

Aus der Klinik für Kardiologie

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. B. Schieffer
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Differentielle Expression von Monozytensubpopulationen im
Rahmen von Inflammation und Remodelling bei der koronaren
Herzkrankheit**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Medizinischen Doktorgrades

der gesamten Humanmedizin dem Fachbereich Medizin

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt

von Ann-Christin SCHÄFER

geboren in Siegen

Marburg 2019

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am: 19.12.2019

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Herr Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Herr Prof. Dr. B. Schieffer

1. Korreferent: Herr Prof. Dr. R. Eming

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VIII
TABELLENVERZEICHNIS	IX
1. EINLEITUNG.....	1
1.1. DIE KORONARE HERZKRANKHEIT.....	1
1.1.1 <i>Definition der koronaren Herzkrankheit</i>	<i>1</i>
1.1.2 <i>Gesellschaftliche und wirtschaftliche Bedeutung</i>	<i>2</i>
1.1.3 <i>Ätiologie und Risikofaktoren</i>	<i>5</i>
1.1.4 <i>Die Pathophysiologie</i>	<i>7</i>
1.2. DAS IMMUNSYSTEM.....	15
1.2.1 <i>Grundlagen.....</i>	<i>15</i>
1.2.2 <i>Das erworbene Immunsystem.....</i>	<i>16</i>
1.2.3 <i>Das angeborene Immunsystem</i>	<i>18</i>
1.2.4 <i>Monozyten</i>	<i>20</i>
1.3. ZIEL DER ARBEIT	26
2. MATERIAL UND METHODEN.....	27
2.1. VERWENDETE GERÄTE UND MATERIALIEN	27
2.2. DAS STUDIENDESIGN.....	28
2.3. CHARAKTERISIERUNG DES PATIENTENKOLLEKTIVS	28
2.4. ABLAUF DER REKRUTIERUNG UND PATIENTENERFASSUNG	29
2.5. ERKLÄRUNG ZUR ETHIKKOMMISSION.....	30
2.6. AUFBEREITUNG DER PROBEN	30
2.7. DURCHFLUSSZYTOMETRIE.....	30
2.7.1 <i>Theoretische Grundlagen</i>	<i>31</i>
2.7.2 <i>Aufbau und Funktion des Durchflusszytometers LSR II</i>	<i>33</i>
2.7.3 <i>Fluoreszenzfarbstoffe und Biomarker</i>	<i>34</i>
2.7.4 <i>Präparation der Leukozytenproben für die FACS-Analyse</i>	<i>37</i>
2.7.5 <i>Durchführung der FACS-Analyse</i>	<i>39</i>
2.7.6 <i>Datenverwaltung und Auswertung</i>	<i>41</i>
3. ERGEBNISSE.....	42
4. DISKUSSION.....	49
4.1. ZUSAMMENFASSUNG DER HAUPTERGEBNISSE.....	49
4.2. DISKUSSION DER METHODIK	51
4.3. DISKUSSION DER ERGEBNISSE	52
ZUSAMMENFASSUNG	63
SUMMARY	65
LITERATURVERZEICHNIS.....	67
VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER.....	76
DANKSAGUNG	77

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ACS	Acute Coronary Syndrom
ADH	Antidiuretisches Hormon
ADP	Adenosindiphosphat
APC	Allophycocyanin
AT	Adenin-Thymin
ATP	Adenosintriphosphat
AT II	Angiotensin II
AU	Adenin- Uracil
BMI	Body Mass Index
BMP	Bone Morphogenetic Protein
CAD	Coronary Artery Disease
CCL	Cystein-Cystein Chemokin Ligand
CCR	Cystein-Cystein Chemokin Rezeptor
CD	Cluster of Differentiation
CKD	Chronic Kidney Disease
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
(hs) CRP	(high sensitive) C-Reaktives Protein
CTL	Zytotoxischer T-Lymphozyt
CXCL	Cystein-Aminosäure X-Cystein Chemokin Ligand
CXCR	Cystein-Aminosäure X-Cystein Chemokin Rezeptor
DALY	Disability adjusted life year
DAPI	4'-6-Diamidin-2-Phenylindol
DC	Dendritische Zelle
DEGS	Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland
DNA	Deoxyribonucleic Acid

DSMO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ENG	Endoglin, CD105
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
3-FAL	3-Fucosyl-N-Acetyllactosamin
FBS	Fötales Bovines Serum
FCS	Flow Cytometry Standards
FGF	Fibroblast Growth Factor
FITC	Fluoresceinisothio-cyanate
FKN	Fraktalkine
FL (-A, -W)	Fluoreszentes Licht (Area, Width)
FSC (-A)	Forward Scatter (Area)
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
HBSS	Hank`s Balanced Salt Solution
HDL	High Density Lipoprotein
HLA	Human-Leucocyte-Antigen
HSP	Hitzeschockprotein
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMC	Intermediate Care
JUPITER	Justification for the Use of Statins in Primary Prevention: An Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	Low Density Lipoprotein
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen
LpPL	Lipoproteinassoziierte Phospholipase
LPS	Lipopolysaccharid

Ly6C	Oberflächenmolekül auf murinen Monozyten
MALT	Mucosa Associated Lymphoid Tissue
MCP	Monocyte Chemoattractant Protein
M-CSF	Macrophage Colony Stimulating Factor
MHC	Haupthisto- kompatibilitätskomplex
MI	Myokardinfarkt
MMP	Matrix Metalloprotease
MONICA	Monitoring Cardiovascular Disease
NK	Natürliche Killerzelle
NO	Stickstoffmonoxid
NSTEMI	Nicht-ST-Strecken Elevations Myokardinfarkt
OTC	Optische Kohärenztomographie
P	Probability, engl. für Wahrscheinlichkeit; Signifikanzwert
PA	Plasminogenaktivator
PAI-1	Plasminogenaktivator-Inhibitor (1)
PAF	Platelet-activating-factor
PAMP	Pathogen-associated- molecular-patterns
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PDGF	Platelet-Derived-Growth Factor
PE	Phycoerythrin
PE-Cy7	Phycoerythrin-Cyanin(7)
PECAM	Platelet endothelial cell adhesion molecule
PET	Positronenemissions Tomographie
PGI	Prostaglandin
PRR	Pattern Recognition Receptor
RANTES	Regulated an Activation Normal T Cell Expressed and Secreted

(m)RNA	(messenger) Ribonucleic Acid
ROS	Reactive Oxygen Species
SPN	Sialophorin
SR	Scavenger Rezeptor
SSC	Side Scatter
STEMI	ST-Strecken Elevations Myokardinfarkt
TCR	T Zell Antigen Rezeptor
TGF	Transforming Growth Factor
TF	Tissue Factor
TH (1/2)	T Helferzelle (1/2)
TIE-2	Tyrosine Kinase with Immunoglobulin-like and EGF-like Domains 1
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF (α)	Tumornekrosefaktor (α)
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR (-2)	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2
VLA	Very Late Antigen (α 4 β 1 Integrin)
WHO	World Health Organization; Weltgesundheitsorganisation
VH-IVUS	Virtueller histologischer intravaskulärer Ultraschall
YLL	Years of Life Lost

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Gating Strategie zur quantitativen Differenzierung der Monozytensubpopulationen.....	40
Abbildung 2: Dot Plot Graphik einer beispielhaften Datenerhebung durch das FACS LSR II.....	45
Abbildung 3: Prozentualer Anteil der Gesamtmonozyten an Gesamtheit der Blutzellen (nach Kruskal-Wallis-Test, anschließend Dunn's multiple comparison Test)	46
Abbildung 4: Prozentualer Anteil der CD14 ^{hi} CD16 ^{lo} Monozyten an den Gesamtmonozyten (nach Kruskal-Wallis-Test, anschließend Dunn's multiple comparison Test).....	47
Abbildung 5: Prozentualer Anteil der CD14 ^{hi} CD16 ^{hi} -Monozyten an den Gesamtmonozyten (nach Kruskal-Wallis-Test, anschließend Dunn's multiple comparison Test).....	47
Abbildung 6: Prozentualer Anteil der CD14 ^{lo} CD16 ^{hi} Monozyten an den Gesamtmonozyten (Kruskal-Wallis-Test anschließend Dunn's multiple comparison test)	48

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Übersicht der physiologischen Funktion vaskulärer Zellen mit Relevanz in der arteriosklerotischen Plaquerentwicklung (Lüllmann-Rauch, 2015) (Behrends, et al., 2012)	14
Tabelle 2: Verwendetes Material.....	27
Tabelle 3: Patientencharakteristika.....	29
Tabelle 4: Fluoreszenzfarbstoffe und Biomarker	38
Tabelle 5: 41 gesunde Kontrollen und 189 Patienten. Body-Mass Index (BMI) ist definiert als Körpergewicht (kg) dividiert durch Körpergröße (m) zum Quadrat. m=männlich, w=weiblich. Der Datenvergleich erfolgte mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Test und anschließendem Post Hoc durch den Dunn's multiple comparison Test. Die Darstellung erfolgt als Median mit 10th/90thpercentile, *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001, ****P<0,0001 vs. control, ###P<0,01 vs. MI.....	44

1. EINLEITUNG

1.1. Die koronare Herzkrankheit

1.1.1 DEFINITION DER KORONAREN HERZKRANKHEIT

Die koronare Herzkrankheit (KHK; engl.: coronary artery disease = CAD) entspricht der Manifestation der Arteriosklerose in den herzversorgenden Gefäßen. Arteriosklerotisch bedingte Stenosen führen zu Flusslimitationen mit konsekutiver poststenotischer Minderversorgung myokardialer Areale. Folge ist eine funktionelle Koronarinsuffizienz, definiert als Dysbalance zwischen Sauerstoffangebot und Sauerstoffbedarf des Myokards.

Die myokardiale Ischämie kann sich in verschiedenen Formen präsentieren. So unterscheidet man zunächst eine asymptomatische KHK von symptomatischen Verläufen. (Herold, 2016) Die Symptomatik unterscheidet sich in dem klinischen Auftreten und zeitlichen Vorkommen. Man unterscheidet die stabile Angina pectoris, das akute Koronarsyndrom, ischämische Herzmuskelschädigungen, das Auftreten von Herzrhythmusstörungen und den plötzlichen Herztod. Die stabile Angina pectoris beschreibt in ihrer Häufigkeit und Ausprägung konstante thorakale Schmerzen. Ursächlich ist die Symptomatik auf reversible Myokardischämien, infolge belastungsabhängiger kardialer Leistungssteigerung zurück zu führen. Von der stabilen Variante ist die instabile Form der Angina pectoris zu unterscheiden. Diese ist der Gruppe des akuten Koronarsyndroms (Acute coronary syndrom = ACS) zuzuordnen. Des Weiteren umfasst das ACS auch den akuten Myokardinfarkt, in den beiden Ausprägungen des NSTEMI (Non ST-Segment-elevation myocardial infarction) und STEMI (ST-Segment-elevation myocardial infarction). Neuaufgetretene, in ihrer Intensität und/oder Dauer zunehmende thorakale Schmerzen ohne laborchemischen Nachweis einer myokardialen Schädigung werden als instabile Angina pectoris bezeichnet. Im Gegensatz hierzu stehen die Myokardischämien, die mit Anstieg organspezifischer Nekrose-Parameter, wie dem Troponin¹ einher

¹ Kardiales Troponin (cTroponin) wird als herzspezifisches Enzym in der Ischämiediagnostik verwendet. Es ist als Proteinkomplex Bestandteil des myokardialen Kontraktionsapparates. Man unterscheidet drei Untereinheiten: cTNT, cTNI und das TNC; wobei c als Index die kardiospezifischen Proteine kennzeichnet. (Rassow, et al., 2016)

gehen. Hier erfolgt eine Differenzierung anhand elektrophysiologischer Diagnostik und dem Vorhandensein von elektrokardiographischen Streckenveränderungen.

1.1.2. GESELLSCHAFTLICHE UND WIRTSCHAFTLICHE BEDEUTUNG

Weltweit sind kardiovaskuläre Erkrankungen die führende Todesursache. 2016 waren rund 17,0 % (4,478 Millionen) der Todesfälle bei Frauen und 16,4 % (4,957 Millionen) der Todesfälle bei Männern auf kardiovaskuläre Erkrankungen zurückzuführen. Insgesamt starben in 2016 9,433 Millionen Menschen weltweit an einer ischämischen Herzkrankheit, was 16,7 % aller Todesursachen entspricht. Die zweithäufigste Ursache, die zerebrovaskulären Erkrankungen, gehört ebenfalls der Gruppe der vaskulären Erkrankungen an und führte zu 5,781 Millionen Todesfällen (10,2 % aller Todesfälle). (World Health Organization, 2018)

Neben der enormen Bedeutung hinsichtlich Morbidität und Mortalität, nimmt die koronare Herzkrankheit für viele Patienten eine entscheidende Rolle in ihrem alltäglichen Leben ein. Sie reduziert nachweislich die Lebensqualität und führt zu gesellschaftlichen Abhängigkeiten der Betroffenen.

Betrachtet man die *years of life lost*² (YLL) so ist die ischämische Herzkrankheit für 10,4 % der verlorenen Lebensjahre verantwortlich. Damit ist es auch hier die führende Ursache. (WHO(YLL), 2018) Allerdings in Bezug auf die *disability adjusted life years*³ (DALYs) nehmen sie wieder einen bedeutenderen Stellenwert ein. Sie entsprechen mit 203.700 (7,6 %) DALYs weltweit der häufigsten Ursache für lebensbeeinträchtigende Erkrankungen. (WHO(DALY), 2018)

² *Years of life lost* beschreibt die verlorenen Lebensjahre einer Population, auf Grund vorzeitig eintretenden Todes durch z.B. Krankheit, Unfall oder Krieg in Abhängigkeit von der zu erwartenden Lebenswahrscheinlichkeit der Population. Der Wert errechnet sich aus der Anzahl der Tode in jeder Altersgruppe multipliziert mit dem Wert der standardisierten globalen Lebenserwartung für das Alter in dem der Tod eingetreten ist. YLL ist ein wichtiger Bestandteil zur Berechnung der DALYs. (WHO, 2008)

³ Disability-adjusted life year (DALY) ist ein Wert, der die Lebensjahre einer Population/ eines Individuums benennt, die durch einen schlechten Gesundheitszustand oder Krankheit negativ beeinflusst waren. Folglich entspricht ein DALY dem Verlust eines Jahres „gesunden Lebens“. DALYs berechnen sich aus der Summe an YLL und YLD (years lost due to disability; Berechnet wie folgt: Anzahl der vorkommenden Fälle * die durchschnittliche Dauer der Erkrankung * Wichtungsfaktor (der Wichtungsfaktor präsentiert die Schwere der Erkrankung und liegt zwischen 0 und 1)) (WHO, 2008)

Schätzungen der WHO zufolge werden die Todesfälle bedingt durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen im Jahre 2030 auf bis zu 23,4 Millionen pro Jahr ansteigen. Damit würden ischämische Herzerkrankungen, neben zerebrovaskulären Erkrankungen, chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen und Infektionen der unteren Atemwege (vor allem Pneumonien), auch im Jahre 2030 weiterhin zu den führenden Todesursachen zählen.

Außerdem ergaben Berechnungen eine Zunahme der DALYs durch kardiovaskuläre Erkrankungen bis zum Jahre 2030. Man geht davon aus, dass sie gemeinsam mit unipolaren depressiven Störungen und Verkehrsunfällen zu den drei häufigsten Ursachen gehören werden, die für lebensqualitätsmindernde gesundheitliche Probleme verantwortlich sind. (WHO, 2008)

Folglich zählen kardiovaskuläre Erkrankungen zu den weltweit schwerwiegendsten gesundheitlichen Problemen hinsichtlich der Todesursachen, der verlorenen Lebensjahre und der DALYs.

Dem deutschen Herzbericht von Dezember 2016 zu Folge waren 8,5 % der Krankenhausaufnahmen in Deutschland im Jahre 2015 auf Herzerkrankungen zurückzuführen. Davon betrug die Zahl der Hospitalisierungen auf Grund der koronaren Herzkrankheit 800,5 pro 100.000 Einwohner, wobei die Anzahl an männlichen Erkrankten mehr als doppelt so hoch war als die der weiblichen. Gesondert aufgeführt wurde der akute STEMI, welcher 266,8 Krankenhausaufnahmen pro 100.000 Einwohnern bedingte. Auch hier waren Männer doppelt so häufig betroffen wie Frauen. (Deutsche Herzstiftung e.V. , 2016)

Im Vergleich zu den Erhebungen von 1995 bis 2015 konnte 2016 eine Entwicklung der stationären Morbiditätsziffer der KHK mit rückläufiger Tendenz festgestellt werden. Auch die Sterbeziffer der kardialen Erkrankungen nimmt kontinuierlich ab. Wobei im Einzelnen die koronare Herzkrankheit sowie der Myokardinfarkt, die Diagnosen mit den schlechtesten Prognosen sind. (Deutsche Herzstiftung e.V. , 2016)

Nach wie vor waren 2015 die Krankheiten des Herz-Kreislaufsystems mit 38,5 % (356.616 Gestorbene insgesamt) der Todesfälle, die häufigste Todesursache in Deutschland. (Statistisches Bundesamt (Destatis), 2017) Insgesamt 35 % waren dabei auf

die chronisch ischämische Herzkrankheit und akute Myokardinfarkte zurückzuführen. (Statistisches Bundesamt (Destatis), 2017)

In der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1)⁴ wurde ermittelt, dass die Lebenszeitprävalenz der 40- bis 79-Jährigen für die koronaren Herzerkrankung 9,3 % beträgt. (Göswald, et al., 2013) Damit wäre nahezu jeder zehnte Deutsche im Alter von 40- bis 79-Jahren im Laufe seines Lebens davon betroffen. (Göswald, et al., 2013)

Bei gleichbleibender Prävalenz konnte eine sinkende Inzidenz des Herzinfarktes und Abnahme der Mortalität nachgewiesen werden. Diese positive Entwicklung ist im Wesentlichen auf eine effektivere Reduktion der Risikofaktoren, optimierte Therapie und Sekundärprävention zurückzuführen. (Göswald, et al., 2013)

Auch aus wirtschaftlicher Sicht kommt der koronaren Herzerkrankung eine enorme Bedeutung zu. Unter anderem die Einstellung der Patienten mittels einer medikamentösen Dauertherapie sowie die flächendeckende Verwendung koronarangiographischer Interventionen, stellen erhebliche Kostenpunkte dar. Laut des statistischen Bundesamtes waren Krankheiten des Kreislaufsystems im Jahr 2006 mit 14,9 %, entsprechend 35,2 Milliarden Euro Ursache der höchsten Krankheitskosten in Deutschland. (Nöthen, et al., 2009)

Eine zusätzliche Variante stellt die Krankheitskostenrechnung dar, die die Kostenrechnung um patienten- und krankheitsbezogene Aspekte ergänzt. Dies ermöglicht eine Analyse aus volkswirtschaftlicher Sicht. Das statistische Bundesamt ermittelte in der Krankheitskostenrechnung 2008 einen Gesamtwert von 254 Mrd. Euro an Krankheitskosten in Deutschland. Krankheiten des Kreislaufsystems umfassten 14,5 % der Summe und stellten damit den größten Einzelposten dar. In absoluten Zahlen entspricht das 36,9 Milliarden Euro. (Statistisches Bundesamt, 2015)

Die koronare Herzerkrankung ist aus gesundheitspolitischer, volkswirtschaftlicher und nicht zuletzt aus Sicht des Patienten, auf nationaler und internationaler Ebene ein Thema von erheblicher Bedeutung. Hier stehen vor allem der hohe Anteil der betroffenen Gesellschaft und die zu tragenden Kosten im Mittelpunkt.

⁴ Durchgeführt durch das Robert- Koch Institut, Berlin, Abteilung für Epidemiologie und Gesundheitsmonitoring; 2013

1.1.3. ÄTIOLOGIE UND RISIKOFAKTOREN

Die Ätiologie der koronaren Herzerkrankung ergibt sich aus dem Vorhandensein und der Kombination verschiedener Risikofaktoren. Die Risikofaktoren für die systemische Arteriosklerose teilen sich in beeinflussbare und nicht beeinflussbare Faktoren. Zu den nicht beeinflussbaren Faktoren zählen das männliche Geschlecht und genetische Determinanten sowie das Lebensalter. Ferner sind hier ethnische Besonderheiten einzuordnen. Unter die genetischen Veränderungen fallen Mutationen sowie Polymorphismen. Für eine frühzeitige Atherothrombose sind familienanamnestisch familiäre Dyslipidämien, Diabetes mellitus oder eine essentielle arterielle Hypertonie prädisponierend. Beeinflussbar hingegen sind bestimmte Lebensweisen und die mit ihnen einhergehenden Veränderungen. Von besonderer Bedeutung sind ein Nikotinabusus, Adipositas sowie Dys- und Hyperlipidämien. Des Weiteren behandelbare Erkrankungen wie Diabetes mellitus und ein erworbener arterieller Hypertonus. Auch ein chronischer Alkoholabusus, chronische Entzündungen und das Vorhandensein oxidativen Stresses stehen in Zusammenhang mit dem Auftreten einer Koronarsklerose. (Guder, et al., 2009)

Häufig werden bereits in jungen Lebensjahren die Grundlagen des Risikoprofils angelegt. Hierbei handelt es sich vor allem um mangelnde Bewegung und obliterierende Essgewohnheiten. (Löwel, 2006) Zu den kardiovaskulären Risikofaktoren zählen auch Entzündungszustände bei bereits an KHK erkrankten Personen und Umstände beziehungsweise Therapien, die einen direkten Einfluss auf das Organ Herz selbst hatten. Zum Beispiel nach einer Radiatio im thorakalen Bereich oder nach erfolgreicher Herztransplantation. (Herold, 2016)

Um eine Einschätzung des Risikoprofils vornehmen zu können, wurden zahlreiche Studien durchgeführt und Scores zur individuellen Risikobewertung erstellt. Im Rahmen der WHO-MONICA⁵ Studie wurden seit 1984/85 im Landkreis Augsburg drei repräsentative Querschnittsstudien zum Vorkommen und zur Entwicklung von kardiovaskulären Risikofaktoren und deren Risikoprädiktion für das Auftreten eines kardiovaskulären Ereignisses vorgenommen. Die Beobachtungen wurden bis

⁵ MONICA als Akronym für „MONItoring Cardiovascular disease“. Eine internationale Kohortenstudie zur Ermittlung und Beobachtung von Ursachen und Trends der Mortalität bei kardiovaskulären Erkrankungen. Durchgeführt von der World Health Organization. (Löwel, et al., 2005)

einschließlich 2002 durchgeführt. Es ergab sich eine Risikofaktorengewichtung für die Manifestation inzidenter akuter Myokardinfarkte pro 100.000 Personenjahre von:

1. Zigarettenrauchen 2. Blutfettstörungen 3. Systolischer Blutdruck größer oder gleich 160 mmHg (in ihrer Bedeutung absteigend). (Löwel, et al., 2005) Die Herzinfarktinzidenz war bei Männern auch dann um etwa das dreifache höher als bei Frauen, wenn die vorhandenen Risikofaktoren alle im Normbereich lagen. Der Geschlechterunterschied minimierte sich mit der Überschreitung der Normwerte für die Risikofaktoren. (Löwel, 2006)

Einige klinische Studien zeigten eine Korrelation von inflammatorischen Markern mit der Auftretenswahrscheinlichkeit eines koronaren Ereignisses. Vor allem das high sensitive *CRP* (hsCRP)⁶, gemessen im Blutplasma des Patienten, scheint eine prospektive Aussagekraft hinsichtlich des Risikos eines Myokardinfarktes zu haben. Des Weiteren steht auch das Outcome eines Patienten nach einem akuten Koronarsyndrom mit dem CRP-Level in Zusammenhang. Im Falle des C-reaktiven Proteins konnte keine pathogenetische Korrelation zu der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen nachgewiesen werden, wobei das Protein durchaus ein validierter Biomarker für das Risiko ist. (Ridker, et al., 2004) Proinflammatorische Zytokine werden unter anderem durch das viszerale Fettgewebe freigesetzt, sodass bei adipöseren Personen häufiger erhöhte Entzündungsparameter nachgewiesen werden konnten. In der JUPITER⁷ Studie (2009) konnte gezeigt werden, dass eine lipidsenkende Therapie mit Rosuvastatin durch zwei unabhängige Effekte das kardiovaskuläre Risiko senkt. Zum einen, über die Reduktion des Low-Density-Lipoproteins (LDL), und zum anderen fand eine Modulation antiinflammatorischer Prozesse zum Zeitpunkt der Primärprävention statt. Beide Effekte führten zur Risikoreduktion eines akuten Koronarereignisses. (Ridker, et al., 2009)

Eine korrekte Risikobeurteilung unter Verwendung des Entzündungsmarkers hsCRP ist in Kombination mit der anamnestischen Information über das familiäre Auftreten einer frühzeitigen Arteriosklerose möglich. Eine Empfehlung für die Anwendung dieser

⁶ hsCRP = high-sensitive C- reactive protein; ein Akute- Phase Protein gemessen mittels high-sensitive assay.

