

Aus der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Malte Kelm

Untersuchung der Phagozytose von Perfluorooctylbromid-Nanoemulsion durch humane mononukleäre Zellen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Denise Colley

2024

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Dr. med. Christian Jung

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Michael Bernhard, MHBA

Widmung

Diese Arbeit ist meiner Mutter gewidmet, die mir auf all meinen Wegen mit ihrer liebevollen und uneingeschränkten Unterstützung, Geduld und Zuspruch zur Seite stand. Ohne dich wäre das alles nicht möglich gewesen. Danke für alles.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Nienhaus, F., Colley, D., Jahn, A., Pfeiler, S., Flocke, V., Temme, S., Kelm, M., Gerdes, N., Flögel, U., Bönner, F., (2019), Phagocytosis of a PFOB-Nanoemulsion for (^{19}F) Magnetic Resonance Imaging: First Results in Monocytes of Patients with Stable Coronary Artery Disease and ST-Elevation Myocardial Infarction. *Molecules*, 24(11), 2058

Zusammenfassung

Der Herzinfarkt zählt zu den häufigsten Todesursachen in vielen Industrienationen. Verschiedene Zellen, darunter CD14⁺CD16⁻- und CD14⁺CD16⁺-Monozyten, wandern in das geschädigte Areal ein und initiieren Entzündungsreaktionen sowie reparative Mechanismen. Zu Beginn dominieren CD14⁺CD16⁻-Monozyten, die vor allem an Phagozytosevorgängen beteiligt sind. Überschießende sowie verminderte Aktivität der Monozyten, die durch therapeutische Intervention beeinflusst werden können, führen zu beeinträchtigter Heilung. Daher könnte es von klinischem Vorteil sein, die Einwanderung von Monozyten nach Herzinfarkt zu visualisieren und zu quantifizieren. Bisherige diagnostische Verfahren können Monozyten nur mit ungenügender Spezifität oder diagnostischer Genauigkeit darstellen. Die ¹⁹F-Fluor-Magnetresonanztomographie ist nicht invasiv und zeigt eine höhere Spezifität und diagnostische Genauigkeit als bisherige Methoden zur Darstellung von Inflammation. Für die ¹⁹F-MRT sind Perfluorcarbon-Nanoemulsionen (PFC-NE), mit Fluor substituierte Kohlenwasserstoffverbindungen, als Marker nötig. Diese Partikel werden vor allen Dingen von Monozyten phagozytiert. Wie sich in Tierversuchen zeigte, ermöglicht die ¹⁹F-MRT gesundes und inflammatorisches Gewebe zu differenzieren und Monozyten zu quantifizieren, beispielsweise nach Myokardinfarkt, Pneumonie, Transplantationsabstoßungen und Myokarditis.

Die Aufnahme der PFC-NE durch humane Monozyten unter Flussbedingungen und ihr Einfluss auf die weitere Funktionalität humaner Monozyten wurden bislang jedoch nicht untersucht. Blutproben von gesunden Probandinnen und Probanden wurden mit Perfluoroctylbromid-Nanoemulsion (PFOB-NE), einem bereits in klinischer Phase II befundenem PFC, im BioFlux unter Flussbedingungen inkubiert und durchflusszytometrisch untersucht. Monozyten, sowie zu einem geringeren Anteil Granulozyten und B-Zellen, nahmen die PFOB-NE auf. Im Vergleich zur Phagozytose auf einem Rollenmischer war der Anteil der Zellen, die PFOB-NE phagozytierten und die MFI signifikant geringer. Die Fähigkeit der Monozyten nach Aufnahme der PFOB-NE weiter zu phagozytieren, wurde mit fluoreszierendem Zymosan A überprüft. Monozyten waren nach Aufnahme der PFOB-NE weiterhin in der Lage Zymosan A zu phagozytieren. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zur Phagozytose von Zymosan A allein. Blutproben von Patientinnen und Patienten nach Myokardinfarkt und mit koronarer Herzkrankheit wurden mit PFOB-NE inkubiert und durchflusszytometrisch untersucht. Dabei zeigten Monozyten von Infarktpatienten eine beschleunigte Phagozytose der PFOB-NE und signifikant höhere Fluoreszenzintensitäten verglichen mit Monozyten von Patienten mit koronarer Herzkrankheit.

Summary

Myocardial infarction is one of the leading causes of death in industrialized countries. Myocardial healing after infarction is orchestrated by monocytes and macrophages such as CD14⁺CD16⁻ and CD14⁺CD16⁺-monocytes. CD14⁺CD16⁻-monocytes participate in phagocytosis. Excessive and insufficient activity of monocytes, that can be influenced through therapeutical interventions, may lead to impaired healing processes. Thus, there is a clinical need to quantify and visualize the migration of monocytes to monitor therapies. Fluorine-19 magnetic resonance imaging with intravenously applied Perfluorocarbon-nanoemulsions (PFC-NE) is a non-invasive and more specific method than other imaging procedures used to visualize inflammatory processes. PFC-NE, with fluor substituted hydrocarbons, are especially ingested by different monocytes and allow cell type-specific tracking in vivo. They have so far been used to visualize myocardial infarction, myocarditis, pneumonia and organ rejection in animal models and differentiate healthy from inflamed tissue.

The phagocytosis of PFC-NE by human monocytes under flow conditions and its influence on further phagocytic activity has not yet been investigated. Blood samples from healthy individuals were incubated with perfluorooctylbromide nanoemulsion (PFOB-NE), a perfluorocarbon in the second clinical phase, under flow conditions in the Bioflux and subsequently analyzed with a flow cytometer. Monocytes and, to a lesser extent, granulocytes and B-cells were able to phagocytose the PFOB-NE. The percentage of cells that had phagocytosed PFOB-NE and their mean fluorescent intensity was significantly lower compared to phagocytosis on a tube roller. Monocytes were additionally incubated with fluorescent zymosan A to investigate their ability to further digest after phagocytosis of PFOB-NE. Comparisons with phagocytosis of zymosan A alone showed no significant differences between the conditions. Monocytes were able to digest zymosan A after phagocytosis of PFOB-NE. Blood samples from patients with coronary artery disease and myocardial infarction were incubated with PFOB-NE and analyzed with a flow cytometer. Monocytes from patients after myocardial infarction showed an accelerated phagocytosis activity compared to monocytes from patients with coronary artery disease.

Abkürzungsverzeichnis

ACE	<i>angiotensin converting enzyme</i>
ACK	Ammonium-Chlorid-Kalium
ACS	akutes Koronarsyndrom
APC	Allophycocyanin
APC-Cy7	Allophycocyanin 7
ASS	Acetylsalicylsäure
AT	Angiotensin
ATP	Adenosintriphosphat
BD	Becton Dickinson
BMI	<i>body mass index</i>
BSA	bovines Serumalbumin
CCR	C-C chemokine receptor
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CK	Creatininkinase
CK-MB	Creatininkinase-Myokardtyp
cm	Zentimeter
COPD	<i>chronic obstructive pulmonary disease</i>
CRP	C-reaktives Protein
CT	Computertomographie
Cy	Cyanin
DAMP	damage associated molecular pattern
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
df	Freiheitsgrade, <i>degrees of freedom</i>
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EKG	Elektrokardiogramm
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i> (=Durchflusszytometrie)
FC	<i>fragment crystallizable receptor</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	<i>forward scatter</i>
g	Gramm
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
GGT	γ -Glutamyltransferase
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
h	Stunde
HbA1c	adultes Hämoglobin 1c
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
hsTNT	<i>high sensitive Troponin T</i>
i.v.	intravenös
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin

kg	Kilogramm
KHCO ₃	Kaliumhydrogencarbonat
KHK	koronare Herzkrankheit
kHz	Kilohertz
l	Liter
LAD	<i>left ascending artery</i>
LCA	<i>left coronary artery</i>
LDH	Lactat-Dehydrogenase
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LPS	Lipopolysaccharide
LVEF	linksventrikulären Ejektionsfraktion
Ly6C	Lymphozytenantigen 6C
M	Molar
MACS	Magnetic-Activated Cell Separation
max.	Maximum
MCP	<i>monocyte chemoattractant protein</i>
Mdn	Median
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
mg	Milligramm
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
Min	Minute
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	mittleres Quadrat
mV	Millivolt
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NF	nukleärer Faktor
ng	Nanogramm
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
nm	Nanometer
NSTEMI	Nicht-ST-Hebungs-Myokardinfarkt, <i>non ST-segment-elevation myocardial infarction</i>
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
OP	Operation
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCI	perkutane koronare Intervention
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PE	Phycoerythrin
PE-Cy7	Phycoerythrin-Cyanin 7
PEG	Polyethylenglycol

PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PerCP-Cy5.5	Peridinin-Chlorophyll-Cyanin 5.5
PET	Positronenemissionstomographie
PFC	Perfluorcarbon
PFCE	Perfluoro-15-crown-5-ether
PFD	Perfluorodecalin
PFOB-NE	Perfluorocetyl bromid-Nanoemulsion
PTCA	perkutane transluminale Coronarangiographie
RCA	<i>right coronary artery</i>
RCF	<i>Relative centrifugal force</i>
RCX	<i>Ramus circumflexus</i>
RIVA	<i>Ramus interventricularis anterior</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies, <i>reactive oxygen species</i>
SD	Standardabweichung
SPECT	Einzelphotonenemissionscomputertomographie, <i>single photon emission computed tomography</i>
SPIO	superparamagnetic iron oxide
SS	Quadratsumme
SSC	<i>side scatter</i>
STEMI	ST-Strecken-Hebungsinfarkt, <i>ST-segment elevation myocardial infarction</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
T-Zellen	Thymus Zellen
U	Unit
(U)SPIO	<i>(ultra)smallsuperparamagnetic iron oxide</i>

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	i
Summary	ii
Abkürzungsverzeichnis.....	iii
Inhaltsverzeichnis.....	vi
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Koronare Herzkrankheit.....	1
1.2 Der akute Myokardinfarkt.....	5
1.2.1 Epidemiologie und klinische Bedeutung	6
1.2.2 Phasen des Infarkts	7
1.2.3 Kommunikation von lokaler und systemischer Immunantwort nach Infarkt.....	11
1.2.4 Diagnostische Werkzeuge.....	13
1.3 Monozytensubpopulationen.....	15
1.3.1 Differenzierung und Funktion.....	15
1.3.2 Möglichkeiten der <i>in vivo</i> Monozytenbildung	19
1.4 Perfluorcarbone und deren Nanoemulsionsformulierung.....	23
1.4.1 Struktur und Eigenschaften der Perfluorcarbone und deren Nanoemulsion	23
1.4.2 Phagozytose	25
1.4.3 Faktoren der Stabilität.....	28
1.5 Zymosan	29
1.6 BioFlux	31
1.7 Zielsetzung	32
2 MATERIAL UND METHODEN.....	34
2.1 Materialien.....	34
2.1.1 Geräte.....	34
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	35
2.1.3 Fluoreszenzmarkierte Substanzen.....	36
2.1.4 Software.....	36
2.2 Probandenkollektiv	36
2.3 Gewinnung des Probematerials.....	39
2.4 Herstellung der fluoreszenzmarkierten Perfluorocetyl bromid-Nanoemulsion	39
2.5 Herstellung der fluoreszenzmarkierten Zymosan A Lösung.....	39
2.6 Das BioFlux-System	40
2.7 Phagozytoseassays	40
2.7.1 Phagozytose mit PFOB-NE im BioFlux	40
2.7.2 Phagozytose mit PFOB-NE im Inkubator.....	41
2.7.3 Phagozytose von PFOB-NE und Zymosan A	41
2.7.4 Phagozytose von PFOB-NE bei Myokardinfarkt- und KHK- Patientinnen und Patienten	42
2.7.5 Aufbereitung der Proben (Protokoll 1)	42
2.7.6 Aufbereitung der Proben (Protokoll 2)	43
2.8 Durchflusszytometrie.....	43

2.8.1	Ausschluss apoptotischer Zellen.....	44
2.8.2	Durchflusszytometrische Analyse.....	44
2.8.3	Auswertung der durchflusszytometrischen Daten.....	45
2.8.3.1	Kaluza Analysis Software.....	45
2.8.3.2	Auswertung der nach Protokoll 1 aufbereiteten Proben.....	45
2.8.3.3	Auswertung der nach Protokoll 2 aufbereiteten Proben.....	46
2.9	Statistik.....	48
3	ERGEBNISSE.....	49
3.1	Phagozytose der PFOB-NE im BioFlux und Inkubator bei gesunden Probandinnen und Probanden	49
3.2	Phagozytose von Zymosan A nach PFOB Koinkubation bei gesunden Probandinnen und Probanden	56
3.2.1	Vorversuche.....	56
3.2.2	Vergleich der Phagozytose von Zymosan A und PFOB-NE im Zeitverlauf.....	57
3.2.3	Vergleich der Monozytensubpopulationen nach Koinkubation.....	63
3.3	Phagozytose der PFOB-NE bei Patientinnen und Patienten mit STEMI und KHK.....	64
3.3.1	Grundcharakteristika der Studienteilnehmerinnen und Studienteilnehmer.....	64
3.3.2	Vergleich der Phagozytose	66
3.3.3	Vergleich der Monozytenpopulationen nach Phagozytose	74
4	DISKUSSION	77
4.1	Das BioFlux.....	77
4.1.1	Phagozytose unter Flussbedingungen	77
4.1.2	Vergleich zur <i>in vivo</i> Situation	79
4.2	Phagozytose von Zymosan A und Koinkubation mit PFOB-NE.....	81
4.3	Phagozytose von PFOB-NE bei Patientinnen und Patienten mit Myokardinfarkt und KHK	83
4.3.1	Unterschiede in der Phagozytose zwischen den Patientengruppen.....	83
4.3.2	Unterschiede zwischen den Monozytensubpopulationen	84
4.4	Weiterführende Untersuchungen.....	87
4.5	Statistik.....	89
4.6	Fazit.....	91
5	LITERATURVERZEICHNIS	92

1 Einleitung

1.1 Koronare Herzkrankheit

Das Herz ist ein muskuläres Organ, dessen Aufgabe es unter anderem ist sauerstoffreiches Blut durch den gesamten Körper zu befördern und somit Zellen mit Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen (Hoth & Wischmeyer, 2016a). Um den Sauerstoffbedarf zu decken, muss das Herz mit ausreichend Blut versorgt werden. In Ruhe fließen ca. 5 % des Herzzeitvolumens durch das Herz, unter Belastung kann dieser Wert auf das Vier- bis Fünffache ansteigen (Gödecke, Schrader, & Kelm, 2019). Die linke Koronararterie, die sich in den *Ramus circumflexus* und den *Ramus interventricularis anterior* verzweigt, und die rechte Koronararterie, entspringen oberhalb der Aortenklappe. Sauerstoff und Nährstoffe müssen aufgrund der hohen Kapillardichte nur geringe Diffusionsstrecken überwinden, um die Versorgung der Kardiomyozyten zu gewährleisten (Gödecke et al., 2019; Hartmann & Stierle, 2017). Bei einer Verengung oder einem Verschluss der Koronararterien, werden die Kardiomyozyten nur unzureichend bis gar nicht durchblutet (Ischämie) und infolgedessen nicht mit Sauerstoff versorgt. Die Zellen in dem betroffenen Areal sterben ab und es kommt zum Myokardinfarkt (Thygesen et al., 2018). Die häufigste Ursache eines Myokardinfarkts ist die koronare Herzkrankheit (KHK) aufgrund arteriosklerotischer Gefäßveränderungen (Hoth & Wischmeyer, 2016a).

Bei der KHK handelt es sich um eine arteriosklerotische Erkrankung des Herzens, die zu Stenosierungen der Koronargefäße führt. Die Lebenszeitprävalenz beträgt 6.3 % für Frauen und 12.3 % für Männer, bei über 65-jährigen steigt die Prävalenz auf über 20 % an (Erdmann, 2011; Hinterseer & Knez, 2015). Die KHK verursacht über 40 % der kardiovaskulären Todesfälle, insbesondere infolge eines akuten Myokardinfarkts und durch die kardialen Folgen der KHK, wie beispielsweise die Herzinsuffizienz (Statistisches Bundesamt, 2019). Ungefähr ein Drittel aller Todesfälle beruhen in den westlichen Industrieländern auf den Auswirkungen einer akuten oder chronischen Einschränkung der Koronardurchblutung.

Die KHK ist eine chronische inflammatorische Erkrankung mit stabilen und instabilen Phasen. Die stabilen Phasen werden als chronisches Koronarsyndrom (*chronic coronary syndrome*) bezeichnet und von den instabilen Phasen des akuten Koronarsyndroms (*acute coronary syndrome*, ACS) abgegrenzt (Knuuti et al., 2020; Möllmann, Leistner, Schulze,

Sechtem, & Bauersachs, 2020). Bei der KHK handelt es sich um dynamische Prozesse mit zunehmenden Ablagerungen atherosklerotischer Plaques und funktionellen Veränderungen der Koronarzirkulation (Knuuti et al., 2020; Silber, 2019). Die endotheliale Dysfunktion spielt eine entscheidende Rolle bei der Progression der Arteriosklerose und somit der KHK (Heitzer, Schlinzig, Krohn, Meinertz, & Munzel, 2001; Schächinger, Britten, & Zeiher, 2000). Durch den Endothelschaden lagern sich zu Beginn Lipoproteine aus dem Blut an der Gefäßwand an, die enzymatisch und durch reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) oxidiert werden (Tabas, Williams, & Boren, 2007). Die dadurch entstandenen oxidierten Lipoproteine aktivieren das Endothel und fördern die Expression von Adhäsionsmolekülen. Diese steigern die Adhäsion von Leukozyten und Thrombozyten an die Gefäßwand. Chemoattraktive Stimuli fördern zusätzlich die Einwanderung von Monozyten und Lymphozyten in die subendotheliale Schicht (Hansson & Hermansson, 2011; Hansson, Robertson, & Soderberg-Naucler, 2006). Zu Makrophagen differenzierte Monozyten phagozytieren die oxidierten Lipoproteine und speichern sie in ihrem Zytoplasma. Die so entstandenen Schaumzellen bilden zusammen mit den Lymphozyten potenziell reversible Fetteinlagerungen (*fatty streaks*) und setzen proinflammatorische Zytokine, wie Interleukine (IL) und Tumornekrosefaktor- (TNF-) α frei (Bentzon, Otsuka, Virmani, & Falk, 2014; Golia et al., 2014; Hansson & Hermansson, 2011; Libby & Ridker, 2006). Ablagerungen von lipidhaltigem Zellinhalt und Debris im Gewebe verstärken die Entzündungsreaktion aufgrund gestörter Phagozytose weiter. Im Verlauf bildet sich durch Umbau und Fibrose des Bindegewebes der Intima ein irreversibler Plaque. Zwischen nekrotischem Kern und Lumen bildet sich eine fibröse Kappe aus extrazellulärer Matrix und glatten Muskelzellen (Schrijvers, De Meyer, Herman, & Martinet, 2007). Die Freisetzung von Matrix-Metalloproteasen durch Makrophagen im Plaque führt zu einem progressiven Abbau des Kollagens und einer Ausdünnung der fibrösen Kappe. Stabile atherosklerotische Läsionen können sich im Verlauf zu instabilen Läsionen entwickeln. Diese bestehen aus einer dünnen fibrösen Kappe, die wenige glatte Muskelzellen enthält, die den nekrotischen Kern aus toten Zellen, Lipidablagerungen und zellulären Debris umgeben (Sakakura et al., 2013; Schrijvers et al., 2007).

Arterielle Umbauprozesse führen zu einer Verringerung des Gefäßlumens und Wachstum des Plaqueanteils. Diese Gefäßverengungen führen zu einer Koronarstenose (Baenkler, Goldschmidt, Hahn, Hinterseer, & Knez, 2015; Bentzon et al., 2014). Es kommt zu einer Minderperfusion und somit zu einer Diskrepanz zwischen O_2 -Angebot und O_2 -Bedarf der Kardiomyozyten. Insbesondere bei Belastungen verhindern Stenosen einen adäquaten Anstieg des koronaren Blutflusses (Gödecke et al., 2019). Klinisch äußert sich dies in einem Angina-pectoris Anfall mit retrosternalen Schmerzen und Dyspnoe.

Trotz langer stabiler Zeiträume kann sich im Verlauf aufgrund von Plaquerupturen oder -erosionen ein ACS entwickeln (Knuuti et al., 2020; Silber, 2019). Subendotheliales Kollagen wird freigesetzt und führt zu einer Plättchenaktivierung und Koagulationskaskade, wodurch letztendlich der Thrombus entsteht (Makki, Brennan, & Girotra, 2013; Naghavi et al., 2003). Dadurch kommt es zu einer partiellen oder vollständigen Okklusion der Koronararterien, die sich als ST-Strecken-Hebungsinfarkt (STEMI, *ST-segment-elevation myocardial infarction*) und dem Nicht-ST-Strecken-Hebungsinfarkt (NSTEMI, *non ST-segment-elevation myocardial infarction*) darstellen können und zusammen mit der instabilen Angina-pectoris unter dem Begriff des ACS zusammengefasst werden (Gödecke et al., 2019; Hartmann & Stierle, 2017). Verschiedene Faktoren erhöhen die Wahrscheinlichkeit einer Plaqueruptur, darunter eine dünne fibrinöse Kappe, ein großer Lipidkern mit inflammatorischen Zellen, Matrix-Metalloproteinasen und ein geringer Anteil glatter Muskelzellen. Patientcharakteristika wie Änderungen der lokalen Scherkräfte, Plättchenaktivität, prothrombotische Zustände wie Dehydration, Hyperkoagulation und Infektionen, haben ebenfalls einen Einfluss (Burke et al., 2001; Libby & Ridker, 2006; Makki et al., 2013; Naghavi et al., 2003).

Durch Änderungen des Lebensstils, Medikamente oder Revaskularisation kann der chronische Verlauf einer KHK beeinflusst werden (Knuuti et al., 2020; Möllmann et al., 2020; Silber, 2019). Wichtige Risikofaktoren für die Entwicklung einer KHK sind Nikotinabusus, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Adipositas und Hyperlipoproteinämie (Herold, 2020). Weitere Risikofaktoren sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Beeinflussbarkeit	Risikofaktor
Beeinflussbar	Nikotinkonsum Adipositas Arterielle Hypertonie Physische Inaktivität Ernährung Emotionaler Stress Hyperlipidämie Diabetes mellitus
Nicht beeinflussbar	Alter Männliches Geschlecht Genetische Disposition

Tabelle 1: Risikofaktoren der Arteriosklerose (Arnett et al., 2019; Erdmann, 2005; Piepoli et al., 2016).

Die Diagnostik der KHK basiert auf einer ausführlichen Anamnese zur Erfassung der Risikofaktoren und einer körperlichen und klinischen Untersuchung (Albus et al., 2017). Zunächst gilt es eine instabile Situation auszuschließen, die diagnostische und therapeutische Schritte eines ACS nach sich ziehen würde (Jurisch & Laufs, 2021). Zur Basisdiagnostik gehören laborchemische Untersuchungen, das Elektrokardiogramm (EKG) und die

Echokardiografie. Weiterführende Untersuchungen schließen die Magnetresonanztomographie (MRT), die Perfusionsszintigrafie und die Koronarangiografie ein (Albus et al., 2017; Silber, 2019).

Bei mehr als 50 % der Patientinnen und Patienten zeigt das Ruhe-EKG keine Auffälligkeiten, diese schließen eine KHK jedoch nicht aus (Herold, 2020). Die Angina pectoris und elektrokardiographische Veränderungen treten zu Beginn häufig erst bei Belastung auf. Zu möglichen EKG-Veränderungen gehören Erregungsrückbildungsstörungen, Schenkelblöcke und Rhythmusstörungen (Herold, 2020; Hinterseer & Knez, 2015). Die Echokardiografie dient dem Ausschluss alternativer Ursachen der Beschwerden, der Identifikation regionaler Wandbewegungsstörungen, der Bestimmung der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) und Beurteilung der diastolischen Funktion. Die myokardiale Perfusion, Ischämie und Vitalität lassen sich unter Verwendung von Adenosin und Dobutamin im Stress-MRT beurteilen. (Hartmann & Stierle, 2017; Jurisch & Laufs, 2021). In Abhängigkeit von der Vortestwahrscheinlichkeit, die die Einteilung der Patientinnen und Patienten in Gruppen mit niedrigem, mittlerem und hohem Risiko für eine vorhandene relevante KHK erlaubt, werden weiterführende diagnostische Schritte eingeleitet (Knuuti et al., 2020).

Bei pathologischen Befunden der nicht-invasiven Diagnostik, einer instabilen Situation oder persistierenden Beschwerden bei leitliniengerechter Therapie sollte eine Koronarangiografie mit gegebenenfalls therapeutischer Intervention erfolgen (Jurisch & Laufs, 2021). Die Koronarangiografie ermöglicht die röntgenologische Darstellung der Koronargefäße mittels Kontrastmittel. Sie bildet den Goldstandard der Diagnostik zur präzisen Lokalisation und Bestimmung des Ausmaßes der KHK. Patientinnen und Patienten mit einem hohen Risiko profitieren von einer Revaskularisation im Hinblick auf die Prognoseabschätzung und eine optimierte Therapie. Indikationen für eine Koronarrevaskularisation sind 50 % Stenose des linken Hauptstamms und des proximalen *Ramus interventricularis anterior* (RIVA), 2- bis 3-Gefäßerkrankungen mit eingeschränkter linksventrikulärer Funktion, nachgewiesene, größere Ischämiezonen und 50 % Stenosierung des letzten verbleibenden Gefäßes (Hartmann & Stierle, 2017). Die koronare Bypass-Operation und die perkutane Koronarintervention (*percutaneous coronary intervention*, PCI) sind Standardverfahren der Revaskularisation. Diagnose und Therapie der KHK sind bei der PCI in einer Sitzung möglich. Über einen Führungsdraht wird ein Katheter in das stenosierte Koronargefäß eingeführt. Eine Ballon-Dilatation, also eine Aufdehnung des stenosierten Gefäßes, oder eine Stent-Implantation sind möglich. Der Erfolg der Intervention kann röntgenologisch kontrolliert werden. Je nach Zentrum werden 80-95 % aller perkutanen transluminalen coronaren Angioplastien (PTCA) mit Stent-Implantation durchgeführt. Diese bieten eine Reduktion der Restenose- und der Re-PCI-Rate. Die Rate der

Restenosen konnte durch *Drug-eluting-Stents* auf 5 % reduziert werden (Hartmann & Stierle, 2017).

Allgemeine therapeutische Maßnahmen der KHK beinhalten eine Reduktion der Risikofaktoren. Dazu gehört die Nikotinkarenz, Gewichtsnormalisierung, Einstellung des Hypertonus, Behandlung eines Diabetes mellitus, körperliches Training und Ernährung. Zur Prognoseverbesserung und Symptomreduktion ist die pharmakologische Therapie angebracht. Eingesetzt werden Nitrate, sowie Betablocker oder Kalziumantagonisten zur antianginösen Therapie. Die myokardiale Sauerstoffzufuhr wird verbessert bzw. der Sauerstoffbedarf vermindert und die Herzfrequenz gesenkt. Zur Prävention kardiovaskulärer Ereignisse wird täglich niedrig dosierte Acetylsalicylsäure als antithrombotische Therapie empfohlen. ACE- (*angiotensin converting enzyme*) Hemmer oder Angiotensinrezeptorblocker eignen sich bei Begleiterkrankungen wie Herzinsuffizienz, arterieller Hypertonie oder Diabetes mellitus (Hartmann & Stierle, 2017; Jurisch & Laufs, 2021).

