

1. Medizinische Klinik und Poliklinik der  
Technischen Universität München  
Klinikum rechts der Isar  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. A. Schömig)

**Pro- und antiinflammatorische Zytokinprofile und differentielle  
T- Zellaktivierung im akuten Koronarsyndrom**

Christoph Philip Matissek

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin  
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Medizin  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.- Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.- Doz. Dr. I. Ott
2. Univ.- Prof. Dr. B. Holzmann

Die Dissertation wurde am 11.09.2006 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin  
am 24.01.2007 angenommen.

---

## GLIEDERUNG

<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>3</b>
1.1 ALLGEMEINE EINFÜHRUNG.....	3
1.2 MANIFESTATIONSFORMEN DER KORONAREN HERZKRANKHEIT UND DEFINITION DES AKUTEN KORONARSYNDROMS .....	3
1.3 GRUNDLAGEN DER ATHEROGENESE .....	4
1.4 ZELLULÄRE ZUSAMMENSETZUNG DER ATHEROMATÖSEN PLAQUE .....	6
1.5 NACHWEIS EINER SYSTEMISCHEN ENTZÜNDUNGSREAKTION IM AKUTEN KORONARSYNDROM .....	7
1.6 IMMUNOLOGISCHE GRUNDLAGEN DER T- ZELLAKTIVIERUNG UND -DIFFERENZIERUNG.....	8
1.7 DIE CHEMOKINREZEPTOREN CXCR3 UND CCR3 .....	12
1.8 AKTIVIERTE T- LYMPHOZYTEN IM AKUTEN KORONARSYNDROM .....	12
1.9 ZYTOKINE, CHEMOKINE UND CHEMOKINREZEPTOREN IM AKUTEN KORONARSYNDROM ...	16
1.10 ZIELSETZUNG DER STUDIE .....	18
<b>2. STUDIENAUFBAU .....</b>	<b>19</b>
2.1 STUDIENPOPULATIONEN UND EINSCHLUSSKRITERIEN .....	19
2.2 AUSSCHLUSSKRITERIEN.....	20
2.3 ABNAHMEPROTOKOLL .....	20
<b>3. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>21</b>
3.1 DURCHFLUSSZYTOMETRIE .....	21
3.1.1 AUFBAU EINES DURCHFLUSSZYTOMETERS .....	21
3.1.2 FUNKTIONSPRINZIP .....	22
3.1.3 FACS- FÄRBUNGEN .....	23
3.1.3.1 OBERFLÄCHENFÄRBUNG.....	23
3.1.3.2 INTRAZYTOPASMATISCHE ZYTOKIN- FÄRBUNG .....	25
3.1.4 DATENVERARBEITUNG .....	27
3.2 IMMUNADSORPTIONSNACHWEIS VON RANTES, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 UND IL-12 p70 .....	28
3.3 ANDERE METHODEN .....	29
3.4 STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	29

---

<b>4. ERGEBNISSE</b> .....	<b>30</b>
4.1 DEMOGRAPHISCHE DATEN DER STUDIENPOPULATIONEN .....	30
4.2 DIFFERENTIALBLUTBILD DER STUDIENPOPULATIONEN.....	32
4.3 EXPRESSION DES FRÜHEN AKTIVIERUNGSMARKERS CD69 .....	33
4.4 ZIRKULIERENDE CD4 POSITIVE CD28 NEGATIVE T- ZELLEN .....	34
4.5 IFN- $\gamma$ - UND IL-4- PRODUKTION NACH IN VITRO STIMULATION MIT SEB- UND CMV-ANTIGEN.....	36
4.6 VERTEILUNGSMUSTER DER CHEMOKINREZEPTOREN CXCR3 UND CCR3 AUF AKTIVIERTEN T- LYMPHOZYTEN.....	41
4.7 SERUMKONZENTRATIONEN DER ZYTOKINE IL-1, IL-6, IL-10, IL-12 UND RANTES.....	43
<b>5. DISKUSSION</b> .....	<b>45</b>
5.1 DIFFERENZIERUNGS- UND AKTIVIERUNGSMUSTER DER T- LYMPHOZYTEN IM AKUTEN KORONARSYNDROM.....	46
5.2 REDUZIERTES INFLAMMATORISCHES POTENTIAL DER T- LYMPHOZYTEN BEI PATIENTEN MIT AKUTEM MYOKARDINFARKT .....	50
5.3 ANTIGENSPEZIFISCHE IMMUNANTWORT STIMULIERTER T- LYMPHOZYTEN IM AKUTEN KORONARSYNDROM.....	52
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>54</b>
<b>7. LITERATURANGABEN</b> .....	<b>56</b>
<b>8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>73</b>
<b>9. TEILPUBLIKATION</b> .....	<b>75</b>
<b>10. DANKSAGUNG</b> .....	<b>76</b>
<b>11. LEBENSLAUF</b> .....	<b>77</b>

---

## **1. Einleitung**

### **1.1 Allgemeine Einführung**

Die koronare Herzkrankheit (KHK) mit ihren Manifestationsformen stellt aufgrund ihrer hohen Inzidenz und Prävalenz vor allem in Industrienationen ein grosses epidemiologisches und volkswirtschaftliches Problem dar. Weltweit sterben jährlich mehr als 16 Millionen Menschen infolge von Erkrankungen des kardiovaskulären Systems. Damit geht jeder fünfte Todesfall zulasten kardiovaskulärer Erkrankungen. Die koronare Herzkrankheit mit ihren Folgeerkrankungen ist die mit Abstand häufigste Mortalitätsursache bei Erkrankungen des kardiovaskulären Systems. Dabei ist festzustellen, dass der Grossteil der Therapieansätze vornehmlich auf die Behandlung der Komplikationen der KHK ausgerichtet ist, während nur wenige Ansätze die kausale Entstehung beeinflussen. Diese Tatsachen sowie die mangelnde Kenntnis der genauen zellulären und pathophysiologischen Vorgänge, die zur Herzmuskelschämie führen, stellen die grosse Bedeutung der medizinischen Forschung in diesem Gebiet dar. Sowohl in Bezug auf die Entwicklung neuer Therapieansätze als auch für die Verbesserung präventivmedizinischer Handlungsmöglichkeiten ist die Aufklärung des pathophysiologischen Ablaufs der Koronarthrombose/stenose daher eine grosse wissenschaftliche Herausforderung.

### **1.2 Manifestationsformen der koronaren Herzkrankheit und Definition des akuten Koronarsyndroms**

Die koronare Herzkrankheit ist die Manifestation der Arteriosklerose an den Herzkranzgefässen. Dabei kommt es durch flusslimitierende Stenosen zu einem Missverhältnis zwischen Sauerstoffbedarf und Sauerstoffangebot, was eine Myokardischämie nach sich zieht, die sich in verschiedenen Formen präsentieren kann.

Das akute Koronarsyndrom (ACS) ist eine dieser Manifestationsformen und umfasst die Entitäten des akuten Myokardinfarkts (AMI) sowie der instabilen Angina Pectoris (iAP). Nach der aktuellen Nomenklatur wird das ACS zusätzlich in Myokardinfarkte mit Hebungen der ST- Strecke im EKG (STEMI, „ST-elevation myocardial infarction“) und ohne (NSTEMI, „non ST-elevation myocardial infarction“) unterteilt. Beim AMI führt eine komplette Okklusion des Gefäßlumens zu einer ischämischen Schädigung

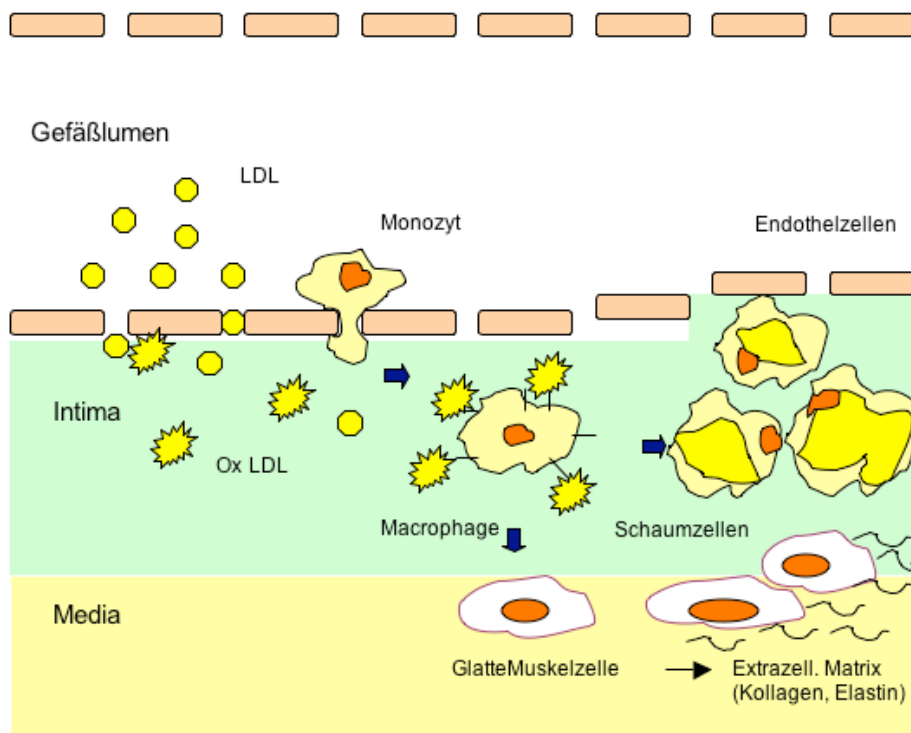
---

des im Endstromgebiet des betroffenen Koronargefäßes liegenden Myokards. Die iAP hingegen ist in ihrer klinischen Manifestation durch das Auftreten wiederholter Episoden myokardialer Ischämie in Ruhe oder bei leichter Arbeit charakterisiert, ohne dass es zu einer Myokardnekrose kommt.

Die stabile Angina Pectoris (sAP) als weitere Manifestationsform der KHK manifestiert sich in reproduzierbar mit gleicher Intensität auftretenden, anfallsartigen thorakalen Schmerzen, die in der Regel wenige Minuten andauern und sich durch Ruhe oder Nitroglyzeringabe rasch bessern.

### **1.3 Grundlagen der Atherogenese**

Ausgangspunkt der Atherogenese in den Koronargefäßen als pathomorphologische Grundlage der Entstehung eines akuten Koronarsyndroms ist eine endotheliale Dysfunktion, die durch die bekannten Risikofaktoren wie Hypertonie, Hyper-/Dyslipoproteinämie, Nikotinabusus und hämodynamische Faktoren ausgelöst werden kann. Durch die Störung der Endothelfunktion kommt es zu einem Einstrom von an Lipoprotein gebundenem Cholesterin, insbesondere Low Density Lipoprotein (LDL), in die Intima der Gefäßwand, wobei dieses teilweise oxidativ modifiziert wird. Monozyten, die durch Endotheldefekte bzw. über die endotheliale Expression von Adhäsionsmolekülen in die Intima einwandern, nehmen als ortsansässige Makrophagen mit Hilfe des sogenannten Scavenger- Rezeptors das modifizierte LDL gebundene Cholesterin auf und speichern es in Vakuolen im Zytoplasma. Die so entstandenen Schaumzellen, die sich in der Intima anreichern, führen zu einem Anwachsen der atherosklerotischen Plaque, wodurch es zu einer mechanischen Schädigung des Endothels und der Intima kommt. Darüber hinaus sind diese Zellen als immunaktive Makrophagen in der Lage, über die Sekretion von Wachstumsfaktoren und bestimmten Zytokinen glatte Muskelzellen in der Media zur Proliferation in die Intima und zur Synthese extrazellulärer Matrix zu stimulieren, wodurch es zu einer weiteren Zunahme der Intimadicke kommt. Diese grundlegenden Mechanismen sind charakteristisch für das frühe Stadium einer atherosklerotischen Läsion und sind in Abb. 1 schematisch dargestellt.



**Abb. 1:** Entstehung einer atheromatösen Plaque:

Im Blut zirkulierende LDL- Cholesterinmoleküle gelangen über Endotheldefekte in die Intima und werden von Makrophagen aufgenommen, die sich zu Schaumzellen umwandeln. Durch Akkumulation der cholesterinbeladenen Zellen und Stimulation anderer immunkompetenter Zellen kommt es zu einer Intimaverbreiterung mit konsekutiver Gefäßstenosierung.

Neben den beschriebenen pathogenetischen Mechanismen, die durch die langfristige Stenosierung des Koronargefäßes auf dem Boden einer Atherosklerose für das Syndrom der sAP eine plausible Erklärung bieten, muss es jedoch für das klinische Bild des ACS zusätzlich zu einer plötzlichen Einengung bzw. zum plötzlichen Verschluss des Gefäßes kommen. Diesem Vorgang liegt ein Einreisen bzw. eine Fissurierung der Plaquekappe zu Grunde, was eine Thrombusauflagerung und somit eine akute Verengung des Gefäßlumens zur Folge hat (Falk et al.,1995). Gerade im Hinblick auf den Übergang einer stabilen Plaque zur instabilen Plaque, die zu der klinischen Manifestation des ACS führt, hat in den letzten Jahren ein Paradigmenwechsel stattgefunden, der inflammatorische Vorgänge als wesentlichen Teil in diesen Prozess mit einbezieht.

Systemisch zeigt sich dies an erhöhten Spiegeln peripher zirkulierender Immunzellen und Akute-Phase-Proteinen (Neri Serneri et al.,1992, Biasucci et al.,1996) bei Patienten mit akuten ischämischen Ereignissen sowie lokal an einer Akkumulation

---

immunkompetenter Zellen in der atherosklerotischen Plaque. Neben Makrophagen sind T- Lymphozyten die dominierenden Immunzellen, deren nachweislich hoher Aktivierungsgrad mit Proliferation und Sekretion von Zytokinen ein Indiz für ein lokal entzündliches Milieu ist.

#### **1.4 Zelluläre Zusammensetzung der atheromatösen Plaque**

Wie im vorhergehenden Kapitel dargestellt, stellen Makrophagen eine entscheidende Zellpopulation innerhalb der atheromatösen Plaque dar. So konnte in fortgeschrittenen Stadien atherosklerotischer Läsionen in einer Reihe von histomorphologischen Untersuchungen eine verstärkte Infiltration von Makrophagen in die Intima bei Patienten mit ACS nachgewiesen werden, deren Besiedlungsdichte einen proportionalen Verlauf zum klinischen Schweregrad der Erkrankung zeigt (Moreno et al.,1994). Neben Makrophagen bilden auch T- Lymphozyten einen wesentlichen Anteil an der zellulären Komponente der atheromatösen Plaque. Diese Erkenntnis wurde zunächst indirekt über den Nachweis von MHC2 und HLA-DR exprimierenden glatten Muskelzellen (smooth muscle cell- SMC), zwei Oberflächenmoleküle, die eine durch Interferon- gamma ( $\text{IFN-}\gamma$ ) induzierte SMC-Aktivierung anzeigen, in Atheromen gewonnen (Jonasson et al. 1985). In weiteren Studien konnte immunhistologisch direkt ein hoher Anteil an T- Lymphozyten in humanen Carotis interna- Plaques nachgewiesen werden, während B- Lymphozyten, neutrophile Granulozyten und Natural-Killer-Zellen abwesend oder nur zu einem geringen Prozentsatz vorhanden waren (Jonassen et al.,1986). Es zeigte sich, dass die Schulterregion der Plaque, die Stelle mit dem größten Rupturrisiko, die höchste Besiedlungsdichte an T- Lymphozyten und mononukleären Zellen aufweist (van der Wal et al.,1994; Boyle et al.,1997). Im Hinblick auf die verschiedenen Subpopulationen der T- Lymphozyten konnte ein Dominieren der CD4 positiven Zellen, die als „T- Helferzellen“ über den Antigenkontakt auf MHC2- Molekülen weitere immunkompetente Zellen aktivieren, innerhalb atherosklerotischer Plaques nachgewiesen werden (de Boer et al.,1999). Ein Großteil der T- Lymphozyten befindet sich dabei in einem aktivierten Zustand, nachweisbar durch die Expression von Adhäsions- und Oberflächenmolekülen, der Sekretion von Zytokinen und der Tendenz zur Proliferation (Hansson et al.,1989, Mazzone et al.,1999). Auch die Präsenz von dendritischen Zellen (Bobryshev 2000), die im Hinblick auf die

---

T- Lymphozytenaktivierung die wichtigsten Antigen-präsentierenden-Zellen (APZ) sind, und die Präsenz von aktivierten Mastzellen innerhalb der Plaque (Kaartinen et al.,1994), rundet den Eindruck einer proinflammatorischen zellulären Komponente ab. Dies legt den Verdacht nahe, dass inflammatorische Prozesse eine wesentliche pathogenetische Rolle beim ACS spielen.

### **1.5 Nachweis einer systemischen Entzündungsreaktion im akuten Koronarsyndrom**

Neben dem Nachweis von lokalen inflammatorischen Prozessen in den Koronargefäßen mit Infiltration, Proliferation und Aktivierung immunkompetenter Zellen und der Sekretion bestimmter Zytokine, lässt sich bei nahezu allen Patienten mit ACS eine systemische inflammatorische Immunantwort nachweisen. Die systemische Entzündungsreaktion ist im Blut durch eine Leukozytose, eine erhöhte Blutkörperchensenkungs-Geschwindigkeit und durch erhöhte Werte des C-reaktiven Proteins gekennzeichnet.

Hierbei kommt vor allem dem C-reaktiven Protein (CRP), ein von Hepatozyten gebildetes Akute-Phase-Protein, das einen sehr sensitiven Parameter inflammatorischer Prozesse darstellt, eine bedeutende Rolle zu. Neben einer Korrelation der CRP- Blutkonzentration mit der Anwesenheit und dem Schweregrad der Arteriosklerose (Heinrich et al.,1995), sind erhöhte CRP- Werte bei ACS- Patienten mit einem erhöhten Risiko für koronarischämische Komplikationen assoziiert (Liuzzo et al.,1994, Haverkate et al.,1997). Bei Patienten mit iAP sind CRP- Blutkonzentrationen über 3 mg/l bei Aufnahme verglichen mit Patienten deren CRP- Werte unter 3 mg/l lagen mit einer signifikanten Erhöhung koronarischämischer Ereignisse und einer erhöhten Mortalität assoziiert (Biasucci et al.,2001).

Auch andere Akute-Phase-Proteine wie Fibrinogen und Serum Amyloid- A bzw. das für die Sekretionsstimulation der Akute-Phase-Proteine hauptsächlich verantwortliche Interleukin- 6 (IL-6) sind bei iAP erhöht und mit einer schlechten Prognose assoziiert (Toss et al.,1997, Liuzzo et al.,1994, Biasucci et al.,1996). Eine systemische Immunreaktion manifestiert sich des Weiteren in der vorübergehenden Aktivierung zirkulierender T- Lymphozyten bei Patienten mit iAP (Neri Serneri et al.,1997), die über die Expression der Oberflächenmoleküle HLA-DR und Bestandteilen des Interleukin-2 (IL-2)- Rezeptors (CD25) ermittelt wurde. Als Auslöser dieser



---

systemischen Entzündungsreaktion werden verschiedene Faktoren diskutiert, so unter anderem die Aktivierung von Endothelzellen und Lymphozyten innerhalb der koronaren Mikrozirkulation, Faktoren innerhalb der rupturierten Plaque oder eine inflammatorische Reaktion auf die Herzmuskelschämie (Neri Serneri et al.,2003, Buffon et al.,2003, Cusack et al.,2002). Das Vorherrschen eines proinflammatorischen Milieus innerhalb der Plaque, verbunden mit einer durch die Plaqueruptur bedingten Exposition gegenüber den zirkulierenden Zellen, legt eine Interaktion von lokaler und systemischer Immunantwort nahe. Untermuert wird diese Theorie durch die Erkenntnis, dass aktivierte zirkulierende T- Lymphozyten bei Patienten mit iAP im Gegensatz zu Patienten mit sAP ein reduziertes T- Zell-Rezeptorrepertoire aufweisen, ein Hinweis auf eine durch Antigenkontakt induzierte monoklonale Expansion, und dabei eine durch Plaqueantigene provozierbare Proliferation zeigen (Caligiuri et al.,2000). Auf neutrophilen Granulozyten und Monozyten ließ sich bei Patienten mit iAP nach Koronardurchfluss eine verstärkte Expression von Adhäsionsmolekülen nachweisen (Mazzone et al.,1993). Auch deutet die Expression später Aktivierungsmarker und das Fehlen früher Aktivierungsmarker bei zirkulierenden Lymphozyten, auf ein Einsetzen der T-Lymphozytenaktivierung vor Beginn der klinischen Symptomatik hin (Neri Serneri et al.,1997).

T- Zellaktivierung führt zu einer Monozytenaktivierung mit konsekutiver verstärkter prokoagulatorischer Aktivität, nachweisbar durch erhöhte Tissue factor- und Thromboxanexpression (Ott et al.,1998, Ott et al.,2000, Benagiano et al.,2003) und zu einer über IFN- $\gamma$  induzierten Matrix-Metalloproteinasen- Expression auf SMCs sowie deren verstärkte Apoptose (Schonbeck et al.,1997, Geng et al.,1996). Diese Vorgänge führen zu einer Destabilisierung der Plaquekappe und zu einer erhöhten Thromboseneigung. Somit könnte die T- Zellaktivierung also eine Schlüsselrolle in der Umwandlung einer chronisch stabilen Plaque zu einer instabilen Plaque mit dem Auftreten eines akuten Koronarsyndroms spielen.

## **1.6 Immunologische Grundlagen der T- Zellaktivierung und -differenzierung**

T- Lymphozyten stellen einen wichtigen Mediator zwischen angeborenem und erworbenem bzw. zwischen humoralem und zellulärem Immunsystem dar. T- Lymphozyten, die das CD8- Molekül an ihrer Oberfläche exprimieren, erkennen

---

aus dem Cytosol stammende, auf MHC1- Rezeptoren präsentierte Antigene und besitzen zytotoxische Eigenschaften, um die meist mit Viren oder intrazellulären Bakterien infizierte Zelle zu eliminieren. Im Gegensatz dazu werden die extrazellulären Antigene von Mikroorganismen durch APZ aufgenommen, verarbeitet und bevorzugt zusammen mit Klasse 2 MHC- Molekülen präsentiert. Dies aktiviert die CD4 positiven (CD4+), Klasse 2 MHC restringierten T- Helferzellen, was überwiegend eine Antikörperproduktion und Makrophagenaktivierung zur Folge hat.

CD4 und CD8, zwei Oberflächen- Glykoproteine auf T- Zellen, binden als Rezeptoren direkt an konstante Bereiche des MHC- Moleküls auf der APZ und sorgen für die stabile und korrekte Antigenbindung durch den T- Zellrezeptor, um so eine vollständige T- Zellaktivierung zu ermöglichen. Dazu gehören des Weiteren einige akzessorische Moleküle, die auf der T- Zelle exprimiert werden. CD28 spielt hier eine entscheidende Rolle als Corezeptor für den T- Zellrezeptor, denn es erhöht den Grad und die Dauer des Aktivierungsstatus der T- Zellrezeptor- Aktivierungskaskade und triggert andere synergistische T- Zellaktivierungskaskaden (Michel et al., 2001).

Die Erkennung eines Peptidantigens plus MHC- Molekül bewirkt eine Reihe von zellulären Abläufen, die man kollektiv T- Zellaktivierung nennt und folgende miteinander verknüpfte Schritte beinhaltet: Die frühe Signaltransduktion, die transkriptionelle Aktivierung verschiedener Gene, die Expression verschiedener Zelloberflächen- Moleküle, die Induktion mitotischer Aktivität und die Sekretion von Effektor- Zytokinen. Daraus resultiert zum einen die Proliferation der T- Zellen, vermittelt durch den autokrinen Wachstumsfaktor IL-2, der eine klonale Expansion der antigenspezifischen T- Zellen bewirkt und zum anderen die Aufnahme von Effektorfunktionen, die bei CD4+ Zellen überwiegend in der Sekretion von Zytokinen und bei CD8 exprimierenden Zellen hauptsächlich in der Lysierung der antigentragenden Zielzelle besteht. Einige aktivierte T- Lymphozyten entwickeln sich zu antigenspezifischen Gedächtnis- T- Zellen, die bei Zweitkontakt mit dem Antigen eine rasche und stärkere sekundäre Immunantwort in Gang bringen.

Ein Aktivierungsmarker auf T- Zellen ist CD69, ein transmembranäres Glykoprotein, das zur Natural Killer cell gene complex family of transducing receptors gehört und auf den meisten hämatopoetischen Zelllinien, einschließlich T- und B- Lymphozyten exprimiert wird (Marzio et al.,1999). Die Expression wird durch verschiedene Mechanismen getriggert, unter anderem durch T- Zellrezeptor- und IL-2- Stimulation

---

und ist nach Stimulation sehr früh über einen Zeitraum von ca. 24 Stunden nachweisbar (Hosono et al., 2003).

In der CD4<sup>+</sup> T- Helferzellpopulation gibt es wiederum Subpopulationen, die nur bestimmte Zytokine als Reaktion auf eine antigene Stimulation produzieren und sich somit auch funktionell unterscheiden. Naive CD4<sup>+</sup> Zellen, die durch ein spezifisches Antigen auf APZ, meist dendritischen Zellen (Santana, 2003), aktiviert werden, differenzieren in zwei Subpopulationen:

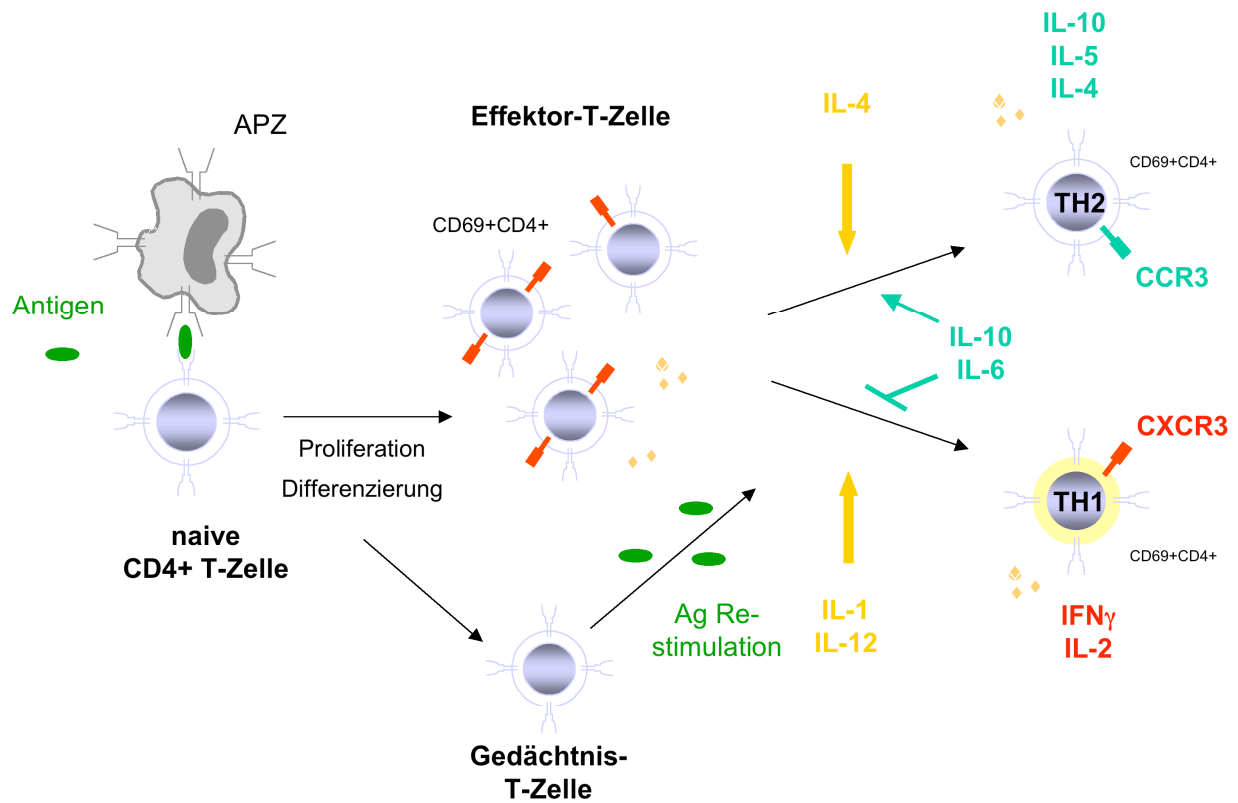
T-Helfer 1- Zellen (TH1- Zellen) sezernieren IL-2 und IFN- $\gamma$  und sind hauptsächlich bei der zellvermittelten Immunität gegen intrazelluläre Mikroorganismen und Überempfindlichkeitsreaktionen vom verzögerten Typ beteiligt. Diejenigen Antikörperisotypen, die durch TH1- Zellen induziert werden, sind besonders geeignet, das Komplementsystem zu aktivieren und Antigene zu opsonisieren, um eine bessere Phagozytose zu ermöglichen. TH1- Zellen setzen also die Phagozyten vermittelte Wirtsabwehr in Gang. Infektionen mit intrazellulären Mikroorganismen bewirken daher die Differenzierung von naiven T- Zellen in die TH1- Subpopulation, was eine Elimination dieser Mikroorganismen durch Phagozyten zur Folge hat.

T-Helfer 2- Zellen (TH2- Zellen) andererseits produzieren IL-4, das die IgE-Antikörperproduktion stimuliert, IL-5, ein Faktor, der eosinophile Granulozyten aktiviert, IL-10 und IL-13, die zusammen mit IL-4 die zellvermittelte Immunität hemmen. Die TH2- Subpopulation ist folglich hauptsächlich verantwortlich für die Phagozyten unabhängige Wirtsabwehr, z.B. gegen Wurmparasiten und für allergische Reaktionen.

Darüberhinaus besteht die Möglichkeit, dass sich naive T- Zellen nach Antigenstimulation zu TH0- Zellen entwickeln, die unter anderem IFN- $\gamma$ , IL-4 und IL-5 produzieren und sich erst im nachhinein in die Subpopulationen TH1 und TH2 differenzieren.

Ausschlaggebend für die CD4<sup>+</sup> T- Zelldifferenzierung in die TH1- oder TH2- Zelllinie sind überwiegend drei Faktoren während der Antigenstimulation: Zytokine, die Art der APZ und die Beschaffenheit bzw. die Konzentration des Antigens. Die Zytokine IL-12, IL-1 und IFN- $\gamma$  fördern die Entwicklung von TH1- Zellen, IL-4 hingegen stimuliert die TH2- Differenzierung. Des Weiteren kann die Differenzierung durch die Art der APZ reguliert werden. Aktivierte Makrophagen sind im besonderen Maße fähig die Differenzierung entlang des TH1- Weges zu prägen, wahrscheinlich weil sie eine der Hauptquellen für IL-12 darstellen. Und letztlich kann die Affinität, mit der die

naiven T- Zellen das Antigen erkennen oder die Konzentration der MHC assoziierten Peptidantigene, die relative Entwicklung von TH1- und TH2- Subpopulationen beeinflussen.



**Abb. 2: T- Zellantwort.** Eine naive CD4+ T- Zelle erkennt das für sie spezifische Antigen, welches ihr auf der Oberfläche einer Antigen-präsentierenden-Zelle dargeboten wird. Unter Vermittlung auto- und parakriner Mechanismen kommt es hiedurch zur Proliferation und Differenzierung dieser T- Zelle, die dann zu Effektorfunktionen wie der Makrophagenaktivierung und der Zytokinproduktion befähigt ist. Nach dem Zytokinproduktionsmuster unterscheidet man 2 Subpopulationen, zum einen die IFN- $\gamma$  und IL-2 produzierenden TH1- Zellen, zum anderen die IL-4 und IL-5 produzierenden TH2- Zellen. Mit freundlicher Genehmigung von Dr. B. Steppich

---

## 1.7 Die Chemokinrezeptoren CXCR3 und CCR3

Chemokine sind eine Gruppe strukturverwandter Glykopeptide, die chemotaktische und Leukozyten aktivierende Funktionen erfüllen. Chemokinfunktionen werden über eine Gruppe von 7- transmembranären, G- Protein gekoppelten Rezeptoren vermittelt. Mittlerweile wurden 20 Mitglieder dieser Gruppe identifiziert. Die Einteilung erfolgt in 4 Gruppen nach der Position der ersten gepaarten Zysteine in der Aminosäuresequenz (CXC, CX3C, CC und C). Korrespondierende Chemokinrezeptoren werden auf T- Lymphozyten abhängig von deren Antigenerfahrung und Polarisation unterschiedlich exprimiert. CXCR3 wurde als Rezeptor für die Zytokine IFN- $\gamma$ -induced protein 10 (IP10), monokine induced by IFN- $\gamma$  (Mig) und IFN-inducible T cell alpha chemoattractant (I-Tac) identifiziert. Es wird stark auf IL-2 aktivierten T- Lymphozyten exprimiert und ist deshalb besonders für die T- Zellrekrutierung wichtig (Loetscher et al.,1996). Außerdem ist der Rezeptor auf den meisten peripheren Gedächtniszellen präsent und wird auf TH1- Zellen stärker exprimiert als auf TH2- Zellen (Sallusto et al.,1998). Die Rolle von CCR3 wurde zunächst hauptsächlich in die Rekrutierung und Aktivierung von eosinophilen Granulozyten gesehen, da der Rezeptor die höchste Affinität zu Eotaxin, Regulated upon Activation, Normal T cells Expressed and presumably Secreted (RANTES) und verschiedenen MCP- Chemokinen aufweist (Kitaura et al.,1996). Bei der Expression auf T- Lymphozyten- Subpopulationen zeigt sich jedoch, dass CCR3 verstärkt auf TH2- Zellen exprimiert wird (Sallusto et al.,1998). Die beiden Chemokinrezeptoren CXCR3 und CCR3 stellen somit in Bezug auf an der Oberfläche exprimierten Molekülen ein wichtiges Unterscheidungskriterium zwischen den beiden T- Zell-Subpopulationen dar und sind darüber hinaus für die Lymphozytenrekrutierung wichtig.

## 1.8 Aktivierte T- Lymphozyten im akuten Koronarsyndrom

T- Lymphozyten stellen neben Makrophagen die wichtigsten in Plaques nachweisbaren Zellen dar, während sie in der Wand gesunder Arterien nicht nachweisbar sind. Jedoch erst im aktivierten Zustand sind diese Zellen in der Lage, über die Sekretion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren andere Zellen wie Makrophagen, Thrombozyten, SMCs und Endothelzellen zu stimulieren bzw. zu

---

modulieren. Die Expression von HLA-DR- Molekülen und Very Late Activation Antigen-1 auf bis zu einem Drittel aller T- Zellen in atherosklerotischen Plaques gab erste Hinweise auf einen aktivierten Zustand der T- Lymphozyten (Hansson et al.,1989). Die T- Lymphozyten zeigen außerdem eine verstärkte Expression des IL-2- Rezeptors bei Patienten mit iAP und AMI, im Vergleich zu sAP- Patienten, ein Oberflächenmolekül, das die klonale Expansion von aktivierten T- Zellen bewirkt (van der Wal et al.,1998). Auch andere T- Zellaktivierungsmarker (CD25, CD26, CD40L und CD69) werden in Koronaratherektomie- Proben mit zunehmendem Schweregrad des Koronarsyndroms verstärkt exprimiert (Hosono et al.,2003). Bei den von aktivierten T- Zellen sezernierten Zytokinen spielt IFN- $\gamma$  eine entscheidende Rolle. Ein Großteil der zirkulierenden T- Lymphozyten bei Patienten mit iAP zeigen eine IFN- $\gamma$ - Produktion, während ihr Anteil bei Patienten mit sAP niedrig ist (Liuzzo et al.,1999). Aus atherosklerotischen Läsionen gewonnene T- Zellklone zeichnen sich zu einem Großteil durch die Fähigkeit zur IFN- $\gamma$ - und TNF- $\alpha$ - Sekretion aus, während die TH2- zellspezifischen Zytokine IL-4 und IL-5 nur eine untergeordnete Rolle spielen (Benagiano et al.,2003) und auch immunhistochemisch läßt sich in atherosklerotischen Plaques eine Dominanz TH1- zellspezifischer Zytokine nachweisen. In Endarterektomieproben fortgeschrittener Arterioskleroseplaques überwiegen die proinflammatorischen Zytokine IL-2 und IL-7, während IL-4 und IL-5 in signifikant weniger Plaques nachweisbar waren (Frostedgard et al.,1999). Im Tierversuch zeigte eine Suppression der TH1- Zelldifferenzierung außerdem einen protektiven Einfluß auf die Atheroskleroseentwicklung: Apolipoprotein E- defiziente Mäuse zeigten nach Behandlung mit Pentoxifylin, einem Inhibitor der TH1- Zelldifferenzierung eine Grössenabnahme der Atheroskleroseläsionen und eine Reduktion IFN- $\gamma$  positiver Milz- T- Lymphozyten, die mit dem Atheroskleroseausmaß korrelierte (Laurat et al.,2001).

Diese Studienergebnisse zeigen, dass eine zellvermittelte und durch aktivierte TH1- Zellen gesteuerte Immunantwort im Vordergrund der inflammatorischen Komponente innerhalb der atherosklerotischen Plaque steht. Diese Theorie lässt sich durch weitere indirekte Erkenntnisse untermauern. So bewirkt IFN- $\gamma$  eine Reihe von immunmodulatorischen Effekten wie die Inhibition der Endothelzell-Proliferation, die Aktivierung von SMCs mit verstärkter Matrix-Metalloproteinasen- Expression und eine gesteigerte Apoptose von Gefäß- SMCs (Friesel et al.,1987, Schonbeck et al.,1997, Geng et al.,1996), Mechanismen, die wesentlich zur Destabilisierung einer

---

Plaque beitragen können. Auch die im ACS nachweisbare Monozytenaktivierung ist zumindest teilweise auf IFN- $\gamma$  zurückzuführen (Liuzzo et al.,2001) und vermittelt über eine gesteigerte Tissue Factor-Expression eine prokoagulatorische Aktivität, die über eine gesteigerte Thromboseneigung zur akuten Gefäßstenosierung beitragen könnte (Mazzone et al.,1993, Seneri et al.,1992, Jude et al.,1994).

Zur Aktivierung von T- Lymphozyten bedarf es eines spezifischen Antigens, das im Rahmen der KHK bisher nicht bekannt ist. Der Nachweis spezifischer T- Lymphozyten mit ähnlichen T- Zellrezeptoren und damit monoklonalem Ursprung bei Patienten mit iAP deutet auf die Expansion eines durch Antigenkontakt aktivierten T- Zellklons hin (Liuzzo et al.,2000). Diese CD4 positiven CD28 negativen (CD4+CD28-) Zellen zeigen darüber hinaus eine Akkumulation in der Schulterregion der Plaque und verfügen über Eigenschaften, die normale CD4 Zellen nicht aufweisen, wie Zytotoxizität und übersteigerte IFN- $\gamma$ - Sekretion (Park et al.,1997, Namekawa et al.,1998). Durch ihre proinflammatorischen, gewebescheidigenden Eigenschaften könnten sie einen wesentlichen Beitrag zum Aufbau eines zur Plaqueruptur prädisponierenden Milieus beisteuern. Koronaratherektomie- Proben von Patienten mit iAP, aber nicht von Patienten mit sAP induzieren eine T-Lymphozytenproliferation (Caligiuri et al.,2000). Dies legt den Verdacht nahe, dass ein in der Plaque vorhandenes Antigen die Lymphozytenaktivierung induziert. Oxidiertes LDL (oxLDL) ist eines der ersten verdächtigten Antigene, das in jeder atherosklerotischen Plaque enthalten ist. Antikörper gegen oxLDL sind in atherosklerotischen Läsionen nachweisbar (Yla- Herttuala et al.,1994) und T- Lymphozyten zeigen eine durch oxLDL auslösbare Aktivierung mit Sekretion von IFN- $\gamma$  (Stemme et al.,1995). Durch Induktion einer neonatalen Toleranz gegen oxLDL bzw. durch Immunisierung konnte im Tierversuch eine Progression der Atherosklerose verhindert werden (Palinski et al.,1995, Ameli et al.,1996, Zhou et al.,2001).

Der deutliche Zusammenhang zwischen der Anzahl an infektiösen Keimen, denen ein Mensch ausgesetzt ist, und dem Atheroskleroseausmaß bzw. dem Risiko eines Folgetodes bei Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung (Espinola- Klein et al.,2002), zeigt die Bedeutung infektiöser Agens im ACS als potentielle Initiatoren der Lymphozytenaktivierung und der damit verbundenen Immunreaktion.

Cytomegalie Virus (CMV), Chlamydia pneumoniae, Helicobacter pylori und Herpes simplex- Virus sind Pathogene, deren Persistenz im menschlichen Körper bei hohem

---

Durchseuchungsgrad der Bevölkerung eine Beteiligung bei der Atherogenese nahelegen könnten. *Chlamydia pneumoniae*, ein Pathogen, das in eine Reihe von chronischen Erkrankungen involviert ist und intrazellulär in Makrophagen überlebt, konnte aus atherosklerotischen Läsionen isoliert und gezüchtet werden (Muhlestein et al.,1996). Auch mit Cytomegalie Virus und Herpes Simplex- Typ 1 Virus gelang dieser Nachweis (Melnick et al.,1994, Shi et al.,2002). Eine Korrelation besteht zwischen hohen Antikörpertitern gegen *Chlamydia pneumoniae* (*C. pneumoniae*) und *Helicobacter Pylori* und dem Auftreten einer KHK (Anderson et al.,1998). Insbesondere erhöhte IgM- Antikörpertiter, als Zeichen einer akuten Chlamydieninfektion, sind mit einer erhöhten Inzidenz von akuten Myokardinfarkten assoziiert (Shiro et al.,2005). Trotz aller Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen genannten Erregern und der Arteriosklerose bleibt jedoch bis heute die Frage offen, ob es sich dabei um eine Ursache der Immunreaktion innerhalb der Plaque oder um einen Kofaktor ohne wesentliche pathoätiologische Bedeutung handelt. In mehreren Therapiestudien wurden Patienten mit ACS über mehrere Tage mit dem Makrolid- Antibiotikum Roxithromycin, das eine gute Wirksamkeit gegen *C. pneumoniae* zeigt, behandelt. Diese Therapie bewirkte keine signifikante Reduktion des Risikos kardiovaskulärer Komplikationen im Vergleich zur mit einem Placebo behandelten Kontrollgruppe (Zahn et al.,2003, Cannon et al.,2005). Der ausbleibende Erfolg könnte jedoch auch dadurch begründet sein, dass sich Chlamydien als intrazelluläre Bakterien in zirkulierenden Monozyten refraktär gegen eine Standard- Antibiotikatherapie zeigen (Gieffers et al.,2001).

Weitere mögliche Antigene wurden mit Heat-Shock-Proteinen (HSP) und Stress-Shock-Proteinen ausgiebig untersucht. So zeigt sich unter anderem eine massive Expansion CD4+CD28- T- Lymphozyten auf Inkubation mit HSP 60 (Zal et al.,2004). Autoimmunologische Prozesse im Sinne einer molekularen Mimikri, wie sie bei vielen Autoimmunkrankheiten bekannt sind, könnten eine Erklärung für die Vielfalt der verdächtigten Antigene darstellen. HSP, die ubiquitär intrazellulär in niedrigen Konzentrationen nachweisbar sind und auch von Bakterien mit grosser Homologität zu menschlichen HSP gebildet werden, werden als Stressantwort auf der Zellmembran, z.B. von Endothelzellen exprimiert und könnten dadurch eine autoimmunologische Immunreaktion induzieren, die zum Untergang dieser Zellen führt (Epstein et al.,2000).



---

Eine intensivierete T- Lymphozytenaktivierung lässt sich mit Hilfe sogenannter Superantigene erreichen. Diese binden an Strukturen außerhalb der Antigenbindungsstelle des T- Zellrezeptors, bedürfen keiner vorheriger Prozessierung und aktivieren einen deutlich grösseren Anteil der T- Zellen im Vergleich zu konventionellen Antigenen (Fleischer et al.,1988).

Staphylococcal Enterotoxin B (SEB) ist ein Superantigen, das an die Vbeta- Kette des T- Zellrezeptors in der Nähe der hypervariablen Region sowie an die alpha Domäne des MHC2- Rezeptors bindet. Dadurch umgeht SEB die normalen Abläufe der spezifischen Antigenerkennung durch CD4+ T- Zellen auf MHC2- Rezeptoren und verursacht eine intensive T- Zellaktivierung (Fleischer 1994).

### **1.9 Zytokine, Chemokine und Chemokinrezeptoren im akuten Koronarsyndrom**

Zytokine sind Glykoproteine von 8-80 kDa Größe, die eine regulierende Wirkung in der Kontrolle des Wachstums und der Differenzierung von Zellen haben. Als interzelluläre Botenstoffe auf hormoneller Basis sind sie insbesondere bei der Blutbildung und bei der Aktivierung und Steuerung des Abwehrsystems von Bedeutung. Sie werden entweder sezerniert oder an der Zelloberfläche exprimiert und binden an für sie spezifische Rezeptoren auf den Zielzellen.

Als essentielle Faktoren für die Rekrutierung und Aktivierung zirkulierender Lymphozyten können sie somit auch einen wichtigen Beitrag zur inflammatorischen Komponente und zur Instabilität der Plaque leisten. Im Hinblick auf die Rekrutierung von Lymphozyten wird sowohl die Adhäsion der Zellen am Endothel mittels Expression von Adhäsionsfaktoren, als auch die Migration durch die Gefäßwand maßgeblich durch Chemokine und Zytokine beeinflusst. Auch bei der Lymphozytenaktivierung sind neben der Erkennung eines spezifischen Antigens costimulatorische Signale und bestimmte Zytokine notwendig. Wie beschrieben zeichnen sich ausdifferenzierte CD4+ T- Lymphozyten durch verschiedene Zytokinsekretionsmuster aus. Das wichtigste von TH1- Lymphozyten sezernierte Zytokin ist IFN- $\gamma$ , das gleichzeitig einen suppressiven Effekt auf die TH2- Zelldifferenzierung hat. Es bewirkt eine Makrophagenaktivierung, eine Hemmung der viralen Replikation und eine verstärkte Expression von MHC- Klasse 1 und 2 Rezeptoren auf Makrophagen und anderen somatischen Zellen. IL-4 als wichtigstes von TH2- Zellen gebildetes Zytokin induziert eine B-Lymphozytenreifung und fördert

---

die TH2- Zelldifferenzierung. Weitere Zytokine bestimmen maßgeblich die Entscheidung, welche T- Zellentwicklung favorisiert wird. IL-12, IL-1 $\beta$  und RANTES gelten als bedeutende Stimuli für die TH1- Zelldifferenzierung, IL-6 und IL-10 hingegen bewirken eine TH2 dominierte Immunantwort (Santana 2003, D'Andrea et al.,1993).

IL-10, ein überwiegend von Monozyten und aktivierten TH2- Zellen sezerniertes Zytokin, vermittelt seine antiinflammatorische Wirkung über eine verminderte Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-12, IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  (D'Andrea et al.,1993, de Waal et al.,1991), eine Inhibition der Antigenpräsentation auf Monozyten (de Waal et al.,1991) und durch Suppression der Makrophagenaktivität (Bogdan et al.,1991). In der Prognose von Patienten mit ACS stellen hohe Konzentrationen an IL-10 einen protektiven Mechanismus dar (Heeschen et al.,2003). IL-10 wird auch in atherosklerotischen Plaques exprimiert (Mallat et al.,1999) und die Expression zeigt bei in vitro- und in vivo- Studien eine negative Korrelation mit der Ausbildung und eine positive Korrelation mit der Stabilität der Plaques (Mallat et al.,1999, Pinderski et al.,1999).

IL-12 ist ein proinflammatorisches Zytokin und hat einen antagonistischen Effekt zu IL-10. Es wird von aktivierten Makrophagen und dendritischen Zellen sezerniert, fördert die Expansion IFN- $\gamma$  positiver T- Zellen (Seder et al.,1993) und konnte in atherosklerotischen Plaques neben IFN- $\gamma$  als dominierendes, von T- Zellen sezerniertes Zytokin nachgewiesen werden (Uyemura et al.,1996). In Monozyten bewirkt die in vitro Inkubation mit oxLDL eine verstärkte IL-12 Expression (Uyemura et al.,1996), eine mögliche Erklärung für das Vorherrschen einer von IL-12 und TH1- Zellen vermittelten Immunreaktion in atherosklerotischen Plaques.

IL-6 wird durch eine Vielzahl von Stimuli wie IFN- $\gamma$ -, TNF- $\alpha$ - und IL-1- Signalisation, Virusbestandteile und bakterielle Endotoxine von zahlreichen Immunzellen sezerniert und vermittelt eine Reihe proinflammatorischer Vorgänge wie die Bildung von Akute-Phase-Proteinen in Hepatozyten (Kishimoto et al.,1989, Le et al 1989), die Stimulation von T- und B- Lymphozyten sowie prokoagulatorische Effekte (Neumann et al.,1997). T- Lymphozyten werden unter IL-6- Einfluss zur TH2- Differenzierung stimuliert durch Inhibition von IFN- $\gamma$ - Rezeptor vermittelten Signalen und durch die Hochregulation der IL-4- Genexpression (Diehl et al.,2000).

---

RANTES ist ein proinflammatorisches Mitglied der CC- Chemokin Familie und besitzt potente chemoattraktive Eigenschaften auf T- Gedächtniszellen, eosinophilen und basophilen Granulozyten (Baggiolini et al., 1994, Kameyoshi et al., 1992).

Die Hauptwirkungen von IL-1beta (IL-1 $\beta$ ) sind die Stimulation von T- Helferzellen und B- Lymphozyten, eine Steigerung des Arachidonsäure-Metabolismus der am Entzündungsvorgang beteiligten Zellen ebenso wie eine fiebererzeugende Wirkung im Hypothalamus (Durum et al 1985). Im Endothel induziert IL-1 $\beta$  eine prokoagulatorische Aktivität (Bevilacqua et al 1985), die Expression von Adhäsionsmolekülen wie ELAM, ICAM und VCAM, die Synthese von chemotaktischen Faktoren (Harlan 1987, Pober et al 1990, Sica et al 1990) und in Endothelzellen und Monozyten die Freisetzung von IL-6 (Sironi et al 1989, Tosato et al 1990).

### **1.10 Zielsetzung der Studie**

Ziel dieser Arbeit war es eine Aktivierung zirkulierender T- Lymphozyten und deren vorherrschende Subpopulation in den verschiedenen Manifestationsformen der KHK nachzuweisen. T- Lymphozytenaktivierung sollte dabei zum einen über den frühen Aktivierungsmarker CD69 ermittelt werden, welcher eine frühe, antigenunspezifische Aktivierung erfasst. Zum anderen sollte durch Stimulation mit SEB, als eine den spezifischen Antigenkontakt simulierende Aktivierung, die Frage geklärt werden, ob sich dadurch eine verstärkte Sekretion T- zellspezifischer Zytokine als Hinweis auf eine Immunantwort von T- Gedächtniszellen induzieren lässt.

Im Hinblick auf die T- Zellsubpopulationen sollte geklärt, ob durch die differentielle Expression von CXCR3 und CCR3 systemisch eine TH1- oder TH2- Zelldifferenzierung überwiegt und ob TH1- oder TH2- zelltypische Zytokinsekretionsmuster nach SEB- Stimulation vorherrschen. Des Weiteren sollte mittels der Bestimmung systemischer Zytokinspiegel geklärt werden, ob pro- oder antiinflammatorische Immunreaktionen bei den verschiedenen KHK-Manifestationsformen dominieren.

## 2. Studienaufbau

### 2.1 Studienpopulationen und Einschlusskriterien

39 Patienten mit AMI der Killip-Klasse I bis II ohne vorangehende wiederholte Episoden einer iAP- Symptomatik wurden in diese Studiengruppe eingeschlossen. Die Diagnose stützte sich auf typische klinische (über mindestens 20 Minuten anhaltender typischer Brustschmerz), elektrokardiographische (ST- Strecken-Elevationen von mindestens 0,1 mV in zwei oder mehr Extremitätenableitungen oder von mindestens 0,2 mV in zwei oder mehr kontinuierlichen, präkardialen Ableitungen im Oberflächen- Elektrokardiogramm) und laborchemisch bestimmten Enzymveränderungen (signifikanter Creatinkinase- Anstieg auf mindestens das Doppelte des Ausgangswertes).

13 Patienten mit iAP wurden in die Studie eingeschlossen. Die Diagnose der iAP basierte auf einer Vorgeschichte mit Troponin T positivem typischem Brustschmerz mit unspezifischen EKG-Veränderungen (ST- Streckensenkungen, negative T-Wellen).

Die Kontrollgruppe setzte sich aus 20 Patienten mit der klinischen Diagnose einer sAP zusammen, die sich einem elektiven Koronargefäßstenting unterzogen.

AMI	iAP	sAP
<ul style="list-style-type: none"> <li>• pectanginöse Beschwerden &gt;20 Minuten</li> <li>• Schmerzbeginn &lt;12 h</li> <li>• ST-Hebungen von mind. 0,1 mV in <math>\geq 2</math> Extremitätenableitungen oder mind. 2 mV in <math>\geq 2</math> Brustwandableitungen</li> <li>• CK mind. 2-fach<math>\uparrow</math> mit spezifischem CK-MB-Anteil</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Typische pectanginöse Beschwerden</li> <li>• Unspezifische EKG-Veränderungen wie ST-Senkungen, T-Negativierungen</li> <li>• TnT <math>\uparrow</math></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Belastungs-Angina pectoris</li> <li>• angiographisch gesicherte interventionsbedürftige Koronarstenose</li> </ul>

**Tab. 1:** Einschlusskriterien der Studiengruppen

## **2.2 Ausschlusskriterien**

Patienten mit interferierenden nichtkardialen Erkrankungen, wie z.B. chronisch entzündlichen oder malignen Erkrankungen, Infektionen, sowie schweren systemischen Erkrankungen hämatologischer, renaler, pulmonaler, hepatischer, endokriner oder neurologischer Art, aber auch Patienten, die innerhalb der vorangegangenen 6 Monate invasive Eingriffe bzw. Traumen erlitten hatten, konnten ebenso wie Patienten mit einer antiinflammatorischen Medikation - mit Ausnahme von 200 mg ASS/d - aufgrund einer möglichen Beeinflussung des Studienergebnisses nicht an der Studie teilnehmen.

## **2.3 Abnahmeprotokoll**

Alle Patienten mit AMI und iAP erhielten vor Studienbeginn in der Notaufnahme 500 mg Aspirin, 5000 IE Heparin intravenös und 600 mg Clopidogrel oral und wurden dann unverzüglich einer Koronarangiographie mit Koronarstenteinlage unterzogen. Die Patienten mit sAP erhielten jeweils 600 mg Clopidogrel sowie 100 mg ASS oral vor der geplanten interventionellen Revaskularisation.

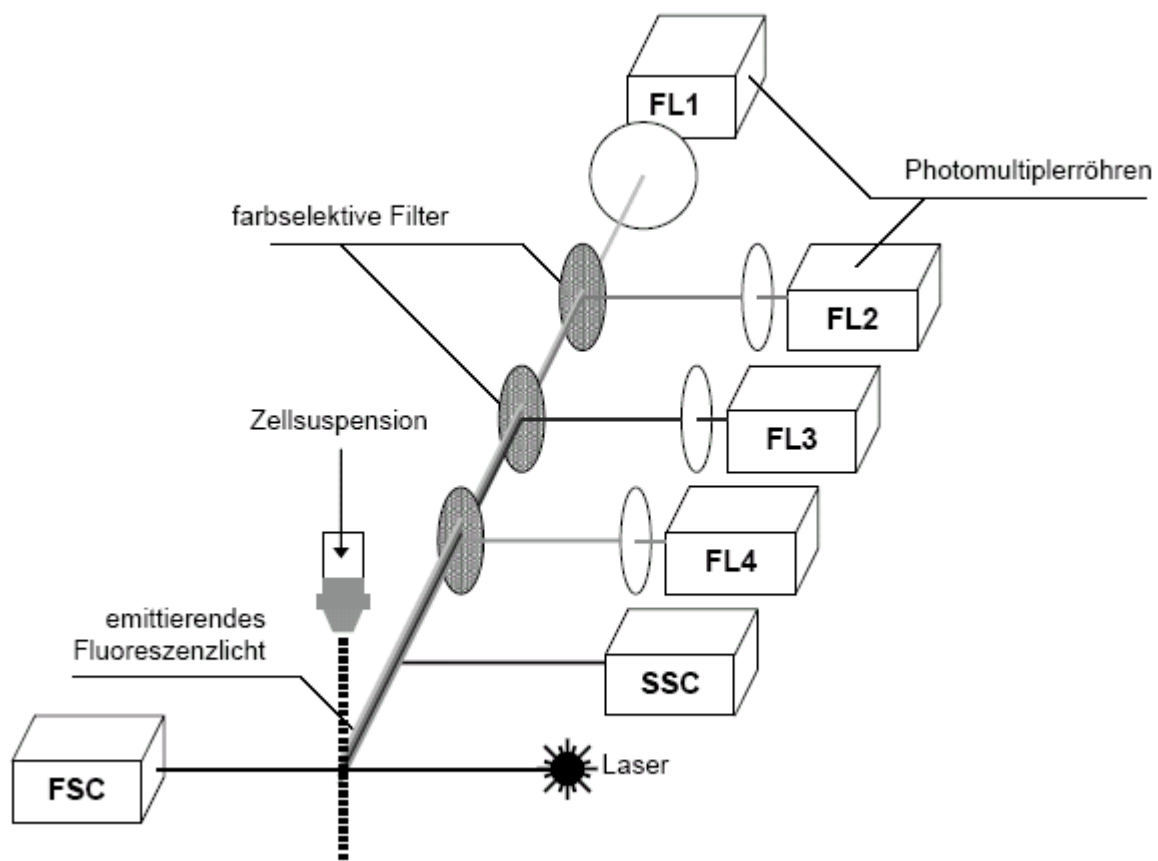
Die Blutproben wurden nach Prüfung der Ein- und Ausschlusskriterien unmittelbar vor dem koronarangiographischen Eingriff durch periphervenöse Abnahme in ein heparinisiertes Röhrchen gewonnen, anschließend auf Eis gekühlt und umgehend nach unten beschriebenen Protokollen verarbeitet. Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission der Institution genehmigt und alle Studienpatienten erteilten nach Aufklärung ihre schriftliche Einverständniserklärung.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Durchflusszytometrie

##### 3.1.1 Aufbau eines Durchflusszytometers

Das Durchflusszytometer „FacScan“ der Firma Becton-Dickinson, Heidelberg, bildete die Grundlage der durchflusszytometrischen Untersuchungen der vorliegenden Studie und setzt sich aus einer Messeinheit, bestehend aus dem Probenführungssystem, zwei luftgekühlten 488 nm Argonlaser mit einer Leistung von 500 Milliwatt (mW) zur Fluoreszenzanregung und fünf Detektoren zur Messung der Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften sowie einem konnektierten Datenverarbeitungssystem zusammen. Abb. 3 stellt schematisch den Aufbau eines Durchflusszytometers dar.



**Abb. 3** : schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers  
 FSC: Forwardscatter      SSC: Sidewardscatter

---

### 3.1.2 Funktionsprinzip

Die Durchflusszytometrie macht sich die unterschiedlichen Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften einzelner Zellen zu Nutze und ermöglicht somit eine relativ exakte Differenzierung verschiedener Zelltypen anhand deren charakteristischer Signalmuster. Einerseits lassen sich dadurch eigentümliche Zelleigenschaften wie Zellgröße, Zellmembran, Zellkern oder intrazelluläre Bestandteile bzw. Granularität ermitteln, andererseits lässt sich aber auch über die Ermittlung der Fluoreszenzintensität eine quantitative Analyse der Antikörperbindung durchführen, wodurch weitere Zellcharakteristika bestimmt werden können.

Grundlage der fluoreszenzaktivierten Zellanalyse ist die Antigen - Antikörper - Reaktion, die mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Antikörpern gegen Oberflächenmoleküle bzw. intracytoplasmatische Moleküle durchgeführt wird. Die so markierten Zellen werden in der Probe als monodisperse Einzelzellsuspension in einem Hüllstrom von entgastem Wasser (Jet- Flüssigkeit) in einer laminaren Strömung zum Analysenpunkt geleitet. Durch dieses Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung wird gewährleistet, dass die Zellen perlschnurartig aufgereiht werden und somit den Lichtstrahl des 488nm Argonlasers einzeln passieren. Der Laserstrahl wird beim Passieren der Zellen in zwei Richtungen gebrochen: Zum einen in Richtung des Lasers, als Vorwärtsstreulicht (Forward- Scatter) bezeichnet, und in eine Richtung orthogonal zum Laserstrahl, als Seitwärtsstreulicht (Side- Scatter) bezeichnet. Die Vorwärtsstreuung wird über Photodioden gemessen und gibt Auskunft über die Zellgröße, während das Seitwärtsstreulicht über die Photomultiplerröhren (Photo Multiplier Tubes, PMT) aufgenommen wird und Aussagen über die Granularität und Membranfaltung zulässt.

Des Weiteren spielt der Laserstrahl eine entscheidende Rolle für die Entstehung der Fluoreszenz: Verschiedene Moleküle, unter anderem Oberflächenmoleküle auf Leukozyten, lassen sich durch die Bindung an einen mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Antikörper in der Zellsuspension nachweisen. Durch die Absorption des monochromatischen Lichts werden die Elektronen der Fluoreszenzfarbstoffe auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Laserimpuls fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie (in Form von Photonen) auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die emittierte Photonenkonzentration, die durch einen Photodetektor registriert wird, verhält sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern pro Zelle.

Eine gleichzeitige Messung mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen ist möglich, da sich die eingesetzten Farbstoffe zwar bei einer gemeinsamen Wellenlänge anregen lassen (in unserem Fall bei 488nm), aber über unterschiedliche, für den jeweiligen Farbstoff charakteristische Emissionsspektren verfügen:

Fluorochrom	Absorptionsmaxima [nm]	Emmissionsmaxima [nm]
Fluoreszeinisothiozyanat ( FITC )	495	519
Peridin Chlorophyll ( Per CP )	490	675
Phycoerythrin ( PE )	480; 465	578
Allophycocyanin ( APC )	650	666

**Tab. 2** : Absorptions- und Emmissionsmaxima verschiedener Fluorochrome

Die optischen Signale werden in der Photodiode (für das Vorwärtsstreulicht) bzw. in den PMT (für das Seitwärtsstreulicht sowie für die verschiedenen Fluoreszenzen) in Form von Spannungspulsen in elektronische Signale umgewandelt. Durch eine Signalumwandlung werden die Spannungspulse digitalisiert und können so auf dem Computer in Form von Histogrammen bzw. Diagrammen dargestellt werden.

### 3.1.3 FACS- Färbungen

#### 3.1.3.1 Oberflächenfärbung

Für die durchflusszytometrische Bestimmung der leukozytären Oberflächenantigene wurde jeweils 100µl heparinisiertes Vollblut in 5 ml Polystyren- Röhrchen (Becton Dickinson, San Jose, USA) vorgelegt. Anschließend wurden die direkt markierten Antikörper (AK) in den unten angegebenen Volumina wie folgt zugegeben und vorsichtig gemischt:

1. 100 µl anti-CD8 FITC AK (Immunotech, Marseille, France)  
50 µl anti-CD4 PE AK (Becton Dickinson, San Jose, USA)



- 
- 50 µl anti-CD69 PerCP AK (Becton Dickinson, San Jose, USA)
  - 50 µl anti-CD3 APC AK (Becton Dickinson, San Jose, USA)
  
  - 2. 100 µl anti-CD3 FITC AK (R&D Systems, Minneapolis, USA)
  - 50 µl anti-CD28 PE AK (Becton Dickinson, San Jose, USA)
  - 50 µl anti-CD69 PerCP AK (Becton Dickinson, San Jose, USA)
  - 25 µl anti-CD4 APC AK (Becton Dickinson, San Jose, USA)
  
  - 3. 100 µl anti-CXCR3 FITC AK (R&D Systems, Minneapolis, USA)
  - 100 µl anti-CCR3 PE AK (R&D Systems, Minneapolis, USA)
  - 50 µl anti-CD69 PerCP AK (Becton Dickinson, San Jose, USA)
  - 25 µl anti-CD3 APC AK (Becton Dickinson, San Jose, USA)

Um in der Durchflusszytometrie die antigenunspezifische Bindung der Antikörper zu detektieren, wurde stets eine Probe mit isotypischen Antikörpern mitgeführt. Hier fanden die folgenden Antikörper Verwendung: 100 µl eines FITC gefärbten anti Immunglobulin G<sub>1</sub> (IgG<sub>1</sub>) AK (Becton Dickinson, San Jose, USA), 100 µl eines PE gefärbten anti IgG<sub>1</sub> AK (Becton Dickinson, San Jose, USA), 100 µl eines PerCP gefärbten anti IgG<sub>1</sub> AK (Becton Dickinson, San Jose, USA).

Die Blutproben wurden daraufhin für 20 Minuten unter Lichtausschluss auf Eis inkubiert. Zur anschließenden Lyse der Erythrozyten wurden jeweils 1ml FACS Lysing- Solution (Becton Dickinson, San Jose, USA) zugegeben und die Röhrchen für 10 Minuten bei 37° C inkubiert. Daraufhin folgte ein Waschschrift mit Phosphat buffered Saline (PBS) Puffer (0,145 molare (M) NaCl, 0,01 M Kaliumphosphat, pH 7,2, Fa. GIBCO, Life Technologies, Leopoldshafen, Deutschland) und eine 5- minütige Zentrifugation bei 1700 Umdrehungen/ Minute (U/min). Der so entstandene Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet zur Zellfixierung in 500µl einer 1% Paraformaldehyd (PFA)- Lösung resuspendiert und bis zur Messung, die innerhalb der nächsten 12 Stunden erfolgte, im Kühlschrank bei 4° C aufbewahrt.

Zur Analyse der verschiedenen Lymphozyten Populationen wurde ein Fenster auf alle CD3 positiven (+) Zellen gesetzt und in dieser Population weiter selektiv die prozentualen Anteile der CD4+, CD8+, CD69+ und CD4+CD28- Zellen kalkuliert. Die

---

Analyse wurde beendet wenn 10.000 CD3+ Zellen detektiert waren. Die Ergebnisse sind jeweils als prozentuale Anteile an allen CD3+ Zellen angegeben.

Um die Antigendichte des CXCR3- bzw. CCR3- Rezeptors auf aktivierten T- Lymphozyten zu bestimmen, wurde im 2-Farben-Dot-Plot ein Fenster auf alle CD3 und CD69 doppelt positiven Zellen gesetzt und in dieser Subpopulation die Expression der beiden Chemokinrezeptoren analysiert. Die Messung wurde beendet wenn 3.000 CD69+CD3+ Zellen erfasst waren. Die spezifische Antigen-Expression wurde durch Bildung der Differenz zwischen den mittleren Fluoreszenzintensitäten der spezifischen mAb- Färbung und der isotypischen Kontroll-Färbung berechnet. Die Ergebnisse sind jeweils als spezifische mittlere Fluoreszenzintensitäten (sMFI) in Kanälen angegeben.

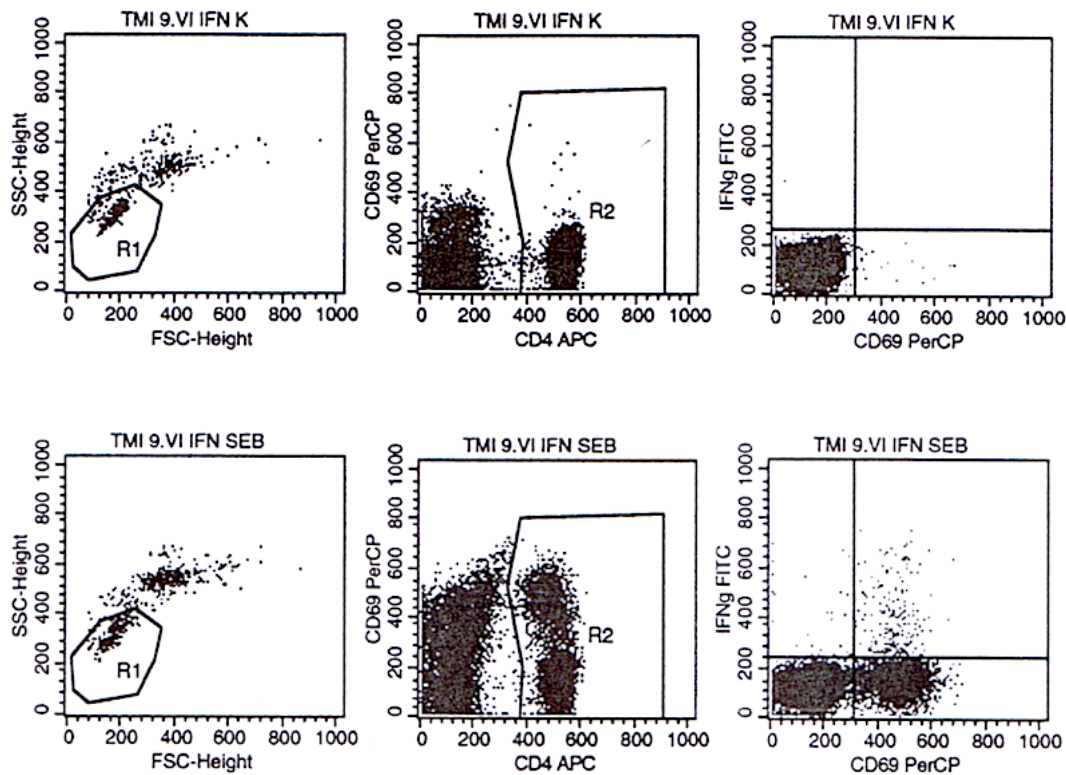
### **3.1.3.2 Intrazytoplasmatische Zytokin- Färbung**

Unmittelbar nach der Abnahme wurden 500µl des heparinisierten Vollblutes in ein Polypropylenröhrchen (Becton Dickinson, San Jose, USA) überführt und mit 500µl eines RPMI-Zellvollmediums (Sigma-Aldrich, St. Louise, USA) durchmischt. Anschließend wurden 20 µl Staphylococcus Enterotoxin B (SEB)- Lösung (Sigma-Aldrich, St. Louise, USA) oder CMV- Lysat (Advanced Biotechnologies, Maryland, USA) bzw. Chlamydienlysat (eigene Herstellung) zugegeben. Nach dem gleichen Verfahren, jedoch ohne Zugabe von SEB- Lösung oder CMV- bzw. Chlamydien-Lysat, wurde ein weiteres Polypropylenröhrchen befüllt und als Kontrolle gekennzeichnet. Daraufhin wurden die Proben bei 37°C für 19 Stunden inkubiert. Nach 19 Stunden im Inkubator wurden die Proben mit jeweils 20µl einer 10% Brefeldin A (BFA)- Lösung (Epicenter Technologies, Madison, WI, USA) beimpft, wodurch die Exozytose der während der Inkubationszeit neu synthetisierten Zytokine aus dem Golgi- Apparat verhindert werden kann (Klausner et al 1992). Nach weiteren 5 Stunden im Inkubator konnte mit der eigentlichen Zytokin-Färbung begonnen werden.

Von den stimulierten Proben sowie der Kontrollprobe wurden jeweils 200 µl in zwei FACS- Röhrchen pipetiert und nach einem Waschschrift mit PBS und folgender Zentrifugation bei 1700 U/min für 5 Minuten mit 5 µl eines PerCP gefärbten anti CD69 AK (Becton Dickinson, San Jose, USA) sowie 2,5 µl eines APC gefärbten

---

anti CD4 AK (Becton Dickinson, San Jose, USA) für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe einer 10% FACS Lysing- Solution zur Lyse der Erythrozyten mit anschließender 10 minütiger Inkubation bei 37° C und einem weiteren Waschschrift mit PBS und anschließender Zentrifugation bei 1700 U/min für 5 Minuten, erfolgte die Resuspension des Zellpellets in jeweils 500 µl Cytofix/ Cytoperm- Lösung (PharMingen, Becton Dickinson, San Jose, USA) mit darauf folgender 20 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss, wodurch die Zellen in einem Schritt fixiert und permeabilisiert werden konnten. Um die für die anschließende Färbung so zugänglich gemachten Zytokine in Lösung zu halten, wurden zwei Waschschriffe mit 10% Perm/ Wash- Lösung (PharMingen, Becton Dickinson, San Jose, USA) und anschließender Zentrifugation bei 1700 U/min für 5 Minuten vorgenommen, wobei die Zellen beim zweiten Waschschrift erneut für 10 Minuten in der Perm/ Wash- Lösung inkubiert wurden. Anschließend wurden die Zellpellets der mit SEB stimulierten Probe in 80 µl Perm/ Wash Lösung resuspendiert und 10 µl eines FITC gefärbten anti IFN- $\gamma$  AK (Becton Dickinson, San Jose, USA) sowie 10 µl eines PE gefärbten anti IL-4 AK (Becton Dickinson, San Jose, USA) zugegeben. Die unstimulierte Kontrollprobe wurde in 90 µl Perm/ Wash- Lösung resuspendiert und zur Detektion unspezifischer AK- Bindung mit je 3 µl eines FITC- und eines PE gefärbten anti IgG<sub>1</sub> AK (Becton Dickinson, San Jose, USA) gefärbt. Diesem Schritt schloss sich eine 20- minütige Inkubation bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss an, gefolgt von einem letzten Waschschrift und anschließender Zentrifugation bei 1700 U/min für 5 Minuten. Letztlich wurden die Zellen in 500 µl PFA fixiert und bis zur Messung im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Während der FACS- Analyse wurde im 2-Farben-Dot-Plot ein Fenster auf alle CD4 und CD69 doppelt-positiven Zellen gesetzt und in dieser Subpopulation die Expression der beiden Zytokine analysiert (siehe Abbildung 4). Die Analyse wurde beendet wenn 10.000 CD4+CD69+ Zellen detektiert waren. Die Ergebnisse sind jeweils als prozentuale Anteile an allen CD4+CD69+ Zellen angegeben.



**Abb 4:** Gezeigt werden Beispielbilder der im Text beschriebenen FACS- Analyse der intrazytoplasmatischen Zytokin-Färbung mit der unstimulierten Kontrollprobe (obere Reihe) und nach SEB-Stimulation (untere Reihe). Das linke Bild zeigt die Auswahl der durch den Forward- und Sideward- Scatter selektierten Leukozyten. Im mittleren Bild werden im Fenster R2 die Zellen ausgewählt, die das CD4- Oberflächenmolekül tragen. Die Selektion auf das rechte obere Fenster, im Bild rechts, mißt die Zahl der CD69 und IFN- $\gamma$  positiven CD4+ Zellen.

### 3.1.4 Datenverarbeitung

Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Cell Quest Research Software (Becton-Dickinson, San Jose, USA). Die Daten wurden als zweidimensionale Punktdiagramme (dot-plots) oder als eindimensionale Histogramme dargestellt und analysiert. In den Punktdiagrammen repräsentiert jeder Punkt eine Zelle. Durch das Setzen von Analysefenstern konnte die Expressionsanalyse auf bestimmte Zellpopulationen, wie oben bereits geschildert, beschränkt werden.

---

### 3.2 Immunadsorptionsnachweis von RANTES, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 und IL-12 p70

Zur Bestimmung der Konzentration von IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 und IL-12p70 wurde mit dem Human inflammation- Cytometric Bead Array (CBA) (Becton-Dickinson, San Jose, USA) ein Verfahren genutzt, das die Durchflusszytometrie mit Fluoreszenzdetektion und einen enzymgekoppelten Immunadsorptionstest (Enzyme-linked Immuno Sorbent Essay, ELISA) miteinander verbindet. Dabei lassen sich in einer Probe multiple Zytokine bestimmen. Für die Bestimmung von RANTES im Serum der Proben wurde ein ELISA durchgeführt (Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, USA), auf dessen Basis auch die Bestimmung des Human inflammation- CBA beruht. Dabei wird im ersten Schritt die Probe zu einem monoklonalen Antikörper gegen das jeweilige Interleukin pipettiert und in einem zweiten Schritt nach Zugabe eines enzymmarkierten polyklonalen Antikörpers ein Sandwichkomplex ausgebildet. Mit Zugabe einer chromogenen Lösung wird ein enzymabhängiger Farbwechsel erreicht, dessen Absorption bei 450nm mittels Glasfaseroptik gemessen werden kann. Die Farbintensität ist dabei proportional der in der Probe gebundenen Antikörper und somit der Interleukinmenge. Der Human Inflammation- CBA basiert auf sechs Bead Populationen mit unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten. Nach Inkubation der Proben mit den PE-konjugierten Detektionsantikörpern bilden sich Sandwich-Komplexe zwischen den Capture-Antikörpern, den Zytokinen und den Detektions-Antikörpern aus. Die gemischten Bead Populationen können im Durchflusszytometer im Fluoreszenzkanal FL-3 diskriminiert werden, während die Fluoreszenzintensität im Fluoreszenzkanal FL-2 die Menge der jeweiligen Zytokine widerspiegelt. Zusammen mit einer Eichreihe können so die Zytokin-Konzentrationen im Kultur-Überstand berechnet werden. Abbildung 5 stellt eine exemplarische Eichkurve der Zytokine dar. Die Auswertung am Computer erfolgte mit Hilfe der Becton Dickinson Cell Quest- und CBA- Software. Die Detektionsgrenzen der einzelnen Zytokine lagen bei 8 pg/ml für RANTES, 7,2 pg/ml für IL-1 $\beta$ , 2,5 pg/ml für IL-6, 3,3 pg/ml für IL-10 und 1,9 pg/ml für IL-12 p70.

## BD Cytometric Bead Array Analysis

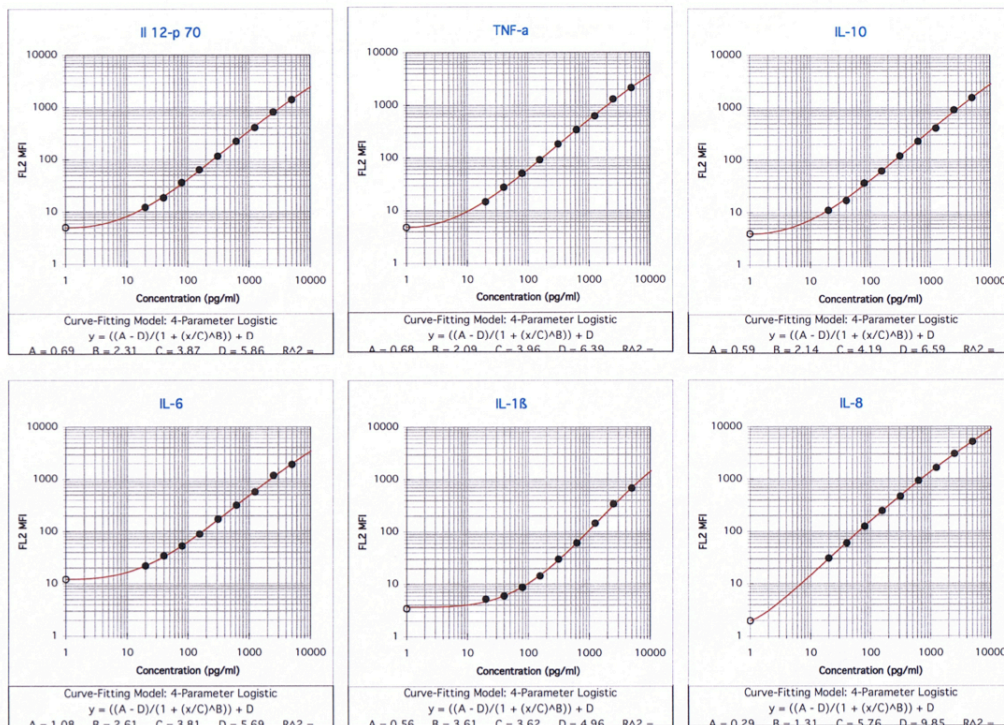


Abb 5: Exemplarische Eichreihe der durch Human inflammation- CBA ermittelten Zytokine.

### 3.3 Andere Methoden

Die Bestimmung des Differentialblutbilds und der Konzentration der Kreatinkinase (CK) wurden im Routinelabor der klinischen Chemie der Institution durchgeführt. Es konnte keine Kontamination weder der Leukozytensuspensionen noch der Puffer festgestellt werden (E-toxate, Sigma-Aldrich, St. Louise, USA).

### 3.4 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse wurden, soweit nicht anders beschrieben, als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Unterschiede zwischen mehr als zwei Variablen wurden durch den Friedmann's Test, gefolgt vom Wilcoxon's Paarvergleichs- Rang Test und Unterschiede zwischen den Gruppen mittels der Mann- Whitney- Wilcoxon Rangsumme analysiert. Korrelationen zwischen den Parametern wurden mittels der linearen Regressionsanalyse berechnet. Unterschiede zwischen drei Variablen wurden mittels ANOVA (SPSS Version 8.0) analysiert. Ein p-Wert im zweiseitigen Test kleiner als 0,05 wurde als signifikant betrachtet.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1 Demographische Daten der Studienpopulationen**

Insgesamt wurden 73 Patienten in die Studie eingeschlossen. Wie aus Tab. 3 ersichtlich unterschieden sich die Studienpopulationen nicht signifikant in Bezug auf Alter, Geschlecht, Risikofaktoren und Ausmaß der koronaren Herzkrankheit. Während Patienten mit sAP und iAP vergleichbare Mengen an ACE (Angiotensin-converting Enzyme)- Inhibitoren und Statinen einnahmen, erhielten diese Medikation signifikant weniger Patienten in der AMI Gruppe. Die Plasma CK- Spiegel waren bei Patienten mit AMI signifikant erhöht. Zudem wiesen Patienten mit AMI und iAP signifikant höhere Konzentrationen an CRP bei Aufnahme in die Klinik auf im Vergleich zur iAP Gruppe.

	AMI	iAP	sAP
Anzahl Patienten	n=39	n=13	n=20
Alter $\pm$ SEM	62,5 $\pm$ 1.8	63,3 $\pm$ 3.5	68 $\pm$ 1,7
Geschlecht m/w	28/11	9/5	16/4
<i>Risikofaktoren:</i>			
Diabetes mellitus	11 (28%)	4 (31%)	4 (20%)
Hypertonie	31 (79%)	12 (92%)	16 (80%)
Hypercholesterinämie	31 (79%)	11 (85%)	15 (75%)
Nikotinabusus	9 (23%)	3 (23%)	4 (20%)
<i>Zahl der betroffenen Gefäße:</i>			
1- Gefässerkrankung	15 (39%)	4 (31%)	6 (30%)
2- Gefässerkrankung	15 (39%)	5 (39%)	5 (25%)
3- Gefässerkrankung	9 (23%)	5 (39%)	6 (20%)
<i>Betroffenes Gefäß:</i>			
LAD	21 (54%)	9 (69%)	12 (60%)
LCX	5 (13%)	5 (38%)	5 (25%)
RCA	16 (41%)	3 (23%)	9 (45%)
<i>Medikation bei Aufnahme:</i>			
Aspirin	39 (100%)	12 (92%)	18 (90%)
Statine	6 (15%)	8 (62%)	13 (60%)
ACE- Inhibitoren	11 (28%)	10 (77%)	14 (70%)
CKmax (U/l)	1275,5 (234-7700)	128 (26-686)	112 (55-182)
CRP (mg/l) $\pm$ SEM	21,8 $\pm$ 5,4	14,4 $\pm$ 2,6	5,6 $\pm$ 1,0

**Tab. 3** : demographische und angiographische Daten der Studienpopulation. Aufgeführt sind jeweils n (%) soweit nicht anders angegeben. ACE= Angiotensin converting enzyme; CK= Creatin Kinase; CRP= C-reaktives Protein bei Aufnahme; LAD= left anterior descending coronary artery; LCX= left circumflex coronary artery; RCA= right coronary artery



## 4.2 Differentialblutbild der Studienpopulationen

Die Gesamtzahl der im Blut zirkulierenden Leukozyten war bei AMI Patienten signifikant erhöht im Vergleich zu Patienten mit iAP und sAP. Dies ist auf eine Erhöhung der Zahl der zirkulierenden neutrophilen Granulozyten zurückzuführen, während die absoluten Zahlen der Lymphozyten, CD3+, CD4+ und CD8+ T- Zellen bei AMI, iAP und sAP keine signifikanten Differenzen aufwiesen (Tabelle 4).

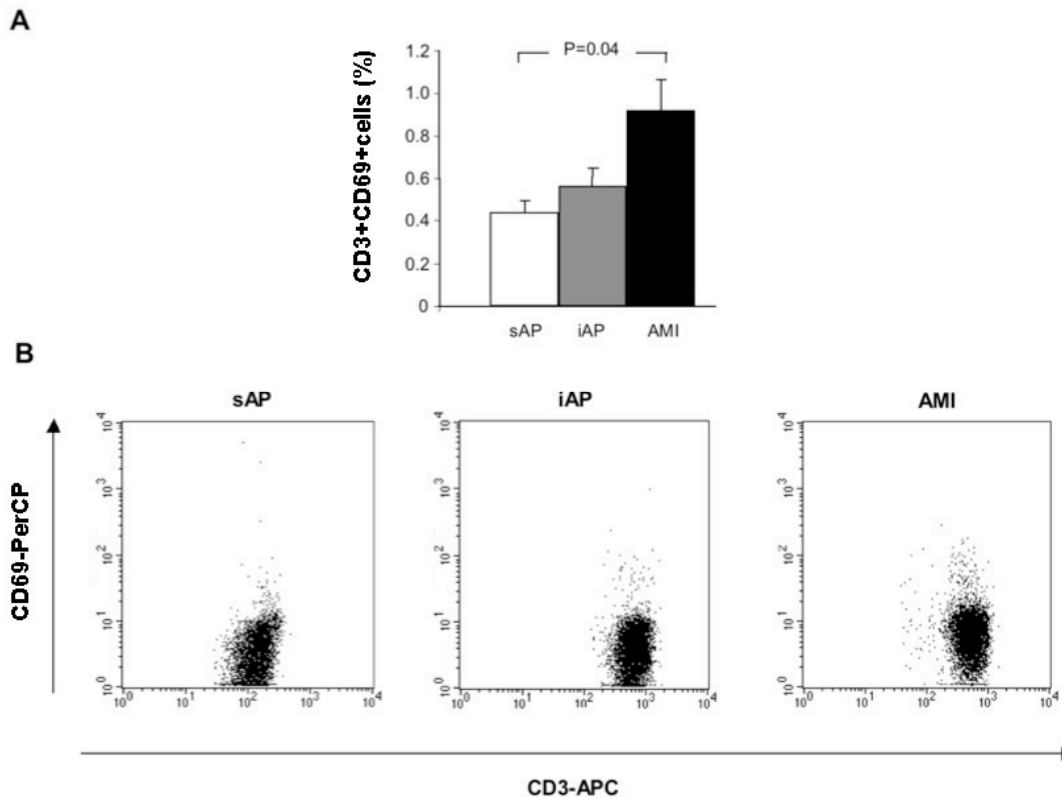
	AMI	iAP	sAP
Thrombozyten (G/l)	215,6 ±9,9	253,3 ±19,6	203,2 ±64,4
Leukozyten (G/l)	12,1 ±0,8	9,0 ±0,6	6,0 ±5,9
Neutrophile (%) (Zellen/μl)	76,1 ±1,9 9697 ±821	68,7 ±2,1 6236 ±487	61,8 ±8,1 4170 ±2112
Monozyten (%) (Zellen/μl)	6,9 ±0,45 798 ±56	9,0 ±7,6 701 ±67	8,2 ±3,7 511 ±204
Lymphozyten (%) (Zellen/μl)	16,3 ±1,6 1766 ±155	20,4 ±1,8 1810 ±188	26,0 ±5,8 1688 ±701
CD3+ T- Zellen (Zellen/μl)	991 ±92,4	985 ±70,4	1101 ±70,9
CD4+ T- Zellen (%)	72,9 ±6,7	67,6 ±12,0	64,4 ±8,7
CD8+ T- Zellen (%)	25,8 ±6,4	29,5 ±9,6	33,4 ±8,7

**Tab. 4** : Differentialblutbild der Studienpatienten. Angegeben sind jeweils Mittelwerte mit SEM.

---

### 4.3 Expression des frühen Aktivierungsmarkers CD69

Um die T- Zellaktivierung im peripheren Blut der Patienten zu untersuchen, analysierten wir die Expression des Antigens CD69, das erst nach Zellaktivierung von T- Lymphozyten auf der Oberfläche exprimiert wird. Hierbei bestimmten wir den prozentualen Anteil CD69 positiver Zellen an allen zirkulierenden CD3+ Zellen. Während sich bei Patienten mit sAP und iAP vergleichbare Prozentsätze an CD69+ Zellen bezogen auf alle zirkulierenden CD3+ Zellen fanden, wiesen Patienten mit AMI eine signifikant erhöhte Zahl an CD69+ T- Lymphozyten im peripheren Blut verglichen zu Patienten mit sAP ( $p = 0,04$ ) auf. In Abbildung 6A sind die jeweiligen Mittelwerte  $\pm$  SEM aufgetragen. Zur Analyse wurde durch Setzen eines selektiven Auswertefensters auf die CD3- exprimierenden Zellen die Gesamtzahl der T- Zellen identifiziert und auf die simultane Expression des CD69- Antigens hin untersucht. Abbildung 6B zeigt repräsentative Dotplot- Analysen jeweils eines Patienten mit AMI, iAP und sAP, wobei die CD69- Expression gegen die CD3- Expression aufgetragen ist. Bei dem Patienten mit AMI lässt sich im Gegensatz zu den Patienten mit sAP und iAP eine signifikant erhöhte Anzahl von CD3+CD69+ Zellen nachweisen.

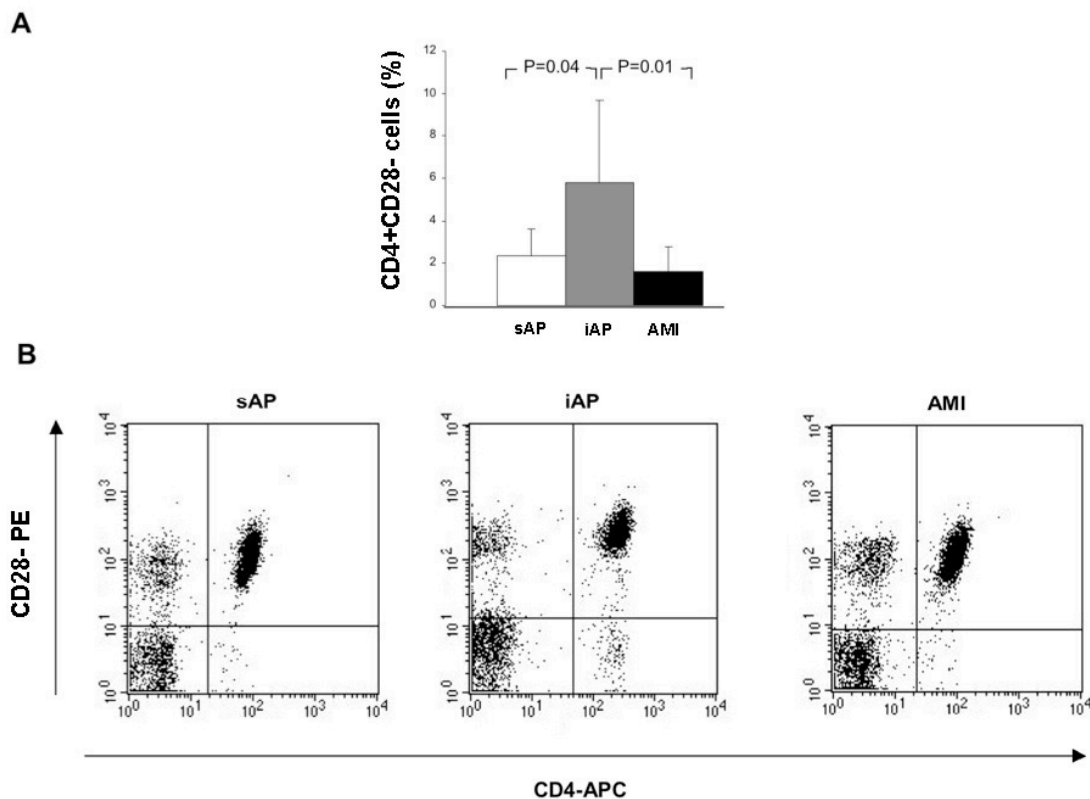


**Abb. 6: Zirkulierende aktivierte T- Zellen bei Patienten mit sAP und ACS.** In Vollblutproben von Patienten mit sAP (n=20), iAP (n=13) und AMI (n=39) wurde die Oberflächenexpression des frühen Aktivierungsmarkers CD69 auf CD3+ T- Lymphozyten mittels Durchflusszytometrie bestimmt. (A) angegeben sind jeweils die Prozentsätze als Mittelwerte  $\pm$ SEM. P-Werte zeigen die statistische Signifikanz. (B) Repräsentative Immunfluoreszenz- Analysen von Patienten mit sAP, iAP und AMI. Jeder Dot Blot zeigt 10.000 CD3 positive Zellen.

#### 4.4 Zirkulierende CD4 positive CD28 negative T- Zellen

Um die Immunantwort im ACS weiter zu charakterisieren, analysierten wir eine Subpopulation von T- Zellen, die sich durch die Expression von CD4 sowie das Fehlen des Antigens CD28 auf Ihrer Oberfläche auszeichnet. Diese Population sezerniert im Rahmen einer Immunantwort große Mengen an IFN- $\gamma$  und besitzt, wie aus in vitro und in vivo Experimenten bekannt, ein hohes proinflammatorisches sowie gewebeschädigendes Potential. Wiederum wurde der prozentuale Anteil CD28 negativer sowie CD4 positiver (CD4+CD28-) Zellen an allen zirkulierenden CD3 exprimierenden Zellen bestimmt. Bei Patienten mit iAP war eine signifikante Expansion dieser CD4+CD28- Population verglichen mit Patienten mit AMI (p=0,01) und sAP (p=0,04) zu beobachten. Zwischen den Patienten mit AMI und sAP konnte hingegen kein signifikanter Unterschied in den prozentualen Anteilen von

CD4+CD28- Zellen an allen CD3+ T- Zellen festgestellt werden. Abbildung 7A zeigt die jeweiligen Mittelwerte  $\pm$  SEM, während in 7B die Expression des CD4 Antigens gegen den CD28 Marker in der Population aller CD3 positiver Zellen, die durch vorheriges Setzen eines Auswertefensters selektioniert wurden, dargestellt ist. Nur der Patient mit iAP zeigt eine Zellpopulation im rechten unteren Quadranten, diese Zellen weisen eine deutliche Expression des CD4 Markers und eine fehlende Expression des CD28 Markers auf (Abbildung 7B).



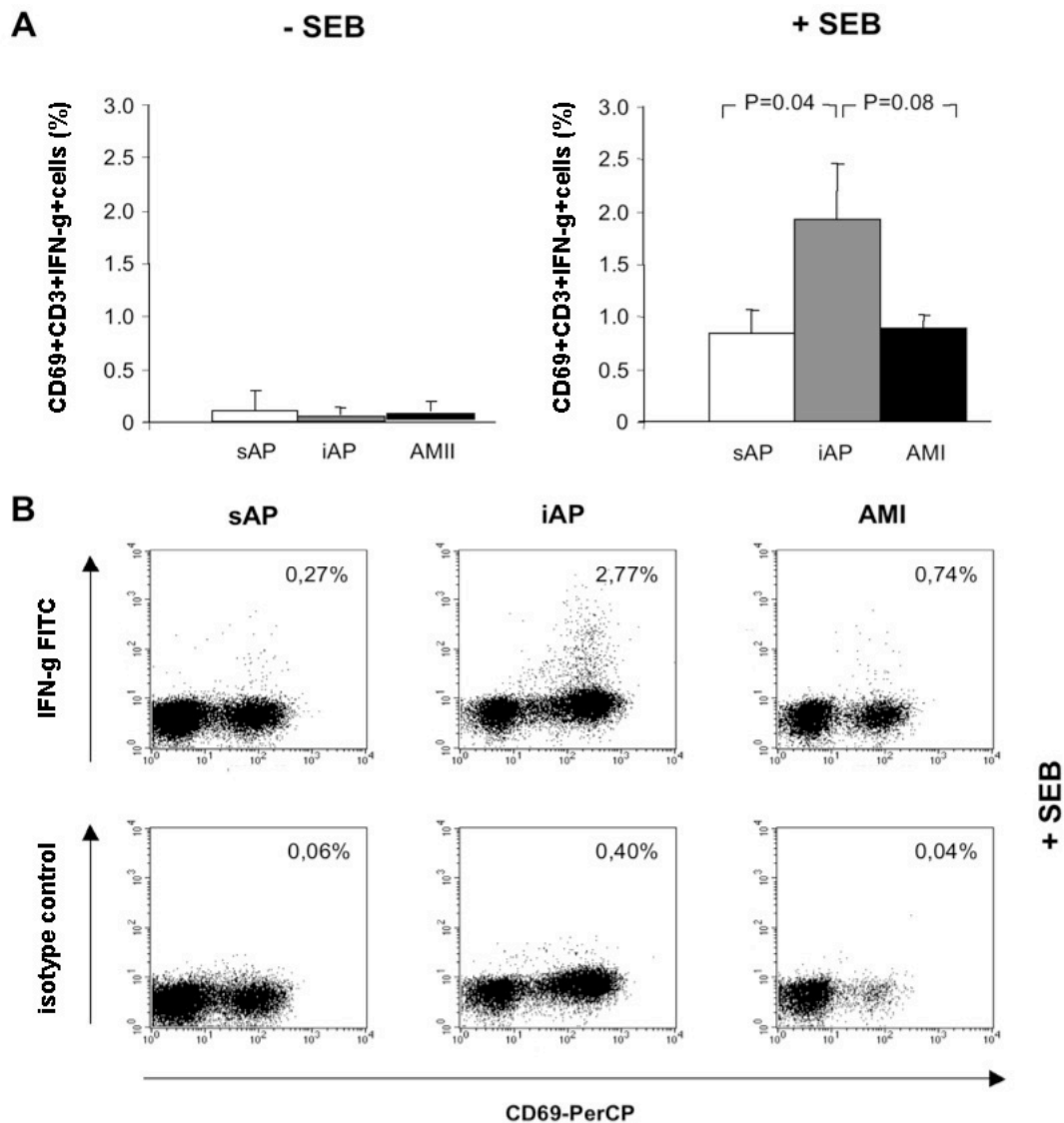
**Abb. 7: Zirkulierende CD4+CD28- Zellen bei Patienten mit sAP und ACS.** In Vollblutproben von Patienten mit sAP (n=20), iAP (n=13) und AMI (n=39) wurde der Anteil der CD4 positiven CD28 negativen Zellen an allen CD3 tragenden Zellen mittels Immunfluoreszenzanalyse bestimmt. (A) angegeben sind jeweils die Prozentsätze als Mittelwerte  $\pm$ SEM. P-Werte zeigen die statistische Signifikanz. (B) Repräsentative Immunfluoreszenz-Analysen von Patienten mit sAP, iAP und AMI. Jeder Dot Blot zeigt 10.000 CD3 positive Zellen.

---

#### 4.5 IFN- $\gamma$ - und IL-4- Produktion nach in vitro Stimulation mit SEB- und CMV-Antigen

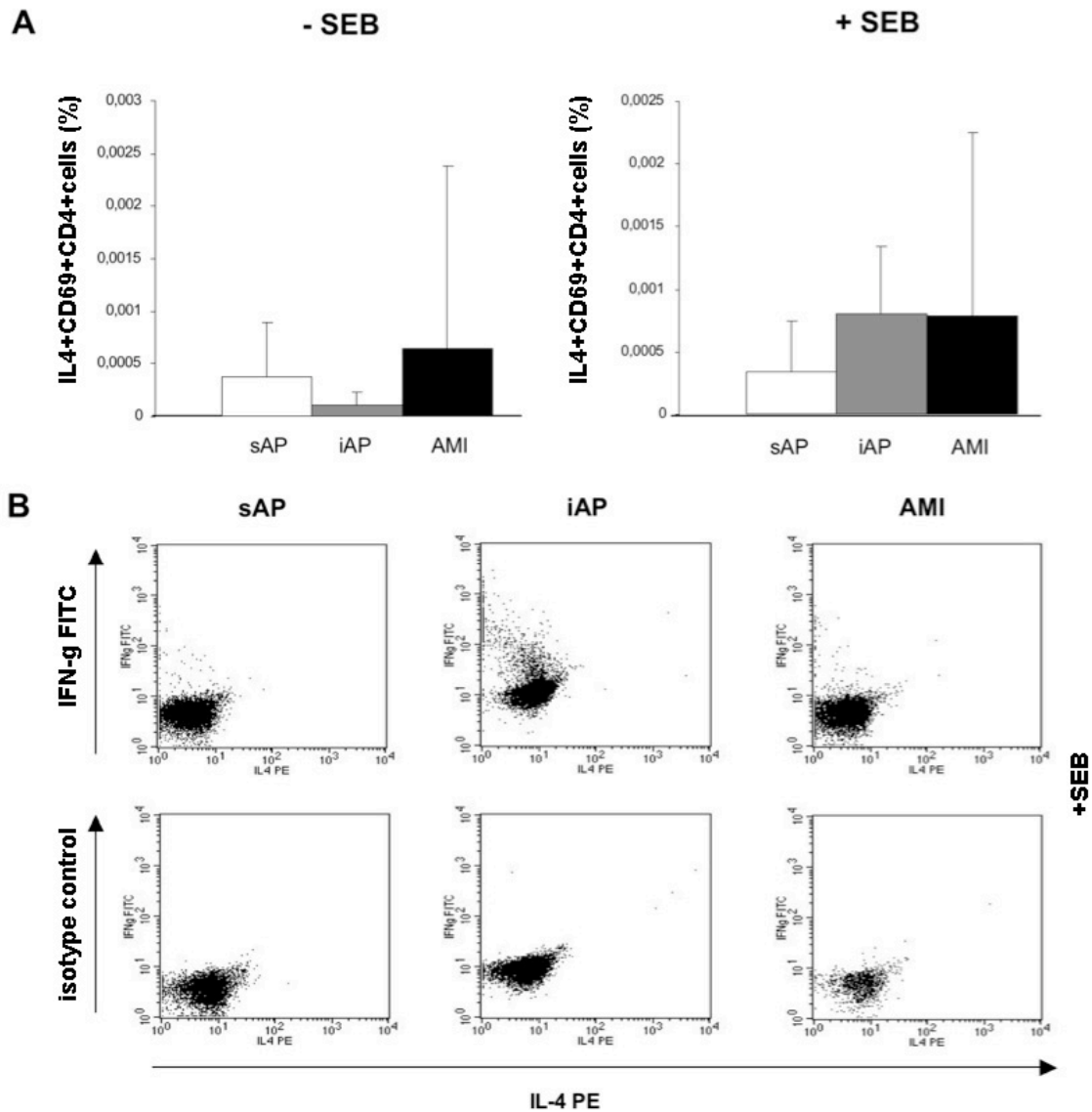
Eine T- Zellaktivierung ist prinzipiell Folge eines Kontaktes der T- Zelle mit dem für sie spezifischen Antigen. Hierdurch wird eine Reihe von zellulären Abläufen in Gang gesetzt, insbesondere erwirbt die T- Zelle die Fähigkeit zur Sekretion von Zytokinen. Um die T- Zellen in diesem Sinne weiter funktionell zu analysieren, bedienen wir uns des Superantigens SEB. SEB quervernetzt Teile des T- Zellrezeptors (CD3) mit MHC2- Molekülen auf APZ und simuliert hierdurch der T- Zelle einen Antigenkontakt. Mittels intrazytoplasmatischer Zytokinfärbung bestimmten wir schließlich nach Stimulation mit SEB die prozentualen Anteile CD69 positiver, IFN- $\gamma$  bzw. IL-4 produzierender Zellen an allen CD4 positiven Zellen.

Bei Patienten mit iAP kam es zu einer signifikanten Expansion aktivierter, IFN- $\gamma$  produzierender CD69+ T- Helferzellen nach Stimulation mit SEB. Im Vergleich zu Patienten mit AMI ( $p=0,08$ ) und sAP ( $p=0,04$ ), wohingegen sich ohne Stimulation kein Unterschied zwischen den Gruppen zeigte. Abbildung 8A gibt die jeweiligen Mittelwerte  $\pm$  SEM der prozentualen Anteile der IFN- $\gamma$ +CD69+CD4+ Zellen mit bzw. ohne SEB- Stimulation wieder. 8B zeigt 3 repräsentative Färbungen jeweils eines Patienten mit sAP, iAP und AMI. Es ist jeweils die CD69- Expression gegen die IFN- $\gamma$ - Expression in der Population der CD4 positiven Zellen aufgetragen. Nur bei dem Patienten mit iAP lässt sich eine deutliche Population an Zellen nachweisen die sowohl CD69 exprimieren als auch IFN- $\gamma$  produzieren. Die untere Reihe zeigt die isotypische Kontrollfärbung mit einem irrelevanten Antikörper und somit die Spezifität der IFN- $\gamma$ - Färbung.



**Abb. 8: IFN- $\gamma$ +CD69+CD4+ Zellen nach Stimulation mit SEB bei Patienten mit AMI, iAP und sAP.** Nach Stimulation von Vollblut mit SEB wurde der prozentuale Anteil von IFN- $\gamma$  produzierenden CD69 positiven Zellen an allen CD4+ Zellen mittels intrazytoplasmatischer IFN- $\gamma$ - Färbung bestimmt. (A) angegeben sind jeweils die Prozentsätze als Mittelwerte  $\pm$ SEM. P-Werte zeigen die statistische Signifikanz. (B) Repräsentative Immunfluoreszenz Analysen von Patienten mit sAP, iAP und AMI. Jeder Dot Blot zeigt die IFN- $\gamma$ - und CD69- Expression von 10.000 CD4+ positiven Zellen nach Stimulation mit SEB. Die obere Reihe zeigt die spezifische Färbung, die untere Reihe die entsprechende Isotyp Kontrolle an.

Bei der Produktion des TH2 spezifischen Zytokins IL-4 zeigten sich im Gegensatz hierzu sowohl mit als auch ohne SEB keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen (Abbildung 9). Es fanden sich kaum IL-4 oder IFN- $\gamma$ /IL-4 produzierende Zellen. Die spezifische Lymphozytenantwort bei iAP zeigt also eine TH1-Polarisierung, die bedingt durch die begrenzte Inkubationszeit überwiegend eine Immunantwort durch sensibilisierte Gedächtnis- T- Helferzellen reflektiert.



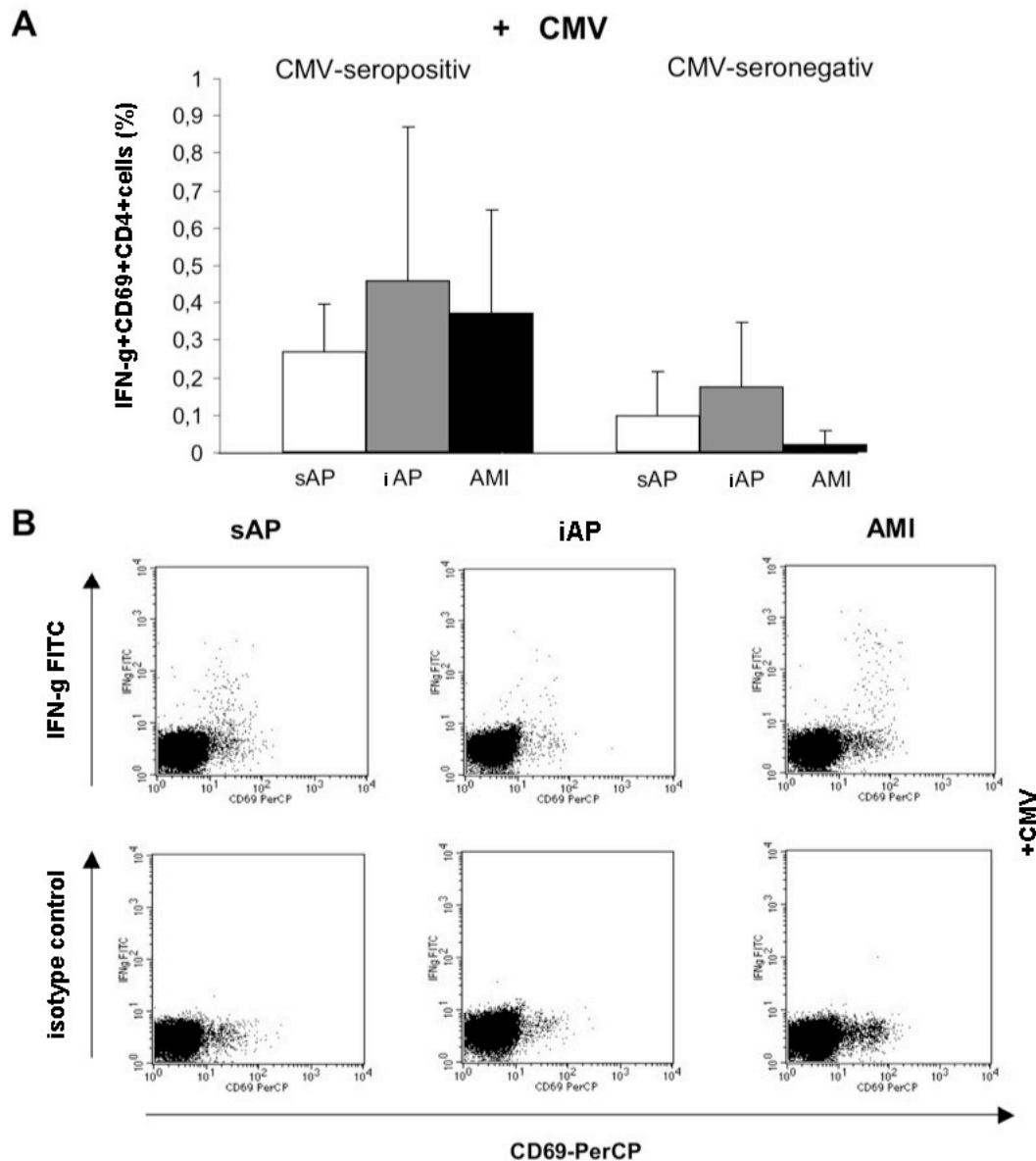
**Abb. 9: IFN- $\gamma$ +IL-4+CD69+CD4+ Zellen nach Stimulation mit SEB bei Patienten mit AMI, iAP und sAP.** Nach Stimulation von Vollblut mit SEB wurde der prozentuale Anteil von IL-4 und IFN- $\gamma$  produzierenden CD69 positiven Zellen an allen CD4+ Zellen mittels intrazytoplasmatischer IL-4- und IFN- $\gamma$ - Färbung bestimmt. (A) angegeben sind jeweils die Prozentsätze als Mittelwerte  $\pm$ SEM. (B) Repräsentative Immunfluoreszenz- Analysen von Patienten mit sAP, iAP und AMI. Jeder Dot Plot zeigt die IFN- $\gamma$ - und IL-4- Expression von 10.000 CD4+CD69+positiven Zellen. Die obere Reihe zeigt die spezifische Färbung, die untere Reihe die entsprechende Isotyp Kontrolle an.

Um das spezifische Antigen gegen das die zirkulierenden TH1- Zellen gerichtet sind genauer zu charakterisieren, führten wir darüber hinaus Stimulationen mit CMV- und Chlamydien- Lysaten durch. Hier zeigten sich keine Unterschiede bezüglich der Anzahl IFN- $\gamma$  produzierender, antigenspezifischer aktivierter T- Helferzellen zwischen den Patientengruppen. Die Ergebnisse der Stimulation mit CMV-Lysat sind in Abbildung 10 dargestellt. Es wurde jeweils zwischen CMV seropositiven und

---

CMV seronegativen Patienten, in Abhängigkeit vom Vorhandensein anti-CMV gerichteter Antikörper der Klasse IgG im Serum der Patienten, unterschieden. Dadurch konnte ermittelt werden, ob die Patienten eine CMV- Infektion durchgemacht haben, d.h. bereits schon einmal Kontakt zu dem Antigen hatten. Die CMV- Seropositivität in den Gruppen lag zwischen 36 und 46% (sAP: 8/20, iAP: 6/13, AMI 14/39). Bei CMV seropositiven Patienten fand sich ein höherer Anteil IFN- $\gamma$  produzierender T- Zellen, jedoch wie den Mittelwerten der Abb. 10A zu entnehmen ist kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen, wofür auch die geringe Gruppengröße verantwortlich sein könnte. Abbildung 10B zeigt wiederum repräsentative Immunfluoreszenz- Analysen jeweils eines seropositiven Patienten mit sAP, iAP und AMI.



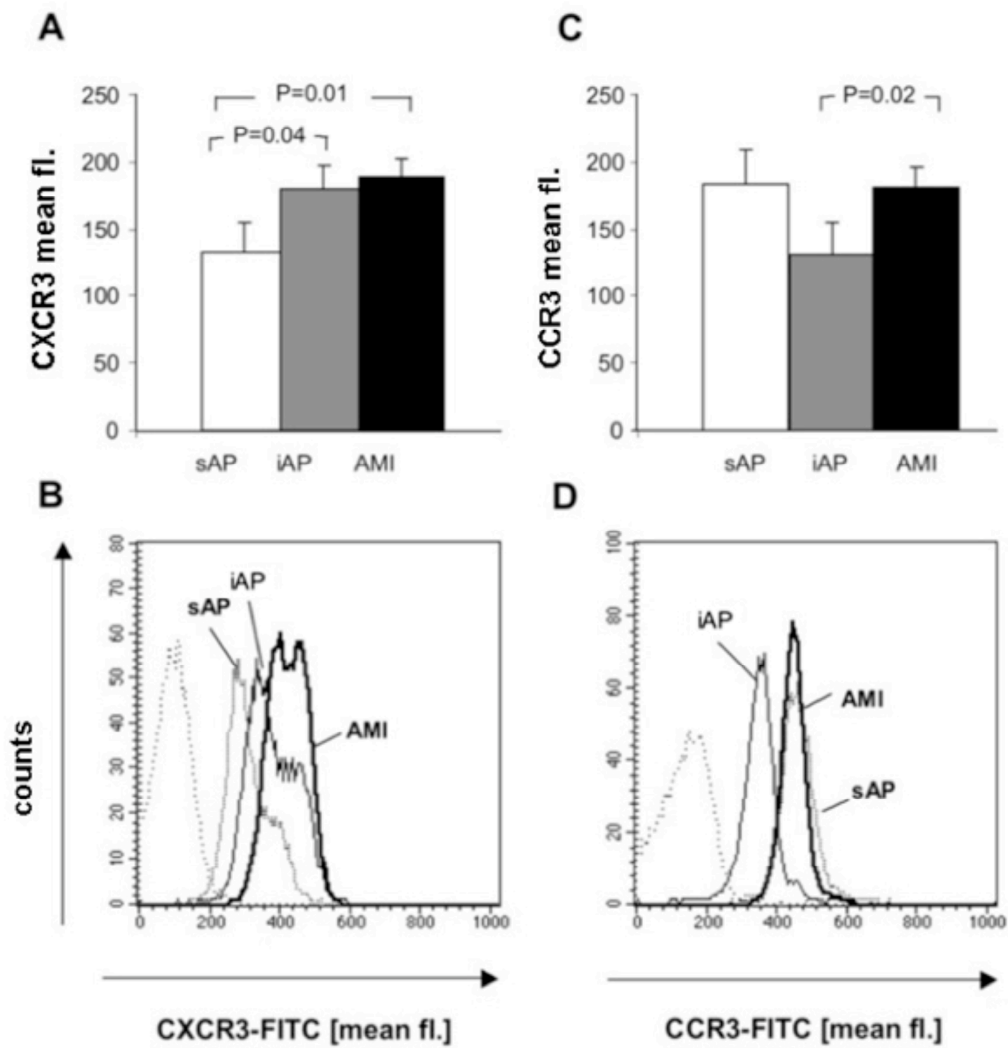


**Abb. 10: IFN- $\gamma$ +CD69+CD4+ Zellen nach Stimulation mit CMV- Antigen bei Patienten mit AMI, iAP und sAP.** (A) Nach Stimulation von Vollblut mit CMV- Lysaten wurde der prozentuale Anteil von IFN- $\gamma$  produzierenden CD69 positiven Zellen an allen CD4+ Zellen mittels intrazytoplasmatischer IFN- $\gamma$ - Färbung bestimmt. In Abhängigkeit vom Nachweis von anti-CMV IgG Antikörpern im Plasma der Patienten wurden die Patienten in CMV seropositiv (links) und CMV seronegativ (rechts) unterteilt; angegeben sind jeweils die Prozentsätze als Mittelwerte  $\pm$ SEM. (B) Repräsentative Immunfluoreszenz- Analysen von Patienten mit sAP, iAP und AMI. Jeder Dot Blot zeigt die IFN- $\gamma$ - und CD69- Expression von 15.000 CD4+ positiven Zellen. Die obere Reihe zeigt die spezifische Färbung, die untere Reihe die entsprechende Isotyp Kontrolle jeweils eines CMV seropositiven Patienten an.

---

#### 4.6 Verteilungsmuster der Chemokinrezeptoren CXCR3 und CCR3 auf aktivierten T- Lymphozyten

Neben der differentiellen Zytokinproduktion, unterscheiden sich die TH1- und TH2- Subpopulation auch in Bezug auf die Expression einiger Chemokinrezeptoren. Da in den vorherigen Experimenten eine Stimulation des Blutes und somit mögliche ex vivo- Alterationen der Zellen nicht auszuschließen sind, analysierten wir im weiteren in Vollblutproben der Patienten die Expression der beiden Chemokinrezeptoren CXCR3 und CCR3 durch direkt markierte Antikörper. Hierbei wurden die Antigendichten für die beiden Rezeptoren auf aktivierten T- Zellen, d.h. CD3+CD69+ Zellen, bestimmt. Sowohl bei Patienten mit AMI, als auch bei Patienten mit iAP konnte eine verstärkte Expression des CXCR3- Rezeptors auf zirkulierenden CD69+CD3+ Lymphozyten im Vergleich zur Patientengruppe mit sAP nachgewiesen werden ( $p = 0,01$ , bzw.  $p = 0,04$ ). Die Ergebnisse sind jeweils als spezifische mediane Fluoreszenzintensitäten (sMFI) angegeben (Abbildung 11A), wobei die sMFI der Differenz aus spezifischer Färbung und isotypischer Färbung entspricht. Abbildung 11B zeigt jeweils als Histogramm dargestellte, repräsentative Immunfluoreszenzanalysen von 3 Patienten mit AMI, sAP und iAP. Auf der x-Achse ist die Fluoreszenzintensität der CXCR3- Expression in Kanälen angegeben, auf der y-Achse die Zellzahl. Im Vergleich zur isotypischen Kontrollfärbung (gepunktete Linie) finden sich bei dem Patienten mit AMI, wie die am weitesten rechts zu liegen kommende Kurve zeigt (dicke schwarze Linie), die höchsten CXCR3- Antigendichten auf aktivierten T- Zellen. Ein Ungleichgewicht in Richtung einer verstärkten TH1- Antwort bei iAP konnte desweiteren durch eine verminderte CCR3- Expression bei Patienten mit iAP im Vergleich zu AMI ( $p = 0,02$ ) beobachtet werden (Abbildung 11C mit Mittelwerten  $\pm$ SEM). Abbildung 11D zeigt eine repräsentative Histogrammauswertung der CCR3- Expression eines Patienten mit AMI, iAP und sAP.

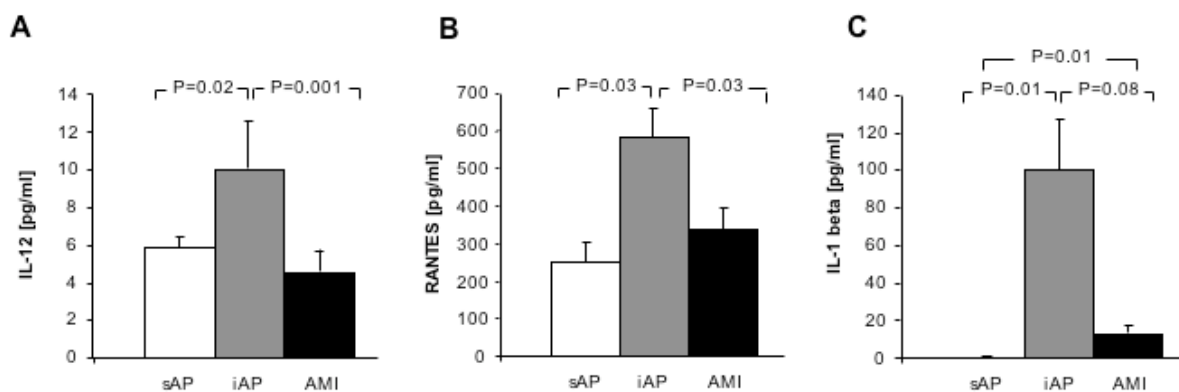


**Abb. 11: Expression der Chemokinrezeptoren CXCR3 (A) und CCR3 (C) bei Patienten mit sAP, iAP und AMI. Gezeigt werden Mittelwerte  $\pm$ SEM. P-Werte zeigen die statistische Signifikanz. (B) und (D) zeigen repräsentative Histogramme der CXCR3- und CCR3- Expression bei Patienten mit sAP, iAP und AMI.**

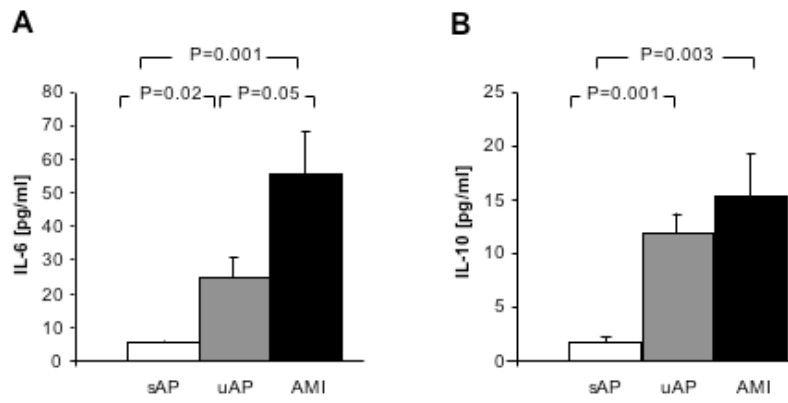
#### 4.7 Serumkonzentrationen der Zytokine IL-1, IL-6, IL-10, IL-12 und RANTES

Neben dem spezifischen Antigen ist das Zytokin-Milieu, das die T- Zelle nach dem Antigenkontakt während ihrer Reifung antrifft, ganz entscheidend für die Polarisierung Richtung TH1- oder TH2- Subpopulation verantwortlich. Daher wurden die Plasmakonzentrationen einiger, für die T- Zelldifferenzierung wichtiger Zytokine analysiert. Die Plasmakonzentrationen von IL-12p70 (IL-12), RANTES und IL-1 $\beta$  waren bei Patienten mit iAP verglichen zu Patienten mit sAP und AMI signifikant erhöht (Abb. 12). Während die Konzentrationen von IL-12 und RANTES keine bedeutenden Differenzen zwischen AMI und sAP zeigten, waren die IL-1 $\beta$ - Spiegel in der AMI Gruppe verglichen zur sAP Gruppe signifikant gesteigert. Abbildung 12 gibt jeweils die Mittelwerte  $\pm$ SEM der Konzentrationen von IL-12, IL-1 $\beta$  und RANTES im Plasma der 3 Patientengruppen an.

Im Gegensatz hierzu waren die Plasmakonzentrationen von IL-6 und IL-10 bei Patienten mit AMI und iAP signifikant erhöht im Vergleich zu Patienten mit sAP. Während die IL-10- Konzentrationen keinen Unterschied zwischen der sAP- und AMI- Gruppe zeigten, waren die IL-6- Spiegel bei Patienten mit AMI im Vergleich zu Patienten mit iAP signifikant erhöht. Die entsprechenden Mittelwerte  $\pm$  SEM der Plasmaspiegel von IL-6 und IL-10 der 3 Patientengruppen sind in Abbildung 13 graphisch zusammengefaßt.



**Abb. 12: Konzentrationen von IL-12 (A), RANTES (B) und IL-1beta (C) im Plasma von Patienten mit sAP, iAP und AMI. Gezeigt werden Mittelwerte  $\pm$ SEM. P-Werte zeigen die statistische Signifikanz.**



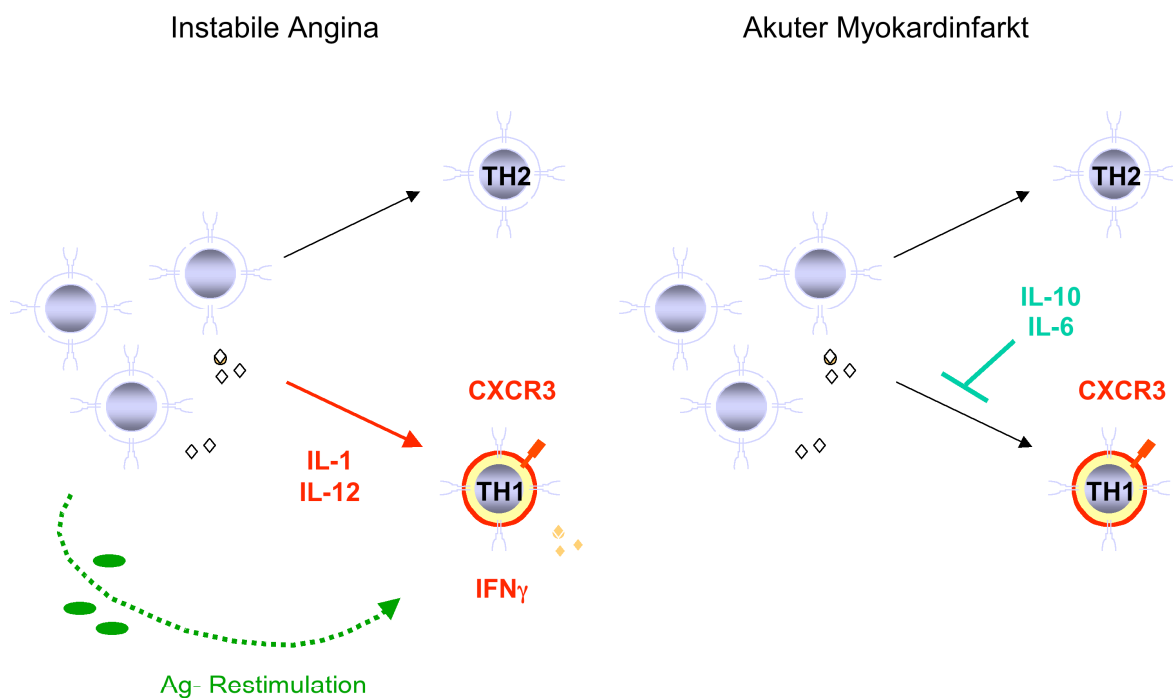
**Abb. 13: Konzentrationen von IL-6 (A) und IL-10 (B) im Plasma von Patienten mit sAP, uAP und AMI.** Gezeigt werden Mittelwerte  $\pm$ SEM. P-Werte zeigen die statistische Signifikanz.

## 5. Diskussion

Die wesentlichen Ergebnisse dieser Arbeit sind:

(1) Bei Patienten mit iAP lässt sich eine spezifische Lymphozytenaktivierung im Sinne einer TH1- Zellpolarisierung nachweisen. Dies zeigt sich in einer verstärkten IFN- $\gamma$ - Produktion der T- Lymphozyten, erhöhten systemischen Serumspiegeln der TH1- zellinduzierenden Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-12p70 und RANTES sowie in einer verminderten Expression des Chemokinrezeptors CCR3 als Zeichen einer Suppression der TH2- Zellpopulation.

(2) Im AMI dominiert eine systemische Entzündungsreaktion mit einer verstärkten Expression des frühen Aktivierungsmarkers CD69 auf T- Lymphozyten und einem differentiellen Zytokinprofil, das durch erhöhte Spiegel der Zytokine IL-6 und IL-10 gekennzeichnet ist und eine TH1- Zellaktivierung supprimiert (Abbildung 14).



**Abb. 14:** Differentielle T- Zellaktivierung und Zytokinprofile im akuten Koronarsyndrom.  
Mit freundlicher Genehmigung von Dr. B. Steppich

---

## 5.1 Differenzierungs- und Aktivierungsmuster der T- Lymphozyten im akuten Koronarsyndrom

Das ACS als eine Manifestationsform der koronaren Herzkrankheit umfasst die Entitäten des AMI sowie der iAP. Die sAP als weitere Manifestationsform der KHK manifestiert sich in reproduzierbar mit gleicher Intensität auftretenden, anfallsartigen thorakalen Schmerzen. Das klinische Erscheinungsbild des ACS resultiert aus einer akuten Stenosierung des Koronararterienlumens, verursacht durch einen Thrombus auf dem Boden einer rupturierten atherosklerotischen Plaque mit darauffolgender Myokardischämie (Falk et al.,1995). Sowohl beim AMI als auch bei iAP geht man von ähnlichen pathophysiologischen Mechanismen aus, wobei das klinische Ergebnis davon abhängig ist, ob die Gefäßthrombosierung zu einer partiellen oder kompletten Unterbrechung des koronaren Blutflusses führt. Beim AMI führt der komplette Verschluss der Koronararterie zusätzlich zu einem ischämiebedingten Untergang funktionsfähigen Myokards. Allen Manifestationsformen der KHK gemein ist eine Einbeziehung immunologischer Prozesse in Entstehung, Progredienz und Ausprägung der Koronarstenose. Obwohl in iAP und AMI ähnliche proinflammatorische Prozesse beobachtet werden konnten (Neumann et al.,1997, Ott et al.,2001), liessen sich in dieser Arbeit unterschiedliche T- Zell prägende Zytokinprofile identifizieren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine TH1- Zell polarisierte, spezifische Lymphozytenaktivierung bei Patienten mit iAP stattfindet.

Nach Stimulation durch Antigenkontakt differenzieren naive T- Lymphozyten in TH1- oder TH2- Zellsubpopulationen, die sich durch die Sekretion charakteristischer Zytokine unterscheiden: TH1- Zellen sezernieren IL-2 und IFN- $\gamma$  und aktivieren dadurch Makrophagen, während TH2- Zellen IL-4, IL-6 und IL-10 sezernieren und dadurch lokale inflammatorische Prozesse eindämmen (Santana 2003).

Die Zytokinumgebung durch Antigenkontakt aktivierter T- Lymphozyten ist eine entscheidende Determinante für die Polarisation dieser Zellen. Das von aktivierten Monozyten produzierte IL-12 vermittelt eine TH1- Polarisation direkt über die Aktivierung spezifischer Transkriptionsfaktoren, die für die Stabilisation des TH1- Phänotyps verantwortlich sind (Uyemura et al.,1996, Murphy et al.,2003). IL-1 $\beta$  und RANTES unterstützen die TH1- Differenzierung hingegen indirekt über eine IL-12- bzw. IFN- $\gamma$ - Induktion (Appay et al.,2001). Im Gegensatz dazu bewirkt IL-10 eine verminderte IL-12- Produktion und fördert somit eine TH2 dominierte Antwort

---

(D'Andrea et al 1993). IL-6 unterstützt die TH2- Zelldifferenzierung durch eine Inhibition der IFN- $\gamma$ - Genexpression und eine Hochregulation der Genexpression TH2 typischer Zytokine (Diehl et al.,2000).

Bei Patienten mit iAP konnten wir eine Erhöhung der TH1- zellpolarisierenden Zytokine IL-12, IL-1 $\beta$  und RANTES nachweisen, während bei Patienten mit AMI IL-6 und IL-10 als anti- TH1 wirksame Zytokine dominierten. Passend zu dem TH1- Zell favorisierenden Zytokinprofil konnten wir bei Patienten mit iAP eine verstärkte IFN- $\gamma$ - Sekretion bei aktivierten T- Lymphozyten nachweisen. Des Weiteren zeigte sich eine reduzierte CCR3- Expression bei Patienten mit iAP als Zeichen einer verminderten TH2- Antwort (Sallusto et al.,1998).

Auch aus atherosklerotischen Plaques gewonnene T- Lymphozyten zeigen eine überwiegende TH1- Polarisation, sichtbar in einer IFN- $\gamma$ - und TNF- $\alpha$ - Sekretion (Hansson et al.,1989, Frostegard et al.,1999). IFN- $\gamma$  ist in der Lage, andere Zellen zu aktivieren und deren Eigenschaften zu modulieren. Makrophagen, aus zirkulierenden Monozyten differenzierte ortsansässige Zellen, sind in atherosklerotischen Plaques in erhöhter Zahl und Dichte nachweisbar (van der Wal et al.,1994) und vermitteln durch Phagozytose, Antigen- Prozessierung und -Präsentation sowie Sekretion verschiedener Zytokine wichtige Immunfunktionen (Hansson 2001). In Regionen mit einer hohen Dichte an T- Lymphozyten zeichnen diese sich durch die Expression des Rezeptors HLA-DR aus (van der Wal et al.,1989), ein Zeichen einer stattgefundenen Aktivierung, die in erster Linie über IFN- $\gamma$  vermittelt wird. Passend hierzu zeigen auch zirkulierende Monozyten bei Patienten mit iAP eine überwiegend auf IFN- $\gamma$ - Stimulation beruhende Aktivierung (Liuzzo et al.,2001). Durch die Aktivierung sind Makrophagen in der Lage, eine effizientere Immunantwort zu induzieren. Dies geschieht über eine gesteigerte Expression von MHC2- und TNF- $\alpha$ - Rezeptoren sowie durch eine verstärkte Sekretion von TNF- $\alpha$ . Sie zeichnen sich darüber hinaus durch die Bildung von Sauerstoffradikalen und Stickstoffoxid und durch die Produktion von proteolytischen Enzymen aus (Galis et al.,1995, Rajagopalan et al.,1996). Diese Mechanismen dienen dem Organismus zur verbesserten Abwehr gegen Erreger, müssen jedoch sehr gut kontrolliert werden, da sie stark gewebebeschädigende Eigenschaften besitzen. Eine übersteigerte IFN- $\gamma$ - Sekretion hat somit eine potentiell schädigende Wirkung auf die Plaqueintegrität. Neben der Beeinflussung von Makrophagen hat IFN- $\gamma$  auch einen Effekt auf andere in der Plaque ansässige Zellen. So konnte ein mit IFN- $\gamma$  verstärkter Zelluntergang von



---

inkubierten glatten Muskelzellen *in vitro*, sowie eine Suppression der Kollagenneusynthese nachgewiesen werden, (Geng et al.,1996, Amento et al.,1991). Endothelzellen können unter IFN- $\gamma$ - Einfluss lysiert werden und zeigen eine verminderte Proliferationstendenz (Friesel et al.,1987, Nakajima et al.,2002). All diese durch IFN- $\gamma$  beeinflussten Mechanismen könnten somit zur akuten Destabilisierung der koronaren Plaque durch Degradierung der fibrösen Kappe beitragen. TH1- Lymphozyten sind neben T- Killerzellen die Hauptproduzenten der systemischen IFN- $\gamma$ - Synthese (Frostegard et al.,1999). Wenn also das systemische T- Zellrepertoire und das vorherrschende Zytokinprofil einen inflammatorischen Prozess mit einer TH1 polarisierten Lymphozytenaktivierung nur bei iAP und nicht bei AMI und sAP widerspiegeln, könnte dies auf eine wichtige Rolle von T- Zellen in der Umwandlung einer stabilen zu einer instabilen Plaque hindeuten. Eine dem Einsetzen der klinischen Symptomatik vorausgehende Immunaktivierung könnte so zu einem akuten Inflammationsschub innerhalb der Plaque und durch darauffolgende Prozesse zu einer Destabilisation mit konsekutiver Plaqueruptur und Wundthrombosierung und der dadurch verursachten klinischen Symptomatik führen. Dabei zeigen sich die hier präsentierten Ergebnisse in Übereinkunft mit der aktuellen Studienlage. Bei Patienten mit ACS läßt sich die ausgeprägteste Aktivierung von TH1- Zellen nachweisen, während Patienten mit AMI und sAP trotz gleichem oder grösserem Ausmaß der KHK eine signifikant niedrigere IFN- $\gamma$ - und IL-2- Produktion und Anzahl CD3 und IFN- $\gamma$  positiver zirkulierender Zellen aufweisen (Methe et al.,2005). Eine Immunaktivierung vor Einsetzen der klinischen Symptomatik wird durch die von uns nachgewiesene frühe Expansion IFN- $\gamma$  produzierender T- Lymphozyten bei iAP Patienten als Hinweis auf eine Immunantwort durch Antigenkontakt aktivierter T- Gedächtniszellen untermauert, auf die am Ende der Diskussion näher eingegangen wird.

Die Expression der CXCR3- Liganden IP10, Mag und iTAC in atherosklerotischen Plaques stellen dabei einen möglichen Rekrutierungsmechanismus für aktivierte T- Lymphozyten dar. Es zeigte sich, dass diese durch IFN- $\gamma$  induzierbaren Chemokine vor allem in Plaques von Patienten mit iAP verstärkt nachweisbar sind (Mach et al.,1999). Ein weiteres Indiz ist die in dieser Arbeit identifizierte signifikant erhöhte Expression des CXCR3- Rezeptors bei Patienten mit iAP und AMI gegenüber Patienten mit sAP, gleichfalls aber auch eine gegenüber iAP erhöhte

---

CCR3- Expression auf aktivierten zirkulierenden T- Lymphozyten im AMI, wofür die unterschiedlichen systemischen Zytokinmilieus eine plausible Erklärung bieten.

Neben besagtem Rekrutierungsmechanismus über Chemokine sprechen weitere Indizien für einen Zusammenhang zwischen systemisch nachgewiesener und lokaler T- Zellaktivierung in der Koronarplaque. Instabile Plaques bei Patienten mit ACS zeigen im Gegensatz zu Patienten mit sAP einen 10fach höheren Anteil an T- Lymphozyten, die zudem nur in der instabilen Plaque eine monoklonale Expansion als Hinweis auf eine spezifische Antigenaktivierung aufweisen (De Palma et al.,2006). Verschiedene spezifische Antigene, die für eine Aktivierung notwendig sind, konnten in atherosklerotischen Plaques nachgewiesen werden: Cytomegalievirus, Herpes simplex- Virus und Chlamydia pneumoniae. Eine Serokonversion gegenüber diesen endemischen Erregern korreliert mit dem Arterioskleroseausmaß und mit der kardiovaskulären Mortalität durch Folgeerkrankungen (Espinola- Klein et al.,2002). Vermutlich steht dabei der Kontakt und die Aktivierung in der Plaque ansässiger T- Lymphozyten am Anfang einer immunologischen Kaskade, die zur Plaque- Instabilität führt. Atherektomieproben von Patienten mit iAP induzieren im Gegensatz zu solchen von sAP- Patienten eine T- Lymphozytenproliferation (Caligiuri et. al 2000), was den Verdacht nahelegt, dass Antigenstimuli im Bereich der Plaque existieren. Patienten, die einer Angioplastie unterzogen wurden, zeigten in den Folgeuntersuchungen einen deutlichen Anstieg der Anti-Chlamydienantikörper, ebenfalls ein Zeichen einer durch die Plaqueverletzung und Antigenexpression induzierten spezifischen Immunreaktion (Kaehler et al.,2005). Eine antibiotische Therapie mit dem Makrolid- Antibiotikum Roxithromycin ergab jedoch in mehreren Therapiestudien bei Patienten mit ACS keine signifikante Reduktion des Risikos kardiovaskulärer Komplikationen im Vergleich zur mit einem Placebo behandelten Kontrollgruppe (Zahn et al.,2003, Cannon et al.,2005). Jedoch konnten Studien einen Benefit für seropositive Patienten mit frühen atherosklerotischen Läsionen nachweisen (Sander et al.,2004) und zudem ist fraglich, ob eine Standardantibiose die intrazellulären Erreger suffizient erreicht. In der vorliegenden Studie konnte keine Spezifität der aktivierten T- Zellpopulation gegen CMV oder Chlamydien aufgezeigt werden. Es zeigte sich jedoch als weiterer Hinweis, dass die nachgewiesene spezifische T- Zellaktivierung durch lokale plaqueständige Prozesse initiiert wird ein systemischer Nachweis von CD4+ CD28- Zellen, die in der Schulterregion der Plaque kummulieren, sich durch

---

eine übersteigerte IFN- $\gamma$ - Produktion und Zytotoxizität auszeichnen und aufgrund ihres monoklonalen Ursprungs den Kontakt zu einem lokal exprimierten Antigen nahelegen. Hier konnte gezeigt werden, dass sich nur bei Patienten mit iAP, nicht jedoch mit AMI oder sAP eine Vermehrung von CD4+ CD28- Zellen findet.

## **5.2 Reduziertes inflammatorisches Potential der T- Lymphozyten bei Patienten mit AMI**

In dieser Arbeit wurden bei Patienten mit AMI und iAP verschiedene in die T- Zellpolarisation eingreifende Zytokinmuster identifiziert. Obwohl den beiden Manifestationsformen des ACS ähnliche pathogenetische Mechanismen zu Grunde liegen und man aufgrund der klinischen Symptomatik eher eine verstärkte inflammatorische Immunreaktion beim AMI erwartet, konnte in dieser Arbeit eine proinflammatorische T- Zellantwort und -Zytokinverteilung überwiegend bei Patienten mit iAP nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse zeigen sich konform mit der aktuellen Forschungslage. Es ist bekannt, dass Myokardnekrose und Reperfusion mit der Aktivierung bestimmter Zytokinkaskaden assoziiert sind (Neumann et al.,1997, Ott et al.,2001). IL-6 gilt als wichtigster Stimulator für die Sekretion von Akute-Phase-Proteinen in Hepatozyten (Baumann et al.,1990) und vermittelt zudem auch prokoagulatorische Prozesse auf Monozyten (Neumann et al.,1997, Ott et al.,2001). Eine starke Elevation des systemischen IL-6- Spiegels, dessen Höhe zudem mit der Prognose der Patienten assoziiert ist, ließ sich sowohl bei Patienten mit AMI (Miyao et al.,1993), als auch bei Patienten mit iAP nachweisen (Biasucci et al.,1996). Eine Erhöhung des systemischen IL-10- Spiegels im AMI wurde in bisherigen Publikationen nicht beschrieben. Allerdings zeigte sich in experimentellen Studien eine Freisetzung von IL-6 und IL-10 aus reperfundiertem Myokard (Frangogiannis et al.,2000). Die erhöhten Plasmakonzentrationen von IL-6 und IL-10 könnten deshalb als Folge einer lokalen Freisetzung von Inflammationsmediatoren eine systemische Entzündungsreaktion reflektieren, die zudem über die Vermittlung prokoagulatorischer Effekte auf Monozyten durch IL-6 Einfluss auf das Thrombosierungsausmaß haben könnte.

Patienten mit AMI zeigten auch nach SEB- Stimulation keine verstärkte Expansion IFN- $\gamma$  positiver T- Lymphozyten, vielmehr zeigten sie ein ähnliches Reaktionsmuster wie sAP- Patienten. Dies könnte auf eine Inhibition der TH1- Polarisation durch die

---

erhöhten Plasmaspiegel der Zytokine IL-10 und IL-6 zurückzuführen sein. Der Nutzen einer TH2- Zellpolarisation könnte in einem Schutz des Körpers vor einer überschießenden proinflammatorischen Immunantwort liegen. In reperfundiertem ischämischem Myokard konnte eine verstärkte Induktion von IL-10- mRNA nachgewiesen werden, während eine IL-12- Induktion nicht stattfindet (Frangogiannis et al.,2000). IL-10 bewirkt über eine Inhibition von Metalloproteinasen und eine Induktion von Tissue Inhibitor of Metalloproteinasen-1 in Makrophagen eine Veränderung des Proteinase/ Antiproteinase- Gleichgewichts zugunsten einer Erhaltung der Extrazellulärmatrix (Lacraz et al.,1996). Darüber hinaus konnte in neuesten Studien nachgewiesen werden, dass die Hauptstresshormone, Katecholamine und Glukokortikoide, die Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-12 und IFN- $\gamma$  inhibieren und gleichzeitig die Synthese der antiinflammatorischen Zytokine IL-10, IL-4 und Transforming growth factor-beta stimulieren (Elenkov et al.,2002). Somit führt eine exzessive Aktivierung des Stress-Systems, wie es vor allem beim AMI zu beobachten ist, zur Aktivierung eines gegenregulatorischen Mechanismus, der den Organismus vor einem Überschuss an proinflammatorischen Zytokinen und anderen von aktivierten Makrophagen produzierten Stoffen mit gewebeschädigenden Eigenschaften beschützt.

Dies könnte eine Erklärung für die von uns nachgewiesene verstärkte Expansion CD69 positiver T- Lymphozyten bei reduzierter IFN- $\gamma$ - Produktion bei Patienten mit AMI sein. Steroide und Katecholamine mobilisieren T- Zellen, aber reduzieren ihre akute inflammatorische Aktivität. Zusätzlich könnte eine Akkumulation aktivierter, IFN- $\gamma$  produzierender T- Zellen im Bereich des ischämischen Myokards zu einer Abnahme des Anteils zirkulierender Zellen führen. So konnten immunhistochemische Studien eine massive T- Zellinfiltration in ischämisches Myokard nachweisen (Frangogiannis et al.,2000).

Der Einfluss einer medikamentösen Therapie auf die immunologische Situation im Rahmen der KHK wurde in den letzten Jahren zunehmend diskutiert. Insbesondere für Aspirin, Statine und Angiotensin II- converting- enzyme (ACE)-Hemmer konnten antiinflammatorische Effekte nachgewiesen werden. ACE- Hemmer sind in der Lage, die systemische Konzentration proinflammatorischer Zytokine wie RANTES, IL-1 und IL-6 zu reduzieren (Nomura et al.,2004) und Statine führen zu einer verminderten TH1- Polarisation mit reduzierter IL-10- Sekretion und verminderter CD69-, RANTES-, IL-8-, IL-12- und IL-6- Expression in vitro (Goldman et al 1996, Shimizu et

---

al 2003, Yilmaz et al.,2005). Patienten mit AMI wurden in dieser Arbeit zu einem signifikant geringeren Prozentsatz mit ACE- Hemmern und Statinen behandelt, allerdings ergab das hier analysierte Zytokinmuster mit einer Erhöhung des systemischen IL-10- Spiegels zum einen ein kontroverses Ergebnis zu einem erwarteten Statineinfluß und zum anderen ließ sich durch einen Vergleich von Infarktpatienten mit oder ohne ACE- Hemmer und Statintherapie keine Differenzen zwischen den beiden Gruppen aufzeigen. Auch die differentielle T- Zellpolarisation zwischen den bezüglich Medikation vergleichbaren Gruppen mit sAP und iAP läßt einen therapiebedingten antiinflammatorischen Effekt unwahrscheinlich machen. Klinische Studien untermauerten, dass niedrige Dosen Atorvastatin (20mg) keinen Einfluß auf die T- Zellaktivierung und -polarisierung haben (Kroger et al.,2003).

### **5.3 Antigen spezifische Immunantwort stimulierter T- Lymphozyten im akuten Koronarsyndrom**

Wichtigste Voraussetzung für die Aktivierung und Entwicklung eines naiven T- Lymphozyten zu einer Effektor- oder Gedächtniszelle ist der Kontakt zu einem spezifischen Antigen. Um diesen Vorgang der Antigenerkennung zu imitieren wurde in dieser Arbeit das Superantigen SEB genutzt, das die variablen Teile des T- Zellrezeptors mit MHC2- Rezeptoren vernetzt und somit eine über den T- Zellrezeptor vermittelte T- Zellaktivierung induziert (Fleischer 1994). Bedingt durch die relativ kurze Inkubationszeit stellt die hierdurch erreichte Zytokinproduktion hauptsächlich eine sekundäre Immunantwort durch sensibilisierte T-Helfer-Gedächtniszellen dar. Dies legt den Verdacht nahe, dass die verstärkte IFN- $\gamma$ - Sekretion bei iAP auf einer vorhergehenden, durch ein Antigen induzierten T- Zellprägung oder auf einer chronischen Antigenstimulation beruht. Konform mit diesem Ergebnis konnte bei aus fortgeschrittenen atherosklerotischen Plaques gewonnen T- Lymphozyten eine überwiegende Expression des T- Gedächtniszell-markers CD45 RO und der Aktivierungsmarker VLA- 1 und HLA-DR nachgewiesen werden (Stemme et al.,1992). Obwohl diese Arbeit nicht direkt beweisen kann, dass die systemische T- Lymphozytenaktivierung auf einen Antigenstimulus innerhalb der koronaren Plaque beruht und somit diese direkt in die Pathogenese des ACS involviert ist, stehen die hier beschriebenen Erkenntnisse im Einklang zur Studienlage der letzten Jahre. In mehreren Arbeiten konnte die Expansion CD4

positiver, CD28 negativer, IFN- $\gamma$  produzierender T- Zellen bei Patienten mit iAP nachgewiesen werden (Liuzzo et al.,1999, Nakajima et al.,2002). Diese T-Zell Subpopulation zeigt einen monoklonalen Ursprung als Hinweis auf eine Aktivierung durch ein spezifisches Antigen, weist zytotoxische Eigenschaften gegen Gefäßzellen auf und konnte aus instabilen Plaques (culprit lesions), nicht jedoch aus stabilen Plaques isoliert werden.

Die in dieser Arbeit gezeigte frühe Antwort von mit SEB stimulierten T- Lymphozyten impliziert einen Antigenkontakt und dadurch eine Aktivierung der Zellen vor Beginn der klinischen Symptomatik. Wenn auch in der vorliegenden Studie der Nachweis eines spezifischen Antigens nicht gelang, so konnte doch für eine Reihe sowohl exogener Antigene wie Chlamydia pneumoniae und Cytomegalievirus als auch für Autoantigene wie ox-LDL und HSP 60 in den letzten Jahren eine Bedeutung als potentielle antigene Stimuli aufgezeigt werden (Espinola- Klein et al.,2002, Hansson et al.,2002).

---

## 6. Zusammenfassung

Inflammatorische Prozesse tragen wesentlich zur Entstehung und zum Verlauf des akuten Koronarsyndroms bei. Atherosklerotische Läsionen zeigen einen hohen Anteil an aktivierten Makrophagen und T- Lymphozyten, deren interzelluläre Kommunikation über Zytokine und Chemokine vermittelt wird. Dabei ließen sich bei den Manifestationsformen der KHK trotz ähnlicher pathoäthologischer Grundlagen verschieden ausgeprägte Lymphozyten-Aktivierungsmuster und unterschiedliche systemische Zytokinprofile feststellen.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass eine TH1- Zell polarisierte, spezifische Lymphozytenaktivierung bei Patienten mit iAP stattfindet im Vergleich zu einer TH2- Zell favorisierenden, systemischen Entzündungsreaktion im AMI: Dies manifestiert sich in einer verstärkten IFN- $\gamma$ - Sekretion bei mit SEB stimulierten T- Lymphozyten, einem erhöhten Spiegel an den TH1- Zell induzierenden Zytokinen IL-1 $\beta$ , IL-12 und RANTES und einer verminderten Expression des CCR3- Rezeptors als Zeichen einer supprimierten TH2- Zellantwort bei Patienten mit iAP. Diese zellvermittelte Immunantwort scheint auf eine vorbestehende antigene Stimulation zurückzuführen zu sein, sichtbar in einer reduzierten Antwortschwelle mit verstärkter IFN- $\gamma$ - Sekretion bei Kontakt mit einem Superantigen. Die verstärkte CXCR3- Expression bei Patienten mit iAP stellt dabei einen möglichen Rekrutierungsmechanismus aktivierter T- Lymphozyten dar. Durch die lokale, zellvermittelte Immunantwort in der koronaren Plaque könnten gewebeschädigende Mechanismen in Gang gesetzt werden, die letztlich zu einer Destabilisierung der Plaquekappe führen mit dem Ergebnis einer durch Plaqueruptur induzierten Thrombusauflagerung und dem Auftreten der klinischen Symptomatik.

Bei Patienten mit AMI zeigte sich hingegen eine systemische Inflammation mit einer verstärkten Expression des frühen Aktivierungsmarkers CD69 und erhöhten IL-6- und IL-10- Spiegeln, die eine TH1- Zellantwort supprimieren. Obwohl die gleichen pathoäthologischen Mechanismen zum Auftreten des AMI und der iAP führen, lassen sich also verschiedene systemische Immunreaktionen nachweisen. Bei iAP- Patienten dominiert eine spezifische TH1- Zell dominierte Immunantwort unklarer Ätiologie, die bei Myokardinfarktpatienten durch antiinflammatorische Prozesse herunterreguliert werden könnte. Konform mit den hier gezeigten Daten zeigt ischämisches Myokard eine verstärkte IL-10- Expression. Möglicherweise stellt die dadurch vermittelte antiinflammatorische Wirkung einen Schutz des Körpers vor

einer überschüssigen Immunreaktion dar. Dazu könnten auch die Hauptstresshormone Katecholamine und Glukokortikoide durch Inhibition der proinflammatorischen Zytokine beitragen.

Die Relevanz dieser Arbeit für den klinischen Alltag liegt zum einen in dem tiefgehendem Verständnis über die immunologischen Mechanismen, die in das Krankheitsbild des ACS involviert sind und den darauf aufbauenden therapeutischen Möglichkeiten z.B. einer medikamentösen Inhibition bestimmter Zytokine wie IFN- $\gamma$ , IL-12 und IL-1 $\beta$ , die für die Vermittlung zellschädigender Mechanismen bzw. für den Aufbau einer proinflammatorischen Immunantwort verantwortlich sind. Hierzu sind weiterführende experimentelle Studien zur Bestätigung eines Benefits für die Prognose des ACS notwendig.



---

## 7. Literaturangaben

- Ameli S., Hultgardh-Nilsson A., Regnstrom J., Calara F., Yano J., Cercek B., Shah P.K., Nilsson J.; *Effect of immunization with homologous LDL and oxidized LDL on early atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits.* Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1996; Vol.16: S.1074-1079.
- Amento E.P., Ehsani N., Palmer H., Libby P.; *Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells.* Arterioscler Thromb. 1991; Vol.11: S.1223-1230.
- Anderson J.L., Carlquist J.F., Muhlestein J.B., Horne B.D., Elmer S.P.; *Evaluation of C-reactive protein, an inflammatory marker, and infectious serology as risk factors for coronary artery disease and myocardial infarction.* J Am Coll Cardiol. 1998; Vol.32: S.35-41.
- Appay V., Rowland-Jones S.L.; *RANTES: a versatile and controversial chemokine.* Trends Immunol. 2001; Vol.22: S.83-87.
- Baggiolini M., Dewald B., Moser B.; *Interleukin-8 and related chemotactic cytokines—CXC and CC chemokines.* Adv Immunol. 1994; Vol.55: S.97-179.
- Baumann H., Gauldie J.; *Regulation of hepatic acute phase plasma protein genes by hepatocyte stimulating factors and other mediators of inflammation.* Mol Biol Med. 1990; Vol.7: S.147-159.
- Benaglio M., Azzurri A., Ciervo A., Amedei A., Tamburini C., Ferrari M., Telford J.L., Baldari C.T., Romagnani S., Cassone A., D'Elisio M.M., Del Prete G.; *T helper type 1 lymphocytes drive inflammation in human atherosclerotic lesions.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2003; Vol.100: S.6658-6663.

- 
- Bevilacqua M.P., Pober J.S., Wheeler M.E., Cotran R.S., Gimbrone M.A. Jr.; *Interleukin-1 activation of vascular endothelium. Effects on procoagulant activity and leukocyte adhesion.*  
Am J Pathol. 1985; Vol.121: S.394-403.
  - Biasucci L.M., Vitelli A., Liuzzo G., Altamura S., Caligiuri G., Monaco C., Rebuzzi A.G., Ciliberto G., Maseri A.; *Elevated levels of interleukin-6 in unstable angina.*  
Circulation. 1996; Vol.94: S.874-877.
  - Biasucci L.M., Liuzzo G., Colizzi C., Rizzello V.; *Clinical use of C-reactive protein for the prognostic stratification of patients with ischemic heart disease.*  
Ital Heart J. 2001; Vol.2: S.164-171.
  - Bobryshev Y.V.; *Dendritic cells and their involvement in atherosclerosis.*  
Curr Opin Lipidol. 2000; Vol.11: S.511-517.
  - Bobryshev Y.V., Taksir T., Lord R.S., Freeman M.W.; *Evidence that dendritic cells infiltrate atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-deficient mice.*  
Histol Histopathol. 2001; Vol.16: S.801-808.
  - Bogdan C., Vodovotz Y., Nathan C.; *Macrophage deactivation by interleukin 10.*  
J Exp Med. 1991; Vol.174: S.1549-1555.
  - Boyle J.J.; *Association of coronary plaque rupture and atherosclerotic inflammation.*  
J Pathol. 1997; Vol.181: S.93-99.
  - Buffon A., Biasucci L.M., Liuzzo G., D'Onofrio G., Crea F., Maseri A.; *Widespread coronary inflammation in unstable angina.*  
N Engl J Med. 2002; Vol.347: S.5-12.

- 
- Caligiuri G., Paulsson G., Nicoletti A., Maseri A., Hansson G.K.; *Evidence for antigen-driven T-cell response in unstable angina.*  
Circulation. 2000; Vol.102: S.1114-1119.
  - Cannon C.P., Braunwald E., McCabe C.H., Grayston J.T., Muhlestein B., Giugliano R.P., Cairns R., Skene A.M.; *Antibiotic treatment of Chlamydia pneumoniae after acute coronary syndrome.*  
N Engl J Med. 2005; Vol.352: S.1646-1654.
  - Cusack M.R., Marber M.S., Lambiase P.D., Bucknall C.A., Redwood S.R.; *Systemic inflammation in unstable angina is the result of myocardial necrosis.*  
J Am Coll Cardiol. 2002; Vol.39: S.1917-1923.
  - D'Andrea A., Aste-Amezaga M., Valiante N.M., Ma X., Kubin M., Trinchieri G.; *Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells.*  
J Exp Med. 1993; Vol.178: S.1041-1048.
  - De Boer O.J., van der Wal A.C., Verhagen C.E., Becker A.E.; *Cytokine secretion profiles of cloned T cells from human aortic atherosclerotic plaques.*  
J Pathol. 1999; Vol.188: S.174-179.
  - De Palma R., Del Galdo F., Abbate G., Chiariello M., Calabro R., Forte L., Cimmino G., Papa M.F., Russo M.G., Ambrosio G., Giombolini C., Tritto I., Notaristefano S., Berrino L., Rossi F., Golino P.; *Patients with acute coronary syndrome show oligoclonal T-cell recruitment within unstable plaque: evidence for a local, intracoronary immunologic mechanism.*  
Circulation. 2006; Vol.113: S.640-646.
  - De Waal Malefyt R., Abrams J., Bennett B., Figdor C.G., de Vries J.E.; *Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes.*  
J Exp Med. 1991; Vol.174: S.1209-1220.

- 
- De Waal Malefyt R., Haanen J., Spits H., Roncarolo M.G., te Velde A., Figdor C., Johnson K., Kastelein R., Yssel H., de Vries J.; *Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression.*  
J Exp Med. 1991; Vol.174: S.915-924.
  - Diehl S., Anguita J., Hoffmeyer A., Zapton T., Ihle J.N., Fikrig E., Rincon M.; *Inhibition of Th1 differentiation by IL-6 is mediated by SOCS1.*  
Immunity. 2000; Vol.13: S.805-815.
  - Durum S.K., Schmidt J.A., Oppenheim J.J.; *Interleukin 1: an immunological perspective.*  
Annu Rev Immunol. 1985; Vol.3: S.263-287.
  - Elenkov I.J., Chrousos G.P.; *Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity.*  
Ann N Y Acad Sci. 2002; Vol.966: S.290-303.
  - Epstein S.E., Zhu J., Burnett M.S., Zhou Y.F., Vercellotti G., Hajjar D.; *Infection and atherosclerosis: potential roles of pathogen burden and molecular mimicry.*  
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000; Vol.20: S.1417-1420.
  - Espinola-Klein C., Rupprecht H.J., Blankenberg S., Bickel C., Kopp H., Rippin G., Victor A., Hafner G., Schlumberger W., Meyer J.; AtheroGene Investigators. *Impact of infectious burden on extent and long-term prognosis of atherosclerosis.*  
Circulation. 2002; Vol.105: S.15-21.
  - Falk E., Shah P.K., Fuster V.; *Coronary plaque disruption.*  
Circulation. 1995; Vol.92: S.657-671.

- 
- Fleischer B.; *Superantigens*.  
Behring Inst Mitt. 1994; Vol.94: S.104-112.
  - Fleischer B., Schrezenmeier H.; *T cell stimulation by staphylococcal enterotoxins. Clonally variable response and requirement for major histocompatibility complex class II molecules on accessory or target cells*.  
J Exp Med. 1988; Vol.167: S.1697-1707.
  - Frangogiannis N.G., Mendoza L.H., Lindsey M.L., Ballantyne C.M., Michael L.H., Smith C.W., Entman M.L.; *IL-10 is induced in the reperfused myocardium and may modulate the reaction to injury*.  
J Immunol. 2000; 1 Vol.65: S.2798-2808.
  - Friesel R., Komoriya A., Maciag T.; *Inhibition of endothelial cell proliferation by gamma-interferon*.  
J Cell Biol. 1987; Vol.104: S.689-696.
  - Frostegard J., Ulfgren A.K., Nyberg P., Hedin U., Swedenborg J., Andersson U., Hansson G.K.; *Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines*.  
Atherosclerosis. 1999; Vol.145: S.33-43.
  - Galis Z.S., Sukhova G.K., Kranzhofer R., Clark S., Libby P.; *Macrophage foam cells from experimental atheroma constitutively produce matrix-degrading proteinases*.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1995; Vol.92: S.402-406.
  - Geng Y.J., Wu Q., Muszynski M., Hansson G.K., Libby P.; *Apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by in vitro stimulation with interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-1 beta*.  
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1996; Vol.16: S.19-27.

- 
- Gieffers J., Fullgraf H., Jahn J., Klinger M., Dalhoff K., Katus H.A., Solbach W., Maass M.; *Chlamydia pneumoniae* infection in circulating human monocytes is refractory to antibiotic treatment.  
Circulation. 2001; Vol.103: S.351-356.
  - Goldman F., Hohl R.J., Crabtree J., Lewis-Tibesar K., Koretzky G.; *Lovastatin inhibits T-cell antigen receptor signaling independent of its effects on ras*.  
Blood. 1996; Vol.88: S.4611-4619.
  - Hansson G.K., Holm J., Jonasson L.; *Detection of activated T lymphocytes in the human atherosclerotic plaque*.  
Am J Pathol. 1989; Vol.135: S.169-175.
  - Hansson G.K.; *Regulation of immune mechanisms in atherosclerosis*.  
Ann N Y Acad Sci. 2001; Vol.947: S.157-165;
  - Hansson G.K., Libby P., Schonbeck U., Yan Z.Q.; *Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis*.  
Circ Res. 2002; Vol.91: S.281-291.
  - Harlan J.M.; *Consequences of leukocyte-vessel wall interactions in inflammatory and immune reactions*.  
Semin Thromb Hemost. 1987; Vol.13: S.434-444.
  - Haverkate F., Thompson S.G., Pyke S.D., Gallimore J.R., Pepys M.B.; *Production of C-reactive protein and risk of coronary events in stable and unstable angina. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group*.  
Lancet. 1997; Vol.349: S.462-466.

- 
- Heeschen C., Dimmeler S., Hamm C.W., Fichtlscherer S., Boersma E., Simoons M.L., Zeiher A.M.; CAPTURE Study Investigators. *Serum level of the antiinflammatory cytokine interleukin-10 is an important prognostic determinant in patients with acute coronary syndromes.* Circulation. 2003; Vol.107: S.2109-2114.
  - Heinrich J., Schulte H., Schonfeld R., Kohler E., Assmann G.; *Association of variables of coagulation, fibrinolysis and acute-phase with atherosclerosis in coronary and peripheral arteries and those arteries supplying the brain.* Thromb Haemost. 1995; Vol.73: S.374-379.
  - Hoshida S., Nishino M., Tanouchi J., Kishimoto T., Yamada Y.; *Acute Chlamydia pneumoniae infection with heat-shock-protein-6.* Atherosclerosis. 2005; Vol.183: S.109-112.
  - Hosono M., de Boer O.J., van der Wal A.C., van der Loos C.M., Teeling P., Piek J.J., Ueda M., Becker A.E.; *Increased expression of T cell activation markers (CD25, CD26, CD40L and CD69) in atherectomy specimens of patients with unstable angina and acute myocardial infarction.* Atherosclerosis. 2003; Vol.168: S.73-80.
  - Jonasson L., Holm J., Skalli O., Bondjers G., Hansson G.K.; *Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque.* Arteriosclerosis. 1986; Vol.6: S.131-138.
  - Jude B., Agraou B., McFadden E.P., Susen S., Bauters C., Lepelley P., Vanhaesbroucke C., Devos P., Cosson A., Asseman P.; *Evidence for time-dependent activation of monocytes in the systemic circulation in unstable angina but not in acute myocardial infarction or in stable angina.* Circulation. 1994; Vol.90: S.1662-1668.

- 
- Kaehler J., Haar A., Schaps K.P., Gaede A., Carstensen M., Schalwat I., Koester R., Laufs R., Meinertz T., Terres W.; *A randomized trial in patients undergoing percutaneous coronary angioplasty: roxithromycin does not reduce clinical restenosis but angioplasty increases antibody concentrations against Chlamydia pneumoniae.*  
Am Heart J. 2005; Vol.150: S.987-993.
  - Kameyoshi Y., Dorschner A., Mallet A.I., Christophers E., Schroder J.M.; *Cytokine RANTES released by thrombin-stimulated platelets is a potent attractant for human eosinophils.*  
J Exp Med. 1992; Vol.176: S.587-592.
  - Kishimoto T.; *The biology of interleukin-6.*  
Blood. 1989; Vol.74: S.1-10.
  - Kitaura M., Nakajima T., Imai T., Harada S., Combadiere C., Tiffany H.L., Murphy P.M., Yoshie O.; *Molecular cloning of human eotaxin, an eosinophil-selective CC chemokine, and identification of a specific eosinophil eotaxin receptor, CC chemokine receptor 3.*  
J Biol Chem. 1996; Vol.271: S.7725-7730.
  - Klausner R.D., Donaldson J.G., Lippincott-Schwartz J.; *Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure.*  
J Cell Biol. 1992; Vol.116: S.1071-1080.
  - Kroger K., Lindemann M., Kreuzfelder E., Brocker M., Santosa F., Grosse-Wilde H.; *Effect of atorvastatin and clopidogrel on cellular immune function.*  
Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2003; Vol.68: S.251-255.
  - Kuo C.C., Gown A.M., Benditt E.P., Grayston J.T.; *Detection of Chlamydia pneumoniae in aortic lesions of atherosclerosis by immunocytochemical stain.*  
Arterioscler Thromb. 1993; Vol.13: S.1501-1504.



- 
- Lacraz S., Nicod L.P., Chicheportiche R., Welgus H.G., Dayer J.M.; *IL-10 inhibits metalloproteinase and stimulates TIMP-1 production in human mononuclear phagocytes.*  
J Clin Invest. 1995; Vol.96: S.2304-2310.
  - Laurat E., Poirier B., Tupin E., Caligiuri G., Hansson G.K., Bariety J, Nicoletti A.; *In vivo downregulation of T helper cell 1 immune responses reduces atherogenesis in apolipoprotein E-knockout mice.*  
Circulation. 2001; Vol.104: S.197-202.
  - Le J.M., Vilcek J.; *Interleukin 6: a multifunctional cytokine regulating immune reactions and the acute phase protein response.*  
Lab Invest. 1989; Vol.61: S.588-602.
  - Liuzzo G., Biasucci L.M., Gallimore J.R., Grillo R.L., Rebuffi A.G., Pepys M.B., Maseri A.; *The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid a protein in severe unstable angina.*  
N Engl J Med. 1994; Vol.331: S.417-424.
  - Liuzzo G., Kopecky S.L., Frye R.L., O'Fallon W.M., Maseri A., Goronzy J.J., Weyand C.M.; *Perturbation of the T-cell repertoire in patients with unstable angina.*  
Circulation. 1999; Vol.100: S.2135-2139.
  - Liuzzo G., Goronzy J.J., Yang H., Kopecky S.L., Holmes D.R., Frye R.L., Weyand C.M.; *Monoclonal T-cell proliferation and plaque instability in acute coronary syndromes.*  
Circulation. 2000; Vol.101: S.2883-2888.
  - Liuzzo G., Vallejo A.N., Kopecky S.L., Frye R.L., Holmes D.R., Goronzy J.J., Weyand C.M.; *Molecular fingerprint of interferon-gamma signaling in unstable angina.*  
Circulation. 2001; Vol.103: S.1509-1514.

- 
- Loetscher M., Gerber B., Loetscher P., Jones S.A., Piali L., Clark-Lewis I., Baggiolini M., Moser B.; *Chemokine receptor specific for IP10 and mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes.*  
J Exp Med. 1996; Vol.184: S.963-969.
  - Mach F., Sauty A., Iarossi A.S., Sukhova G.K., Neote K., Libby P., Luster A.D.; *Differential expression of three T lymphocyte-activating CXC chemokines by human atheroma-associated cells.*  
J Clin Invest. 1999; Vol.104: S.1041-1050.
  - Mallat Z., Heymes C., Ohan J., Faggin E., Leseche G., Tedgui A.; *Expression of interleukin-10 in advanced human atherosclerotic plaques: relation to inducible nitric oxide synthase expression and cell death.*  
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1999; Vol.19: S.611-616.
  - Mallat Z., Besnard S., Duriez M., Deleuze V., Emmanuel F., Bureau M.F., Soubrier F., Esposito B., Duez H., Fievet C., Staels B., Duverger N, Scherman D., Tedgui A.; *Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis.*  
Circ Res. 1999; Vol.85: S.17-24.
  - Marzio R., Mauel J., Betz-Corradin S.; *CD69 and regulation of the immune function.*  
Immunopharmacol Immunotoxicol. 1999; Vol.21: S.565-582.
  - Mazzone A., De Servi S., Ricevuti G., Mazzucchelli I., Fossati G., Pasotti D., Bramucci E., Angoli L., Marsico F., Specchia G.; *Increased expression of neutrophil and monocyte adhesion molecules in unstable coronary artery disease.*  
Circulation. 1993; Vol.88: S.358-363.

- 
- Mazzone A., De Servi S., Vezzoli M., Fossati G., Mazzucchelli I., Gritti D., Ottini E., Mussini A., Specchia G.; *Plasma levels of interleukin 2, 6, 10 and phenotypic characterization of circulating T lymphocytes in ischemic heart disease.*  
Atherosclerosis. 1999; Vol.145: S.369-374.
  - Melnick J.L., Hu C., Burek J., Adam E., DeBakey M.E.; *Cytomegalovirus DNA in arterial walls of patients with atherosclerosis.*  
J Med Virol. 1994; Vol.42: S.170-174.
  - Methe H., Brunner S., Wiegand D., Nabauer M., Koglin J., Edelman E.R.; *T-Helper-1 Lymphocyte Activation Patterns in Acute Coronary Syndromes.*  
J Am Coll Cardiol. 2005; Vol.45: S.1939-1945.
  - Michel F., Attal-Bonnefoy G., Mangino G., Mise-Omata S., Acuto O.; *CD28 as a molecular amplifier extending TCR ligation and signaling capabilities.*  
Immunity. 2001; Vol.15: S.935-945.
  - Miyao Y., Yasue H., Ogawa H., Misumi I, Masuda T., Sakamoto T., Morita E.; *Elevated plasma interleukin-6 levels in patients with acute myocardial infarction.*  
Am Heart J. 1993; Vol.126: S.1299-1304.
  - Moreno P.R., Falk E., Palacios I.F., Newell J.B., Fuster V., Fallon J.T.; *Macrophage infiltration in acute coronary syndromes. Implications for plaque rupture.*  
Circulation. 1994; Vol.90: S.775-778.
  - Muhlestein J.B., Hammond E.H., Carlquist J.F., Radicke E., Thomson M.J., Karagounis L.A., Woods M.L., Anderson J.L.; *Increased incidence of Chlamydia species within the coronary arteries of patients with symptomatic atherosclerotic versus other forms of cardiovascular disease.*  
J Am Coll Cardiol. 1996; Vol.27: S.1555-1561.

- 
- Murphy C.A., Langrish C.L., Chen Y., Blumenschein W., McClanahan T., Kastelein R.A., Sedgwick J.D., Cua D.J.; *Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation.*  
J Exp Med. 2003; Vol.198: S.1951-1957.
  - Nakajima T., Schulte S., Warrington K.J., Kopecky S.L., Frye R.L., Goronzy J.J., Weyand C.M.; *T-cell-mediated lysis of endothelial cells in acute coronary syndromes.*  
Circulation. 2002; Vol.105: S.570-575.
  - Namekawa T., Wagner U.G., Goronzy J.J., Weyand C.M.; *Functional subsets of CD4 T cells in rheumatoid synovitis.*  
Arthritis Rheum. 1998; Vol.41: S.2108-2116.
  - Neri Serneri G.G., Prisco D., Martini F., Gori A.M., Brunelli T., Poggesi L., Rostagno C., Gensini G.F., Abbate R.; *Acute T-cell activation is detectable in unstable angina.*  
Circulation. 1997; Vol.95: S.1806-1812.
  - Neri Serneri G.G., Boddi M., Modesti P.A., Cecioni I., Coppo M., Papa M.L., Toscano T., Marullo A., Chiavarelli M.; *Immunomediated and ischemia-independent inflammation of coronary microvessels in unstable angina.*  
Circ Res. 2003; Vol.92: S.1359-1366.
  - Neumann F.J., Ott I., Marx N., Luther T., Kenngott S., Gawaz M., Kotsch M., Schomig A.; *Effect of human recombinant interleukin-6 and interleukin-8 on monocyte procoagulant activity.*  
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1997; Vol.17: S.3399-3405.
  - Nomura S., Shouzu A., Omoto S., Nishikawa M., Iwasaka T.; *Effects of losartan and simvastatin on monocyte-derived microparticles in hypertensive patients with and without type 2 diabetes mellitus.*  
Clin Appl Thromb Hemost. 2004; Vol.10: S.133-141.

- 
- Ott I., Neumann F.J., Kenngott S., Gawaz M., Schomig A.; *Procoagulant inflammatory responses of monocytes after direct balloon angioplasty in acute myocardial infarction.*  
Am J Cardiol. 1998; Vol.82: S.938-942.
  - Ott I., Andrassy M., Zieglgansberger D., Geith S., Schomig A., Neumann F.J.; *Regulation of monocyte procoagulant activity in acute myocardial infarction: role of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor-1.*  
Blood. 2001; Vol.97: S.3721-3726.
  - Palinski W., Miller E., Witztum J.L.; *Immunization of low density lipoprotein (LDL) receptor-deficient rabbits with homologous malondialdehyde-modified LDL reduces atherogenesis.*  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1995; Vol.92: S.821-825.
  - Park W., Weyand C.M., Schmidt D., Goronzy J.J.; *Co-stimulatory pathways controlling activation and peripheral tolerance of human CD4+CD28- T cells.*  
Eur J Immunol. 1997; Vol.27: S.1082-1090.
  - Pinderski Oslund L.J., Hedrick C.C., Olvera T., Hagenbaugh A., Territo M., Berliner J.A., Fyfe A.I.; *Interleukin-10 blocks atherosclerotic events in vitro and in vivo.*  
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1999; Vol.19: S.2847-2853.
  - Pober J.S., Bevilacqua M.P., Mendrick D.L., Lapierre L.A., Fiers W., Gimbrone M.A. Jr. ; *Two distinct monokines, interleukin 1 and tumor necrosis factor, each independently induce biosynthesis and transient expression of the same antigen on the surface of cultured human vascular endothelial cells.*  
J Immunol. 1986; Vol.136: S.1680-1687.

- 
- Rajagopalan S., Meng X.P., Ramasamy S., Harrison D.G., Galis Z.S.; *Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability.*  
J Clin Invest. 1996; Vol.98: S.2572-2579.
  - Sallusto F.; *The role of chemokines and chemokine receptors in T cell priming and Th1/Th2-mediated responses.*  
Haematologica. 1999; Vol.84 Suppl EHA-4: S.28-31.
  - Sallusto F., Lenig D., Mackay C.R., Lanzavecchia A.; *Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes.*  
J Exp Med. 1998; Vol.187: S.875-883.
  - Sander D., Winbeck K., Klingelhofer J., Etgen T., Conrad B.; *Progression of early carotid atherosclerosis is only temporarily reduced after antibiotic treatment of Chlamydia pneumoniae seropositivity.*  
Circulation. 2004; Vol.109: S.1010-1015.
  - Santana M.A., Rosenstein Y.; *What it takes to become an effector T cell: the process, the cells involved, and the mechanisms.*  
J Cell Physiol. 2003; Vol.195: S.392-401.
  - Schonbeck U., Mach F., Sukhova G.K., Murphy C., Bonnefoy J.Y., Fabunmi R.P., Libby P.; *Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vascular smooth muscle cells by T lymphocytes: a role for CD40 signaling in plaque rupture?*  
Circ Res. 1997; Vol.81: S.448-454.
  - Seder R.A., Gazzinelli R., Sher A., Paul W.E.; *Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming.*  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1993; Vol.90: S.10188-10192.

- 
- Serneri G.G., Abbate R., Gori A.M., Attanasio M., Martini F., Giusti B., Dabizzi P., Poggesi L., Modesti P.A., Trotta F.; *Transient intermittent lymphocyte activation is responsible for the instability of angina.*  
Circulation. 1992; Vol.86: S.790-797.
  - Shi Y., Tokunaga O.; *Herpesvirus (HSV-1, EBV and CMV) infections in atherosclerotic compared with non-atherosclerotic aortic tissue.*  
Pathol Int. 2002; Vol.52: S.31-39.
  - Shimizu K., Aikawa M., Takayama K., Libby P., Mitchell R.N.; *Direct anti-inflammatory mechanisms contribute to attenuation of experimental allograft arteriosclerosis by statins.*  
Circulation. 2003; Vol.108: S.2113-2120.
  - Sica A., Wang J.M., Colotta F., Dejana E., Mantovani A., Oppenheim J.J., Larsen C.G., Zachariae C.O., Matsushima K.; *Monocyte chemotactic and activating factor gene expression induced in endothelial cells by IL-1 and tumor necrosis factor.*  
J Immunol. 1990; Vol.144: S.3034-3038.
  - Sironi M., Breviario F., Proserpio P., Biondi A., Vecchi A., Van Damme J., Dejana E., Mantovani A.; *IL-1 stimulates IL-6 production in endothelial cells.*  
J Immunol. 1989; Vol.142: S.549-553.
  - Stemme S., Holm J., Hansson G.K.; *T lymphocytes in human atherosclerotic plaques are memory cells expressing CD45RO and the integrin VLA-1.*  
Arterioscler Thromb. 1992; Vol.12: S.206-211.
  - Stemme S., Faber B., Holm J., Wiklund O., Witztum J.L., Hansson G.K.; *T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein.*  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1995; Vol.92: S.3893-3897.

- 
- Tosato G., Jones K.D.; *Interleukin-1 induces interleukin-6 production in peripheral blood monocytes.*  
Blood. 1990; Vol.75: S.1305-1310.
  - Toss H., Lindahl B., Siegbahn A., Wallentin L.; *Prognostic influence of increased fibrinogen and C-reactive protein levels in unstable coronary artery disease. FRISC Study Group. Fragmin during Instability in Coronary Artery Disease.*  
Circulation. 1997; Vol.96: S.4204-4210.
  - Uyemura K., Demer L.L., Castle S.C., Jullien D., Berliner J.A., Gately M.K., Warriar R.R., Pham N., Fogelman A.M., Modlin R.L.; *Cross-regulatory roles of interleukin (IL)-12 and IL-10 in atherosclerosis.*  
J Clin Invest. 1996; Vol.97: S.2130-2138.
  - van der Wal A.C., Das P.K., Bentz van de Berg D., van der Loos C.M., Becker A.E.; *Atherosclerotic lesions in humans. In situ immunophenotypic analysis suggesting an immune mediated response.*  
Lab Invest. 1989; Vol.61: S.166-170.
  - van der Wal A.C., Becker A.E., van der Loos C.M., Das P.K.; *Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology.*  
Circulation. 1994; Vol.89: S.36-44.
  - van der Wal A.C., Piek J.J., de Boer O.J., Koch K.T., Teeling P., van der Loos C.M., Becker A.E.; *Recent activation of the plaque immune response in coronary lesions underlying acute coronary syndromes.*  
Heart. 1998; Vol.80: S.14-18.



- 
- Yilmaz A., Reiss C., Weng A., Cicha I., Stumpf C., Steinkasserer A., Daniel W.G., Garlich C.D.; *Differential effects of statins on relevant functions of human monocyte-derived dendritic cells.*  
J Leukoc Biol. 2006; Vol.79: S.529-538.
  - Yla-Herttuala S., Palinski W., Butler S.W., Picard S., Steinberg D., Witztum J.L.; *Rabbit and human atherosclerotic lesions contain IgG that recognizes epitopes of oxidized LDL.*  
Arterioscler Thromb. 1994; Vol.14: S.32-40.
  - Zal B., Kaski J.C., Arno G., Akiyu J.P., Xu Q., Cole D., Whelan M., Russell N., Madrigal J.A., Dodi I.A., Baboonian C.; *Heat-shock protein 60-reactive CD4+CD28null T cells in patients with acute coronary syndromes.*  
Circulation. 2004; Vol.109: S.1230-1235.
  - Zahn R., Schneider S., Frilling B., Seidl K., Tebbe U., Weber M., Gottwik M., Altmann E., Seidel F., Rox J., Hoffler U., Neuhaus K.L., Senges J.; *Antibiotic therapy after acute myocardial infarction: a prospective randomized study.*  
Circulation. 2003; Vol.107: S.1253-1259.
  - Zhou X., Caligiuri G., Hamsten A., Lefvert A.K., Hansson G.K.; *LDL immunization induces T-cell-dependent antibody formation and protection against atherosclerosis.*  
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2001; Vol.21: S.108-114.

---

## 8. Abkürzungsverzeichnis

ACS	Akutes Koronarsyndrom; <i>acute coronary syndrome</i>
ACE	<i>Angiotensin converting enzyme</i>
AK	Antikörper
ASS	Acetylsalicylsäure
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigen- präsentierende Zelle
AMI	Akuter Myocardinfarkt
CD	Cluster of differentiation
CK	Kreatinkinase; <i>creatine kinase</i>
CMV	Cytomegalie- Virus
CRP	C- reaktives Protein
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest; <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EKG	Elektrokardiogramm
ELAM-1	<i>Endothelial cell adhesion molecule-1</i>
FACS	Fluoreszenz- aktivierter Zellsortierer; <i>fluorescence-activated cell sorter</i>
FITC	Fluorescein 5- isothiocyanat
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
iAP	Instabile Angina Pectoris
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule-1</i>
Ig-G	Immunglobulin G
IFN $\gamma$	Interferon-gamma
IL	Interleukin
IP-10	<i>Interferon-gamma- inducible protein-10</i>
i-Tac	<i>Interferon-inducible T cell-alpha chemoattractant</i>
KHK	Koronare Herzkrankheit
LAD	Ramus interventricularis anterior; <i>left anterior descending coronary artery</i>
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>

---

Mig	<i>Monokine induced by interferon-gamma</i>
PFA	Paraformaldehyd
PBS	Phosphatpuffer; <i>phosphate buffered saline</i>
PE	Phycoerythrin
Per CP	Peridin Chlorophyll
PMT	<i>Photo multiplier tubes</i>
RANTES	<i>Regulated upon activation, normal T-cell expressed and presumably secreted</i>
RCA	Rechte Koronararterie; <i>right coronary artery</i>
RCX	Ramus circumflexus der linken Koronararterie
sAP	Stabile Angina Pectoris
SEB	<i>Staphylococcal enterotoxin B</i>
SMC	<i>Smooth muscle cell</i>
STEMI	<i>ST- elevation myocardial infarction</i>
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor- alpha
TZR	T- Zellrezeptor
U/min	Umdrehungen pro Minute
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule-1</i>

## 9. Teilpublikation

Wesentliche Teile dieser Arbeit wurden publiziert:

Steppich B.A., Moog P., Matissek C., Wisniowski N., Kuhle J., Joghetaei N.,  
Neumann F.J., Schomig A., Ott I.;  
*Cytokine profiles and T cell function in acute coronary syndromes.*  
*Atherosclerosis.* 2007 Feb; Vol.190(2): S.443-451.

## **10. Danksagung**

Bedanken möchte ich mich ausdrücklich bei Priv. Doz. Dr. Ilka Ott für die Überlassung der Arbeit und für die grosse Hilfsbereitschaft sowohl im praktischen Teil der Arbeit als auch bei der Ausarbeitung des Manuskripts. Dr. Birgit Steppich hat durch die Betreuung im Labor und die tatkräftige Unterstützung bei Auswertung und Publikation der Arbeit einen wesentlichen Beitrag zum Gelingen geleistet.

Die Arbeit im Labor und vor allem am Durchflusszytometer wurde mir durch die Hilfe aller mitwirkenden medizinisch-technischen und labortechnischen Assistentinnen, insbesondere Fr. Annette Stobbe und Fr. Birgit Campbell, wesentlich erleichtert.

Nicht zuletzt geht mein ausdrücklicher Dank auch an Philipp Moog und Dean Sobczyk, mit denen ich viele Stunden im Labor verbracht habe sowie an Anne End und Maximilian Jagsch, die zur Fertigstellung der Arbeit einen grossen Teil beigetragen haben.

## 11. Lebenslauf

Name: Christoph Philip Matissek

Anschrift: Ickstattstr. 28  
80469 München  
Tel. : 089- 89064978

Geboren: 24.04.1977 in Kaiserslautern

### Schulbildung

1983 – 1987 Theodor Heuss-Grundschule Kaiserslautern

1987 – 1996 Albert- Schweitzer- Gymnasium  
Kaiserslautern mit Abiturabschluss

### Studium

Medizinstudium an der  
Ludwigs- Maximilian- Universität  
München

04/1998 – 04/2000 vorklinischer Studienabschnitt

04/2000 – 09/2003 klinischer Studienabschnitt

10/2003 – 08/2004 Praktisches Jahr

- 1. Tertial: Chirurgische- und kinderchirurgische Klinik München Innenstadt
- 2. Tertial: Pädiatrie in Valparaiso, Chile
- 3. Tertial: Innere Medizin, Klinikum Großhadern

12.10.2004 Erfolgreiches Absolvieren des  
3. Staatsexamens

### Beruflicher Werdegang

Seit 01.01.2005 Assistenzarzt in der allgemein- und viszeralchirurgischen Abteilung  
Krankenhaus München- Harlaching

### Publikationen

„Cytokine profiles and T cell function in acute coronary syndromes“  
Atherosclerosis. 2007 Feb; Vol.190(2): S.443-451.

„Tissue factor pathway inhibitor on circulating microparticles in acute myocardial infarction“  
Thromb Haemost. 2005; Vol.93: S.35-39.

**MEINEN ELTERN GEWIDMET**