⁷ JUPITER: *Justification for the Use of Statins in Prevention*; eine multizentrische randomisierte Interventionsstudie zur Evaluation des β -HMG-CoA- Reduktase Hemmers Rosuvastatin. (Ridker, et al., 2009)

Risikoeinschätzung besteht zurzeit nur für Patienten der KHK-Risikogruppe (Zehn-Jahres-Risiko 10-20 %). (Suttorp N., 2012)

Anhand der Risikofaktoren ergeben sich eine Reihe laborchemischer Parameter, die in der Diagnostik und zur Primärprävention der koronaren Herzerkrankung herangezogen werden. Es erfolgen die Bestimmungen des Gesamtcholesterins, LDL-Cholesterins, High-Density-Lipoproteins (HDL-Cholesterins), des Apolipoproteins B-100, der Triglyzeride und des Lipoproteins(a) zur Beurteilung des Fettstoffwechsels. Im Weiteren wird die Nüchternblutglukose zur Einschätzung des Blutzuckerhaushalts gemessen. An thrombogenetischen Faktoren können Fibrinogen, Faktor VII und der Von-Willebrand-Faktor bestimmt werden. Als weiterer Hinweis auf diabetische oder hypertone Folgeerscheinungen ist die Betrachtung des Albumins im Urin möglich. Als zusätzlicher Parameter für eine Risikostratifizierung kann das hsCRP bestimmt werden.

1.1.4. DIE PATHOPHYSIOLOGIE

Die koronare Herzerkrankung entspricht der Manifestation der Arteriosklerose in den herzversorgenden Gefäßen. Arteriosklerose ist eine chronische Erkrankung, die sich initial in der Intima betroffener Gefäße entwickelt. Pathologisches Korrelat stellen inflammatorische lipidreiche Plaques dar. Durch deren Wachstum im Gefäßlumen, kommt es zu stenotisch bedingten Flusslimitationen oder aufgrund einer Plaqueruptur mit konsekutiver lokaler Thrombusbildung, zu einer Okklusion der Arterie. Die, die Blutströmung beeinflussenden Ereignisse, manifestieren sich klinisch als belastungsinduzierte stabile Angina pectoris, akutes Koronarsyndrom oder können zu einem plötzlichen Herztod führen.

Die Wand eines Blutgefäßes besteht aus folgenden histologischen Komponenten: Endothel, glatte Muskulatur sowie Fibroblasten und der Extrazellulärmatrix. Das Endothel besteht aus einzelnen Lagen Endothelzellen, die die bedeutendste Komponente in der Trennung von Intra- und Extravasalraum darstellen. Gemeinsam mit der subendothelialen Schicht bilden sie die Tunica intima, kurz Intima genannt. Die einzelnen Endothelzellen sind durch Tight junctions, Adhärenz Kontakten und Gap junctions mit einander verbunden. In ihrer Gesamtheit bilden sie eine selektiv permeable Schicht und übernehmen im Wesentlichen die Aufgabe den Durchtritt von Plasmabestandteilen zu kontrollieren und eine Kontaktaufnahme von Blutbestandteilen mit der thrombogenen

Extrazellulärmatrix zu verhindern. Die Tunica media wird gebildet von glatten Muskelzellen, deren Aufgabe die Aufrechterhaltung und Anpassung der Wandspannung ist sowie die Produktion von extrazellulärer Matrix Bestandteilen. Zwischen den glatten Muskelzellen befindet sich die Extrazellulärmatrix, bestehend aus elastischen und kollagenen Fasern sowie Proteoglykanen. Mikrofibrillen aus Fibrin und kollagenen Fasern sind das Bindungsäquivalent für den Von-Willebrand-Faktor, der nach Kontaktaufnahme eine sofortige Thrombozytenaggregation induziert. Die äußerste Schicht ist die Tunica adventitia. Sie besteht hauptsächlich aus Bindegewebe und erfüllt die Aufgabe der Verankerung im umliegenden Gewebe. (Lüllmann-Rauch, 2015) Ort der arteriosklerotischen Plaquentstehung ist initial der subendotheliale Raum.

Die physiologisch sezernierten endothelialen Faktoren dienen der Interaktion zwischen Gefäßendothel und der Muskulatur in der Media. Endothelrezeptor-vermittelt kann die Gefäßweite, dem entsprechenden Sauerstoffbedarf des Myokards angepasst werden. Mögliche Mediatoren, die eine Produktion des gefäßdilatierenden Stickstoffmonoxides (NO) induzieren, sind Acetylcholin, Adenosintriphosphat (ATP), Histamin und Endothelin. Die Freisetzung des koronarkonstruktiven Endothelins wird induziert durch die Bindung von Angiotensin II (AT II), dem antidiuretischen Hormon (ADH) und dem Transforming Growth Factor (TGF). Thrombin als Mediator wirkt sowohl auf die Produktion von NO, als auch auf die Synthese von Endothelin. Direkt koronardilatierende Substanzen sind NO, Prostaglandin PGI₂ und Adenosin. (Silbernagel, et al., 2014)

Die Grundlagen zur Entwicklung einer Arteriosklerose könnten schon in der fetalen Periode oder kurz nach der Geburt gelegt werden. Durch intimale Zellformationen und die beginnende Entwicklung von Fatty-Streaks (Fettstreifen) können erste Grundlagen einer Läsion gesetzt werden. Die zunächst klinisch unauffällige Läsion entwickelt sich etwa 20-30 Jahre, bis es zu einer symptomatischen Signifikanz kommt. (Coleman, et al., 2009) Doch nicht alle Fatty-Streaks reifen zu einem Atherom heran. Die für die Fettstreifen charakteristischen Lipoproteinbestandteile in der Intima können durch mononukleäre Phagozyten mit entsprechenden Rezeptoren, wieder aus den sich entwickelnden Läsionen eliminiert werden. (Suttorp N., 2012) Daher kommt es nicht regelmäßig zur Ausbildung eines Atheroms. Als ein unabhängiger Weg, Lipide dem plaquebildenden Prozess zu entziehen, gilt das HDL. Überschreitet die Lipidintegration die Eliminierungskapazität, so kommt es zum Progress des Atheroms. (Suttorp N., 2012)

Die ersten pathophysiologischen Erklärungen der Arteriosklerose basierten auf der Annahme, dass Arteriosklerose eine Antwort auf örtlich begrenzte Gefäßverletzungen sei, so formulierte es Virchow Mitte des neunzehnten Jahrhunderts. Abgelöst wurde diese Theorie durch die Erklärung mittels eines rein proliferativen Prozesses in der Gefäßwand. Ergänzt durch die Erkenntnis thrombozytärer Aggregation an beschädigtem Endothel und der dadurch ausgelösten Freisetzung von Platelet-Derived-Growth Factor (PDGF), welcher zur Proliferation glatter Muskelzellen in der arteriellen Intima führe. Es wurde angenommen, dass dieser Prozess den Ursprung des arteriosklerotischen Plaques bildet und passive Lipidablagerungen die Wachstumsbausteine des Atheroms darstellen. Dieses Konzept konnte durch zellbiologische Kenntnisse überarbeitet werden. So konnten Immunzellen und Mediatoren in Atheromen identifiziert werden, welche unter Verdacht standen durch inflammatorische Prozesse die Entwicklung der Erkrankung voranzutreiben. (Libby, et al., 1991) Mit der Möglichkeit gentechnischer Untersuchungen am Mausmodell konnte diese These weiter gestützt und die zentrale Rolle der Hypercholesterinämie definiert werden. (Hansson, et al., 2006) Die Entstehung der Arteriosklerose basiert auf einer komplexen Interaktion zwischen Inflammation, metabolischen und vaskulären Mechanismen. Initial kommt es zu einer Aktivierung der Endothelzellen. Frühe Endothelschäden sind auf eine Reihe unterschiedlicher Faktoren zurückzuführen. Dazu zählen Mikroorganismen, Toxine, Hypercholesterinämie, arterielle Hypertonie und immunologische Ereignisse. Besonders aber auch Scherkräfte, die am ungünstigsten an Gefäßabzweigungen und kurvigen Verlaufsabschnitten einwirken. Parallel zu den endothelialen Prozessen, folgt neben der mechanischen Mehrbeanspruchung dieser Gefäßabschnitte, eine physiologische Zunahme gefäßwandverstärkender glatter Muskelzellen. Diese Akkumulation subendothelialer Muskelzellen führt zu einer ersten Dickenzunahme der Intima und gilt als ein prädisponierender Faktor in der Entstehung einer arteriosklerotischen Formation. Auf der anderen Seite führen sowohl ein reduziertes Vorkommen als auch ein zu stark fluktuierendes Auftreten physikalischer Scherkräfte gleichfalls zu endothelialen Dysbalancen. Folglich bedingen die hämodynamisch abhängigen Scherkräfte Veränderungen der Endothelfunktion. Es erfolgt die Induktion der Genexpression für Arteriosklerose fördernde Proteine wie etwa Fibroblast-Growth-Factor-2 (FGF-2), Tissue-Factor (TF), Plasminogenaktivator (PA) und Endothelin als auch parallel für solche, die antiatherogen wirken, besonders NO und Plasminogenaktivator-Inhibitor

(PAI-1). (Coleman, et al., 2009) Die Reaktion auf die pathologischen Ereignisse ist die Endothelzellaktivierung. Ausdruck dieser Aktivierung, ist die gesteigerte Expression von extrazellulären, lumenseitigen Adhensionsmolekülen, wie z.B. Vascular Cell Adhesion Molecule (VCAM), an welche sich Monozyten binden und in die Intima migrieren. (Ley, et al., 2007) (Laudanna, et al., 2002) Dieser Prozess wird reguliert durch proinflammatorische Zytokine und die zugehörigen Rezeptoren. (Ley, et al., 2007) (Laudanna, et al., 2002) (Tacke, et al., 2007) Die zu Beginn auftretende Gefäßwandveränderung bezeichnet man als Fatty-Streaks. Ihre Entstehung läuft parallel zur Endothelzellaktivierung ab. Hierbei handelt es sich um lokal erhöhte Lipoproteineinlagerungen innerhalb der Intima. Die Akkumulation findet nicht rein passiv statt, sondern kann durch die Bindung von Lipoproteinpartikel an extrazelluläre Bestandteile des Endothels katalysiert werden. Eine anschließende Interaktion mit extrazellulären Glycosaminoglycanen fixiert die Lipidmoleküle zusätzlich. In einer weiteren Reaktion kommt es zu einer Oxidation der matrixgebundenen Lipoproteine. Die lipoproteinassozierte Phospholipase A2 (LpPL A2) katalysiert die Reaktion von, in oxidierten Lipoproteinen vorhandenen, Phospholipiden zu proinflammatorischen lysophosphatidylhaltigen oxidierten Lipoproteinen. (Suttrop N., 2012)

Die beschriebenen Ereignisse bilden die Grundlage der Entzündung. Im Zentrum des inflammatorischen Geschehens steht besonders die Monozytenrekrutierung respektive die Monozytenaktivierung und die transendotheliale Diapedese mit Transformation in intimaständige Makrophagen. Die gewebeständigen mononukleären Zellen sezernieren eine Vielzahl an unterschiedlichen Mediatoren, wodurch der Prozess weiter forciert wird. Chemokine wie Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP1) oder RANTES locken vermehrt Monozyten/Makrophagen an. Die Makrophagen verstärken durch die Freisetzung zahlreicher proinflammatorischer Mediatoren, unter anderem reaktive Sauerstoffspezies, proinflammatorische Zytokine, wie beispielsweise Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) und Interleukine, die Endothelzellaktivierung und die Modulation der glatten Muskulatur. (Idzkowska, et al., 2015)

Monozyten differenzieren zu Makrophagen, welche durch Endozytose von Lipiden in Schaumzellen degenerieren. (Ley, et al., 2011) Adhäsion, Migration und Reifung zu Schaumzellen sind entscheidende Abläufe in der Fatty-Streak-Läsion Bildung. (Murphy, et al., 2014) Eine weitere Hypothese ist, dass die Schaumzellbildung direkt aus neu

rekrutierten Monozyten stattfindet. Zusätzlich ist auch die Entwicklung aus läSIONSSTÄNDIGEN dendritischen Zellen (DC) möglich. (Paulson, et al., 2010) Den Schaumzellen ist es möglich transendothelial in die Blutzirkulation einzutreten und somit den Prozess zu verlassen. (Gerrity, 1981) Eine hohe Dichte an Scavenger Rezeptoren auf der Zelloberfläche von Makrophagen (SR-A, CD36, CXCL16), die in der Lage sind modifizierte Lipoproteine aufzunehmen, entwickelt sich während der Makrophagenreifung. (Kunjathoor, et al., 2002) (Ley, et al., 2011) Studien über den Zusammenhang von Cluster of Differentiation (CD)36 positiven Makrophagen und dem Auftreten arteriosklerotischer Erkrankungen zeigen keine einheitlichen Ergebnisse. Diese kontroversen Beobachtungen könnten auf temporär abhängige Auswirkungen, im Sinne von früh- und spätarteriosklerotischen Zeitpunkten, der Scavengerrezeptoren zurückzuführen sein. (Witztum, 2005) (Ley, et al., 2011)

Durch Sekretion von Wachstumsfaktoren steigt die Proliferationsrate von glatten Muskelzellen an. Eine weitere wichtige Säule in der Pathophysiologie, ist die durch die Veränderungen der Gefäßwand hervorgerufene prokoagulatorische Aktivität. Die durch Makrophagen sezernierten Zytokine, Interleukin-1 (IL1) und TNF α , induzieren in Endothelzellen die Produktion von Platelet-activating-factor (PAF), TF und PAI. Folglich wird die antikoagulatorische Eigenschaft der Endotheloberfläche aufgehoben und es kommt zu einer Thrombozytenaktivierung. Der Aktivierung von Thrombozyten, folgt die Freisetzung zahlreicher Mediatoren durch die Plättchen selbst. Unter anderem PDGF, der das Wachstum glatter Muskelzellen anregt; TGF- β , der die Sekretion von Matrixbestandteilen (Kollagen, Myofibroblasten Differenzierung) und Thrombin fördert sowie Adenosindiphosphat (ADP) und Thromboxan, die weitere Thrombozyten aktivieren. Die Entstehung eines Thrombus macht prinzipiell zwei Szenarien möglich. Entweder kommt es zeitnah zur Lyse des Thrombus, induziert durch eine parallel zur Koagulation ablaufende Fibrinolyse oder es folgt die Organisation des Thrombus, der zum festen Bestandteil des Plaques wird.

Mit der Größenzunahme des Plaques, kommt es zunehmend zu hypoxischen Bereichen im Plaqueeinneren. Daraus resultieren ischämische Nekrosen und die Apoptose von Makrophagen und glatter Muskulatur. Beides, Hypoxie und Zellreste führen zu einer Sekretion von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und proteolytischen Enzymen. VEGF induziert die Angiogenese, sodass es zu einer Neovaskularisierung des

arteriosklerotischen Plaques kommt. Die Gefäßversorgung bedingt zu einem gewissen Teil die Permanenz des Plaques. In diesem Stadium der Erkrankung liegt ein fibroinflammatorischer, lipidreicher Plaque vor, der im Zentrum einen nekrotischen Kern aufweist. Der zentrale Inhalt ist lediglich durch eine fragile fibröse Kappe, von dem ihn umströmenden Blut, getrennt. Es findet eine kontinuierliche Infiltration von Immunzellen und Lipiden statt, die von einer stetigen Matrixreorganisation begleitet wird. Die apoptotischen Zellen präsentieren auf ihrer Oberfläche Human-Leucocyte-Antigen-DR- (HLA-DR-) Rezeptoren und initiieren so eine Kaskade des adaptiven Immunsystems. (Paulson, et al., 2010) Eine besonders wichtige Funktion der Makrophagen ist das Phagozytieren der apoptotischen Zellen und nekrotischen Substanzen innerhalb des Plaques. Zu Beginn führt die Aufnahme der Zellreste zu einer Abnahme des Plaquewachstums. (Tabas, 2005) Eine effektive Efferozytose⁸ induziert die Sekretion von anti-inflammatorischen Substanzen wie IL10⁹ und TGFβ. (Henson, et al., 2001)

Im Folgenden kommt es zu einer Phase der Adaptation. Eine erneut durch Scherkräfte induzierte Produktion von Matrix-Metalloproteasen (MMPs), Kollagenen, basic-Fibroblast Growth Factor (bFGF), TGFβ und inflammatorischen Faktoren führt zu einem kontinuierlichen Remodelling und Aufbau des Plaques. Physiologisches Ziel der Enzymproduktion ist die Aufrechterhaltung des Blutflusses. (Coleman, et al., 2009) Allerdings führt die Exkretion dieser lytischen Enzyme gleichzeitig zu einer Plaqueinstabilität und erhöht damit das Risiko für Plaquerupturen. (Idzkowska, et al., 2015)

Sich wiederholende Hämorrhagien, aus instabilen Neovaskularisationen, können zu einer direkten Ruptur des Plaques führen oder resultieren in einem progredienten Wachstum des Plaquevolumens. Die Kalzifikation des Gewebes wird gesteuert von TGFβ, osteogenetischen Progenitorzellen und Mediatoren des Knochenwachstums wie z.B. Bone Morphogenetic Protein 2a (BMP2a). (Boström, et al., 1993) Folglich kommt es zu Prozessen der Chondro- und Osteogenese innerhalb des arteriosklerotischen Plaques. (Coleman, et al., 2009) Das kontinuierliche Wachstum führt schließlich zu manifesten

⁸ Efferozytose entspricht der phagozytotischen Entsorgung von apoptotischen oder nekrotischen Zellen durch Makrophagen.

⁹ Interleukin 10. Antiinflammatorisches Zytokin. Inhibiert die Reifung und Zytokinproduktion von DC. Verstärkt die Antwort cytox. T-Zellen. (Nizzoli, et al., 2016)

Stenosen und Gefäßverschlüssen. Komplikationen während des gesamten Prozesses können plötzliche Plaquerupturen, die Ausbildung von Aneurysmen, Erosionen oder Ulzerationen sein.

Kommt es zu einem Myokardinfarkt, so führen inflammatorische Signale innerhalb der ersten 24 Stunden nach Ischämie, zu einem Auftreten neutrophiler Granulozyten im geschädigten Myokard. Kurze Zeit darauf folgen Makrophagen beziehungsweise Monozyten in das Ischämiegebiet. Die Leukozyten räumen nekrotische Myozyten, Zelldetritus und Bestandteile der extrazellulären Matrix ab. Während dieser frühen Phase besteht ein hohes Risiko für Herzwand-Rupturen, ausgehend von der geschädigten Wand des Ventrikels. Weitere Komplikationen sind die Ruptur des Septums und Papillarmuskelabrisse.

Nach etwa fünf Tagen erfolgt zunehmend die Koordination von Angiogenese und den wiederaufbauenden Prozessen des Granulationsgewebes. Von Myofibroblasten produziertes Typ I Kollagen stabilisiert den fragilen Bereich. Nach zwei bis drei Wochen ist die Reparaturphase abgeschlossen, das Kollagennetz verlinkt und es hat sich eine stabile Narbe entwickelt. (Nahrendorf, et al., 2007)

Der Heilungsprozess nach einem Infarkt ereignis umfasst folglich ein komplexes Zusammenspiel molekularer und zellulärer Bestandteile. Diese Prozesse beeinflussen direkt die Pathophysiologie und die strukturellen Veränderungen des Herzmuskels. Sodass im Anschluss an ein ischämisches Ereignis, das Gewebe einem kontinuierlichen Remodelling unterliegt. Diese Umbauprozesse dienen der Anpassung an die gegebenen Bedingungen, wie zum Beispiel dem Blutdruck. Das linksventrikuläre Remodelling kann nach einem stattgehabten Myokardinfarkt zu der Entstehung einer Herzinsuffizienz führen, die mit einer hohen Mortalität einhergeht.

Zellen der Gefäßwand	Physiologische Funktion
Endothelzellen	<ul style="list-style-type: none"> - Thrombusresistente Beschichtung auf inneren Oberflächen des Gefäßbaumes - Wirken antikoagulativ, fibrinolytisch, antiinflammatorisch, provasodilatatorisch, Matrix- und Gefäßstabilisierend - Barriere bildend, leukozytenabweisend - Selektive Impermeabilität - Ruhende Zellen; durch Läsionen oder im Rahmen lokaler pathologischer Ereignisse aktiviert <input type="checkbox"/> Proliferation - Transduktion physikalischer Scherkräfte auf die Gefäßwand in biochemische Signale, die die Synthese bioaktiver Moleküle initiieren (unter anderem vasoaktive Stoffe (z.B. NO), Wachstumsfaktoren, pro-koagulatorische und inflammatorische Mediatoren und extrazelluläre Matrix- Proteine)
Glatte Muskelzellen	<ul style="list-style-type: none"> - Vorkommen in der Media und der Matrix der normalen Gefäßwand - Normalerweise ruhend. Aktivierung durch Verletzungen der Gefäßwand: Proliferation, Sekretion und phänotypische Transformation zu Myofibroblasten - Schaumzellbildung durch Lipidingestion - Mediator gestützte Aktivierung von Makrophagen und Endothelzellen. - Regulation des Gefäßremodellings
Leukozyten	<ul style="list-style-type: none"> - In der gesunden Gefäßwand finden sich hauptsächlich Makrophagen und Lymphozyten (Intima) - Endotheliale Dysfunktion führt zur Monozytenaktivierung, konsekutiver Gefäßwandpenetration und Transformation in Makrophagen mit anschließender Schaumzellbildung.
Fibroblasten	<ul style="list-style-type: none"> - Lokalisiert in der Adventitia - Synthetisieren Bindegewebsfasern (z.B. Kollagen, elastische Fasern) - Synthese von IL-6 und -8, MCP-1

Tabelle 1: Übersicht der physiologischen Funktion vaskulärer Zellen mit Relevanz in der arteriosklerotischen Plaquentwicklung (Lüllmann-Rauch, 2015) (Behrends, et al., 2012)

1.2. Das Immunsystem

1.2.1. GRUNDLAGEN

Das Immunsystem ist ein komplexes System von heterogenen Zellpopulationen, humoralen Faktoren, synthetisierten Abwehrprodukten und kommunikationsermöglichenden Zytokinen. Die Funktionsweise reicht von einem breiten Wirkspektrum, bis hin zu hoch spezialisierten und äußerst effektiven Verteidigungsstrategien. Es tritt systemisch auf und kann gleichzeitig einzelnen Organen zugeschrieben werden. Die hämatopoetischen Stammzellen, von denen die meisten Zellen des Immunsystems entstammen, findet man in der fetalen Leber und postpartal im Knochenmark.

Dem Immunsystem werden vier wichtige Aufgaben zugeschrieben. Zunächst ist es die Instanz des Organismus, die fremde oder schädliche Zellen oder Substanzen und Infektionserreger erkennt. Nach dem Erkennen ist es in einem zweiten Schritt seine Aufgabe die Pathogene zu eliminieren. Hier kommen vor allem humorale Faktoren, wie das Komplementsystem und Antikörper zum Einsatz. Um dem Körper selbst nicht zu schaden, ist eine dritte Instanz der Selbstregulation integriert worden. Allergien und Autoimmunerkrankungen sind Ausdruck einer nicht vollständig intakten Immunregulation. Die vierte Funktion wird ausschließlich durch das adaptive Immunsystem umgesetzt – das Immungedächtnis. Unserem Abwehrsystem ist es möglich, einmal erfolgreich bekämpfte Pathogene wieder zu erkennen und ohne Latenzzeit mit der Vollständigkeit des unspezifischen und spezifischen Immunsystems erneut zu eliminieren. (Murphy, et al., 2014)

Die Abwehrmechanismen sind hintereinander geschaltete Barrieren, die das Eindringen, Vermehren und Angreifen von Pathogenen verhindern sollen. In erster Reihe stehen Körperoberflächen, wie unsere Haut und Schleimhäute, die hauptsächlich physikalisch und chemisch funktionieren. Eine zweite Abwehrfront findet sich im Blut und Gewebe. Hier detektieren und eliminieren Leukozyten körperfremde Organismen sowie mutierte oder defekte körpereigene Zellen. Sowohl das unspezifische, als auch das spezifische Immunsystem verfügt über zelluläre und humorale Bestandteile. (Silbernagel, et al., 2014)

1.2.2. DAS ERWORBENE IMMUNSYSTEM

Die erworbene Immunität ist gekennzeichnet durch die zunehmende Integrität im Laufe des Lebens. Ausschließlich Vertebraten verfügen über ein erworbenes Immunsystem. Durch Präsentation von körperfremden Substanzen oder nicht intakten körpereigenen Zellen, erfolgt die Produktion von molekülspezifischen Zellen und Antikörpern. Die Einsatzfähigkeit nach Invasion eines Krankheitserregers dauert mehrere Tage. Die Abwehr erfolgt mittels hoch spezifischer Antigenerkennung. Nach einer erfolgreich abgewehrten Infektion bleiben Antikörper sowie T-Lymphozyten weiter bestehen, sodass eine direkte Reinfektion verhindert wird. Auch nach Jahren können einmal produzierte antigenspezifische Zellen und Faktoren wiederholt abgerufen werden und führen zu einer sofortigen und stärkeren Defensivreaktion. (Murphy, et al., 2014)

Die Hauptzellen des adaptiven Immunsystems sind die Lymphozyten (T- und B-Lymphozyten). Sie erkennen Antigene über spezifische klonale Oberflächenrezeptoren. Lymphozyten sind im Gegensatz zu den Zellen des unspezifischen Immunsystems in bestimmten Organen lokalisiert. Diese sogenannten primären Organe des Immunsystems sind der Thymus und die fetale Leber, beziehungsweise das postpartale Knochenmark. Die T-Zell-Produktion findet im Knochenmark statt. Die unreifen T-Zellen migrieren in den Thymus und differenzieren hier mittels Antigenpräsentation und kontrollierter Selektion aus. Die B-Zell-Synthese findet gleichfalls im Knochenmark statt. Ihre Funktion nehmen die Lymphozyten nach Migration aus den primären Organen des Immunsystems, in die sekundären Organe wahr. Zu den sekundären Organen zählen die Milz, Lymphknoten und das Mukosa-assoziierte lymphatische Gewebe (mucosa-associated-lymphoid-tissue, MALT).

Jede B-Zelle ist, genetisch determiniert und befähigt einen antigenspezifischen Rezeptor zu exprimieren. Die antigenspezifischen Rezeptoren werden Antikörper genannt. Findet die Bindung eines passenden Antigens an den Rezeptor einer B-Zelle statt, beginnt diese sich zu teilen und zu einer Plasma-Zelle zu differenzieren. Plasma-Zellen produzieren große Mengen von monoklonalen Antikörpern. Die Moleküle können nach der Synthese als membranständige Rezeptoren auf der B-Zelle oder als soluble Antikörper wirken, wobei der sezernierte Antikörper dem membranständigen Protein (B-Zell-Rezeptor) der produzierenden Plasmazelle entspricht.

Antikörper werden auch als Immunglobuline (Ig) bezeichnet. Der Aufgabenbereich liegt in der Opsonierung von spezifischen Antigenen. Dieser Mechanismus kann zum einen, zu einer direkten Inaktivierung (Neutralisierung) des Pathogens führen und dient zum anderen als ‚Erkennungshilfe‘ gegenüber weiterer Immunzellen, deren Mobilisation initiiert wird. Diese beiden Funktionen sind innerhalb des Moleküls strukturell voneinander getrennt. Die antigenspezifische Region ist immer individuell und spezifisch auf das Antigen angepasst. Es handelt sich um die V-Region (variable Region). Die großen Varianzmöglichkeiten der Bindungsregion sind auf eine hohe Rekombinationsrate während der Reifung zurückzuführen. Die Effektorfunktion wird über eine konstante Region (C-Region) vermittelt. Ein Immunglobulin ist aus gepaarten schweren und leichten Ketten aufgebaut. Man unterscheidet fünf verschiedene Immunglobulin-Gruppen: IgA, IgD, IgE, IgG und IgM, die sich in ihrem molekularen Aufbau und Wirkort unterscheiden können. (Murphy, et al., 2014)

Bei den, während der FACS Analyse verwendeten Biomarkern, handelte es sich um eine Kombination aus Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt an einen monoklonalen Antikörper, sodass die Markierung spezifischer Oberflächenmoleküle möglich ist.

Die T-Lymphozyten werden nach ihren Oberflächenmolekülen und ihrer Funktion in drei Subtypen eingeteilt. Die T-Helfer-Zellen Typ I (TH1) interagieren mit mononukleären Phagozyten und unterstützen die Elimination intrazellulärer Pathogene. Bei den T-Helfer-Zellen des Typs II (TH2) handelt es sich um Zellen, die die Differenzierung, Proliferation und Antikörperproduktion von B-Zellen fördern. Die Zellen der dritten Gruppe richten sich gegen virusinfizierte körpereigene Zellen oder andere intrazelluläre Pathogene. Sie werden entsprechend als zytotoxische T-Zellen (CTL, zytotoxische T-Lymphozyten) bezeichnet. Die Gesamtheit der T-Zellen verfügt zur Antigenerkennung über T-Zell-Antigen-Rezeptoren (TCR). Ihre Wirkung entfalten die Lymphozyten durch Sekretion löslicher Zytokine oder durch direkten Zell-Zell-Kontakt.

Die Zellkommunikation untereinander wird über Oberflächenrezeptoren möglich. Man unterscheidet verschiedene Klassen dieser membranständigen Proteine. Des Weiteren kann man diese Proteine als Zellerkennungsmerkmale nutzen und im Rahmen wissenschaftlicher Fragestellungen eine Differenzierung einzelner Zellen durch die Verwendung bekannter Antikörper vornehmen.

Bei Major Histokompatibilitäts Komplexen (MHC) handelt es sich um Proteine, die auf der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen, Peptide oder ganze Zellfragmente darstellen. Man unterscheidet Typ I von Typ II MHC Molekülen. MHC I Proteine präsentieren kurze Peptidfragmente intrinsischer Proteine. Wohingegen Bestandteile internalisierter extrinsischer Antigene von MHC Klasse II Rezeptoren dargestellt werden. Die MHC Proteine dienen als Ligand für T-Zell-Rezeptoren und sind damit ein bedeutender Faktor in der Interaktion zwischen unspezifischem und spezifischem Immunsystem. MHC Komplexe werden in allen Wirbeltieren exprimiert, jedoch mit einer gewissen interspezifischen Varianz. Eine präzisere Bezeichnung für die menschlichen Major Histokompatibilitäts Komplexe ist ‚Humanes Leukozyten Antigen‘ (HLA). (Male, et al., 2006) MHC Moleküle lassen sich weiter in verschiedene Untergruppen einteilen.

Ein weiteres Oberflächenmolekül, das auf einer Vielzahl variabler Zellen exprimiert wird, ist das Cluster of Differentiation Molekül (CD). Deren Funktionen sind vielseitig. Sie können als Oberflächenrezeptoren oder Ligand dienen. Ferner kennzeichnen sie Zellen mit ihrer Eigenschaft als Antigen. Die Kombination von unterschiedlichen CD Molekülen charakterisiert eine bestimmte Zellpopulation.

Die Kenntnis der unterschiedlichen Oberflächenmoleküle und insbesondere deren zellspezifische Kombination, machen die durchflusszytometrische Analyse von Leukozytenproben hinsichtlich der Fragestellung nach bestimmten Zellpopulationen möglich. Durch Detektion sowie positiver und negativer Selektion von Immunzellen aus einer Leukozytenprobe können die Monozytensubpopulationen quantitativ erfasst werden.

1.2.3. DAS ANGEBORENE IMMUNSYSTEM

Das angeborene unspezifische Immunsystem dient vor allem der Abwehr eines breiten Spektrums an Bakterien, Pilzen und körperfremden Stoffen. Die Elimination erfolgt unverzüglich nach der Invasion in den Organismus, meist durch Inkorporation und anschließende Destruktion. Zu den Zellen des angeborenen Immunsystems zählen die mononukleären Phagozyten, die polymorphkernigen Phagozyten, natürliche Killerzellen (NK), Mastzellen und Thrombozyten. Die Erkennung der pathogenen Mikroben erfolgt

mit Hilfe der Pathogen-associated- molecular-patterns (PAMP) und Pattern Recognition Receptors (PRR).

Bei den natürlichen Killerzellen handelt es sich um große granulare Lymphozyten. Ihre Hauptaufgabe ist die Identifikation von virusinfizierten oder mutierten Zellen und deren Beseitigung.

Bei Mastzellen und basophilen Granulozyten handelt es sich um Leukozyten, die sich durch einen sehr hohen Gehalt an Granulavesikel charakterisieren lassen. Sie verfügen über eine Reihe proinflammatorischer Zytokine und gewebe wirksamer Mediatoren, die nach Aktivierung exozytotisch freigesetzt werden. Mastzellen sind meist perivascular lokalisiert, wohingegen basophile Granulozyten mobil sind.

In einem intakten Organismus befindet sich der Großteil an Leukozyten in der Blutbahn und muss durch Extravasation an den Ort der Gewebeschädigung migrieren. Zu Beginn der Extravasation erfolgt, durch die gewebebeständigen Makrophagen, die Freisetzung von Chemokinen wie IL1 und TNF α . IL1 und TNF α aktivieren Endothelzellen, welche ihrerseits vermehrt Adhäsionsmoleküle und proinflammatorische Mediatoren exprimieren. Unter diesem Axiom kann eine zielgerichtete Leukozyten-Endothel-Interaktion stattfinden. Durch membranständige Selektine (endotheliale Adhäsionsmoleküle) wird das Rolling vermittelt. Das Leukozytenrollen ermöglicht die mediatorvermittelte Aktivierung der Immunzellen. Hierzu produziert das Endothel Entzündungsmediatoren wie den PAF. Über weitere Adhäsionsmoleküle, den Integrinen, findet die fixe Bindung der Leukozyten an die Endothelzellen statt. Die stabile Zell-Zell-Adhäsion ermöglicht die transendotheliale Diapedese. Physiologischerweise folgt dieser Vorgang einer chemotaktischen Steuerung. (Silbernagel, et al., 2014)

Der unspezifisch zelluläre Anteil umfasst hauptsächlich die neutrophilen Granulozyten und Monozyten. Beide Zellpopulationen tragen besonders durch Phagozytose ihren Anteil an der Immunabwehr bei. Die humorale Komponente umfasst im Besonderen das Komplementsystem, Lysozyme und Interferone in der Funktion von Mediatoren. Namensgebend für das angeborene Immunsystem ist das Vorhandensein der Abwehrmechanismen ab dem Zeitpunkt der Geburt und somit die sofortige Einsetzbarkeit und die pathogenunspezifische Vorgehensweise. (Silbernagel, et al., 2014)

1.2.4. MONOZYTEN

Monozyten sind mononukleäre Phagozyten, die einen zellulären Bestandteil des angeborenen Immunsystems ausmachen. Ferner beinhaltet die Gruppe der phagozytierenden Zellen Granulozyten und dendritische Zellen.

Sie gehören zu den langlebigen Phagozyten. Im Gegensatz dazu stehen die polymorphkernigen Phagozyten, die auch als neutrophile Granulozyten bekannt sind, welche nur eine kurze Lebensdauer aufweisen. Der Normbereich für Leukozyten liegt in einem gesunden menschlichen Körper bei 1,6 bis 7,2 Gpt/l (Giga ($\times 10^9$) Partikel/Liter = Absolutkonzentration). Dabei liegt die Monozytenanzahl zwischen 0,08 und 1 Gpt/l, entsprechend 2 bis 10 % (% von 100 gezählten Leukozyten) innerhalb der Norm. Die Bestimmung der Monozytenanzahl wird im klinischen Alltag regelmäßig in Zusammenhang mit einem Differenzialblutbild durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine durchflusszytometrische Analyse mit exakter Zellzählung der Leukozytengesamtzahl, der unterschiedlichen Granulozyten Populationen, Monozyten, Lymphozyten, Blasten und Erythrozyten. Abweichungen von der Norm finden sich bei unterschiedlichen Pathologien und treten in der Regel mit umfassenden Veränderungen, der im Differenzialblutbild gemessenen Zellen auf.

Monozytosen können Hinweise auf chronisch entzündliche Reaktionen, wie beispielsweise bei Autoimmunerkrankungen oder Tuberkulose, oder auf das Vorliegen einer malignen Erkrankung, sowohl solider Tumoren als auch myeloproliferativer Syndrome, geben. Ferner kann es sich um das Vorliegen der Heilungsphase einer akuten Infektionskrankheit handeln. Im Gegensatz dazu treten Monozytopenien entweder im Rahmen hämatopoetischer Erkrankungen (z.B. aplastische Anämie, Haarzelleukämie) oder iatrogen verursacht, durch Medikamentengabe oder Radiatio, auf. (Guder, et al., 2009)

Bei Monozyten handelt sich um nicht vollständig ausdifferenzierte Phagozyten, die im Blut zirkulieren.

Monozyten weisen einen Durchmesser von 10 bis 15 μm auf und tragen einen bohnenförmigen Zellkern. Das Zytoplasma ist feingranulär und beinhaltet Lysosome, phagozytische Vakuolen und Filamente des Zytoskeletts. Es handelt sich um eine heterogene Zellgruppe, mit zurzeit drei bekannten Subpopulationen. Die Einteilung

erfolgt anhand unterschiedlicher Oberflächenmoleküle und Migrationsverhalten in Gewebe. (Abbas, et al., 2012)

Der physiologische Ablauf einer Extravasationskaskade umfasst das Andocken der zirkulierenden Monozyten an geschädigtes Endothel, selektinabhängiges Rolling, eine Aktivierung der Leukozyten durch endotheliale oberflächengebundene Chemokine mit nachfolgender integringeförderter Adhäsion und einer transendotheliale Migration. Die Induktion zur Synthese von Adhäsionsmolekülen, erfolgt durch modifizierte Lipoproteine und zytokinetische Signale. Auch IL1 und TNF α triggern die Expression der Oberflächenmoleküle. In arteriosklerotischen Mäuserarterien zeigte sich, dass vor allem das P-Selektin verantwortlich für das monozytäre Rolling ist. (Ramos, et al., 1999) Die im nächsten Schritt stattfindende Adhäsion ist besonders abhängig von $\alpha_4\beta_1$ -Integrin (VLA4). Dieses Integrin bindet vor allem Fibronektin und VCAM1 (Huo, et al., 2000), ein Adhäsionsmolekül, das besonders auf Endothelzellen in der Nähe von aktiviertem Endothel, somit auch arteriosklerotischen Läsionen lokalisiert ist. (Richardson, et al., 1994)

Nach Extravasation differenzieren die Monozyten vollständig aus und werden zu Makrophagen. Makrophagen gehören zu den ältesten bekannten Immunzellen und stammen wahrscheinlich direkt von phagozytischen Zellen, die aus einfachsten Tieren bekannt sind, ab. (Murphy, et al., 2014) Gemeinsam mit Granulozyten, dendritischen Zellen, Mastzellen, Megakaryozyten und Erythrozyten stammen die Makrophagen von myeloiden Progenitorzellen ab.

Die physiologischen Funktionen der Monozyten erstrecken sich über die gesamte Spanne des angeborenen Immunsystems und darüber hinaus in Bereiche der adaptiven Immunabwehr. Als Phagozyten ist eine ihrer Hauptaufgaben, das Erkennen von Infektionserregern und deren sofortige Inkorporation. Überwindet ein pathogener Erreger die Schutzbarrieren unseres Körpers, trifft er initial auf den gewebeständigen mononukleären Phagozyten. Nach endozytotischer Aufnahme, tötet der Makrophage die Erreger mit Hilfe von enzymatisch erzeugten hoch reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies. Die anschließende Verdauung erfolgt proteolytisch. Durch Sekretion wichtiger Zytokine, sind sie in der Lage weitere Instanzen des Immunsystems zu mobilisieren und damit eine Kaskade an Abwehrreaktionen zu initiieren. Sie bilden durch die Fähigkeit zur Antigenpräsentation ein zusätzliches Bindeglied zwischen angeborener

und erworbener Immunantwort. Einzelne Bestandteile der phagozytierten Pathogene werden mittels MHC-Moleküle auf der Zelloberfläche präsentiert und können im Folgenden vereinfacht durch Lymphozyten erkannt werden. Neben der Abwehr von pathogenen Keimen, gehört es zu den Aufgaben von Makrophagen, Zelltrümmer und apoptotische Zellüberreste zu beseitigen. Man bezeichnet sie daher auch als Fresszellen (scavenger cells). Neben den Aufgaben in der Immunabwehr und dem Beseitigen von defekten oder toten Zellen, sind sie an reparativen Prozessen in geschädigten Geweben beteiligt. Durch die Sekretion von Zytokinen stimulieren sie angiogenetische Prozesse und die Synthese von kollagenreicher extrazellulärer Matrix. (Abbas, et al., 2012)

Nach chemotaktisch gesteuerter Extravasation können sich Monozyten abhängig von den Signalen entweder zu Makrophagen oder dendritischen Zellen ausdifferenzieren. Durch Stimulation mittels Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) und IL4 kommt es zur Ausreifung dendritischer Zellen. Die Differenzierung zum Makrophagen, wird durch den Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (M-CSF) ausgelöst. (Murphy, et al., 2014) Abhängig von dem Gewebe, in dem sich die Makrophagen befinden, erhalten sie einen Eigennamen. Zum Beispiel werden Makrophagen im zentralen Nervensystem als Mikrogliazellen bezeichnet und in der Leber handelt es sich um Kupferzellen. (Abbas, et al., 2012)

Aktiviert Makrophagen synthetisieren unter anderem Defensine und steigern die Produktivität der NO-Synthase, die aus der Aminosäure L-Arginin NO abspaltet. (Silbernagel, et al., 2014)

Bis in die späten 1980er Jahre hielt man die Monozyten für eine homogene Population von phagozytierenden Immunzellen. Bis Passlick et al. zum ersten Mal eine Publikation veröffentlichte, über die Existenz zweier verschiedener Monozytensubpopulationen. (Idzkowska, et al., 2015) Die Differenzierung erfolgt anhand des Lipopolisaccharid (LPS)-bindenden Oberflächenmoleküls CD14 und CD16 (Rezeptor für Fc γ Typ III). Man unterschied phänotypisch die quantitativ häufiger auftretenden CD14⁺⁺, von einer Population mit geringerer CD14 Expression bei gleichzeitig hoher CD16 Expression (CD16⁺) Nachweis. (Passlick, et al., 1989) Bei den CD16⁺ Zellen konnte eine hohe phagozytotische Effizienz und Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies nachgewiesen werden, während die Zytokin-Synthese deutlich reduziert war. Kurz nach ihrer

Entdeckung, stellte man fest, dass CD14⁺CD16⁺ Monozyten besonders an systemischen inflammatorischen Prozessen beteiligt sind, so machten sie zum Beispiel bei einer Sepsis bis zu 50 % der Blutmonozyten aus. (Fingerle, et al., 1993) Im Laufe der Zeit ergaben sich innerhalb der CD16⁺-Population weitere erkennbare Unterschiede in der Expression der Adhäsionsmoleküle und Chemokinrezeptoren, sodass das Vorliegen zweier funktional unterschiedlicher Subpopulationen wahrscheinlich schien. (Ancuta, et al., 2003)

Im Jahre 2010 fand schließlich eine einheitliche Nomenklatur der Monozytensubpopulationen statt, die durch das *Nomenclature Committee of the International Union of Immunological Societies* genehmigt wurde. Zurückzuführend auf diese Nomenklatur ist die aktuelle Klassifikation der Monozyten, in die drei Populationen: klassische Monozyten (CD14^{hi}CD16^{lo}), intermediäre Monozyten (CD14^{hi}CD16^{hi}) und nicht-klassische Monozyten (CD14^{lo}CD16^{hi}). (Heitbrock, et al., 2010)

Die drei Subpopulationen unterscheiden sich in ihrer immunologischen Funktion, dem Zytokinexpressionsmuster, der Effektivität von Phagozytose und ihres reparativen Potenzials. (Idzkowska, et al., 2015) Wie schon erwähnt, stammen alle Monozytensubpopulationen von einer Stammzelle ab. Sie unterscheiden sich im Verlauf durch das Erreichen unterschiedlicher Entwicklungsstufen. Etwa 90 % der peripheren Monozyten entsprechen klassischen CD14^{hi}CD16^{lo} Monozyten, die Zellen mit dem geringsten Reifegrad. Die in ihrer Entwicklung am weitesten fortgeschrittene Population ist die der nicht-klassischen CD14^{lo}CD16^{hi} Monozyten. Der vollständige Entwicklungsverlauf der monozytären Leukozyten konnte noch nicht vollständig geklärt werden. (Rogacev, et al., 2015)

Klassische Monozyten exprimieren eine hohe Dichte an CC Chemokin-Rezeptoren Typ 2 (CCR2; MCP1-Rezeptor), Chemokin CXCR1,-2,-4- Rezeptoren und CD62L (L-Selektin, Zelladhäsionsmolekül). Vergleichsweise zeigen sie geringe Expressionsraten der folgenden Rezeptoren: CX3CR1 und CCR5 (Liganden: CCL3, CCL4, CCL8). Auf den starken Stimulationsfaktor LPS hin, produzieren sie eine Reihe an Zytokinen. Vor allem Interleukine (-6, -8, -10, -1β), TNFα und das Chemokin CCL2. Weiter konnte man eine hohe phagozytotische Aktivität und eine ausgeprägte Syntheserate an Myeloperoxidase nachweisen. CD14^{hi}CD16^{lo} Monozyten verfügen über genetische

Informationen, die Proteine der antimikrobiellen Abwehr, Wundheilung, Angiogenese und Koagulation kodieren. (Idzkowska, et al., 2015)

Nicht-klassische Monozyten hingegen exprimieren kein CCR2 oder CD62L. Auf ihrer Oberfläche war vor allem der Chemokin Rezeptor CX3CR1 nachweisbar. Eine ihrer Hauptaufgaben liegt in der Kontrolle körpereigener Zellen, hinsichtlich eines Virusbefalles oder sonstiger Schäden. Sie verfügen über die Fähigkeit auf dem Gefäßendothel zu patrouillieren und dessen Integrität zu schützen. Auch das Sekretionsmuster an Zytokinen und Chemokinen unterscheidet sich deutlich von dem der klassischen Monozyten. So handelt es sich bei dem stärksten Produktionsinduktor um viral befallene Zellen und Nukleidsäurebestandteile, woraufhin IL-1 und TNF α exprimiert werden. Auch in ihrem Mobilitätsverhalten distinguieren die genannten Monozytensubpopulationen. Im Gegensatz zu dem eher gewebeständigen Verhalten der klassischen Monozyten, konnte man eine ausgeprägte Mobilität für CD14^{lo}CD16^{hi} Monozyten in ‚in vivo‘-Experimenten nachweisen. (Idzkowska, et al., 2015)

Die Einordnung der intermediären Monozytensubpopulation zwischen dem klassischen und dem nicht-klassischen Typ, kann durch unterschiedliche Kriterien belegt werden. Der intermediäre Typ trägt phänotypische Merkmale beider Populationen. Die Gesamtheit, der exprimierten Oberflächenmoleküle stellt eine Kombination, der jeweils Typcharakterisierenden Chemokine dar. Intermediäre Monozyten weisen CCR1, CCR2 und CXCR2 Rezeptoren auf, ebenso wie den CX3CR1 Rezeptor, der dem nicht-klassischen Zelltyp zugeordnet werden kann. Eine weitere, in ihrer Aussage hinsichtlich der Funktion bedeutende Identifikationsmöglichkeit, ist der CCR5 Rezeptor. Als Rezeptor für MCP1 und RANTES wird er mit der Progression des arteriosklerotischen Plaques assoziiert. (Idzkowska, et al., 2015) Das synthetisierte Zytokinmuster der CD14^{hi}CD16^{hi} Monozyten weist ihnen ein hohes proinflammatorisches Potenzial zu. In Gegenwart des bakteriellen LPS sezernieren sie TNF α und IL1 β . Außerdem sind sie der Hauptproduzent reaktiver Sauerstoffspezies unter den Monozyten. (Cros, et al., 2010) Zusätzlich sezernieren sie große Mengen an IL10. Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal, ist die hohe Expressionsrate an HLA-DR Molekülen, die besonders CD4⁺-Lymphozyten stimulieren. (Zawada, et al., 2011) Auch die Fähigkeit große Mengen des Angiotensin converting Enzyms (ACE) zu produzieren, grenzt diese Subpopulation von den klassischen und nicht-klassischen Monozyten ab. (Ulrich, et al., 2006)

Monozyten nehmen in diversen inflammatorischen Erkrankungen eine bedeutende Rolle ein. So beispielsweise in chronisch obstruktiven pulmonalen Erkrankungen (COPD) (Costa, et al., 2016) oder in der rheumatoiden Arthritis. (Rossol, et al., 2012)

1.3. Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Studie ist es, einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten differenzieller Monozytensubpopulationen und dem Verlauf der verschiedenen Stadien der koronaren Herzerkrankung sowie gesunder Kontrollprobanden herzustellen. Dies geschah vor dem Hintergrund, dass die koronare Herzerkrankung zu den häufigsten Todesursachen weltweit zählt. Des Weiteren aufgrund der hohen Inzidenz, die einen großen volkswirtschaftlichen Kostenfaktor darstellt und nicht zuletzt die Lebensqualität jedes einzelnen Patienten mindert.

Die zentrale Rolle der Inflammation bei der Entstehung und Progression der koronaren Herzkrankheit, ist seit Jahren bekannt und Inhalt zahlreicher Forschungsarbeiten. Bislang lagen die Schwerpunkte auf der Charakterisierung der Monozytensubpopulationen und den damit einhergehenden Funktionen der mononukleären Phagozyten in der arteriosklerotischen Pathogenese.

Langfristig soll diese Studie einen Beitrag zu einem besseren Verständnis der Entstehung der koronaren Herzerkrankung und der Entwicklung präventiv einsetzbarer Biomarker leisten. Zusätzlich könnten auf Grundlage des Wissens, um mögliche Abhängigkeiten im Auftreten der Monozytensubpopulationen mit der Krankheitsaktivität, neue medikamentöse Therapieansätze entstehen.

Zur Erreichung dieses Ziels wurde eine Kohortenstudie mit drei Patientenkohorten und einer Kontrollkohorte durchgeführt. Es erfolgte die Analyse von Leukozytenproben mit dem Ziel der quantitativen Bestimmung der Monozyten an der Leukozytengesamtheit, sowie die differenzielle Messung der einzelnen Monozytensubpopulationen. Die Ergebnisse wurden vor dem Hintergrund der zuvor erhobenen Krankheitsaktivität der Patienten interpretiert.

Die Arbeitshypothese steht für einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Auftreten der unterschiedlichen Monozytensubpopulationen und den verschiedenen Erkrankungsstadien. Dementsprechend steht die Null-Hypothese, für die Wahrscheinlichkeit eines unabhängigen parallelen Vorkommens von den Monozytensubpopulationen und den Stadien der koronaren Herzerkrankung.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Verwendete Geräte und Materialien

Gerät und Material	Firma
APC Mouse Anti-Human CD14	BD Bioscience
Cellstar Tubes 10 ml	Greiner Bio-One International GmbH
Cellstar Tubes 50 ml	Greiner Bio-One International GmbH
Clean Bench LaminAir HB 2448	Heraeus Instruments GmbH
Cryo.S™ Tubes 2 ml	Greiner Bio-One International GmbH
DAPI	Sigma-Aldrich
Fetal Bovine Serum	Sigma-Aldrich
FITC Mouse Anti-Human HLA-DR	BD Bioscience
FLOWJO Data Analysis Software	FlowJo, LLC
Gefrierschrank Premium NoFrost	Liebherr International-Deutschland GmbH
Handschuhe Vasco® Nitril	B. Braun Vet Care GmbH
Kryoboxen	Thermo Fisher Scientific Inc.
BD™ LSR II	BD Biosciences
BD FACSDiva™ Software	
Magnetrührer	IKA
Mikro Tube 1,5ml	Sarstedt AG&Co
PE Mouse Anti-Human CD335	BD Bioscience
PE Mouse Anti-Human CD2	BD Bioscience
PE Mouse Anti-Human CD19	BD Bioscience
PE Mouse Anti-Human CD56	BD Bioscience
PE Mouse Anti-Human CD15	BD Bioscience
PE-Cy7 Mouse Anti-Human CD16	BD Bioscience
Becher PMP 500 ml	Brand GmbH+CoKG
Phosphate Buffered Saline Tablets	Gibco-Thermo Fisher Scientific Inc.
Pipetten Research 10	Eppendorf AG
Pipetten Research 100	Eppendorf AG
Pipette Research plus 1000	Eppendorf AG
Pipettenspitzen	Eppendorf AG
Pipetboy	Integra, Biosciences AG
Reagenzglasschüttler REAx	Heidolph Instruments+CoKG
Serologische Pipette 5 ml	Sarstedt AG&Co
Serologische Pipette 10 ml	Sarstedt AG&Co
Serologische Pipette 25 ml	Sarstedt AG&Co
Tubes 5 ml	Sarstedt AG&Co
Vakuumregler CVC 2000	Vacuubrand GmbH+CoKG
Wasserbad Haake C1	Kobe
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf AG

Tabelle 2: Verwendetes Material

2.2. Das Studiendesign

Das Erfassen der Daten erfolgte innerhalb einer Substudie im Rahmen des Großprojektes BIO-NRW (‘Arteriosklerose und ihre Folgeerkrankungen: Von der Genomik über eine verbesserter Risikoprädiktion zur individualisierten Prävention und Therapie‘. Bei dem Studiendesign handelt es sich um eine Querschnittsstudie. Die eingeschlossenen Patienten wurden drei unterschiedlichen Kohorten zugeordnet. Zum Vergleich der Patientenmessungen wurden kardial nicht vorerkrankte Personen in eine Kontrollkohorte aufgenommen. Die Blutentnahme für die Gewinnung des Probenmaterials erfolgte einmalig nach definierter Zuordnung zu einer der vier Kohorten.

2.3. Charakterisierung des Patientenkollektivs

Die Ein- und Ausschlusskriterien orientierten sich an den Voraussetzungen zur Teilnahme an der BIO-NRW-Studie.

Der Einschluss erfolgte in vier voneinander zu unterscheidenden Gruppen:

1. Patienten mit akutem Myokardinfarkt.
2. Patienten mit stabiler chronischer koronarer Herzerkrankung, ohne akutes Ereignis innerhalb der letzten sechs Monate.
3. Patienten mit chronischer koronarer Herzerkrankung, mit akutem Ereignis innerhalb der letzten sechs Monate.
4. Kardial nicht vorerkrankte Kontrollen.

Erkrankte Personen kennzeichneten sich durch eine relevante Koronarstenose (>50 % mindestens einer Koronararterie). Die Stenosen sind mittels Koronarangiographie nachgewiesen worden. Die Altersverteilung des Probenkollektivs umfasst eine Spanne zwischen 31,2 Jahren bis 73,0 Jahren.

Die kardial nicht vorerkrankten Kontrollen wurden der Patientenkohorte altersentsprechend in die Studie aufgenommen. Als gesund galten Personen, die anamnestisch keine kardiovaskulären Vorerkrankungen aufwiesen und bis zum Einschlusszeitpunkt keiner Koronarangiographie unterzogen worden sind.

Ausschlusskriterien für alle Patientengruppen waren eine mangelnde Kooperationsbereitschaft und psychische, mentale oder sprachliche Probleme, die eine

Aufklärung und das Verständnis der Fragebögen sowie die Einwilligungsfähigkeit negativ beeinflusst hätten. Außerdem die Teilnahme an einer weiteren Studie, die einen Einschluss an der vorliegenden Verlaufsbeobachtung verbietet.

An klinischen Parametern wurden das Geschlecht, das Alter, der Body Mass Index, der Nikotinabusus-Status sowie der systolische und diastolische Blutdruck erhoben.

Tabelle 3 zeigt die absoluten Daten der Patientencharakterisierung.

Charakteristiku	Gruppe			
	Kontrollen	Akuter MI	CAD	CAD-MI
m				
n	41	92	61	36
Männlich/ weiblich	20/21 – (49/51)	80/12 (87/13)	54/7 (89/11)	29/7 (81/19)
No.(%)				
Alter	49,0 (31,2-59,8)	57,0 (49,0-66,0)	65,0 (51,2-71,8)	63,5 (51,7-73,0)
Body-Mass- Index	27,5 (22,2-35,2)	28,1 (23,7-35,3)	29,1 (23,8-38,0)	28,4 (23,7-39,7)
Nikotinabusus				
Aktuell – No. (%)	7 (17)	49 (53)	10 (16)	9 (25)
Sistiert – No. (%)	24 (59)	22 (24)	39 (64)	22 (61)
Noch nie – No. (%)	10 (24)	21 (23)	12 (20)	5 (14)
Blutdruck				
Systolisch (mmHg)	130,0 (110,0-152,8)	126,5 (110,0-157,9)	130,0 (110,0-163,6)	140,0 (113,5-162,4)
Diastolisch (mmHg)	87,0 (66,0-94,8)	80,0 (61,0-87,0)	80,0 (60,0-90,0)	80,0 (70,0-90,0)

Tabelle 3: Patientencharakteristika

Zur Teilnahmebestätigung durch den Patienten wurde eine schriftliche Einverständniserklärung eingeholt.

2.4. Ablauf der Rekrutierung und Patientenerfassung

Das Erheben der Ein- und Ausschlusskriterien erfolgte durch Sichtung der studienrelevanten Patientendaten im Orbis, dem klinikinternen Programm zur Datenerfassung. Des Weiteren durch die bei Erstkontakt mit dem Patienten durchgeführte Anamnese. Die Patientenaufklärung erfolgte schriftlich und mündlich.

Die Rekrutierung fand auf der Chest-Pain-Unit, der IMC 2, der kardiologischen Ambulanz und der kardiologischen Station 131 des Universitätsklinikums Marburg statt.

2.5. Erklärung zur Ethikkommission

Die Genehmigung des Ethikantrages für die Studie: ‚Arteriosklerose und Ihre Folgeerkrankungen: Von der Genomik über eine verbesserte Risikoprädiktion zur individualisierten Prävention und Therapie.‘ Erfolgte am 07.05.2013 durch den Vorsitzenden der Ethikkommission der Universität Marburg Fachbereich Medizin.

2.6. Aufbereitung der Proben

Die Blutentnahme wurde mit Hilfe einer 24G-Nadel und unter Verwendung von EDTA-Monovetten zu viermal 10 ml (40 ml) durchgeführt. Die Vollblutproben wurden von dem kardiologischen Labor des Universitätsklinikums Marburg aufbereitet. Hierbei wurden die Leukozyten isoliert und bei -80°C zwischengelagert beziehungsweise bei -196 °C dauerhaft in Stickstoff aufbewahrt.

Die Leukozytenpräparation wurde mittels Ficoll-Seperation aus den Vollblutproben durchgeführt. Dieses Verfahren entspricht einer Dichtenzentrifugation, bei der ein Stufengradient mit Hilfe des Polymers Ficoll¹⁰ gebildet wird. Nach mehreren Waschschrinen, mit Hank`s Balanced Salt Solution (GIBCO® HBSS) erfolgte die Aliquotierung zu $6-7 \times 10^6$ Zellen pro Einfrierröhrchen in einem Dimethylsulfoxid (DSMO) Medium¹¹.

2.7. Durchflusszytometrie

Das Ziel der fluoreszenzaktivierten Zellanalyse (Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS) ist die Separierung und die quantitative Erfassung der in den Blutproben vorhandenen Monozytensubpopulationen.

¹⁰ Pancoll human von PAN™ BioTech. Dichte 1.077g/ml

¹¹ Cryo-SFM der Firma PromoCell GmbH

2.7.1. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

Die Durchflusszytometrie ist ein optisches Analyseverfahren zur gezielten Untersuchung größerer Mengen von Partikeln, beziehungsweise Zellen in Suspension.

Die Durchflusszytometrie ist ein Prozess, der sich physikalische und chemische Eigenschaften von Zellen zur Detektion zu Nutze macht. Zu den physikalischen Eigenschaften zählen die Lichtstreuung oder Fluoreszenz sowie physikalische Eigenschaften von mit der Zelle reagierenden Reagenzien. Weitere mögliche Parameter können als strukturell oder funktionell definiert werden. (Shapiro, et al., 2003) Die Erhebung der Parameter erfolgt während die zu untersuchenden Zellen in einem Flüssigkeitsstrom durch die Apparatur fließen.

Das Durchflusszytometer vereint moderne Technik: Es benutzt Lösungen, Laser, optische Systeme, analoge und digitale Elektronik und arbeitet mit Computern und diversen Softwares. Verschiedene Parameter jeder einzelnen Zelle, welche die Messkammer passiert, werden erhoben, darunter die Zellgröße, die Zellstruktur und der Inhalt der zellulären Bestandteile. (Melamed, et al., 1991)

Es ist möglich eine Großzahl an Zellen innerhalb kurzer Zeit zu untersuchen. Grundsätzlich besteht ein Zytometer aus einer Flusskammer, durch die die Zellsuspension gemeinsam mit einer Pufferlösung an ein oder mehreren Lichtquellen vorbei geleitet wird. Als Lichtquellen dienen Laser unterschiedlicher Wellenlängen, um in einem Untersuchungsdurchgang mehrere Fluoreszenzfarbstoffe parallel nutzen zu können. Die emittierte Energie wird in Form von Streustrahlung und Fluoreszenz durch Detektoren und Photomultiplier erfasst und in elektronische Spannung übersetzt. Die Informationen werden in Folge an einen Computer weitergeleitet. Die Anordnung des optischen Systems erfolgt in einer orthogonalen Konfiguration der drei Hauptachsen des Instruments: dem Probeneinlauf, dem Laserstrahl und der optischen Achse der Fluoreszenzdetektion. Der Laser ist dabei mittels einer oder zweier Linsen auf den Zellstrom gerichtet. (Melamed, et al., 1991)

Optische Systeme basieren auf dem Prinzip der elektromagnetischen Strahlung. Relevante Konzepte sind vor allem die Reflexion und Refraktion von Licht. Unterhalb einer bestimmten Größe der zu untersuchenden Partikel sind diese Konzepte jedoch

unbrauchbar. Hier wird auf die Phänomene der Streuung und Fluoreszenz zurückgegriffen. (Shapiro, et al., 2003)

Bei der Streustrahlung handelt es sich um emittiertes Licht mit nahezu der identischen Wellenlänge wie die des absorbierten Lichtes. Die Emission erfolgt konstant in einem Winkel zu dem einfallenden Lichtstrahl des Lasers. Daraus ergeben sich folgende zwei Parameter: die Vorwärtsstreuung (FSC, forward scatter) und die Seitwärtsstreuung (SSC, side scatter).

Ein Großteil der abgegebenen Strahlung erscheint in einem kleinen Winkel ($0,5^\circ$ bis 5°) zu der einfallenden Lichtquelle. Die Intensität der Vorwärtsstrahlung, oder auch ‚small angle‘ genannt, ist abhängig von der Partikelgröße und dem Brechungsindex zwischen Partikel und dem umgebenden Medium. Der Parameter ‚Vorwärtsstrahlung‘ ist kein exakter Messwert zur Größenbestimmung eines Partikels. Mit Hilfe des FSC kann lediglich eine ungefähre Einordnung der Objektgröße erfolgen, denn die Beziehung der Partikelgröße zu FCS ist nicht linear. So können beispielsweise die Signalstärken unterschiedlich großer Partikel von gleicher Intensität sein.

SSC ist definiert für einen Winkelbereich von 15° bis 150° zwischen einfallendem und ausfallendem Licht. Die gemessene Amplitude der Signale ist für granuläre Zellen höher als für solche ohne intrazelluläre Granulavesikel. Anteilsmäßig ist der Messwert SSC für kleine Partikel größer.

Parallel zur Erfassung der Streustrahlung, werden in der Durchflusszytometrie Informationen aus der Fluoreszenz bezogen. Dieses Phänomen gehört dem Bereich der Quantenmechanik an und ist nicht mehr durch Strahlung und Wellenoptik erklärbar.

Durch den Laserstrahl werden Fluoreszenzfarbstoffmoleküle angeregt und auf ein höheres Energieniveau befördert. Der Zustand des Exzitationsstadiums hält nur kurze Zeit an und wird sogleich, unter Vorhandensein konkurrierender photophysikalischen Prozesse, durch die Abgabe von Energie in Form von Wärme und Photonen niedrigerer Energieniveaus als die des absorbierten Lichtes, wieder verlassen. Die emittierten Photonen entsprechen der messbaren Fluoreszenz. In modernen FACS-Geräten ist die parallele Messung multipler Fluoreszenzen unter Einsatz mehrerer Laser sowie unterschiedlicher Farbstoffe möglich.

Lichtstreuung und Fluoreszenzen werden über Farbteilerspigel und Bandpassfilter zu den Sensoren und Photomultipliern geleitet. Diese Umleitungen dienen der optischen Trennung der sich überlappenden Emissionsspektren, der verschiedenen Farbstoffe. Die Photomultiplier detektieren die spektral unterschiedlichen Lichtsignale und wandeln sie in elektrische Signale um. Die analogen elektrischen Signale werden hochaufgelöst digitalisiert und in standardisierten¹² ‚list mode‘-Dateien gespeichert. Anhand dieser Rohdatenspeicherung erfolgt im Anschluss an die Messung die Datenanalyse. Vorteile dieses zweiteiligen Vorgehens sind zum einen die detaillierte Auswertung einzelner Zellsubpopulationen hinsichtlich mehrerer korrespondierender Messparameter und zum anderen die Möglichkeit der repetitiven Fehlerkorrektur während des Analyseverfahrens. (Sack, et al., 2007) (Shapiro, et al., 2003)

2.7.2. AUFBAU UND FUNKTION DES DURCHFLUSSZYTOMETERS LSR II

Die Datenaufnahme wird getriggert durch einen definierten Schwellenwert (threshold), für einen festgelegten, führenden Parameter. Neben eines präterminierten Probensignals zum Start der Messung, bedarf es weiter, zur Qualitätssicherung, einer Einstellung der Pulsverarbeitung. Unterschieden wird eine Analyse anhand der Pulshöhe (z.B. FL1-Height, FL1-H), häufig bei immunologischen Fragestellungen verwendet, von der Auswertung des Integrals des Lichtsignals (z.B. FL1-Area, FL1-A), welches seine Anwendung häufiger in der Tumoranalytik findet. Ein entscheidendes Kriterium für die Wahl der Pulsverarbeitung ist die zu erwartende Zellgröße. Eine dritte Möglichkeit liegt in der Verwendung der Pulsbreite (FL1-Width, FL1-W). Vorteile der Datenaufnahme unter Anwendung der Pulsfläche oder Pulsbreite ist die Möglichkeit der Differenzierung zwischen der Passage von Doublets (aneinanderheftende Zellen) oder Signalen einzelner, aber großer Zellen. (Sack, et al., 2007) Die 100-1000-fache Unterscheidung von Merkmalsausprägungen macht eine Logarithmisierung der gemessenen Daten erforderlich. Standardisierte Darstellungen umfassen 1024 oder 4096 Kanalklassen und umfassen somit vier Dekaden. Die Logarithmisierung erfolgt entweder in elektronischer Form durch analoge Verstärker oder rechnerisch unter der Voraussetzung einer hochauflösenden Digitalisierung der Datensätze.

¹² Flow Cytometry Standards (FCS) eingeführt durch das Data File Standards Committee der International Society for Analytical Cytology (ISAC).

Die Verwendung einer Kombination aus Fluoreszenzfarbstoffen macht die Kompensation von sich überlappenden Spektren, der detektierten Lichtsignale notwendig. Passbandfilter limitieren die Überlappung, können sie aber nicht vollständig beheben. Die Kompensation findet durch anteilige Subtraktion der Spannungswerte statt. Die Ermittlung dieser Spannungswerte setzt zu jeder Analyse die Messung einzeln gefärbter Zellen voraus. (Sack, et al., 2007)

In vielen Geräten ist die Detektion von mehr als fünf Fluoreszenzen parallel möglich. Technisch bedarf es hierzu der Laser-Mehrfach-Anregung, wie sie zum Beispiel auch mit dem in dieser Arbeit genutzten Durchflusszytometer LSR II eingesetzt werden kann. Durch die Verwendung mehrerer Lichtquellen erweitert sich das Spektrum, der zu messenden Farbstoffe. Die Anordnung der Laser kann kollinear – die Laser treffen die Zelle an einem identischen Messpunkt der Durchflusszelle – oder flexibel – die Laser werden hintereinandergeschaltet – erfolgen. Die räumlich getrennte Anordnung (flexibel) bietet den Vorteil Fluoreszenzen mit gleicher Emission simultan verwenden zu können, vorausgesetzt die Anregung findet überwiegend mittels eines Lasers statt. (Sack, et al., 2007)

Es sind Akquisitionsraten von >20.000 Ereignisse/sec möglich. Die Signalverarbeitung erfolgt in Form digitaler Logarithmisierung. Die Kompensation kann sowohl online als auch offline durchgeführt werden. Die Datenerfassung erfolgt mit Hilfe der FACSDiva™ Software, die bei LSR II gerätespezifisch eingesetzt wird. ((LSRII))Die Datenspeicherung wird nach dem Flow Cytometer Standards (FCS) 3.0 durchgeführt. (Sack, et al., 2007)

2.7.3. FLUORESZENZFARBSTOFFE UND BIOMARKER

Die Verwendung von Antikörper gebundenen Fluoreszenzfarbstoffen ermöglicht eine sehr viel spezifischere Analyse der Zellpopulationen einer Probe. Fluorochrome können einzeln oder in Kombination, als sogenannte Tandem-Farbstoffe, Anwendung finden. Die Farbstoffe wurden jeweils an unterschiedliche Antikörper gebunden. Tabelle 4: Fluoreszenzfarbstoffe gibt eine Übersicht über die verwendeten Biomarker.

2.7.3.1. ALLOPHYCOCYANIN (APC)

Allophycocyanin ist ein Pigment, welches aus dem Cyanobakterium *Spirulina platensis* (blaugrüne Algen) stammt. Die Exzitation des Farbstoffes erfolgt bei Wellenlängen von 633 nm, 635 nm und 640 nm. Die maximale Emission ist bei 660 nm messbar. (Bioscience, 2015) In einem Molekül APC finden sich sechs Phycocyanobilin Chromophore, es ähnelt im strukturellen Aufbau dem Phycoerythrin. (Sack, et al., 2007) APC markiert über den monoklonalen Antikörper M5E2 (APC Mouse IgG2a) spezifisch CD14. CD14 ist ein 53-55 kDa großes Glycosylphosphatidylinositol-verankertes einkettiges Glykoprotein, welches vor allem auf Monozyten exprimiert wird. Des Weiteren ist es auch auf interfollikulären Makrophagen, retikulären dendritischen Zellen und Langerhans`chen Zellen zu finden. (APC BD Pharmingen)

2.7.3.2. 4'-6-DIAMIDIN-2-PHENYLINDOL (DAPI)

Diamidin-Phenylindol ist ein DNA und RNA bindender Fluoreszenzfarbstoff. Liegt eine Bindung zu doppelsträngiger DNA vor so besteht das Absorptionsmaximum bei 358 nm, das Emissionsmaximum bei 461 nm.

Das Molekül bindet in der kurzen Windung an A-T-Basenpaare des DNA-Doppelstranges. Auf drei Basenpaare kommt ein Farbstoffmolekül. Damit ist die gemessene Fluoreszenz direkt proportional zu der bestehenden Menge an DNA. Bei der Interaktion mit RNA-Strängen handelt es sich um eine Interkalation in A-U-reiche Regionen. Das Emissionsmaximum dieser Verbindung liegt etwa bei 500 nm. (Sigma Aldrich, 2008) Die unterschiedlichen Emissionsmaxima machen eine quantitative Differenzierung von DNA und RNA möglich.

DAPI ist innerhalb eines pH-Bereichs von 4-11 stabil. Bei einer dunklen Lagerung bei 2-8 °C ist es ca. drei Jahre haltbar. Der Fluoreszenzfarbstoff kann alleine oder in Multiparameter-Zell-Analysen, in Kombination mit weiteren Farbstoffen eingesetzt werden. (Kapuscinski, 1995)

DAPI kann intakte Zellmembranen durchdringen. Dieser Vorgang erfolgt allerdings sehr langsam, sodass DAPI erst unmittelbar vor der FACS-Analyse zu den Proben hinzugefügt wurde. Damit konnte DAPI die perforierten Zellmembranen toter Zellen überwinden und

hauptsächlich mit freiliegenden DNA- und RNA-Molekülen interagieren. So konnten wir den Fluoreszenzfarbstoff nutzen um beschädigte Zellen, abgestorbene Zellen und Zelltrümmer zu kennzeichnen und die Zellen so von der Analyse auszuschließen.

2.7.3.3. FLUORESCEINISOTHIOCYANATE (FITC)

Fluoresceinisothiocyanate ist ein Xanthen-Farbstoff mit einer atomaren Masse von 389 Da. Es reagiert sensitiv auf pH-Wert-Veränderungen und unterliegt dem Prozess des ‚photobleaching‘.¹³ Die maximale Anregung erfolgt mit einem Laser von 494 nm Wellenlänge. Die maximale Emission liegt bei 520 nm. (Bioscience, 2015) Es ist der am häufigsten verwendete Konjugatfarbstoff bei der Verwendung von Proteinen und Antikörpern.

FITC ist kovalent an eine IgG2b κ leichte Kette gebunden und reagiert mit dem Epitop des Major-Histokompatibilitäts-Komplexes II (HLA-DR) auf B-Zellen, aktivierten T-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen. (FITC BD Pharmingen)

2.7.3.4. R-PHYCOERYTHRIN (PE)

Phycoerythrin konnte aus den Rotalgen *Porphyrium cruentum* und *Porphyrium sordidum* extrahiert werden. Es handelt sich um ein Photosynthesepigment, welches als Fluorochrom in der Durchflusszytometrie eine breite Anwendung findet. Phycoerythrin ist ähnlich dem APC gut als Konjugationspartner für Tandemfarbstoffe geeignet. (Sack, et al., 2007) Die molekulare Masse liegt bei 240 kDa. Jedes Molekül verfügt über 23 Phycoerythrobilin Chromophore. Aufgrund dessen ist es das Hellste aller Fluochrome. Auch PE unterliegt der Eigenschaft des Photobleachings. (Bioscience, 2015)

Eine Vielzahl der hier verwendeten Antikörper ist an Phycoerythrin gebunden.

Der Anti-Human CD2 Antikörper LFA-2 (PE Mouse IgG1 κ) ist ein 50 kDa großes transmembranes Glykoprotein. Der Rezeptor CD2 kommt auf 80-90 % der

¹³ *Photobleaching* auch bekannt als *fading*, beschreibt den permanenten Verlust der Fluoreszenz eines Moleküls, durch Bestrahlung mit einem Anregungslicht. Ursache ist eine photochemische Zerstörung des Fluorochroms.

menschlichen peripheren Lymphozyten und auf über 95 % der Thymozyten vor. (PE1 BD Pharmingen)

Der monoklonale Antikörper 9E2/Nkp46 bindet spezifisch an CD335, das dem Natural-Killer-Zell Protein p46 (NKp46) entspricht. Exprimiert wird CD335 auf ruhenden und aktivierten Natural-Killer-Zellen. (PE2 BD Pharmingen)

Ein weiterer Biomarker, der CD56 positive Zellen markiert, besteht aus PE und Mouse IgG1 κ . CD56 als glykosyliertes Antigen findet sich auf granularen peripheren Lymphozyten, welche NK-Zell Aktivität anzeigen. (PE3 BD Pharmingen)

Das 95 kDa schwere transmembrane Glykoprotein CD19 wird kennzeichnend durch den PE gekoppelte HIB 19 monoklonalen Antikörper gebunden. CD 19 wird auf allen Entwicklungsstufen der B-Zell-Reihe sowie der differenzierten B-Zellen exprimiert, ausgeschlossen der Plasmazellen. Außerdem präsentiert sich das Glykoprotein auf folliculären dendritischen Zellen. (PE4 BD Pharmingen)

Der fünfte Phycoerythrin markierte Biomarker, gekoppelt an eine Mouse IgM κ leichte Kette, reagiert mit 3-Fucosyl-N-Acetyllactosamin (3-FAL), auch bekannt als CD15 Oberflächenmolekül. Nachweisbar ist es auf 95 % der Eosinophilen und Neutrophilen und in variierender Anzahl auf Monozyten. (PE5 BD Pharmingen)

2.7.3.5. PE-Cy7

PE-Cy7 ist ein Tandem Farbstoff, aus den Komponenten Phycoerythrin und dem Cyanin Farbstoff Cy7. Die maximale Exzitation erfolgt bei 496 nm und die maximale Emission ist bei 785 nm messbar.

In Kombination mit dem 3G8 monoklonalen Mausantikörper markiert es die transmembrane Form des CD16 Moleküls, indem es extrazellulär an den IgG Fc-Rezeptor Anteil bindet. CD16 ist ein mit NK-Zellen, Makrophagen und Granulozyten assoziiertes Oberflächenantigen. (PE-Cy7 BD Pharmingen)

2.7.4. PRÄPARATION DER LEUKOZYTENPROBEN FÜR DIE FACS-ANALYSE

Zur Vorbereitung der Leukozyten mussten diese zunächst mit Hilfe eines Wasserbades bei 37 °C für zwei Minuten aufgetaut werden. 1 ml der Leukozyten wurde mit 9 ml einer

PBS/FBS-Pufferlösung¹⁴ in einem Falcon-Röhrchen verdünnt. Im nächsten Schritt erfolgte die Zentrifugation der Proben für zehn Minuten mit 350 g bei 22 °C Raumtemperatur. Nachdem der Überstand verworfen wurde, sind die Zellpellets in 400 µl PBS/FBS-Pufferlösung mittels mehrmaligen Pipettierens gelöst worden. Von jeder Probe wurden 100 µl entnommen und in ein FACS- Röhrchen gefüllt.

Jeder FACS-Durchgang umfasste eine Negativkontrolle (ungefärbt), vier Proben einzelmarkiert mit den Farbstoffen FITC, PE CD2, APC und PE Cy7, zur Anpassung der Kompensationseinstellungen. Für die Applikation der Antikörper wurde zunächst ein ‚Master-Mix‘ aus allen Antikörpern erstellt und jeweils 37 µl zu einer Probe hinzugefügt.

Farbstoff	Biomarker	Volumen	Hersteller
APC	APC Mouse Anti-Human CD14	5µl	BD Bioscience
FITC	FITC Mouse Anti-Human HLA-DR	5µl	BD Bioscience
PE	PE Mouse Anti-Human CD335 (NKp46)	5µl	BD Bioscience
PE	PE Mouse Anti-Human CD2	5µl	BD Bioscience
PE-Cy7	PE Cy7 Mouse Anti-Human CD16; Clone 3G8	2µl	BD Bioscience
PE	PE Mouse Anti-Human CD19; Clone : HIB 19	5µl	BD Bioscience
PE	PE Mouse Anti-Human CD56	5µl	BD Bioscience
PE	PE Mouse Anti-Human CD15; Clone: HI98	5 µl	BD Bioscience
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol	5µl	Sigma-Aldrich

Tabelle 4: Fluoreszenzfarbstoffe und Biomarker

¹⁴ Phosphat-gepufferte Saline (PBS) plus Fötales bovines Serum (FBS).

Die Proben wurden auf Eis, bedeckt mit Aluminiumfolie, für 30 Minuten inkubiert und anschließend mit 2 ml PBS/FBS- Pufferlösung verdünnt um sie erneut für zehn Minuten mit 350 g bei 22 °C zu zentrifugieren. Wie zuvor wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet mittels 300 µl PBS/FBS-Pufferlösung gelöst und mit der Pipette gemischt.

2.7.5. DURCHFÜHRUNG DER FACS-ANALYSE

Die Probenaufnahme durch das Durchflusszytometer erfolgte über eine Kapillare, die eine lineare Zellaufnahme ermöglichte.

Mit Hilfe einer standardisierten Gating-Strategie konnte eine vergleichbare Datenaufnahme aller Proben erreicht werden und machte damit eine valide Datenanalyse möglich. Die Datenakquirierung wurde mittels der LSR II zugehörigen FACSDiva™ - Software durchgeführt.

In einem ersten Schritt wurden die unterschiedlichen Zellpopulationen Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten über die Parameter FSC und SSC aufgeteilt in einer Dot-Plot-Grafik dargestellt. Über die polygonale Gating-Methode konnte die Monozytenpopulation gezielt in einem neuen Graphen abgebildet werden. Um die ausschließliche Analyse vitaler Zellen zu gewährleisten, wurden abgestorbene Zellen und Zelltrümmer exkludiert. Dieser Schritt wurde durch die Verwendung des Fluoreszenzmarkers DAPI umgesetzt. Weiter war die Isolation der singulären Zellen durch den Ausschluss von Doublets notwendig. Hierzu wurden die vitalen mononukleären Zellen unter den Parametern Forward Scatter-Area (FSC-A) und Forward Scatter-Width analysiert. Dieses geometrische Analyseverfahren bedient sich der Tatsache, dass Doublets ein größeres Pulsintegral und gleichzeitig ein breiteres Pulssignal als singuläre Zellen aufweisen. Nach der Isolation von vitalen mononukleären Einzelzellen ist im folgenden Gating, durch ein negatives Selektionsverfahren, der Ausschluss von hoch PE positiven und HLA-DR negativen Zellen möglich. PE positive Zellen sind CD3⁺ (T-Zellen), CD19⁺ (B-Zellen), CD56⁺ (NK-Zellen), NKp46⁺ (NK-Zellen) und CD15⁺ (Granulozyten). Die für die Fragestellung relevante Monozytenpopulation wies entsprechend geringe positive bis negative PE-Werte und positive HLA-DR Messwerte auf. Durch ein rechtwinkliges Gating konnte in einem letzten Analyseschritt durch die Parameterbestimmung APC-CD14 gegenüber PE-Cy7-CD16 eine qualitative und quantitative Erfassung der Monozytensubpopulationen

erfolgen. Es ergaben sich drei Gruppen. Monozyten 1 entsprechend $CD14^{hi}CD16^{lo}$, Monozyten 2 entsprechend $CD14^{hi}CD16^{hi}$ und Monozyten 3 entsprechend $CD14^{lo}CD16^{hi}$.

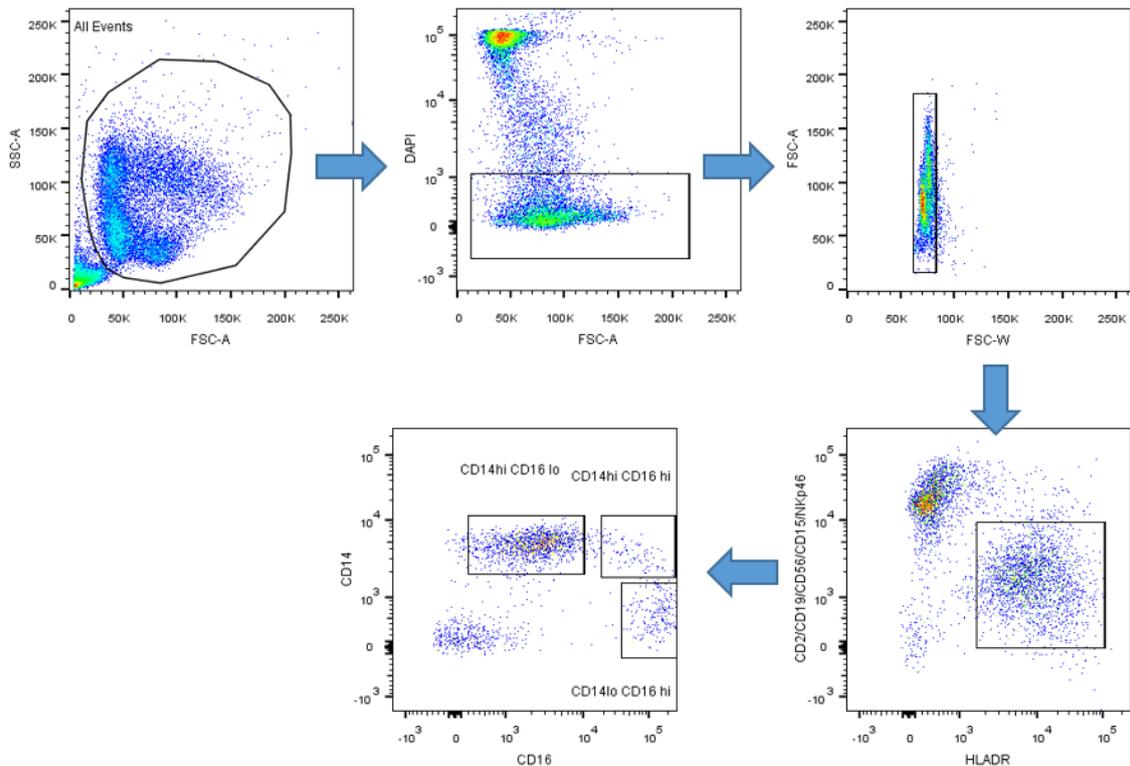


Abbildung 1: Gating Strategie zur quantitativen Differenzierung der Monozytensubpopulationen

Die intermediären Monozyten weisen gleich hohe Konzentrationen an CD14-Markern auf, wie die der inflammatorischen Monozyten. Die Populationen unterscheiden sich in dem Vorhandensein der CD16 Oberflächenmoleküle. Inflammatorische Monozyten tragen geringere bis keine CD16 Moleküle, im Gegensatz dazu sind auf den intermediären Monozyten hohe CD16-Konzentrationen nachweisbar. Die dritte Subpopulation, namentlich nicht-klassische oder reparative Monozyten sind gekennzeichnet durch geringe Konzentrationen der CD14-Moleküle und eine hohe CD16-Molekül-Oberflächendichte. Siehe auch Abbildung 1.

2.7.6. DATENVERWALTUNG UND AUSWERTUNG

Das Durchflusszytometer LSR II verfügt über eine direkte Digitalisierung der Messdaten mit Erhebung der Analyseparameter durch die Software FACSDiva™. Die Datenspeicherung wurde nach dem offiziellen Flow Cytometry Standard 3.0 durchgeführt.

Die Analyse der gespeicherten Rohdaten fand mit Hilfe der Computersoftware FlowJo Version 10 statt.

Die statistische Auswertung und Bewertung der Aussagekraft der erhaltenen Informationen, wurde anhand des Kruskal-Wallis-Test (H-Test) mit anschließendem Post Hoc, dem Dunn`s multiple comparison test, durchgeführt.

Der Kruskal-Wallis-Test ist geeignet für eine parameterfreie Varianzanalyse von rangskalierten Daten. Dieses Verfahren findet seine Anwendung zur vergleichenden Betrachtung einer zentralen Tendenz ordinalskaliert Variablen. Voraussetzungen für die Anwendung des H-Tests sind das Vorhandensein von mehr als zwei unabhängigen Zufallsstichproben und ordinalskaliert Variablen. Die Nullhypothese vertritt die Unterscheidungsfreiheit der Summen – der Rangplätze. Es wird davon ausgegangen, dass die Rangplätze gleichmäßig auf alle Gruppen verteilt sind. (Leonhart, 2013)

Zur Beurteilung des errechneten Ergebnisses, wird der H-Wert mit dem kritischen χ^2 – Wert mit einem Freiheitsgrad von $df=k-1$ (k entspricht der Anzahl der Gruppen) verglichen. Dabei entspricht der χ^2 -Wert einer stetigen Wahrscheinlichkeitsverteilung.

Dunn`s multiple comparison test ist ein nicht-parametrisches Verfahren, mit Rangsummen als Basisdaten. Der Prozess erfolgt in einem paarweisen Vergleich, der bei dem Kruskal-Wallis-Test erhaltenen Daten. Ziel des Post-Hoc-Verfahrens ist die Überprüfung der Ablehnung der Null-Hypothese durch den Kruskal-Wallis-Test. (StackExchange, 2015)

Die Ergebnispräsentation erfolgt durch den Median mit 25./75. Perzentil, sowie Whiskers, entsprechend 10./90. Perzentil. Des Weiteren werden Ausreißer als Punkte dargestellt. Zur grafischen Darstellung werden Box Plots verwendet.

3. ERGEBNISSE

Die Gesamtstichprobengröße umfasste 230 Personen. Davon konnten 41 der Kontrollgruppe (Gesunde) zugeordnet werden. Dementsprechend wurden 189 kardial erkrankte Patienten eingeschlossen, die anhand des koronarangiographischen Ergebnisses in drei Subpopulationen eingeteilt wurden. Die Kohorte ‚Myokardinfarkt‘ (MI) bestand aus 92 Patienten. Akute Myokardinfarkte wurden definiert als Ereigniseintritt ab Tag null bis vier, nach koronarangiographischer Intervention. Patienten mit einer chronisch stabilen koronaren Herzerkrankung, ohne Symptome innerhalb der letzten sechs Monate, die nach einer elektiven Kontrollintervention eingeschlossen werden konnten, wurden der Gruppe der chronischen KHK (CAD) zugeordnet. In dieser Kohorte wurden Proben von 61 Patienten untersucht. Die dritte Untergruppe der Patienten wurde definiert als chronisch Erkrankte mit Rezidivereignis. Bei 36 der 189 Patienten konnte ein erneut aufgetretenes Infarktereignis diagnostiziert werden, entsprechend mit chronischer KHK-Myokardinfarkt (CAD-MI) benannt. Der Einschluss erfolgte von Tag null bis einschließlich Tag vier nach einer kathetergestützten Untersuchung.

Bei den einzelnen Personen wurden jeweils die Parameter Alter, Geschlecht, Body-Mass-Index¹⁵ (BMI), Zigarettenkonsum und Blutdruck erhoben. Die durchflusszytometrische Untersuchung der Leukozytenproben ergab die quantitative Bestimmung der Monozyten.

Die Kontrollkohorte (n=41) bestand aus 20 männlichen und 21 weiblichen Probanden. Das mediane Alter lag bei 49,0 Lebensjahren, bei einer Gesamtverteilung zwischen 31,2 bis 59,8 Jahren. Der berechnete BMI entsprach im Median 27,5 (22,2-35,2). Hinsichtlich ihres Rauchverhaltens gaben 17 % (n=7) an, einem aktiven Nikotinkonsum nachzugehen, 59 % (n=24) erklärten den Nikotinkonsum eingestellt zu haben und 24 % (n=10) haben laut eigener Angabe noch nie geraucht. Der mediane systolische Blutdruckwert lag bei 130,0 mmHg, Intervall von 110,0 bis 152,8 mmHg. Diastolisch konnte der Median bei 87,0 mmHg (66,0-94,8 mmHg) festgestellt werden.

Die Kohorte der akuten Ereignisse (MI, n=92) bestand zu 87 % aus Männern und entsprechend zu 13 % aus Frauen. Bei einem Altersintervall von 49,0 bis 66,0 Jahren, lag

¹⁵ Body- Mass-Index als Maß des Körpergewichts. Berechnet als Körpergewicht (kg) geteilt durch Körpergröße (m) zum Quadrat. Einheitslose Angabe

der Median bei 57,0 Jahren. Der mediane BMI wurde mit 28,1 bestimmt. Die Verteilung des Nikotinabusus ergab, dass 53 % (n=49) aktiv rauchen, 24 % (n=22) den Zigarettenkonsum sistiert haben und 23 % (n=21) noch nie geraucht haben. Die systolischen Blutdruckwerte lagen im Bereich von 110,0 bis 157,9 mmHg, Zentralwert entsprach 126,5 mmHg. Diastolisch ergab sich ein Median von 80,0 mmHg (61,0-87,0 mmHg).

In der Kohorte der chronisch erkrankten KHK-Patienten ohne neu aufgetretenes Ereignis lag das mediane Alter bei 65,0 Jahren (51,2-71,8 Jahre) und die Geschlechterverteilung fiel mit 89 % zu 11 % zu Gunsten der männlichen Teilnehmer aus. Der Zentralwert des BMI belief sich auf 29,1 (23,8-38,0). Die Frage nach dem aktuellen Zigarettenkonsum wurde von 16 % (n=10) mit persistent, 64 % (n=39) mit sistiert und 20 % (n=12) mit „Noch-Nie“ beantwortet. Der Zentralwert der systolischen Blutdruckmessung lag bei 130 mmHg (110,0-163,6 mmHg) und das mediane Diastolikum wurde mit 80,0 mmHg (60,0-90,0) bestimmt.

Das Alter der CAD-MI Population betrug im Median 63,5 Jahre (51,7-73,0). Die Geschlechterverteilung fiel männlich zu weiblich 81 % zu 19 % (29/7) aus. Der mediane BMI-Wert wurde mit 28,4 berechnet. 25 % (n=9) der Patienten gaben an aktive Raucher zu sein. 61 % (n=22) hatten den Nikotinabusus wieder beendet und 14 % (n=5) verneinten den Zigarettenkonsum zu jedem Lebenszeitpunkt. Der systolische Blutdruckwert lag im Median bei 140 mmHg (113,5-162,4) und diastolisch konnte ein Wert von 80,0 mmHg (70,0-90,0) ermittelt werden.

Es konnten statistisch relevante Unterschiede besonders für die Altersverteilung der eingeteilten Kohorten festgestellt werden. So lag das mediane Alter der Myokardinfarkt-Patienten acht Jahre ($p < 0,001$), der chronischen KHK-Patienten 16 Jahre ($p < 0,0001$ vs. Kontrollen; $p < 0,01$ vs. MI) und der chronischen Patienten mit akuten Re-Ereignis 14,5 Jahre ($p < 0,0001$) über dem der Kontrollgruppe. Weitere signifikante Unterschiede betrafen die diastolischen Blutdruckwerte. Hier ergab sich bei allen Patientenkohorten ein im Median um 7 mmHg niedrigerer Blutdruckwert als in der Kontrollgruppe (MI $p < 0,001$, CAD $p < 0,01$).

Charakteristikum	Gruppe			
	Kontrollen	Akuter MI	CAD	CAD-MI
n	41	92	61	36
m/w Nr. (%)	20/21 (49/51)	80/12 (87/13)	54/7 (89/11)	29/7 (81/19)
Alter	49,0 (31,2-59,8)	57,0 (49,0-66,0)***	65,0 (51,2-71,8)****,###	63,5 (51,7-73,0)****
Body-Mass-Index	27,5 (22,2-35,2)	28,1 (23,7-35,3)	29,1 (23,8-38,0)	28,4 (23,7-39,7)
Nikotinabusus				
Aktuell-Nr. (%)	7 (17)	49 (53)	10 (16)	9 (25)
Sistiert- Nr.. (%)	24 (59)	22 (24)	39 (64)	22 (61)
Noch Nie- Nr. (%)	10 (24)	21 (23)	12 (20)	5 (14)
Blutdruck (mmHg)				
Systolisch	130,0 (110,0-152,8)	126,5 (110,0-157,9)	130,0 (110,0-163,6)	140,0 (113,5-162,4)
Diastolisch	87,0 (66,0-94,8)	80,0 (61,0-87,0)***	80,0 (60,0-90,0)**	80,0 (70,0-90,0)
Monozyten (%)				
Gesamt	39,5 (20,3-57,67)	45,5 (28,8-64,5)	42,8 (21,0-60,9)	43,7 (20,1-60,6)
CD14 ^{hi} CD16 ^{lo}	41,8 (3,5-62,3)	54,2 (10,1-75,1)*	53,2 (29,8-76,0)**	55,3 (32,1-69,3)
CD14 ^{hi} CD16 ^{hi}	2,7 (0,6-6,3)	4,0 (1,4-10,5)*	4,2 (1,5-9,5)*	4,6 (1,7-9,4)**
CD14 ^{lo} CD16 ^{hi}	5,0 (1,9-11,6)*	3,3 (1,4-8,4)	6,0 (2,5-11,6)###	4,0 (1,6-10,0)

Tabelle 5: 41 gesunde Kontrollen und 189 Patienten. Body-Mass Index (BMI) ist definiert als Körpergewicht (kg) dividiert durch Körpergröße (m) zum Quadrat. m=männlich, w=weiblich. Der Datenvergleich erfolgte mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Test und anschließendem Post Hoc durch den Dunn's multiple comparison Test. Die Darstellung erfolgt als Median mit 10th/90thpercentile, *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001, ****P<0,0001 vs. control, ###P<0,01 vs. MI.

Im Folgenden werden die durch die durchflusszytometrische Analyse unter Verwendung des FACS LSR II ermittelten Messergebnisse der Gesamtmonozytenanzahl sowie die differenzierte quantitative Darstellung der Monozytensubpopulationen vorgestellt. Abbildung 2 zeigt beispielhaft für eine Messdurchführung die erhaltenen Rohdaten, dargestellt in einer Dot-Plot-Grafik. Zu erkennen ist eine logarithmische Auftragung der Anzahl der unterschiedlichen Monozytensubpopulationen, definiert über die Ausprägungsintensität der Fluoreszenzemission, der Marker für die zellkennzeichnenden Oberflächenmoleküle CD14 und CD16.

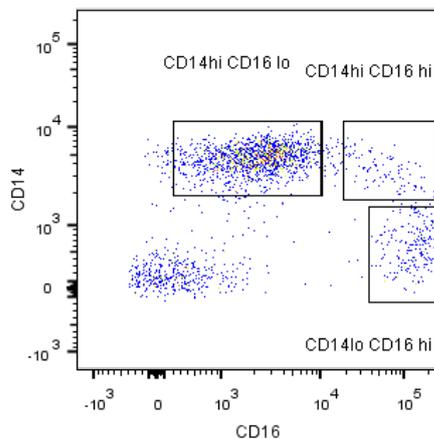


Abbildung 2: Dot Plot Graphik einer beispielhaften Datenerhebung durch das FACS LSR II

Nach Auswertung aller Messergebnisse der Leukozytenuntersuchungen, ergaben sich folgende Ausprägungen der Monozytensubpopulationen. Die Gesamtanzahl der Monozyten an der Leukozytengesamtheit der Blutprobe lag im Median bei der gesunden Kontrollgruppe bei 39,5 % (20,3-57,67). Demgegenüber standen der Median der MI-Gruppe mit 45,5 % (28,8-64,5), der CAD-Gruppe mit 42,8 % (21,0-60,9) und CAD-MI-Gruppe mit 43,7 % (20,1-60,6). Abbildung 3 fasst die Monozytengesamtergebnisse grafisch zusammen. Nach einer nicht-parametrischen Varianzanalyse konnten keine signifikanten Differenzen unter den Kohorten festgestellt werden.

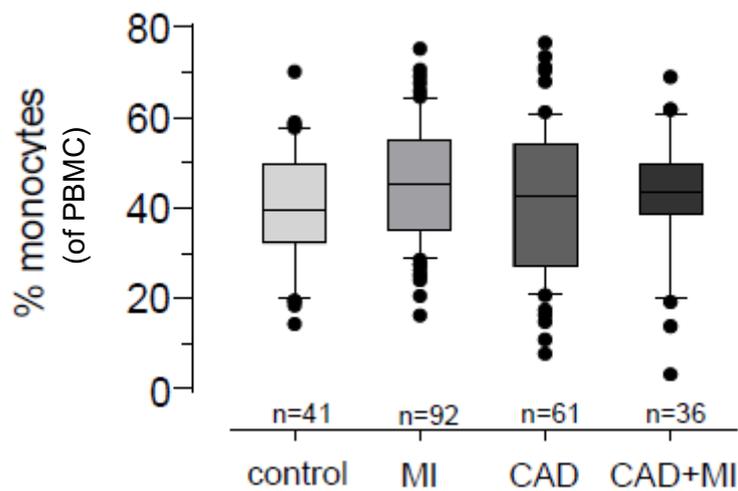


Abbildung 3: Prozentualer Anteil der Gesamtmonozyten an Gesamtheit der PBMC (peripheral blood mononuclear cell) (nach Kruskal-Wallis-Test, anschließend Dunn's multiple comparison Test)

Für die Monozytensubpopulation der CD14^{hi}CD16^{lo} Monozyten ergab sich für die Kontrollgruppe ein Median von 41,8 % an den jeweils gesamt gemessenen Monozyten einer Blutprobe. Mit einer Anzahl von 54,2 % bei den MI-Patienten bestand eine Signifikanz mit $p < 0,05$ gegenüber der Kontrollkohorte. Mit $p < 0,01$ konnte auch für die CAD-Gruppe ein signifikant höheres Vorkommen mit einem Median von 53,2 % an inflammatorischen Monozyten, gegenüber der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Der Zentralwert der CD14^{hi}CD16^{lo} Population in der CAD-MI-Gruppe lag bei 55,3 % und unterlag keinem signifikanten Zusammenhang mit der Kontrollgruppe. Damit wurde der Zentralwert für die Patientengruppe mit CAD-MI am höchsten gemessen, gefolgt von der Kohorte der akuten Myokardinfarkte. Abbildung 4 zeigt das prozentuale Vorkommen der inflammatorischen Monozytenpopulationen in den einzelnen Patientengruppen.

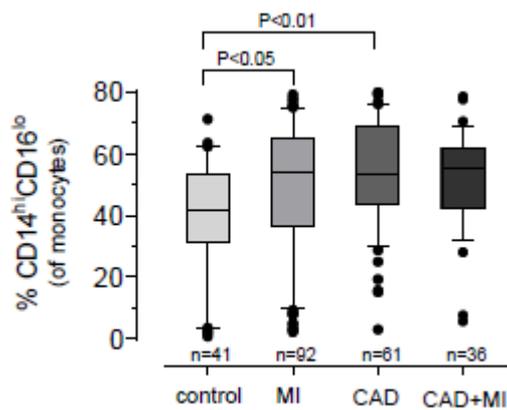


Abbildung 4: Prozentualer Anteil der $CD14^{hi}CD16^{lo}$ Monozyten an den Gesamtmonozyten (nach Kruskal-Wallis-Test, anschließend Dunn's multiple comparison Test)

Wie Abbildung 5 erkennen lässt, war der prozentuale Anteil der intermediären Monozyten in der Kontrollgruppe mit 2,7 % am niedrigsten. Im Vergleich zu den gesunden Kontrollen bestand in allen drei Patientengruppen eine signifikante Korrelation zwischen dem quantitativen Auftreten der $CD14^{hi}CD16^{hi}$ -Monozyten und der koronaren Herzerkrankung. Der Zentralwert für die Messungen der intermediären Monozyten ergab für die Gruppe MI 4,0 % ($p < 0,05$), für CAD zugehörigen Patienten 4,2 % ($p < 0,05$) und für die CAD-MI-Kohorte 4,6 % ($p < 0,01$). Im Durchschnitt lag der Medianwert bei den Patientengruppen um 1,57 Prozentpunkte höher als in der Kontrollgruppe.

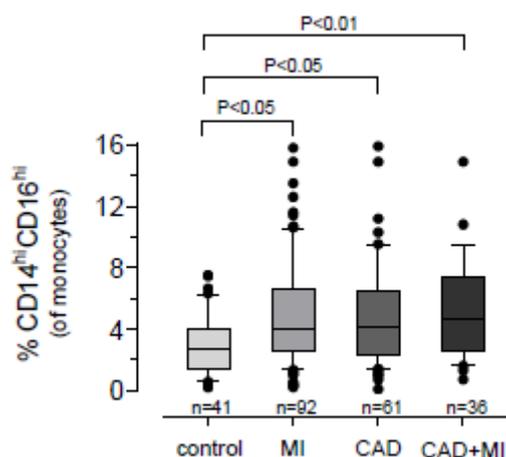


Abbildung 5: Prozentualer Anteil der $CD14^{hi}CD16^{hi}$ -Monozyten an den Gesamtmonozyten (nach Kruskal-Wallis-Test, anschließend Dunn's multiple comparison Test)

Auch in den Messungen hinsichtlich der nicht-klassischen Monozytensubpopulation konnten signifikante Unterschiede unter den Vergleichsgruppen festgestellt werden. Abbildung 6 zeigt die grafische Analyse der FACS Messungen für die CD14^{lo}CD16^{hi}-Monozyten. In der Kontrollkohorte war im Median ein Wert von 5,0 % messbar. Demgegenüber konnte ein relevanter Unterschied mit $p < 0,05$ der nicht-klassischen Monozytenanzahl in der MI-Gruppe (Median 3,3 %) nachgewiesen werden. Mit einem Signifikanzwert von $p < 0,01$ stellt sich die Gruppe CAD (Median 6 %) im Vergleich zu der MI-Kohorte dar. Der Zentralwert ließ sich in der dritten Patientengruppe (CAD-MI) mit 4,0 % festlegen. Damit ergab sich für die CAD-Kohorte der höchste Median, gefolgt von der Kontrollgruppe.

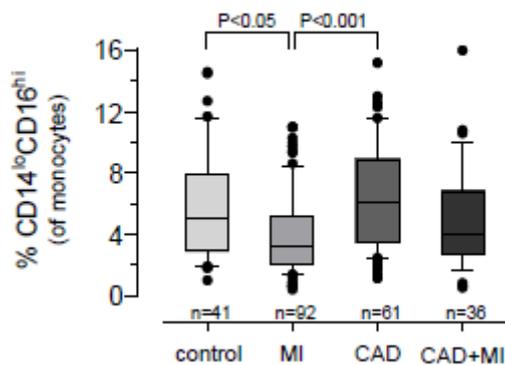


Abbildung 6: Prozentualer Anteil der CD14^{lo}CD16^{hi} Monozyten an den Gesamtmonozyten (Kruskal-Wallis-Test anschließend Dunn's multiple comparison test)

4. DISKUSSION

Die Erkenntnis der zentralen Rolle des inflammatorischen Geschehens im Rahmen der Arterogenese veränderte die Sicht auf die koronare Herzerkrankung maßgeblich. Die Arteriosklerose gilt seit etwa den 1970er Jahre als eine Erkrankung, die unter Beteiligung des Immunsystems entsteht. (Ross, et al., 1976) Bis zu diesem Zeitpunkt ging man von passiven Prozessen und einem Heranwachsen des Atheroms durch Akkumulation von Lipiden und Zellen aus. Zunehmend gewann man Erkenntnis über die außerordentliche Beteiligung des Immunsystems. Heute gilt es als gesichert, dass Monozyten und Makrophagen aktive Rollen in der Pathogenese der Arteriosklerose und damit bei der Entstehung der koronaren Herzerkrankung einnehmen.

Lange Zeit galten Monozyten und Makrophagen als homogene Zellpopulationen. In zahlreichen Studien konnte jedoch nachgewiesen werden, dass es sich bei den mononukleären Phagozyten um eine heterogene Population mit unterschiedlichen Subpopulationen handelt. Bis jetzt wurden vor allem die phänotypischen Differenzen und die funktionellen Eigenschaften der Subpopulationen untersucht. Des Weiteren zeigten zahlreiche Studien der vergangenen Jahre, eine Korrespondenz zwischen dem Vorhandensein von unterschiedlichen zirkulierenden Monozytenpopulationen und kardiovaskulären Ereignissen. Das Ziel der vorliegenden Untersuchung ist, Hinweise auf mögliche Zusammenhänge des Auftretens verschiedener Monozytensubpopulationen und den unterschiedlichen Krankheitsstadien im Verlauf der koronaren Herzerkrankung aufzuzeigen. Das Wissen über Korrelationen spezifischer Monozyten mit der Krankheitsaktivität könnte als Grundlage zur Entwicklung neuer Biomarker in der primär und sekundär Prophylaxe der koronaren Herzerkrankung mit ihren klinischen Ereignissen genutzt werden.

4.1. Zusammenfassung der Hauptergebnisse

Eine Gegenüberstellung des Gesamtmonozytenvorkommens zwischen den vier Kohorten ergab keine signifikanten Unterschiede. Betrachtet man allerdings die Häufigkeitsverteilung einzelner Monozytensubpopulationen, so lassen sich statistisch relevante Differenzen feststellen.

Die Median-Werte der inflammatorischen Monozyten liegen bei den Patienten der Gruppe CAD-MI am höchsten (55,3 %), gefolgt von der Patientengruppe MI (54,2 %). Diese Ergebnisse weisen auf ein vermehrtes Vorkommen der CD14^{hi}CD16^{lo} Monozyten bei akuten Ereignissen hin.

Der Anteil der CD14^{hi}CD16^{hi} Monozyten ist bei allen Patientenkohorten signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht. Im Durchschnitt liegen die medianen Werte der Monozytenzahlen in den Patientengruppen 1,57 % über den Werten der Gesunden. Vergleicht man die Mengen bei den Patientengruppen untereinander, sind keine signifikanten Differenzen festzustellen. So liegen die Mediane maximal 0,6 % auseinander. Es scheint eine generelle Erhöhung der intermediären Monozyten für alle Stadien einer KHK zu geben. Folglich könnten die CD14^{hi}CD16^{hi} Monozyten im gesamten Krankheitsverlauf, von dem akuten Erstereignis über chronisch stabile Stadien bis hin zu Exazerbationen, eine Rolle spielen.

Die Ergebnisse zeigen signifikante Anstiege der relativen Submonozytenzahlen in den Untergruppen der intermediären sowie der inflammatorischen Zellen. Aktuelle wissenschaftliche Arbeiten ordnen Monozyten mit hoher oberflächengebundener CD14-Dichte vor allem akuten inflammatorischen Prozessen zu. (Cros, et al., 2010) (Rogacev, et al., 2012) Die vorliegenden Ergebnisse weisen in die gleiche Richtung.

Die nicht-klassischen Monozyten, konnten mit signifikanten Werten in der Kontrollgruppe (Median 5,0 %, $p < 0,05$) sowie den chronischen KHK-Patienten (Median 6,0 %, $p < 0,001$) gegenüber den MI-Patienten, gemessen werden. Die Funktion als patrouillierende Kontroll-Leukozyteneinheit, deckt sich mit der Beobachtung, dass die ‚reparativen‘ Monozytensubpopulation im Zustand physiologischer Gegebenheiten vermehrt gegenüber akuten inflammatorischen Prozessen nachweisbar sind. Dieses Untersuchungsergebnis scheint für einen Verlust, beziehungsweise ein Verdrängen, der CD14^{lo}CD16^{hi} Monozyten durch die inflammatorischen und intermediär Monozytensubpopulationen unter akut entzündlichen Bedingungen zu sprechen. So könnten hohe Anteile der CD14^{lo}CD16^{hi} Monozyten an der Gesamtmonozytenanzahl bei bekannten KHK-Patienten für eine aktuell ‚ruhenden‘ Verlauf sprechen.

4.2. Diskussion der Methodik

Die fluoreszenzgestützte durchflusszytometrische Untersuchung der Leukozytenproben ermöglichte eine gezielte, der Fragestellung entsprechende, quantitative Differenzierung der drei verschiedenen Monozytensubpopulationen. Die Analyse fand in Abhängigkeit von den unterschiedlichen Stadien der koronaren Herzerkrankung und im Vergleich zu nicht kardial vorerkrankten Kontrollen statt. Dieses Verfahren ermöglichte die Verwendung eines Analyseprotokolls zur differenziellen Bestimmung der drei Monozytensubpopulationen, sodass auch die Gruppe der CD16^{hi} Monozyten nach intermediären und nicht-klassischen Untergruppen betrachtet werden konnte. Das Protokoll folgte aktuellen wissenschaftlichen Empfehlungen um eine möglichst hohe Korrektheit der Monozytenerfassung und Charakterisierung zu gewährleisten. Die korrekte Monozytenidentifikation, setzt die Verwendung eines Pan-Monozyten Markers voraus. Hierzu wurde HLA-DR verwendet. (Zawada, et al., 2012) (Heimbeck, et al., 2010) Wichtig für eine aussagekräftige CD16 Färbung ist die Verwendung des 3G8 Klons. Andere erhältliche Biomarker (etwa B37.1/Leu11c) könnten zu inkorrekten Ergebnissen führen, beispielsweise durch den Verlust des B73.1/Leu11c-Epitops auf CD16 positiven Zellen im Rahmen primärer immundefizieller Erkrankungen. (Zawada, et al., 2012) (Lenart, et al., 2010)

Das Design einer Kohorten-Studie limitiert die Aussagekraft über mögliche vorliegende Kausalitäten. Des Weiteren ist bei der Ergebnisansicht und Interpretation zu beachten, dass die Kohorte der CAD-MI zahlenmäßig geringer ausgefallen ist als die anderen Kohorten. Mögliche Konsequenz dieses quantitativen Unterschieds, könnte der fehlende Nachweis von signifikanten Werten in dieser Untergruppe sein.

Die Einteilung der Patienten erfolgte primär nach zeitlichen Charakteristika. Dieses Kriterium war konstant und zu jeder Zeit umsetzbar. Monozyten sind ein zentraler Bestandteil des nativen Immunsystems. Sie sind an der Pathogenese zahlreicher weiterer chronischer Erkrankungen und in der täglichen Immunabwehr beteiligt. Während der Patientenrekrutierung erfolgte kein sicherer Ausschluss zusätzlicher chronischer Erkrankungen oder akuter Infekte. So ist ein Einfluss weiterer immunologischer Prozesse auf die Messergebnisse nicht sicher zu exkludieren.

Die Verfahren zu der Leukozytenseparation entsprachen labortechnischen Standards und wurden durch regelmäßige Zellzählungen des Probeninhaltes kontrolliert. Die kurzfristige Aufbewahrung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ und die langfristige Kühlung bei $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ basieren gleichfalls auf langjährig erprobten Deponierungsstandards. Die Standardisierung der Probendurchläufe macht eine Replizierbarkeit der Versuchsreihe möglich.

Adipositas, gemessen an dem errechneten BMI, führt nachweislich zu erhöhten Infektionswerten. So konnte eine direkte positive Korrelation zwischen $\text{CD14}^{\text{lo}}\text{CD16}^{\text{hi}}$ Monozyten und einem erhöhten BMI nachgewiesen werden. Des Weiteren bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen erhöhten $\text{CD14}^{\text{lo}}\text{CD16}^{\text{hi}}$ Konzentrationen und dem Patientenalter sowie erhöhten Blutdruckwerten. (Rogacev, et al., 2010) Diese von der koronaren Herzerkrankung unabhängige Erhöhung der nicht-klassischen Monozytensubpopulation kann bei nicht vorliegenden signifikanten Unterschieden des BMI zwischen den Kohorten vernachlässigt werden. Bei den Blutdruckwerten konnten signifikante Unterschiede erörtert werden, allerdings lag der Median in der Kohorte MI und CAD unterhalb der Kontrollgruppe (siehe Tabelle 5). Das Alter kann als unabhängiger Einflussfaktor, auf die Höhe der gemessenen $\text{CD14}^{\text{lo}}\text{CD16}^{\text{hi}}$ Monozyten nicht sicher ausgeschlossen werden.

4.3. Diskussion der Ergebnisse

Zur Einordnung der erhaltenen Ergebnisse ist im Folgenden der aktuelle Stand wissenschaftlicher Erkenntnisse dargestellt.

Der Nachweis von zwei differenziellen Monozytensubpopulationen gelang zunächst in Mäusen: Einer inflammatorischen Subpopulation (Ly6C^{hi} Monozyten) und einer zweiten Monozytengruppe, den Ly6C^{lo} Monozyten, die regressiv auf inflammatorische Prozesse wirken und durch Prozessinnovation reparativer Vorgänge gekennzeichnet sind. (Swirski, et al., 2007) Swirski et al. veröffentlichten 2007 ihre Ergebnisse zu Monozytenanalysen in Mäusen im ‚Journal of Clinical Investigation‘. Die zwei nachgewiesenen Subpopulationen unterschieden sich sowohl in ihrer Expression des Oberflächenrezeptors, als auch in ihrer Funktionalität. Ly6C^{hi} Monozyten waren deutlich vermehrt in hypercholesterämischen ApoE-defizienten Mäusen nachweisbar. Die Hypercholesterinämie-assoziierte Monozytose war Ergebnis höherer

Zellüberlebensraten, einer durchgehenden Proliferation und gestörter Ly6C^{hi} zu Ly6C^{lo} Konversionen. (Swirski, et al., 2007)

Ly6C^{hi} Monozyten binden bevorzugt an aktivierten Endothelzellen und infiltrieren endotheliale Läsionen. In Makrophagen umgewandelt, akkumulieren sie in der Intima. Hauptstimuli der inflammatorischen Monozytose schienen erhöhte Cholesterin und Lipidwerte im Blut zu sein. (Swirski, et al., 2007)

Das schon angedeutete proinflammatorische Potenzial, lässt sich bei den Ly6C^{hi} Monozyten aus den sezernierten Zytokinen ableiten. Sie exprimieren eine Vielzahl proteolytischer Proteine, zum Beispiel CCL2 (entspricht MCP-1) und treten vermehrt in inflammatorischen Geweben auf. (Swirski, et al., 2009)

Im Gegensatz dazu scheinen die Ly6C^{lo} Monozyten antiinflammatorische Eigenschaften aufzuweisen. Sie fördern Heilungsprozesse und initiieren Granulationsgewebe.

Hinweise auf eine Beteiligung an dem Artheromwachstum erbringen Studien, in denen durch Blockade der Chemokin-Rezeptoren CCR2, CCR5 und CX3CR1 die stärkste Abnahme des Plaquewachstums erzielt werden konnten. (Combadière, et al., 2008) Diese Beobachtung legte nahe, dass sowohl Ly6C^{hi} als auch Ly6C^{lo} Monozyten an der Entstehung arteriosklerotischer Plaques beteiligt sein könnten. (Swirski, et al., 2009)

Die granulationsfördernden Eigenschaften der Ly6C^{lo} Monozyten lassen vermuten, dass es in ihrer Gegenwart zu der Ausbildung „stabiler“ Plaques kommt. (Weber, et al., 2008) Während nicht inflammatorischer Zustände patrouillieren sie entlang des Endothels und reichern sich schnell in entzündlichen Geweben an. (Nahrendorf, et al., 2007) (Geissmann, et al., 2003) (Auffray, et al., 2007) Die Monozyten-Endothel-Interaktion wird durch Lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1 entspricht $\alpha_L\beta_2$ Integrin) und den Chemokin Rezeptor CX₃CR1 vermittelt. (Auffray, et al., 2007) Ly6C^{lo} Monozyten weisen höhere Konzentrationen an CX₃CR1 auf. Das stützt die These der patrouillierenden Fähigkeiten von Ly6C^{lo} Monozyten Die Akkumulation wird hauptsächlich über CCR5 gesteuert. (Tacke, et al., 2007)

Ly6C^{hi} Zellen binden in höherem Maße an aktivierte Endothelzellen und infiltrieren die Intima besser als Ly6C^{lo} Monozyten. (Swirski, et al., 2007)

Nicht nur die Entstehung der koronaren Herzerkrankung basiert auf monozytärem Vorkommen, auch der Verlauf nach einem Myokardinfarkt ist stark durch das Vorhandensein der mononukleären Phagozyten geprägt. 2009 erschien eine Population von Swirski et al. in dem Journal ‚Science‘, die ein Reservoir an Monozyten in der roten Pulpa der Milz beschrieb. Diese Monozyten wurden als Antwort auf einen ischämischen Myokardinfarkt in Massen aus der Milz mobilisiert und akkumulierten im Ischämiebereich. (Swirski, et al., 2009-2) Die Milz als Monozytenreservoir scheint eine mögliche Erklärung für den rapiden Anstieg der peripheren Monozytenkonzentration als Folge einer Organläsion, beziehungsweise eines inflammatorischen Geschehens zu sein.

Neben den inflammatorischen Grundlagen der Entstehung einer KHK, ist auch die Heilungseffektivität nach einem Infarkt bedeutend abhängig von einer koordinierten Monozytenmobilisation in das ischämische Areal. (Nahrendorf, et al., 2010)

Im Menschen gelang erstmals 1989 der Nachweis einer Heterogenität innerhalb der Monozytenpopulation, beschrieben durch Passlick, Ziegler-Heitbrock und Flieger. Sie konnten unter Anwendung einer Zweifarben-Fluoreszenz zwei unterschiedliche Subpopulationen in humanem Blut nachweisen. Diese entsprechen den CD16⁺ und CD16⁻ Monozytenpopulationen. (Passlick, et al., 1989)

Die differenziellen Monozytenpopulationen im Mausmodell suggerierten eine äquivalente Aufteilung humaner Monozyten. Die Unterscheidung der Mausmonozyten erfolgte anhand der Expressionsmuster von Ly6C, Gr1, CC Chemokin Rezeptor 2 und CX3 Chemokin Rezeptor 1 (CX3CR1). Als Ly6C^{hi} wurden Monozyten mit der Gr1⁺CCR2⁺CX3CR1^{lo} Rezeptor-Kombination genannt und umgekehrt gehören den Ly6C^{lo} Populationen Zellen mit Gr1⁻CCR2⁻CX3CR1^{hi} Muster an. Auf Grund der ähnlichen Expression von CCR2 und CX3CR1 Molekülen auf humanen Monozyten, konnte anhand der Verteilungsmuster eine Korrespondenz der CD14⁺⁺CD16⁻ und CD14⁺CD16⁺ entsprechend Ly6C^{hi} und Ly6C^{lo} angenommen werden. (Geissmann, et al., 2003) (Swirski, et al., 2009) Ebenso unterstützen die paradox erscheinenden Funktionen der Monozyten die differenzielle Einteilung in Subpopulationen. (Geissmann, et al., 2003) (Shantsila, et al., 2014)

Auf genetischer Ebene konnte zum ersten Mal die Arbeitsgruppe um Zawada (2011) den Nachweis von drei unterschiedlichen Monozytensubpopulationen erbringen. (Zawada, et al., 2011)

Die Monozytengesamtheit bildet sich aus den inflammatorischen (klassischen), den intermediären und den reparativen (nicht klassischen) Monozytensubpopulationen. Wie bereits ausführlich im Einführungsteil 1.2.3 geschildert, erfolgt die Differenzierung vorrangig über die Oberflächenrezeptoren CD14 und CD16. Im Folgenden soll durch die Darstellung weiterer molekularer Eigenschaften und Zusammenfassungen der Funktionalität, die Grundlage für die Interpretation der erhaltenen Ergebnisse gelegt werden.

CD14^{hi}CD16^{lo} Monozyten (inflammatorische) produzieren auf den bakteriellen Stimulus LPS hin IL6¹⁶, IL8¹⁷, CCL2 und CCL3. (Cros, et al., 2010) Diese Zytokine initiieren und fördern maßgeblich inflammatorische Prozesse. Aktivierte Monozyten dieser Subpopulation sind sehr aktiv hinsichtlich der phagozytotischen Funktion und sind in der Lage große Mengen an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) sowie mRNA codierend für Myeloperoxidase und Lysozyme zu exprimieren. (Cros, et al., 2010) Weitere Oberflächenmoleküle, die auf CD14^{hi} Monozyten nachgewiesen werden konnten, sind CCR2, Selektin und der Fc-Rezeptor CD64.

Die Subpopulation der intermediären Monozyten unterscheidet sich phänotypisch, aber auch funktional von den inflammatorischen Phagozyten. Sie produzieren deutlich weniger ROS und geringere Konzentrationen an Myeloperoxidase- und Lysozym-codierender mRNA. Die Differenzen hinsichtlich der Zytokinproduktion liegen in der Produktquantität und in den Produkten selbst. (Cros, et al., 2010) CD16^{hi} Monozyten produzieren große Mengen TNF- α (Belge, et al., 2002) und gelten als die Hauptproduzenten von IL12¹⁸ (Szaflarska, et al., 2004). Weiter synthetisieren sie IL6 und CCL3. Die größte Aktivitätssteigerung geht, entsprechend den inflammatorischen

¹⁶ Interleukin 6 gehört zu den Zytokinen, die an der Regulation der Akuten-Phase-Reaktion als Antwort auf Schäden und Infektionen beteiligt sind. (Heinrich, et al., 2003)

¹⁷ Interleukin 8 führt zur Akkumulation und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten in inflammatorischen Regionen. (Bickel, 1993)

¹⁸ Interleukin-12 ist einer der Hauptregulatoren in der T-Helferzellaktivierung und wird hauptsächlich von Monozyten sezerniert. Damit stellt dieses Zytokin einen wichtigen proinflammatorischen Faktor in der Konnektion des angeborenen und erworbenen Immunsystems dar. (Uyemura, et al., 1996)

mononukleären Zellen, von der Gegenwart eines LPS Moleküls aus. (Cros, et al., 2010) Für den Rezeptor CCR2 weisen sie geringere Konzentrationen auf. Zusätzlich exprimieren sie CD32 und zeigen eine höhere Dichte an MHC-II Molekülen.

Neben den proinflammatorischen Eigenschaften, scheinen die intermediären Monozyten gleichzeitig an strukturellen Veränderungen des Gewebes beteiligt zu sein. Die Expression proangiogenetischer Rezeptoren (TIE-2, VEGFR-2, ENG) ist auf intermediären Monozyten vermehrt nachweisbar. Folglich liegt eine Beteiligung an einer plaquestabilisierenden Reorganisation via Angiogenese nahe. (Zawada, et al., 2011)

Die Migration von CD16⁺ und CD16⁻ Monozyten, wird durch unterschiedliche Kombinationen aus Rezeptoren koordiniert. CD16⁺ Monozyten exprimieren im Gegensatz zu den CD16⁻ Äquivalenten hohe Mengen an CX3CR1 und CXCR4, aber nur geringe Mengen an CCR2 und CD62L. Folglich wird die Migration der CD16⁺ Zellen durch Fraktalkine (FKN, CX3CL1) und weniger durch MCP1 (CCL2) gesteuert. Neben der Migration über den FKN/CX3CR1 Weg, ist auch die Bindungsstärke der CD16⁺-Monozyten an FKN-exprimierenden Zelloberflächen höher, als die der CD16⁻ Monozyten. (Ancuta, et al., 2003) Damit scheinen CD16⁺ Monozyten eher befähigt für einen transendothelialen Übertritt zu sein.

Sowohl inflammatorische als auch intermediäre Monozyten produzieren das anti-inflammatorische IL10. Zirkulierende Monozyten tragen zahlreiche Rezeptoren, die mit einer Immunantwort bei inflammatorischen Prozessen assoziiert sind. CD14 Moleküle agieren als Ko-Rezeptor für Toll-Like-Rezeptor 4 (TLR4). Für die Arteriosklerose und das akute Koronarsyndrom konnte eine Konzentrationssteigerung von TLR4 nachgewiesen werden. (Methe, et al., 2005)

Ein exogener Ligand ist das bakterielle Protein LPS. Das Hitze-Schock-Protein 60¹⁹ (HSP-60) stellt einen endogenen Aktivator dar. (Benjamin, et al., 1998) Hitze-Schock-Proteine werden auf die Präsenz eines Stressfaktors hin produziert. Zu diesen Stimuli zählen die klassischen Risikofaktoren der koronaren Herzerkrankung. (Wick, et al., 2004) Die mitochondrialen Proteine lassen sich nach dem Einfluss von Stressoren, auf der Oberfläche von Endothelzellen und glatten Muskelzellen finden. (Xu, et al., 1994) Ihr

¹⁹ Hitze-Schock-Protein 60: Eine Proteinfamilie, die inkorrekt Proteinfaltungen und Aggregationen und der damit einhergehenden Fehlfunktionen verhindern (Chaperon-Funktion). (Benjamin, et al., 1998)

Auftreten scheint besonders in den frühen Läsionen der arteriosklerotischen Gefäßwandveränderungen von Bedeutung zu sein. (Wick, et al., 2004) Über den Mechanismus HSP60/TLR4 scheinen initiale Ereignisse der Plaquebildung möglich zu sein. (Methe, et al., 2005) Diese Beobachtungen suggerieren das frühe Vorhandensein von CD14^{hi}CD16^{lo} und CD14^{hi}CD16^{hi} Monozyten und somit eine Beteiligung an den initialen Prozessen der Plaqueformation. Der Zeitraum der Plaqueentstehung kann durch die Methodik der durchgeführten Studie nicht abgebildet werden. Hier wäre eine Verlaufsbeobachtung, der zum Zeitpunkt der Probenentnahme als gesund definierten Probanden interessant. Dies wäre unter der Fragestellung zu betrachten, ob sich bei gesunden Personen mit erhöhten Monozytenkonzentrationen der Subpopulationen klassisch und intermediär früher oder häufiger eine koronare Herzerkrankung manifestiert.

Eine Genexpressions-Vergleichsanalyse zwischen humanen und murinen Monozyten, zeigte, dass humane CD14^{lo}CD16^{hi} Monozyten am ehesten eine Kontrollfunktion ausführen, indem sie ähnlich den residenten Monozyten entlang der inneren Gefäßwand patrouillieren. Ihre Aktivierung erfolgt nicht, wie bei den anderen Monozytenpopulationen über LPS, sondern maßgeblich über virale Bestandteile und Nukleidsäuren. Durch TLR7 und 8 aktivierte Monozyten, produzierten vornehmlich TNF α , IL1 β und CCL3. In Kontrast zu den CD14⁺⁺ Populationen waren sie weniger an phagozytierenden Prozessen und der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies beteiligt. (Cros, et al., 2010) Zawada et al. konnte die höchste Expressionsdichte an Adhäsionsmolekülen auf den nicht-klassischen Monozyten nachweisen. Mit Hilfe einer Genexpressionsanalyse (SuperSAGE) und FACS Messungen, zeigte sich eine besonders hohe Konzentration an Integrin α L (ITGAL, CD11a), dem Integrin-assoziierten-Protein CD47, Sialophorin (SPN, CD43, Ligand von ICAM1) und PECAM1 (CD31; platelet endothelial cell adhesion molecule). (Zawada, et al., 2011) Diese Rezeptoren vermitteln sowohl Adhäsion als auch Migration der Leukozyten. (Imhof, et al., 2004) Diese Erkenntnisse stützen maßgeblich die These der patrouillierenden Monozyten.

Die Monozyten scheinen allerdings keine unabhängigen Subgruppen zu bilden, sondern entwickeln sich aus klassischen Monozyten je nach Umgebungsfaktoren zu CD16^{pos} Subpopulationen. So beschrieb Patel 2017 eine sequentielle Transition von klassischen

zu intermediären und nicht-klassischen Monozyten. Ausgelöst wird diese Transition durch inflammatorische Prozesse. (Patel, et al., 2017)

Die dargestellten phänotypischen Marker und die Zytokinexpressionsmuster lassen Rückschlüsse auf die Funktion der einzelnen Populationen der phagozytierenden mononukleären Zellen zu. Außerdem suggerieren die unterschiedlichen Migrationsmechanismen verschiedene Aufgabenbereiche der einzelnen Monozytensubpopulationen. Die Charakterisierung der reparativen Monozyten, als patrouillierende Population, die vor allem kontrollierende und überwachende Aufgaben wahrnimmt, passt zu den Beobachtungen, dass deren prozentualer Anteil in gesunden Probanden und Patienten mit asymptomatisch fortschreitender Krankheitsaktivität signifikant am höchsten sind. Gleichfalls stellen sich die intermediären Monozyten in unseren Ergebnissen, mit einer deutlichen Beteiligung in der Unterhaltung sowie Exazerbation der koronaren Herzerkrankung dar. Auch dieses Ergebnis wäre mit den hohen proinflammatorischen Potenzialen dieser Subpopulation vereinbar. Auch die Aussagen, die bezüglich des Auftretens der inflammatorischen Monozytensubpopulation getroffen werden konnten, stehen nicht im Kontrast zu dem aktuellen Wissensstand über die funktionellen Eigenschaften der CD14^{hi}CD16^{lo} Monozyten.

Zahlreiche Studien beschäftigten sich bereits mit der Fragestellung nach einer Korrelation zwischen dem Auftreten der verschiedenen Monozytensubpopulationen und der Entwicklung einer arteriosklerotischen Erkrankung. Die ersten Untersuchungen in diesem Themengebiet gingen dieser Fragestellung mit der Kenntnis von nur zwei unterschiedlichen Populationen nach. (Passlick, et al., 1989) (Swirski, et al., 2009) (Geissmann, et al., 2003) Nachdem innerhalb der CD16⁺-Population eine weitere Heterogenität festgestellt wurde, erfolgten zunächst mehrere Querschnittsstudien. (Rogacev, et al., 2012)

So zeigte Schlitt et al., dass die Anzahl an CD14⁺⁺CD16⁺-Monozyten bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöht war. Der intermediäre Typ wurde mit einer erhöhten Prävalenz der KHK assoziiert. (Schlitt, et al., 2004) Weiter wurden CD16 positive mononukleäre Phagozyten mit einer gesteigerten Plaquivulnerabilität bei Patienten mit stabiler Angina pectoris in Zusammenhang gebracht. (Kashiwagi, et al., 2010) In einer Querschnittsstudie bei Patienten mit einer

instabilen Angina pectoris wurde mit Hilfe der optischen Kohärenztomographie die Plaquedicke bestimmt und im Zusammenhang mit durchflusszytometrisch gemessenen Monozytenanzahlen betrachtet. Die Ergebnisse sprachen ebenfalls für eine erhöhte Plaqueinstabilität, bei Vorhandensein einer hohen Anzahl an CD14⁺CD16⁺CX₃CR1-Zellen. (Imanishi, et al., 2010) Eine prospektive Kohortenstudie mit nicht dialysepflichtigen CKD (Chronical Kidney Disease)-Patienten beschrieb einen unabhängigen Stellenwert der CD14⁺⁺CD16⁺ Monozyten, bei dem Vorkommen kardiovaskulärer Ereignisse. Die Studienergebnisse unterstützten die These, dass CD16⁺ Monozyten eher im Zusammenhang mit arteriosklerotischen Veränderungen stehen als CD16⁻ Monozyten. (Rogacev, et al., 2011)

Die Assoziation zwischen einem vermehrten Auftreten intermediärer Monozyten im Serum und der Präsenz von vulnerablen Plaques wurde in den letzten Jahren weiter mit differenziellen Verfahren untersucht. In der Arbeit von Zhuang et al. wurden Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom bezüglich des Vorhandenseins von Monozytensubpopulationen untersucht. Es konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein vulnerabler Plaques, nachgewiesen durch optische Kohärenztomographie (OCT) in Koronarangiographischen Untersuchungen, und dem Auftreten intermediärer Monozyten in der Blutstrombahn aufgezeigt werden. (Zhuang, et al., 2017)

Dieser Zusammenhang bestätigte sich ebenfalls in einer 2017 publizierten Querschnittstudie. Hier wurden mittels virtueller Histologie bei intravaskulären Ultraschalluntersuchungen (VH-IVUS) Plaques mit nekrotischem Kern und vulnerable Plaques (thin-cap fibroatheroma) detektiert. Die zusätzlich durchgeführte durchflusszytemetrische Untersuchung ergab eine signifikante Korrelation zwischen dem Auftreten der zuvor dokumentierten Plaques und dem Vorhandensein intermediärer Monozytensubpopulationen. Die Studie betrachtete den Zusammenhang vor dem Hintergrund diabetischer vs. nicht-diabetischer Patienten. (Yoshida, et al., 2017)

Die starke Korrelation zwischen Plaqueinstabilität und vermehrten Vorkommen an Intermediär-Monozyten, lässt sich sehr gut mit den Ergebnissen erhöhter CD14^{hi}CD16^{hi} Konzentrationen bei Patienten mit akutem Ereignis in dieser Studie vereinbaren. So könnte sich die Plaqueinstabilität klinisch in akuten Myokardinfarkten manifestieren.

2012 veröffentlichten Ozaki et al. die Ergebnisse einer Kohortenstudien, in der 125 Patienten anhand ihrer koronarangiographischen Ergebnisse in drei Gruppen unterteilt wurden. Patienten ohne nachweisbare KHK, Patienten mit einer Eingefäß-KHK und solche mit einer Dreigefäß-KHK. Es zeigte sich ein quantitativ höherer Wert für CD14⁺CD16⁺ Monozytensubpopulationen bei den Patienten mit einer Dreigefäß-KHK, im Vergleich zu den anderen beiden Kohorten. Es konnten Signifikanzen für eine unabhängige Beteiligung der CD16 positiven Monozyten an der Entstehung einer Dreigefäß-Krankung nachgewiesen werden. (Ozaki, et al., 2012)

Wie bereits weiter oben angedeutet, sind auch die Prozesse nach einem Infarkt direkt von einer orchestrierten Monozytenmobilisation abhängig. In Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass nach einem Myokardinfarkt gleichfalls zwei unterschiedliche Monozytensubpopulationen in das ischämische Gebiet rekrutiert werden. Ly6C^{hi}-Monozyten präsentierten sich früh nach dem initialen Ereignis und trugen durch Phagozytose und Proteolyse zum Abbau des geschädigten Myokards bei. Ly6C^{lo}-Monozyten hingegen schienen erst im Verlauf ihre Funktion in den ischämischen Myokardbereichen anzutreten. Sie triggerten Myofibroblasten Rekrutierungen und die Synthese sowie Einbau von Kollagenfasern. Außerdem produzierten sie den Wachstumsfaktor VEGF und den dazugehörigen Tyrosin Kinase Rezeptor 2 (TIE2), der angiogenetisch wirkt. (Nahrendorf, et al., 2007) Die Zusammenschau der Monozytenfunktionen rückt die mononukleären Zellen in die Position einer Schlüsselrolle der Infarktheilung. (Nahrendorf, et al., 2010) Für die myokardiale Heilung ist die gut koordinierte biphasische Monozytenrekrutierung von großer Bedeutung. (Nahrendorf, et al., 2010)

2009 veröffentlichten Tsuijoka et al. Ergebnisse über das Verhalten und die Funktion von Monozyten nach einem akuten ischämischen kardialen Infarkt bei Patienten. 36 Patienten wurden über zwei Wochen nach einem akuten Myokardinfarkt hinsichtlich zirkulierender Monozytenmengen untersucht. Es zeigte sich ein simultaner biphasischer Monozytenverlauf. Das Anzahlmaximum der inflammatorischen Monozyten war bei 2,6 Tagen messbar und ein Maximum der CD16⁺ Monozyten lag bei 4,8 Tagen. (Tsuijoka, et al., 2009) Darüber hinaus lieferte diese Arbeit Hinweise auf einen Zusammenhang

zwischen erhöhten Leveln der inflammatorischen Monozyten zum Zeitpunkt des Infarktes und einer gesteigerten Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung einer postischämischen Herzinsuffizienz. Die Spitzenwerte der CD14⁺CD16⁻ Monozyten wurden mit einer beeinträchtigten Myokardheilung assoziiert und gleichfalls scheint das linksventrikuläre Remodelling ungünstig beeinflusst zu werden. (Tsujioka, et al., 2009)

Aufgrund des Blutabnahmezeitpunktes ist auf Grundlage der hier ermittelten Daten eine Aussage bezüglich des Monozytenvorkommens zum Zeitpunkt kurz nach dem Myokardinfarkt, das heißt im initialen Heilungsprozess, nicht möglich.

Der Idee immunologische Biomarker in der Diagnostik der KHK einzuführen gingen bereits 2001 Schonbeck et al. in einer Studie über die Aussagekraft des sCD40L (solubler CD40 Ligand) hinsichtlich des kardiovaskulären Risikos bei Frauen nach. Mit einer prospektiven Fall-Kontroll-Studie konnten sie eine positive Korrelation zwischen erhöhten Plasmaleveln des sCD14L und dem Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse aufzeigen. (Schönbeck, et al., 2001) In einer weiteren Querschnittsstudie deutete sich das CD-Molekül ebenfalls als Marker für ein erhöhtes Risiko kardiovaskulärer Ereignisse bei Patienten mit einer instabilen Angina pectoris an. (Heeschen, et al., 2003)

Wenn man davon ausgeht, dass das Auftreten der inflammatorischen und intermediären Monozytensubpopulationen mit einer erhöhten Plaqueinstabilität einhergeht und dem Zuzufolge ein erhöhtes Risiko akuter Ereignisse birgt, wäre die Messung dieser Monozytensubpopulationen als Prädiktor eines akuten koronaren Syndroms denkbar. Allerdings steht dem gegenüber, dass Monozyten als alleiniger Messparameter durch zahlreiche weitere Umstände beeinflusst werden. Folglich würde es sich um einen unabhängigen Parameter mit sehr geringer Spezifität handeln.

Alternativ könnten Messungen intermediärer Monozyten in bereits bestehende Risiko-Scores eingehen und diese damit stärken. So zum Beispiel als ergänzendes Merkmal in dem Framingham Risk Score als Prädiktor schwerer koronarer Stenosen und ausgedehnte Plaques in asymptomatischen Individuen. (Lo, et al., 2017)

Des Weiteren bietet das Wissen um die Korrespondenz definierter Monozytensubpopulationen nach einem Myokardinfarkt in geschädigtem Gewebe, die Möglichkeit das betroffene Myokard darzustellen und gezielt immunmodulatorisch zu therapieren, um so zum Beispiel ischämischen Kardiomyopathien vorzubeugen. Die

Arbeitsgruppe um Heo et al. detektierte mittels Positronemissions Tomographie (PET) CCR2+ Zellen in geschädigtem Myokardgewebe. So könnten bestimmte Patienten identifiziert werden, die von einer immunmodulatorischen Therapie profitieren würden. (Heo, et al., 2019)

Mit Canakinumab gibt es bereits einen Antikörper gegen IL-1 β welcher in der CANTOS Studie eine signifikante Reduktion wiederkehrender kardiovaskulärer Ereignisse erwirkt hat. Die Einschlusskriterien umfassten einen vorausgegangenen Myokardinfarkt mit einhergehendem erhöhten hsCRP Level >2 mg/l. Endpunkte der Studie waren nichttödliche Myokardinfarkte, nichttödliche cerebrale Schlaganfälle und kardiovaskular-bedingte Todesfolge. Die randomisierte, doppelt-blind und Placebo-kontrollierte Studie von P. M. Ridker et al. wurde im September 2017 veröffentlicht. (Ridker, et al., 2017)

Obgleich viele Zusammenhänge zwischen dem Vorhandensein von zirkulierenden Monozyten und der Entwicklung arteriosklerotischer Veränderungen festgestellt wurden, fehlen noch detailliertere Erkenntnisse über die individuellen Funktionen der Subpopulationen in der Entwicklung der koronaren Herzerkrankung.

Die zentrale Rolle der Monozyten innerhalb der inflammatorischen Genese der koronaren Herzerkrankung bietet eine Chance neuer gezielter Therapiemöglichkeiten. Wenn gleich zu beachten ist, dass Monozyten viele bedeutende systemische Funktionen verfolgen und damit eine breite medikamentöse Therapie zum jetzigen Zeitpunkt ausgeschlossen scheint.

Zusammenfassend besteht nachweislich ein Zusammenhang zwischen dem erhöhten Auftreten definierter Monozytensubpopulationen und den unterschiedlichen Stadien einer koronaren Herzkrankheit. So können erhöhte Level an intermediären Monozyten prospektiv Hinweise auf akute ischämische Ereignisse geben. Hohe Messwerte an nicht-klassischen Monozyten sprechen eher für ein ruhendes chronisches Stadium der KHK. Diese Erkenntnisse bieten eine Chance für eine verbesserte Diagnostik und eventuell Ansatzpunkte in einer primären Prävention beziehungsweise einer effizienten Therapie der KHK.

ZUSAMMENFASSUNG

Die koronare Herzerkrankung ist eine Erkrankung von weltweiter Bedeutung. Die Inflammation sowie die zentrale Rolle der Monozyten sind seit Jahren Inhalt wissenschaftlicher Studien zum besseren Verständnis der arteriosklerotischen Pathogenese.

Ziel der durchgeführten Untersuchung war daher der Nachweis einer differenziellen Monozytenverteilung in Patienten mit koronarer Herzerkrankung im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden. Zur Erreichung dieses Ziels wurde eine Kohortenstudie mit drei Patientenkohorten, definiert nach der Krankheitsaktivität zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses und einer Kontrollkohorte aus kardial nicht vorerkrankten Probanden, durchgeführt. Die Krankheitsaktivität war definiert nach:

1. Akutes Ereignis (Kohorte: Myokardinfarkt MI)
2. Chronische KHK, ohne akutes Ereignis in den letzten sechs Monaten (Kohorte: Chronical artery disease = CAD)
3. Chronische KHK, mit akut auftretendem Ereignis (Kohorte: CAD-MI)
4. Kontroll-Kohorte

Es erfolgte die durchflusszytometrische Analyse von Leukozyten, die aus Vollblutproben isoliert wurden. Dieses Verfahren ermöglichte sowohl die exakte Differenzierung sowie die Quantifizierung der gesuchten Monozytensubpopulationen. Die erhaltenen Messdaten der einzelnen Kohorten wurden in statistischen Verfahren ausgewertet.

Die Ergebnisse der Untersuchungen ergaben signifikant höhere Vorkommen von inflammatorischen Monozyten bei Patienten mit akuten koronaren Ereignissen ($p_{CAD} < 0,01$). Die intermediären Monozyten waren bei allen Patientengruppen gegenüber der Kontrollkohorte erhöht ($p_{MI} < 0,05$, $p_{CAD} < 0,05$, $p_{CAD-MI} < 0,01$). Die Ergebnisse lassen sich mit bisher durchgeführten Studien, im Bezug zu der Fragestellung Monozytenvorkommen und Funktion bei Patienten mit KHK vereinbaren. Auch in der dritten Subpopulation ($CD14^{lo}CD16^{hi}$), den reparativen Monozyten konnten signifikant höhere Monozytenvorkommen für die Kontrollgruppe ($p < 0,05$) sowie für die Patientengruppe CAD ($p < 0,001$) gegenüber den Patienten mit akuten Myokardinfarkten nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis spricht für ein eventuelles Verdrängen der

reparativen Monozyten durch die Monozytenpopulationen, die in Zusammenhang mit einer aktiven KHK und den klinischen akuten Ereignissen stehen könnten.

Der Nachweis eines differenziellen monozytären Verteilungsmusters bei Patienten mit unterschiedlichen Krankheitsaktivitäten kann weitere Studien zur Untersuchung in Frage kommender Biomarker zu Frühdiagnostik oder neuer immunmodulatorischer Therapien unterstützen.

SUMMARY

Coronary artery disease is a disease of global significance. Inflammation as well as the central role of monocytes have been content of scientific studies for years for better understanding atherosclerotic pathogenesis.

The aim of this study was the detection of different monocyte subpopulations in patients with coronary artery disease versus healthy controls. For achieving this goal a study was conducted with three patient cohorts, defined by disease activity at the time of study inclusion and one control group without any cardiac preconditions. The disease activity was defined as:

1. Acute event (Acute myocardial infarction, group MI)
2. Chronic coronary artery disease without any acute event in the last six months (group CAD)
3. Chronic coronary artery disease with an acute event (group CAD-MI)
4. Control group

In all patients, flow cytometric examinations of leucocytes were carried out, which were isolated from blood samples. This process enabled both the exact differentiation and the quantification of the ($p < 0,05$) required monocyte subpopulations. The measured data obtained from each cohort were evaluated with standard statistical methods.

The results of the study showed significantly higher presence of inflammatory monocytes in patients with acute coronary events ($p_{CAD} < 0,01$). The intermediate monocytes were increased in all patient groups compared to the control cohort ($p_{MI} < 0,05$, $p_{CAD} < 0,05$, $p_{CAD-MI} < 0,01$). The results are compatible with current studies published in literature, examining the question of monocyte presence and function in patients with CAD. In a third subpopulation ($CD14^{lo}CD16^{hi}$) significantly higher monocyte deposits were also detected for the control group ($p < 0,05$) as well as for the patient group CAD ($p < 0,001$) compared to patients with acute myocardial infarctions. This result suggests that the reparative monocytes may be displaced by other monocyte subpopulations, which could be related to an active CAD and clinical acute events. The evidence of various monocytic distribution patterns in patients with different disease activities may support further

studies investigating eligible biomarkers for early diagnosis or new immunomodulatory therapy.

LITERATURVERZEICHNIS

(LSRII) BD Bioscience BD LSR II: The most flexible flow cytometer available [Online]. - BD Bioscience. - 3. August 2019. - <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=17868>.

Abbas A. K., Lichtman A. H. und Pillai S. Cellular and Molekular Immunology, 7. Ed. [Buch]. - Philadelphia, USA : Elsevier Saunders, 2012.

Ancuta P. [et al.] Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes [Artikel] // The Journal of Experimental Medicine. - New York, USA : The Rockefeller University Press, 16. Jun 2003.

Ancuta P. [et al.] Fraktaline preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes [Artikel] // The Journal of Experimental Medicine. - [s.l.] : The Rockefeller University Press, 2003. - JEM vol. 197 no. 12 1701-1707.

APC BD Pharmingen Technical Data Sheet, Mat.-Nr. 555399. APC Mouse IgG2ak Isotype Control [Bericht]. - [s.l.] : BD Pharmingen.

Auffray C. [et al.] Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior [Artikel] // Science. - [s.l.] : American Association for the Advancement of Science, 3. Aug 2007. - 317(5838):666-70.

Behrends J., Bischofberger J. und Deutzmann R. Duale Reihe Physiologie, 2. Auflage [Buchabschnitt]. - Stuttgart : Thieme, 2012. - Bde. doi:10.1055/b-002-23567.

Belge K. U. [et al.] The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF [Artikel] // The Journal of Immunology. - [s.l.] : The American Association of Immunologists, 1. April 2002. - 168(7):3536-42.

Benjamin I. J. und McMillan D. R. Stress (heat shock) proteins- Molecular chaperones in cardiovascular biology and disease [Artikel] // Circulation Research. - 1998. - PubMed ID: 9686751.

Bickel M. The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation [Artikel] // Journal of Periodontology. - May 1993. - 64(5Suppl):456-60.

Bioscience BD Fluorochrome/ Laser Reference Poster [Online] // <https://wwwbdbiosciences.com>. - Bd Bioscience, 2015. - 11. Okt. 2018. - https://wwwbdbiosciences.com/documents/multicolor_fluorochrome_laser_chart.pdf.

Boström K. [et al.] Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerosis lesions [Artikel] // The Journal of Clinical Investigation. - [s.l.] : American Society for Clinical Investigation, Apr 1993.

Coleman W. B. und Tsongalis G. J. Molecular Pathology [Buch]. - USA : Elsevier, 2009.

Combadière C. [et al.] Combined inhibition of CCL2, CX3CR1, and CCR5 abrogates Ly6C(hi) and Ly6C(lo) monocytoxis and almost abolishes atherosclerosis in hypercholesterolemic mice [Artikel] // *Circulation*. - Dallas : American Heart Association, 1. Apr 2008. - 117(13):1649-57.

Costa C. [et al.] Enhanced monocyte migration to CXCR3 and CCR5 chemokines in COPD [Artikel] // *European Respiratory Journal*. - Sheffield, UK : European Respiratory Society, 10. März 2016. - 47.

Cros J. [et al.] Human CD14^{dim} monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors [Artikel] // *Immunity*. - [s.l.] : Elsevier, 24. Sep. 2010. - 33. - S. 289-291.

Deutsche Herzstiftung e.V. Deutscher Herzbericht 2016 [Bericht]. - Frankfurt am Main : [s.n.], 2016.

Fingerle G. [et al.] The novel subset of CD14⁺/CD16⁺ blood monocytes is expanded in sepsis patients [Artikel] // *Blood*. - Washington DC, USA : The American Society of Hematology, 15. Nov 1993. - 82(10):3170-6.

FITC BD Pharmingen Technical Data Sheet, Mat.-Nr. 555560. FITC Mouse IgG1, k Isotype Control. - [s.l.] : BD Pharmingen.

Göswald A. [et al.] Prävalenz von Herzinfarkt und koronarer Herzerkrankheit bei Erwachsenen im Alter von 40 bis 79 Jahren in Deutschland- Ergebnisse der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1). - Berlin : Springer Verlag, 2013.

Geissmann F., Jung S. und Littman D. R. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties [Artikel] // *Immunity*. - [s.l.] : Elsevier, Jul 2003. - 19(1):71-82.

Gerrity R. G. The role of the monocyte in atherosclerosis: II. Migration of foam cells from atherosclerotic lesions [Artikel] // *American Journal of Pathology*. - [s.l.] : American Society for Investigative Pathology, Elsevier, May 1981. - 103(2):191-200.

Guder W. G. und Nolte J. Das Laborbuch- für Klinik und Praxis [Buch]. - [s.l.] : Urban & Fischer Verlag, Elsevier GmbH, 2009.

Hansson G. K. und Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword [Artikel] // *Nature Reviews Immunology*. - [s.l.] : Springer Nature Publishing AG, 16. Jun 2006. - 6:508-519(2006).

Heeschen C. [et al.] Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes, CAPTURE Study [Artikel] // *New England Journal of Medicine*. - 2003. - N Engl J Med. 2003 Mar 20;348(12):1104-11.

Heimbeck I. [et al.] Standardized single-platform assay for human monocyte subpopulations: Lower CD14⁺CD16⁺⁺ monocytes in females [Artikel] // *Cytometry Part A*. - [s.l.] : Wiley Online Library, Sep 2010. - 77(9):823-30.

Heinrich P. C. [et al.] Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation [Artikel] // *Biochemical Journal*. - [s.l.] : Portland Press, 2003.

Heitbrock L. Ziegler-, Ancuta P. und Crowe S. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood [Artikel] // Blood. - Washington DC, USA : The American Society of Hematology, 21. Okt 2010. - 116.

Henson P. M., Bratton D. L. und Fadok V. A. Apoptotic cell removal [Artikel] // Current Biology. - [s.l.] : Elsevier, 2. Oct 2001. - 11(19):R795-805.

Heo Gyu Seong [et al.] Molecular Imaging visualizes recruitment of inflammatory monocytes and macrophages to the injured heart [Artikel] // Circulation Research. - 21. Jan 2019.

Herold Gerd und Mitarbeiter Innere Medizin [Buch] / Hrsg. Herold Gerd. - Köln : [s.n.], 2016.

Huo Y., Hafezi-Moghadam A. und Ley K. Role of vascular cell adhesion molecule-1 and fibronectin connecting segment-1 in monocyte rolling and adhesion on early atherosclerotic lesions [Artikel] // Circulation Research. - [s.l.] : American Heart association, 21. Jul 2000. - 87(2):153-9.

Idzkowska E. [et al.] The role of different monocyte subsets in the pathogenesis of atherosclerosis and acute coronary syndroms [Artikel] // Scandinavian Journal of Immunology. - [s.l.] : Wiley, Jan 2015. - S. 163-173.

Imanishi T. [et al.] Association of monocyte subsets counts with coronary fibrous cap thickness in patients with unstable angina pectoris [Artikel] // Atherosclerosis. - [s.l.] : Elsevier, Okt 2010. - Oct;212(2):628-35.

Imhof B. A. und Aurrand-Lions M. Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes [Artikel] // Nature Reviews Immunology. - [s.l.] : Springer Nature Publishing AG , 1. Jun 2004. - 4;432-444.

Kapuscinski J. DAPI: A DNA-Specific fluorescent probe [Artikel] // Biotechnic and Histochemistry. - UK : Taylor & Francis, 1995. - Vol 70. - S. 220-233.

Kashiwagi M. [et al.] Association of monocyte subsets with vulnerability characteristics of coronary plaques as assessed by 64-slice multidetector computed tomography in patients with stable angina pectoris [Artikel] // Atherosclerosis. - [s.l.] : Elsevier, Sep 2010. - Sep;212(1):171-6.

Kunjathoor V. V. [et al.] Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages [Artikel] // The Journal of Biological Chemistry. - [s.l.] : American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 20. Dec 2002. - 277(51):49982-8.

Löwel H., Döring A. und Schneider A. The MONICA/ KORA Augsburg Surveys- Basis for prospective cohort studies [Artikel] // Gesundheitswesen 2005. - Stuttgart- New York : Thieme Verlag KG, 2005. - Bd. Sonderheft 1 .

Löwel Hannelore Gesundheitsberichtserstattung des Bundes- Koronare Herzkrankheit und akuter Myokardinfarkt [Bericht] / Robert Koch Institut. - 2006.

Lüllmann-Rauch Renate Taschenlehrbuch Histologie [Buch]. - Stuttgart : Thieme, 2015.

Laudanna C. [et al.] Rapid leukocyte integrin activation by chemokines [Artikel] // Immunological Reviews. - [s.l.] : Wiley-Blackwell, 2002. - 186. - S. 37-46.

Lenart M. [et al.] The loss of CD16 B73.1/Leu11c epitope occurring in some primary immunodeficiency disease is not associated with the FcγRIIIa-48L/R/H polymorphism. [Artikel] // International Journal of Molecular Medicine. - Athen, Griechenland : Spandidos Publications, Sep 2010. - 26(3):435-42.

Leonhart R. Lehrbuch Statistik- Einstieg und Vertiefung, 3. Aufl. [Buch]. - Bern, Schweiz : Hogrefe AG, 2013. - Bde. 978-3-456-85258-4.

Ley K. [et al.] Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated [Artikel] // Nature Reviews Immunology. - [s.l.] : Springer Nature Publishing AG , 7. Sep 2007. - S. 678-689.

Ley K., Miller Y. I. und Hedrick C. C. Monocyte and macrophage dynamics during atherogenesis [Artikel] // Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology. - Dallas, USA : Lippincott Williams & Wilkins, Jul 2011. - 31(7):1506-16.

Libby P. und Hansson G. K. Involvement of the immune system in human atherogenesis: current knowledge and unanswered questions [Artikel] // Laboratory Investigation. - [s.l.] : Springer Nature Publishing AG, Jan 1991. - 1991 Jan;64(1):5-15.

Lo Shyh-Chyi [et al.] Intermediate CD14⁺⁺CD16⁺ monocyte predicts severe coronary stenosis and extensive plaque involvement in asymptomatic individuals [Artikel] // The International Journal of Cardiovascular Imaging . - [s.l.] : Springer, 26. Feb 2017. - 33:1223-1236.

Male D. [et al.] Immunology 7. s.l. [Buch]. - Philadelphia, USA : Mosby Elsevier, 2006.

Melamed M. R., Lindmo T. und Mendelsohn M. L. Flow Cytometry and Sorting, 2nd ed. [Buch]. - New York, USA : Wiley-Liss, 1991.

Methé H. [et al.] Expansion of circulating Toll-like receptor 4-positive monocytes in patients with acute coronary syndrome [Artikel] // Circulation. - [s.l.] : American Heart Association, May 2005. - 111(20):2654-61.

Murphy K. M., Travers P. und Walport M. Janeway Immunologie 7. Auflage [Buch]. - Berlin, Heidelberg : Springer Verlag , 2014.

Nöthen Manuela und Böhm Karin Krankheitskosten [Artikel] // Gesundheitsberichterstattung des Bundes. - Berlin : Robert Koch Institut, 2009. - Bd. Heft 48.

Nahrendorf M. [et al.] The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary function [Artikel] // Journal of Experimental Medicine. - New York, USA : The Rockefeller University, 2007.

Nahrendorf M., Pittet M. J. und Swirski F. K. Monocytes: Protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction [Artikel] // *Circulation*. - [s.l.] : American Heart Association, 2010. - 2010;121:2437-2445.

Nizzoli G. [et al.] IL-10 promotes homeostatic proliferation of human CD8+ memory T cells and, when produced by CD1c+ DCs, shapes naive CD8+ T-cell priming. [Artikel] // *European Journal of Immunology*. - Weinheim : Wiley Verlag GmbH & Co. KG, 30. April 2016.

Ozaki Y. [et al.] Circulating CD14+CD16+ monocyte subsets as biomarkers of the severity of coronary artery disease in patients with stable angina pectoris [Artikel] // *Circulation Journal*. - [s.l.] : Japanese Circulation Society , 2012. - *Circ.J.* 2012;76(10):2412-8.

Passlick B., Flieger D. und Ziegler-Heitbrock H. W. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood [Artikel] // *Blood*. - Washington DC, USA : The American Society of Hematology, 15. Nov 1989. - 74. - S. 2527-2534.

Patel A. A. [et al.] The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation [Artikel] // *The Journal of Experimental Medicine*. - [s.l.] : The Rockefeller University, 3. Jul 2017. - 214(7):1913-1923 : Bd. doi: 10.1084/jem.20170355.

Paulson K. E. [et al.] Resident intimal dendritic cells accumulate lipid and contribute to the initiation of atherosclerosis [Artikel] // *Circulation Research*. - [s.l.] : American Heart Association, 5. Feb 2010. - 106(2):383-90.

PE1 BD Pharmingen Technical Data Sheet, Mat.-Nr.: 555327, PE Mouse IgG1, k Isotype Control. - [s.l.] : BD Pharmingen.

PE2 BD Pharmingen Technical Data Sheet, Mat.-Nr.: 557991, NCR1. PE Mouse IgG1, k Isotype control. - [s.l.] : BD Pharmingen.

PE3 BD Pharmingen Technical Data Sheet, Mat.-Nr.: 556647. PE Mouse IgG1, k Isotype control. - [s.l.] : BD Pharmingen.

PE4 BD Pharmingen Technical Data Sheet, Mat.-Nr.: 555413. PE Mouse IgG1, k Isotype control. - [s.l.] : BD Pharmingen TM.

PE5 BD Pharmingen Technical Data Sheet, Mat.-Nr.: 555402. PE Mouse IgM, k Isotype control. - [s.l.] : BD Pharmingen TM .

PE-Cy7 BD Pharmingen Technical Data Sheet, Mat.-Nr.: 557744. PE-Cy7TM7 Mouse IgG1, k Isotype control. - [s.l.] : BD Pharmingen TM .

Ramos C. L. [et al.] Direct demonstration of P-selectin- and VCAM-1-dependent mononuclear cell rolling in early atherosclerotic lesions of apolipoprotein E-deficient mice [Artikel] // *Circulation Research*. - [s.l.] : American Heart Association, 11. Jun 1999. - 84(11):1237-44.

Richardson M. [et al.] Increased expression in vivo of VCAM-1 and E-selectin by the aortic endothelium of normolipemic and hyperlipemic diabetic rabbits [Artikel] // *Arteriosclerosis*,

Thrombosis and Vascular Biology. - Dallas, USA : American Heart Association, May 1994. - 14(5):760-9.

Ridker P. M. [et al.] Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease [Artikel] // New England Journal of Medicine. - 21. Sep 2017. - Vol. 377 No. 12. - S. 1119- 1131.

Ridker P. M. [et al.] Reduction in C-reactive protein and LDL cholesterol and cardiovascular event rates after initiation of rosuvastatin: a prospective study of the JUPITER- Trial [Artikel] // Lancet. - [s.l.] : Elsevier, 4. April 2009. - Bd. 373.

Ridker P. M., Wilson P. W. und Grundy S. M. Should C-reactive protein be added to metabolic syndrome and to assessment of global cardiovascular risk? [Artikel] // Circulation. - Dallas : American Heart Association, 2004. - 23 : Bd. 109.

Rogacev K. S. [et al.] CD14++CD16+ monocytes and cardiovascular outcome in patients with chronic kidney disease [Artikel] // European Heart Journal. - Oxford : Oxford University Press, Jan 2011. - Eur Heart J. 2011 Jan;32(1):84-92.

Rogacev K. S. [et al.] CD14++CD16+ monocytes independently predict cardiovascular events: a cohort study of 951 patients referred for elective coronary angiography [Artikel] // J Am Coll Cardiol.. - [s.l.] : Elsevier B. V., 16. Okt 2012. - 16;60(16):1512-20.

Rogacev K. S. [et al.] Immunosuppression and monocyte subsets [Artikel] // Nephrology Dialysis Transplantation. - Oxford, UK : Oxford University Press, Jan 2015. - 30(1):143-53.

Rogacev K. S. [et al.] Monocyte heterogeneity in obesity and subclinical atherosclerosis [Artikel] // European Heart Journal. - Oxford, UK : European Society of Cardiology, Oxford University Press, Feb 2010. - 31(3):369-76.

Ross R. und Glomset J. A. The pathogenesis of atherosclerosis (second of two parts) [Artikel] // New England Journal of Medicine. - Aug 1976. - 19;295(8):420-5.

Rossol M. [et al.] The CD14(bright)CD16+ monocyte subset is expanded in rheumatoid arthritis and promotes expansion of the Th17 cell population [Artikel] // Arthritis and Rheumatology. - Atlanta, USA : American College of Rheumatology, März 2012. - 64. - S. 671-677.

Sack U., Tärnok A. und Rothe G. Zelluläre Diagnostik. Grundlagen: Methoden und klinische Anwendung der Durchflusszytometrie [Buch]. - Basel : Karger, 2007.

Schönbeck U. [et al.] Soluble CD40L and cardiovascular risk in women [Artikel] // Circulation. - [s.l.] : American Heart Association, 6. Nov 2001. - Circulation Nov 6;104(19):2266-8.

Schlitt A. [et al.] CD14+CD16+ monocytes in coronary artery disease and their relationship to serum TNF-alpha levels [Artikel] // Journal of Thrombosis and Haemostatis . - 2004. - Thromb Haemost. 2004 Aug;92(2):419-24.

- Shantsila E. [et al.]** Monocyte subsets in coronary artery disease and their associations with markers of inflammation and fibrinolysis [Artikel] // *Atherosclerosis*. - Irland : Elsevier, 2014. - 234(2014)4e10.
- Shapiro und Howard M.** *Practical flow cytometry*, 4. Aufl. [Buch]. - Hoboken : Wiley-Liss, 2003.
- Sigma Aldrich** Product Information- DAPI. - Jun 2008.
- Silbernagel S. [et al.]** *Physiologie* 7. Auflage [Buch]. - Stuttgart : Georg Thieme Verlag, 2014.
- StackExchange** <http://stats.stackexchange.com/tags/dunn-test/info>. [Online]. - 2015. - 16. Mai 2016.
- Statistisches Bundesamt (Destatis)** Todesursachen in Deutschland 2015 [Online]. - 19. Januar 2017. - 29. August 2018. - https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen2120400157004.pdf?__blob=publicationFile.
- Statistisches Bundesamt** *Gesundheit in Deutschland- Gesundheitsberichterstattung des Bundes [Bericht]*. - Berlin : [s.n.], 2015.
- Suttorp N. Zeitz M., Dietel M.** *Harrisson Innere Medizin* [Buch]. - [s.l.] : ABW Wissenschaftsverlag , 2012. - Bd. 2 .
- Swirski F. K. [et al.]** Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites [Artikel] // *Science*. - [s.l.] : American Association for the Advancement of Science, 2009-2. - 31;325(5940):612-6.
- Swirski F. K. [et al.]** Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytosis and give rise to macrophages in atheromata [Artikel] // *Journal of Clinical Investigation*. - Michigan, USA : American Society of Clinical Investigation, 2007. - 117:195-205(2007).
- Swirski F. K., Weissleder R. und Pittet M. J.** Heterogeneous in vivo behavior of monocyte subsets in atherosclerosis [Artikel] // *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. - Dallas, USA : American Heart Association, Okt 2009. - 29(10):1424-32.
- Szaflarska A. [et al.]** Antitumor response of CD14+/CD16+ monocyte subpopulation [Artikel] // *Journal of Hematology, Stem Cell Biology and Transplantation*. - 2004. - j.exphem.2004.05.027.
- Tabas I.** Consequences and therapeutic implications of macrophage apoptosis in atherosclerosis: the importance of lesion stage and phagocytic efficiency [Artikel] // *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. - [s.l.] : Lippincott Williams & Wilkins Verlag , Nov 2005. - 25(11):2255-64.
- Tacke F. [et al.]** Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5 and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques [Artikel] // *The Journal of Clinical Investigation*. - [s.l.] : American Society for Clinical Investigation, Jan 2007. - 117. - S. 185-194.

Tsujioka H. [et al.] Impact of heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets on myocardial salvage in patients with primary acute myocardial infarction [Artikel] // Journal of the American College of Cardiology. - [s.l.] : Elsevier, 2009. - J. Am Coll Cardiol. 2009 Jul 7;54(2):130-8.

Ulrich C. [et al.] Increased expression of monocytic angiotensin-converting enzyme in dialysis patients with cardiovascular disease [Artikel] // Nephrology Dialysis Transplantation. - Oxford, UK : Oxford University Press, 13. Feb. 2006.

Uyemura K. [et al.] Cross-regulatory Roles of Interleukin (IL)-12 and IL-10 in Atherosclerosis [Artikel] // The Journal of Clinical Investigation. - [s.l.] : The American Society for Clinical Investigation, 1996.

Weber C., Zerneck A. und Libby P. The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models [Artikel] // Nature Reviews Immunology. - [s.l.] : Nature Publishing Group, 2008. - 8(10):802-15.

WHO The global burden of disease 2004 [Artikel] // Update. - Genf : [s.n.], 2008.

WHO(DALY) Global Health Estimates 2016 Summary tables: Global DALYs by cause, age and sex, 2000-2016 [Online]. - 2018. - 29. August 2018. - www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates/en/index1.html.

WHO(YLL) Global Health Estimates 2016 Summary tables: YLL by cause, age and sex, by WHO region, 2000-2016 [Online]. - Juni 2018. - 29. August 2018. - www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates/en/index1.html.

Wick G., Knoflach M. und Xu Q. Autoimmune and inflammatory mechanisms in atherosclerosis [Artikel] // Annual Review of Immunology. - 2004. - Annu Rev Immunol. 2004;22:361-403.

Witztum J. L. You are right too! [Artikel] // The Journal of Clinical Investigation. - [s.l.] : American Society for Clinical Investigation, Aug 2005. - 115(8):2072-5.

World Health Organization [Buch]. - Geneva : [s.n.], 2018.

Xu Q. B. [et al.] Surface staining and cytotoxic activity of heat-shock protein 60 antibody in stressed aortic endothelial cells [Artikel] // Circulation Research. - Dec 1994. - CircRes.1994Dec;75(6):1078-85.

Yoshida N. [et al.] Impact of CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes on plaque vulnerability in diabetic and non-diabetic patients with asymptomatic coronary artery disease: a cross-sectional study [Artikel] // BioMed Central. - 8. Aug 2017. - DOI 10.1186/s12933-017-0577-8.

Zawada A. M. [et al.] Monocyte heterogeneity in human cardiovascular disease [Artikel] // Immunobiology. - [s.l.] : Elsevier, Dec 2012. - 217(12):1273-84.

Zawada A. M. [et al.] SuperSAGE evidence for CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes as a third monocyte subset [Artikel] // Blood. - Washington DC, USA : The American Society of Hematology, 22. Sep. 2011. - 118. - S. e50-e60.

Zhuang J. [et al.] Comparison of circulating dendritic cell and monocyte subsets at different stages of atherosclerosis: insights from optical coherence tomography. [Artikel]. - [s.l.] : BMC Cardiovascular Disorders, Oct 2017. - 18. doi:10.1186/s12872-017-0702-3.

VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER

Meine akademischen Lehrer waren:

Adamkiewicz, Aumüller, Bartsch, Bauer, Baum, Basler, Becker, Behr, Cetin, Czubayko, Daut, Dietrich, Dodel, Donner-Banzhoff, Feuser, Fuchs-Winkelmann, Garten, Gress, Grosse, Grundmann, Grzeschik, Hertl, Heverhagen, Hofer, Hofmann, Hoyer, Kann, Kill, Kinscherf, Kircher, Klose, Koch, Köhler, Koolman, Kruse, Lill, Lohoff, Mahnken, Maier, Maisch, Maisner, Moll, Moosdorf, Mueller, Mutters, Neff, Neubauer, Neumüller, Nimsky, Oertel, Oliver, Pagenstecher, Peterlein, Plant, Renz, Richter, Riera Knorrenschild, Riße, Roelcke, Ruchholtz, Schäfer, Schieffer, Schneider, Schütz, Schultz, Sekundo, Steiniger, Vogelmeier, Wagner, Weihe, Werner, Westermann, Wrocklage, Wulf

DANKSAGUNG

Vielen Dank an all die Unterstützer, die mir ermöglicht haben in diesem Themengebiet forschen zu können und diese Arbeit entstehen zu lassen. Herr Prof. Dr. Schieffer, der mich als Doktorandin angenommen hat und mir das Thema überlassen hat. Danke an Frau Dr. Birgit Markus für die Betreuung und Hilfestellung. Dem kardiologischen Forschungslabor geleitet von Frau Prof. Dr. Pankuweit, wo ich einen Einstieg in die praktische Laborarbeit fand. Dem kardiologischen Forschungslabor geleitet von Herrn Prof. Dr. Schieffer, besonders Raghav Oberoi und Karsten Grotek.

Mein Dank gilt all den Menschen, die mir während meines Studiums der Medizin geholfen haben. Meinen Eltern, die mich immer wieder aufgebaut und ermutigt haben. Kathrin, mit der ich eine wirklich tolle Studienzeit haben durfte und gemeinsam die Klausur- und Examensphasen bestritten habe.

Bone, der ganz zu Beginn meiner Ausbildung mir das Selbstvertrauen gegeben hat, dass das ganz sicher mein richtiger beruflicher Weg werden wird.

Zoltan, ohne den ich diese Arbeit vielleicht nicht zu Ende gebracht hätte. Und Elena für die Ermutigung und Korrektur.