1.2 Der akute Myokardinfarkt

Der größte Anteil der Myokardinfarkte entsteht im Rahmen einer KHK (Erdmann, 2011; Gödecke et al., 2019; Hartmann & Stierle, 2017; Hoth & Wischmeyer, 2016a). Lipide und Immunzellen akkumulieren als Folge der endothelialen Dysfunktion und bilden einen Plaque. Das Gefäßlumen wird eingengt und der Blutfluss eingeschränkt. Kommt es zur Destabilisation des Plaques, werden Substanzen freigesetzt, die zu einer Plättchenaktivierung und -aggregation und Thrombusformation führen, die die betroffene Koronararterie verschließt. Dadurch kommt es zu einem Missverhältnis zwischen Sauerstoffbedarf und -angebot, die Kardiomyozyten werden unzureichend oder gar nicht durchblutet und nicht mit Sauerstoff versorgt. Die Zellen in dem betroffenen Areal sterben ab und es kommt zum Myokardinfarkt (Hansson et al., 2006; Mann, Zipes, Libby, & Bonow, 2015; Thygesen et al., 2018). Seltener entstehen Infarkte aufgrund von Spasmen der Koronargefäße (Prinzmetal-Angina), Aortendissektionen oder Embolien. Bei weiter proximal gelegenen Verschlüssen ist wesentlich mehr Myokard betroffen als bei distalen Gefäßverschlüssen. Eine rechtzeitige Reperfusion kann die Ischämiedauer verkürzen und zu einer Reduktion der Infarktgröße führen (Moser, Van de Loo, & Bode, 2009).

Der akute Myokardinfarkt ist definiert als Verletzung des Myokards mit klinischem Nachweis akuter myokardialer Ischämie und positiven Nachweis von Troponin T im Serum sowie Symptome einer myokardialen Ischämie, Wandbewegungsstörungen in der Bildgebung, ischämietypische EKG-Veränderungen, angiographischer oder autoptischer Nachweis eines koronaren Thrombus (Gödecke et al., 2019; Hartmann & Stierle, 2017; Thygesen et al., 2018).

Der Myokardinfarkt lässt sich in STEMI und NSTEMI unterteilen. Bei einem STEMI handelt es sich um einen transmuralen Infarkt, bei dem alle Wandschichten betroffen sind. Dieser zeigt sich im EKG durch eine Hebung der ST-Strecke. Bei einem NSTEMI handelt es sich um einen Infarkt der Innenwandschichten, bei dem es im EKG definitionsgemäß nicht zu einer Hebung der ST-Strecke kommt (Hartmann & Stierle, 2017; Van de Werf et al., 2003).

1.2.1 Epidemiologie und klinische Bedeutung

Ischämische Herzkrankheiten, darunter der Myokardinfarkt, zählen zu den häufigsten Diagnosen für eine Krankenhauseinweisung und belegen Platz eins der häufigsten Todesursachen in Deutschland und weltweit (Meinertz et al., 2017; Statistisches Bundesamt, 2019; World Health Organisation (WHO), 2018). Erkrankungen des Herzens machten 2015 8.5 % aller im Rahmen der Krankenhausdiagnosestatistik vollstationären Fälle in Deutschland aus. Der Myokardinfarkt und andere kardiovaskuläre Erkrankungen gehören zu den Erkrankungen, die die meisten Kosten verursachen (Statistisches Bundesamt, 2019; Torio & Moore, 2016). Die Prävalenz ist bei Männern höher als bei Frauen, wobei das durchschnittliche Alter beim akuten Myokardinfarkt 65.6 Jahre für Männer und 72.0 Jahre für Frauen beträgt. Im Jahr 2018 starben über 5 % an einem akuten Herzinfarkt oder seinen Folgen. Zu den Komplikationen nach Infarkt zählen beispielsweise die Ausbildung von Herzrhythmusstörungen, Herzinsuffizienz und Ventrikelruptur (Mann et al., 2015; Meinertz et al., 2017; Statistisches Bundesamt, 2018; Virani et al., 2020; Yeh et al., 2010).

Zu den Risikofaktoren des akuten Myokardinfarkts gehören unter anderem Nikotinkonsum, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Adipositas und Hyperlipoproteinämie (Mann et al., 2015). Das häufigste Symptom bei einem akuten Myokardinfarkt sind anhaltende retrosternale oder links thorakale, atemunabhängige Schmerzen, oft mit Ausstrahlung in den linken Arm oder Hals. Diese können von Übelkeit, Dyspnoe, Angst, Unruhe, Schwitzen und Todesangst begleitet sein. Seltener sind Rücken- oder abdominale Schmerzen. Auf Gabe von Nitroglycerin zeigt sich keine Besserung. Begleitend kann es zu Zeichen der akuten Linksherzinsuffizienz mit Tachykardie, Hypotonie, Lungenödem, Zyanose und Schock und akuter Rechtsherzinsuffizienz mit Halsvenen- und Leberstauung kommen. Bei ca. 25 % aller Infarkte, zum Beispiel bei Diabetes mellitus, älteren Patientinnen und Patienten und Frauen, fehlt der typische Infarktschmerz (Bavry & Bhatt, 2009; Hartmann & Stierle, 2017; Mann et al., 2015; Thygesen et al., 2018).

Bei anhaltender Flussunterbrechung wird das Gewebe im Verlauf irreversibel geschädigt (Gödecke et al., 2019). Bei Patientinnen und Patienten mit STEMI handelt es sich um einen medizinischen Notfall. Ungefähr 25 % der Todesfälle ereignen sich noch vor Eintreffen im

Krankenhaus. Die Krankenhausmortalität bei einem STEMI liegt bei 7 %. Die Sterblichkeitsrate liegt im Jahr nach einem Infarkt bei ca. 20 %, bei älteren Patientinnen und Patienten steigt diese auf über 30 % (Erdmann, 2011; Hartmann & Stierle, 2017; Löwel, 2006; Zeymer, Gitt, & Senges, 2005). Die frühe Reperfusion ist daher von zentraler Bedeutung. Linksventrikuläre Dysfunktion kann somit reduziert und das Überleben verbessert werden. Je nach Verfügbarkeit der Methoden ist die unmittelbare PCI die bevorzugte Wahl. Ist diese nicht innerhalb von weniger als 120 Minuten möglich steht die Lysetherapie mit sekundärer PCI zur Wahl (Antman, 2008; Bavry & Bhatt, 2009; Gersh, Stone, White, & Holmes, 2005; Hartmann & Stierle, 2017).

Obwohl die Überlebensrate durch Fortschritte in der Behandlung durch frühzeitige Reperfusion gesteigert werden konnte (Floyd et al., 2009; Fox et al., 2007; Liew, Sulfi, Ranjadayalan, Cooper, & Timmis, 2006; Yeh et al., 2010), besteht die Gefahr eines Gewebeschadens und des Verlusts von kontraktilem Gewebe, wodurch es zu langfristigen Funktionseinschränkungen und infarktbedingten Komplikationen wie beispielsweise der Herzinsuffizienz kommen kann (Hellermann et al., 2003; Lewis et al., 2003; Lopez-Sendon & Lopez de Sa, 2008). Das Ausmaß dieser funktionellen Einschränkungen ist dabei von der Infarktgröße und dem Heilungsverlauf nach Infarkt abhängig (Frantz, Bauersachs, & Ertl, 2009; McKay et al., 1986). Die Heilung umfasst mehrere Phasen, von der Ischämie bis zur Ausbildung einer stabilen Infarktnarbe (Frangogiannis, 2008, 2012; Frantz et al., 2009; Nahrendorf et al., 2007; van der Laan et al., 2014).

1.2.2 Phasen des Infarkts

Der Myokardinfarkt und die nachfolgende Heilung können in vier Phasen eingeteilt werden: die Nekrose der Kardiomyozyten, die myokardiale Inflammation, die Proliferation von Fibroblasten und Endothelzellen und die Ausbildung der Infarktnarbe (van der Laan, Nahrendorf, & Piek, 2012). Ziel ist es die Nekrose abzuräumen und ein stabiles Narbengewebe aufzubauen.

Phase 1: Kardiomyozelluläre Nekrose

Damit die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) für die Kontraktion bereitstellen kann, benötigen Kardiomyozyten ausreichend Sauerstoff. Kommt es zu einem Verschluss einer Koronararterie und infolgedessen zu einer Unterversorgung der Zellen mit Blut, steht für die Atmungskette und somit die mitochondriale Bildung von ATP nicht mehr genügend Sauerstoffs zur Verfügung. Aufgrund der Reduktion der ATP-Konzentration wird nun die anaerobe Glykolyse zur Energiegewinnung genutzt (Del Re, Amgalan, Linkermann, Liu, & Kitsis, 2019; Katz, 2010; Muntean et al., 2016;

J. Zhang, Liu, Zhang, & Zhang, 2019; T. Zhou, Chuang, & Zuo, 2015). Durch anfallende Stoffwechselprodukte werden die Enzyme der anaeroben Glykolyse jedoch beeinträchtigt, so dass die anaerobe Glykolyse die aerobe Energieproduktion auf Dauer nicht ausgleichen kann (Jennings & Reimer, 1981; Jennings, Reimer, Hill, & Mayer, 1981; Mochizuki & Neely, 1979; Rovetto, Lamberton, & Neely, 1975). Die Akkumulation von Laktat und Protonen aus der Glykolyse senkt den intrazellulären pH-Werte, so dass über den Na^+/H^+ -Austauscher Protonen aus der Zelle hinaus und Na^+ in die Zelle hinein transportiert werden müssen. Durch die steigende Na^{2+} -Konzentration in der Zelle wird der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschmechanismus angeregt, so dass Na^{2+} aus der Zelle und Ca^{2+} in die Zelle befördert wird (Del Re et al., 2019; Inserte et al., 2008; J. Zhang et al., 2019; T. Zhou et al., 2015). Durch den Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle werden Ca^{2+} -abhängige Proteasen stimuliert, die den Abbau von Proteinen des Zytoskeletts, des endoplasmatischen Retikulums und der Mitochondrien bewirken (Baines, 2009; Garcia-Dorado, Ruiz-Meana, Inserte, Rodriguez-Sinovas, & Piper, 2012; Kalogeris, Bao, & Korthuis, 2014; Whelan, Kaplinskiy, & Kitsis, 2010). Folglich kommt es zur Nekrose der Zellen.

Phase 2: Akute myokardiale Inflammation

Der Zellinhalt der nekrotischen Zellen wird in das umliegende Gewebe entleert und Alarmine (auch *damage associated molecular patterns*, DAMPs) werden abgegeben. Diese Moleküle lösen aufgrund der Abwesenheit pathogener Erreger in der zweiten Phase der Heilung eine sterile Entzündungsreaktion aus, durch die Immunzellen rekrutiert werden (G. Y. Chen & Nuñez, 2010; Kono & Rock, 2008). Zusammen mit Fragmenten der extrazellulären Matrix regen DAMPs das Komplementsystem und *Toll-like* Rezeptoren (TLR) an (Christia & Frangogiannis, 2013; Frangogiannis, 2012; Ong et al., 2018; Timmers et al., 2012). Dadurch wird der Transkriptionsfaktor nukleärer Faktor (NF)- κ B aktiviert, der die Expression von Zytokinen und Zelladhäsionsmolekülen einleitet. Während der Ischämie/Reperfusion werden auch ROS gebildet, die über NF- κ B zu einer Freisetzung von Zytokinen führen (Christia & Frangogiannis, 2013; Kalogeris et al., 2014; Moris et al., 2017). Stimuli wie ROS, Matrixfragmente oder Komplementfaktoren aktivieren residente Fibroblasten, Endothelzellen und Mastzellen als Initiatoren der Entzündungsreaktion woraufhin pro-inflammatorischen Zytokine sezerniert und die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen induziert wird (W. Chen & Frangogiannis, 2013). Dadurch werden Leukozyten, darunter neutrophile Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten, aus dem Blut in das Infarktareal rekrutiert und wandern in Richtung nekrotischer Zellen (Frangogiannis, 2007, 2008; McDonald et al., 2010; Ong et al., 2018; van der Laan, Nahrendorf, et al., 2012; F. Yang et al., 2002).

Neutrophile Granulozyten wandern eine Stunde nach Reperfusion in das infarzierte Areal ein und phagozytieren tote Zellen und Debris wodurch sie zerstörte Matrix- und Zellbestandteilen beseitigen (Dreyer et al., 1991; Frangogiannis, 2008). Eine übermäßige Extravasation kann zu mikrovaskulären Verschlüssen führen und die Perfusion weiter einschränken. Die von Granulozyten freigesetzten toxischen Metabolite, wie ROS und proteolytische Enzyme, können Kardiomyozyten, vaskuläre Endothelzellen und extrazelluläre Matrix schädigen und den myokardialen Schaden verschlimmern. Patientinnen und Patienten mit hohen Konzentrationen zirkulierender neutrophiler Granulozyten zeigen ungünstige Umbauprozesse und eine schlechtere Prognose (Frangogiannis, 2008; O'Donoghue et al., 2008; Takahashi et al., 2008). Die Barrierefunktion der Gefäßwände ist limitiert und Immunzellen können leichter in das Gewebe einwandern. Granulozyten sezernieren zudem chemotaktische Proteine, durch die weitere Immunzellen angezogen werden und die Entzündungsreaktion somit vorangetrieben wird (Frangogiannis, 2008; Hirase & Node, 2012; Jordan, Zhao, & Vinten-Johansen, 1999; Soehnlein et al., 2008; Vinten-Johansen, 2004).

Einen Tag nach Myokardinfarkt sammeln sich Monozyten im Gewebe an (Nahrendorf et al., 2007). Diese können anhand verschiedener Oberflächenmarker und Funktionen in unterschiedliche Subpopulationen unterteilt werden (Ghattas, Griffiths, Devitt, Lip, & Shantsila, 2013; Italiani & Boraschi, 2014; Kapellos et al., 2019; Nahrendorf & Swirski, 2013; Weber et al., 2016). Das Chemokin CCL2 (auch *monocyte chemoattractant protein 1*, MCP-1) führt unmittelbar nach Infarkt zur Infiltration von inflammatorischen klassischen Monozyten (CD14⁺CD16⁻, *cluster of differentiation*). Diese erreichen an Tag zwei nach Myokardinfarkt ihr Maximum und sind an Phagozytosevorgängen beteiligt. In der Proliferationsphase sinkt die Anzahl der klassischen Monozyten und über einen CX3CL1-vermittelten Mechanismus wandern reparative, nicht-klassische Monozyten (CD14⁺CD16⁺) in das Gewebe ein. Diese Zellen sind vor allem an Tag fünf nach Myokardinfarkt vorzufinden und fördern die Zellproliferation, Kollagenbildung und Angiogenese (Dewald et al., 2005; Frangogiannis, 2002; J. M. Lambert, Lopez, & Lindsey, 2008; Manoonkitiwongsa, Jackson-Friedman, McMillan, Schultz, & Lyden, 2001; Moldovan & Moldovan, 2005; Nahrendorf et al., 2007; Troidl et al., 2009; Tsujioka et al., 2009; Weihrauch, Arras, Zimmermann, & Schaper, 1995). In Kapitel 1.3 soll näher auf die Monozytensubpopulationen eingegangen werden.

Phase 3: Granulationsgewebe

Monozyten, Myofibroblasten und proliferierende Endothelzellen formen nach Entfernung nekrotischer Zellen und Zelldebris im infarzierten Areal ein stabiles, vaskularisiertes Ersatzgewebe (Frangogiannis, 2008). Anti-inflammatorische Zytokine wie IL-10 und TGF-β

(*transforming growth factor beta*), die von nicht klassischen Monozyten, Makrophagen und T-Zellen sezerniert werden, führen den Wechsel zur Proliferations- und Heilungsphase herbei (Ma, Iyer, Jung, Czubyrt, & Lindsey, 2017; Ong et al., 2018; Ortega-Gomez, Perretti, & Soehnlein, 2013; Westman et al., 2016). Des Weiteren fördern Zytokine und Wachstumsfaktoren die Fibroblastenproliferation und die Angiogenese (W. Chen & Frangogiannis, 2013; Ma et al., 2017; Swirski & Nahrendorf, 2013). Zu Myofibroblasten differenzierte Fibroblasten werden zur Produktion von Matrixproteinen veranlasst, wodurch das beschädigte Gewebe durch eine stabile Narbe substituiert wird (W. Chen & Frangogiannis, 2013; Ma et al., 2017; Ong et al., 2018; Prabhu & Frangogiannis, 2016; Shinde & Frangogiannis, 2014). Myofibroblasten bilden im infarzierten Areal Kollagen Typ III, das ein lockeres, mechanisch weniger stabiles Geflecht bildet und dem Herzen somit Beweglichkeit ermöglicht. Mit der Zeit löst Kollagen I das Kollagen Typ III ab. Hierdurch wird das Infarktareal mechanisch stabiler und fester (Cleutjens, Verluyten, Smiths, & Daemen, 1995; Prabhu & Frangogiannis, 2016). Während der Proliferationsphase regen von Monozyten und Makrophagen sezernierte Wachstumsfaktoren wie der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor oder der Fibroblasten-Wachstumsfaktor die Angiogenese an (Frangogiannis, 2008; Prabhu & Frangogiannis, 2016; Shinde & Frangogiannis, 2014). Die neuen Gefäße haben ihren Ursprung an unversehrten Gefäßen im Randbereich des Infarkts und durchziehen das Granulationsgewebe. Somit können die Zellen, die an der Wundheilung teilhaben mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt werden (T. Zhao, Zhao, Chen, Ahokas, & Sun, 2010).

Phase 4: Bildung von Regeneratgewebe

In der letzten Phase bildet sich die Infarktnarbe aus. Aufgrund apoptotischer Vorgänge der Immunzellen, Endothelzellen und Myofibroblasten, reduzieren sich die Zellzahl und Kapillardichte im Bereich der Infarktnarbe (Frangogiannis, 2000; Takemura et al., 1998; W. Zhao, Lu, Chen, & Sun, 2004). Durch die Quervernetzung von fibrillärem Kollagen, die durch die Lysyloxidase katalysiert wird, entsteht ein dichtes und widerstandsfähiges Narbengewebe im Infarktareal (Eyre, 1980; Holmes, Borg, & Covell, 2005; Koshy, 2003; Lerman et al., 1983). Die Narbe stabilisiert den infarzierten Bereich und schützt das Herz vor einer Ruptur. Durch die zunehmende Rigidity des Ventrikels wird die Kontraktilität jedoch begrenzt und die Pumpfunktion somit reduziert. Am Ende der Ausreifungsphase hat sich eine weitgehend zellfreie Infarktnarbe ausgebildet, die mechanisch stabil und dennoch flexibel ist (Frangogiannis, 2006; Holmes et al., 2005; van der Laan, Nahrendorf, et al., 2012).

1.2.3 Kommunikation von lokaler und systemischer Immunantwort nach Infarkt

Inflammatorische Prozesse beeinflussen infarktassoziierte myokardiale und systemische Reaktionen, bei denen es zu Konzentrationsänderungen entzündlicher Mediatoren kommt. In Folge der myokardialen Ischämie und der folgenden Reperfusion kommt es zu inflammatorischen Reaktionen, die Leukozyten, Thrombozyten, Endothelzellen und myokardiales Gewebe miteinbeziehen. Durch die sezernierten proinflammatorischen Zytokine der Endothelzellen und die Aktivierung von Leukozyten und Endothelien wird die systemische Inflammation im Bereich der Myokardnekrose, des rupturierten Plaques und der Mikrozirkulation aufrechterhalten (Buffon et al., 2002). Die vermehrte Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren wie IL-6, IL-1, IL-2 oder TNF- α durch Endothelzellen und Leukozyten trägt zu einer systemischen Inflammation bei und stört die myokardiale Kontraktilität sowie die vaskuläre endotheliale Funktion (Bonvini, Hendiri, & Camenzind, 2005; Mazzone et al., 1999). Die systemische Entzündungsreaktion kann die Gefäßpermeabilität, die Chemotaxe sowie phagozytäre Prozesse über das Komplementsystem stimulieren. Dieses aktiviert die Produktion verschiedener Zytokine, die zusammen mit dem plättchenaktivierenden Faktor die endovaskuläre Adhäsion von neutrophilen Granulozyten stimulieren und somit die vaskuläre und Gewebeinflammation verstärken (Bonvini et al., 2005; Griselli et al., 1999). Durch die Sekretion inflammatorischer Mediatoren durch das Endothel wird die Progredienz der Arteriosklerose und der klinische Verlauf von Patientinnen und Patienten nach Infarkt beeinflusst (Biasucci et al., 1996; Bonvini et al., 2005). Zudem zeigt sich ein Zusammenhang zwischen erhöhten Leukozytenzahlen, C-reaktives Protein (CRP), Serum Albumin A und IL-Konzentrationen und der Mortalität nach Infarkt, dem Risiko für zukünftige, kardiale Ereignisse und weiteren Komplikationen (Burke et al., 2002; Corti, Salive, & Guralnik, 1996; Friedman, Klatsky, & Siegelau, 1974; Griselli et al., 1999; Liuzzo et al., 1994; Lowe, Machado, Krol, Barton, & Forbes, 1985; Ridker, Hennekens, Buring, & Rifai, 2000; Ridker, Hennekens, Roitman-Johnson, Stampfer, & Allen, 1998).

Endothelzellen sezernieren im Rahmen des Myokardinfarkts Adhäsionsmoleküle, Wachstumsfaktoren und Zytokine wie beispielsweise das intrazelluläre Adhäsionsmolekül eins, das vaskuläre Zelladhäsionsmolekül eins, den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor, MCP, PDGF (*platelet-derived growth factor*) oder E-Selectin. Dadurch werden Leukozyten in das infarzierte Areal rekrutiert. Die lokale Immunantwort wird durch die Produktion chemotaktischer Zytokine endothelialer Zellen aufrechterhalten (Kurose, 2021; Mazzone et al., 1999; Prabhu & Frangogiannis, 2016). Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen, endotheliale Zellen, Fibroblasten und glatte Muskelzellen sezernieren in Folge des Infarkts proinflammatorische Zytokine und Interleukine, unter anderem TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6 und

IL-8, die bei der Plaquestabilisierung und Thrombogenese eine Rolle spielen und mit der Größe des Infarkts in Zusammenhang stehen (Maury & Teppo, 1989; Mizia-Stec et al., 2003; Neumann et al., 1997; Neumann et al., 1995; Pannitteri et al., 1997). Ihre Konzentrationen sind bei Patientinnen und Patienten mit akutem Myokardinfarkt erhöht. Infarktpatientinnen und -patienten mit erhöhten Serumkonzentrationen antiinflammatorisch wirksamer Mediatoren wie IL-10 zeigen einen günstigeren klinischen Verlauf nach Myokardinfarkt (Heeschen et al., 2003; Mizia-Stec et al., 2003).

Die entzündlichen Vorgänge beeinflussen klinische Parameter, die kardiale Funktion und den klinischen Verlauf der Patientinnen und Patienten. Die Auflösung der Entzündung erfordert die Rekrutierung, Differenzierung und Aktivierung reparativer Zellen wie neutrophiler Granulozyten, Makrophagen, inhibitorischer Monozyten und regulatorischer T-Zellen. Die Freisetzung anti-inflammatorischer Mediatoren und Zytokine wie IL-10, TGF- β , die proinflammatorische Signalkaskaden hemmen, spielt ebenso eine Rolle. IL-10 und TGF- β inhibieren die Produktion weiterer Zytokine durch Makrophagen, wodurch die inflammatorische Reaktion unterdrückt wird (Christia & Frangogiannis, 2013; Frangogiannis, 2012; Kitamura, 1997; Ouyang, Rutz, Crellin, Valdez, & Hymowitz, 2011; Werner et al., 2000). Überschießende sowie verminderte Aktivität der Monozyten, die durch therapeutische Intervention beeinflusst werden können, führen zu beeinträchtigter Heilung (Dobaczewski, Xia, Bujak, Gonzalez-Quesada, & Frangogiannis, 2010; Huebener et al., 2008; Kempf et al., 2011). Eine überschießende Immunantwort kann zu einer zusätzlichen Schädigung des Gewebes führen und damit zu einer weiteren Einschränkung der Herzfunktion (Maekawa et al., 2002; van der Laan, Hirsch, et al., 2012). Durch vermehrte Einwanderung der Immunzellen kommt es zu einem verstärkten Abbau der extrazellulären Matrix. Die Folge ist eine Ausdehnung des Infarktareals mit folgender linksventrikulärer Dilatation, Bildung von Aneurysmen und Ruptur der Herzwand (de Lemos et al., 2007; Dobaczewski et al., 2010; Frangogiannis, 2012; Maekawa et al., 2002; van den Borne et al., 2009). Der Aufbau eines stabilen Narbengewebes wird durch die verlängerte Immunantwort beeinträchtigt. Dadurch kann es zu einer erhöhten Dilatation des Ventrikels kommen (Frangogiannis, 2012; Panizzi et al., 2010). Die verspätete Reduktion der Immunantwort würde zu einer Ausweitung der inflammatorischen Reaktion auf das nicht infarzierte Gewebe des Myokards führen und zu einer gesteigerten Fibrosierung mit einhergehender Reduktion der Pumpfunktion des Herzens (Frangogiannis et al., 2005; Sun et al., 2004; Takahashi et al., 2008). Eine zu geringe Aktivität der Monozyten wird mit Heilungsdefekten und verstärkter Thrombusbildung assoziiert. Daher ist es von Vorteil die Einwanderung von Monozyten nach Infarkt zu visualisieren und zu quantifizieren, um die

Regulation der Immunantwort dazustellen, Risiken abschätzen zu können und die Therapie zu überwachen.

1.2.4 Diagnostische Werkzeuge

Neben der klinischen Symptomatik sind vor allem elektrokardiographische Befunde, die Labordiagnostik und die PCI wegweisend zur Diagnostik und Therapie eines Myokardinfarkts. Zentrales Diagnostikum bei Verdacht auf einen Myokardinfarkt ist bereits prä-hospital das EKG. Ein prä-hospitaler EKG reduziert die Zeit bis zur Diagnose und Behandlung und steigert die Überlebensrate (Chan et al., 2012; Thygesen et al., 2018). Infarkttypische Veränderungen zeigen sich initial bei 60-70 % der Patientinnen und Patienten. Bei anhaltenden thorakalen Schmerzen und ST-Strecken-Hebungen in mindestens zwei benachbarten Ableitungen im EKG oder neu aufgetretenem Linksschenkelblock liegt die Wahrscheinlichkeit eines Verschlusses der Koronararterien bei ca. 90 %. Folgende persistierende ST-Strecken-Hebungen sprechen für einen STEMI (Ibanez et al., 2018; Thygesen et al., 2018):

- Männern über 40 Jahre: ≥ 0.20 mV in V_2 - V_3
- Männern unter 40 Jahre: ≥ 0.25 mV in V_2 - V_3
- Frauen: ≥ 0.15 mV in V_2 - V_3
- ≥ 0.10 mV in allen anderen Ableitungen

Des Weiteren kann es zu nicht infarkttypischen Veränderungen in ca. 20 % der Fälle kommen. Dabei handelt es sich um ST-Streckensenkungen, Veränderungen der T-Welle und neu aufgetretenem Linksschenkelblock. Die Unterscheidung zwischen STEMI und NSTEMI dient zudem der Risikostratifizierung (Bavry & Bhatt, 2009; Hartmann & Stierle, 2017). Die alleinige Anwendung des EKGs zur Diagnosestellung ist nicht hinreichend, da ST-Strecken-Veränderungen auch bei anderen Erkrankungen wie Perikarditis oder linksventrikulärer Hypertrophie vorkommen können (Thygesen et al., 2018).

Labordiagnostisch sind vor allem die Troponine (cTnT und cTnI) als Marker kardialer Verletzung von Bedeutung. Es handelt sich um Komponenten des kontraktiven Apparates myokardialer Zellen, die vor allem im Herzen exprimiert werden. Die myokardiale Verletzung ist definiert als Anstieg der Troponinlevel im Serum oberhalb der 99. Perzentile des Referenzlimits (Hartmann & Stierle, 2017; Thygesen et al., 2018). Der Nachweis erhöhter Troponinkonzentrationen ist bereits ein bis zwei Stunden nach Schmerzbeginn möglich. Erhöhte Werte lassen sich bis zu zwei Wochen nach dem Ereignis messen. Bei den Troponinen handelt es sich um den sensitivsten Marker eines Herzmuskelschadens, jedoch ist ihr Anstieg nicht spezifisch für den Myokardinfarkt und gibt keinen Aufschluss über die Ätiologie. Erhöhte Werte können auch bei Myokarditiden, Kardiomyopathien, Sepsis und Nierenerkrankungen

aufzutreten. Andere Biomarker wie Kreatinkinase (CK), CK-MB und Myoglobin sind weniger spezifisch, jedoch korreliert der maximale Wert der CK-MB mit der Nekrosegröße und kann zusammen mit der CK der Detektion eines Re-Infarkts dienen. Die Zeit des Anstiegs nach Infarktbeginn, das Maximum und die Normalisierung nach Infarkt unterschieden sich für die verschiedenen Laborparameter (siehe Tabelle 2). Die Ergebnisse labordiagnostischer Tests sollten für therapeutische Entscheidungen nicht abgewartet werden (Antman et al., 2004; Bavry & Bhatt, 2009; Hartmann & Stierle, 2017; Mann et al., 2015; Thygesen et al., 2018).

Laborparameter	Anstieg nach Infarktbeginn	Maximum nach Infarktbeginn	Normalisierung nach Infarkt
Myoglobin	2-4 h	6-12 h	1 Tag
TnT	1-6 h	12-96 h	6-14 Tage
CK	3-12 h	12-24 h	2-6 Tage
CK-MB	3-12 h	12-242 h	2-3 Tage

Tabelle 2: Zeitverlauf der Laborparameter nach Myokardinfarkt. TnT = Troponin T, CK = Kreatinkinase, h = Stunden. (AMBOSS GmbH, 2022; Solecki et al., 2015).

Bildgebende Verfahren wie die Echokardiographie, MRT, Computertomographie (CT) und nuklearmedizinische Verfahren bieten vor allem prognostische Informationen über das Ausmaß des Infarkts, aufgetretene Komplikationen und die ventrikuläre Funktion.

Die Echokardiografie ist eine nicht invasive Methode zur Beurteilung der kardialen Funktion und Morphologie. Durch einen Schallkopf, der dem Thorax aufliegt (transthorakale Echokardiografie, TTE) oder sich im Ösophagus (Transösophageale Echokardiografie, TEE) befindet werden Ultraschallwellen ausgesendet. Die an den Grenzflächen von Strukturen unterschiedlicher Dichte entstehenden Reflexionen werden vom Schallkopf registriert, so dass das empfangene Signal auf einem Monitor dargestellt werden kann. Die Echokardiografie kann die Diagnostik des Herzinfarkts bei nicht diagnostischem EKG, aber thorakalen Schmerzen unterstützen. Mit Hilfe der Echokardiografie lassen sich die Myokardperfusion, Flussgeschwindigkeit des Blutes, die ventrikuläre Pumpfunktion, Funktion und Morphologie der Herzklappen und Wandbewegungsstörungen beurteilen. Es liefert Informationen über Komplikationen wie Herzinsuffizienz, Septumruptur, Papillarmuskelabriss oder Mitralklappeninsuffizienz und dient der Prognosebeurteilung (Gödecke et al., 2019; Mann et al., 2015; Schäfers et al., 2008; Van de Werf et al., 2003; Van de Werf et al., 2008).

Die MRT ermöglicht neben der Lokalisation und Größenbestimmung des infarzierten Areals eine frühe Erkennung und eine Beurteilung des Schweregrades der Ischämie. Des Weiteren bietet es die Möglichkeit die Perfusion von infarziertem und nicht infarziertem Gewebe zu untersuchen sowie des reperfundierten Myokards. Gefährdete Areale können bestimmt werden und Ödeme, Fibrose, hypertrophe Areale, Wandbewegungen identifiziert werden. Durch kontrastmittelgestützte Verfahren mit Gadolinium können Areale myokardialer

Nekrose akkurat bestimmt werden (Mann et al., 2015). Bei einer akuten Nekrose kommt es zu einer Anreicherung von Gadolinium, da die Zellmembranen rupturieren und das Verteilungsvolumen zunimmt (Vöhringer, Mahrholdt, Yilmaz, & Sechtem, 2007). Das Kontrastmittel verbleibt länger vor Ort und lässt sich als sogenanntes *Late Gadolinium Enhancement* (LGE) nutzen. Dabei handelt es sich nicht um einen Absolutwert, der Kontrast wird in Beziehung zum gesunden Myokard gesetzt. Das LGE-Signal entspricht in Lokalisation und Ausdehnung dem Infarktareal (Kim, Chen, Lima, & Judd, 1996; Vöhringer et al., 2007).

Die CT basiert darauf, dass eine Röntgenquelle den Körper durchstrahlt. Die Schwächung der Röntgenstrahlung durch Strukturen im Körper wird mittels Detektoren registriert und über die Schwächungswerte werden Querschnittsbilder des Körpers errechnet. Mittels CT lassen sich Wanddicke und Größe der Herzhöhlen bestimmen. Akute und ältere Infarktareale, Aneurysmen und intrakardiale Thromben können detektiert werden. Zur Visualisierung der Ventrikel und Herzklappen ist intravenös injiziertes Kontrastmittel nötig (Mann et al., 2015; Schäfers et al., 2008).

Nuklearmedizinische Verfahren wie die Positronenemissionstomographie (PET) und die Einzelphotonenemissionscomputertomographie (*single photon emission computed tomography*, SPECT) können einen Myokardinfarkt detektieren, die Infarktgröße, den kollateralen Fluss und gefährdetes Myokard beurteilen. Die Effekte des Infarkts auf die ventrikuläre Funktion können bestimmt und die Prognose der Patientin/des Patienten mit STEMI abgeschätzt werden (Mann et al., 2015; Schäfers et al., 2008).

1.3 Monozytensubpopulationen

1.3.1 Differenzierung und Funktion

Monozyten gehören zu den mononukleären Zellen, die sich von myeloischen Stammzellen ableiten und die Vorläuferzellen der Makrophagen und zum Teil der dendritischen Zellen bilden (Auffray, Sieweke, & Geissmann, 2009; Fogg et al., 2006). Als antigenpräsentierende Zellen ist ihre Aufgabe die zellvermittelte Immunabwehr des Körpers. Sie sind an der Erkennung und Phagozytose von Mikroorganismen und Zelldetritus beteiligt, sowie an der Synthese pro- und antiinflammatorischer Zytokine und der Aktivierung von B- und T-Lymphozyten (Hoth & Wischmeyer, 2016b; Williams, Rhoades, Newland, & Kelsey, 1999). Dabei unterscheidet man in Abhängigkeit von Zelloberflächenproteinen verschiedene Phänotypen, die sich funktionell unterscheiden: CD14⁺⁺CD16⁻-Monozyten (klassische Monozyten), CD14⁺⁺CD16⁺-Monozyten (intermediäre Monozyten) und CD14⁺CD16⁺⁺-Monozyten (nicht klassische Monozyten) (Kapellos et al., 2019; Ozanska, Szymczak, & Rybka, 2020; Weber et al., 2016). Periphere

Monozyten exprimieren das CD14-Molekül auf ihrer Oberfläche. Dabei handelt es sich um ein Glykoprotein, das über Glykophosphatidylinositol mit der Monozytenmembran verbunden ist. CD14 Proteine sind multifunktionelle Rezeptoren, die Teil des membranständigen TLR-Komplexes sind. Dadurch sind sie für die Erkennung von Lipopolysacchariden (LPS), Phospholipiden und Peptidoglykanen zuständig (Devitt et al., 1998; Scherberich, 2003; Simmons, Tan, Tenen, Nicholson-Weller, & Seed, 1989). Die Erkennung von LPS löst proinflammatorische Reaktionen aus, die aus der Ausschüttung reaktiver Sauerstoff- und Nitrospezies und der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine bestehen (Abbas, Lichtman, & Pillai, 2019). Zu den proinflammatorischen Zytokinen gehören beispielsweise IL-1, IL-8 und TNF- α , die zu einer verstärkten Stimulation von Makrophagen und CD14⁺CD16⁻-Monozyten führen (Italiani & Boraschi, 2014). Einige Monozyten exprimieren zudem das CD16-Molekül, ein Fc- γ -III-Rezeptor (*fragment crystallizable receptor*) für Immunglobulin (IG) G III. Klassische Monozyten machen ca. 90 % der Monozyten aus, wohingegen nicht-klassische Monozyten ca. 10 % ausmachen (Passlick, Flieger, & Ziegler-Heitbrock, 1989; Ziegler-Heitbrock et al., 1993).

Klassische Monozyten besitzen eine höhere Phagozytoseaktivität als nicht klassische Monozyten und sind vor allem an der Beseitigung von Zelldebris beteiligt (Cros et al., 2010; Shantsila et al., 2011). Letztere ähneln funktionell und phänotypisch ausgereiften Gewebsmakrophagen und entstehen während akuter und chronischer Entzündung (Ziegler-Heitbrock et al., 1993). Sie exprimieren eine höhere Rate des *Major Histocompatibility Complex* (MHC) Klasse II (Zawada et al., 2011; Ziegler-Heitbrock et al., 1993). CD16 exprimierende Monozyten werden weiter unterteilt in intermediäre (CD14⁺⁺CD16⁺) und nicht klassische Monozyten (CD14⁺CD16⁺⁺) (Weber et al., 2016; Ziegler-Heitbrock et al., 2010). Intermediäre Monozyten sind ebenfalls an der Phagozytose beteiligt, jedoch zu einem geringeren Anteil als klassische Monozyten (Cros et al., 2010; Shantsila et al., 2011; Weber et al., 2016). Des Weiteren wird ihnen aufgrund der erhöhten Expression von HLA (*human leukocyte antigen*)-DR eine verbesserte Fähigkeit zur Antigenpräsentation zugeschrieben (Passlick et al., 1989; Rossol, Kraus, Pierer, Baerwald, & Wagner, 2012; Wong et al., 2012; Ziegler-Heitbrock, 2007). Verglichen mit nicht klassischen Monozyten zeigen intermediäre Monozyten eine stärkere Phagozytoseaktivität und eine höhere Produktion von TNF- α , IL-6, IL-10 und IL-1 β auf Stimulation mit LPS (Cros et al., 2010; Shantsila et al., 2011; Skrzeczynska-Moncznik et al., 2008). Nicht klassische Monozyten zeigen die Fähigkeit zur aktiven Überwachung des vaskulären Endothels unter inflammatorischen Bedingungen und tragen zur Beseitigung geschädigter Zellen und Debris, zur Wundheilung und Gewebewiederherstellung bei. Im Gegensatz zu klassischen und intermediären Monozyten werden sie nicht mit der

Phagozytose in Verbindung gebracht (Shantsila et al., 2011; Thomas, Tacke, Hedrick, & Hanna, 2015; Weber et al., 2016).

Die Monozytensubpopulationen zeigen in Abhängigkeit ihrer Chemokinrezeptoren unterschiedliche Migrationseigenschaften. Nicht klassische Monozyten zeigen eine höhere Expression des Chemokin-Rezeptors CCR5 und CX3CR1 als klassische Monozyten, jedoch eine geringe Expression von CCR2. Klassische Monozyten hingegen exprimieren vermehrt CCR2 (Auffray et al., 2009; Geissmann, Jung, & Littman, 2003; Gordon & Taylor, 2005; Rossol et al., 2012; Weber et al., 2000). Der CX3CR1-Rezeptor ist an der Adhäsion und Migration von Leukozyten ins Gewebe beteiligt. Hauptligand des CCR2 ist MCP-1, ein Chemokin, das Monozyten rekrutiert und zu einem großen Anteil von Makrophagen und Monozyten gebildet wird (Ancuta, Moses, & Gabuzda, 2004; Ancuta et al., 2003; Dewald et al., 2005; Gu, Tseng, & Rollins, 1999).

Bezüglich der Zytokinproduktion der Monozytensubpopulationen konnten bisher keine übereinstimmenden Ergebnisse gefunden werden. In einigen Studien werden intermediäre Monozyten mit einer gesteigerten Produktion von TNF- α , IL-1 β und IL-6 in Verbindung gebracht (Belge et al., 2002; Cros et al., 2010; Frankenberger, Sternsdorf, Pechumer, Pforte, & Ziegler-Heitbrock, 1996; Schlitt et al., 2004; Skrzeczynska-Moncznik et al., 2008). Wong et al. (2011) hingegen konnten nach Stimulation mit LPS eine gesteigerte Synthese von TNF- α und IL-1 β durch nicht klassische Monozyten zeigen, jedoch keine Unterschiede bei IL-6 und IL-8. In einigen Studien konnte eine vermehrte Produktion von TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 und IL-12, sowie eine geringere Produktion des anti-inflammatorischen IL-10 gezeigt werden (Ancuta, Weiss, & Haeffner-Cavaillon, 2000; Belge et al., 2002; Frankenberger et al., 1996; Rossol et al., 2012; Szaflarska et al., 2004; Ziegler-Heitbrock, 2007).

Eine Änderung der Zellzahl bei den verschiedenen Monozytensubpopulationen wurde bisher bei einigen inflammatorische Prozesse nachgewiesen. Im Mausmodell zeigte sich ein Anstieg von Ly6C^{hi} (Lymphozytenantigen), das den klassischen Monozyten beim Menschen entspricht, nach zerebraler und myokardialer Ischämie (Chu et al., 2016; X. Zhang et al., 2016). Auch beim Menschen kommt es im Verlauf einer Infektion oder Autoimmunprozessen zu einer Veränderung der Zellzahl der Monozytensubpopulationen. Bei der Kawasaki-Arteriitis, rheumatoider Arthritis, chronischen Infekten wie mit dem humanen Immundefizienz-Virus, bakteriellen Infektionen, malignen Neoplasien und auch bei der koronaren Herzkrankheit zeigt sich beispielsweise ein Anstieg der nicht klassischen Monozyten (Fingerle et al., 1993; Katayama, Matsubara, Fujiwara, Koga, & Furukawa, 2000; Kawanaka et al., 2002; Melichar, Touskova, & Vesely, 2002; Nockher, Bergmann, & Scherberich, 1994; Schlitt et al., 2004; Skrzeczynska, Kobylarz, Hartwich, Zembala, & Pryjma, 2002; Thieblemont, Weiss, Sadeghi,

Estcourt, & Haeffner-Cavaillon, 1995). Bei der medikamentösen Therapie der Kawasaki-Arteriitis, der rheumatoiden Arthritis und der Behandlung des septischen Schocks nimmt der Anteil dieser Zellen wieder ab (Katayama et al., 2000; Kawanaka et al., 2002; Tsujimoto et al., 2004). Hochdosierte Therapien mit Glukokortikoiden führt ebenfalls zu einer Reduktion nicht klassischer Monozyten sowie einer Zunahme klassischer Monozyten (Dayyani et al., 2003; Fingerle-Rowson, Angstwurm, Andreesen, & Ziegler-Heitbrock, 1998).

Ein Anstieg der intermediären Monozyten wurde bei Sarkoidose, Lymphomen, chronischer Niereninsuffizienz und Arteriosklerose beobachtet (Dayyani et al., 2004; Okamoto, Mizuno, & Horio, 2003; Rogacev et al., 2014; Schlitt et al., 2004). Bei Patientinnen und Patienten mit Arteriosklerose ist zudem der Anteil der nicht klassischen Monozyten gegenüber Gesunden erhöht. Eine erhöhte Expression steigerte das Risiko zur Arteriosklerose. Bei Patientinnen und Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz sagte die Anzahl der nicht klassischen Monozyten das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse vorher. Zudem zeigte sich eine Assoziation mit weiteren kardiovaskulären Erkrankungen. Intermediäre Monozyten zeigen einen Anstieg bei Schlaganfallpatientinnen und -patienten und korrelierten negativ mit der Mortalität. Nicht klassische Monozyten hingegen sind in ihrer Zellzahl reduziert und mit einem schlechten Ergebnis, hoher Mortalität und klinischer Verschlechterung assoziiert. Die Anzahl der CD16⁺-Monozyten ist bei Patientinnen und Patienten mit KHK erhöht und korreliert positiv mit der Bildung von Thromben im linken Ventrikel bei Patientinnen und Patienten mit Myokardinfarkt. Das Niveau der CD16⁺-Monozyten ist bei Patientinnen und Patienten, die eine Statinbehandlung erhalten signifikant reduziert (Frantz et al., 2013; Imanishi et al., 2010; Kaito et al., 2013; Rogacev et al., 2012; Rogacev et al., 2011; Thomas et al., 2015; Tsujioka et al., 2009; Urra et al., 2009).

Nach einem Myokardinfarkt kommt es zu einer Erhöhung der Leukozyten. Es zeigt sich zunächst ein Anstieg der Anzahl der klassischen Monozyten, dieser ist an Tag drei nach Infarkt am höchsten. Im Verlauf nimmt ihre Zahl wieder ab und an Tag fünf nach Infarkt steigen die nicht klassischen Monozyten an. Dabei zeigt sich an Tag fünf ein signifikanter Unterschied zu Patientinnen und Patienten mit stabiler Angina pectoris (Tsujioka et al., 2009). X. Zhou et al. (2016) konnten zeigen, dass es nach einem STEMI, verglichen mit Gesunden und Patientinnen und Patienten mit KHK, zu einem Anstieg der intermediären Monozyten kommt. Zudem besaßen diese einen prädiktiven Wert für negative kardiovaskuläre Ereignisse. Die Zahl der klassischen Monozyten stieg ebenfalls an, wohingegen die Anzahl der nicht klassischen Monozyten verglichen mit Patientinnen und Patienten mit KHK nicht anstieg. Auch Tapp, Shantsila, Wrigley, Pamukcu, and Lip (2012) zeigen einen Anstieg der klassischen und intermediären Monozyten nach STEMI verglichen mit Patientinnen und Patienten mit KHK

und gesunden Probandinnen und Probanden. Es zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang der intermediären Monozyten mit dem maximalen Troponinniveau und Plasmazytokinen. Eine reduzierte Anzahl der intermediären Monozyten war prädiktiv für eine höhere LVEF. van der Laan, Hirsch, et al. (2012) zeigten einen Zusammenhang zwischen dem Anstieg klassischer Monozyten und beeinträchtigter LVEF, systolischer Funktion und Infarktgröße. Für nicht klassische Monozyten zeigte sich ein umgekehrtes Bild. Die maximale Anzahl der Monozyten korrelierte positiv mit dem Höchstwert für CRP und CK, negativ mit der Ejektionsfraktion und war ein Prädiktor für Pumpversagen und zukünftige kardiale Ereignisse (Maekawa et al., 2002). Die Autoren unterschieden jedoch nicht zwischen den Monozytensubpopulationen und STEMI und NSTEMI. Zudem konnte Tsujioka et al. (2009) für den Höchstwert der klassischen Monozyten, jedoch nicht für die nicht klassischen Monozyten eine signifikante positive Korrelation mit dem maximalen Wert für CRP nachweisen. Zu Indikatoren des Schweregrads des Infarkts, wie Höchstwerte für CK, CK-MB und LVEF, konnten keine Korrelationen gezeigt werden. Das Maximum der klassischen Monozyten, jedoch nicht der nicht klassischen Monozyten, korrelierte signifikant negativ mit dem Ausmaß der myokardialen Rettung. Klassische Monozyten waren außerdem mit Veränderungen der LVEF sechs Monate nach Myokardinfarkt korreliert. Auch in dieser Studie fand keine Unterscheidung zwischen STEMI und NSTEMI statt. Es zeigt sich also, dass die Monozytensubpopulationen eine bedeutende Rolle während und nach Myokardinfarkt spielen und einen Einfluss auf die Heilung haben. Die Gesamtzahl der Monozyten nach Myokardinfarkt ist erhöht und das Verhältnis der Monozytensubpopulationen verändert sich in der Akutphase nach Infarkt dynamisch. Die Monozytenbildung könnte daher die Möglichkeit bieten aktive inflammatorische Phasen zu identifizieren, um anti-inflammatorische oder immunmodulatorische Therapien anzuwenden und zu überwachen.

1.3.2 Möglichkeiten der *in vivo* Monozytenbildung

Da inflammatorische Prozesse eine wichtige Rolle bei einer Vielzahl von Erkrankungen spielen, steigt das Interesse an der Bildung von Immunzellen. Monozyten stellen in diesem Kontext ein attraktives Ziel dar, da sie sowohl bei der Progression als auch der Auflösung einer inflammatorischen Reaktion eine Schlüsselrolle einnehmen und die Prognose beeinflussen (Mosser & Edwards, 2008; Shi & Pamer, 2011; Soehnlein & Lindbom, 2010). Kardiovaskuläre Erkrankungen wie die Arteriosklerose und der akute Myokardinfarkt werden durch Monozyten und Makrophagen orchestriert (Dutta & Nahrendorf, 2015; Swirski & Nahrendorf, 2013). Daher besteht ein klinisches Interesse Monozyten und Makrophagen spezifisch und direkt zu markieren. Um diese Zellen im Verlauf der Inflammation nicht-invasiv darzustellen, werden

Monozyten mit Kontrastmitteln markiert. Ansätze zur nicht-invasiven Beurteilung von Monozyten bei Myokardinfarkt sind der Gebrauch radioaktiver Substanzen, die mittels MRT, PET und SPECT dargestellt werden können, die Nutzung superparamagnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln (*(ultrasmall-) superparamagnetic iron oxide*, (U)SPIO) und Perfluorcarbonen (PFC).

Kircher et al. (2008) nutzten ^{111}In -oxine, eine radioaktive Substanz, um die Rekrutierung von Monozyten zu arteriosklerotischen Läsionen bei Apolipoprotein E defizienten Mäusen nicht invasiv mittels SPECT darzustellen. Aufgrund der langen Halbwertszeit von ca. drei Tagen, konnten Monozyten bis zu sieben Tage dargestellt werden. Des Weiteren konnten sie mittels dieser Bildgebung den Effekt einer Intervention auf die Rekrutierung der Monozyten zum Plaque überprüfen. Die Untersuchung erforderte die Isolation, Markierung und Aufbereitung der Monozyten *ex vivo* und die Applikation über die Schwanzvene der Tiere. Die Lebensfähigkeit und Migration der Zellen wurden durch die Markierung mit ^{111}In -oxine nicht beeinflusst. Positive Signale wurden bereits nach einem Tag detektiert. Jedoch war erst nach fünf Tagen ein Signal im Bereich der arteriosklerotischen Läsion zu identifizieren. Zudem war die Auflösung geringer als bei anderen Methoden wie beispielsweise der MRT. Es zeigte sich ein linearer Zusammenhang zwischen dem SPECT-Signal und der Menge an Monozyten. Adonai et al. (2002) zeigten eine Möglichkeit zur *in vivo* Verfolgung von *ex vivo* ^{64}Cu markierten Zellen mittels PET. Die Verfolgung der Zellen gelang aufgrund der langen Halbwertszeit für bis zu 20 Stunden. Die Markierung der Zellen veränderte die Lebensfähigkeit und die Proliferationsrate der Zellen nicht. Auch in dieser Studie mussten die Zellen isoliert und markiert und über einen längeren Zeitraum inkubiert werden, bevor sie im Tiermodell appliziert werden konnte. Elmaleh et al. (2006) konnten arteriosklerotische Läsionen im PET innerhalb weniger Minuten nach Injektion des Radiopharmazeutikums darstellen. Jedoch war die Elimination der Substanz schneller, so dass ein kürzerer Zeitraum für die Bildgebung zur Verfügung stand. Trotz des guten Kontrasts des PET und SPECT benötigen beide Methoden die Applikation von radioaktiven Substanzen, eine teils aufwändige Aufbereitung und die Exposition gegenüber Strahlung. Die MRT hingegen bietet eine gute räumliche Auflösung mit gutem Kontrast zwischen Geweben ohne den Gebrauch radioaktiver Substanzen oder Strahlung.

Ein weiterer Ansatz zur nicht invasiven Bildgebung von Monozyten ist die MRT mittels SPIO. Diese bestehen aus einem Eisenoxidkern mit unterschiedlicher Ummantelung. Humane Monozyten können mit SPIOs und USPIOs inkubiert und somit für die Bildgebung mit einem MRT markiert werden (Wu et al., 2009; Yilmaz et al., 2013). In Abhängigkeit von der verwendeten Substanz, der Größe der Partikel, der Beschichtung und Konzentration zeigen sich

Unterschiede in der Aufnahme der Partikel und Apoptose der Zellen. Die Aufnahme von SPIOs durch Monozyten ist höher verglichen mit der Aufnahme von USPIOs. Die Phagozytose der Eisenoxide nach intravenöser Applikation klinisch zugelassener Dosen fällt deutlich geringer aus als nach *in vitro* Inkubation. Die Partikel werden rasch durch Zellen des retikuloendothelialen Systems aufgenommen und zeigen nur geringe Halbwertszeiten und kurze Zeiten der Interaktion mit zirkulierenden phagozytierenden Zellen (Metz et al., 2004; Stoll & Bendszus, 2009). SPIO werden nach intravenöser Applikation von Monozyten aufgenommen und infiltrieren das entzündete Gewebe, beispielsweise nach Myokardinfarkt. Dort bewirken die mit Eisen beladenen Zellen eine Signalauslöschung im ^1H -MRT (Alam et al., 2012; Stoll, Basse-Lusebrink, Weise, & Jakob, 2012; Yilmaz et al., 2013). Die Signalauslöschung durch SPIOs ist jedoch nur schwer zu quantifizieren und Eisenoxid-Nanopartikel verringern präzise anatomische Informationen, da der Zusammenhang zwischen Eisenoxidgehalt und Signalauslöschung nicht linear ist. Des Weiteren kann es durch Suszeptibilitätsartefakte an Grenzen unterschiedlicher Gewebe ebenfalls zu einem Signalverlust kommen. Die Eisenakkumulation im Verlauf eines Myokardinfarkts verringert darüber hinaus die Spezifität der Methode (Ahn et al., 2013; Farr, Seehafer, Nelles, & Hoehn, 2011; Grapentin et al., 2015).

Ein alternatives Verfahren ist die Monozytenbildgebung mittels PFC (^{19}F)-Nanopartikeln und anschließender ^{19}F -MRT. PFC sind synthetische Moleküle, bei denen die Wasserstoffatome des Moleküls durch Fluor ersetzt werden. In Kapitel 1.4 soll näher auf die Perfluorcarbone eingegangen werden. PFC werden nach intravenöser Verabreichung von Monozyten und Makrophagen mit hoher Affinität phagozytiert. Die so markierten Zellen erlauben eine zellspezifische Verfolgung *in vivo*, migrieren in Bereiche der Inflammation, wodurch es zu einer lokalen Ablagerung von ^{19}F -Nuklei kommt (Flögel et al., 2008; Temme, Bönner, Schrader, & Flögel, 2012; Weise, Basse-Lusebrink, Wessig, Jakob, & Stoll, 2011). PFC bieten sich als Kontrastmittel zur Monozytenbildgebung an, da die anatomische Information der ^1H -MRT und die Lokalisation der ^{19}F markierten Zellen kombiniert werden kann. Dabei zeigen ^{19}F -Signale aufgrund des fehlenden ^{19}F -Hintergrundsignals eine hohe Spezifität und können zuverlässiger quantifiziert werden verglichen mit gadolinium- oder eisenbasierten Markern. Der Zusammenhang zwischen der ^{19}F -Signalintensität und der Perfluorcarbonkonzentration ist für Perfluorooctylbromide (PFOB) linear (Kaneda, Caruthers, Lanza, & Wickline, 2009; Ruiz-Cabello, Barnett, Bottomley, & Bulte, 2011; Wolters et al., 2013).

In einer Reihe von inflammatorischen Prozessen konnte die Anwendbarkeit des ^{19}F -MRT bisher überprüft werden. Dazu gehören Transplantationsabstoßungen, pulmonale

Inflammation, Schlaganfall und der Myokardinfarkt (siehe Abb. 1) sowie Myokarditiden und Thrombosen. Dabei konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass mittels ^{19}F -MRT inflammatorische Areale von gesunden Gewebe nach Injektion von PFC abgegrenzt werden können. (Balducci, Helfer, Ahrens, O'Hanlon, & Wesa, 2012; Ebner et al., 2010; Flögel et al., 2012; Flögel et al., 2008; Flögel et al., 2011; Hitchens et al., 2011; Jacoby, Borg, et al., 2014; Kadayakkara, Ranganathan, Young, & Ahrens, 2012; Temme et al., 2015; van Heeswijk et al., 2013). Bei Transplantationsabstoßungen konnte die Immunantwort mittels ^{19}F -MRT früher detektiert werden als mit herkömmlichen Methoden. Das Signal nimmt über die Zeit zu und korreliert mit dem Ausmaß der Abstoßungsreaktion. Flögel et al. (2011) nutzten ^{19}F -MRT, um die immunsuppressive Therapie mit Rapamycin nach Transplantationsabstoßung zu überwachen. Das ^{19}F -Signal war unter immunsuppressiver Therapie signifikant geringer als bei Kontrollen. Ebner et al. (2010) zeigten einen positiven Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Entzündung und dem ^{19}F -Signal im Tiermodell mit Pneumonie, während sich im ^1H -MRT erst zu späteren Zeitpunkten und bei stärkeren Entzündungsreaktionen Veränderungen zeigten. Das ^{19}F -Signal war unter antiinflammatorischer Therapie signifikant geringer als bei der Kontrollgruppe.

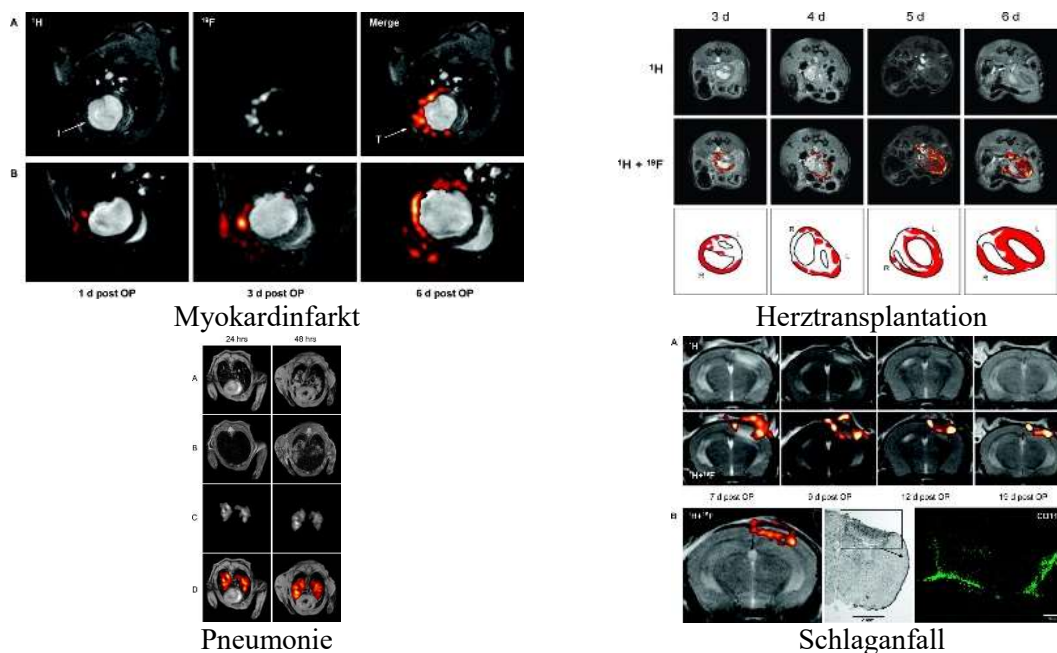


Abb. 1: ^{19}F -MRT Aufnahmen nach Injektion von PFCs bei verschiedenen Erkrankungen. Die PFCs werden von den Monozyten aufgenommen, die in inflammatorische Areale migrieren. Die Kombination mit dem klassischen ^1H -MRT und dem ^{19}F -Signals (rot) zeigt die anatomische Position der infiltrierten Zellen und damit des inflammatorischen Areals. F = Fluor, H = Wasserstoff, d = Tag, hrs = Stunden, OP = Operation, MRT = Magnetresonanztomographie, PFC = Perfluorcarbon (reproduziert mit Erlaubnis von Ebner et al., 2010; Flögel et al., 2008; Flögel et al., 2011).

Bei myokardialer und zerebraler Ischämie zeigt sich eine zeitabhängige Infiltration der intravenös applizierten PFCs in der infarzierten Region und am Ort des chirurgischen Eingriffs. Von anderen Geweben oder vom Blut geht hingegen kein Signal aus. Das ^{19}F -Signal ist direkt

proportional zu der Menge der aufgenommenen Partikel. Die Aufnahmen können dann übereinandergelegt werden, so dass die exakte Lokalisation des ^{19}F -Signals anatomisch zugeordnet werden kann (siehe Abb. 2) (Flögel et al., 2008).

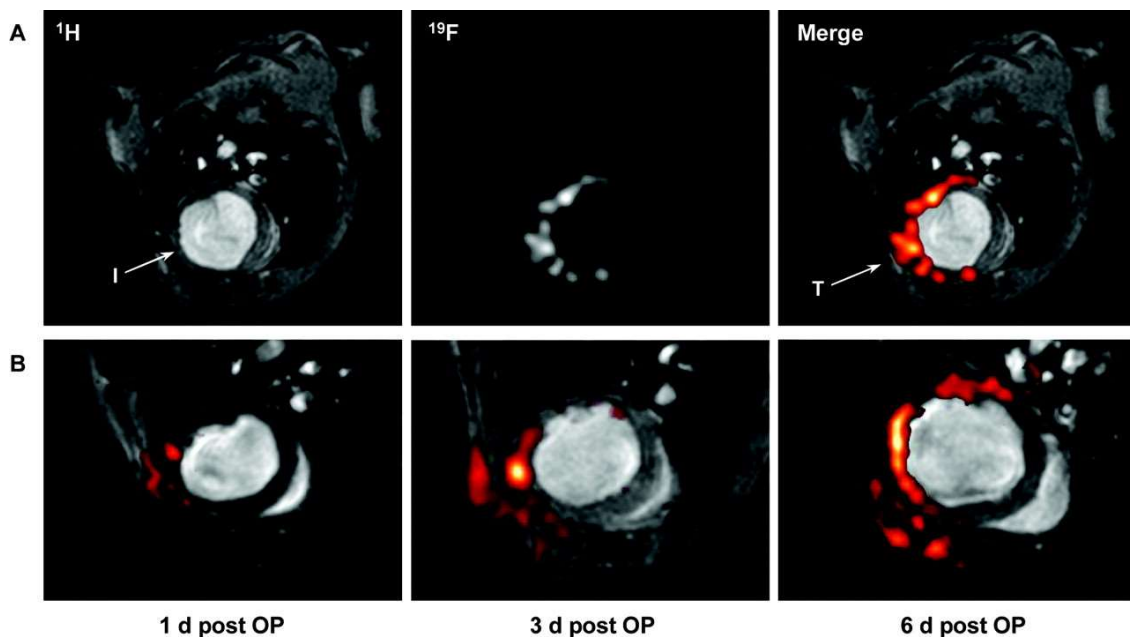


Abb. 2: Infiltration der PFCs nach Myokardinfarkt mit ^{19}F MRT detektiert. A: Anatomisch entsprechende ^1H und ^{19}F Aufnahmen vom Thorax einer Maus vier Tage nach Ligation des Ramus interventricularis anterior. Akkumulation des ^{19}F signal in der infarzierten Region (I) und am Ort des chirurgischen Eingriffes (T). B: Überlagerung der ^1H Aufnahmen mit den entsprechenden ^{19}F Aufnahmen (rot) an Tag 1, 3, und 6 nach dem Eingriff zeigt zeitabhängige Infiltration der PFCs im infarzierten Bereich des Herzens. F = Fluor, H = Wasserstoff, d = Tag, OP = Operation, MRT = Magnetresonanztomographie, PFC = Perfluorcarbon (reproduziert mit Erlaubnis von Flögel et al., 2008).

1.4 Perfluorcarbone und deren Nanoemulsionsformulierung

Die nicht invasive Visualisierung von Makrophagen ist bei inflammatorischen Erkrankungen von Interesse, da diese Zellen Prognose und Therapie beeinflussen. Die zellspezifische Markierung von Monozyten und Makrophagen bei kardiovaskulären Erkrankungen ist dabei von besonderem Interesse. ^{19}F -MRT nach intravenös applizierten Perfluorcarbon-Nanoemulsionen (PFC-NE) hat sich wie bereits beschrieben als nützlich zur Darstellung inflammatorischer Prozesse bei einer Vielzahl von Erkrankungen erwiesen (Ebner et al., 2010; Flögel et al., 2008; Flögel et al., 2011; Jacoby, Borg, et al., 2014; Temme et al., 2015). Die Methode basiert auf den Eigenschaften von Monozyten die PFC-NE zu phagozytieren.

1.4.1 Struktur und Eigenschaften der Perfluorcarbone und deren Nanoemulsion

Perfluorcarbone sind synthetische Moleküle, bei denen die Wasserstoffatome des Moleküls durch Fluor ersetzt werden. Aufgrund der hohen Elektronegativität des Fluoratoms kommt es

zu starken Kohlenstoff-Fluor-Verbindungen. Bisher konnten weder Enzyme nachgewiesen werden, die diese Verbindung auflösen, noch biologische Abbauewege. PFC gelten daher als hydro- und lipophobe, nicht toxische und biochemisch inerte Substanzen (M. P. Krafft, 2001; Stares et al., 2018). Sie weisen aufgrund der kovalenten Bindung eine hohe thermodynamische Stabilität auf (Kaisers, Kelly, & Busch, 2003; O'Hagan, 2008; Riess, 1992, 2001, 2005; Spahn, 1999). PFC werden nicht in zelluläre Membran oder Strukturen integriert. Aufgrund der hydro- und lipophobischen Eigenschaften können PFC nicht mit Wasser gemischt werden.

PFC können in vier strukturelle Klassen eingeteilt werden: Ether, zyklisch, linear und Amine. Für die ^{19}F -MRT werden hauptsächlich Perfluoro-15-crown-5-ether (PFCE), Perfluorooctylbromid (PFOB) und Perfluorodecalin (PFD) genutzt (siehe Abb. 3).

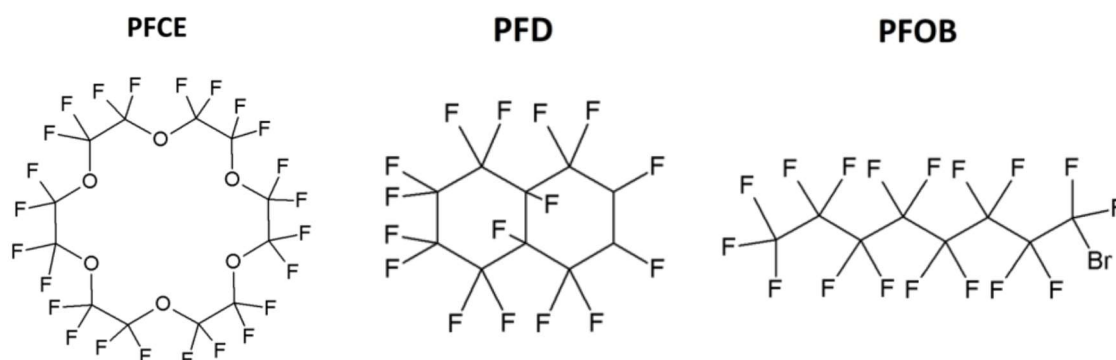


Abb. 3: Repräsentative Perfluorcarbone, die zur Herstellung von Perfluorcarbon-Nanoemulsionen als Kontrastmittel im ^{19}F -MRT eingesetzt werden (Basierend auf Grapentin et al., 2015. CC BY 4.0). PFCE = Perfluoro-15-crown-5-ether, PFD = Perfluorodecalin, PFOB = Perfluorooctylbromide.

PFCE gehören zu den Perfluorethern. Aufgrund der zwanzig chemischen und magnetischen äquivalenten Fluornuklei ist PFCE durch eine MR Resonanz charakterisiert. Bisher wurde es für die Nachverfolgung von Zellen *in vivo* und die Detektion von Arteriosklerose in Mäusen genutzt (Ahrens, Flores, Xu, & Morel, 2005; Balducci et al., 2012; Morawski et al., 2004; Partlow et al., 2007). Jedoch besitzt es lange biologische Halbwertszeiten von mehreren Monaten in den Organen des retikuloendothelialen Systems und ist für die klinische Anwendung nicht geeignet (Riess, 2001). PFD gehört zu den zyklischen PFC und zeigt eine einzige MR-Resonanz. Wie PFOB besitzt es geringe biologische Halbwertszeiten. PFD existiert jedoch als Diastereomer und weist dadurch komplexe MR-Spektren und geringe Sensitivitäten auf (Jacoby, Temme, et al., 2014). PFOB, ein lineares PFC, ist durch das terminale Bromatom geringfügig lipophil. Die Herstellung stabiler Nanoemulsionen und die Passage von Membranen werden dadurch vereinfacht (Jacoby, Temme, et al., 2014; Pierre & Allen, 2017). Jacoby, Temme, et al. (2014) stellen fest, dass PFOB sich für die Translation inflammatorischer Bildgebung beim Menschen am besten eignet, da es hohe ^{19}F -Intensitäten

und eine geringe biologische Halbwertszeit besitzt. Nachteil ist das durch den asymmetrischen Aufbau hervorgerufene komplexe MR-Spektrum, das zu Artefakten führen kann (Stares et al., 2018). Im Hinblick auf eine Translation in die Klinik haben PFCs als Blutersatzstoff bereits klinische Studien durchlaufen und werden im Körper abgeatmet. Die geringeren van der Waals Kräfte führen zu geringem molekularem Zusammenhalt. Daher besitzen PFC eine hohe Kapazität, um Sauerstoff und andere Gase aufzulösen und wurden ursprünglich für die Flüssigkeitsbeatmung bei Patientinnen und Patienten mit Atemnotsyndrom als Sauerstoffträger eingesetzt (Kaisers et al., 2003; M. P. Krafft, 2001; E. Lambert & Janjic, 2021; Riess, 2005; Spahn et al., 2002). Noveck et al. (2000) und Leese et al. (2000) konnten in einer randomisierten, kontrollierten Doppelblindstudie zeigen, dass PFOB die Blutgerinnung nicht beeinflusst und keinen verzögerten Einfluss auf zirkulierende Immunglobuline, Komplementaktivierung, Plasmalevel inflammatorischer Zytokine, TNF- α , IL-1 α und IL-1 β , das proliferative Potenzial der Lymphozyten und Hautreaktionen hat.

Aufgrund der hydro- und lipophobischen Eigenschaften müssen PFCs mittels eines Emulgators und unter Energiezufuhr in einem physiologischen Puffer verteilt werden. Als Emulgatoren eignen sich Lipide oder Poloxamere, um durch Ultraschall oder Hochdruckhomogenisierung PFC-NE zu generieren. Lipide zeigen verglichen mit Poloxameren keine unerwünschten Nebenwirkungen wie Komplementaktivierung (Hammerschmidt & Vercellotti, 1988; Ingram, Forman, & Murray, 1993). Für die Herstellung der PFOB-NE werden die PFOB in mehreren Zyklen unter hohem Druck (1000 bar) in einem Homogenisator, beispielsweise Microfluidizer M-110P, emulgiert. Durch Hinzugabe eines semifluorinierten Alkans, Fluorocarbon/Hydrocarbon Diblocks (C₆F₁₃C₁₀H₂₁, F₆H₁₀), kann die Emulsion stabilisiert werden (Flögel et al., 2008; Jacoby, Temme, et al., 2014; Nienhaus et al., 2019). Die Größe der Nanoemulsion hängt dabei von der verwendeten Substanz, dem Emulgator und der Herstellungstechnik ab (Fu, Ohta, Kamihira, Sakai, & Ito, 2019; Marie Pierre Krafft & Riess, 2007; Stares et al., 2018). Bei der Herstellung der PFC-NE können Liposome entstehen, die jedoch keine PFCs enthalten und die Stabilität der Nanoemulsion beeinflussen. Sie konkurrieren mit PFC-NE um die zelluläre Aufnahme. Dies führt zu einem verringerten PFC-Gehalt der Zielzellen und damit zu einer geringeren Sensitivität für die Verfolgung der Zellen *in vivo*. Aufgrund der höheren Dichte können PFC-NE durch Zentrifugation von Liposomen getrennt werden (Grapentin et al., 2015).

1.4.2 Phagozytose

Ex vivo ¹⁹F-MRT Blutuntersuchungen von Mäusen zeigen, dass Monozyten und neutrophile Granulozyten nach intravenöser Applikation die PFCs *in vivo* phagozytieren, wobei

der PFC-Gehalt der Monozyten größer ist. B- und T-Zellen hingegen zeigen kein Fluorsignal (Ebner et al., 2010; Temme et al., 2014). Flögel et al. (2008) zeigten, dass Monozyten und Makrophagen *in vivo* den größten Anteil Rhodamine markierter PFCs aufnehmen, jedoch waren auch B- und T-Zellen zu einem geringen Anteil rhodaminpositiv. Jacoby, Borg, et al. (2014) untersuchten Zellfraktionen mittels ^{19}F -MRT nach i.v. Gabe von PFC-NE bei viraler Myokarditis. Das Fluorsignal ging lediglich von Makrophagen aus, jedoch nicht von B- oder T-Zellen. Wichtige Determinanten für die Phagozytose und Biodistribution der PFC-NE sind die Größe, die Konzentration, die Geometrie, die Ladung und Oberflächenbeschaffenheit (Amoozgar & Yeo, 2012; Moghimi, Hunter, & Andresen, 2012; Moghimi, Hunter, & Murray, 2001; Moghimi, Parhamifar, et al., 2012).

Die Herstellung von PFCs mit einer schmalen Größenstreuung spielt eine wichtige Rolle, da größere Partikel, die mit größerer Wahrscheinlichkeit phagozytiert werden oder einen höheren PFC Gehalt besitzen, die Spezifität und Quantität der Markierung mit PFC beeinflussen. Größere Partikel werden im Allgemeinen effizienter von Phagozyten aufgenommen als kleinere Partikel. Kleinere Partikel werden nur in geringem Ausmaß aufgenommen. Für Partikel größer als 200nm zeigt sich ein steiler Anstieg der Aufnahme, der für Partikel von 300 nm und mehr ein Plateau erreicht (Abb. 4A). Des Weiteren wird die Phagozytose durch die Konzentration der Partikel beeinflusst. Nanopartikel von 180 nm erreichen bereits ihre maximale Aufnahme bei 60 % positiver Zellen bei einer Konzentration von 170 nmol. Mit steigender Partikelgröße steigt der prozentuale Anteil positiver Zellen trotz geringerer Konzentrationen (Abb. 4B) (dos Santos, Varela, Lynch, Salvati, & Dawson, 2011; Grapentin et al., 2015; Waiczies et al., 2011).

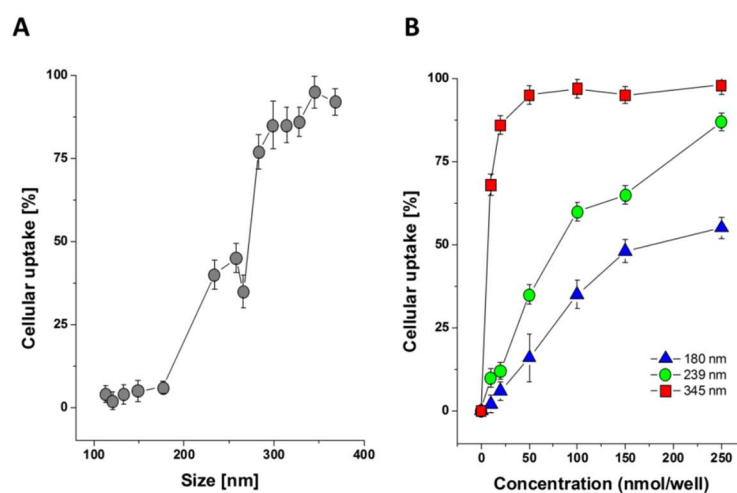


Abb. 4: Aufnahme der PFC-NE in Abhängigkeit von der Größe und Konzentration. A: Aufnahme der PFC-NE verschiedener Größen, B: Konzentrationsabhängige Aufnahme der PFC-NE. PFC-NE = Perfluorcarbon-Nanoemulsion, nm = Nanometer (Basierend auf Grapentin et al., 2015. CC BY 4.0).

Nicht nur die Größe und Konzentration der Partikel hat einen Einfluss auf die Phagozytose und Biodistribution, auch die Form spielt eine wichtige Rolle. Champion and Mitragotri (2006) untersuchten den Einfluss verschiedenster geometrischer Formen auf die Phagozytose. Sie fanden heraus, dass die Form der Partikel sowohl bei opsonisierten als auch bei nicht opsonisierten Partikeln die dominantere Rolle bei der Phagozytose spielt verglichen mit der Größe der Partikel. Die Form der Partikel bestimmt, ob die Phagozytose stattfindet oder nicht. Die Komplexität der Aktinstruktur, die nötig ist, um die Phagozytose zu initiieren, wird von der Form der Partikel bestimmt. Ist diese nicht vorhanden, kommt es nicht zur Internalisierung der Partikel. Die Größe der Partikel beeinflusst die Vollendung der Phagozytose in Fällen, in denen die Größe bzw. das Volumen der Partikel die Größe bzw. das Volumen der Zellen übersteigt (Champion & Mitragotri, 2006; Decuzzi et al., 2010; Decuzzi, Pasqualini, Arap, & Ferrari, 2009).

Um Zellen zu visualisieren, die PFC-NE nur zu einem geringen Anteil (B-Zellen) oder gar nicht aufnehmen (T-Zellen) ist spezifisches Targeting nötig. Die Oberfläche der PFC-NE muss mit spezifischen Antigenen markiert werden, damit diese ihr Ziel erreichen (T. M. Allen, Brandeis, Hansen, Kao, & Zalipsky, 1995; Moghimi et al., 2001; Zylberberg & Matosevic, 2016). Die PFC-NE wird nach intravenöser Gabe mit Serumproteinen umhüllt. Dadurch nehmen Monozyten vermehrt PFC auf. Jedoch kommt es auch zu einer gesteigerten Beseitigung aus der Zirkulation durch das Retikuloendotheliale System, wodurch eine effiziente Beladung der Monozyten und die Sensitivität des ^{19}F -MRT verhindert wird. Die Kopplung mit Polyethylenglycol (PEG) verhindert die Bindung von Serumproteinen an die Nanopartikel und reduziert die Opsonisierung. Dadurch werden die Nanoemulsionen zu einem geringeren Anteil von den Zellen aufgenommen und später von der Zirkulation entfernt (Owens & Peppas, 2006). PEG gekoppelte Emulsionen werden später in der Leber und Milz aufgenommen als nicht PEG gekoppelte Nanoemulsion und das ^{19}F -Signal ist deutlich reduziert. Sie akkumulieren nicht in inflammatorischen Arealen (Amoozgar & Yeo, 2012; Giraudeau et al., 2012; Grapentin et al., 2015; Moghimi, Hunter, et al., 2012; Moghimi et al., 2001; Temme et al., 2015).

Für ortsspezifisches Targeting werden Liganden wie Antikörper an die Partikeloberfläche gekoppelt (Bae et al., 2013; Giraudeau et al., 2013; Kaneda et al., 2009). Nicht modifizierte PEG Nanoemulsion wird nur zu einem geringen Anteil von Makrophagen phagozytiert, wohingegen mit Antikörper gekoppelte Nanoemulsion von ca. 80 % der Zellen phagozytiert wird. Auch Thrombozyten können so markiert und zur nicht invasiven Detektion von Plaques genutzt werden. ^{19}F -MRT konnte bisher genutzt werden, um Stammzellen zu detektieren, T-Zell-Infiltration darzustellen und die Migration von dendritischen Zellen nach *ex vivo* Markierung. Dabei zeigten sich keine Veränderungen der Funktion, Zellproliferation,

Lebensfähigkeit und der Reifung der Zellen (Ahrens et al., 2005; Grapentin et al., 2015; Partlow et al., 2007; Srinivas, Morel, Ernst, Laidlaw, & Ahrens, 2007; Srinivas et al., 2009).

1.4.3 Faktoren der Stabilität

Die Stabilität der PFC-NE ist bei der Herstellung ein kritischer Punkt. Bei hohen Temperaturen kann es zu Koaleszenz kommen, der irreversiblen Fusion zweier oder mehrerer Partikel zu einem größeren. Bei längeren Lagerungsintervallen führt die molekulare Diffusion, auch Ostwald Ripening genannt, zum irreversiblen Wachstum größerer Partikel auf Kosten kleinerer Partikel. Dies kann durch Hinzufügen eines homologen PFCs mit geringerer Wasserlöslichkeit verhindert werden (Benita, 1998). Inkooperierte semifluorinierte Alkane als Ko-Surfakante generieren eine stabilisierende Brücke zwischen Lipiden und PFC, wodurch stabilere Nanoemulsionen erzielt werden. Die Struktur des PFCs, des Emulgators sowie das Verhältnis beider Komponenten und die Temperatur beeinflussen die Stabilität der Emulsion (Bertilla, Thomas, Marie, & Krafft, 2004; Freire, Dias, Coelho, Coutinho, & Marrucho, 2005; Grapentin et al., 2015; Kabalnov & Shchukin, 1992; M. P. Krafft et al., 1992; Pierre & Allen, 2017; Varescon, Arlen, Le Blanc, & G. Riess, 2017). PFC-NE erweisen sich auch ohne Additive als stabil insofern sie ordnungsgemäß hergestellt und bei 4 °C gelagert werden (Kuznetsova & Yurchenko, 2006). PFOB zeigen lediglich bei geringen Mengen an Phospholipiden Instabilität (siehe Abb. 5).

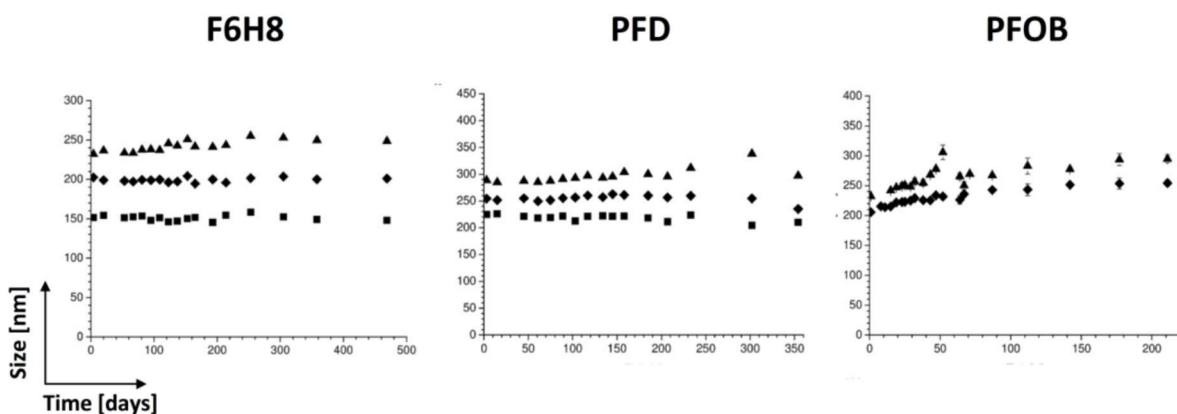


Abb. 5: Stabilität verschiedener Nanoemulsionen über die Zeit in Abhängigkeit von der Konzentration. ▲ = 15.8 mM S75, ■ = 31.6 mM S75, ◆ = 47.4 mM S75. F6H8 = Perfluorhexyloktan, PFD = Perfluordecalin, PFOB = Perfluorocetyl bromid, nm = Nanometer, mM = millimolar (Basierend auf Grapentin et al., 2015. CC BY 4.0)

Um kleinere Emulsionen mit geringer Polydispersität herzustellen werden Prozesse wie die Ultraschallbehandlung, Homogenisierung oder Mikrofluidisierung genutzt (Maa & Hsu, 1999). Die Ultraschallbehandlung führt zu einer breiten Größenverteilungen, einem höheren Gehalt an Liposomen und kann nur schwer reproduziert werden. Mikrofluidisierer zeigen bessere Effizienz und führen zu schmalen Größenverteilungen und geringeren Liposominhalt. Mit

Zunahme der Zeit für die Ultraschallbehandlung, Druck und Anzahl der Durchläufe im Mikrofluidisierer, nimmt die Größe der Emulsionen ab (Maa & Hsu, 1999; Mahdi Jafari, He, & Bhandari, 2006; Riess, 2001). Emulsionen, die mit Phospholipiden produziert werden, zeigen eine längere intravaskuläre Halbwertszeit als solche mit synthetischen Emulgatoren (Putyatina, Aprosina, & Afonin, 1994). Daher eignen sie sich besonders für die intravenöse Anwendung und die Markierung von Makrophagen für die Bildgebung von Inflammation im MRT, bei dem längere Zirkulationszeiten wünschenswert sind. Ein Nachteil synthetischer Emulgatoren ist die potenzielle Aktivierung des Komplementsystems. Des Weiteren zeigen Lipide eine bessere Stabilität (M. P. Krafft et al., 1992; Varescon et al., 2017; Vorob'ev, 2009). Der lipophile Charakter von PFOB führt zu einer besseren Balance zwischen dem Phospholipid und PFOB verglichen mit anderen PFCs. Die Menge des Phospholipids beeinflusst die Größe der Partikel in der Emulsion. Mit zunehmendem PFC/Phospholipid Verhältnis nimmt die Partikelgröße zu. Überschüssiges Phospholipid kann PFC freie Vesikel formen, die die Stabilität negativ beeinflussen und anfälliger gegenüber Hydrolyse und Oxidation sind. Liposome, die kein PFC enthalten konkurrieren mit der PFC-NE um die zelluläre Aufnahme. Dies führt zu einem reduzierten PFC-Gehalt der Zellen und somit zu einer reduzierten Sensitivität für die *in vivo* Zellverfolgung. Mit wiederholter Zentrifugation kann der Liposomgehalt reduziert werden. Große Zeta Potenziale führen zu elektrostatischen Repulsionen zwischen den Partikeln und einer relativ stabilen Emulsion (Grapentin et al., 2015; M. P. Krafft, Rolland, & Riess, 1991; Riess et al., 1992; Stares et al., 2018).

1.5 Zymosan

Zymosan ist ein Polysaccharid, das aus der Zellwand von *Saccharomyces cerevisiae* hergestellt wird (Pillemer & Ecker, 1941). Es besteht hauptsächlich aus Glukan und Mannan mit β -1,3-glykosidischen Bindungen. Der durchschnittliche Durchmesser beträgt 3 μ m (Di Carlo & Fiore, 1958). Zymosan wurde in Studien zur Stimulation der Zytokinproduktion, über Mechanismen der Phagozytose und Aktivierung der Komplementablagerung verwendet (L. A. Allen & Aderem, 1996; L. H. Allen & Aderem, 1995; Dillon et al., 2006; Shibata, Metzger, & Myrvik, 1997; Stein & Gordon, 1991; Underhill, Chen, Allen, & Aderem, 1998; Zhu, Bao, & Li, 1995). Die Injektion von Zymosan führt im Tiermodell zu einer sterilen inflammatorischen Reaktion. Leukozyten, darunter Monozyten und Makrophagen werden aktiviert und angeregt IL-6, IL-8, TNF- α und IL-1 β zu sezernieren (Bondeson, Browne, Brennan, Foxwell, & Feldmann, 1999; Dillon et al., 2006; Estrada et al., 1997; Rankin, Sylvester, Smith, Yoshimura, & Leonard, 1990; Sanguedolce, Capo, Bongrand, & Mege, 1992; Young, Ye, Frazer, Shi, &

Castranova, 2001). *In vitro* Experimente konnten zeigen, dass Zymosan durch die Bildung von Stickstoffmonoxid und freien Sauerstoffradikalen vaskuläre Dysfunktionen auslöst (Cuzzocrea et al., 1997).

In vivo kommt es zur Opsonierung von Zymosan durch IgG und Komplementfaktoren, wodurch die Bindung und Phagozytose der Zymosanpartikel erleichtert wird. Monozyten und Makrophagen besitzen eine Reihe an Rezeptoren wie Komplementrezeptoren, Mannoserezeptoren und β -Glykanrezeptoren, die bei der Erkennung und Internalisierung von Zymosanpartikeln eine Rolle spielen (D. M. Underhill & A. Ozinsky, 2002). Zymosan aktiviert Komplemente über den Komplementweg und induziert die Sekretion hydrolytischer Enzyme von Makrophagen (Schorlemmer, Edwards, Davies, & Allison, 1977). In der Folge binden C3b/iC3b an die Zymosanpartikel, wodurch diese von Phagozyten über Komplementrezeptoren wie CR1 (CD35) und CR3 (CD11/18) aufgenommen werden. Die Aufnahme von Zymosan durch Monozyten kann durch Inkubation mit anti-CR3-Antikörpern unterdrückt werden (Ross, Cain, & Lachmann, 1985). CR3 enthält eine Lektinbindungsstelle für β -1,3-Glykan. Dectin-1, ebenfalls ein β -1,3-Glykan-Rezeptor, befindet sich auf Monozyten und Makrophagen und ist ebenfalls wie der Mannoserezeptor an der Phagozytose von Zymosan beteiligt (Brown & Gordon, 2001; Ezekowitz, Sastry, Bailly, & Warner, 1990; Ezekowitz, Sim, Hill, & Gordon, 1984; Ezekowitz, Sim, MacPherson, & Gordon, 1985; Lindena & Burkhardt, 1990; Lindena, Burkhardt, & Dwenger, 1987; Roos, Bot, Vanschaik, Deboer, & Daha, 1981). Zymosan stimuliert auch neutrophile Granulozyten über den CR3, jedoch binden sie Zymosan zu einem geringen Anteil (Lieberman, Sachanandani, & Pinney, 1996). Zymosan aktiviert Makrophagen (Underhill, 2003), die nach der Phagozytose lysosomale Enzyme, reaktive Sauerstoffmetabolite, Arachidonsäure und TNF- α sezernieren (Daum & Rohrbach, 1992; Kelly & Carchman, 1987; Sanguedolce et al., 1992).

Nach der Phagozytose von Zymosan kommt es zur Rekrutierung von TLR2 und TLR6 zum Phagosom der Makrophagen. TLR sind an der Erkennung und der inflammatorischen Reaktion auf eine Reihe von mikrobischen Produkten beteiligt und werden für eine effektive Verteidigung benötigt (David M. Underhill & Adrian Ozinsky, 2002). TLR erkennen *pathogen-associated-molecular-patterns* (PAMPs), die auch an Zymosan enthalten sind (Janeway Jr & Medzhitov, 2002). Zymosan wird durch TLR2 erkannt (Akira, Takeda, & Kaisho, 2001; David M. Underhill & Adrian Ozinsky, 2002). Durch Bindung an den TLR-2 wird eine Signalkaskade ausgelöst, durch die NF- κ B aktiviert wird. In Folge werden inflammatorische Mediatoren induziert (Sato et al., 2003), darunter das Komplementsystem, Prostaglandine, Leukotriene und TNF- α (Humes et al., 1982; Pillemer & Ecker, 1941; Sanguedolce et al., 1992). Es kommt zur Einwanderung von neutrophilen Granulozyten durch Aktivierung von Zytokinen und

Chemokinen. Im Gegensatz zur Phagozytose basieren die inflammatorischen Antworten auf Zymosan auf einem Rezeptor, einem Heterodimer der TLR2 und TLR6. Die Aktivierung des TLR2/TLR6 Heterodimers wird für die inflammatorischen Reaktionen wie die Produktion von TNF- α und Aktivierung von NF- κ B benötigt. TLR Aktivierung wird für die Bindung und Internalisierung nicht benötigt (Ozinsky, Smith, Hume, & Underhill, 2000; Ozinsky, Underhill, et al., 2000; Underhill et al., 1999).

1.6 BioFlux

Viele physiologische Prozesse finden unter Flussbedingungen statt, darunter Migration, Adhäsion und Phagozytose. Physiologischer Fluss hat einen starken Einfluss auf diese biologischen Prozesse, dennoch werden viele Experimente *in vitro* ohne Flussbedingungen untersucht (Allport, Muller, & Luscinskas, 2000; Djaldetti & Bessler, 2015; Finger et al., 1996; Jones, Smith, & McIntire, 1996; Lawrence, Kansas, Kunkel, & Ley, 1997; Rinkenauer et al., 2015; Ruggeri, 2009; Samar Shurbaji, Gulsen G. Anlar, Essara A. Hussein, Ahmed Elzatahry, & Yalcin, 2020; Slattery & Dong, 2003; L. Yang et al., 2005; Yazdimamaghani, Barber, Hadipour Moghaddam, & Ghandehari, 2018). So konnte gezeigt werden, dass Nanopartikel verschiedenster Größen und geometrischer Formen unter Flussbedingungen ein anderes Flussverhalten zeigen, wodurch die Interaktion mit den Zellen, die Wahrscheinlichkeit der Adhäsion und die Aufnahme der Partikel beeinflusst wird (Blackwell, Dagia, Dickerson, Berg, & Goetz, 2001; Journey et al., 2017; Moghimi, Hunter, et al., 2012; Samar Shurbaji et al., 2020; Thurn et al., 2007). Des Weiteren kommt es unter statischen Bedingungen zur Sedimentation und Aggregation des Materials, wodurch die Phagozytose beeinträchtigt wird (Mahto, Yoon, & Rhee, 2010; Yazdimamaghani et al., 2018). Daher ist eine möglichst genaue Simulation der *in vivo* Bedingungen zur Untersuchung von Phagozytosevorgängen relevant. Hierzu gehören Fluss- und Temperaturbedingungen, Vollblutproben und Beschichtungen (Vu et al., 2020).

Das BioFlux™ 200 ermöglicht mehrere Zellassays parallel unter kontrollierten Flussbedingungen durchzuführen und *in vivo* Bedingungen zu simulieren (Fluxion Biosciences, 2008a). In der vorliegenden Arbeit wurde das BioFlux genutzt, um die Phagozytose von PFOB-NE durch humane Monozyten gesunder Probandinnen und Probanden zu untersuchen.

Die Mikrotiterplatten für das BioFlux bestehen entweder aus 24 oder aus 48 Wells. Jedes Untersystem einer BioFlux-Platte besteht aus einem *inlet* und einem *outlet well*, sowie aus einem 350 μ m x 70 μ m Kanal, der beide Wells verbindet und durch den die Probe fließt (siehe Abb. 6B und D) (Benoit, Conant, Ionescu-Zanetti, Schwartz, & Matin, 2010). Dazu wird die Probe in das *inlet well* pipettiert. Das Arbeitsvolumen beträgt 50 μ l bis maximal 1 ml. Die Platte

wird an ein *Interface* angebracht, das mit einer pneumatischen Pumpe verbunden ist, die die Einstellung verschiedener Scherkräfte ermöglicht (0,1-200 dyn/cm² für 48-*high shear* Platten) (siehe Abb. 6C). Mit einem Mikroskop kann überprüft werden, ob Luftblasen im Kanal vorhanden sind, die den kontinuierlichen Fluss behindern würden (siehe Abb. 6A). Zudem kann mit einer Temperaturplatte, die für die BioFlux-Platte angepasst ist, die Temperatur der BioFlux-Platte konstant gehalten werden (Fluxion Biosciences, 2008a).

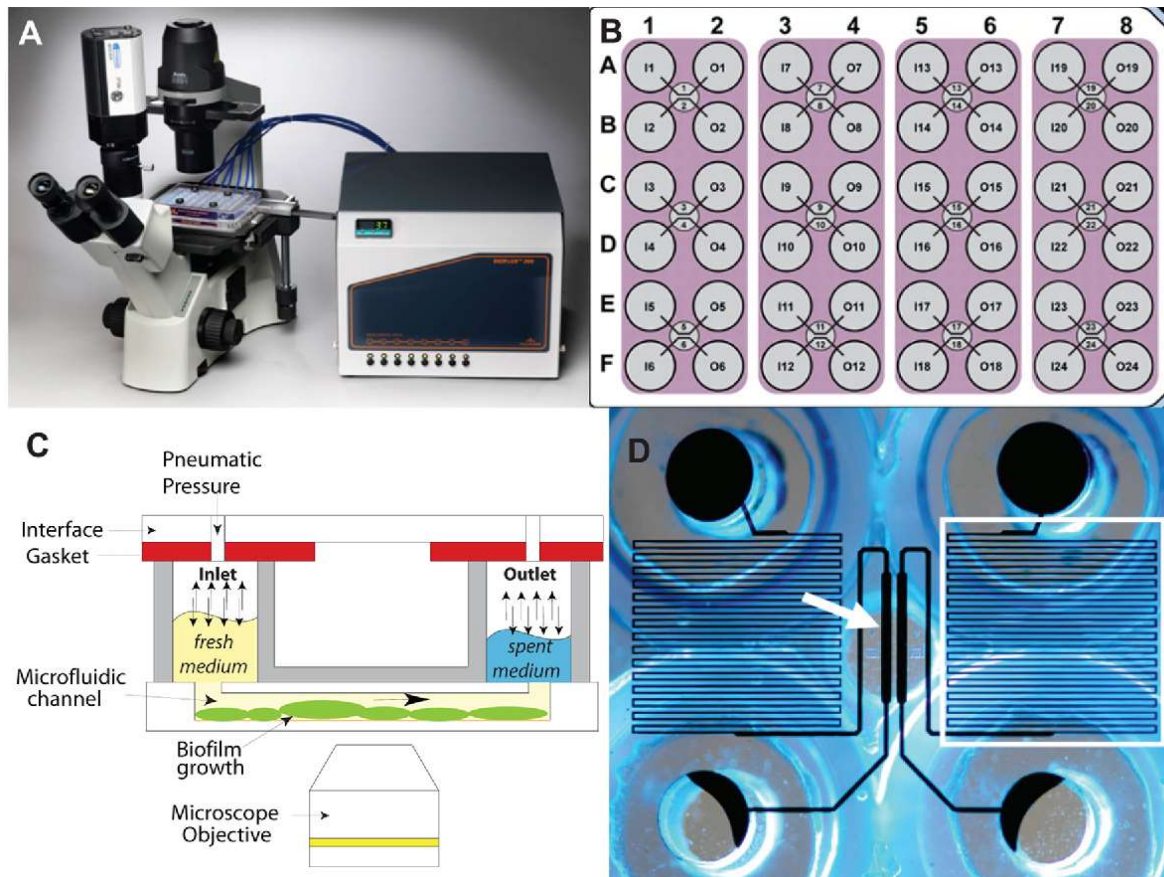


Abb. 6: Das BioFlux-System. (A) Bild des gesamten BioFlux-Systems. Die Vorrichtung enthält eine pneumatische Pumpe, die über ein Interface mit einer 48-Well-Platte verbunden ist, deren Kanäle sich unter einem Mikroskop begutachten lassen. (B) Schematische Zeichnung einer 48-Well-Platte des BioFlux-Systems. 24 voneinander unabhängige Kanäle 350 µm x 70 µm verbinden jeweils ein *inlet* und ein *outlet well*. (C) Schematische Zeichnung eines BioFlux-Untersystems mit einem *inlet* und *outlet well*, die über einen Kanal verbunden sind. Über das *inlet well* wird mittels der pneumatischen Pumpe Druck appliziert, der das Medium durch den Kanal in das *outlet well* presst. Der Fluss kann mit einem Mikroskop überprüft werden. (D) Zwei *inlet* und zwei *outlet wells*, die jeweils über unabhängige Kanäle (schwarze Linien) verbunden sind. Jeder Kanal besteht aus einer serpentinigen Region (weiße Box) und einer Region für die mikroskopische Aufsicht (weißer Pfeil). µm = Mikrometer. (Reproduziert mit Erlaubnis von Benoit et al., 2010).

1.7 Zielsetzung

Monozyten spielen bei einer Reihe von inflammatorischen Prozessen wie Infektionserkrankungen und Wundheilung nach Myokardinfarkt eine wichtige Rolle. Daher werden für eine potenzielle klinische Translation des ¹⁹F-MRT Informationen über die

Phagozytose der PFOB-NE und die Funktion der Zellen nach deren Aufnahme benötigt. Verschiedene Erkrankungen könnten einen Einfluss auf die Phagozytoseaktivität der Monozyten haben und zu Veränderungen der Signalintensität im ^{19}F -MRT führen. PFC-NE wurden bisher bei verschiedensten Erkrankungen im Mausmodell zur Diagnostik im ^{19}F -MRT eingesetzt und hauptsächlich von Monozyten phagozytiert. Die Phagozytose dieser Nanoemulsionen durch humane Monozyten und ihr Einfluss auf die weitere Phagozytose wurden bisher nicht untersucht. Es ist noch nicht geklärt, ob sich die Aufnahmekinetik durch mögliche infarkt-assoziierte, inflammatorische Signale von Infarktpatientinnen und -patienten im Vergleich zu anderen Personengruppen unterscheidet. Im Hinblick auf eine Translation des ^{19}F -MRT vom Versuchstier zum Menschen soll die Phagozytose von PFC-NE an Vollblut von Patientinnen und Patienten nach Myokardinfarkt untersucht werden. Ziel dieser Arbeit ist es daher die Aufnahme der PFOB-NE in peripheren humanen Monozyten zu untersuchen sowie den Einfluss der Aufnahme auf die weitere Phagozytose. Des Weiteren soll untersucht werden, ob inflammatorische Erkrankungen wie der Myokardinfarkt und die KHK einen Einfluss auf die Phagozytose der PFOB-NE durch humane Monozyten haben. Die folgenden Hypothesen sollten überprüft werden:

1. PFOB-NE wird unter Flussbedingungen durch humane Monozyten in definierter Kinetik aufgenommen.
2. Die Phagozytose von PFOB-NE verändert die weitere Phagozytosefähigkeit der Zellen nicht.
3. Humane Monozyten nach STEMI zeigen eine verstärkte und beschleunigte Phagozytose verglichen mit Monozyten von KHK-Patientinnen und -Patienten.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Tabelle 3 zeigt die verwendeten Laborgeräte inklusive Gerätetyp, Herstelle und Ort, Tabelle 4 die verwendeten Verbrauchsmaterialien mit dazugehörigen Herstellern und Tabelle 5 die verwendeten fluoreszenzmarkierten Substanzen, die Fluorochrome, sowie Klon und Ursprung, wenn vorhanden und den jeweiligen Hersteller.

2.1.1 Geräte

Gerät	Gerätetyp und Hersteller (Ort)
BioFlux System	BioFlux™ 200, I&L Biosystems GmbH (Königswinter, Deutschland)
Durchflusszytometer	FACSVerse™ und FACSCanto™ II, BD BioSciences (San José, USA)
Inkubatoren	Incubator Hood TH15, Edmund Bühler GmbH, (Hechingen, Deutschland) Brutschrank IN55, Memmert GmbH+Co. KG (Schwabach, Deutschland)
Microtrac Zetatrac™	Particle Metrix (Meerbusch, Deutschland)
Hochdruckhomogenisator	M-110P Microfluidizer® processor (Microfluidics™; Gernsbach Germany)
Mikroskop	Nikon Eclipse TE2000-U (Düsseldorf, Deutschland)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Reagenzglasschüttler	Heidolph reax top (Schwabach, Deutschland) IKA® MS1 minishaker (Breisgau, Deutschland) VWR International (Darmstadt, Deutschland)
Rollenmischer	Taumel-Rollenmischer RM5, Paul Marienfeld GmbH & Co. KG (Lauda-Königshofen Deutschland)
Rüttelplatten	VWR® Rocking platform shaker (Radnor, Pennsylvania, Vereinigte Staaten) Heidolph Polymax 1040 (Schwabach, Deutschland)
Ultraschallbad	Bandelin Sonorex RK 52, BANDELIN electronic GmbH & Co. KG (Berlin, Deutschland)
Zentrifugen	Rotina 35R, Rotina 38 R und Rotina 380 R, Andreas Hettich GmbH & Co.KG (Tuttlingen, Deutschland) Allegra® X-30R, Beckman Coulter (Brea, USA) Rotanta 460R, Hettich® (Kirchlengern, Deutschland)

Tabelle 3: Verwendete Laborgeräte.

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller (Ort)
48-Well Platte, <i>high-shear</i>	Fluxion Biosciences (San Francisco, USA), I&L Biosystems GmbH (Königswinter, Deutschland)
ACK Lysepuffer 0.15 M NH ₄ Cl 1 mM KHCO ₃ 0.1 mM EDTA pH 7.4	Zentralapotheke der Heinrich-Heine-Universität (Düsseldorf, Deutschland)
DAPI	Sigma Aldrich® (St. Louis, Missouri USA)
Diblock (1-Perfluoro-n-hexyl-decan)	ABCR (Karlsruhe, Deutschland)
Eilecithin (E 80S)	Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Deutschland)
FITC	Avanti® Polar Lipids, Inc.(Alabaster, Vereinigte Staaten)
Cellstar® Polypropylen Röhrchen (15 und 50 ml),	Greiner Bio-One GmbH (Kremsmünster, Österreich)
5 ml Polystyrol Rundbodenröhrchen	Greiner Bio-One GmbH (Kremsmünster, Österreich)
MACS-Puffer 0.5 % BSA in Waschpuffer 5 mM EDTA in PBS, pH 7.4	Institut für molekulare Kardiologie der Heinrich-Heine-Universität (Düsseldorf, Deutschland)
Na ₂ HPO ₄	Sigma Aldrich® (St. Louis, Missouri USA)
NaCl	Sigma Aldrich® (St. Louis, Missouri USA)
NaH ₂ PO ₄	Sigma Aldrich® (St. Louis, Missouri USA)
PBS	Sigma Aldrich® (St. Louis, Missouri USA)
PFOB	ABCR (Karlsruhe, Deutschland)
Pipettenspitzen	TipOne®, StarLab International GmbH (Hamburg, Deutschland)
Blutentnahmenadel	BD Vacutainer® Safety-Lok™ Sicherheitsblutentnahmeset (Heidelberg, Deutschland)
Vakuum (Heparin) Röhrchen	Becton Dickinson Vacutainer Systems (Heidelberg, Deutschland)

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterialien. ACK = Ammonium-Chlorid-Kalium, M = Molar, NH₄Cl = Ammoniumchlorid, mM = Millimolar, KHCO₃ = Kaliumhydrogencarbonat, EDTA = Ethylendiamintetraessigsäure, DAPI = 4',6-Diamidin-2-phenylindol, FITC = Fluoresceinisothiocyanat, ml = Milliliter, MACS = *Magnetic-Activated Cell Separation*, BSA = Bovines Serumalbumin, PBS = *phosphate buffered saline*, Na₂HPO₄ = Dinatriumhydrogenphosphat, NaCl = Natriumchlorid, NaH₂PO₄ = Natriumdihydrogenphosphat, PFOB = Perfluorocetyl bromid.

2.1.3 Fluoreszenzmarkierte Substanzen

Substanz	Fluorochrom	Klon	Ursprung	Hersteller (Ort)
CD14	PE-Cy7	M5E2	Maus	BD Pharmingen™ (Heidelberg, Deutschland)
CD15	APC	HI98	Maus	BD Pharmingen™ (Heidelberg, Deutschland)
CD16	APC-Cy7	3G8	Maus	BD Pharmingen™ (Heidelberg, Deutschland)
CD19	PerCP-Cy5.5	HIB19	Maus	BD Pharmingen™ (Heidelberg, Deutschland)
PFOB-NE	FITC	-	-	Institut für molekulare Kardiologie der Heinrich-Heine-Universität (Düsseldorf, Deutschland)
Zymosan A	FITC	-	Saccharomyces cerevisiae	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)

Tabelle 5: Verwendete fluoreszenzmarkierte Substanzen. CD = *cluster of differentiation*, PFOB-NE = Perfluorocetyl bromid-Nanoemulsion, PE = Phycoerythrin, Cy = Cyanin, APC = Allophycocyanin, PerCP = Peridinin-Chlorophyll-Protein, FITC = Fluoresceinisothiocyanat.

2.1.4 Software

Zur Erstellung dieser Arbeit wurden die Programme Microsoft Word 2010, Microsoft Excel 2010 (Microsoft® Office 2010, Microsoft Deutschland GmbH Unterschleißheim, Deutschland), Kaluza Analysis Software 1.3 (Beckman Coulter, Brea, USA) und IBM® SPSS Statistics (SPSS Inc. Chicago, Illinois) verwendet.

2.2 Probandenkollektiv

Insgesamt wurden 27 Teilnehmende rekrutiert, elf gesunde Probandinnen und Probanden und 16 Patientinnen und Patienten. Für die erste Studie wurden fünf gesunde Probandinnen und Probanden (zwei Männer und drei Frauen, 23-50 Jahre, $M = 35.20$, $SD = 10.01$, $Mdn = 33$), für die zweite Studie sechs gesunde Probandinnen und Probanden (drei Männer und drei Frauen, 24-51 Jahre, $M = 30.00$, $SD = 10.47$, $Mdn = 26$) ohne kardiologische, hämatologische oder onkologische Grunderkrankungen über das kardiologische Labor der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf sowie das Personal der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie rekrutiert. Ein- und Ausschlusskriterien für die Teilnehmenden der ersten und zweiten Studie sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Einschlusskriterien	– gesunde Frauen und Männer, älter als 20 Jahre
Ausschlusskriterien	<ul style="list-style-type: none"> – Zustand nach Myokardinfarkt – stattgehabte PTCA/Bypass-OP – Arterielle Hypertonie – Diabetes mellitus – Hyperlipidämie – Adipositas – Koronare Herzkrankheit – Periphere arterielle Verschlusskrankheit – Schwangerschaft bzw. Stillzeit – virale oder bakterielle Erkrankungen – onkologische Erkrankungen – hämatologische Erkrankungen – COPD – Niereninsuffizienz – Dialyseverfahren – Asthma bronchiale – Autoimmunerkrankungen

Tabelle 6: Ein- und Ausschlusskriterien gesunder Probandinnen und Probanden. PTCA= perkutane transluminale coronarangiographie, OP = Operation, COPD = *chronic obstructive pulmonary disease*.

Für die dritte Studie wurden acht Patientinnen und Patienten mit Zustand nach Myokardinfarkt (zwei Frauen und sechs Männer, 53-77 Jahre, $M = 66.75$, $SD = 7.73$, $Mdn = 65.50$) und acht Patientinnen und Patienten mit stabiler, nicht stenosierender KHK (zwei Frauen und sechs Männer, 51-82 Jahre, $M = 67.25$, $SD = 9.13$, $Mdn = 68.50$), jedoch ohne vorausgegangenen Myokardinfarkt in die Studie aufgenommen (siehe Tabelle 7 und Tabelle 8). Die Patientinnen und Patienten mit KHK wurden über die Tagesklinik, die Patientinnen und Patienten mit Zustand nach Myokardinfarkt während ihres stationären Aufenthalts in der Abteilung für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf ausgewählt.

Kardiovaskuläre Risikofaktoren (Nikotinabusus, arterielle Hypertonie, Hyperlipidämie, Diabetes mellitus, Adipositas und positive Familienanamnese), weitere Grunderkrankungen sowie die medikamentöse Anamnese wurden erhoben. Zusätzlich wurde der koronarangiographische Befund inklusive des infarzierten bzw. erkrankten Gefäßes erfasst. Zur Bestimmung des Routinelabors (Blutbild, Serumelektrolyte, CRP, CK, CK-MB, Troponin T, Nieren- und Leberwerte) beider Patientengruppen wurden die Daten aus bisherigen Blutuntersuchungen der Abteilung für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie verwendet. Ein- und Ausschlusskriterien für die Teilnehmenden der dritten Studie sind in Tabelle 7 und Tabelle 8 zusammengefasst.

Einschlusskriterien	<ul style="list-style-type: none"> – Frauen und Männer, älter als 50 Jahre – klinisch und laborchemisch akuter STEMI, Troponin T > 1000 ng/l – drei Tage nach reperfundiertem Herzinfarkt – Informierte Einwilligung
Ausschlusskriterien	<ul style="list-style-type: none"> – Systemische, nicht infarktbedingte Entzündung (Leukozytose, CRP > 30 mg/dl und nachgewiesener Entzündungsfokus) – ventrikuläre Unterstützungssysteme – onkologische Erkrankungen – hämatologische Erkrankungen – COPD – Niereninsuffizienz – Dialyseverfahren – Asthma bronchiale – Autoimmunerkrankungen

Tabelle 7: Ein- und Ausschlusskriterien der Patientinnen und Patienten mit Myokardinfarkt. STEMI = ST-elevation myocardial infarction, ng = Nanogramm, mg = Milligramm, dl = Deziliter, CRP = C-reaktives Protein, COPD = *chronic obstructive pulmonary disease*.

Einschlusskriterien	<ul style="list-style-type: none"> – gesunde Frauen und Männer, älter als 50 Jahre – angiographischer Nachweis einer Koronarstenose – informierte Einwilligung
Ausschlusskriterien	<ul style="list-style-type: none"> – frischer Myokardinfarkt – instabile Angina pectoris – ventrikuläre Unterstützungssysteme – Systemische, nicht infarktbedingte Entzündung (Leukozytose, CRP > 30 mg/dl und nachgewiesenem Entzündungsfokus) – onkologische Erkrankungen – hämatologische Erkrankungen – COPD – Niereninsuffizienz – Dialyseverfahren – Asthma bronchiale – Autoimmunerkrankungen

Tabelle 8: Ein- und Ausschlusskriterien der Patientinnen und Patienten mit KHK. mg = Milligramm, dl = Deziliter, CRP = C-reaktives Protein, COPD = *chronic obstructive pulmonary disease*.

Nachdem die Ein- und Ausschlusskriterien (siehe Tabelle 6, Tabelle 7 und Tabelle 8) überprüft wurden, erfolgte ein Aufklärungsgespräch über den geplanten Untersuchungsablauf und die Ziele der Untersuchung. Die Möglichkeit des Abbruchs zu jeder Zeit der Untersuchung wurde erläutert und die schriftliche Einverständniserklärung eingeholt. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf genehmigt und entspricht der Deklaration von Helsinki. Es liegt ein positives Ethikvotum der Ethikkommission der

medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf vom 27.06.2013 unter der Studiennummer 4297 vor.

2.3 Gewinnung des Probematerials

Für die erste und dritte Studie wurden jeweils 5 ml, für die zweite Studie insgesamt 15 ml durch die Punktion einer peripheren Vene des Armes mit einer 0.8 mm x 19 mm x 305 mm Kanüle (BD Vacutainer® Safety-Lok™ Sicherheitsblutentnahmeset) in Vakuumröhrchen (BD Vacutainer® Systems) gewonnen.

2.4 Herstellung der fluoreszenzmarkierten Perfluorocetyl bromid-Nanoemulsion

Zur Herstellung von 100 ml der PFOB-NE wurde ein Protokoll von Flögel et al. (2008) und Jacoby, Temme, et al. (2014) adaptiert. Zunächst wurde eine Pufferlösung aus 0.287 g Natriumchlorid (NaCl), 71.127 g demineralisiertes Wasser (H₂O), 0.0595 g Natriumdihydrogenphosphat (NaH₂PO₄) und 0.616 g Dinatriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄), angesetzt und unter konstantem Rühren gelöst. Im nächsten Schritt wurden 4.599 g Eilecithin (E 80 S), 5 mg Fluoresceinisothiocyanat (FITC), 2.156 g Diblock (1 Perfluoro-n-hexyl-decan) und 80.5 g PFOB hinzugegeben. Darauffolgend wurden die jeweiligen Phasen mit einem Stabmixer gemischt. Die entstandene Emulsion wurde in zehn Zyklen bei 1000 bar in einem Hochdruckhomogenisator homogenisiert. Die Partikel der PFOB-NE hatten eine durchschnittliche Größe von 213nm mit einer Standardabweichung von 93 nm und einem ζ - Potenzial von -28.59 mV.

2.5 Herstellung der fluoreszenzmarkierten Zymosan A Lösung

Die Fähigkeit der Monozyten nach Aufnahme der PFOB-NE weiter zu phagozytieren wurde mit FITC fluoreszierenden Zymosanpartikeln überprüft. Die FITC-markierten Zymosanpartikel wurden in Pulverform über Thermo Fisher Scientific erworben. Pro Milligramm des Pulvers sind 2×10^7 FITC-markierte Zymosan A Partikel enthalten (Molecular Probes Inc., 2001). 10 mg der Partikel wurden in 500 µl PBS aufgelöst, dies entspricht 4×10^5 Partikeln/µl. Die Lösung wurde 3x15 Sekunden auf höchster Einstellung in einem Reagenzglasschüttler gemischt und bei 4 °C gelagert. Um eine homogene Mischung zu erhalten, wurde die Suspension im Ultraschallbad bei 35 kHz für 3x20 Sekunden behandelt. Laut Hersteller sollen pro Leukozyt zwischen 1 und 100 Partikeln vorhanden sein, um eine adäquate Phagozytose zu

gewährleisten (Molecular Probes Inc., 2001; Oben & Foreman, 1988). Unter der Annahme einer mittleren Blutkonzentration von 10×10^3 Leukozyten/ μl entspricht dies 10 μl Zymosanlösung pro Milliliter Blut.

2.6 Das BioFlux-System

Um zu zeigen, dass humane Monozyten die PFOB-NE unter Flussbedingungen aufnehmen, wurde das BioFlux-System verwendet. Mittels des BioFlux-Systems ist es möglich humane Monozyten mit FITC-markierter PFOB-NE unter kontrollierten Temperatur- und laminaren Flussbedingungen zu inkubieren. In einem ersten Schritt wurde zunächst das benötigte Arbeitsvolumen für die einzelnen *inlet wells* des BioFlux auf 1 ml festgelegt. Des Weiteren wurde das benötigte Volumen für die Durchflusszytometrie bestimmt, sowie die Zeitpunkte, zu denen die Entnahme des Blutes aus dem *outlet well* möglich ist. Die Volumina im *outlet well* wurden mit Hilfe einer Excel-Datei von Fluxion BioSciences berechnet, in der die Scherströmung und die Viskosität der verwendeten Substanz angegeben werden müssen (Fluxion BioSciences). Die Scherströmung wurde auf 10 dyn/cm^2 festgelegt, da diese nur geringfügig über der durchschnittlichen Scherströmung einer peripheren Vene liegt (Papaioannou, Karatzis, Vavuranakis, Lekakis, & Stefanadis, 2006; Papaioannou & Stefanadis, 2005) und ausreichend Volumen im *outlet well* zur Verfügung steht, das entnommen werden kann.

2.7 Phagozytoseassays

2.7.1 Phagozytose mit PFOB-NE im BioFlux

Um zu zeigen, dass humane Monozyten die PFOB-NE unter Flussbedingungen in vergleichbarer Kinetik aufnehmen wie unter artifiziellen Bedingungen im Inkubator, wurden Vollblutproben von gesunden Probandinnen und Probanden entnommen und jeweils im Inkubator auf einem Rollenmischer sowie im BioFlux mit PFOB-NE inkubiert und nachfolgend durchflusszytometrisch analysiert und verglichen. Für die Phagozytoseassays im BioFlux wurde 5 ml heparinisiertes Vollblut aus einer peripheren Vene von gesunden Probandinnen und Probanden (siehe Tabelle 6) entnommen. Die Probe wurde im Verhältnis 1:20 mit FITC-markierter PFOB-NE inkubiert und kurz gemischt. 200 μl der Vollblutprobe wurde zum Zeitpunkt 0 Minuten aus dem Vakuumröhrchen entnommen. Unmittelbar danach wurde 1 ml Aliquot in das *inlet well* der BioFlux 48-*high shear* Platte pipettiert, das Interface angebracht und die Scherkraft auf 10 dyn/cm^2 eingestellt. Unter einem Mikroskop wurde bei einer

Vergrößerung von 400 sichergestellt, dass durch das Pipettieren keine Luftblasen in den Kanal gelangt sind und somit der kontinuierliche Fluss nicht gehemmt war. Dieser wurde im Abstand von 15 min über die Zeit der Inkubation von 128 min überprüft. Die 48-*high-shear* Platte wurde auf eine Temperaturplatte von 37 °C gestellt. Um zu verhindern, dass die Erythrozyten sedimentieren und somit den Kanal verschließen, wurde die Well- samt der Temperaturplatte auf eine Rüttelplatte gestellt. Diese wurde auf 300/min eingestellt. Zu definierten Zeitpunkten (8, 16, 32, 64 und 128 min) wurde das Interface abgenommen und 10 µl Vollblut aus dem *outlet well* entnommen, der Rest wurde verworfen. Die Proben wurden wie unter Abschnitt 2.7.5 beschrieben (Protokoll 1) aufbereitet und durchflusszytometrisch mit einem FACSVerse™ analysiert (siehe Abschnitt 2.8.3.2).

2.7.2 Phagozytose mit PFOB-NE im Inkubator

Fünf Milliliter heparinisertes Vollblut aus einer peripheren Vene gesunder Probandinnen und Probanden (siehe Tabelle 6) wurde mit FITC-markierter PFOB-NE in einem Verhältnis von 1:20 bei 37 °C auf einem Rollenmischer inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten (0, 8, 16, 32, 64 und 128 Minuten nach Inkubation) wurden 200 µl Aliquots entnommen und wie unter Abschnitt 2.7.5 (Protokoll 1) beschrieben aufbereitet. Die durchflusszytometrische Analyse wurde mit einem FACSVerse™ durchgeführt (siehe Abschnitt 2.8.3.2).

2.7.3 Phagozytose von PFOB-NE und Zymosan A

Um die weitere Phagozytosefähigkeit von Monozyten nach Aufnahme der PFOB-NE zu bestimmen, wurden Vollblutproben gesunder Probandinnen und Probanden (siehe Tabelle 6) nach Aufnahme von PFOB-NE zusätzlich mit Zymosan A ko-inkubiert. Dazu wurden drei Proben heparinisertes Vollblut à 5 ml vorbereitet (Nienhaus et al., 2019).

In Vorversuchen sollte zunächst die Konzentration der Zymosan A Lösung für die Inkubation mit humanen Leukozyten bestimmt werden. Dazu wurde 1 ml heparinisertes Vollblut gesunder Probandinnen und Probanden in unterschiedlichen Verhältnissen (1:40, 1:100 und 1:1000) bei 37 °C auf einem Rollenmischer mit Zymosan A inkubiert und zu definierten Zeitpunkten (0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 und 60 min) 100 µl Aliquots entnommen. Die weitere Aufbereitung lief wie unter Abschnitt 2.7.5 (Protokoll 1) beschrieben ab, die durchflusszytometrische Analyse wurde mit einem FACSVerse™ durchgeführt. Für die weiteren Versuche wurde eine Konzentration von 1:100 gewählt.

Probe 1 wurde mit FITC-markierten PFOB-NE in einem Verhältnis von 1:20 bei 37 °C unter End-zu-End-Rotation inkubiert. Probe 2 enthielt die Lösung mit FITC-markiertem Zymosan A, die in einem Verhältnis von 1:100 bei 37 °C unter End-zu-End-Rotation mit

Vollblut inkubiert wurden. Zu definierten Zeitpunkten (0, 8, 16, 32, 64, 128 und 160 min nach Inkubation) wurden 200 µl Aliquots für die Aufbereitung der Blutproben entnommen. Für die Koinkubation (Probe 3) der PFOB-NE und des Zymosan A wurde zunächst PFOB-NE im Verhältnis 1:20 zu der heparinisierten Vollblutprobe hinzugegeben und bei 37 °C für insgesamt 64 min inkubiert. 200 µl Aliquots wurden zu den Zeitpunkten 0, 8, 16, 32, und 64 min nach Inkubation entnommen. Nach 64 min wurde die Lösung mit Zymosan A im Verhältnis 1:100 hinzugegeben und für weitere 96 min bis Zeitpunkt 160 min inkubiert. 200 µl Aliquots wurden zu den Zeitpunkten 128 min und 160 min entnommen. Alle Proben wurden wie unter Abschnitt 2.7.6 (Protokoll 2) beschrieben aufbereitet und mit einem FACSCanto™ II analysiert (Nienhaus et al., 2019).

2.7.4 Phagozytose von PFOB-NE bei Myokardinfarkt- und KHK- Patientinnen und Patienten

Um die Phagozytose von PFOB-NE durch humane Monozyten bei Patientinnen und Patienten nach einem Myokardinfarkt (STEMI, siehe Tabelle 7) mit der von Patientinnen und Patienten mit einer stabilen, nicht stenosierenden KHK (siehe Tabelle 8) zu vergleichen, wurde 5 ml heparinisiertes Vollblut mit PFOB-NE inkubiert und untersucht. Die Proben wurden mit PFOB-NE in einem Verhältnis von 1:20 unter End-zu-End-Rotation bei 37 °C inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0, 8, 16, 32, 64, 128 und 160 min wurden Aliquots entnommen und wie unter Abschnitt 2.7.6 (Protokoll 2) beschrieben für die durchflusszytometrische Analyse aufbereitet. Die Analyse erfolgte mit einem FACSCanto™ II (Becton Dickinson).

2.7.5 Aufbereitung der Proben (Protokoll 1)

Die Proben für die Phagozytoseassays im BioFlux und Inkubator mit PFOB-NE und Vollblut gesunder Probandinnen und Probanden, sowie für die Vorversuche mit Zymosan A wurden nach Protokoll 1 aufbereitet. 200 µl Aliquots mit PFOB bzw. 100 µl mit Zymosan A wurden für zehn Minuten in 5 ml ACK-Lysepuffer bei 4 °C auf Eis inkubiert und nachfolgend mit 8 ml MACS-Puffer abgelöscht. Die Proben wurden für zehn Minuten bei 450 RCF und 4 °C zentrifugiert, der Überstand dekantiert und in 5 ml ACK resuspendiert. Nach drei Lyse-Durchgängen wurde das Zellpellet in 200 µl MACS resuspendiert und 100 µl in ein FACS-Röhrchen überführt. Die Proben wurden mit jeweils 1 µl fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern (CD14: PE-Cy7, CD16: APC-Cy7 und CD19: PerCP-Cy5.5) für zehn Minuten im Dunkeln bei 4 °C inkubiert und nachfolgend mit 1 ml MACS abgelöscht. Nach weiteren zehn Minuten Zentrifugation bei 450 RCF und 4 °C wurde der Überstand dekantiert und die

Zellsuspension in 200 µl MACS resuspendiert. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Analyse mit einem FACSVerser™ (Becton Dickinson Biosciences).

2.7.6 Aufbereitung der Proben (Protokoll 2)

Für die Aufbereitung der Proben nach Koinkubation mit PFOB-NE und Zymosan A sowie für die Proben der Patientinnen und Patienten mit KHK und Zustand nach Myokardinfarkt wurde Protokoll 2 verwendet. 200 µl der inkubierten Proben wurden für zehn Minuten in 5 ml ACK-Lysepuffer bei 4 °C auf Eis inkubiert und mit 8 ml MACS-Puffer abgelöscht. Nach 7-minütiger Zentrifugation bei 500 RCF und 4 °C wurde der Überstand dekantiert und in 5 ml ACK resuspendiert. Das Zellpellet wurde nach drei Lyse-Durchgängen in 200 µl MACS resuspendiert und 100 µl in ein FACS-Röhrchen überführt. Da sich die Zellpopulationen der Monozyten und Granulozyten bei den vorherigen FACS-Analysen überlagerten, wurden die Granulozyten in allen weiteren Versuchen mit CD15 markiert, um diese von der Population der Monozyten besser differenzieren zu können. Die Proben wurden für zehn Minuten im Dunkeln bei 4 °C mit jeweils 1 µl fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern (CD14: PE-Cy7, CD16: APC-Cy7 und CD15: APC) inkubiert, mit 1 ml MACS abgelöscht und für sieben Minuten bei 500 RCF und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Zellsuspension in 500 µl MACS resuspendiert. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Analyse mit einem FACSCanto™ II von Becton Dickinson Biosciences.

2.8 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie beruht auf der Analyse von Zellen basierend auf ihrer Größe, Granularität und Fluoreszenzemission. Dazu werden die Zellen in Einzelzellsuspension an einem Laserstrahl vorbeigeleitet, ihre Lichtstreuung und Fluoreszenzemission werden von einem Detektor registriert. Die Menge des Vorwärtsstreulichtes (*forward scatter*, FSC) hängt von der Größe der Zellen ab, während das Seitwärtsstreulicht (*sideward scatter*, SSC) von ihrer Granularität bestimmt wird. Mit fluoreszierenden Antikörpern markierte Zellen lassen sich zudem nach Oberflächenproteinen sortieren. Die Menge des emittierten Fluoreszenzlichtes ist proportional zur Menge gebundener Antikörper oder aufgenommener fluoreszierender Partikel. Einzelne Zellen können somit aufgrund ihrer Morphologie und ihrer Antigenexpression identifiziert und charakterisiert werden. Bei den Messungen wird die relative Größe, Granularität und Fluoreszenz ohne Maßeinheit bestimmt (Adan, Alizada, Kiraz, Baran, & Nalbant, 2017; McKinnon, 2018).

2.8.1 Ausschluss apoptotischer Zellen

Um apoptotische Zellen und Zellen mit intakter Zellmembran differenzieren zu können, wurde 1 µl des Fluoreszenzfarbstoffs DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid) unmittelbar vor der Messung zu der Zellsuspension gegeben. DAPI diffundiert bei apoptotischen Zellen aufgrund der beschädigten Zellmembran in die Zelle und bindet an A-T-reiche Regionen der DNA-Doppelhelix (Kubista, Aakerman, & Norden, 1987). Auf die DAPI-positiven Zellen wurde ein Auswertungsfenster gesetzt. Die rotfluoreszierenden Zellen galten als geschädigt und wurden von der späteren Analyse ausgeschlossen. Der prozentuale Anteil DAPI-positiver Zellen sollte 10 % nicht überschreiten.

2.8.2 Durchflusszytometrische Analyse

Für die durchflusszytometrische Analyse der Proben wurde entweder das FACSVerse™ oder das FACSCanto™ II von Becton Dickinson Biosciences benutzt. Die Durchflusszytometer sind mit drei Lasern ausgestattet und ermöglichen die durchflusszytometrische Analyse von Vorwärtsstreulicht, Seitwärtsstreulicht und acht Fluoreszenzparametern.

Zur Differenzierung unterschiedlicher Zellpopulationen wurden diese mit monoklonalen Antikörpern, wie in Tabelle 9 dargestellt, markiert und identifiziert. Um die Überschneidung der Emissionsspektren zu kompensieren und positive von negativen Signalen abgrenzen zu können, wurden Einzelfärbungen basierend auf den jeweiligen Antikörpern benutzt. Anhand der Negativkontrollen wurden die Analysefenster zur Eingrenzung der positiv fluoreszierenden Populationen im Seitwärtsstreulicht und im logarithmischen Modus des jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffes festgelegt. Für jede Probe wurden mindestens 10,000 Ereignisse registriert. Die minimale Anzahl an Ereignissen, die eine Zellpopulation definierte betrug 100 unter Ausschluss DAPI-positiver Zellen. Die Daten wurden mit der Kaluza Analysis Software (Beckman Coulter) analysiert und dargestellt.

Zellpopulation	Verwendeter Antikörper
Monozyten	
CD14 ⁺ CD16 ⁺	CD14 und CD16
CD14 ⁺ CD16 ⁻	CD14
Granulozyten	CD15 und CD16
B-Zellen	CD19

Tabelle 9: Monoklonale Antikörper, die für die Differenzierung der unterschiedlichen Zellpopulationen verwendet wurden. *CD = cluster of differentiation.*

2.8.3 Auswertung der durchflusszytometrischen Daten

2.8.3.1 Kaluza Analysis Software

Die Kaluza Analysis Software ist ein Programm, um durchflusszytometrische Daten auswerten zu können. Einzelfärbungen zur Kontrolle erkennt das Programm automatisch und berechnet die spektrale Überlappung. Im logarithmischen Modus kann die Fluoreszenzintensität angezeigt und die unterschiedlichen Zellpopulationen entsprechend ihrer Fluoreszenzen mit Analysefenstern eingegrenzt werden. Mit diesen Analysefenstern kann unter anderem die Anzahl der Zellen bestimmt werden, deren prozentualer Anteil an der Gesamtzellpopulation und die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI).

Folgende Parameter wurden zur weiteren Analyse mit der Kaluza Software bestimmt:

- a. Der prozentuale Anteil der Zellen, die FITC-markierte Nanoemulsion phagozytiert haben an der Gesamtzahl der jeweiligen Zellpopulation.
- b. Die mittlere Fluoreszenzintensität pro Einzelzelle (=Mean), die zur Anzahl an aufgenommenen Partikeln pro Zelle proportional ist.
- c. Zellzahl der unterschiedlichen Zellpopulationen

2.8.3.2 Auswertung der nach Protokoll 1 aufbereiteten Proben

Um die Zellpopulationen zu charakterisieren, wurde eine FACS-Analyse mit verschiedenen antigenspezifischen Markern durchgeführt. Abbildung 7 zeigt die verwendete Strategie zur Charakterisierung der verschiedenen Zellpopulationen mit der Kaluza Analysis Software. Mit Auswertungsfenstern wurden die Zellen identifiziert und der Anteil FITC-positiver Zellen der jeweiligen Zellpopulationen bestimmt. Apoptotische Zellen wurden mittels DAPI von der weiteren Analyse ausgeschlossen (Abb. 7 A). Nachfolgend wurden die Leukozyten eingegrenzt (Abb. 7 B) und mittels monoklonaler Antikörper zwischen Leukozyten gesamt, Monozyten, Granulozyten und B-Zellen differenziert (Abb. 7 C bis E). Die jeweiligen Zellpopulationen wurden im logarithmischen Modus als FITC-positive Zellen markiert, um den prozentualen Anteil FITC-positiver Zellen und die MFI zu bestimmen (Abb. 7 F bis I).

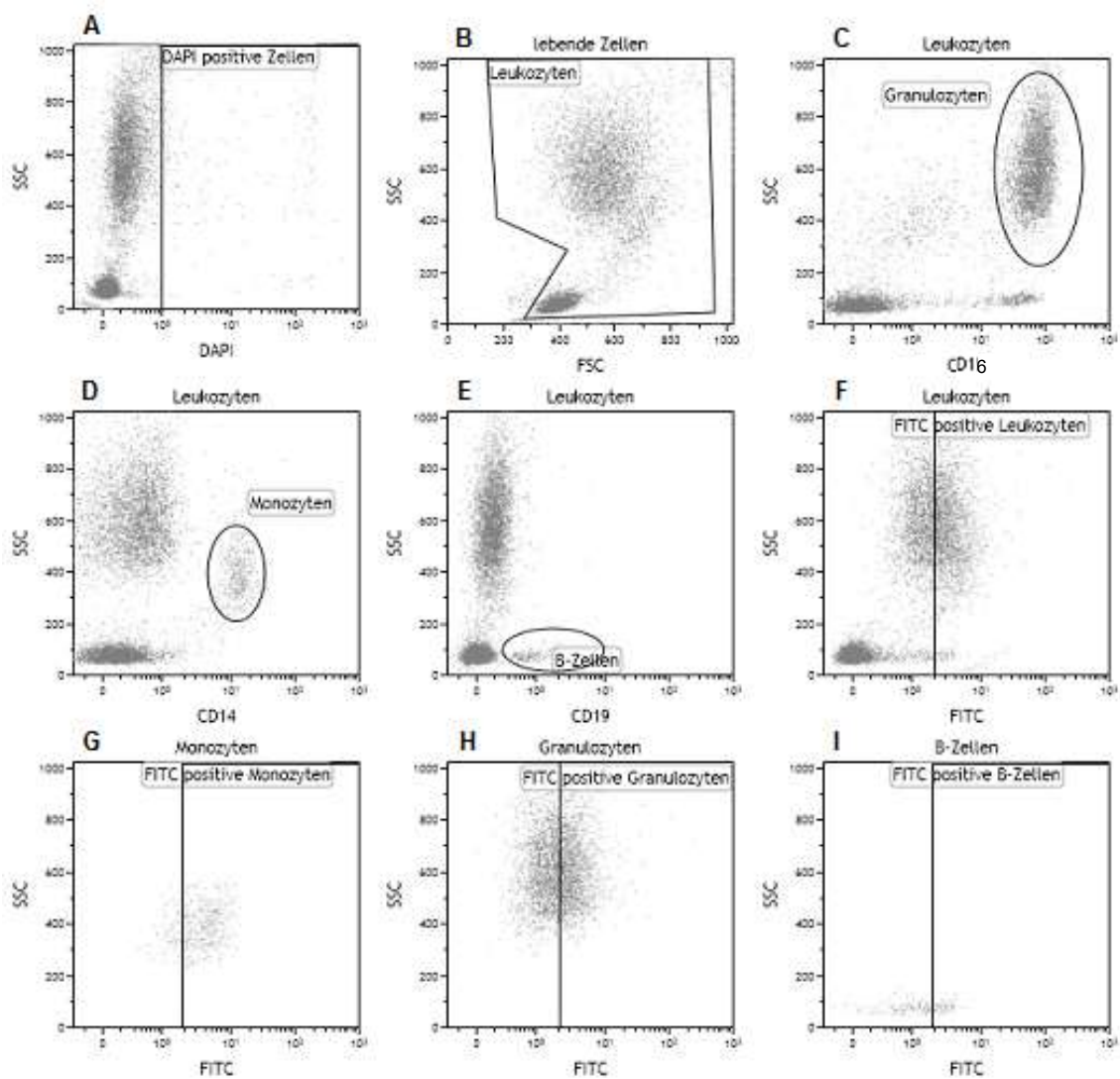


Abb. 7: Repräsentative FACS-Analyse der nach Protokoll 1 aufbereiteten Proben, um FITC-positive Zellpopulationen zu identifizieren und zu differenzieren. (A) Apoptotische Zellen wurden mit DAPI angefärbt und von der weiteren Analyse ausgeschlossen. (B) Eingrenzung der Leukozyten. (C) Granulozyten wurden mit CD16 identifiziert, (D) Monozyten mit CD14 und CD16 und (E) B-Zellen mit CD19. (F-I). Die vier Populationen wurden separat im logarithmischen FITC Modus eingegrenzt und der prozentuale Anteil FITC-positiver Zellen sowie die mittlere Fluoreszenzintensität bestimmt. SSC = Seitwärtsstreulicht (*sideward scatter*), FSC = Vorwärtsstreulichtes (*forward scatter*), DAPI = 4',6-Diamidin-2-phenylindol, CD = *cluster of differentiation*, FITC = Fluoresceinisothiocyanat.

2.8.3.3 Auswertung der nach Protokoll 2 aufbereiteten Proben

Abbildung 8 stellt die einzelnen Auswertungsschritte mit der Kaluza Analysis Software dar, um die Zellpopulationen der nach Protokoll 2 aufbereiteten Zellen zu identifizieren. Apoptotische Zellen wurden wieder mittels DAPI von der weiteren Analyse ausgeschlossen (Abb. 8 A). Da sich die Zellpopulationen der Monozyten und Granulozyten bei den vorherigen FACS-Analysen überlappten, wurden die Granulozyten in allen weiteren Versuchen mit CD15 markiert (Abb. 8 B), um diese von der Population der Monozyten besser differenzieren zu können und von der weiteren Analyse auszuschließen (Abb. 8 C). Die im logarithmischen

Modus markierten CD14-Monozyten wurden weiter in CD14⁺CD16⁻ und CD14⁺CD16⁺- Monozyten unterteilt (Abb. 8 D). Um den prozentualen Anteil FITC-positiver Zellen und die MFI zu bestimmen, wurden die jeweiligen Zellpopulationen im logarithmischen Modus als FITC-positive Zellen eingegrenzt (Abb. 8 E bis F).

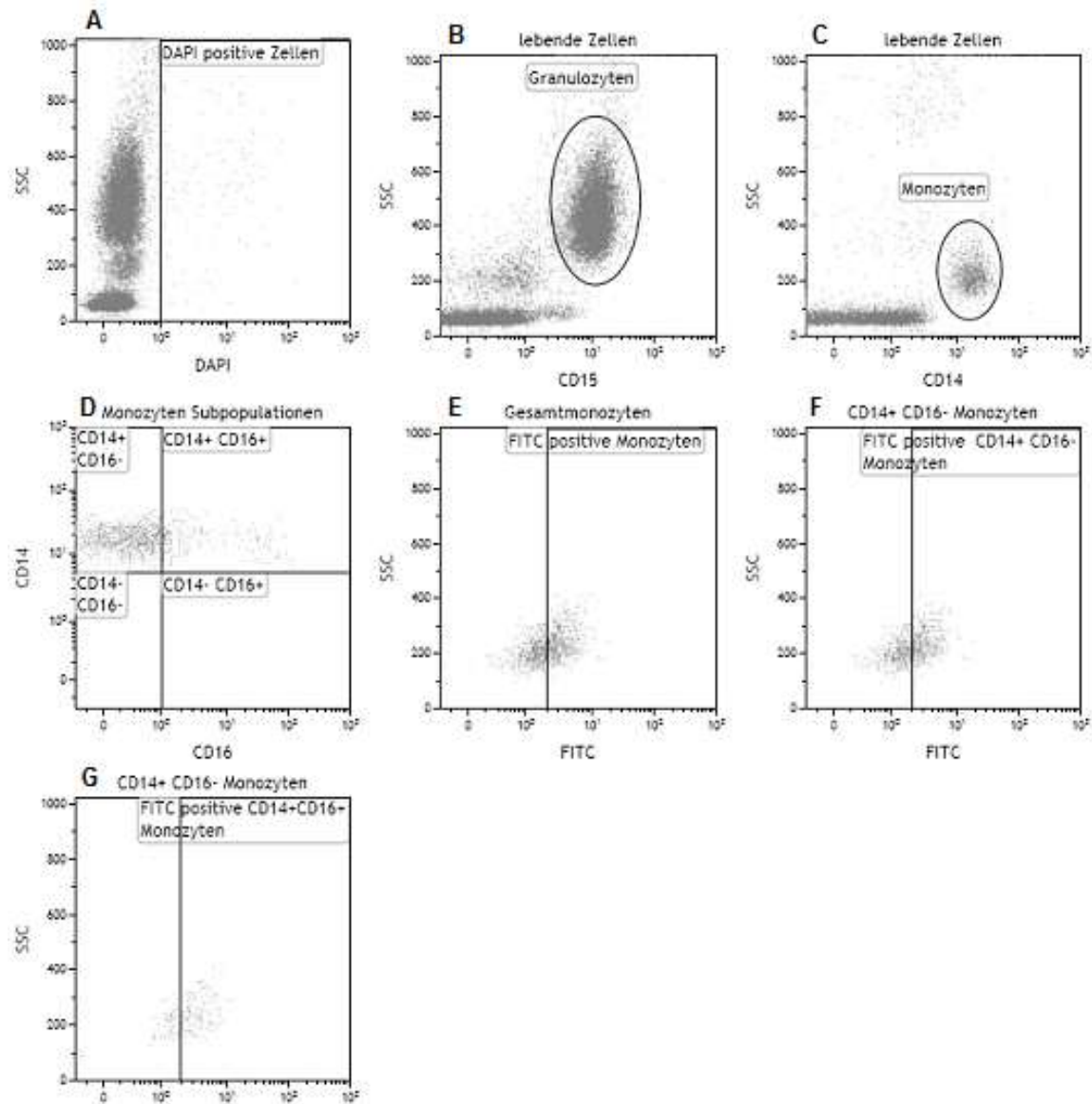


Abb. 8: Repräsentative FACS-Analyse der nach Protokoll 2 aufbereiteten Proben. Auswertungsfenster um einzelne Leukozytenpopulationen nach Inkubation mit PFOB-NE und/oder Zymosan A zu differenzieren. (A) Apoptotische Zellen wurden mit DAPI angefärbt und von der weiteren Analyse ausgeschlossen. (B) Durch die Expression von CD15 wurden Granulozyten von Monozyten differenziert und ebenfalls von der weiteren Analyse ausgeschlossen. (C) Monozyten wurden mit CD14 und CD16 markiert und nachfolgend in (D) CD14⁺CD16⁻- und CD14⁺CD16⁺-Monozyten unterteilt. (E-G) Die drei Zellpopulationen (Gesamtmonozyten, CD14⁺CD16⁻- und CD14⁺CD16⁺-Monozyten) wurden im logarithmischen FITC Modus eingegrenzt, um den prozentualen Anteil FITC-positiver Zellen zu bestimmen. SSC = Seitwärtsstreulicht (*sideward scatter*), DAPI = 4',6-Diamidin-2-phenylindol, CD = *cluster of differentiation*, FITC = Fluoresceinisothiocyanat.

2.9 Statistik

Die Aufbereitung und Analyse der Daten sowie die Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit dem Programm IBM® SPSS Statistics 23. Mit der Kaluza Analysis Software konnte der prozentuale Anteil FITC-positiver Zellen der jeweiligen Zellpopulation an ihrer Gesamtzellzahl bestimmt werden sowie die MFI der einzelnen Zellpopulationen. Deskriptive Statistiken sind als Mittelwert mit Standardabweichungen (SD) oder als Median angegeben. Fehlende Werte wurden durch den Mittelwert der restlichen Werte ersetzt. Die Daten wurden mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung, mit dem Levene-Test auf Homoskedastizität, mit dem Box-Test auf Gleichheit der Kovarianzen und mit dem Mauchly's Test auf Sphärizität überprüft.

Für den Vergleich der Phagozytose von PFOB-NE im Inkubator und BioFlux wurde eine 2×6 messwiederholte Varianzanalyse mit den Zeitpunkten (0, 8, 16, 32, 64, 128 Minuten) und dem Gerätetyp (Inkubator vs. BioFlux) als Innersubjektfaktor und dem prozentualen Anteil FITC-positiver Zellen bzw. der MFI der jeweiligen Zellpopulation als abhängige Variable durchgeführt. Um auf signifikante Unterschiede zwischen BioFlux und Inkubator zu den einzelnen Zeitpunkten zu überprüfen, wurden Analysen zu den einfachen Effekten verwendet.

Um die prozentualen Anteile und MFI der jeweiligen Zellpopulationen nach Inkubation mit den unterschiedlichen Substanzen zu vergleichen, wurde ein Friedman-Test zu den einzelnen Zeitpunkten durchgeführt. Bei einem signifikanten Ergebnis wurde ein zweiseitiger paarweiser Vergleich mit α -Adjustierung durchgeführt.

Um die Grundcharakteristika der Patientinnen und Patienten mit KHK und Myokardinfarkt zu vergleichen, wurde der Mann-Whitney-U-Test für unabhängige, intervallskalierte Parameter (Alter, Blutdruck, Laborwerte etc.) und der exakte Test nach Fisher für kategoriale Parameter verwendet. Es wurde eine 2×7 gemischte Varianzanalyse mit den Zeitpunkten (0, 8, 16, 32, 64, 128, 160 Minuten) als Innersubjektfaktor, der Gruppenzugehörigkeit (STEMI vs. KHK) als Zwischensubjektfaktor und dem prozentualen Anteil FITC-positiver Zellen bzw. der MFI der jeweiligen Zellpopulation als abhängige Variable durchgeführt. Um Patientinnen und Patienten mit KHK und STEMI zu den einzelnen Zeitpunkten zu vergleichen, wurden Analysen zu den einfachen Effekten verwendet. Zum Vergleich der Monozytensubpopulationen bei Patientinnen und Patienten mit STEMI und KHK wurden t -Tests durchgeführt.

Das Signifikanzniveau wurde für alle Analysen auf $\alpha = .05$ festgelegt. Die geringste signifikante Differenz wurde für die α -Adjustierung bei Mehrfachvergleichen bei den Analysen für einfache Effekte angewendet. Bei den t -Tests wurde eine Bonferroni-Korrektur vorgenommen.

3 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es die Phagozytose von PFOB-NE durch humane Monozyten zu untersuchen. Zunächst sollte im BioFlux System gezeigt werden, dass PFOB-NE unter Flussbedingungen in definierter Kinetik aufgenommen werden (Kapitel 2.7.1). Um zu zeigen, dass die Phagozytose von PFOB-NE die weitere Phagozytosefähigkeit der Zellen nicht einschränkt, wurden humane Vollblutproben zusätzlich mit Zymosan A inkubiert (Kapitel 2.7.3). Die Phagozytose von PFOB-NE wurde bei Patientinnen und Patienten mit KHK sowie bei Patientinnen und Patienten nach STEMI untersucht, um zu zeigen, dass humane Monozyten bei Patientinnen und Patienten nach STEMI eine verstärkte und beschleunigte Phagozytose zeigen (Kapitel 2.7.4).

3.1 Phagozytose der PFOB-NE im BioFlux und Inkubator bei gesunden Probandinnen und Probanden

Das erste Ziel dieser Arbeit war es zu zeigen, dass humane Monozyten PFOB-NE unter Flussbedingungen phagozytieren. Dazu wurden humane Vollblutproben mit der PFOB-NE auf einem Rollenmischer im Inkubator sowie im BioFlux wie in Abschnitt 2.7.5 beschrieben inkubiert und in der Durchflusszytometrie analysiert. Die Histogramme und Q-Q-Plots zeigten für einige Zeitpunkte keine Normalverteilung, die deskriptiven Statistiken zeigten ebenfalls schiefe Verteilungen für die verschiedenen Bedingungen. Dennoch wurde die messwiederholte Varianzanalyse explorativ durchgeführt, um die prozentualen Anteile und die MFI der jeweiligen Zellpopulationen im Inkubator und BioFlux zu vergleichen. Bei verletzter Sphärizität wurde eine Greenhouse-Geisser Korrektur vorgenommen (Field, 2013; Kubinger, Rasch, & Moder, 2009; Rasch, Kubinger, & Moder, 2011). Um auf signifikante Unterschiede zwischen BioFlux und Inkubator zu den einzelnen Zeitpunkten zu überprüfen, wurden Analysen zu den einfachen Effekten durchgeführt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Zellpopulationen befinden sich in Tabelle 10.

Zellpopulation	Zeit (min)	Inkubator		BioFlux	
		Anteil FITC-positiver Zellen	MFI der Zellen	Anteil FITC-positiver Zellen	MFI der Zellen
		$M \pm SD$	$M \pm SD$	$M \pm SD$	$M \pm SD$
Leukozyten	0	0.07 ± 0.07	2.47 ± 0.70	0.06 ± 0.04	2.01 ± 0.28
	8	0.27 ± 0.14	2.14 ± 0.55	0.06 ± 0.03	2.41 ± 0.83
	16	0.45 ± 0.19	2.23 ± 0.34	0.10 ± 0.03	3.00 ± 1.54
	32	0.68 ± 0.13	2.48 ± 0.50	0.40 ± 0.17	2.26 ± 0.42
	64	0.77 ± 0.13	2.95 ± 0.62	0.62 ± 0.16	2.78 ± 0.83
	128	0.79 ± 0.09	2.85 ± 0.56	0.59 ± 0.16	2.40 ± 0.39
Granulozyten	0	0.07 ± 0.07	2.23 ± 0.61	0.04 ± 0.03	1.76 ± 0.08
	8	0.30 ± 0.15	2.24 ± 0.87	0.06 ± 0.01	2.11 ± 0.46
	16	0.44 ± 0.21	1.99 ± 0.31	0.14 ± 0.11	2.08 ± 0.40
	32	0.69 ± 0.15	2.43 ± 0.49	0.38 ± 0.18	2.05 ± 0.37
	64	0.80 ± 0.14	2.65 ± 0.70	0.60 ± 0.17	2.11 ± 0.32
	128	0.86 ± 0.07	2.39 ± 0.45	0.57 ± 0.17	2.26 ± 0.30
Monozyten	0	0.11 ± 0.08	1.81 ± 0.51	0.12 ± 0.07	1.55 ± 0.12
	8	0.40 ± 0.08	1.84 ± 0.24	0.05 ± 0.04	1.67 ± 0.13
	16	0.51 ± 0.19	1.90 ± 0.33	0.13 ± 0.10	1.70 ± 0.46
	32	0.87 ± 0.07	3.00 ± 0.80	0.48 ± 0.21	2.17 ± 0.48
	64	0.94 ± 0.05	4.91 ± 1.32	0.77 ± 0.17	2.34 ± 0.56
	128	0.96 ± 0.04	6.88 ± 1.79	0.92 ± 0.03	2.78 ± 0.45
B-Zellen	0	0.10 ± 0.12	7.52 ± 5.17	0.06 ± 0.04	6.38 ± 1.96
	8	0.27 ± 0.19	3.13 ± 1.96	0.25 ± 0.10	4.52 ± 4.86
	16	0.40 ± 0.17	2.78 ± 0.83	0.39 ± 0.22	4.66 ± 3.77
	32	0.52 ± 0.24	2.57 ± 0.72	0.56 ± 0.28	3.45 ± 1.48
	64	0.31 ± 0.15	2.48 ± 0.71	0.67 ± 0.18	8.11 ± 4.70
	128	0.12 ± 0.08	3.46 ± 1.66	0.41 ± 0.30	3.93 ± 2.82

Tabelle 10: Mittelwerte und Standardabweichung der Anteile FITC-positiver Zellen und mittleren Fluoreszenzintensitäten der unterschiedlichen Zellpopulationen im Inkubator und BioFlux zu verschiedenen Zeitpunkten. Min = Minuten, FITC = Fluoresceinisothiocyanat, MFI = mittlere Fluoreszenzintensität, M = Mittelwert, SD = Standardabweichung, $n = 5$.

Abbildung 9 zeigt, dass alle Leukozyten-Subpopulationen die PFOB-NE sowohl im Inkubator als auch im BioFlux phagozytierten. Der Anteil FITC-positiver Zellen zeigt im Inkubator einen hyperbolen Kurvenverlauf, im BioFlux einen sigmoidalen Verlauf. Der Anteil FITC-positiver Zellen fiel für Leukozyten, Granulozyten und Monozyten im BioFlux zu allen Zeitpunkten geringer aus als im Inkubator. Bei den Gesamt-Leukozyten zeigte sich ein signifikanter Haupteffekt¹ der Zeit sowie des Gerätetyps. Der Interaktionseffekt¹ war nicht signifikant (siehe Tabelle 11). Zu den Zeitpunkten 8, 16 und 32 Minuten zeigten sich

¹ Haupteffekte geben den Einfluss einzelner unabhängiger Variablen auf die abhängige Variable wieder, betrachten die Wirkung der unabhängigen Variable also isoliert, d.h. unter Nichtbeachtung von anderen unabhängigen Variablen. Interaktionseffekte geben den kombinierten Einfluss mehrerer unabhängiger Variablen auf die abhängige Variable wieder (Field, 2013).

signifikante Unterschiede zwischen Inkubator und BioFlux (siehe Tabelle 12 und Abb. 9 A). Der Haupteffekt der Zeit und des Gerätetyps war für den Anteil der FITC-positiven Granulozyten ebenfalls signifikant, der Interaktionseffekt wurde nicht signifikant (siehe Tabelle 11). Die Unterschiede zwischen Inkubator und BioFlux wurden zu den Zeitpunkten 8, 16, 32 und 128 Minuten signifikant (siehe Tabelle 12 und Abb. 9 B). Für den Anteil FITC-positiver B-Zellen zeigte sich ein signifikanter Haupteffekt für die Zeit. Der Haupteffekt für den Gerätetyp und der Interaktionseffekt wurden nicht signifikant (siehe Tabelle 11). Zum Zeitpunkt 64 Minuten zeigte sich jedoch ein signifikanter Unterschied für den Anteil FITC-positiver B-Zellen zwischen BioFlux und Inkubator (siehe Tabelle 11 und Abb. 9 D). Sowohl die Haupteffekte für die Zeit und für den Gerätetyp als auch der Interaktionseffekt wurden für die Monozyten signifikant (siehe Tabelle 11). Die Anteile FITC-positiver Monozyten unterschieden sich im Inkubator und BioFlux zum Zeitpunkt 8, 16 und 32 Minuten signifikant voneinander (siehe Tabelle 12 und Abb. 9 C).

Zellpopulation	Quelle der Varianz	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	η^2
Leukozyten	Messzeitpunkt	1.45	3.71	2.56	57.88	.000	.935
	Fehler	5.81	0.26	0.04			
	Gerätetyp	1	0.61	0.61	17.11	.014	.810
	Fehler	4	0.14	0.04			
	Messzeitpunkt \times Gerätetyp	1.72	0.16	0.09	4.52	.060	.530
	Fehler	6.87	0.14	0.02			
Granulozyten	Messzeitpunkt	1.30	3.99	3.07	50.92	.001	.927
	Fehler	5.19	0.31	0.06			
	Gerätetyp	1	0.75	0.75	21.87	.009	.845
	Fehler	4	0.14	0.03			
	Messzeitpunkt \times Gerätetyp	1.77	0.15	0.08	3.84	.078	.489
	Fehler	7.07	0.15	0.02			
Monozyten	Messzeitpunkt	2.07	5.97	2.88	107.84	.000	.964
	Fehler	8.29	0.22	0.03			
	Gerätetyp	1	0.74	0.74	62.09	.001	.939
	Fehler	4	0.05	0.01			
	Messzeitpunkt \times Gerätetyp	1.94	0.42	0.22	12.72	.004	.761
	Fehler	7.77	0.13	0.02			
B-Zellen	Messzeitpunkt	2.13	1.46	0.69	16.39	.001	.804
	Fehler	8.51	0.36	0.04			
	Gerätetyp	1	0.17	0.17	1.11	.352	.217
	Fehler	4	0.61	0.15			
	Messzeitpunkt \times Gerätetyp	2.63	0.38	0.15	2.72	.103	.405
	Fehler	10.50	0.56	0.05			

Tabelle 11: Messwiederholte Varianzanalyse für die Effekte von Zeit und Gerätetyp auf die mittlere Fluoreszenzintensität FITC-positiver Zellen für die verschiedenen Zellpopulationen. FITC = Fluoresceinisothiocyanat, df = Freiheitsgrade, SS = Quadratsumme, MS = mittleres Quadrat. Messzeitpunkt: Verglichen wurden die Zeitpunkte 0, 8, 16, 32, 64 und 128 Minuten. Gerätetyp: Verglichen wurden Inkubator und BioFlux. $n = 5$. Signifikante p -Werte $< .05$ sind grau unterlegt.

Zellpopulation	Zeit (min)	p	größerer Anteil FITC-positiver Zellen im Inkubator
Leukozyten	0	.468	ja
	8	.025	ja
	16	.010	ja
	32	.010	ja
	64	.096	ja
	128	.117	ja
Granulozyten	0	.312	ja
	8	.030	ja
	16	.008	ja
	32	.009	ja
	64	.063	ja
	128	.045	ja
Monozyten	0	.345	nein
	8	.002	ja
	16	.004	ja
	32	.008	ja
	64	.054	ja
	128	.089	ja
B-Zellen	0	.554	ja
	8	.881	ja
	16	.933	ja
	32	.854	nein
	64	.029	nein
	128	.139	nein

Tabelle 12: Analyse der einfachen Effekte zum Anteil FITC-positiver Zellen im Vergleich zwischen BioFlux und Inkubator für die unterschiedlichen Zellpopulationen. $n = 5$, min = Minute, FITC = Fluoresceinisothiocyanat. Signifikante p -Werte $< .05$ sind grau unterlegt.

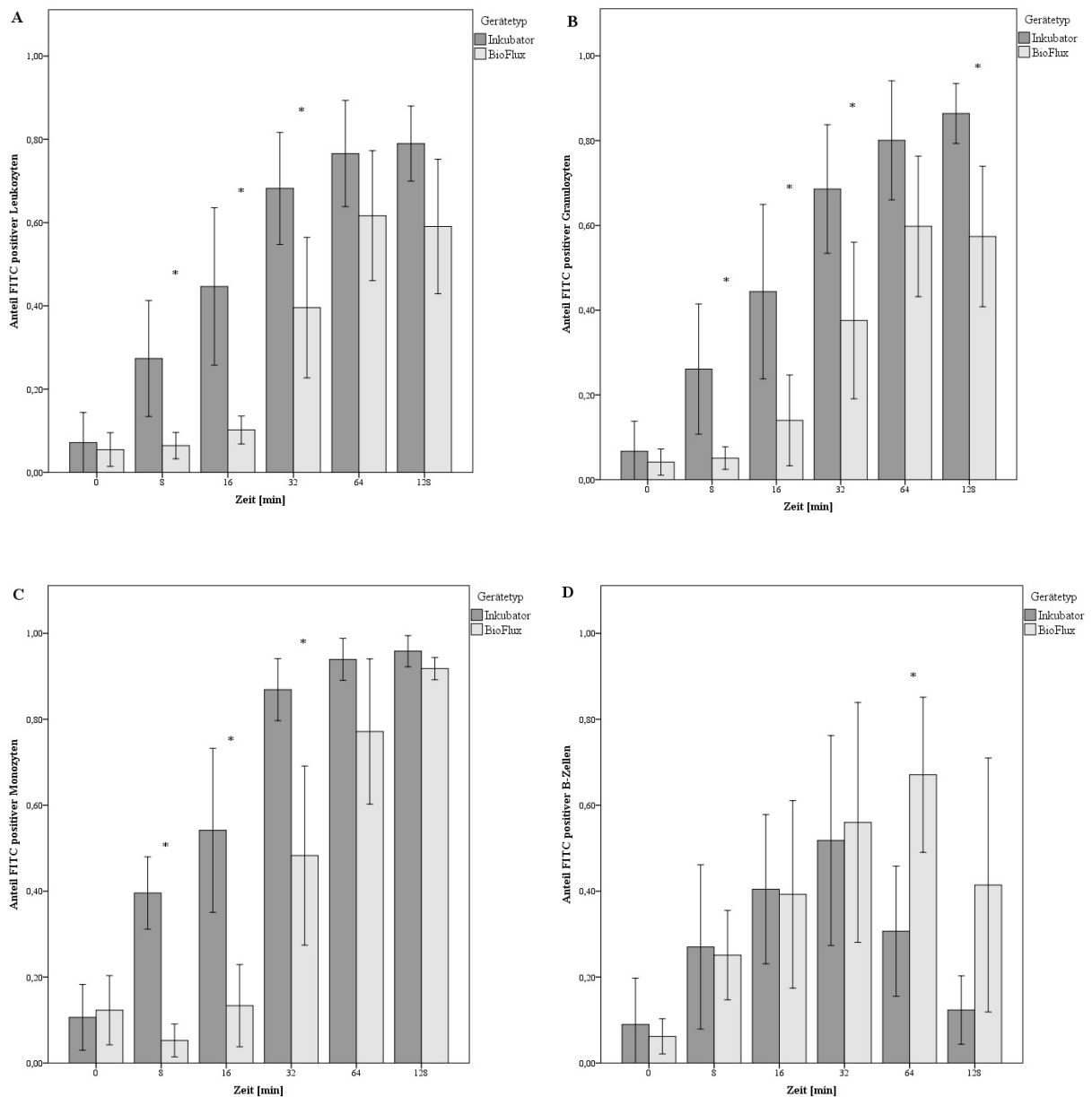


Abb. 9: Mittelwerte der Anteile FITC-positiver Zellen der verschiedenen Zellpopulationen zu unterschiedlichen Zeitpunkten im BioFlux und Inkubator. Anteil FITC-positiver Leukozyten (A), Anteil FITC-positiver Granulozyten (B), Anteil FITC-positiver Monozyten (C), Anteil FITC-positiver B-Zellen (D). Angegeben sind die Mittelwerte \pm eine Standardabweichungen, $n = 5$, $*p < .05$. FITC = Fluoresceinisothiocyanat, min = Minuten.

Die MFI der Monozyten stiegen mit der Zeit an, während sie für die Granulozyten und B-Zellen relativ konstant blieben (siehe Abb. 10). Signifikante Unterschiede zwischen Inkubator und BioFlux zeigten sich hier nur bei den Monozyten und B-Zellen. Für die MFI der Monozyten zeigten sich sowohl signifikante Haupteffekte, $F(1.86, 7.43) = 45.86, p < .001, \eta^2 = .920$ für die Zeit und $F(1, 4) = 13.72, p = .021, \eta^2 = .774$ für den Gerätetyp, als auch ein signifikanter Interaktionseffekt $F(2.07, 8.29) = 16.65, p = .001, \eta^2 = .806$. Die MFI der Monozyten war in den Versuchen mit BioFlux zu den Zeitpunkten 64 und 128 Minuten signifikant geringer als für Monozyten in Versuchen auf einem Rollenmischer im Inkubator (siehe Tabelle 13 und Abb.

10 C). Bei den B-Zellen zeigte sich ein signifikanter Haupteffekt für den Gerätetyp, $F(1, 4) = 22.25$, $p = .009$, $\eta^2 = .848$ und ein signifikanter Haupteffekt für den Messzeitpunkt, $F(2.18, 8.74) = 4.45$, $p = .042$, $\eta^2 = .532$. Die Analyse der einfachen Effekte ergab jedoch keine signifikanten Unterschiede der MFI der B-Zellen im BioFlux und Inkubator zu den einzelnen Zeitpunkten. Für die MFI der Leukozyten und Granulozyten zeigten sich weder signifikante Haupteffekte noch signifikante Interaktionseffekte (siehe Abb. 10 A, B und D und Tabelle 14).

Zellpopulation	Zeit (min)	<i>p</i>
Monozyten	0	.235
	8	.272
	16	.539
	32	.171
	64	.021
	128	.009

Tabelle 13: Analyse der einfachen Effekte zur mittleren Fluoreszenzintensität der Monozyten im Vergleich zwischen BioFlux und Inkubator. $n = 5$, min = Minute. Signifikante *p*-Werte < .05 sind grau unterlegt.

Zellpopulation	Quelle der Varianz	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	η^2
Leukozyten	Messzeitpunkt	1.66	2.94	1.77	1.65	.258	.292
	Fehler	6.65	7.13	1.07			
	Gerätetyp	1	0.03	0.03	0.20	.677	.048
	Fehler	4	0.53	0.13			
	Messzeitpunkt × Gerätetyp	2.37	2.89	1.22	1.16	.364	.224
	Fehler	9.47	9.97	1.05			
Granulozyten	Messzeitpunkt	1.91	1.18	0.62	1.38	.307	.256
	Fehler	7.63	3.43	0.45			
	Gerätetyp	1	1.01	1.01	3.04	.156	.431
	Fehler	4	1.33	0.33			
	Messzeitpunkt × Gerätetyp	1.93	0.73	0.38	0.55	.592	.121
	Fehler	7.72	5.35	0.69			
Monozyten	Messzeitpunkt	1.86	81.65	43.98	45.86	.000	.920
	Fehler	7.43	7.12	0.96			
	Gerätetyp	1	27.60	27.60	13.72	.021	.774
	Fehler	4	8.05	2.01			
	Messzeitpunkt × Gerätetyp	2.07	33.00	15.92	16.65	.001	.806
	Fehler	8.29	7.93	0.96			
B-Zellen	Messzeitpunkt	2.18	105.3	48.23	4.54	.042	.532
	Fehler	8.74	92.82	10.63			
	Gerätetyp	1	34.58	34.58	22.25	.009	.848
	Fehler	4	6.22	1.55			
	Messzeitpunkt × Gerätetyp	2.26	64.21	28.46	1.26	.334	.240
	Fehler	8.49	131.97	15.55			

Tabelle 14: Messwiederholte Varianzanalyse für die Effekte von Zeit und Gerätetyp auf die mittlere Fluoreszenzintensität FITC-positiver Zellen für die verschiedenen Zellpopulationen. FITC = Fluoresceinisothiocyanat, df = Freiheitsgrade, SS = Quadratsumme, MS = mittleres Quadrat. Messzeitpunkt: Verglichen wurden die Zeitpunkte 0, 8, 16, 32, 64 und 128 Minuten. Gerätetyp: Verglichen wurden Inkubator und BioFlux. $n = 5$. Signifikante p -Werte $< .05$ sind grau unterlegt.

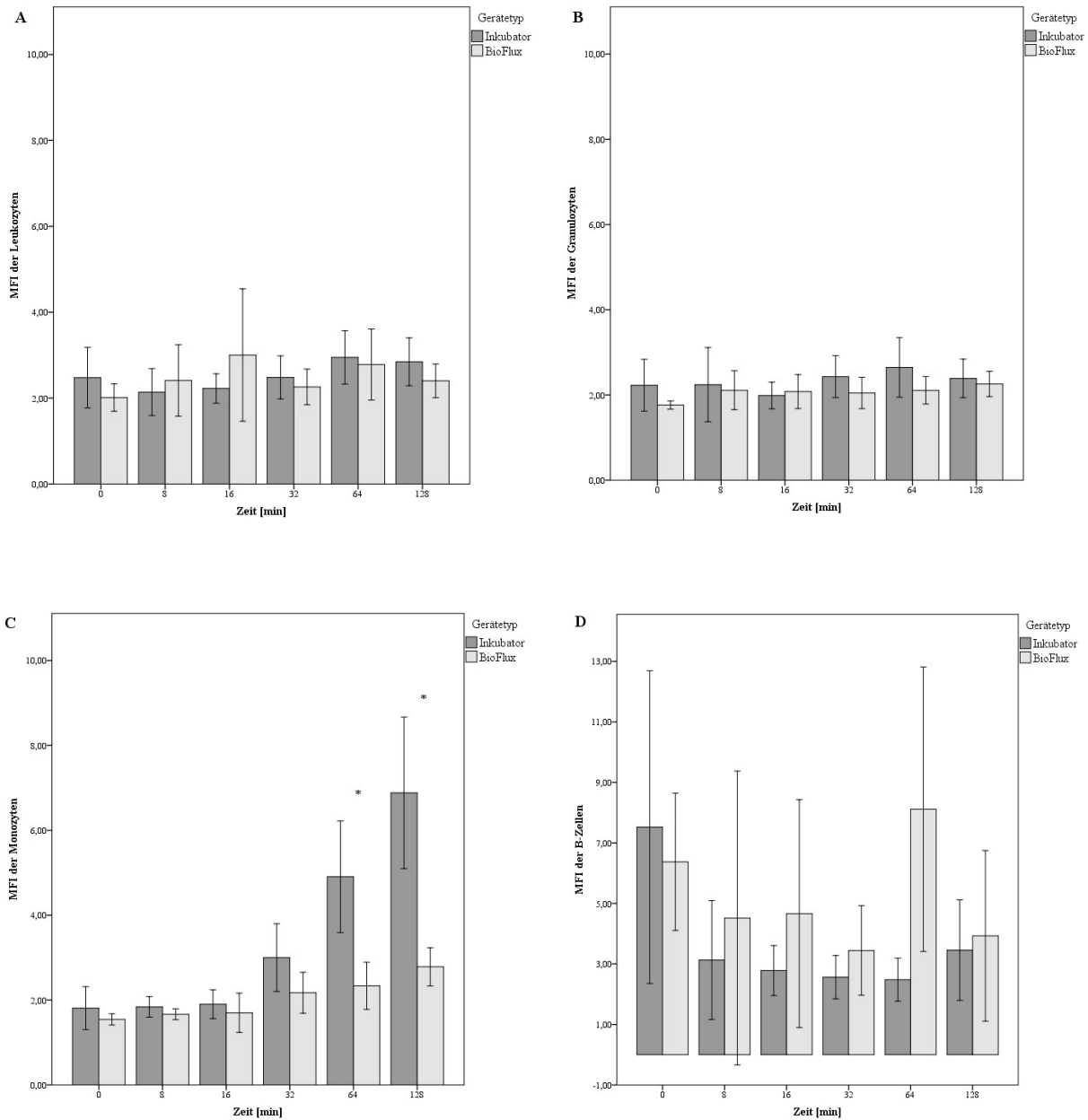


Abb. 10: Mittlere Fluoreszenzintensitäten aus den verschiedenen Zellpopulationen zu unterschiedlichen Zeitpunkten im BioFlux und Inkubator. MFI der Leukozyten (A), MFI der Granulozyten (B), MFI der Monozyten (C), MFI der B-Zellen (D). MFI = mittlere Fluoreszenzintensität, min = Minute. Es handelt sich um Mittelwerte \pm eine Standardabweichung, $n = 5$, $*p < .05$.

3.2 Phagozytose von Zymosan A nach PFOB Koinkubation bei gesunden Probandinnen und Probanden

3.2.1 Vorversuche

Um die weitere Phagozytosefähigkeit von Monozyten nach Aufnahme der PFOB-NE zu bestimmen, sollte zunächst in Vorversuchen die Konzentration des Zymosan A für die Inkubation mit humanen Monozyten bestimmt werden. Das Vorgehen ist in Abschnitt 2.7.3 beschrieben. Abbildung 11 zeigt die prozentualen Anteile sowie die MFI der Monozyten bei verschiedenen Konzentrationen des Zymosan A zu verschiedenen Zeitpunkten. Bei hohen Konzentrationen erreichten die prozentualen Anteile und die MFI bereits nach wenigen Minuten Werte über 60 % beziehungsweise 20 und stiegen nur geringfügig an. Dahingegen nahm der prozentuale Anteil bei geringen Konzentrationen einen annähernd sigmoidalen Verlauf an. Die prozentualen Anteile FITC-positiver Monozyten fielen bei einer Konzentration von 1:1000 am geringsten und bei einer Konzentration von 1:40 am höchsten aus. Die MFI für eine Konzentration von 1:40 fielen am höchsten aus. Die prozentualen Anteile und die MFI für eine Konzentration von 1:100 befanden sich dazwischen (siehe Abb. 11). Da bei Verwendung von hohen Konzentrationen bereits früh höhere Werte erreicht wurden, die im Zeitverlauf nur geringfügig anstiegen und der prozentuale Anteil FITC-positiver Zellen bei einer Konzentration von 1:1000 zu gering ausfiel, wurden in nachfolgenden Versuchen Konzentrationen von 1:100 verwendet.

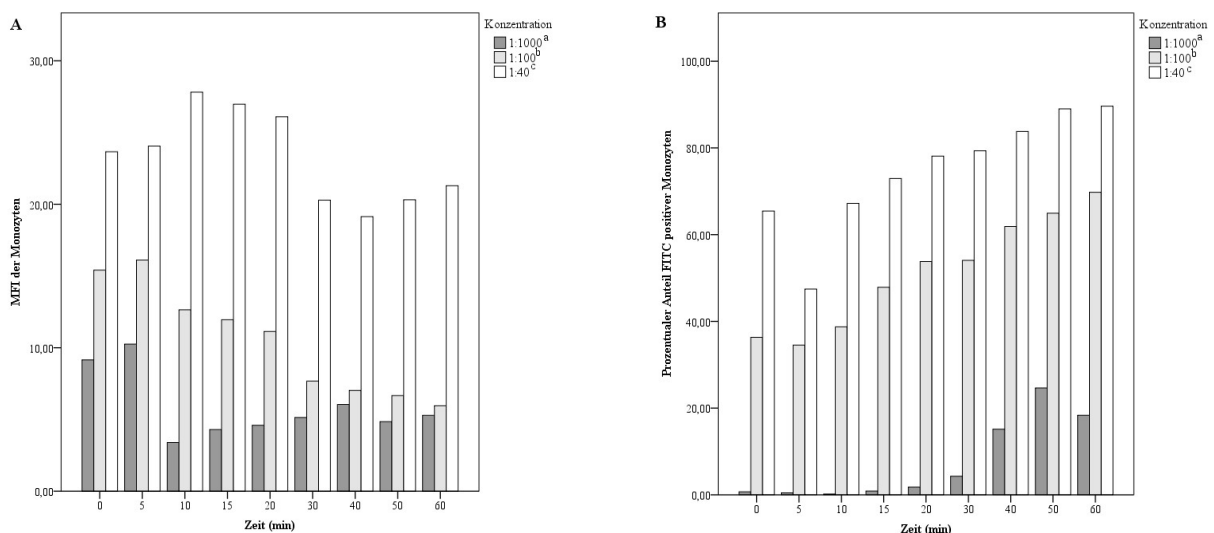


Abb. 11: Prozentualer Anteil und mittlere Fluoreszenzintensität FITC-positiver Monozyten in Abhängigkeit von der Zymosankonzentration. Prozentualer Anteil FITC-positiver Monozyten (A), mittlere Fluoreszenzintensität der Monozyten (B), FITC = Fluoresceinisothiocyanat, min = Minuten, MFI = mittlere Fluoreszenzintensität, ^{a,c}n = 2, ^bn = 3.

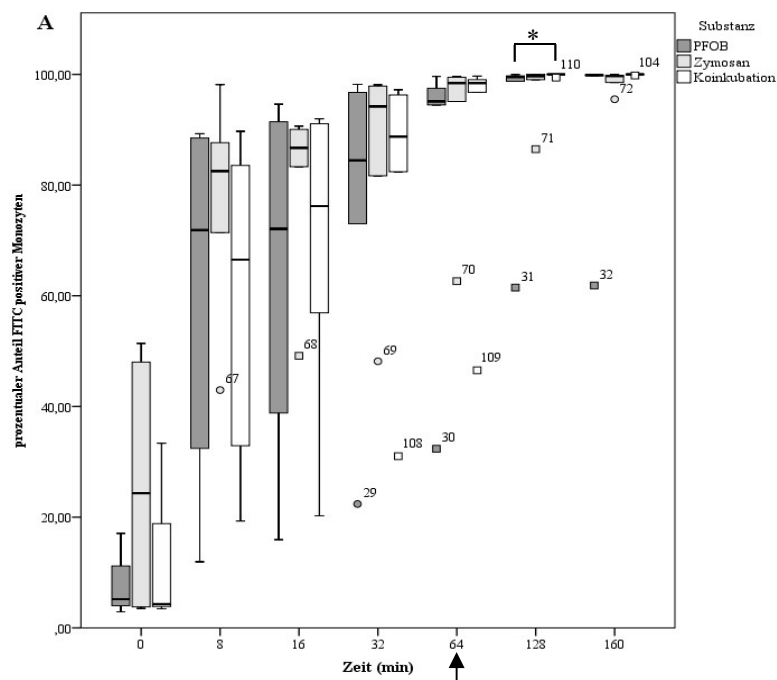
3.2.2 Vergleich der Phagozytose von Zymosan A und PFOB-NE im Zeitverlauf

Um zu zeigen, dass humane Monozyten nach Aufnahme der PFOB-NE weiterhin in der Lage sind zu phagozytieren, wurden Vollblutproben gesunder Probandinnen und Probanden nach Aufnahme von PFOB-NE zusätzlich mit Zymosan A inkubiert wie in Kapitel 2.7.6 beschrieben. Die erste Probe enthielt die PFOB-NE, die zweite Zymosan A und die dritte PFOB-NE und nach 64 Minuten zusätzlich Zymosan A (Nienhaus et al., 2019, siehe Abschnitt 2.7.3). Um die prozentualen Anteile und die Mediane der MFI der jeweiligen Zellpopulationen nach Inkubation mit den unterschiedlichen Substanzen zu vergleichen wurde ein Friedman-Test zu den einzelnen Zeitpunkten durchgeführt. Bei einem signifikanten Ergebnis wurde ein paarweiser Vergleich durchgeführt.

Wie Abbildung 12 zeigt, nahm der prozentuale Anteil FITC-positiver Zellen nach Phagozytose der verschiedenen Substanzen stetig zu. Nahezu 100 % der unterschiedlichen Zellpopulationen waren nach 160 Minuten FITC-positiv. Bei den Gesamtmonozyten zeigte sich im paarweisen Vergleich ein signifikanter Unterschied zum Zeitpunkt 128 Minuten zwischen der Inkubation mit PFOB-NE ($Mdn = 99.53\%$) und der Inkubation mit beiden Substanzen ($Mdn = 100.00\%$), $z = -2.60$, $p = .028$, $r = -.75$ (siehe auch Tabelle 15 und Abb. 12 A). Für die $CD14^+CD16^-$ -Monozyten ergaben sich signifikante Unterschiede im prozentualen Anteil FITC-positiver Zellen zu den Zeitpunkten 0, 8, 128 und 160 Minuten (siehe Tabelle 15). Zum Zeitpunkt 0 Minuten ergab der paarweise Vergleich einen signifikanten Unterschied zwischen der Inkubation mit Zymosan A und der Koinkubation, $z = 2.89$, $p = .012$, $r = .83$, für den Zeitpunkt 128 Minuten zwischen PFOB-NE und Zymosan A, $z = -2.89$, $p = .012$, $r = -.83$, und für den Zeitpunkt 160 Minuten zwischen PFOB und Zymosan A sowie zwischen PFOB und der Koinkubation, $z = -2.60$, $p = .028$, $r = -.75$. Zum Zeitpunkt 8 Minuten zeigten die paarweisen Vergleiche keine signifikanten Unterschiede (siehe Abb. 12 B). Für die $CD14^+CD16^+$ -Monozyten zeigte sich ein ähnliches Bild. Der paarweise Vergleich wurde zum Zeitpunkt 0 Minuten zwischen Zymosan A und Koinkubation signifikant, $z = -2.89$, $p = .012$, $r = -.83$, zum Zeitpunkt 128 Minuten zwischen PFOB und Zymosan A, $z = 2.89$, $p = .012$, $r = .83$ und zum Zeitpunkt 160 Minuten zwischen PFOB und Zymosan A sowie zwischen PFOB und Koinkubation, jeweils $z = 2.60$, $p = .028$, $r = .75$. Zum Zeitpunkt 8 Minuten zeigten sich ebenfalls keine spezifischen signifikanten Unterschiede (siehe Abb. 12 C und Tabelle 15).

Zellpopulation	Zeit (min)	Prozentualer Anteil FITC-positiver Zellen (<i>Mdn</i>)			χ^2	<i>p</i>
		PFOB	Zymosan A	Koinkubation		
Gesamtmonozyten	0	5.20	24.33	4.30	4.33	.115
	8	71.87	82.52	66.53	2.33	.311
	16	72.08	86.71	76.20	0.33	.846
	32	84.47	94.20	88.74	2.33	.311
	64	95.11	98.43	98.43	4.33	.115
	128	99.53	99.68	100.00	7.64	.022
	160	99.85	99.70	100.00	4.26	.119
CD14 ⁺ CD16 ⁻ Monozyten	0	2.87	24.06	2.75	8.33	.016
	8	61.04	82.61	58.22	6.33	.042
	16	64.12	88.22	66.78	3.00	.223
	32	75.58	95.18	81.48	4.33	.115
	64	91.83	98.53	97.72	4.33	.115
	128	99.32	99.90	100.00	9.33	.009
	160	99.77	99.64	100.00	9.00	.011
CD14 ⁺ CD16 ⁺ Monozyten	0	9.18	25.90	6.68	8.33	.016
	8	77.14	81.44	72.34	6.33	.042
	16	79.74	76.76	81.75	3.00	.223
	32	88.44	89.29	92.11	4.33	.115
	64	97.67	96.78	98.70	4.33	.115
	128	99.67	99.19	100.00	9.33	.009
	160	99.95	99.49	100.00	9.00	.011

Tabelle 15: Friedmann-Test für den prozentualen Anteil FITC-positiver Monozytenpopulationen in Abhängigkeit von der Substanz zu verschiedenen Zeitpunkten. Min = Minute, FITC = Fluoresceinisothiocyanat, *Mdn* = Median, CD = cluster of differentiation, *df* = 2, *N* = 6. Signifikante *p*-Werte sind grau unterlegt.



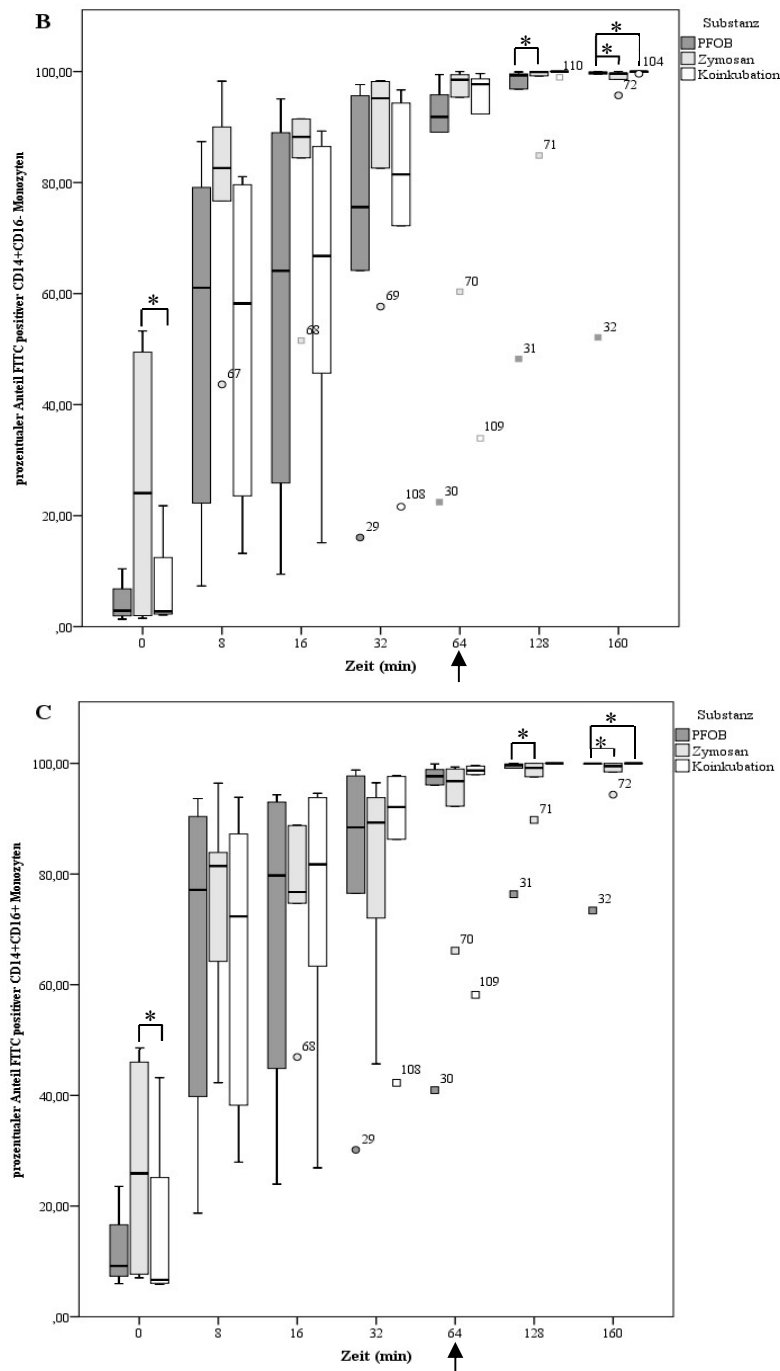


Abb. 12: Prozentualer Anteil FITC-positiver Monozytenpopulationen in Abhängigkeit von der Substanz und der Zeit. Prozentualer Anteil FITC-positiver Gesamtmonozyten (A), prozentualer Anteil FITC-positiver CD14⁺CD16⁻-Monozyten (B), prozentualer Anteil FITC-positiver CD14⁺CD16⁺-Monozyten (C). Der Pfeil gibt den Zeitpunkt an, an dem Zymosan A zur Probe 3 hinzugeben wurde. PFOB = Perfluorocetyl bromid, FITC = Fluoresceinisothiocyanat, min = Minuten, CD = cluster of differentiation. Die Daten sind als Boxplot mit dem Median und dem 25.-75. Perzentil (Box) sowie 5.-95. Perzentil (Whisker) dargestellt. Bei den Kreisen handelt es sich um Ausreißer, bei den Quadraten um Extremwerte. $N = 6$, $*p < .05$.

Für die Koinkubation (Probe 3) stieg der Median der MFI der Gesamtmonozyten zwischen Zeitpunkt 64 und 128 Minuten von $Mdn = 12.46$ auf $Mdn = 685.43$ an und erreichte 64 Minuten nach Zugabe des Zymosans zu Probe 3 ähnliche Werte wie in Probe 2 nach 64 Minuten Inkubation mit Zymosan A allein, $Mdn = 641.26$. Der Median der MFI unterschied sich bis auf

den Zeitpunkt 0 Minuten zu allen Zeitpunkten signifikant zwischen den Proben (siehe Tabelle 16). Probe 1 (PFOB-NE allein) und Probe 3 (Koinkubation) unterschieden sich zu keinem Zeitpunkt signifikant voneinander. Der paarweise Vergleich zwischen PFOB-NE und Zymosan A (Probe 2) wurde bis auf Zeitpunkt 8 Minuten zu allen Zeitpunkten signifikant. Ab Minute 64 zeigten paarweise Vergleiche keine signifikanten Unterschiede zwischen Zymosan A allein und der Koinkubation (Nienhaus et al., 2019). Lediglich vor Zugabe von Zymosan A zu Probe 3 zeigten sich signifikante Unterschiede zum Zeitpunkt 8 und 32 Minuten (siehe Tabelle 17 und Abb. 13 A).

Bei den CD14⁺CD16⁻-Monozyten stieg der Median der MFI der Zellen zwischen Zeitpunkt 64 und 128 Minuten für Probe 3 von *Mdn* = 11.46 auf *Mdn* = 678.43 an und erreichte 64 Minuten nach Zugabe des Zymosans (Minute 128) ähnliche Werte wie in Probe 2, 64 Minuten nach Inkubation mit Zymosan A allein, *Mdn* = 648.58 (siehe Tabelle 16). