® Art.-Nr. 353046
Kulturschale	Corning® Primaria™ Standard-Schale Art.-Nr. 734-0071
Steriles Skalpell	Pfm medical Art.-Nr. 200130023
Sterile Pasteurpipette	Ratiolab® Art.Nr. 2655135
Falkon, 50ml, CELLSTAR®, Schraubverschluss blau, Natur	Greiner bio-one Art.-Nr. 227261
Paraformaldehyd	Merck Art.Nr. 8187151000
Sterilbank	Thermo Electron Corporation HS18 40617682
Paraplast Plus®	Roth Art.-Nr. X881.2

2.3 Hämatoxylin-Eosin-(HE)Färbung

Bei jedem Thrombus wurde zunächst eine HE-Färbung durchgeführt. Auf eine absteigende Alkoholreihe zur Entparaffinierung folgte ein 5 Minuten-Bad in Aqua dest.. Dann erfolgte der erste Färbeschritt, in dem die Schnitte 5 Minuten in Mayers Hämalaun schwammen und die Kerne eine blaue Farbe annahmen. Nun wurden die Schnitte kurz in Leitungswasser ausgespült und anschließend 15 Minuten in Leitungswasser gebläut. Dann erfolgte der zweite Färbeschritt in 1 % Eosin, dem 1 Tropfen Eisessig zugegeben wurde. Innerhalb von 3 Minuten färbte sich das Plasma dabei rot. Jetzt wurden die Schnitte erneut kurz abgewaschen. Nach einer aufsteigenden Alkoholreihe mussten die Objektträger noch 5 Minuten in Rotihistol baden, bevor sie mit Roti®-Histokitt eingedeckt wurden.

Tabelle 3

Mayers Hämalalaunlösung	Merck Art.-Nr. 1092490500 1:5
Eosin G 50 mg	Roth Art.-Nr. 7089.1
Essigsäure (Eisessig) 100%	Merck Art.-Nr. 100063
Roti®-Histokitt	Roth Art.-Nr. 6638.2
Roti®-Histol	Roth Art.-Nr. 6640.1

2.4 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie dient der Detektion von Antigenen im Gewebe (Vollmar et al. 2013). Prinzipiell bestehen immuno- und zytochemische Techniken aus zwei Schritten. In einem ersten Schritt wird ein sogenannter primärer Antikörper eingesetzt, der spezifisch an das Epitop eines gesuchten Antigens im Gewebe oder in der Zelle bindet. Durch verschiedene direkte und indirekte Methoden werden diese gebundenen primären Antikörper, d.h. die Antigen-Antikörper-Bindungsstellen, anschließend lokalisiert und dadurch sichtbar gemacht (Böcker et al. 2012).

In der Immunzytochemie hat sich die Peroxidase als Markerenzym durchgesetzt, die entweder an das Immunglobulin kovalent gekoppelt wird oder als löslicher Komplex vorliegen kann. Auf diese Weise können Antigene auf licht- und elektronenmikroskopischer Ebene mittels der von Graham und Karnovsky 1966 entwickelten Diaminobenzidintetrahydrochlorid(DAB)-Reaktion lokalisiert werden (Friemel et al. 1991).

Bei der direkten Methode trägt der primäre Antikörper ein Markermolekül, welches nach der Immunreaktion im Gewebe detektiert werden kann. Bei den indirekten Methoden wird hingegen an den primären Antikörper ein zweiter gebunden, dessen Markierung eine Visualisierung ermöglicht. Eine weitere Verstärkung des Signals im Sinne einer Amplifikation kann z.B. durch einen biotinylierten sekundären Antikörper erreicht werden, der von einem Komplex aus Avidin und einem biotinylierten Enzymmarker erkannt wird (Böcker et al. 2012).

Bei der sogenannten ABC-Methode werden z.B. biotinylierte Antikörper und Avidin, das mit biotinylierter Peroxidase im sogenannten ABC-Komplex vorliegt, verwendet. Wenn der biotinylierte Antikörper nun an ein Antigen bindet, so führt diese Reaktion durch Gabe von ABC-Komplexen zur Ausbildung von makromolekularen Komplexen,

da Avidin vier Bindungsstellen für Biotin besitzt (Vollmar et al. 2013).

Für diese Arbeit wurden zunächst die Schnitte zum Zwecke der Entparaffinierung 2x10 Minuten in Rotihistol eingelegt. Währenddessen wurde aus tri-Natriumcitrat-Dihydrat und Zitronensäure ein Citratpuffer mit pH 6 hergestellt. Danach folgte eine absteigende Alkoholreihe, wo die Schnitte jeweils 5 Minuten lagerten. Im Anschluss folgte die Demaskierung in der Mikrowelle, indem die Schnitte 3x5 Minuten im Citratpuffer kochten. Nach dem Abkühlen wurde fünf Minuten in phosphate buffered saline (PBS) gewaschen. Nun wurde das Wasserstoffperoxid 30 % 1:10 verdünnt. In diese Verdünnung wurden nun die Schnitte für 15 Minuten im Dunkeln inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift in PBS wurden die Schnitte mit einem Fettstift umkreist. Um unspezifische Bindungen zu vermindern, wurde nun mit 4%-Serum eine Stunde blockiert. Dabei wurde das Serum der Spezies verwendet, aus der der sekundäre Antikörper stammte. Jetzt wurde der entsprechende primäre Antikörper in 1% bovinem Serumalbumin (BSA) und 4%-Serum verdünnt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Daneben wurden noch IgG- und PBS-Kontrollen mitgeführt. Am folgenden Tag wurden die Schnitte 3x5 Minuten in PBS mit 0,05 % Tween gewaschen. Danach wurde der biotynilierte sekundäre Antikörper pipettiert. Dieser richtete sich gegen die Spezies, die den primären Antikörper geliefert hat, sodass eine Bindung entsteht. Nach 30 Minuten Inkubationszeit folgte ein weiterer Waschschrift 3x5 Minuten in PBS mit 0,05 % Tween. Nun wurde auf die Schnitte noch Streptavidin pipettiert, das wiederum an das Biotin des zweiten Antikörpers bindet und so einen Komplex bildete. Nach 30 Minuten Inkubationszeit und erneutem Waschen in PBS mit 0,05 % Tween, wurde 1 ml DAB-Chromogenlösung mit einem Tropfen Substrat vermischt und aufpipettiert. Innerhalb kurzer Zeit wurden die positiven Zellen braun, während die IgG-Kontrolle sich allenfalls schwach anfärbte und die PBS-Kontrolle hell blieb. Nach zwei Minuten, wurden die Objektträger in ein Bad mit Mayers Hämalaunlösung gestellt, wo in drei Minuten die Kerne blau gefärbt wurden. Danach wurde bei fließendem Wasserhahn zehn Minuten entbläut. Um die Färbungen besser zu fixieren, wurden nun für 20 Minuten eine 0,5 % Paraformaldehyd-Lösung aufpipettiert. Danach wurden die Schnitte in 3x5 Minuten in PBS mit 0,05 % Tween gewaschen. Zum Schluss wurden die Objektträger in eine aufsteigende Alkoholreihe eingetaucht, die mit 2x10 Minuten Rotihistol endete. Nun wurden die Objektträger mit Rotihistokitt eingebettet und zum

Trocknen unter den Abzug gelegt. Nach dem Mikroskopieren wurden sie dunkel und trocken gelagert.

2.5 Primäre Antikörper

Tabelle 4

Anti-SDF1 antibody 0,5 mg/ml	abcam ab9797	1:50
Rabbit anti-TLR4 1 mg/ml	abcam ab13556	1:200
Anti-Histone 3 H3 Rb pAb 1mg/ml	abcam ab61252	1:100
Anti-Myeloperoxidase Mouse Monoclonal Ab 0,5mg/ml	abcam ab49464	1:25
Anti-BMP2 biorbyt 0,5mg/ml	biorbyt orb10194	1:10
Anti-BMP4 0,43 mg/ml	GeneTex GTX100874	1:10
Rabbit Anti-BMP7 Polyclonal Antibody, Biotin Conjugated 1mg/ml	Bioss bs-2242R-Biotin	1:20

2.6 IgG-Kontrollen

Tabelle 5

Rabbit IgG 15mg/ml	Dako X0936	1:75-1:3000
Mouse IgG2b 0,5mg/ml	R&D Systems	1:25

2.7 Sekundäre Antikörper

Tabelle 6

Goat anti-Rabbit Biotynilated	Dako E0432	1:1000
Polyclonal Rabbit Anti- mouse Immunglobulines Biotynilated	Dako E0464	1:300

2.8 Seren

Tabelle 7

Goat-Serum	Dako X0907
Rabbit-Serum	Dako X0902

2.9 Reagenzien

Tabelle 8

Roti®-Histol	Roth Art.-Nr. 6640.1
Ethanol 99%, vergällt mit MEK (v/v)	UN 1170 SAV liquid production GmbH
PBS Tablets	Gibco 1571002
Tween®20 for synthesis	Merck Art.Nr. 8221840500
Citrit acid	SIGMA-ALDRICH 251275
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	AppliChem APA3901.1000
AnalaR NORMAPUR Methanol 2,5l	VWR Chemicals 20.847.307
Hydrogen peroxide 30%	EMSURE® 1072092500
Albumin Fraction V (pH 7.0)	AppliChem APA1391.0250
Streptavidin-HRP	Dako P0397
Liquid DAB + Substrate System	Chromogen Dako K3468

Mayers Hämalaunlösung	Merck Art.-Nr. 1092490500
Paraformaldehyd	Merck Art.Nr. 8187151000
Roti®-Histokitt	Roth Art.-Nr. 6638.2

2.10 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 9

Deckgläser 24x50 mm Stärke 0,13-0,16mm	R.Langenbrinck 01-2450/1
Deckgläser 24x60mm Stärke 0,13-0,16mm	R.Langenbrinck 01-2460/1
Deckgläser 24x40mm	Menzel-Gläser BB024040A1
Pipetten(weich)	Ratiolab Art.-Nr. 2600131
Fettstifte	Science Services Circle Writer Liquid Blocker CWAL-F
Cellstar®Tubes 50 ml	Greiner bio-one Art.-Nr. 227261
Safe-Lock Tubes 0,5 ml	Eppendorf 0030 121.023
Safe-Lock Tubes 1,5 ml	Eppendorf 0030 120.086
Pipettenspitzen 200 µl	SARSTEDT 0109/5089011
ratiolab®Pipettenspitzen Blau 1000 µl	Ratiolab Art.-Nr. 2100610
Pipettenspitzen, 10µl, farblos	Biozym Scientific GmbH Art.Nr. 720011
SuperFrost®Plus Objektträger	R.Langenbrinck 03-0060
Duran®Laborflaschen, 500ml, 1000ml	DURAN Group GmbH Art.Nr. 21 801 44 59; 21 801 54 55
Falkon, 50ml, CELLSTAR®, Schraubverschluss blau, Natur	Greiner bio-one Art.-Nr. 227261

2.11 Geräte

Tabelle 10

pH-Meter	HANNAinstruments Artikel-Nr. AHI-9124
Mikrowelle	Severin Art.MW 7809
Mikroskop	Nikon Optiphot-2
Kamera	Nikon Digital Sight DS-U1
Waage	Denver Instrument
Vortexer	IKA®MS 3 basic Ident-Nr. 0003617000
Magnetrührer	IKAMAG®RET-GS
Wasseraufbereitungsanlage	Thermo Scientific TKA Genpure
Pipetten	Eppendorf Research®10;100;1000
Stoppuhr	Carl Roth GmbH+Co. KG Modell Nr. TR118

Die Fotos wurden mit Hilfe der Software NIS-Elements BR 3.2 von Nikon gemacht.
Die Auswertung der Fotos erfolgte mit der Software Image J von Wayne Rasband.

2.12 Statistik

Die Graphiken wurden mit Hilfe von GraphPad Prism 6 der GraphPad Software, Inc. erstellt.

Zur statistischen Auswertung diente SPSS, Version 24.0 von IBM. Normalverteilte Werte wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Es erfolgte eine Post-hoc-Testung nach Bonferroni mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA). Die Berechnung der Korrelationen zwischen den verschiedenen Variablen erfolgte mit dem Spearmankorrelationskoeffizienten. Als statistisch signifikant wurden p-Werte $<0,05$ betrachtet.

3 Ergebnisse

3.1 Charakteristika der Studienpopulation

Insgesamt wurden die arteriellen Thromben von 31 Patienten aus drei kardiologischen Zentren mit akutem Myokardinfarkt untersucht. Dabei erhielten 9 Patienten ein Loading mit Clopidogrel, 5 Patienten eines mit Ticagrelor und 17 eines mit Prasugrel.

4 (12,90 %) der Patienten erlitten einen Nicht ST-Strecken Hebungsinfarkt (NSTEMI), die restlichen 27 (87,10 %) einen ST-Streckenhebungsinfarkt (STEMI).

In der Herzkatheteruntersuchung wiesen 8 (25,81%) eine koronare Herzkrankheit (KHK) in einem Gefäß, 5 (16,13 %) eine koronare Herzkrankheit in zwei Gefäßen und 18 (58,06 %) eine Dreifäßkrankung auf.

Im transthorakalen Echo wurden die linksventrikuläre Ejektionsfraktion und der pulmonalarterielle Druck bestimmt.

Außerdem wurden das Alter zum Zeitpunkt des Infarktes, Geschlecht, BMI, Vorhofflimmern, kardiovaskuläre Risikofaktoren, relevante Begleiterkrankungen und für die Fragestellung relevante Medikamente erfasst.

Tabelle 11 gibt einen Überblick über die erfassten Daten.

Tabelle 11: Klinische Daten der Patienten

		Gesamt	Clopidogrel	Ticagrelor	Prasugrel
		(n=31)	(n=9)	(n=5)	(n=17)
Geschlecht	Männlich (%)	23 (74,19)	6 (66,67)	3 (60,00)	14 (82,35)
	Weiblich (%)	8 (25,81)	3 (33,33)	2 (40,00)	3 (17,65)
Alter	(Mittelwert±Standardabweichung)	63,89±14,528	66,44±13,749	67,80±24,129	60,86±11,072
BMI	(kg/m ²) (Mittelwert±Standardabweichung)	26,5258±3,54683	25,6875±3,29997	26,98±4,6192	26,9291±3,45429
ACS	NSTEMI (%)	4 (12,90)	2 (22,22)	1 (20,00)	1 (5,88)
	STEMI (%)	27 (87,10)	7 (77,78)	4 (80,00)	16 (94,12)
Vorhofflimmern		3 (9,68)	2 (22,22)	0 (0,00)	1 (5,88)
KHK	Ein-Gefäß (%)	8 (25,81)	4 (44,44)	0 (0,00)	4 (23,53)
	Zwei-Gefäß (%)	5 (16,13)	0 (0,00)	1 (20,00)	4 (23,53)

	Drei-Gefäß (%)	18 (58,06)	5 (55,56)	4 (80,00)	9 (52,94)
	ACB (%)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
Kardiovaskuläre Risikofaktoren	Arterielle Hypertonie (%)	17 (54,84)	6 (66,67)	4 (80,00)	7 (41,18)
	Dyslipidämie (%)	12 (38,71)	5 (55,56)	2 (40,00)	5 (29,41)
	Diabetes mellitus (%)	3 (9,68)	2 (22,22)	0 (0,00)	1 (5,88)
	Positive Familienanamnese (%)	9 (29,03)	2 (22,22)	2 (40,00)	5 (29,41)
	Nikotinabusus (%)	8 (25,81)	1 (11,11)	1 (20,00)	6 (35,29)
	Ex-Nikotinabusus (%)	8 (25,81)	5 (55,56)	0 (0,00)	3 (17,65)
	Niereninsuffizienz (%)	6 (19,35)	4 (44,44)	1 (20,00)	1 (5,88)
Begleiterkrankungen	COPD (%)	1 (3,23)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (5,88)
	pAVK (%)	4 (12,90)	1 (11,11)	1 (20,00)	2 (11,76)
Linksventrikuläre Ejektionsfraktion (%)	≥50 %	9 (29,03)	1 (11,11)	1 (20,00)	7 (41,18)
	36-49 %	14 (45,16)	7 (77,78)	2 (40,00)	5 (29,41)
	≤35 %	3 (9,68)	1 (11,11)	1 (20,00)	1 (5,88)
	Pulmonale Hypertonie >30mmHg (%)	13 (41,94)	4 (44,44)	2 (40,00)	7 (41,18)
Medikamente	ASS	30 (96,77)	9 (100,00)	4 (80,00)	17 (100,00)
	Aldosteronantagonisten	6 (19,35)	3 (33,33)	1 (20,00)	2 (11,76)
	Andere Diuretika	6 (19,35)	5 (55,56)	1 (20,00)	0 (0,00)
	AT1-Blocker	5 (16,13)	3 (33,33)	0 (0,00)	2 (11,76)
	ACE-Hemmer	12 (38,71)	3 (33,33)	1 (20,00)	8 (47,06)
	Betablocker	16 (51,61)	7 (77,78)	3 (60,00)	6 (35,29)
	Statine	17 (54,84)	6 (66,67)	2 (40,00)	9 (52,94)
	Marcumar	2 (6,45)	2 (22,22)	0 (0,00)	0 (0,00)

3.2 Morphologische und immunhistochemische Analyse

Um den Aufbau und die exprimierten Proteine der mittels Aspirationsthorbektomie gewonnenen, arteriellen Thromben zu erfassen, wurden sie mit einer Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung sowie immunhistochemisch gefärbt und anhand der unter dem Mikroskop vorherrschenden Thrombusmorphologie in fünf verschiedene Gruppen eingeteilt (Abb.6).

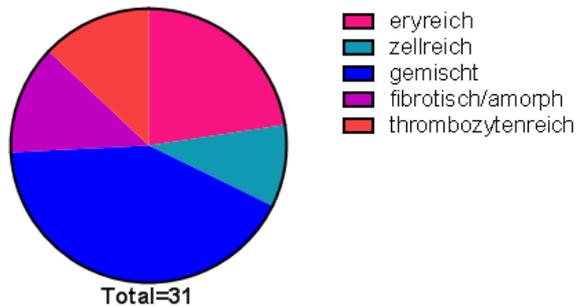
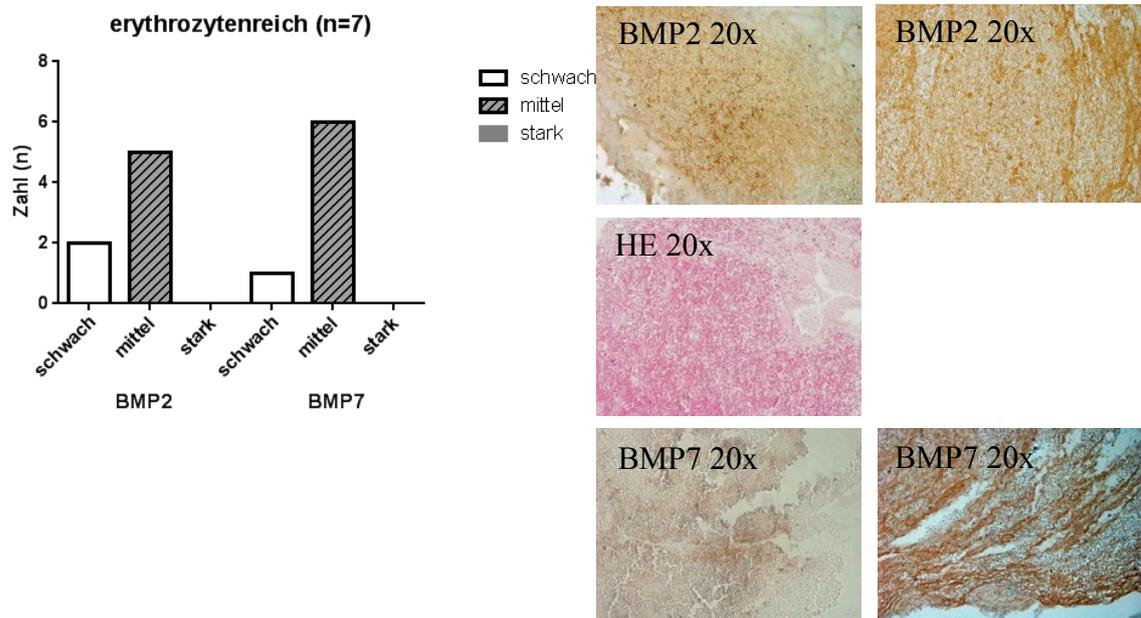


Abbildung 6: Morphologische Einteilung der koronaren Thromben

Im Hinblick auf die Expression von BMP2 und BMP7 wurden bezüglich der sichtbaren Braunfärbung drei Gruppen gebildet: schwache, mittlere und starke Expression.

Unter den sieben erythrozytenreichen Thromben fanden sich zwei mit einer schwachen BMP2 Expression, fünf wiesen eine mittlere Expression auf.

Bei BMP7 gab es einen mit einer schwachen Expression, während sechs eine mittlere BMP7 Expression aufwiesen (Abb. 7).



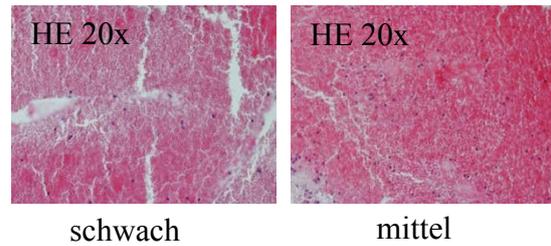


Abbildung 7: BMP2 und BMP7 in erythrozytenreichen Thromben mit repräsentativen immunhistochemischen Färbungen und den jeweiligen HE-Färbungen (20x Objektiv)

Bei den vier thrombozytenreichen Thromben gab es einen mit einer mittleren und drei mit einer starken BMP2 Expression. BMP7 exprimierten jeweils zwei der Thromben mittel und stark (Abb. 8).

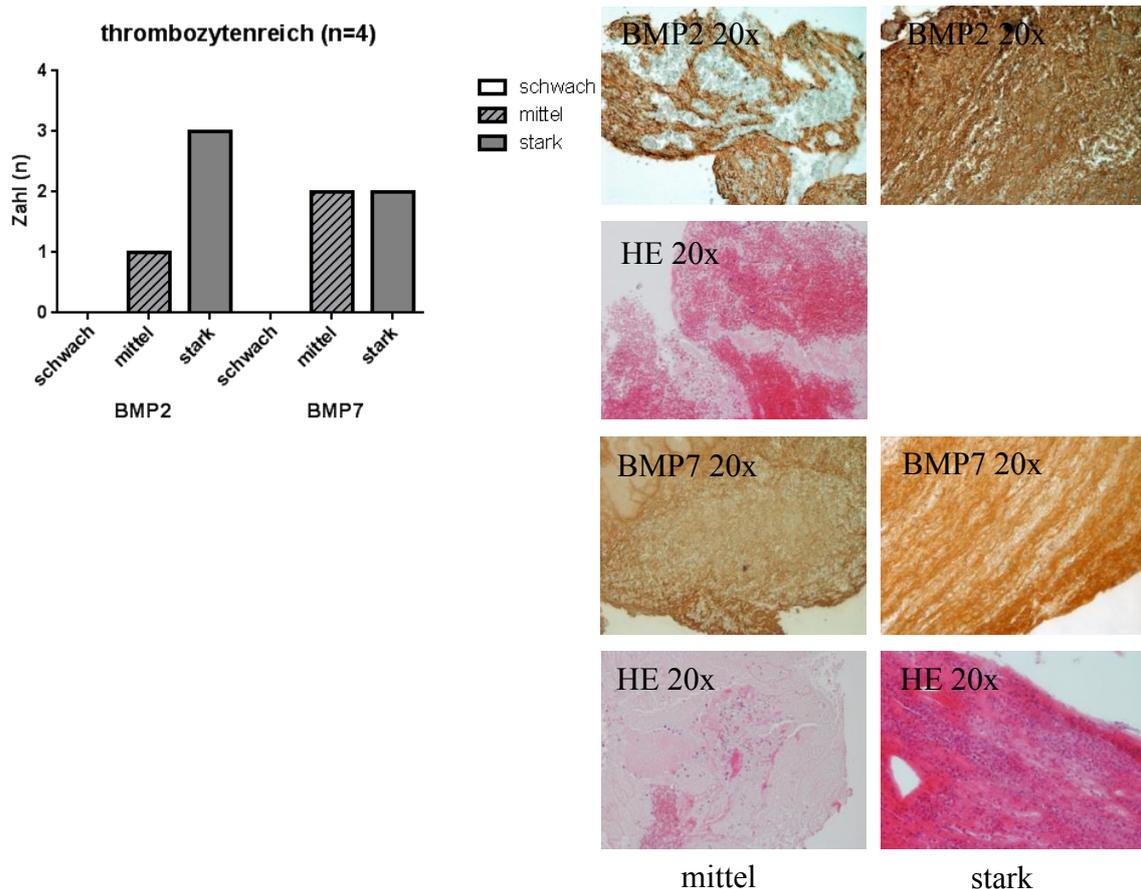


Abbildung 8: BMP2 und BMP7 in thrombozytenreichen Thromben mit repräsentativen immunhistochemischen Färbungen und den jeweiligen HE-Färbungen (20x Objektiv)

Unter den drei zellreichen Thromben fand sich sowohl für BMP2 als auch für BMP7 jeweils eine schwache, eine mittlere und eine starke Expression (Abb. 9).

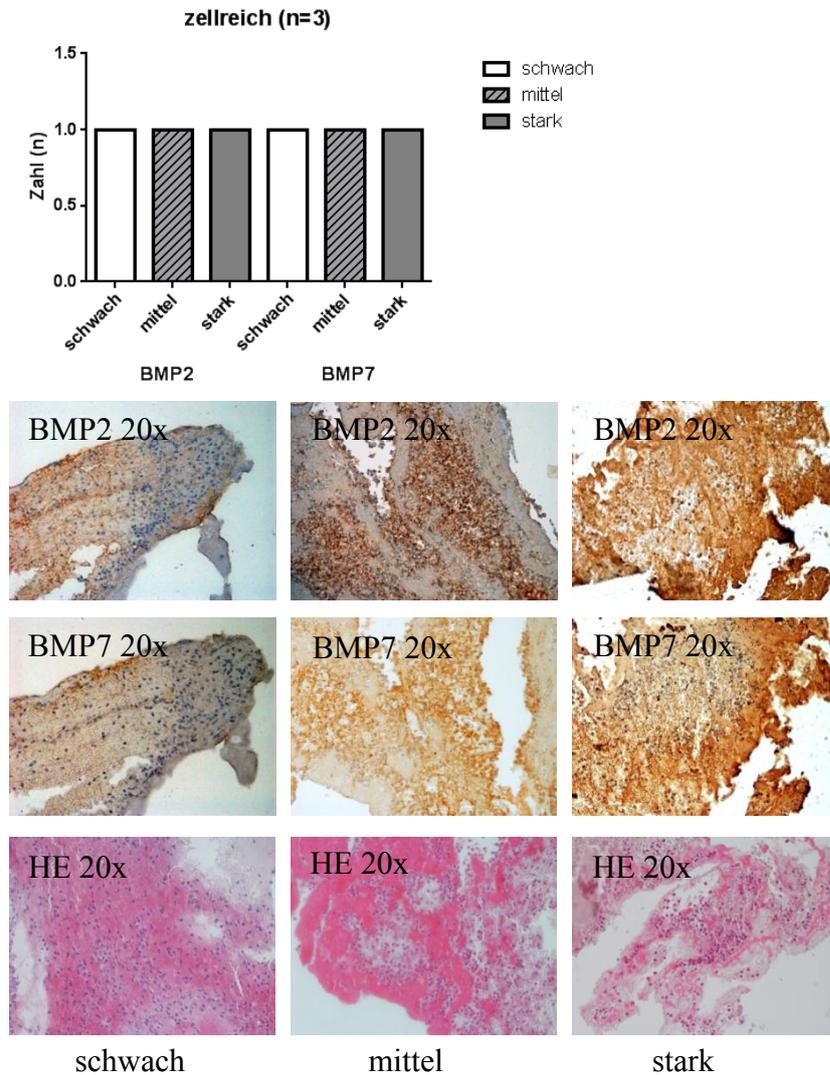


Abbildung 9: BMP2 und BMP7 in zellreichen Thromben mit repräsentativen immunhistochemischen Färbungen und den jeweiligen HE-Färbungen (20x Objektiv)

Betrachtet man die vier fibrotisch amorphen Thromben, weist einer eine schwache BMP2 Expression auf, zwei eine mittlere und einer eine starke. Das gleiche Ergebnis zeigte sich auch für BMP7 (Abb. 10).

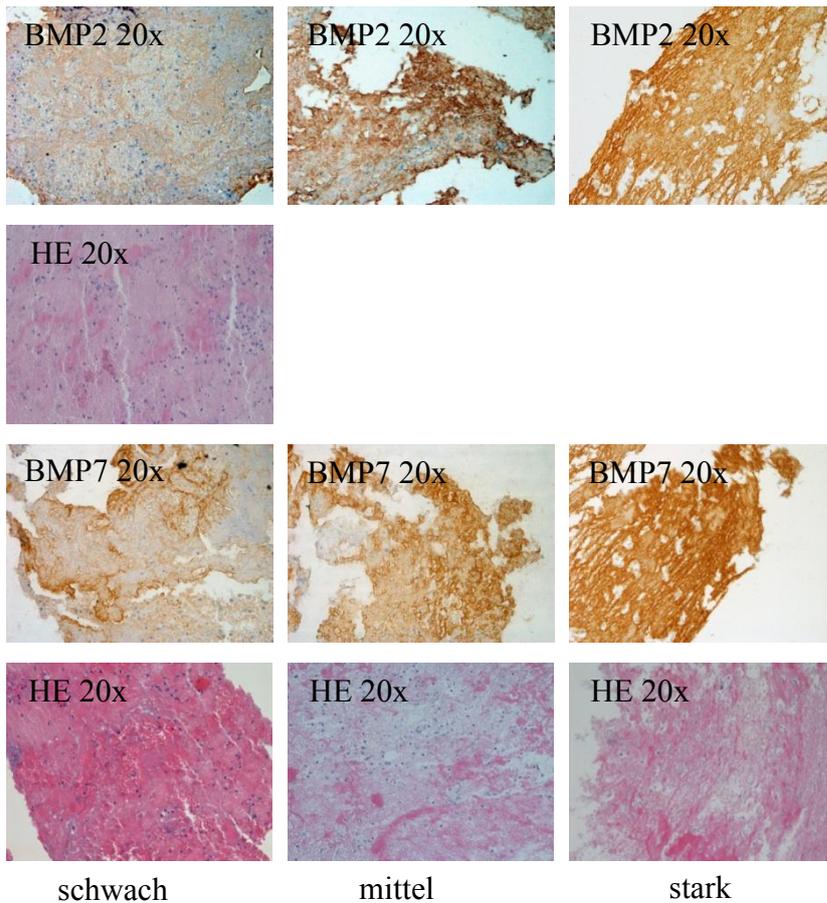
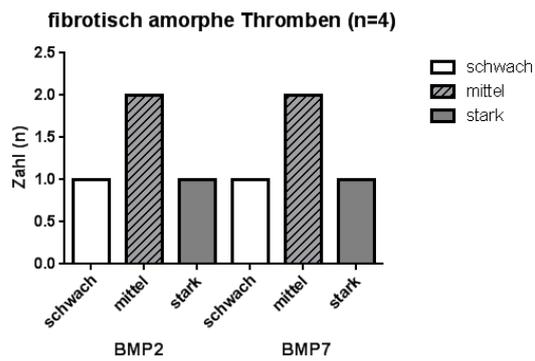


Abbildung 10: BMP2 und BMP7 in fibrotisch amorphen Thromben mit repräsentativen immunohistochemischen Färbungen und den jeweiligen HE-Färbungen (20x Objektiv)

Unter den dreizehn Thromben gemischter Morphologie fanden sich schließlich einer mit einer schwachen BMP2 Expression, elf mit einer mittleren und einer mit einer starken. Dasselbe gilt für die BMP7 Expression (Abb.11).

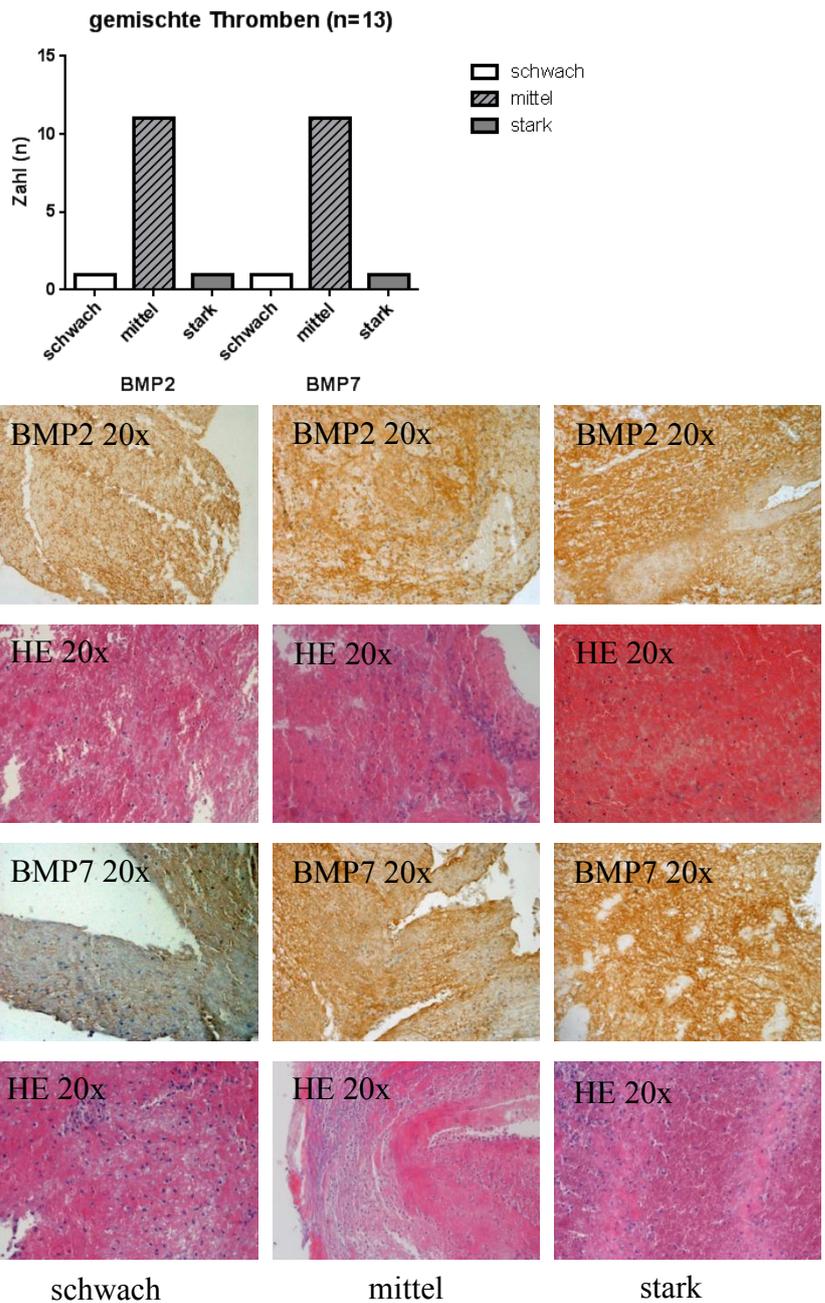


Abbildung 11: BMP2 und BMP7 in gemischten Thromben mit repräsentativen immunhistochemischen Färbungen und den jeweiligen HE-Färbungen (20x Objektiv)

Um die Expression von MPO, BMP4, Histon H3, SDF1 und TLR4 zwischen den Thromben besser vergleichen zu können, wurde als nächstes nach den exprimierenden Zellen pro Gesichtsfeld geschaut. In einem weiteren Schritt wurde für BMP4, Histon

H3, SDF1 und TLR4 die exprimierende Fläche im Verhältnis zur sichtbaren Gesamtfläche betrachtet. Hierzu wurde die Image Analysis Toolbox der Software ImageJ verwendet. Die folgenden Abbildungen zeigen die Ergebnisse dieser Auswertungen bezüglich der verschiedenen Thrombusmorphologien (Abb 12-Abb.16).

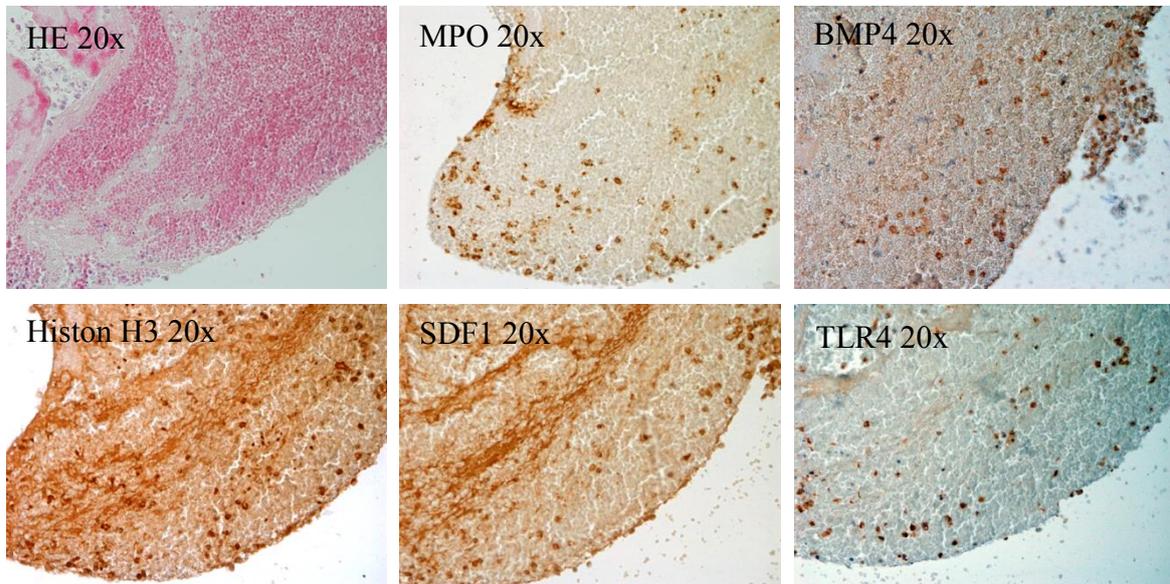
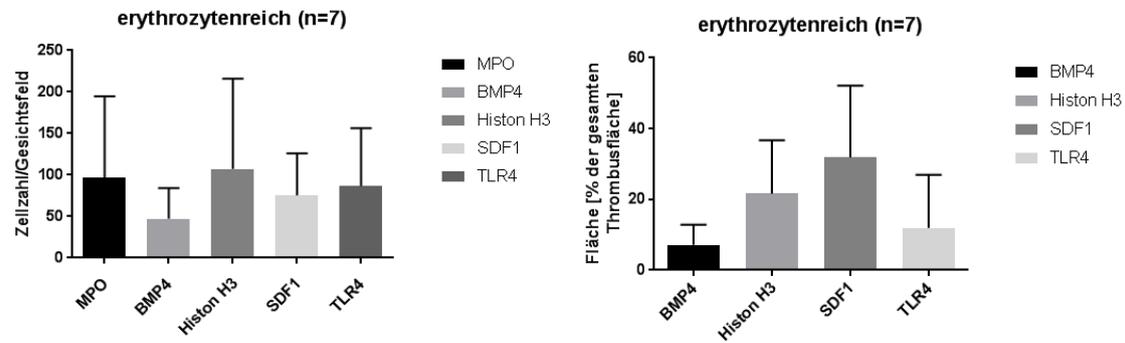


Abbildung 12: Zellzahl/Gesichtsfeld von MPO, BMP4, Histon H3, SDF1 und TLR4 bei erythrozytenreichen Thromben

Fläche in % der gesamten Thrombusfläche von BMP4, Histon H3, SDF1 und TLR4 bei erythrozytenreichen Thromben mit repräsentativen immunhistochemischen Färbungen und der zugehörigen HE-Färbung (20x Objektiv)

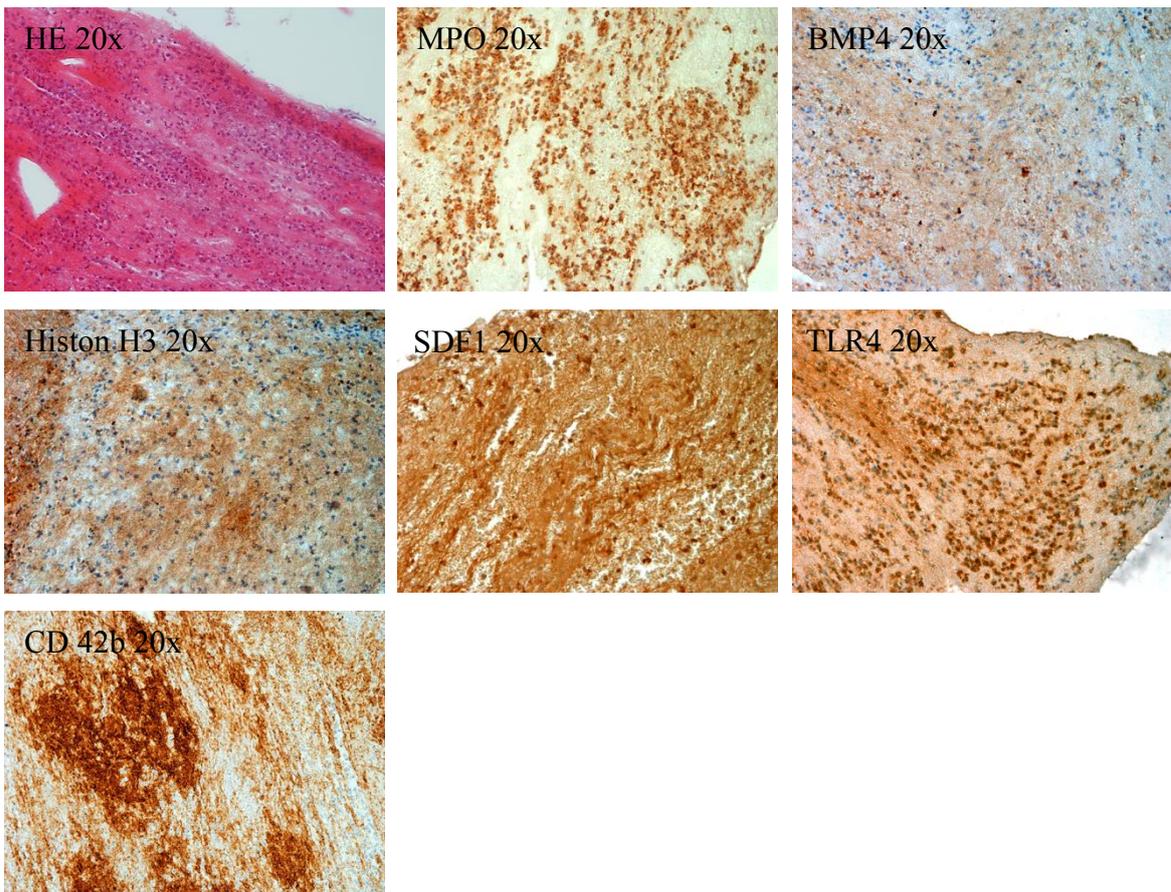
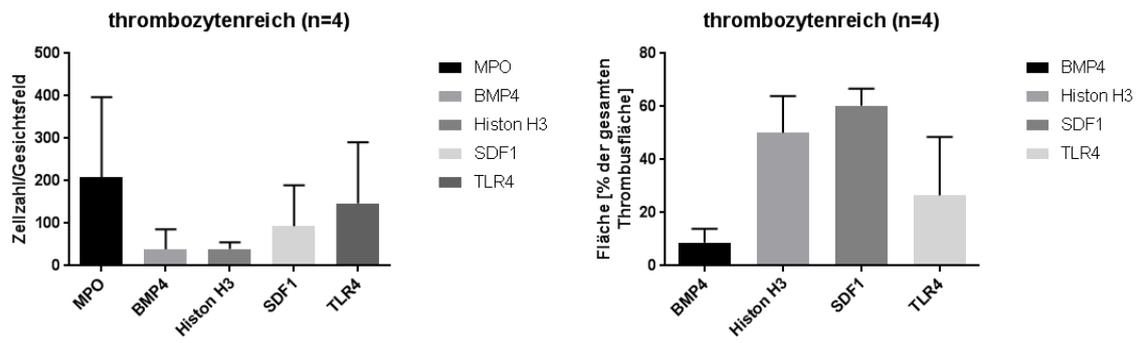


Abbildung 13: Zellzahl/Gesichtsfeld von MPO, BMP4, Histon H3, SDF1 und TLR4 bei thrombozytenreichen Thromben

Fläche in % der gesamten Thrombusfläche von BMP4, Histon H3, SDF1 und TLR4 bei thrombozytenreichen Thromben mit repräsentativen immunhistochemischen Färbungen, der zugehörigen HE-Färbung und der zugehörigen CD42b Färbung zur Darstellung des Thrombozytenanteils (20x Objektiv)

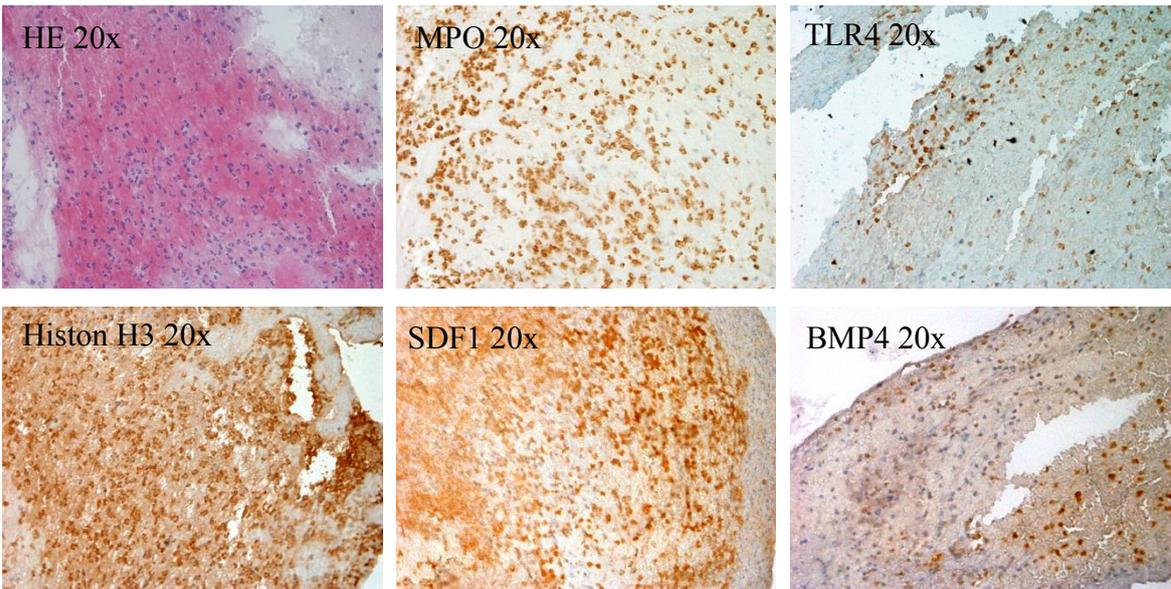
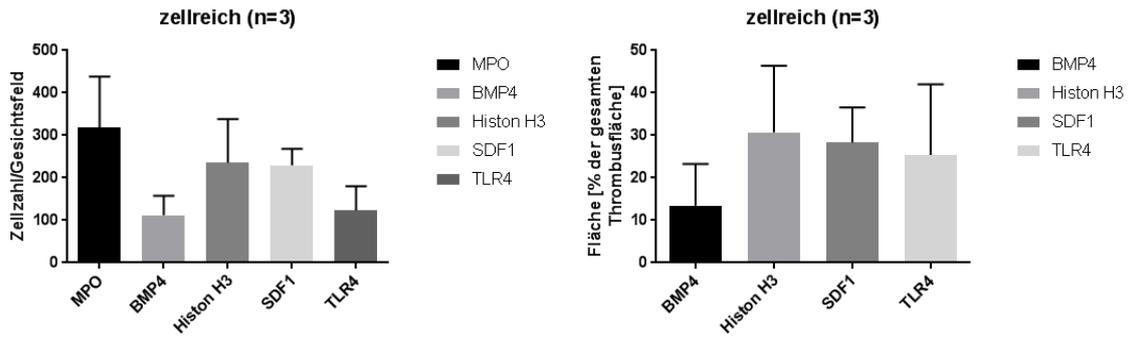
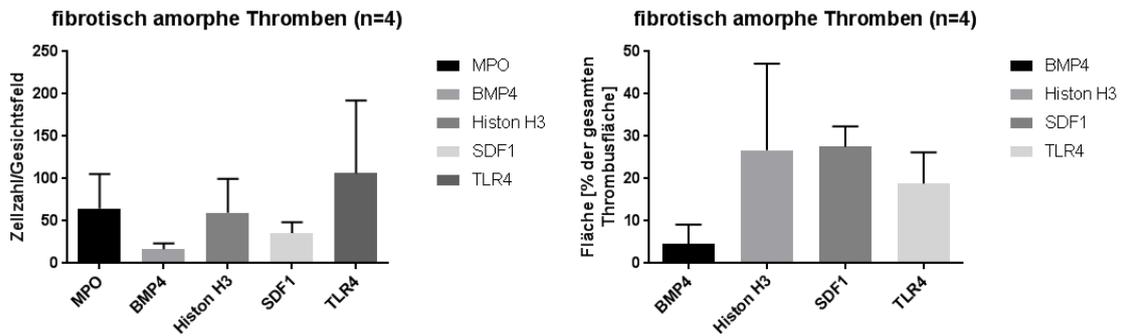


Abbildung 14: Zellzahl/Gesichtsfeld von MPO, BMP4, Histon H3, SDF1 und TLR4 bei zellreichen Thromben

Fläche in % der gesamten Thrombusfläche von BMP4, Histon H3, SDF1 und TLR4 bei zellreichen Thromben mit repräsentativen immunhistochemischen Färbungen und der zugehörigen HE-Färbung (20x Objektiv)



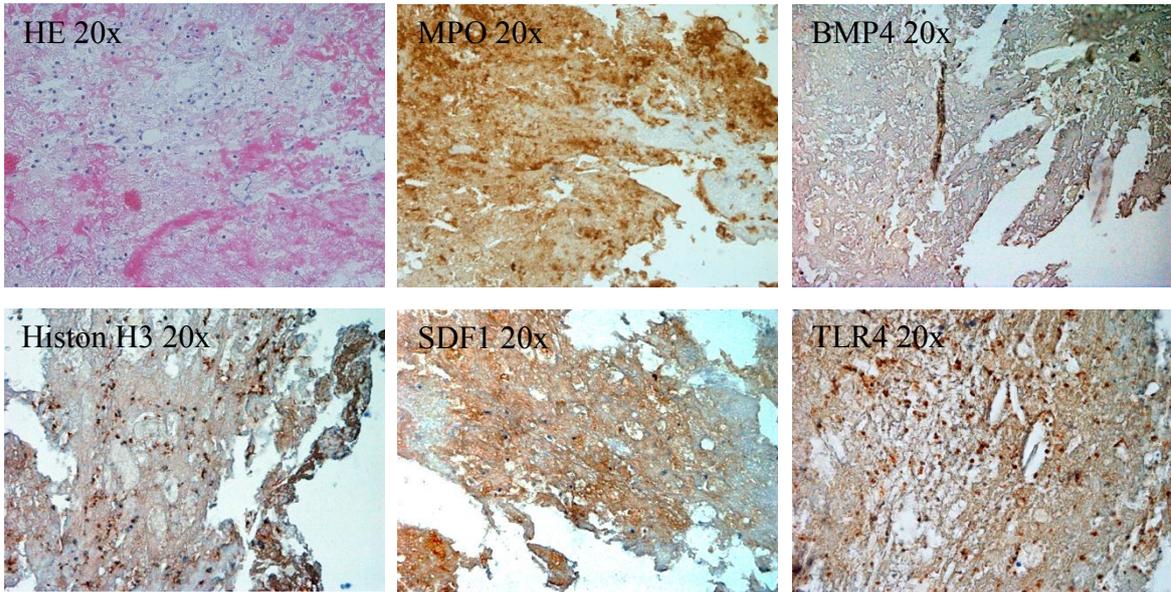
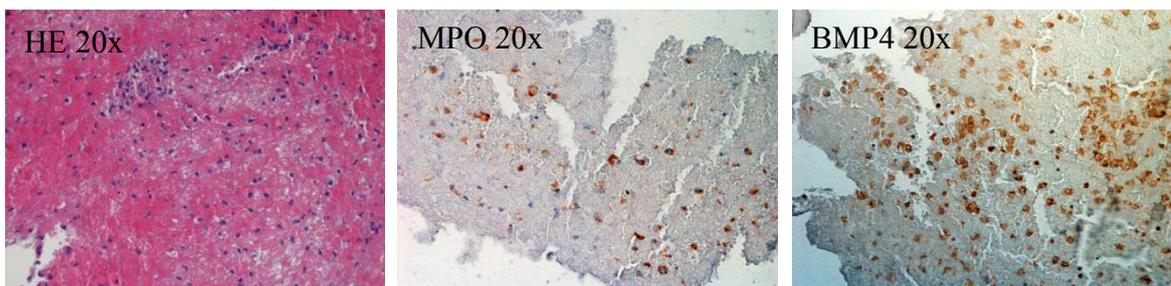
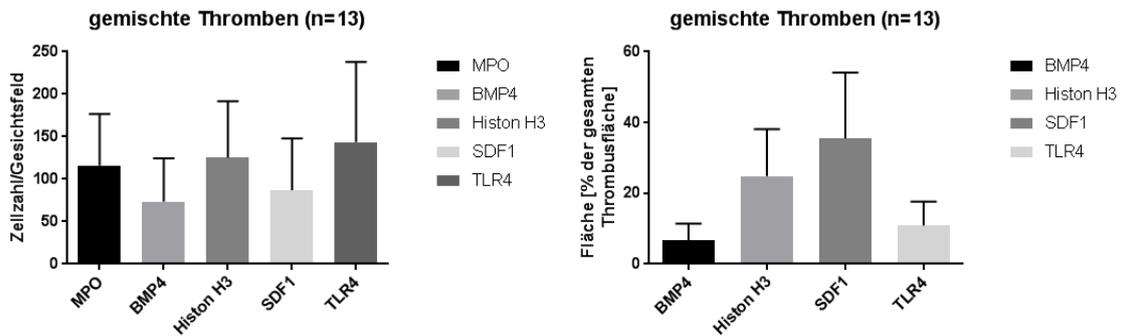


Abbildung 15: Zellzahl/Gesichtsfeld von MPO, BMP4, Histon H3, SDF1 und TLR4 bei fibrotisch amomorphen Thromben

Fläche in % der gesamten Thrombusfläche von BMP4, Histon H3, SDF1 und TLR4 bei fibrotisch amomorphen Thromben mit repräsentativen immunhistochemischen Färbungen und der zugehörigen HE-Färbung (20x Objektiv)



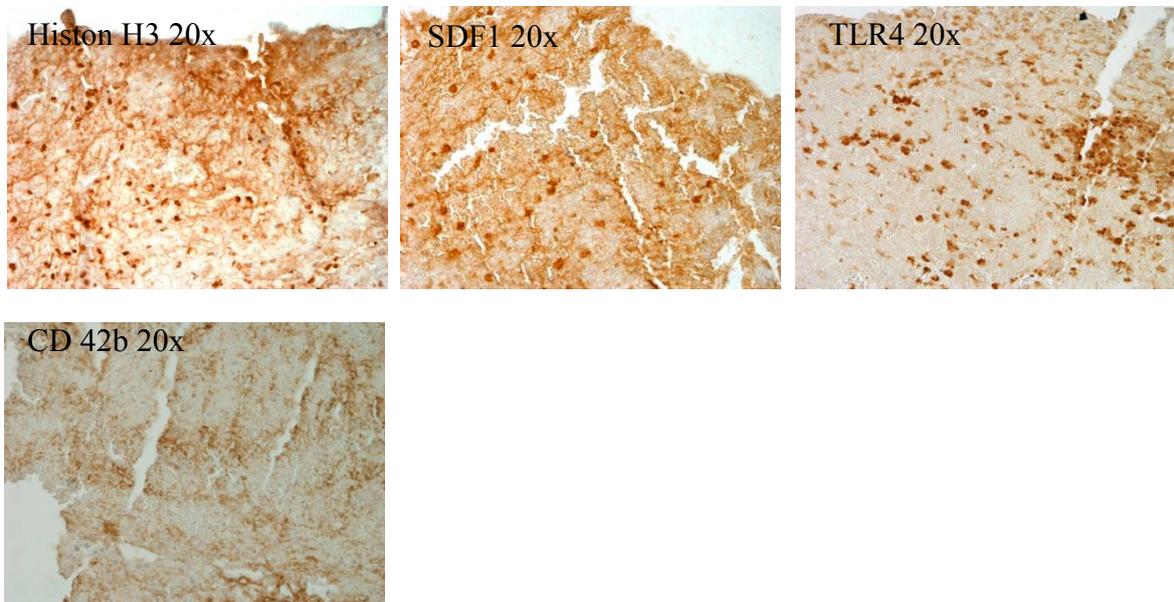
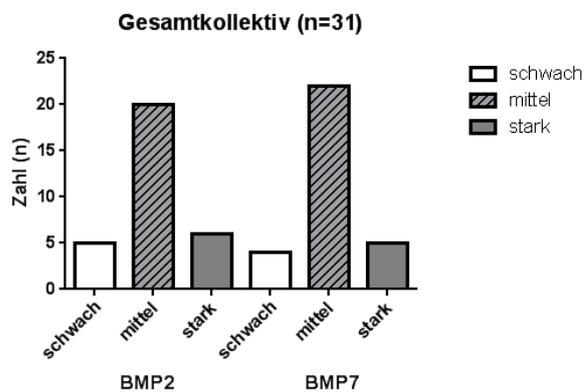


Abbildung 16: Zellzahl/Gesichtsfeld von MPO, BMP4, Histon H3, SDF1 und TLR4 bei gemischten Thromben

Fläche in % der gesamten Thrombusfläche von BMP4, Histon H3, SDF1 und TLR4 bei gemischten Thromben mit repräsentativen immunhistochemischen Färbungen, der zugehörigen HE-Färbung und der zugehörigen CD 42b Färbung zur Darstellung des Thrombozytenanteils (20x Objektiv)

Für das Gesamtkollektiv ergibt sich somit folgendes Bild (Abb.17):



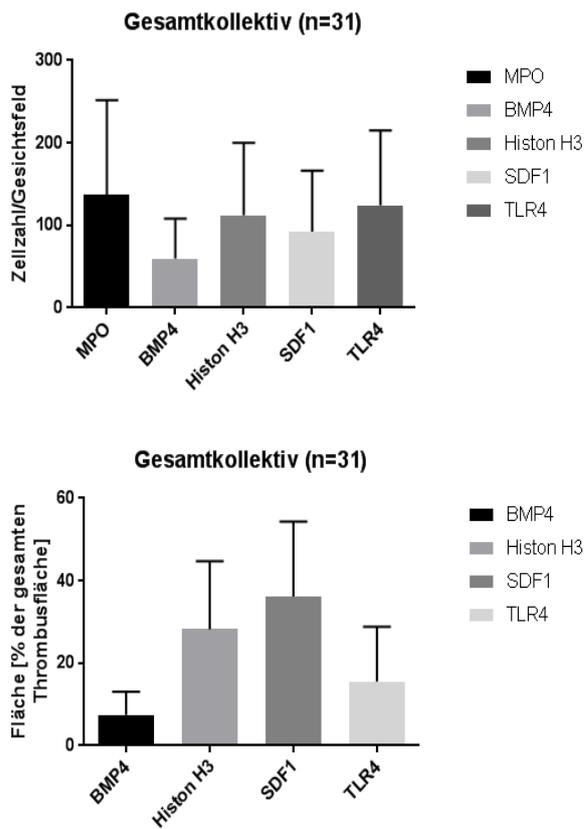


Abbildung 17: Expression von BMP2 und BMP7, Anzahl exprimierender Zellen pro Gesichtsfeld für MPO, BMP4, Histon H3, SDF1 und TLR4 und exprimierende Fläche in % der gesamten Thrombusfläche für BMP4, Histon H3, SDF1 und TLR4 im Gesamtkollektiv

Es zeigte sich, dass v.a. Histon H3 und SDF1 eine flächige Expression aufwiesen, während die anderen Marker eher in abgrenzbaren Zellen zu finden waren. Bilder der HE-Färbungen aller Thromben finden sich im Anhang (s.S.94).

3.3 Korrelationen nach Spearman mit Schwerpunkt auf der ermittelten Proteinexpression

Kardiomyozyten und kardiale Fibroblasten setzen Mitglieder der TGF- β -Familie frei, darunter BMP2, das an der embryonalen Kardiomyogenese beteiligt (Behfar, Atta, et al. 2002) und bei Myokardinfarkt in den Perinfarktkardiomyozyten hochreguliert ist (Chang, Sung-A., et al. 2008). Es zeigte sich eine hoch signifikante Korrelation zwischen BMP2- und BMP7-Expression ($r=0,502$; $p=0,004$). Monozyten exprimieren Rezeptoren für BMP7 und differenzieren nach Bindung von BMP7 zu M2

Makrophagen, was zur kardioprotektiven Wirkung von BMP7 beiträgt (Urbina, Princess; Singla, Dinender 2014). Zudem war eine hohe BMP2 Expression auch mit einer hohen TLR4 Zellzahl assoziiert ($r=0,394$; $p=0,028$).

In Bezug auf die Anzahl MPO positiver Zellen fand sich eine signifikante Korrelation mit der Anzahl der BMP4 positiven Zellen ($r=0,375$; $p=0,037$). BMP4 wird von Kardiomyozyten exprimiert (Pallotta, Isabella, et al. 2015), fördert die Apoptose von Kardiomyozyten und wird bei Ischämie und Reperfusion hochreguliert (Ogura, Yasuhiro, et al. 2012).

Darüber hinaus fand sich eine hoch signifikante Korrelation der Anzahl der MPO positiven Zellen mit der Anzahl der Histon H3 positiven Zellen ($r=0,461$; $p=0,009$), der SDF1 positiven Zellen ($r=0,544$; $p=0,002$), das von Thrombozyten (Uematsu, Manabu, et al. 2015; Chatterjee, M.; Gawaz, M. 2013; Massberg, Steffen, et al. 2006), Perinfarkt-kardiomyozyten (Abbott, J. Dawn, et al. 2004) und Endothelzellen (Uematsu, Manabu, et al. 2015; Ceraldini, Daniel J., et al. 2004) exprimiert wird, und der TLR4 positiven Zellen ($r=0,488$; $p=0,005$).

Des Weiteren korrelierte die Anzahl der BMP4 positiven Zellen signifikant mit der Anzahl der TLR4 positiven Zellen ($r=0,432$; $p=0,015$) und hoch signifikant mit der Anzahl der Histon H3 positiven Zellen ($r=0,634$; $p<0,001$) und den SDF1 positiven Zellen ($r=0,730$; $p<0,001$).

Auch zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Anteil der BMP4 exprimierenden Fläche und dem Anteil der SDF1 exprimierenden Fläche ($r=0,398$; $p=0,027$).

Histone sind in großer Menge in allen eukaryotischen Zellen vorhanden (Thatcher, Thomas H.; Gorovsky, Martin A. 1994; Vogel, Benjamin, et al. 2015). Interessanterweise korrelierte die Anzahl der Histon H3 positiven Zellen hochsignifikant mit der Anzahl der SDF1 positiven Zellen ($r=0,542$; $p=0,002$) und der Anzahl der TLR4 positiven Zellen ($r=0,483$; $p=0,006$).

Darüber hinaus fand sich zwischen dem Anteil der Histon H3 exprimierenden Fläche und dem Anteil der SDF1 exprimierenden Fläche ein hochsignifikanter ($r=0,548$; $p=0,001$), zwischen dem Anteil der Histon H3 exprimierenden Fläche und dem Anteil der TLR4 exprimierenden Fläche ($r=0,440$; $p=0,013$) und der linksventrikulären Ejektionsfraktion ein signifikanter Zusammenhang ($r=0,394$; $p=0,046$).

Außerdem zeigte sich eine hochsignifikante Korrelation zwischen der Anzahl der SDF1 positiven Zellen und der Anzahl der TLR4 positiven Zellen ($r=0,502$; $p=0,004$).

Schließlich war ein hoher Anteil der TLR4 exprimierenden Fläche auch mit einem hohen Anteil der SDF1 exprimierenden Fläche assoziiert ($r=0,501$; $p=0,004$). TLR4 wird bei akutem Myokardinfarkt von Monozyten überexprimiert (Tapp, L. D., et al. 2013). Außerdem ist TLR4 aus Thrombozyten und Endothelzellen an der Thrombusbildung in vivo beteiligt (Kondo, Kensuke, et al. 2015). Zudem fand sich ein signifikanter, negativer Zusammenhang zwischen der TLR4 Zellzahl und dem Schweregrad der koronaren Herzkrankheit ($r=-0,359$; $p=0,048$).

Überraschenderweise war ein hoher Anteil der TLR4 exprimierenden Fläche mit einem geringen BMI assoziiert ($r=-0,440$; $p=0,031$).

Tabelle 12 stellt übersichtlich die gefundenen Korrelationen in einer Matrix dar.

Tabelle 12: Korrelationsmatrix mit den Korrelationskoeffizienten nach Spearman

Variable	BMP 2Expression	BMP 7Expression	MPO Zellzahl	BMP 4Zellzahl	BMP 4exprimierende Fläche	H3Zellzahl	H3exprimierende Fläche	SDF1 Zellzahl	SDF1 exprimierende Fläche	TLR 4Zellzahl	TLR 4exprimierende Fläche	KHK	BMI
BMP 7Expression	0,502**												
MPO Zellzahl	0,347	0,177											
BMP 4Zellzahl	-0,097	-0,093	0,375*										
BMP 4exprimierende Fläche	0,168	-0,160	0,316	0,227									
H3Zellzahl	-0,054	-0,134	0,461**	0,634**	0,297								
H3exprimierende Fläche	0,156	0,228	0,065	-0,089	0,310	-0,103							
SDF1 Zellzahl	0,023	0,131	0,544**	0,730**	0,066	0,542**	-0,122						
SDF1 exprimierende Fläche	0,056	0,005	-0,031	0,162	0,398*	-0,172	0,548**	-0,101					

e													
TLR 4Zellzahl	0,394*	0,264	0,488**	0,432*	0,015	0,483**	0,073	0,502**	-0,132				
TLR 4exprimierende Fläche	0,179	0,283	-0,069	0,206	0,338	-0,019	0,440*	0,009	0,501**	0,126			
KHK	-0,202	-0,036	-0,197	-0,240	0,050	-0,063	-0,182	-0,061	-0,196	0,359*	-0,019		
BMI	-0,128	-0,343	-0,062	-0,151	-0,158	-0,054	-0,258	-0,064	-0,065	-0,218	0,440**	-0,195	
LVEF	0,013	-0,016	0,025	0,175	0,163	0,208	0,394*	0,175	0,160	0,058	0,171	-0,080	-0,025

3.4 Signifikanter Unterschied der Anzahl MPO positiver Zellen zwischen Clopidogrel- und Prasugreleinnahme

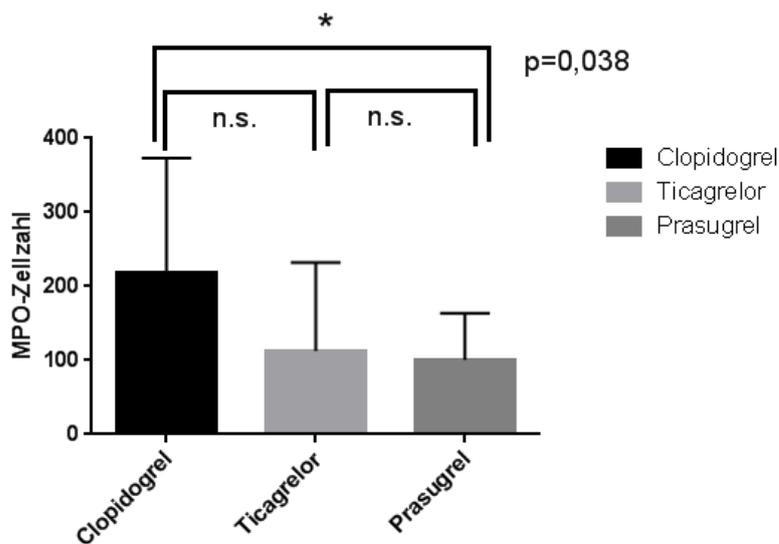


Abbildung 18: Die Anzahl MPO positiver Zellen in Abhängigkeit von der antiaggregatorischen Therapie unterscheidet sich signifikant zwischen Clopidogrel und Prasugrel (p=0,038).

MPO stellt einen wichtigen Marker für eine stattfindende Inflammation dar (Rathnayake, Nilminie, et al. 2015; Husted, Steen, et al. 2010). Sie ist ein redoxaktiviertes Hämprotein, das reichlich in polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten zu finden ist und bis zu 5 % ihrer gesamten intrazellulären Proteine ausmacht. Daneben wird sie von Monozyten und Gewebsmakrophagen exprimiert (Lau,

Denise; Baldus, Stephan 2006).

Interessanterweise zeigte sich ein signifikanter Unterschied der Anzahl MPO positiver Zellen zwischen den Thromben der Patienten, die ein Loading mit Clopidogrel erhalten haben (n=9), und den Thromben der Patienten, die ein Loading mit Prasugrel erhalten haben (n=17; p=0,038). Auch die Anzahl MPO positiver Zellen bei den Thromben der Patienten, die ein Loading mit Ticagrelor erhalten haben (n=5), scheint deutlich geringer als bei einem Loading mit Clopidogrel zu sein, erreichte jedoch keine Signifikanz (p=0,266).

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der wesentlichen Ergebnisse

Aus der durchgeführten Studie lassen sich folgende Erkenntnisse ziehen:

Die Thromben der Patienten, die Prasugrel bekommen haben, weisen signifikant weniger MPO positive Zellen auf als die Thromben derjenigen, die Clopidogrel bekommen haben.

4.2 Aufbau arterieller Thromben

Die Thrombusbildung beruht auf einem empfindlichen Gleichgewicht zwischen antithrombotischen und prothrombotischen Faktoren (Kondo, Kensuke, et al. 2015).

Bei Thrombosen werden Abscheidungsthrombus, hyaliner Thrombus und Gerinnungsthrombus unterschieden. Die größte klinische Bedeutung haben Abscheidungsthromben über atherosklerotischen Plaques, v.a. in den Koronararterien.

Beim Abscheidungsthrombus kommt es bei der Endothelschädigung zur Freilegung subendothelialer Faktoren. Der Von-Willebrand-Faktor vermittelt eine Thrombozytenadhäsion an Gefäßwandstrukturen. In der Folge freigesetzte Faktoren bewirken, dass die Thrombozyten zu einem irreversiblen grauweißen Plättchenthrombus verklumpen, was als Thrombozytenaggregation bezeichnet wird.

Thrombin fördert einerseits die Thrombozytenaggregation und führt andererseits zur Fibrinbildung. Das Fibrin lagert sich netzförmig auf dem Plättchenthrombus ab und schließt dabei auch Leukozyten und Erythrozyten mit ein, was schließlich zu einer Gefäßobliteration führt (Böcker et al. 2012).

Histologisch zeigen Abscheidungsthromben einen schichtweisen Aufbau aus Fibrinnetzen mit Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozytenlamellen sowie häufig inflammatorischen Zellen (Böcker et al 2012; Yunoki, Kei, et al. 2012).

Sadowski, Marcin, Zabczy, Michał und Undas, Anetta untersuchten 40 durch Aspiration gewonnene intrakoronare Thromben von STEMI-Patienten auf ihre Zusammensetzung.

Dabei zeigte sich, dass der Hauptbestandteil der Thromben Fibrinfasern sind. Der Fibringehalt war dabei umso höher, je mehr Zeit zwischen Symptombeginn und Thrombusaspiration verstrichen war, während der Erythrozytengehalt mit der Zeit von 31,4 % auf 1,7 % sank. Der Thrombo- und Leukozytengehalt wurde auf im Durchschnitt 11,6 % bzw. 3,7 % geschätzt, ohne eine Assoziation zur Dauer seit

Symptombeginn aufzuweisen. Daneben fanden sich in einigen der Thromben auch Cholesterinkristalle.

Darüber hinaus zeigten Patienten mit Niereninsuffizienz, positiver Familienanamnese für KHK oder arterieller Hypertonie einen höheren Fibringehalt als die Patienten ohne diese Risikofaktoren.

Ein hoher Fibringehalt in intrakoronaren Thromben, insbesondere in den frühen Stunden eines STEMIs, steht im Zusammenhang mit der Aktivierung von Endothelzellen, neutrophiler Granulozyten und Thrombozyten, was bedeutende Assoziationen zwischen zellulären und plasmatischen Blutbestandteilen während der Thrombusbildung auf rupturieren Plaques der Koronararterien hervorhebt (Sadowski, Marcin; Zabczy, Michał; Undas, Anetta 2014).

Es konnte u.a. nachgewiesen werden, dass Rauchen ein unabhängiger Faktor für das Vorkommen erythrozytenreicher Thromben ist.

Außerdem enthielten erythrozytenreiche Thromben mehr inflammatorische Zellen und entsprachen einer höheren Thrombuslast, die zu einer beeinträchtigten elektrokardiografischen und angiografischen Myokardreperfusion und einem Fortschreiten der linksventrikulären Umbauvorgänge führen (Yunoki, Kei, et al. 2012).

Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine hohe Dichte neutrophiler Granulozyten im aspirierten Thrombus mit einer beeinträchtigten koronaren Mikrozirkulation und linksventrikulärer Dysfunktion assoziiert ist (Arakawa, Kentaro, et al. 2009).

Ein frischer Thrombus enthält vitale Granulozyten, Thrombozyten und Erythrozyten. Nach >24 Stunden werden lytische Veränderungen sichtbar. Nach mehr als 5 Tagen kommt es schließlich zur Organisation des Thrombus mit Einwachsen von Spindelzellen und Ablagerung von Kollagen (Kramer, Miranda CA 2008).

4.3 BMP2, BMP4 und BMP7 bei kardiovaskulären Erkrankungen

BMP2 wird während myokardialer Ischämie von Periinfarktmyozyten exprimiert (Sanders, Lehanna N., et al. 2016). Kardiomyozyten exprimieren bekanntermaßen BMP2 und BMP4, die als chemotaktische Faktoren wirken können. Des Weiteren werden sie auch von Makrophagen exprimiert und sind an ihrer Rekrutierung beteiligt (Pallotta, Isabella, et al. 2015). Monozyten exprimieren Rezeptoren für BMP7 und differenzieren nach Bindung zu M2 Makrophagen (Urbina, Princess; Singla, Dinender

2014).

Kardiomyozyten und kardiale Fibroblasten setzen TGF β und BMP2 frei, was die kardiale Differenzierung pluripotenter Stammzellen in funktionierende Kardiomyozyten induziert und auf diese Weise eine Verbesserung der Kontraktionsleistung des infarzierten Myokards vermittelt. Somit ist BMP2 an der kardialen Reparatur nach Myokardinfarkt beteiligt (Behfar, Atta, et al. 2002; Chang, Sung-A., et al. 2008; DeGeorge Jr, Brent R., et al. 2008). Die genaue Rolle der BMP Signalwege bei kardialer Gewebereparatur und nach kardialer Schädigung ist jedoch noch unklar (Sanders, Lehanna N., et al. 2016).

Es konnte gezeigt werden, dass fibroblast growth factor-2 (FGF-2) mit BMP2 synergistisch dafür sorgen, dass murine Knochenmarkstammzellen in Gegenwart von neonatalen, ventrikulären Kardiomyozyten der Ratte die morphologischen, biochemischen und funktionellen Merkmale von Kardiomyozyten annehmen (DeGeorge Jr, Brent R., et al. 2008). Im infarzierten Myokard differenzierten Stammzellen in funktionierende Kardiomyozyten und verbesserten so die Kontraktionsleistung. Die parakrine TGF β /BMP2-Funktion des Herzens bietet demnach eine Möglichkeit zur Optimierung stammzellbasierter, therapeutischer Strategien für die kardiale Reparatur (Behfar, Atta, et al. 2002). Auch die Anwendung von BMP4 bei der kardiovaskulären Reparatur könnte zu einer verstärkten kardialen (Cagavi, Esra, et al. 2014) bzw. endothelialen (Jumabay, Medet, et al. 2012) Differenzierung implantierter Stammzellen führen und so die Regeneration fördern (Cagavi, Esra, et al. 2014; Jumabay, Medet, et al. 2012).

BMP2 wird in der Infarktzone und in der Grenzzone nach akutem Myokardinfarkt gegenüber dem normalen Myokard signifikant hochreguliert (Chang, Sung-A., et al. 2008; DeGeorge Jr, Brent R., et al. 2008). Die Gabe von rekombinantem BMP2 verkleinert bei Mäusen die Infarktgröße nach Myokardinfarkt (Pallotta, Isabella, et al. 2015).

Es konnte gezeigt werden, dass BMP2 nach ischämischer Schädigung am frühesten induziert wird und zwar am Tag 1 nach Myokardinfarkt und einen Gipfel am Tag 3 erreicht, was dem Muster der inflammatorischen Phase der kardialen Reparatur entspricht. Während der BMP2 Suppression werden ab Tag 5 BMP4, BMP6 und BMP10 hochreguliert und persistieren während der Fibrose und Narbenbildung.

TNF α trägt zur Induktion des BMP2 Gens nach Myokardinfarkt bei. BMP2 wiederum induziert E-Selectin und Gremlin2, das wohl als Schutz vor Inflammation in der Grenzzone des Infarkts wirkt. Durch diese negative Rückkopplung bewirkt BMP2 möglicherweise die Hemmung seiner eigenen Aktivität. BMP2 erhöht das Ausmaß der Inflammation durch Induktion proinflammatorischer Zelladhäsionsmembranproteine in Endothelzellen (Sanders, Lehanna N., et al. 2016). Abbildung 19 fasst die Rolle von BMP2 bei ischämischer Schädigung zusammen.

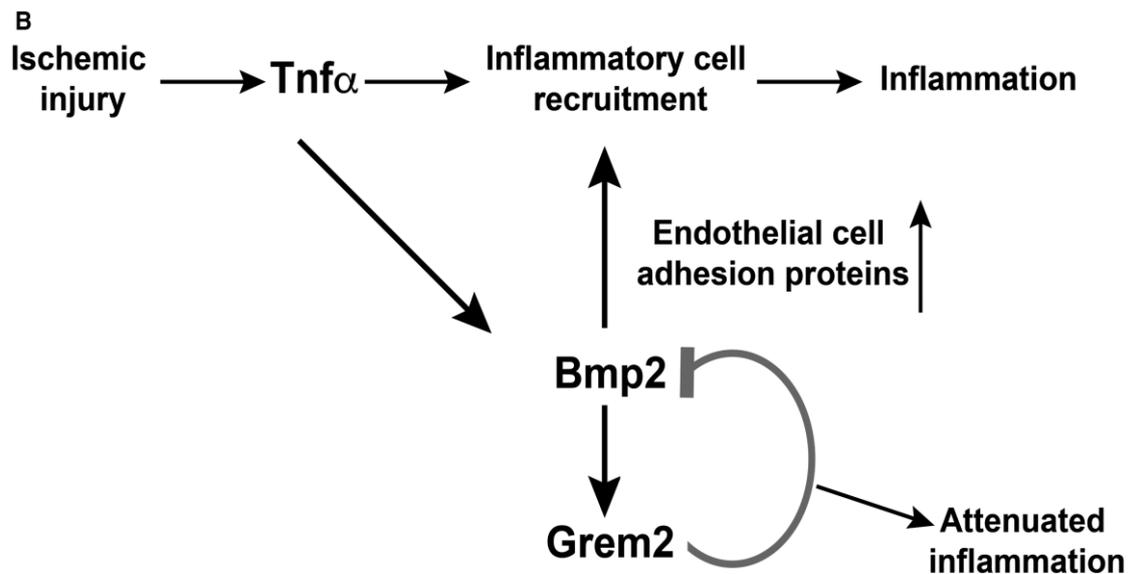


Abbildung 19 Bei ischämischer Schädigung sorgt TNF α für die Rekrutierung inflammatorischer Zellen. Gleichzeitig induziert es die BMP2-Expression, das die Inflammation zusätzlich verstärkt. Durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus über Gremlin 2 wird das Ausmaß der Inflammation und damit der ischämischen Schädigung begrenzt (Sanders, Lehanna N., et al. 2016).

Ischämie und Reperfusion führten zu einer gesteigerten kardialen BMP4 Expression (Ogura, Yasuhiro, et al. 2012; Pachori, Alok S. 2010; Wu, Xueping, et al. 2014), was mit einer verstärkten Phosphorylierung von Smad1/5/8 assoziiert ist (Ogura, Yasuhiro, et al. 2012). Wu et al. untersuchten, ob BMP4 und seine Rezeptoren bei den Umbauvorgängen nach Infarkt und bei Herzversagen aktiviert werden. Dabei zeigte sich, dass die BMP4 Expression im Herzen bei Patienten nach Bypassoperation und bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie erhöht war, aber nicht bei Patienten mit Herzversagen nach Infarkt. Wu et al. führen dies auf die bessere Fähigkeit zur Gewebereparatur und Umbauvorgängen bei den Bypassoperierten zurück. Zudem haben die Patienten mit Herzversagen möglicherweise durch eine verminderte BMP

Rezeptorexpression ein geringeres Ansprechen auf BMP4 (Wu, Xueping, et al. 2014). BMP Signalwege werden nach ischämischer Schädigung in adulten Mäuseherzen induziert und sind während Ischämie und Reperfusion in die Apoptose von Kardiomyozyten verwickelt (Sanders, Lehanna N., et al. 2016).

Über einen Smad1-abhängigen Signalweg schützt BMP2 während Hypoxie und Reoxygenierung als pro-Überlebensfaktor eine Reihe von Zelltypen vor Apoptose (DeGeorge Jr, Brent R., et al. 2008; Yuan, Shi-Min; Jing, Hua 2010; Li, Ning; Pasha, Zeeshan; Ashraf, Muhammad 2014).

Für BMP4 wurden sowohl anti- als auch proapoptotische Effekte beschrieben. So soll die BMP4-Aktivität die Apoptose von Kardiomyozyten bei durch Ischämie und Reperfusionsschädigung induzierten Myokardinfarkten fördern (Ogura, Yasuhiro, et al. 2012; Pachori, Alok S. 2010) und spielt demnach eine wichtige Rolle in der Regulation des Kardiomyozytenverlusts nach Ischämie-Reperfusionsschädigung. Daher könnte ein BMP Inhibitor zur Behandlung der akuten Schädigung durch Ischämie und Reperfusion beitragen (Pachori, Alok S. 2010). Dabei zeigte sich, dass heterozygote BMP4 knockout Mäuse vor der akuten Schädigung durch Ischämie und Reperfusion nach Myokardinfarkt geschützt sind, kleinere Infarkte, geringere Apoptose und eine Herunterregulation proapoptotischer Proteine im Vergleich zu Wildtypmäusen nach Ischämie und Reperfusion aufweisen (Mungrue, Imran N., et al. 2011; Pachori, Alok S. 2010; Ogura, Yasuhiro, et al. 2012).

Andererseits konnte gezeigt werden, dass BMP4 einen durch Wasserstoffperoxid induzierten Zelltod reduzieren und die Zellschädigung nach Hypoxie vermindern kann (Wu, Xueping, et al. 2014). Pallotta et al. diskutierten einen positiven Effekt der BMPs auf die Umbauvorgänge nach Myokardinfarkt. Dies sei entweder auf eine antiapoptotische Wirkung oder eine vermehrte Differenzierung von Vorläuferzellen in Kardiomyozyten zurückzuführen (Pallotta, Isabella, et al. 2015).

Also könnte BMP4 je nach Zelltyp, Dosis, Spezies und Einwirkungsdauer unterschiedliche Wirkungen ausüben (Wu, Xueping, et al. 2014).

Zudem besitzt BMP4 eine proinflammatorische Wirkung, indem es die Expression von TNF α und Il-6 erhöht. Die Anwendung von FSTL1 vermindert vermutlich durch Antagonisierung sowohl der proinflammatorischen als auch der proapoptotischen Funktionen von BMP4 die akute Schädigung durch Hypoxie und Reperfusion (Ogura,

Yasuhiro, et al. 2012). Abcc6 wirkt über die Hemmung der BMP Signalwege kardioprotektiv. Mungrue et al. fanden heraus, dass Abcc6 Mangel das Infarktareal vergrößert und Apoptose auslöst (Mungrue, Imran N., et al. 2011).

BMP7 wirkt dem fibrogenetischen Effekt des TGF β 1 aus Makrophagen entgegen (Wang, Mei, et al. 2015; Xu, Xingbo, et al. 2015a; Xu, Xingbo, et al. 2015b; Merino, David, et al. 2016) und könnte deshalb eine wirksame Behandlungsstrategie der kardialen Fibrose nach ischämischer Schädigung darstellen (Xu, Xingbo, et al. 2015a; Xu, Xingbo, et al. 2015b; Wang, Mei, et al. 2015). Die Aortenstenose führt zu einer Druckbelastung des linken Ventrikels und führt dadurch zu pathologischen linksventrikulären Umbauvorgängen in Form von konzentrischer Hypertrophie und interstitieller und perivaskulärer Fibrose. Die Gabe von rekombinantem BMP7 kann vor diesen ungünstigen linksventrikulären Umbauvorgängen schützen (Merino, David, et al. 2016), was man sich auch bei den Umbauvorgängen durch Ischämie und Reperfusion bei Myokardinfarkt zunutze machen könnte.

In der hier vorliegenden Arbeit zeigte sich eine hoch signifikante Korrelation zwischen BMP2- und BMP7-Expression, was auf sich ergänzende Wirkungen in Bezug auf Myokardinfarkt hinweist. So schützen sowohl BMP2 (Pallotta, Isabella, et al. 2015) als auch BMP7 (Merino, David, et al. 2016) vor ungünstigen kardialen Umbauvorgängen, was evtl. auf die antiapoptotische Wirkung (DeGeorge Jr, Brent R., et al. 2008; Li, Ning; Pasha, Zeeshan; Ashraf, Muhammad 2014; Yuan, Shi-Min; Jing, Hua. 2010; Urbina, Princess; Singla, Dinender 2014) zurückzuführen ist. Das gefundene Expressionsmuster und die tendenziell stärkere Expression in der Gruppe der thrombozytenreichen Thromben, weist auf eine Expression durch Thrombozyten hin. Eine Expression der BMPs in Thrombozyten konnten u.a. auch Kalén et al. zeigen (Kalén, Anders, et al. 2008).

Zudem war eine hohe BMP2 Expression auch mit einer hohen TLR4 Zellzahl assoziiert. Des Weiteren korrelierte die Anzahl der BMP4 positiven Zellen signifikant mit der Anzahl der TLR4 positiven Zellen und hoch signifikant mit der Anzahl der Histon H3 positiven Zellen und den SDF1 positiven Zellen.

Auch zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Anteil der BMP4 exprimierenden Fläche und dem Anteil der SDF1 exprimierenden Fläche. BMP4 fördert

die Bildung vaskulärer Netzwerke und induziert ALK 1, dessen Aktivierung ein zentrales Element der Angiogenese darstellt (Jumabay, Medet, et al. 2012). SDF-1 soll die Neovaskularisation in ischämischem Gewebe fördern (Stellos, Konstantinos, et al. 2008b; Stellos, Konstantinos, et al. 2008a; Takahashi, Masafumi 2010).

4.4 Histon H3 bei kardiovaskulären Erkrankungen

Histone kommen in Eukaryoten ubiquitär vor (Thatcher, Thomas H.; Gorovsky, Martin A. 1994; Vogel, Benjamin, et al. 2015) und spielen eine wichtige Rolle in der Struktur und Funktion des Chromatins (Thatcher, Thomas H.; Gorovsky, Martin A. 1994).

Histonmodifikationen spielen eine Rolle in der endogenen Erholung nach Myokardinfarkt (Schiano, Concetta, et al. 2015). Histon H3.3 ist speziell an Orten mit hoher Zellteilung zu finden und könnte eine Rolle bei der Regeneration von Kardiomyozyten spielen (Goldman, Joseph Aaron, et al. 2017).

Histondeacetylasen besitzen wichtige Funktionen bei pathologischen, kardialen Umbauvorgängen, darunter ventrikuläre Hypertrophie, Apoptose, Nekrose, Metabolismus, Kontraktilität und Fibrose (Zakharova, Liudmila, et al. 2015; Xie, Min, et al. 2014). Histondeacetylasen scheinen zudem eine bedeutende Rolle in der Bestimmung der Schwere eines Myokardinfarkts zu spielen.

Trichostatin-A kann über die Hemmung von Histondeacetylasen die kardiale Leistungsfähigkeit erhalten, myokardiale Umbauvorgänge durch die Stimulation endogener, kardialer Regeneration mildern und die Bildung von Myozyten und Mikrogefäßen im Herzen verstärken (Schiano, Concetta, et al. 2015). Die Behandlung mit dem Histondeacetylaseinhibitor Suberoylanilidhydroxamsäure (SAHA) konnte bei Kaninchen durch die Induktion von Kardiomyozyten die Infarktgröße reduzieren und z.T. die systolische Funktion bewahren (Xie, Min, et al. 2014). Die Behandlung mit Mocetinostat könnte über die Acetylierung von Histon H3 für die Hochregulation der Expression von kardialen und Stammzellgenen sorgen und auf diese Weise das Überleben von Stammzellen verbessern (Zakharova, Liudmila, et al. 2015). Histondeacetylaseinhibitoren scheinen also kardioprotektive Wirkungen zu besitzen, können nach Myokardinfarkt den Verlust der myokardialen Leistungsfähigkeit durch Stimulation der Angiogenese minimieren und das sogar noch eine Stunde nach der Ischämie, was auf einen potenziellen Nutzen in Herzkatheterlaboren hinweisen könnte

(Xie, Min, et al. 2014; Schiano, Concetta, et al. 2015).

Die Histonmethylierung könnte bei der Apoptose von Makrophagen bei der Bildung instabiler Plaques eine Rolle spielen (Cong, Guangzhi, et al. 2017).

Reiss et al. fanden in Ratten mit großen Infarkten gegenüber placebooperierten Ratten eine erhöhte Expression von Histon H3 in Myozyten, was ein Zeichen für induzierte DNA-Synthese nach Myokardinfarkt darstellen könnte (Reiss, Krzysztof, et al. 1994).

Phosphoryliertes Histon H3 ist ein etablierter Marker für den mitotischen Index der Kardiomyozyten (Li, Yongjun, et al. 2013; Sur, Swastika, et al. 2016; Bai, Chen-Guang, et al. 2008). Es zeigte sich, dass die Expression von phosphoryliertem Histon H3 im infarzierten Rattenherz gegenüber einem gesunden Herz signifikant erhöht war (Li, Yongjun, et al. 2013). Bai et al. fanden über die Bestimmung von phosphoryliertem Histon H3 heraus, dass das HIF-System Kardiomyozyten dazu stimulieren kann, wieder in den Zellzyklus einzutreten (Bai, Chen-Guang, et al. 2008). Suzuki et al. untersuchten die Auswirkungen mesenchymaler Stammzellen auf hibernierendes Myokard von Schweinen und konnten dabei eine erhöhte Anzahl phospho Histon3 positiver Kardiomyozyten feststellen (Suzuki, Gen, et al. 2011). Nach Bypassoperationen oder PTCA in Schweinen kann darüber hinaus in der Neointima ein Anstieg der Expression von phosphoryliertem Histon H3 beobachtet werden (Sur, Swastika, et al. 2016).

Histone sind extrem zytotoxisch, wenn sie aus sterbenden Zellen freigesetzt werden.

Deshalb stellten Vogel et al. die Hypothese auf, wonach die myokardiale Nekrose nach einem Myokardinfarkt zu einer unkontrollierten Freisetzung toxischen Chromatins aus Kardiomyozyten führt und so zur ischämischen Schädigung beitragen könnte.

Die Gabe von DNase1 vermag nekrotisches Chromatin zu stören und so die histoninduzierte Nekrose zu vermindern. Tatsächlich kann als eine Art endogener Rettungsmechanismus nach Myokardinfarkt eine erhöhte DNaseaktivität gemessen werden, was Schutz vor histoninduzierter Schädigung bieten kann (Vogel, Benjamin, et al. 2015). Der Einsatz neutralisierender Antikörper gegen Histone konnte die kardiale Dysfunktion bei Sepsis vermindern (Kalbitz, Miriam, et al. 2015). Diese kardioprotektive Wirkung der neutralisierenden Antikörper gegen Histone könnte man sich auch in der Behandlung der Ischämie-Reperfusionsschädigung nach Myokardinfarkt zunutze machen.

In der hier vorliegenden Arbeit korrelierte die Anzahl der Histon H3 positiven Zellen hochsignifikant mit der Anzahl der SDF1 positiven Zellen und der Anzahl der TLR4 positiven Zellen. Freie Histone stellen endogene damage-associated molecular patterns (DAMPs) dar, welche möglicherweise mit TLR2, TLR4 und TLR9 auf einer Reihe verschiedener Zelltypen, darunter Kardiomyozyten und zirkulierende, inflammatorische Zellen, interagieren, um den Organismus vor Gefahr zu warnen (Kalbitz, Miriam, et al. 2015; Vogel, Benjamin, et al. 2015).

Darüber hinaus fand sich zwischen dem Anteil der Histon H3 exprimierenden Fläche und dem Anteil der SDF1 exprimierenden Fläche ein hochsignifikanter, zwischen dem Anteil der Histon H3 exprimierenden Fläche und dem Anteil der TLR4 exprimierenden Fläche und der linksventrikulären Ejektionsfraktion ein signifikanter Zusammenhang. Letztes könnte darauf hinweisen, dass eine gute Regenerationsfähigkeit mit hoher Histoneexpression zu einer gut erhaltenen Auswurfleistung führt.

4.5 TLR4 bei kardiovaskulären Erkrankungen

TLR4 wird sowohl von Immunzellen als auch von Nichtimmunzellen exprimiert (Karper, Jacco C., et al. 2013; Avlas, Orna, et al. 2016), so z.B. von Monozyten (Bastiaansen, Antonius JNM, et al. 2014; Tapp, L. D., et al. 2013; Kashiwagi, Manabu, et al. 2012), Makrophagen (Bastiaansen, Antonius JNM, et al. 2014; Kashiwagi, Manabu, et al. 2012; Yin, Yan-Wei, et al. 2014; Džumhur, Andrea, et al. 2012), von vaskulären glatten Muskelzellen (Karper, Jacco C., et al. 2013), von Endothelzellen (Kondo, Kensuke, et al. 2015; Yin, Yan-Wei, et al. 2014), Thrombozyten (Kondo, Kensuke, et al. 2015) und von Kardiomyozyten (Avlas, Orna, et al. 2016).

TLR4 spielt eine wichtige Rolle bei Atherosklerose (Yin, Yan-Wei, et al. 2014). Blich et al. fanden heraus, dass Heparanase über TLR2 und TLR4 Makrophagen aktivieren kann, was mit einer merklichen Zytokinexpression mit Plaqueprogression hin zu vulnerablen Plaques einhergeht (Blich, Miry, et al. 2013). Kondo et al. konnten zeigen, dass TLR4 aus Endothelzellen und Thrombozyten an der Thrombusbildung *in vivo* beteiligt ist (Kondo, Kensuke, et al. 2015).

Darüber hinaus spielt TLR4 eine Schlüsselrolle bei der Aktivierung inflammatorischer Signalwege bei ACS und wird bei Myokardinfarkt hochreguliert (Kashiwagi, Manabu, et al. 2012; Tapp, L. D., et al. 2013; Yin, Yan-Wei, et al. 2014; Džumhur, Andrea, et al.

2012; Van der Pouw Kraan, Tineke CTM, et al. 2014; Bastiaansen, Antonius JNM, et al. 2014; Ding, Hua-Sheng, et al. 2013; Avlas, Orna, et al. 2016; Van Den Akker, F.; De Jager, S. C. A.; Sluijter, J. P. G. 2013). Zudem konnte gezeigt werden, dass das Ausmaß der TLR4 Aktivierung nach einem Myokardinfarkt mit der Ischämie-Reperfusionsschädigung sowie linksventrikulärer Dysfunktion korreliert (Van Den Akker, F.; De Jager, S. C. A.; Sluijter, J. P. G. 2013; Wang, Xian-tao, et al. 2017; Van der Pouw Kraan, Tineke CTM, et al. 2014).

TLR4 und sein Ligand HMBG1 sind bekannt dafür, eine pathogenetische Rolle für die Apoptose von Kardiomyozyten bei myokardialer Ischämie-Reperfusionsschädigung zu spielen (Ding, Hua-Sheng, et al. 2013; Yang, Jun, et al. 2015).

Die Überexpression von RP105 führte zu einer Reduktion der Infarktgröße, weniger apoptotischen Kardiomyozyten und einer verminderten mitochondrialen Apoptosekaskadenaktivität, was eine kardioprotektive Rolle von RP105 bei Ischämie und Reperfusion nahelegt, die auf die spezifische Unterdrückung TLR4-abhängiger, proinflammatorischer und -apoptotischer Wirkungen zurückzuführen ist (Yang, Jun, et al. 2015).

Die TLR4 vermittelte Aktivierung proinflammatorischer Monozyten ist entscheidend für die Pathogenese des ACS (Kashiwagi, Manabu, et al. 2012; Bastiaansen, Antonius JNM, et al. 2014; Van der Pouw Kraan, Tineke CTM, et al. 2014) und eine effektive, postischämische Neovaskularisation.

Es konnte gezeigt werden, dass das TLR4 Beimmolekül RP105 eine wichtige Rolle in der Kollateralenbildung nach Ischämie spielt (Bastiaansen, Antonius JNM, et al. 2014) und einen potenten Hemmer postinterventioneller Neointimabildung darstellt (Karper, Jacco C., et al. 2013). TLR4 hemmt den pGSK3 β -Weg, der zum Schutz des Myokards beiträgt (Avlas, Orna, et al. 2016). Abbildung 20 zeigt die TLR4 vermittelte Schädigung der Kardiomyozyten bei Ischämie.

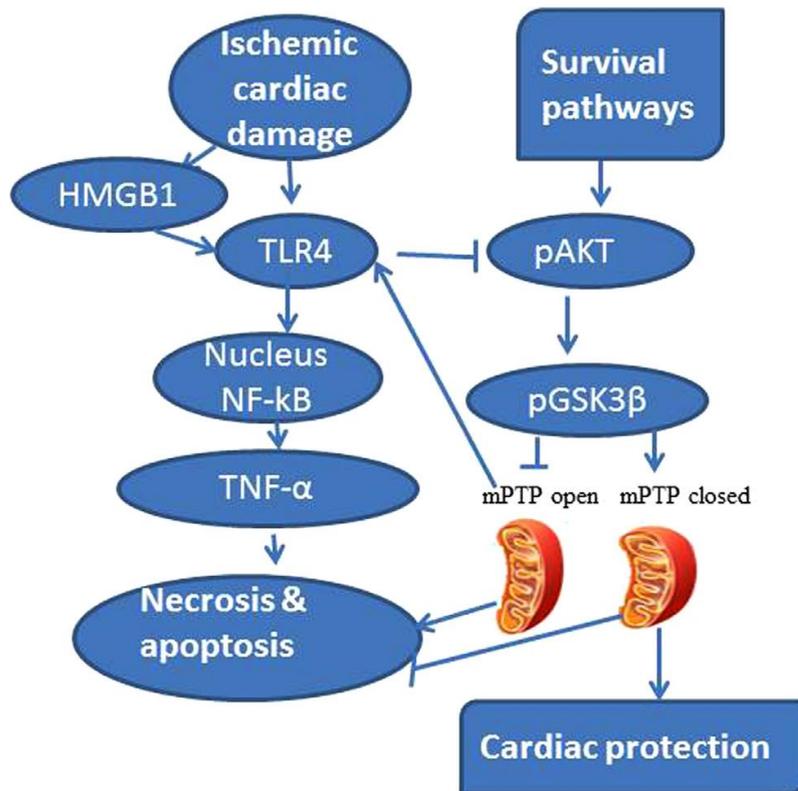


Abbildung 20 TLR4 vermittelt bei ischämischer Schädigung über NFκB die Freisetzung inflammatorischer Substanzen wie TNF α, was zu Nekrose und Apoptose führt. Der pGSK3β-Weg, der das Herz schützt, wird jedoch gehemmt (Avlas, Orna, et al. 2016)

Eine Hemmung der TLR4 Signalwege konnte das Zellüberleben sowie den kardialen Umbau nach hypoxischer Schädigung durch Schwächung inflammatorischer und apoptotischer Signale verbessern und könnte so der Behandlung myokardialer Ischämie-Reperfusionsschädigung dienen (Avlas, Orna, et al. 2016; Wang, Xian-tao, et al. 2017; Yang, Jun, et al. 2015; Ding, Hua-Sheng, et al. 2013; Van der Pouw Kraan, Tineke CTM, et al. 2014; Tapp, L. D., et al. 2013).

S100 Proteine spielen bei Freisetzung aus nekrotischen Zellen eine aktive Rolle in Gewebeinflammation und –reparatur (Rohde, David, et al. 2014).

Die TLR4 Liganden S100A8 und S100A9 werden infolge eines Myokardinfarktes lokal freigesetzt und verstärken die inflammatorische Antwort auf myokardiale Ischämie-Reperfusionsschädigung (Schiopu, Alexandru; Cotoi, Ovidiu S. 2013).

Mäuse mit TLR4-Mangel weisen eine geringere Apoptose von Kardiomyozyten, eine geringere Infarktgröße, eine geringere Expression inflammatorischer Marker bei Ischämie und eine geringere Infiltration neutrophiler Granulozyten ins myokardiale

Gewebe auf (Ding, Hua-Sheng, et al. 2013; Džumhur, Andrea, et al. 2012; Avlas, Orna, et al. 2016).

Bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt war TLR4 auf CD14⁺CD16⁺ Monozyten signifikant mehr exprimiert als auf CD14⁺CD16⁻ Monozyten. In der gegenüber Plaqueruptur besonders empfindlichen Schulterpartie finden sich auch häufig Makrophagen mit starker TLR4 Expression. Die Modulation der Monozytensubpopulation könnte daher ein Therapieziel bei Myokardinfarkt darstellen (Kashiwagi, Manabu, et al. 2012).

Die TLR4 Überexpression durch Monozyten bei akutem Myokardinfarkt ist assoziiert mit hohen Plasmakonzentrationen an inflammatorischen Zytokinen (Kashiwagi, Manabu, et al. 2012; Tapp, L. D., et al. 2013).

Die Rekrutierung mesenchymaler Stammzellen zu apoptotischen kardialen Zellen nach Myokardinfarkt, scheint einen entscheidenden Mechanismus für die Reparatur und Regeneration des geschädigten Myokards darzustellen (Vogel, Sebastian, et al. 2014). Die Aktivierung von TLR4 über HMBG1 kann eine ungünstige Umgebung für mesenchymale Stammzellen schaffen, was ihre therapeutische Effektivität nach Myokardinfarkt vermindert (Van Den Akker, F.; De Jager, S. C. A.; Sluijter, J. P. G. 2013; Vogel, Sebastian, et al. 2014). Die Blockade von TLR4 könnte demnach die Wirksamkeit dieser Therapieformen aufgrund einer verbesserten Infiltration ins geschädigte Gewebe verbessern (Vogel, Sebastian, et al. 2014).

In der hier durchgeführten Studie war ein hoher Anteil der TLR4 exprimierenden Fläche mit einem hohen Anteil der SDF1 exprimierenden Fläche assoziiert. Die TLR4 vermittelte Aktivierung proinflammatorischer Monozyten ist entscheidend für eine effektive, postischämische Neovaskularisation (Bastiaansen, Antonius JNM, et al. 2014). Ebenso spielt SDF-1 α eine bedeutende Rolle für eine effektive Angiomyogenese im infarzierten Herzen (Elmadbouh, I. et al. 2007).

Zudem fand sich ein signifikanter, negativer Zusammenhang zwischen der TLR4 positiven Zellzahl und dem Schweregrad der koronaren Herzkrankheit. Dies überrascht, da eine starke TLR4 Expression v.a. in fortgeschrittenen, fettreichen atherosklerotischen Plaques gefunden wurde (Džumhur, Andrea, et al. 2012; Kashiwagi, Manabu, et al. 2012) und man daher eher bei schwerer KHK eine hohe Expression erwarten würde.

Überraschenderweise war ein hoher Anteil der TLR4 exprimierenden Fläche mit einem geringen BMI assoziiert.

4.6 SDF-1 bei kardiovaskulären Erkrankungen

Thrombozyten stellen eine Hauptquelle von SDF-1 α dar und speichern es als Teil ihres α -Granula-Sekretoms (Uematsu, Manabu, et al. 2015; Chatterjee, M.; Gawaz, M. 2013; Massberg, Steffen, et al. 2006). Zudem wird SDF1 von Kardiomyozyten (Uematsu, Manabu, et al. 2015; Abbott, J. Dawn, et al. 2004; Proulx, Cindy, et al. 2007; Chen, Jiqui, et al. 2010), glatten Muskelzellen (Massberg, Steffen, et al. 2006) und Endothelzellen (Uematsu, Manabu, et al. 2015; Ceraldini, Daniel J., et al. 2004) exprimiert.

HIF-1-induzierte SDF-1 Expression erhöht die Adhäsion, Migration und das Homing zirkulierender CXCR4 positiver Progenitorzellen in ischämischem Gewebe, beispielsweise dem infarzierten Myokard (Uematsu, Manabu, et al., 2015; Ceradini, Daniel J., et al. 2004; Stellos, Konstantinos, et al. 2008b; Ghadge, Santhosh K., et al. 2011; Stellos, Konstantinos, et al. 2008a). Abbildung 21 zeigt die Rolle der SDF-1/CXCR4-Achse im ischämischen Myokard.

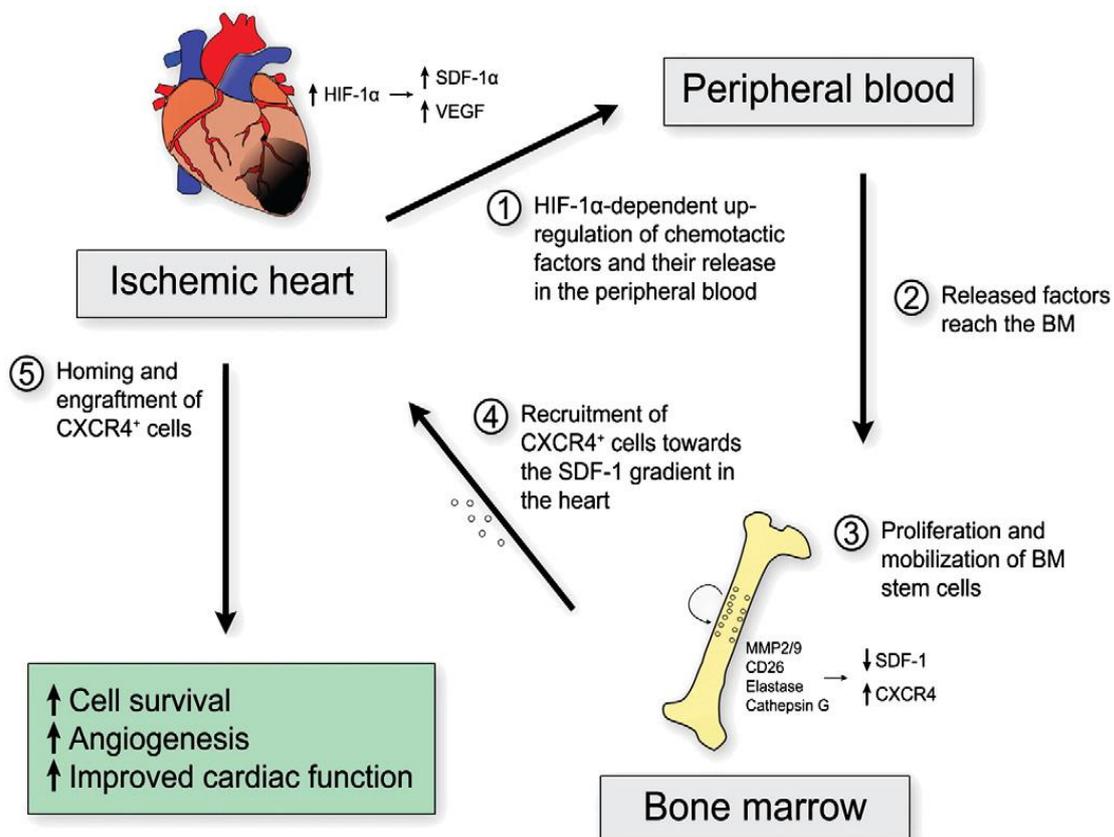


Abbildung 21 Im ischämischen Myokard vermittelt HIF-1 α die Hochregulation von SDF-1 α , welches ein verbessertes Zellüberleben, eine verstärkte Angiogenese sowie eine verbesserte kardiale Funktion vermittelt (Ghadge, Santhosh K., et al. 2011)

SDF-1 α spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese des Myokardinfarkts und für die kardiale Reparatur (Ghadge, Santhosh K., et al. 2011; Stellos, Konstantinos, et al. 2008a). SDF-1 fördert die Neovaskularisation in ischämischem Gewebe (Stellos, Konstantinos, et al. 2008b; Stellos, Konstantinos, et al. 2008a; Takahashi, Masafumi 2010). Zudem soll SDF-1 α auch direkte kardioprotektive Effekte nach Myokardinfarkt ausüben (Takahashi, Masafumi 2010; Stellos, Konstantinos, et al. 2008a).

Lokale SDF-1 Expression könnte über die Aktivierung antiapoptotischer Signalwege die kardialen Myozyten vor hypoxischen oder Reoxygenierungsschäden schützen (Hu, Xiaofeng, et al. 2007).

Doch obwohl SDF-1 in atherosklerotischen Plaques hochreguliert wird, finden sich bei ACS verminderte Konzentrationen an zirkulierendem SDF-1 (Abbott, J. Dawn, et al. 2004), was möglicherweise durch die proteolytische Spaltung durch Matrixmetalloproteinasen, die bei Myokardinfarkt hochreguliert werden, bedingt ist (Abbott, J. Dawn, et al. 2004; Stellos, Konstantinos, et al. 2008a; Purcell, Brendan P., et al. 2012).

SDF-1 α vermittelt die Reduktion von Mastzellen, was zu einer verminderten, inflammatorischen Zellantwort und zu einer vermehrten Angiogenese führt (Thevenot, Paul T., et al. 2010). SDF-1 α beeinflusst die Narbenbildung und die ventrikuläre Funktion im ischämisch geschädigten Herzen (Proulx, Cindy, et al. 2007).

Verschiedene experimentelle Studien konnten zeigen, dass SDF-1 vorteilhafte Effekte auf den Heilungsprozess nach Myokardinfarkt ausübt (Uematsu, Manabu, et al. 2015; Elmadbouh, I., et al. 2007; Zamani, Maedeh, et al. 2015; Purcell, Brendan P., et al. 2012; Chatterjee, M.; Gawaz, M. 2013; Ghadge, Santhosh K., et al. 2011; Stellos, Konstantinos, et al. 2008a). So führte eine Behandlung mit SDF-1 α zu kleineren Infarkten (Chatterjee, M.; Gawaz, M. 2013; Ghadge, Santhosh K., et al. 2011; Hu, Xiaofeng, et al. 2007) sowie erhöhter Resistenz gegenüber hypoxischer Schädigung und Apoptose (Ghadge, Santhosh K., et al. 2011; Hu, Xiaofeng, et al. 2007; Stellos, Konstantinos, et al. 2008a). Auch chemotaktische Effekte auf Stamm- und Progenitorzellen spielen eine Rolle, was zu Regeneration und verstärkter

Angiomyogenese im infarzierten Herz führt (Uematsu, Manabu, et al. 2015; Ghadge, Santhosh K., et al. 2011; Stellos, Konstantinos, et al. 2008a; Elmadbouh, I., et al. 2007). Aktivierte Thrombozyten setzen das SDF-1 aus ihren Speichern frei und fördern die Migration von Vorläuferzellen an Orte der Gefäßschädigung (Massberg, Steffen, et al. 2006; Chatterjee, M.; Gawaz, M. 2013; Stellos, Konstantinos, et al. 2008a; Hu, Xiaofeng, et al. 2007).

Andererseits führte die Anwendung des CXCR4 Antagonisten AMD3100 tierexperimentell zu einer schnellen Mobilisierung endothelialer Progenitorzellen aus dem Knochenmark (Jujo, Kentaro, et al. 2010), einer verminderten Infarktgröße sowie einer verbesserten systolischen Ventrikelfunktion nach Myokardinfarkt (Proulx, Cindy, et al. 2007), was auf eine eher schädliche Wirkung von SDF1-Gabe schließen lässt.

Möglicherweise führt die CXCR4-Überexpression im Herzen während eines Myokardinfarktes durch gesteigerte Rekrutierung inflammatorischer Zellen, erhöhte TNF α Produktion und Apoptose zu einer vermehrten Schädigung von Kardiomyozyten (Chen, Jiqui, et al. 2010; Ghadge, Santhosh K., et al. 2011). In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass die myokardiale Freisetzung von SDF-1 in der chronischen Phase des Myokardinfarktes mit adversen Remodeling des linken Ventrikels nach Infarkt und progressiver Dysfunktion assoziiert ist.

Diese sich offensichtlich widersprechenden Ergebnisse könnten die komplexe Rolle, die SDF-1 im Heilungsprozess nach Myokardinfarkt innehat, widerspiegeln, die gleichermaßen vorteilhafte wie proinflammatorische Wirkungen umfasst (Uematsu, Manabu, et al. 2015; Ghadge, Santhosh K., et al. 2011).

Die SDF-1-Expression wird in den ersten Stadien nach einem Myokardinfarkt im Infarktgebiet (Purcell, Brendan P., et al. 2012; Uematsu, Manabu, et al. 2015; Chatterjee, M.; Gawaz, M. 2013; Elmadbouh, I., et al. 2007; Proulx, Cindy, et al. 2007; Stellos, Konstantinos, et al. 2008b; Abbott, J. Dawn, et al. 2004; Stellos, Konstantinos, et al. 2008a; Zamani, Maedeh, et al. 2015) sowie im Grenzgebiet dazu natürlicherweise hochreguliert (Chatterjee, M.; Gawaz, M. 2013; Proulx, Cindy, et al. 2007), doch die Expression ist nicht hoch genug und zu kurz, um signifikante regenerative Effekte im infarzierten Gebiet auszulösen. Deshalb wird eine lokale, prolongierte Freisetzung von SDF-1 α benötigt, um die Ausübung seiner biologischen Funktion zu gewährleisten (Zamani, Maedeh, et al. 2015; Purcell, Brendan P., et al. 2012; Elmadbouh, I., et al.

2007). Außerdem gestaltet sich die Herstellung eines SDF-1 α Arzneimittels als schwierig (Zamani, Maedeh, et al. 2015).

Cross et al. entwickelten SDF-1 α geladene Mikropartikel. Das > 50 Tage freigesetzte SDF-1 α war bioaktiv und führte über diesem Zeitraum zu vermehrter Migration mesenchymaler Stammzellen in vitro (Cross, Daisy P.; Wang, Chun 2011).

Zamani et al. entwickelten durch Elektrospraytechnik einen speziellen, SDF-1 α -beladenen Kern-Schale-Partikel. So konnte eine nachhaltige Freisetzung von SDF-1 α über mindestens 40 Tage erreicht werden sowie die Struktur von SDF-1 α und somit seine Bioaktivität erhalten werden, sodass die Partikel effektiv als injizierbare Arzneimittelgabesysteme für die kardiale Regeneration in situ eingesetzt werden könnten. Das freigesetzte SDF-1 α behielt seine chemotaktische Aktivität und erhöhte die Anzahl migrierter mesenchymaler Stammzellen (Zamani, Maedeh, et al. 2015).

Die hier vorgestellte Studie zeigte eine hochsignifikante Korrelation zwischen der Anzahl der SDF1 positiven Zellen und der Anzahl der TLR4 positiven Zellen.

SDF-1 und TLR4 üben gegensätzliche Effekte im geschädigten Myokard aus. Während TLR4 die Ischämie-Reperfusion-Schädigung durch Förderung apoptotischer Signalkaskaden begünstigt (Yang, Jun, et al. 2015), fördert SDF-1 durch Rekrutierung antiapoptotischer Kinasen ein antiapoptotisches Programm, das Schutz vor ischämischem oder Reperfusionsschaden verleiht (Hu, Xiaofeng, et al. 2007).

4.7 MPO bei kardiovaskulären Erkrankungen

MPO ist ein redoxaktives Hämprotein, das reichlich in neutrophilen Granulozyten zu finden ist und bis zu 5 % ihrer gesamten intrazellulären Proteine ausmacht (Lau, Denise; Baldus, Stephan 2006; Spallarossa, Paolo, et al. 2008; Wang, Zeneng, et al. 2007; Ferrante, Giuseppe, et al. 2010; Sugiyama, Seigo, et al. 2004; Sugiyama, Seigo, et al. 2001; Zhang, Renliang, et al. 2002; Biasucci, Luigi M., et al. 1996; Husted, Steen, et al. 2010; Teng, Nathaniel, et al. 2017; Mollenhauer, Martin, et al. 2017; Stamboul, Karim, et al. 2017; Yunoki, Kei, et al. 2012).

Daneben ist MPO auch in azurophilen Granula der Monozyten und in bestimmten Gewebsmakrophagen in humanen Atheromen zu finden (Lau, Denise; Baldus, Stephan 2006; Wang, Zeneng, et al. 2007; Sugiyama, Seigo, et al. 2004; Sugiyama, Seigo, et al.

2001; Zhang, Renliang, et al. 2002; Husted, Steen, et al. 2010; Teng, Nathaniel, et al. 2017; Stamboul, Karim, et al. 2017).

Bei akutem Myokardinfarkt wird MPO vermehrt freigesetzt (Lau, Denise; Baldus, Stephan, 2006; Stamboul, Karim, et al. 2017; Sadowski, Marcin; Zabczy, Michał; Undas, Anetta 2014; Yunoki, Kei, et al. 2012), was zur endothelialen Dysfunktion bei akutem Myokardinfarkt beitragen könnte (Stamboul, Karim, et al. 2017).

Wichtig ist, dass neutrophile Granulozyten bei ACS eine ortsspezifische Aktivierung durchlaufen und dabei MPO in den koronaren Kreislauf freisetzen (Lau, Denise; Baldus, Stephan 2006; Biasucci, Luigi M., et al. 1996). MPO ist somit ein Marker für neutrophile Aktivierung (Stamboul, Karim, et al. 2017; Yunoki, Kei, et al. 2012; Niccoli, Giampaolo, et al. 2017; Ferrante, Giuseppe, et al. 2010).

Bereits zwei Stunden nach Einsetzen der Symptome ist die MPO bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt signifikant erhöht (Teng, Nathaniel, et al. 2017; Stamboul, Karim, et al. 2017), was zeigt, dass die Aktivierung neutrophiler Granulozyten und die damit verbundene MPO Freisetzung ein frühes Ereignis bei akutem Myokardinfarkt darstellt (Stamboul, Karim, et al. 2017). Andere Quellen sprechen sogar davon, dass die neutrophile Aktivierung und MPO-Freisetzung einer Schädigung des Myokards vorausgeht, was eine direkte Rolle der MPO-Freisetzung in der Pathogenese des ACS nahelegt (Niccoli, Giampaolo, et al. 2017; Lau, Denise; Baldus, Stephan 2006).

Trotz seiner potenten proinflammatorischen Eigenschaften wurde lange geglaubt, dass MPO keine wichtige Rolle in inflammatorischen Krankheiten spielt, da neutrophile Granulozyten im Gegensatz zu Makrophagen und Lymphozyten nur selten in koronaren Plaques zu finden waren (Capron, L. 1991; Lau, Denise; Baldus, Stephan 2006; Spallarossa, Paolo, et al. 2008). Neuere immunhistochemische Analysen konnten jedoch auch neutrophile Granulozyten in Läsionen von Patienten mit akutem Koronarsyndrom verorten (Lau, Denise; Baldus, Stephan 2006; Sadowski, Marcin; Zabczy, Michał; Undas, Anetta, 2014).

Erhöhte MPO-Konzentrationen sind mit einer schlechten Prognose bei ACS assoziiert (Husted, Steen, et al. 2010; Ferrante, Giuseppe, et al. 2010; Lau, Denise; Baldus, Stephan 2006). Zudem scheint der MPO-Gehalt einen zuverlässigen Prädiktor für das Auftreten eines Myokardinfarkts in den nächsten zwei Jahren darzustellen (Husted, Steen, et al. 2010; Stamboul, Karim, et al. 2017).

Die Rolle von MPO wurde u.a. auch im Hinblick ihres Einflusses auf die Zusammensetzung koronarer Thromben untersucht (Yunoki, Kei, et al. 2012; Sadowski, Marcin; Zabczy, Michał; Undas, Anetta, 2014).

MPO positive neutrophile Granulozyten repräsentieren einen größeren Anteil intrakoronarer Thromben bei ACS Patienten mit erodierten Plaques und der systemische MPO-Gehalt im Serum bei Patienten mit erodierten Plaques ist signifikant höher als bei Patienten mit rupturierten Plaques (Sadowski, Marcin; Zabczy, Michał; Undas, Anetta 2014; Ferrante, Giuseppe, et al. 2010).

Dabei wurde von einer pathogenetischen Rolle von MPO bei der Bildung von Plaqueerosionen berichtet (Ferrante, Giuseppe, et al. 2010; Sugiyama, Seigo, et al. 2004). Auch eine wichtige Rolle für die Thrombusbildung in Folge von Erosionen wird vermutet (Ferrante, Giuseppe, et al. 2010).

MPO findet sich v.a. in erythrozytenreichen Thromben (Niccoli, Giampaolo, et al. 2017; Yunoki, Kei, et al. 2012).

Yunoki et al. untersuchten per Aspiration gewonnene Thromben von 178 STEMI-Patienten. Das Hauptergebnis dieser Studie war, dass eine Erhöhung von MPO und ox-LDL in erythrozytenreichen Thromben beobachtet werden kann.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der Plasmagehalt von MPO mit einem no-reflow Phänomen oder beeinträchtigter myokardialer Mikrozirkulation bei STEMI Patienten assoziiert ist.

Die Aktivierung neutrophiler Granulozyten ist einer der Hauptdeterminanten für vaskuläre Beeinträchtigung in reperfundierten Herzen (Yunoki, Kei, et al. 2012). Außerdem wurde berichtet, dass MPO-positive neutrophile Granulozyten die strukturellen und funktionellen Eigenschaften von Erythrozyten in Richtung erhöhter Aggreabilität und Adhäsion modifizieren kann (Yunoki, Kei, et al. 2012; Sadowski, Marcin; Zabczy, Michał; Undas, Anetta 2014), was zur Bildung erythrozytenreicher Thromben führt (Yunoki, Kei, et al. 2012).

Der Gehalt an systemischer MPO wird als Marker für die Plaquevulnerabilität angesehen (Ferrante, Giuseppe, et al. 2010; Teng, Nathaniel, et al. 2017). Die MPO-Aktivität kann zudem das Risiko einer Plaqueruptur vorhersagen (Teng, Nathaniel, et al. 2017).

Sugiyama et al. untersuchten die Regulation der MPO Expression in humanen

atherosklerotischen Läsionen, die per Endarterektomie oder post mortem von Patienten, die an einem plötzlichen Herztod infolge eines akuten Myokardinfarkt gestorben waren, gewonnen wurden. Dabei identifizierten sie eine neue Untergruppe MPO haltiger Makrophagen, die den subendothelialen Raum an Orten der koronaren Plaquerosion oder -ruptur infiltrieren. Die MPO haltigen Makrophagen könnten die Stabilität atherosklerotischer Plaques beeinflussen und somit möglicherweise zur Entwicklung eines ACS beitragen. MPO haltige Makrophagen könnten zur strukturellen Schwächung der fibrösen Kappe und zur Plaqueruptur beitragen (Sugiyama, Seigo, et al. 2001).

Die MPO katalysierte Lipidoxidation an Orten der Inflammation stellt ein Schlüsselereignis für Plaquebildung und Plaueinstabilität bei Atherosklerose dar (Lau, Denise; Baldus, Stephan 2006).

So wiesen fortgeschrittene atheromatöse Plaques durchweg eine reichliche Expression von MPO in Makrophagen auf (Sugiyama, Seigo, et al. 2001; Ferrante, Giuseppe, et al. 2010; Teng, Nathaniel, et al. 2017), während die Makrophagen in humanen fatty streaks wenig oder keine MPO enthielten (Sugiyama, Seigo, et al. 2001; Teng, Nathaniel, et al. 2017).

Außerdem akkumulieren durch HOCl modifizierte Proteine an rupturierten oder erodierten Stellen des humanen, koronaren Atheroms.

Die Ergebnisse legen auch nahe, dass GM-CSF die Akkumulation MPO positiver Makrophagen in humanen Atheromen und damit die Plaqueruptur fördern kann (Sugiyama, Seigo, et al. 2001).

MPO-positive Makrophagen und HOCl können Proteoglykane degradieren, die Bindung subendothelialer extrazellulärer Matrix an Endothelzellen schwächen und endotheliale Zellretraktion und Zelltod verursachen, was zur oberflächlichen Erosion der Intima führen kann und so eine erhöhte Thrombogenität fördert (Sugiyama, Seigo, et al. 2001; Sugiyama, Seigo, et al. 2004; Ferrante, Giuseppe, et al. 2010).

MPO wird bei akutem Myokardinfarkt im Vergleich zu stabiler Angina pectoris hochreguliert. Außerdem kann MPO als Prädiktor großer kardiovaskulärer Ereignisse dienen (Teng, Nathaniel, et al. 2017).

Außerdem destabilisiert MPO möglicherweise atherosklerotische Läsionen und trägt auf diese Weise zu mikrovaskulärer Obstruktion bei akutem Myokardinfarkt bei (Stamboul, Karim, et al. 2017). Bei Patienten, die myokardiale Ischämie und Reperfusion erfahren

haben, korrelierten der plasmatische MPO-Gehalt ziemlich genau mit der Rate des NO-Verbrauchs im Plasma (Lau, Denise; Baldus Stephan 2006). Während der Ischämie und Reperfusion ist die mikrovaskuläre Dysfunktion v.a. mit der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten und der verminderten Bioverfügbarkeit der NO assoziiert. Hohe MPO-Konzentrationen waren dabei mit einem größeren Infarkt und einer tendenziell verminderten linksventrikulären Ejektionsfraktion eine Woche nach Ereignis assoziiert. Stamboul et al. fanden zudem eine starke Korrelation zwischen der Troponinkonzentration, der CK-Konzentration und dem Plasmagehalt der MPO (Stamboul, Karim, et al. 2017).

MPO ist in kardiale Umbauvorgänge nach Myokardinfarkt verwickelt (Mollenhauer, Martin, et al. 2017; Niccoli, Giampaolo, et al. 2017; Yunoki, Kei, et al. 2012). So ist ein hoher MPO-Gehalt assoziiert mit schlechter Reperfusion und unvorteilhaften Umbauvorgängen (Niccoli, Giampaolo, et al. 2017; Yunoki, Kei, et al. 2012).

Außerdem wiesen MPO knockout Mäuse eine geringere linksventrikuläre Dilatation sowie eine geringere Beeinträchtigung der linksventrikulären Ejektionsfraktion auf. In den Vorhöfen führte die MPO zudem zu einem verstärkten fibrotischen Umbau, was Vorhofflimmern begünstigte. Mollenhauer et al. konnten zeigen, dass der systemische Gehalt der MPO in Patienten, die sich einer elektiven kardiovaskulären Diagnostik unterzogen, mit ventrikulären Arrhythmien assoziiert ist und dass MPO arrhythmogene ventrikuläre Umbauvorgänge in Mäusen verursacht (Mollenhauer, Martin, et al. 2017).

Angesichts der zahlreichen Nachweise einer bedeutenden Rolle von MPO in inflammatorischen Erkrankungen sollten therapeutische Strategien entwickelt werden, um MPO zu beeinflussen. Es konnte gezeigt werden, dass Heparin die Bindung von MPO an Endothelzellen verhindert und rückgängig macht, was sehr wahrscheinlich eine Erklärung für die antiinflammatorischen Wirkungen von Heparin ist (Lau, Denise; Baldus, Stephan 2006).

In Bezug auf die Anzahl MPO positiver Zellen fand sich eine signifikante Korrelation mit der Anzahl der BMP4 positiven Zellen.

MPO könnte pathophysiologisch an den inflammatorischen Prozessen in der Entstehung eines ACS beteiligt sein (Husted, Steen, et al. 2010). Auch BMP4 wird eine proinflammatorische Wirkung zugeschrieben, indem es die Expression von TNF α und

Il-6 erhöht (Ogura, Yasuhiro, et al. 2012).

Darüber hinaus fand sich eine hoch signifikante Korrelation der Anzahl der MPO positiven Zellen mit der Anzahl der Histon H3 positiven Zellen, der SDF1 positiven Zellen und der TLR4 positiven Zellen.

4.8 Klinische Relevanz für die antiaggregatorische Therapie nach Myokardinfarkt

Die duale Antikoagulation nach akutem Myokardinfarkt erfolgt mit ASS in Kombination mit den ADP-Antagonisten Clopidogrel, Prasugrel oder Ticagrelor (Karow, Lang-Roth 2014; Mega JL, Simon T 2015; Husted, Steen, et al. 2010). Die duale Plättchenhemmung mit Aspirin und einem Thienopyridin ist bei Patienten mit ACS oder nach PTCA entscheidend für die Prävention weiterer ischämischer Ereignisse (Wiviott, SD, et al. 2007b). Prasugrel und Ticagrelor werden gegenüber Clopidogrel zunehmend bevorzugt, wobei Ticagrelor beim NSTEMI und Prasugrel beim STEMI präferiert wird (Karow, Lang-Roth 2014).

Clopidogrel vermindert bei Patienten mit ACS gegenüber Placebo kardiovaskuläre Todesfälle und ischämische Komplikationen, ohne eine Zunahme schwerwiegender Blutungen (Karow, Lang-Roth 2014; Husted, Steen, et al. 2010; Mega, JL, et al. 2009).

Im Vergleich zwischen Clopidogrel und Prasugrel konnte Prasugrel die kardiovaskulären Endpunkte signifikant verringern, löste jedoch vermehrt schwere Blutungen aus, die auch lebensbedrohliche Ausmaße annehmen können (Karow, Lang-Roth 2014; Mega, JL et al. 2009; Wiviott, SD, et al. 2007a; Wallentin, Lars et al. 2009; Mega JL, Simon T 2015), weshalb Prasugrel nicht bei Patienten verwendet werden sollte, die in der Anamnese einen Schlaganfall oder eine transiente ischämische Attacke haben oder älter als 75 Jahre sind (Mega JL, Simon T 2015). Insgesamt wird der Nutzen höher als das Risiko bewertet (Karow, Lang-Roth 2014; Mega, JL et al. 2009).

In der PLATO Studie, die mehr als 18000 Patienten mit ACS einschloss, konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Ticagrelor im Vergleich zu Clopidogrel signifikant die Rate der vaskulären Todesfälle, Myokardinfarkte oder Schlaganfälle senken konnte, ohne einen Anstieg der großen Blutungen zu verursachen (Husted, Steen, et al. 2010; Karow, Lang-Roth 2014; Wallentin, Lars, et al. 2009). Dabei konnte jedoch nach Subgruppenanalyse kein signifikanter Vorteil für Ticagrelor festgestellt werden (Karow, Lang-Roth 2014).

In Phase 3 Studien konnten sowohl Prasugrel als auch Ticagrelor die Rate an kardiovaskulären Ereignissen vermindern (Wiviott, SD, et al. 2007a; Wallentin, Lars, et al. 2009).

Zudem weisen sowohl Prasugrel (Wiviott, SD, et al. 2007b) als auch Ticagrelor eine stärkere Hemmung der Thrombozytenaggregation auf als Clopidogrel (Husted, Steen, et al. 2010).

Im Unterschied zu Clopidogrel konnte bei Patienten mit ACS, die mit Prasugrel behandelt wurden, keine signifikante Assoziation zwischen verschiedenen Cytochrom P Genotypen und dem Risiko eines kardiovaskulären Todes, Myokardinfarktes oder Schlaganfall gefunden werden, was erklärt, warum Prasugrel ein zuverlässigeres Ansprechen bei ACS bietet (Mega, JL, et al. 2009).

Duale Plättchenhemmung über ein Jahr hinaus kann zwar gegenüber der Aspirinmonotherapie das Risiko der Stentthrombose und kardiovaskulärer Ereignisse signifikant senken, ist jedoch mit einem erhöhten Blutungsrisiko assoziiert (Mauri, Laura, et al. 2014).

Zusammenfassend wirken Prasugrel und Ticagrelor schneller und stärker als Clopidogrel mit weniger Non-Respondern, weisen aber andererseits mehr Blutungen auf, insbesondere in Kombination mit anderen Antikoagulantien.

So wird Prasugrel in der Leitlinie „DEGAM S1-Handlungsempfehlung Duale Plättchenhemmung –Neue Thrombozyten-Aggregationshemmer“ der deutschen Gesellschaft für Allgemeinmedizin und Familienmedizin wegen eines ungünstigen Nutzen-Risiko-Verhältnisses explizit nicht empfohlen (Egidi, G., Wille, H. 2013).

Darüber hinaus hat Ticagrelor auch einen hemmenden Effekt auf den equilibrative nucleoside transporter (ENT), was zu erhöhten Plasmakonzentrationen von Adenosin führt, das u.a. koronare Vasodilatation, Verminderung des Schadens durch Ischämie oder Reperfusion sowie eine Hemmung der inflammatorischen Reaktion auf Stressbedingungen bewirkt (Mega JL, Simon T 2015).

Interessanterweise zeigte sich ein signifikanter Unterschied der Anzahl MPO positiver Zellen zwischen den Thromben der Patienten, die ein Loading mit Clopidogrel erhalten haben (n=9), und den Thromben der Patienten, die ein Loading mit Prasugrel erhalten haben (n=17; p=0,038). Auch die Anzahl MPO positiver Zellen bei den Thromben der

Patienten, die ein Loading mit Ticagrelor erhalten haben (n=5), scheint deutlich geringer als bei einem Loading mit Clopidogrel zu sein, erreichte jedoch keine Signifikanz (p=0,266).

Tatsächlich deuteten einige Studien darauf hin, dass die Wirksamkeit der P2Y₁₂ Inhibitoren z.T. auf antiinflammatorische Wirkungen zurückzuführen ist (Husted, Steen, et al. 2010). So konnten Molero et al. zeigen, dass Clopidogrel antiinflammatorische Effekte auf ischämische Koronarterien in Kaninchen ausübt (Molero, Laura, et al. 2005).

Somit lieferte die Studie eine Bestätigung der stärkeren Wirksamkeit der antiaggregatorischen Therapie mit Prasugrel und Ticagrelor gegenüber Clopidogrel und identifizierte dabei die MPO Expression als möglichen Vermittler dieser besseren Wirkung.

Husted et al. untersuchten das Verhalten der MPO bei täglicher Gabe von 90 mg Ticagrelor, bei 180 mg Ticagrelor und bei 75 mg Clopidogrel über 4 Wochen. Dabei unterschied sich der Rückgang der systemischen MPO-Konzentration nicht zwischen den drei Gruppen (Husted, Steen, et al. 2010). Dies könnte damit zusammenhängen, dass Husted et al. systemische Konzentrationen der MPO untersucht haben, während die vorliegende Arbeit die MPO-Expression direkt auf den arteriellen Thromben untersucht hat.

4.9 Limitationen dieser Arbeit

Die vorgestellten Ergebnisse weisen auf eine Bedeutung der MPO für die Wirksamkeit der antiaggregatorischen Therapie bei Myokardinfarkt hin. In Anbetracht der kleinen Fallzahl (n=31) sollten die Ergebnisse dieser Arbeit jedoch in größeren, prospektiv angelegten Studien untersucht werden. Insbesondere sollte die MPO Expression bei einer größeren Anzahl von Patienten mit Ticagrelor untersucht werden, um die in der vorliegenden Studie gesehene Tendenz zu bestätigen. Zudem gilt es zu beachten, dass die Auszählung der positiven Zellen und Ausmessungen der Flächen manuell erfolgte, wodurch Ungenauigkeiten möglich sind.

5 Zusammenfassung

Das ACS trägt maßgeblich zur Morbidität und Mortalität der Gesamtbevölkerung bei. Das klinische Outcome der Patienten hängt dabei unter anderem vom Ausmaß der ischämischen Schädigung und von der Regenerationsfähigkeit des geschädigten Gewebes ab. Deshalb befasste sich diese Studie mit dem Einfluss des Aufbaus intrakoronarer Thromben sowie der antiaggregatorischen Therapie auf die Reparaturvorgänge nach Myokardinfarkt.

Neben der histologischen Analyse der Koronarthromben mittels HE-Färbung wurden sieben Proteine ausgewählt, für die es in der Literatur bereits zahlreiche Nachweise gibt, dass sie eine bedeutende Rolle in der Pathophysiologie des Myokardinfarkts spielen: BMP2, BMP4, BMP7, Histon H3, SDF-1, TLR4 und MPO.

Die Expression dieser Proteine in intrakoronaren Thromben wurde bei 31 Patienten mit akutem Myokardinfarkt analysiert und in Beziehung gesetzt zu verschiedenen klinischen Parametern der Patienten.

Die vorliegende Arbeit gewährt einen genauen Einblick in den Aufbau der intrakoronaren Thromben im akuten Myokardinfarkt und ihre Variabilität. Die vorgestellten Ergebnisse weisen auf eine Bedeutung der antiaggregatorischen Therapie auf inflammatorische Prozesse bei Myokardinfarkt hin, was sich anhand der Expression von MPO in den Thromben messen lässt.

Interessanterweise zeigte sich ein signifikanter Unterschied der Anzahl MPO positiver Zellen zwischen den Thromben der Patienten, die ein Loading mit Clopidogrel erhalten haben (n=9), und den Thromben der Patienten, die ein Loading mit Prasugrel erhalten haben (n=17; p=0,038). Welche Rolle diese potenzielle antiinflammatorische Wirkweise von Prasugrel in der Behandlung des Myokardinfarkts hat, sollte in größeren Studien untersucht werden. Zudem sollte geklärt werden, inwiefern dadurch der klinische Verlauf der Patienten verbessert werden kann.

6 Literaturverzeichnis

- Abbott, J. Dawn, et al. Stromal cell-derived factor-1 α plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury. *Circulation*, 2004, 110. Jg., Nr. 21, S. 3300-3305.
- Arakawa, Kentaro, et al. Significant association between neutrophil aggregation in aspirated thrombus and myocardial damage in patients with ST-segment elevation acute myocardial infarction. *Circulation Journal*, 2009, 73. Jg., Nr. 1, S. 139-144.
- Avlas, Orna, et al. Silencing cardiomyocyte TLR4 reduces injury following hypoxia. *Experimental cell research*, 2016, 348. Jg., Nr. 2, S. 115-122.
- Bai, Chen-Guang, et al. Regional expression of the hypoxia-inducible factor (HIF) system and association with cardiomyocyte cell cycle re-entry after myocardial infarction in rats. *Heart and vessels*, 2008, 23. Jg., Nr. 3, S. 193-200.
- Bastiaansen, Antonius JNM, et al. TLR4 accessory molecule RP105 (CD180) regulates monocyte-driven arteriogenesis in a murine hind limb ischemia model. *PloS one*, 2014, 9. Jg., Nr. 6, S. e99882.
- Behfar, Atta, et al. Stem cell differentiation requires a paracrine pathway in the heart. *The FASEB Journal*, 2002, 16. Jg., Nr. 12, S. 1558-1566.
- Biasucci, Luigi M., et al. Intracellular neutrophil myeloperoxidase is reduced in unstable angina and acute myocardial infarction, but its reduction is not related to ischemia. *Journal of the American College of Cardiology*, 1996, 27. Jg., Nr. 3, S. 611-616.
- Blich, Miry, et al. Macrophage activation by heparanase is mediated by TLR-2 and TLR-4 and associates with plaque progression. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 2013, 33. Jg., Nr. 2, S. e56-e65.
- Böcker et al., 5. Auflage 2012, Pathologie, S.12-13, S.182-185, S.357-359, S.377-384, S.398-404, Elsevier GmbH, München
- Boersma, Eric, et al. Early thrombolytic treatment in acute myocardial infarction: reappraisal of the golden hour. *The Lancet*, 1996, 348. Jg., Nr. 9030, S. 771-775.
- Bombelli, Thomas; Schwartz, Barbara R.; Harlan, John M. Endothelial cells undergoing apoptosis become proadhesive for nonactivated platelets. *Blood*, 1999, 93. Jg., Nr. 11, S. 3831-3838.
- Cagavi, Esra, et al. Functional cardiomyocytes derived from Isl1 cardiac progenitors via Bmp4 stimulation. *PloS one*, 2014, 9. Jg., Nr. 12, S. e110752.
- Capron, L. [Leukocytes and arteriosclerosis]. *Archives des maladies du coeur et des vaisseaux*, 1991, 84. Jg., Nr. 12, S. 1845-1850.
- Ceradini, Daniel J., et al. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nature medicine*, 2004, 10. Jg., Nr. 8, S. 858-864.
- Chang, Sung-A., et al. Impact of myocardial infarct proteins and oscillating pressure on the differentiation of mesenchymal stem cells: effect of acute myocardial infarction on stem cell differentiation. *Stem Cells*, 2008, 26. Jg., Nr. 7, S. 1901-1912
- Chatterjee, M.; Gawaz, M. Platelet-derived CXCL12 (SDF-1 α): basic mechanisms and clinical implications. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2013, 11. Jg., Nr. 11, S.1954-1967.
- Chen, Jiqiu, et al. Effects of CXCR4 gene transfer on cardiac function after ischemia-reperfusion injury. *The American journal of pathology*, 2010, 176. Jg., Nr. 4, S. 1705-1715.

Cong, Guangzhi, et al. Involvement of histone methylation in macrophage apoptosis and unstable plaque formation in methionine-induced hyperhomocysteinemic ApoE^{-/-} mice. *Life Sciences*, 2017, 173. Jg., S. 135-144.

Cross, Daisy P.; Wang, Chun. Stromal-derived factor-1 alpha-loaded PLGA microspheres for stem cell recruitment. *Pharmaceutical research*, 2011, 28. Jg., Nr. 10, S. 2477-2489.

DeGeorge Jr, Brent R., et al. BMP-2 and FGF-2 Synergistically Facilitate Adoption of a Cardiac Phenotype in Somatic Bone Marrow c-kit⁺/Sca-1⁺ Stem Cells. *Clinical and translational science*, 2008, 1. Jg., Nr. 2, S. 116-125.

Ding, Hua-Sheng, et al. The HMGB1–TLR4 axis contributes to myocardial ischemia/reperfusion injury via regulation of cardiomyocyte apoptosis. *Gene*, 2013, 527. Jg., Nr. 1, S. 389-393.

Džumhur, Andrea, et al. Association Studies of Gene Polymorphisms in Toll-Like Receptors 2 and 4 in Croatian Patients with Acute Myocardial Infarction. *Scandinavian journal of immunology*, 2012, 75. Jg., Nr. 5, S. 517-523.

Egidi, G.; Wille, H., 2013, DEGAM S1-Handlungsempfehlung Duale Plättchenhemmung – Neue Thrombozyten-Aggregationshemmer

Elmadbouh, I., et al. Ex vivo delivered stromal cell-derived factor-1 α promotes stem cell homing and induces angiomyogenesis in the infarcted myocardium. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 2007, 42. Jg., Nr. 4, S. 792-803

Ferrante, Giuseppe, et al. High Levels of Systemic Myeloperoxidase Are Associated With Coronary Plaque Erosion in Patients With Acute Coronary Syndromes A Clinicopathological Study. *Circulation*, 2010, 122. Jg., Nr. 24, S. 2505-2513.

Friemel et al., 4.Auflage 1991, Immunologische Arbeitsmethoden, S.188-199, Gustav Fischer Verlag, Jena

Ghadge, Santhosh K., et al. SDF-1 α as a therapeutic stem cell homing factor in myocardial infarction. *Pharmacology & therapeutics*, 2011, 129. Jg., Nr. 1, S. 97-108.

Goldman, Joseph Aaron, et al. Resolving heart regeneration by replacement histone profiling. *Developmental Cell*, 2017, 40. Jg., Nr. 4, S. 392-404. e5.

He, J., et al. Hypoxic adipose mesenchymal stem cells derived conditioned medium protects myocardial infarct in rat. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2015, 19. Jg., Nr. 4397, S. 406.

Herold et al., Innere Medizin 2015, S.237-260, Gerd Herold, Köln

Hillis, L. David; Lange, Richard A. Myocardial infarction and the open-artery hypothesis. *New England Journal of Medicine*, 2006, 355. Jg., Nr. 23, S. 2475-2477.

Hu, Xiaofeng, et al. Stromal cell–derived factor-1 α confers protection against myocardial ischemia/reperfusion injury role of the cardiac stromal cell–derived factor-1 α –CXCR4 axis. *Circulation*, 2007, 116. Jg., Nr. 6, S. 654-663.

Husted, Steen, et al. Changes in inflammatory biomarkers in patients treated with ticagrelor or clopidogrel. *Clinical cardiology*, 2010, 33. Jg., Nr. 4, S. 206-212.

Jujo, Kentaro, et al. CXCR4 blockade augments bone marrow progenitor cell recruitment to the neovasculature and reduces mortality after myocardial infarction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, 107. Jg., Nr. 24, S. 11008-11013.

Jumabay, Medet, et al. Endothelial differentiation in multipotent cells derived from mouse and human white mature adipocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 2012, 53. Jg., Nr. 6, S. 790-800.

Kalbitz, Miriam, et al. Role of extracellular histones in the cardiomyopathy of sepsis. *The FASEB Journal*, 2015, 29. Jg., Nr. 5, S. 2185-2193.

Kalén, Anders, et al. The content of bone morphogenetic proteins in platelets varies greatly between different platelet donors. *Biochemical and biophysical research communications*, 2008, 375. Jg., Nr. 2, S. 261-264.

Karow, Lang-Roth, 23.Auflage 2014, Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie S.179-181, S.281-298, Thomas Karow, Pulheim

Karper, Jacco C., et al. TLR accessory molecule RP105 (CD180) is involved in post-interventional vascular remodeling and soluble RP105 modulates neointima formation. *PloS one*, 2013, 8. Jg., Nr. 7, S. e67923.

Kashiwagi, Manabu, et al. Differential expression of Toll-like receptor 4 and human monocyte subsets in acute myocardial infarction. *Atherosclerosis*, 2012, 221. Jg., Nr. 1, S. 249-253.

Kazui, Miho, et al. Identification of the human cytochrome P450 enzymes involved in the two oxidative steps in the bioactivation of clopidogrel to its pharmacologically active metabolite. *Drug Metabolism and Disposition*, 2010, 38. Jg., Nr. 1, S. 92-99.

Kondo, Kensuke, et al. Trans-fatty acid promotes thrombus formation in mice by aggravating antithrombogenic endothelial functions via Toll-like receptors. *Molecular nutrition & food research*, 2015, 59. Jg., Nr. 4, S. 729-740.

Kramer, Miranda CA, et al. Presence of older thrombus is an independent predictor of long-term mortality in patients with ST-elevation myocardial infarction treated with thrombus aspiration during primary percutaneous coronary intervention. *Circulation*, 2008, 118. Jg., Nr. 18, S. 1810-1816.

Lau, Denise; Baldus, Stephan. Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. *Pharmacology & therapeutics*, 2006, 111. Jg., Nr. 1, S. 16-26.

Li, Ning; Pasha, Zeeshan; Ashraf, Muhammad. Reversal of ischemic cardiomyopathy with Sca-1+ stem cells modified with multiple growth factors. *PloS one*, 2014, 9. Jg., Nr. 4, S. e93645.

Li, Yongjun, et al. Acute myocardial infarction induced functional cardiomyocytes to re-enter the cell cycle. *American journal of translational research*, 2013, 5. Jg., Nr. 3, S. 327-335.

Mader et al., 7.Auflage 2014, Allgemeinmedizin und Praxis, S.132-139, Springer-Verlag Berlin Heidelberg

Mallat, Ziad; Tedgui, Alain. Apoptosis in the vasculature: mechanisms and functional importance. *British journal of pharmacology*, 2000, 130. Jg., Nr. 5, S. 947-962.

Massberg, Steffen, et al. Platelets secrete stromal cell-derived factor 1 α and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo. *Journal of Experimental Medicine*, 2006, 203. Jg., Nr. 5, S. 1221-1233.

Mauri, Laura, et al. Twelve or 30 months of dual antiplatelet therapy after drug-eluting stents. *New England Journal of Medicine*, 2014, 371. Jg., Nr. 23, S. 2155-2166.

Mega, Jessica L., et al. Cytochrome P450 genetic polymorphisms and the response to prasugrel relationship to pharmacokinetic, pharmacodynamic, and clinical outcomes. *Circulation*, 2009, 119. Jg., Nr. 19, S. 2553-2560.

Mega, Jessica L.; Simon, Tabassome. Pharmacology of antithrombotic drugs: an assessment of oral antiplatelet and anticoagulant treatments. *The Lancet*, 2015, 386. Jg., Nr. 9990, S. 281-291.

Merino, David, et al. BMP-7 attenuates left ventricular remodelling under pressure overload and facilitates reverse remodelling and functional recovery. *Cardiovascular research*, 2016, 110. Jg., Nr. 3, S. 331-345.

Molero, Laura, et al. Effect of clopidogrel on the expression of inflammatory markers in rabbit ischemic coronary artery. *British journal of pharmacology*, 2005, 146. Jg., Nr. 3, S. 419-424.

Mollenhauer, Martin, et al. Myeloperoxidase Mediates Postischemic Arrhythmogenic Ventricular Remodeling. *Circulation Research*, 2017, S. CIRCRESAHA. 117.310870.

Mungrue, Imran N., et al. Abcc6 deficiency causes increased infarct size and apoptosis in a mouse cardiac ischemia-reperfusion model. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 2011, 31. Jg., Nr. 12, S. 2806-2812.

Niccoli, Giampaolo, et al. Relationship between Serum Inflammatory Biomarkers and Thrombus Characteristics in Patients with ST Segment Elevation Myocardial Infarction. *Cardiology*, 2017, 137. Jg., Nr. 1, S. 27-35.

Ogura, Yasuhiro, et al. Therapeutic impact of follistatin-like 1 on myocardial ischemic injury in preclinical models. *Circulation*, 2012, 126. Jg., Nr. 14, S. 1728-1738.

Pachori, Alok S., et al. Bone morphogenetic protein 4 mediates myocardial ischemic injury through JNK-dependent signaling pathway. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 2010, 48. Jg., Nr. 6, S. 1255-1265.

Pallotta, Isabella, et al. BMP protein-mediated crosstalk between inflammatory cells and human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 2015.

Poggio, Paolo, et al. Noggin attenuates the osteogenic activation of human valve interstitial cells in aortic valve sclerosis. *Cardiovascular research*, 2013, 98. Jg., Nr. 3, S. 402-410.

Proulx, Cindy, et al. Antagonism of stromal cell-derived factor-1 α reduces infarct size and improves ventricular function after myocardial infarction. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 2007, 455. Jg., Nr. 2, S. 241-250.

Purcell, Brendan P., et al. Synergistic effects of SDF-1 α chemokine and hyaluronic acid release from degradable hydrogels on directing bone marrow derived cell homing to the myocardium. *Biomaterials*, 2012, 33. Jg., Nr. 31, S. 7849-7857

Rathnayake, Nilminie, et al. Salivary matrix metalloproteinase-8 and-9 and myeloperoxidase in relation to coronary heart and periodontal diseases: a subgroup report from the PAROKRANK study (periodontitis and its relation to coronary artery disease). *PLoS one*, 2015, 10. Jg., Nr. 7, S. e0126370.

Reiss, Krzysztof, et al. Upregulation of IGF1, IGF1-receptor, and late growth related genes in ventricular myocytes acutely after infarction in rats. *Journal of cellular physiology*, 1994, 158. Jg., Nr. 1, S. 160-168.

Rohde, David, et al. S100A1 is released from ischemic cardiomyocytes and signals myocardial damage via Toll-like receptor 4. *EMBO molecular medicine*, 2014, 6. Jg., Nr. 6, S. 778-794.

Sadowski, Marcin; Zabczyk, Michał; Undas, Anetta. Coronary thrombus composition: links with inflammation, platelet and endothelial markers. *Atherosclerosis*, 2014, 237. Jg., Nr. 2, S. 555-561.

Sanders, Lehanna N., et al. The BMP Antagonist Gremlin 2 Limits Inflammation After Myocardial Infarction. *Circulation Research*, 2016, S. CIRCRESAHA. 116.308700.

Schiano, Concetta, et al. Epigenetic-related therapeutic challenges in cardiovascular disease. *Trends in pharmacological sciences*, 2015, 36. Jg., Nr. 4, S. 226-235.

Schiopu, Alexandru; Cotoi, Ovidiu S. S100A8 and S100A9: DAMPs at the crossroads between innate immunity, traditional risk factors, and cardiovascular disease. *Mediators of inflammation*, 2013, 2013. Jg.

Schmidt, Lang, Heckmann, 31. Auflage 2010, Physiologie des Menschen, S.540-543, S. 563-564, S.568-571, Springer Medizin Verlag Heidelberg.

Song, Rui, et al. BMP-2 and TGF- β 1 mediate biglycan-induced pro-osteogenic reprogramming in aortic valve interstitial cells. *Journal of Molecular Medicine*, 2015, 93. Jg., Nr. 4, S. 403-412.

Spallarossa, Paolo, et al. Postprandial serum induces apoptosis in endothelial cells: Role of polymorphonuclear-derived myeloperoxidase and metalloproteinase-9 activity. *Atherosclerosis*, 2008, 198. Jg., Nr. 2, S. 458-467.

Stamboul, Karim, et al. Relation between high levels of myeloperoxidase in the culprit artery and microvascular obstruction, infarct size and reverse remodeling in ST-elevation myocardial infarction. *PloS one*, 2017, 12. Jg., Nr. 7, S. e0179929.

Stellos, Konstantinos, et al. Platelet-derived stromal cell-derived factor-1 regulates adhesion and promotes differentiation of human CD34+ cells to endothelial progenitor cells. *Circulation*, 2008, 117. Jg., Nr. 2, S. 206-215. (a)

Stellos, Konstantinos, et al. Expression of stromal-cell-derived factor-1 on circulating platelets is increased in patients with acute coronary syndrome and correlates with the number of CD34+ progenitor cells. *European heart journal*, 2008, 30. Jg., Nr. 5, S. 584-593. (b)

Sugiyama, Seigo, et al. Macrophage myeloperoxidase regulation by granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human atherosclerosis and implications in acute coronary syndromes. *The American journal of pathology*, 2001, 158. Jg., Nr. 3, S. 879-891.

Sugiyama, Seigo, et al. Hypochlorous acid, a macrophage product, induces endothelial apoptosis and tissue factor expression involvement of myeloperoxidase-mediated oxidant in plaque erosion and thrombogenesis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 2004, 24. Jg., Nr. 7, S. 1309-1314.

Sur, Swastika, et al. Increased Expression of Phosphorylated Polo-Like Kinase 1 and Histone in Bypass Vein Graft and Coronary Arteries following Angioplasty. *PloS one*, 2016, 11. Jg., Nr. 1, S. E0147937.

Suzuki, Gen, et al. Autologous mesenchymal stem cells mobilize cKit+ and CD133+ bone marrow progenitor cells and improve regional function in hibernating myocardium. *Circulation research*, 2011, 109. Jg., Nr. 9, S. 1044-1054.

Takahashi, Masafumi. Role of the SDF-1/CXCR4 system in myocardial infarction. *Circulation Journal*, 2010, 74. Jg., Nr. 3, S. 418-423.

Tapp, L. D., et al. TLR4 expression on monocyte subsets in myocardial infarction. *Journal of internal medicine*, 2013, 273. Jg., Nr. 3, S. 294-305.

Teng, Nathaniel, et al. The roles of myeloperoxidase in coronary artery disease and its potential implication in plaque rupture. *Redox Report*, 2017, 22. Jg., Nr. 2, S. 51-73.

Thatcher, Thomas H.; Gorovsky, Martin A. Phylogenetic analysis of the core histones H2A, H2B, H3, and H4. *Nucleic acids research*, 1994, 22. Jg., Nr. 2, S. 174-179.

Thevenot, Paul T., et al. The effect of incorporation of SDF-1 α into PLGA scaffolds on stem cell recruitment and the inflammatory response. *Biomaterials*, 2010, 31. Jg., Nr. 14, S. 3997-4008

Uematsu, Manabu, et al. Sustained myocardial production of stromal cell-derived factor-1 α was associated with left ventricular adverse remodeling in patients with

myocardial infarction. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2015, 309. Jg., Nr. 10, S. H1764-H1771.

Urbina, Princess; Singla, Dinender. BMP-7 Attenuates Adverse Cardiac Remodeling Mediated Through M2 Macrophages in Diabetic Cardiomyopathy. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2014, S. ajpheart. 00367.2014.

Van Den Akker, F.; De Jager, S. C. A.; Sluijter, J. P. G. Mesenchymal stem cell therapy for cardiac inflammation: immunomodulatory properties and the influence of toll-like receptors. *Mediators of inflammation*, 2013, 2013. Jg.

Van der Pouw Kraan, Tineke CTM, et al. Systemic toll-like receptor and interleukin-18 pathway activation in patients with acute ST elevation myocardial infarction. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 2014, 67. Jg., S. 94-102.

Vogel, Benjamin, et al. Acute DNase1 treatment improves left ventricular remodeling after myocardial infarction by disruption of free chromatin. *Basic research in cardiology*, 2015, 110. Jg., Nr. 2, S. 1-15.

Vogel, Sebastian, et al. Activated platelets interfere with recruitment of mesenchymal stem cells to apoptotic cardiac cells via high mobility group box 1/Toll-like receptor 4-mediated down-regulation of hepatocyte growth factor receptor MET. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289. Jg., Nr. 16, S. 11068-11082.

Vollmar et al. 2.Auflage 2013, Immunologie-Grundlagen und Wirkstoffe, S.423, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart

Wallentin, Lars, et al. Ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *New England Journal of Medicine*, 2009, 361. Jg., Nr. 11, S. 1045-1057.

Wang, Mei, et al. Crosstalk of mesenchymal stem cells and macrophages promotes cardiac muscle repair. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2015, 58. Jg., S. 53-61.

Wang, Xian-tao, et al. TAK-242 Protects Against Apoptosis in Coronary Microembolization-Induced Myocardial Injury in Rats by Suppressing TLR4/NF- κ B Signaling Pathway. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2017, 41. Jg., Nr. 4, S. 1675-1683.

Wang, Yabin, et al. Activation of liver X receptor improves viability of adipose-derived mesenchymal stem cells to attenuate myocardial ischemia injury through TLR4/NF- κ B and Keap-1/Nrf-2 signaling pathways. *Antioxidants & redox signaling*, 2014, 21. Jg., Nr. 18, S. 2543-2557.

Wang, Zeneng, et al. Protein carbamylation links inflammation, smoking, uremia and atherogenesis. *Nature medicine*, 2007, 13. Jg., Nr. 10, S. 1176-1184.

Wiviott, Stephen D., et al. Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *New England Journal of Medicine*, 2007, 357. Jg., Nr. 20, S. 2001-2015 (a)

Wiviott, Stephen D., et al. Prasugrel Compared With High Loading-and Maintenance-Dose Clopidogrel in Patients With Planned Percutaneous Coronary Intervention The Prasugrel in Comparison to Clopidogrel for Inhibition of Platelet Activation and Aggregation–Thrombolysis in Myocardial Infarction 44 Trial. *Circulation*, 2007, 116. Jg., Nr. 25, S. 2923-2932. (b)

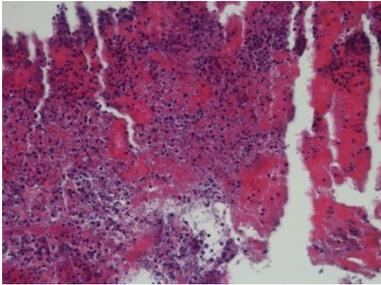
Wu, Xueping, et al. Expression of bone morphogenetic protein 4 and its receptors in the remodeling heart. *Life sciences*, 2014, 97. Jg., Nr. 2, S. 145-154.

Xie, Min, et al. HDAC inhibition blunts ischemia/reperfusion injury by inducing cardiomyocyte autophagy. *Circulation*, 2014, S. CIRCULATIONAHA. 113.002416.

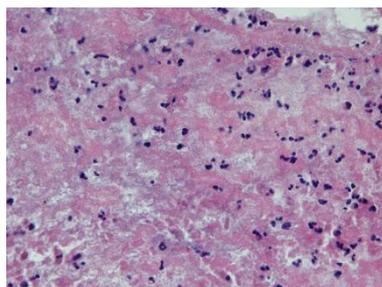
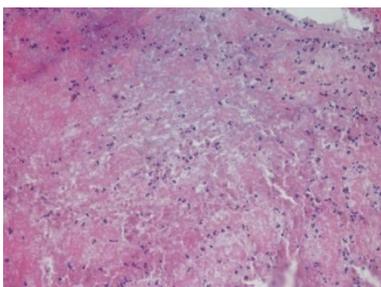
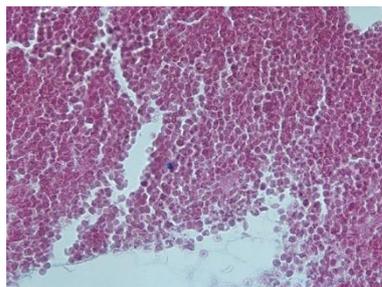
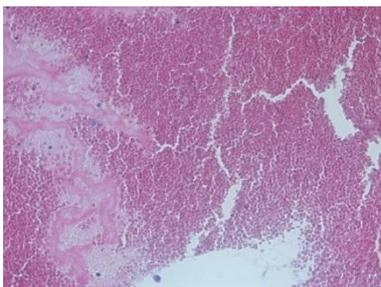
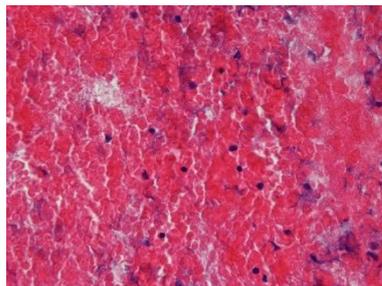
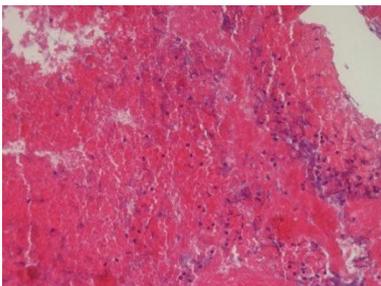
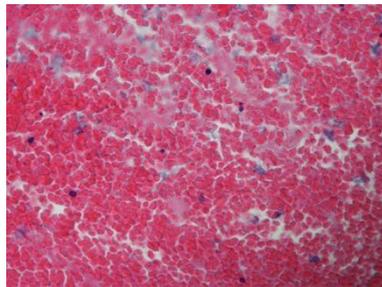
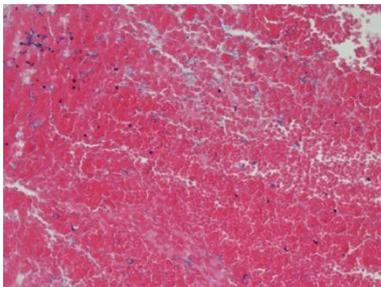
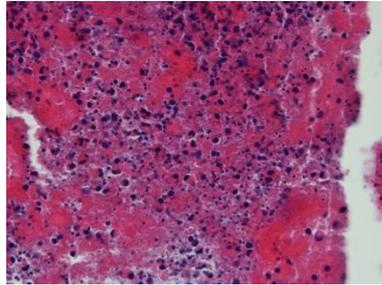
- Xu, Xingbo, et al. Endocardial Fibroelastosis Is Caused by Aberrant Endothelial to Mesenchymal Transition Novelty and Significance. *Circulation research*, 2015, 116. Jg., Nr. 5, S. 857-866(a)
- Xu, Xingbo, et al. Epigenetic balance of aberrant Rasal1 promoter methylation and hydroxymethylation regulates cardiac fibrosis. *Cardiovascular research*, 2015, 105. Jg., Nr. 3, S. 279-291(b)
- Yang, Jun, et al. RP105 protects against apoptosis in ischemia/reperfusion-induced myocardial damage in rats by suppressing TLR4-mediated signaling pathways. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2015, 36. Jg., Nr. 6, S. 2137-2148.
- Yellon, Derek M.; Hausenloy, Derek J. Myocardial reperfusion injury. *New England Journal of Medicine*, 2007, 357. Jg., Nr. 11, S. 1121-1135.
- Yin, Yan-Wei, et al. Toll-like receptor 4 gene Asp299Gly polymorphism in myocardial infarction: a meta-analysis of 15,148 subjects. *Human immunology*, 2014, 75. Jg., Nr. 2, S. 163-169.
- Yuan, Shi-Min; Jing, Hua. Cardiac pathologies in relation to Smad-dependent pathways. *Interactive cardiovascular and thoracic surgery*, 2010, 11. Jg., Nr. 4, S. 455-460
- Yunoki, Kei, et al. Erythrocyte-rich thrombus aspirated from patients with ST-elevation myocardial infarction: association with oxidative stress and its impact on myocardial reperfusion. *European heart journal*, 2012, 33. Jg., Nr. 12, S. 1480-1490.
- Zakharova, Liudmila, et al. Transplantation of Epigenetically Modified Adult Cardiac c-Kit+ Cells Retards Remodeling and Improves Cardiac Function in Ischemic Heart Failure Model. *Stem cells translational medicine*, 2015, 4. Jg., Nr. 9, S. 1086.
- Zamani, Maedeh, et al. Controlled delivery of stromal derived factor-1 α from poly lactic-co-glycolic acid core-shell particles to recruit mesenchymal stem cells for cardiac regeneration. *Journal of colloid and interface science*, 2015, 451. Jg., S. 144-152.
- Zhang, Renliang, et al. Defects in leukocyte-mediated initiation of lipid peroxidation in plasma as studied in myeloperoxidase-deficient subjects: systematic identification of multiple endogenous diffusible substrates for myeloperoxidase in plasma. *Blood*, 2002, 99. Jg., Nr. 5, S. 1802-1810.

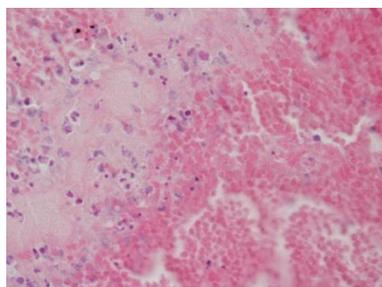
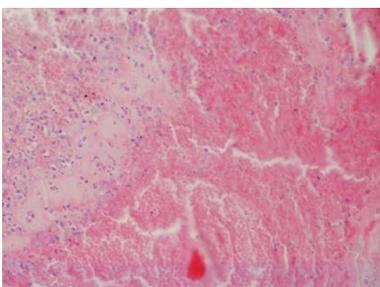
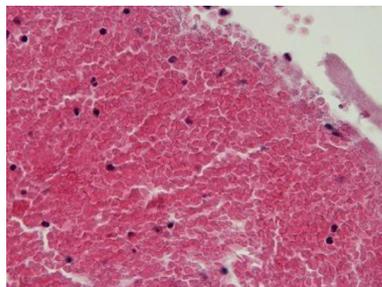
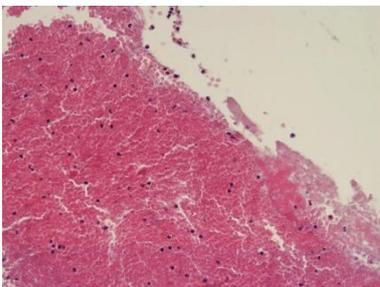
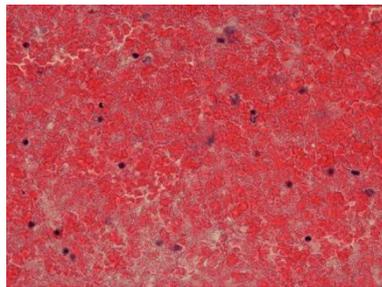
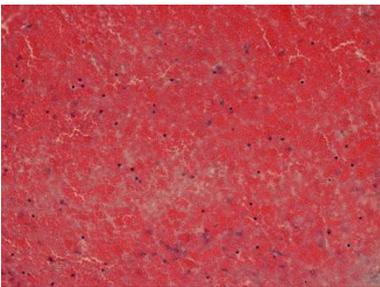
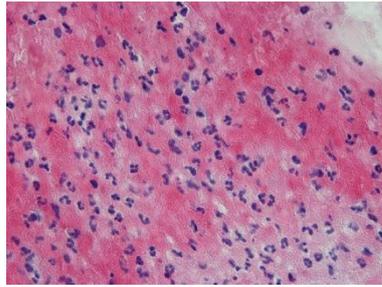
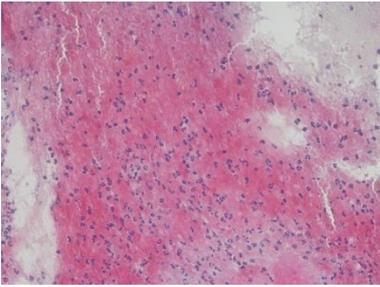
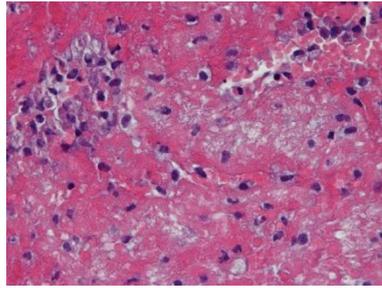
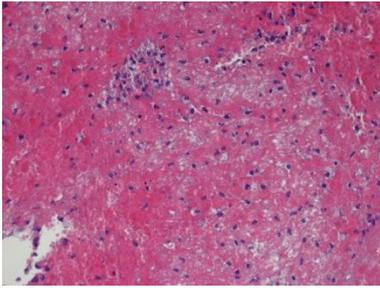
7 Anhang

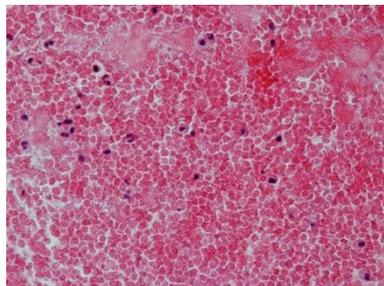
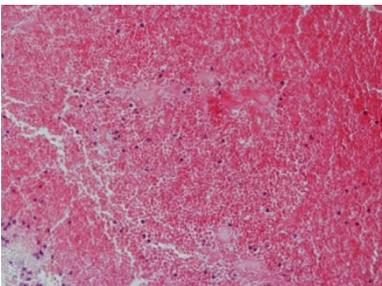
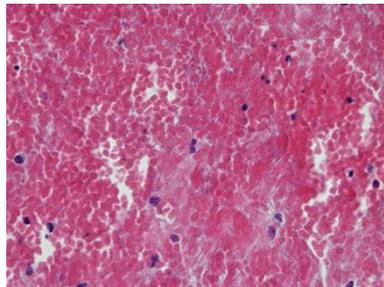
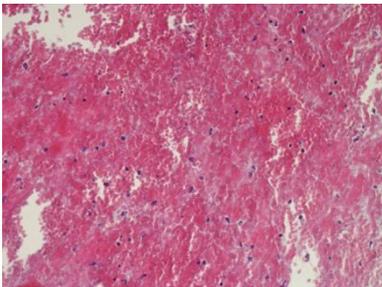
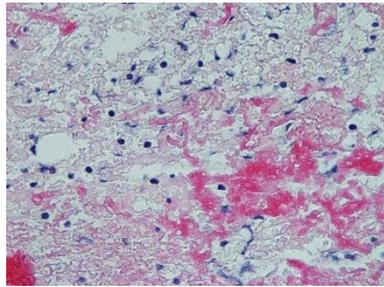
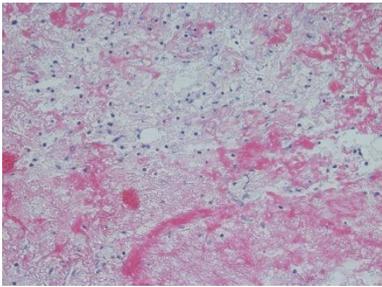
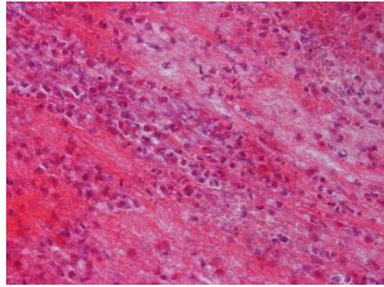
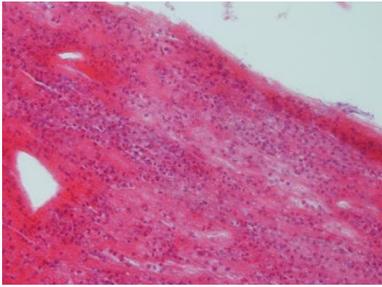
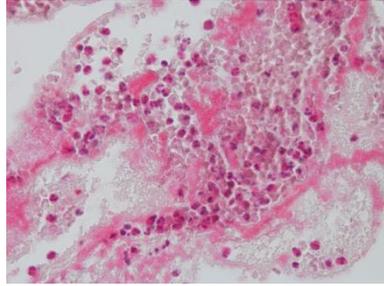
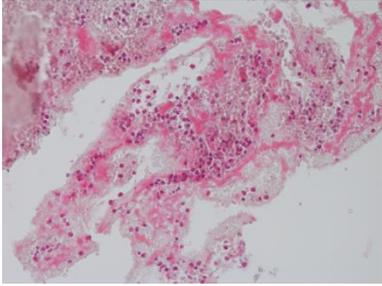
HE 20x

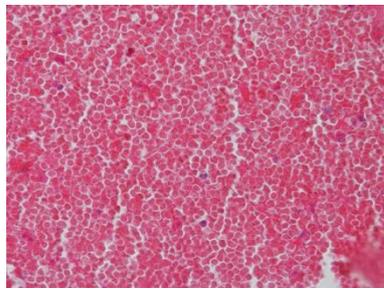
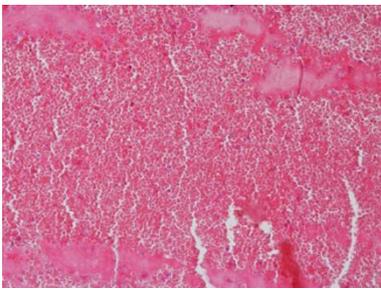
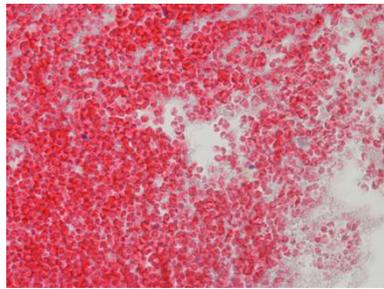
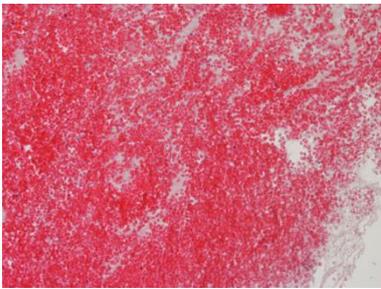
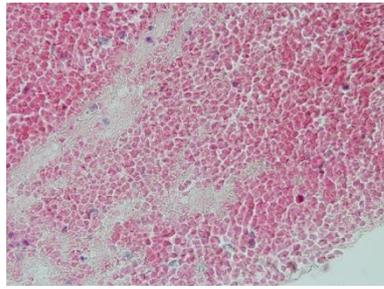
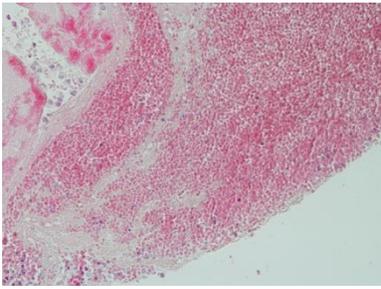
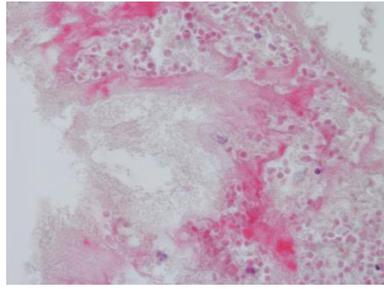
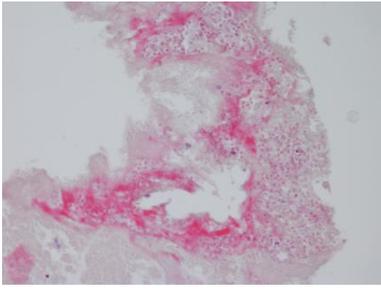
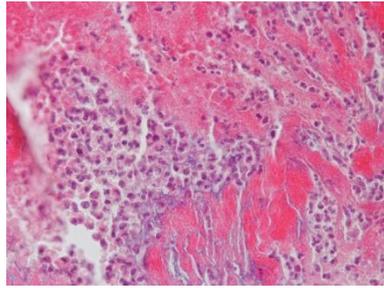
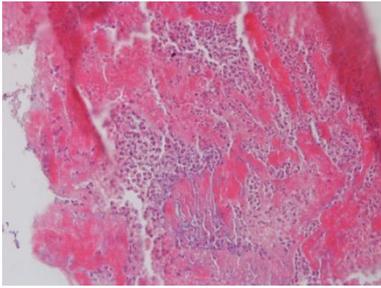


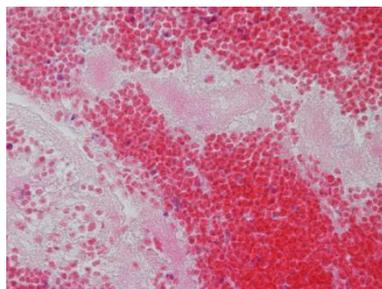
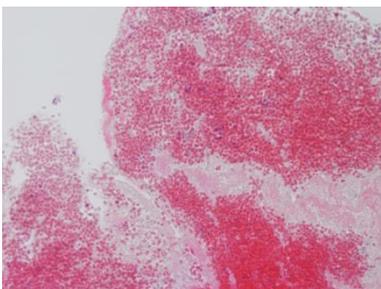
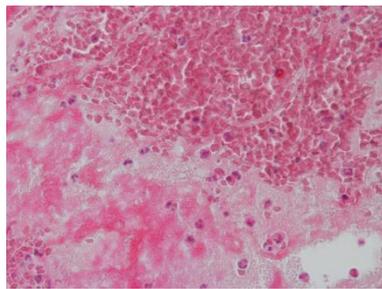
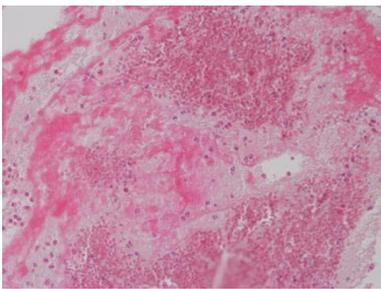
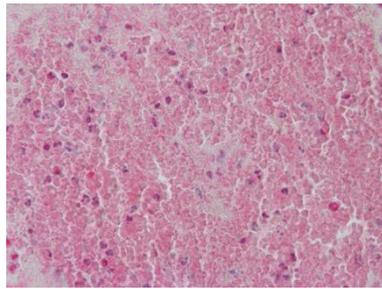
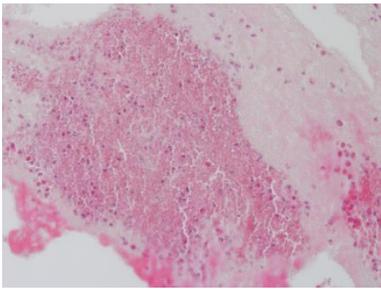
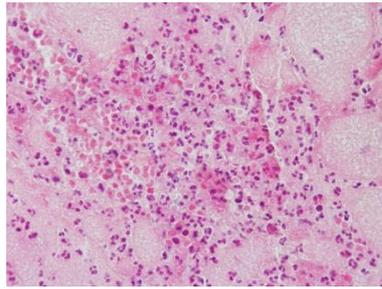
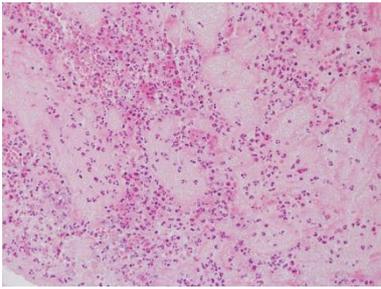
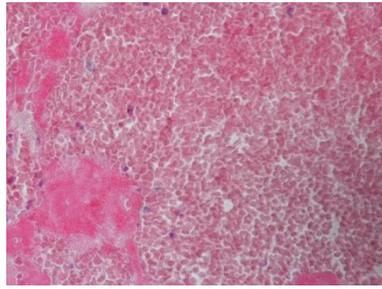
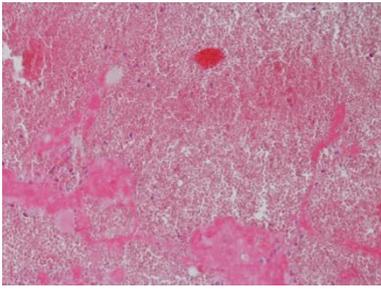
HE 40x

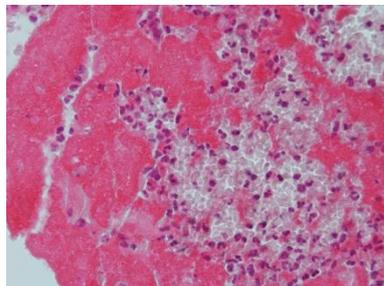
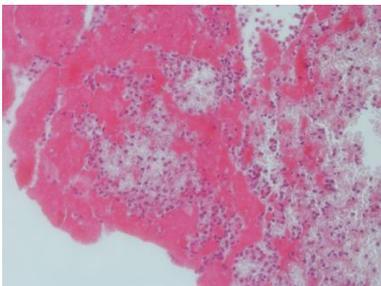
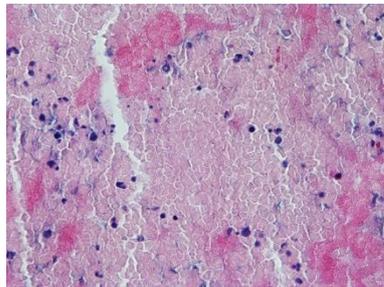
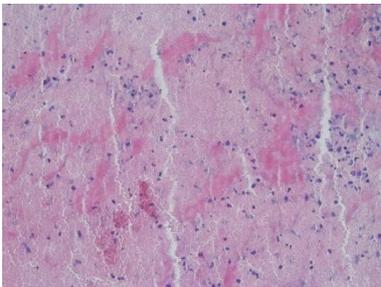
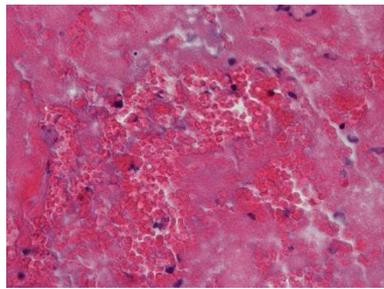
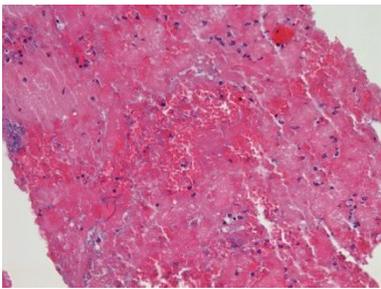
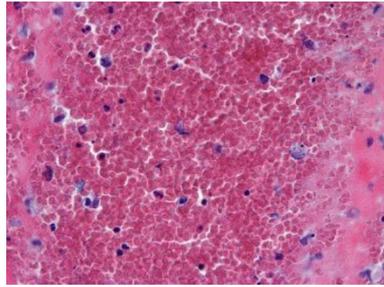
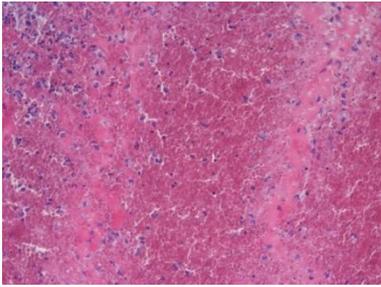
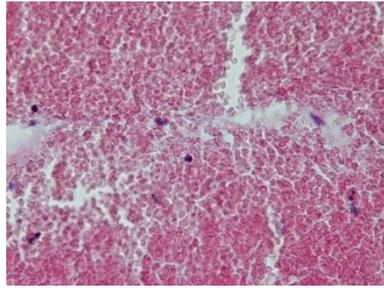
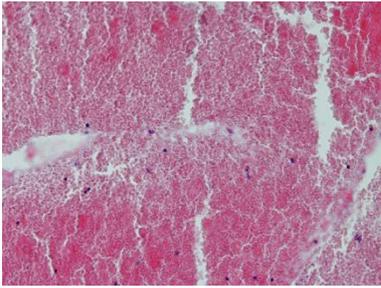


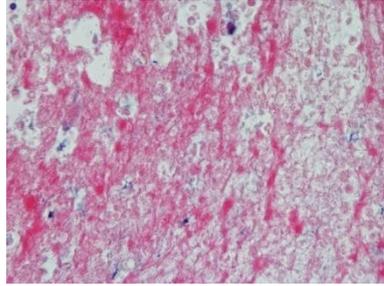
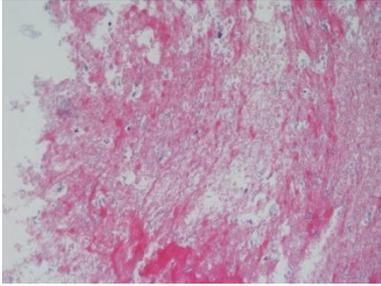












8 Erklärungen zum Eigenanteil

Diese Studie wurde von Herrn Prof. Dr. Tobias Geisler in Zusammenarbeit mit Frau PD Dr. Iris Müller und Frau Dr. Karin Müller konzipiert.

Die Thrombusaspiration erfolgte durch ärztliche Mitarbeiter der Kardiologie des Universitätsklinikums Tübingen.

Die Aufarbeitung der Thromben wurde von den MTAs Frau Lydia Laptev und Frau Ingrid Epple durchgeführt.

Die immunhistochemischen Färbungen wurden nach Anleitung durch die MTA Ingrid Epple von mir selbstständig durchgeführt und ausgewertet.

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbungen wurden zum Teil von Frau Annette Hermann und zum anderen von Herrn Markus Rauer durchgeführt und von mir ausgewertet. Die CD 42b-Färbungen auf S.54 und S.57 erfolgten ebenfalls durch Frau Annette Hermann.

Die statistische Auswertung erfolgte durch mich in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Karin Müller.

Ich habe selbstständig die Daten aufgearbeitet und eine gründliche Literaturrecherche betrieben. Hiermit versichere ich, dass ich diese Dissertationsschrift selbstständig verfasst habe und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen verwendet habe. Die wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen wurden als solche gekennzeichnet.

9 Danksagung

Besonders möchte ich mich an dieser Stelle bei meiner zuverlässigen Betreuerin und Doktormutter Frau PD Dr. med. Iris Müller bedanken, die mich auch wenn es mal nicht so gut voranging immer wieder zum Weitermachen ermunterte.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei Herr Prof. Dr. Tobias Geisler für die Bereitstellung des interessanten Themas meiner Dissertationsschrift.

Außerdem möchte ich mich auch bei Frau Dr. med. Karin Müller bedanken für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Danke auch an meine Mitdoktoranden Frau Annette Hermann und Herrn Markus Rauer für die Bereitstellung der Hämatoxylin-Eosin-Färbungen.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Labors bedanken, die mir immer wieder die ein oder andere Frage beantworten konnten oder mich bei technischen oder logistischen Schwierigkeiten unterstützt haben.

10 Lebenslauf

Name Streib
Vorname Lisa
Geburtsdatum 04.12.1991
Geburtsort Geislingen/Steige

Schulbildung

1998-2002 Grund- und Hauptschule Gingen/Fils
2002-2011 Michelberggymnasium
Geislingen/Steige, Abitur

Studium

Seit dem Wintersemester 2011/2012 Studium der Humanmedizin an der
Eberhard Karls Universität Tübingen
03/14 1.Abschnitt der ärztlichen Prüfung
04.-06.April 17 2.Abschnitt der ärztlichen Prüfung
05/17-08/17 Praktisches Jahr im Bereich Neurologie
am Universitätsklinikum Tübingen
09/17-12/17 Praktisches Jahr im Bereich Innere
Medizin mit Schwerpunkt Rheumatologie
und Kardiologie an den Mediuskliniken
Standort Kirchheim/Teck
12/17-04/18 Praktisches Jahr im Bereich Chirurgie an
den Mediuskliniken Standorte
Kirchheim/Teck und Nürtingen
08.+09. Mai 2018 3.Abschnitt der ärztlichen Prüfung
16.Mai 2018 Approbation als Ärztin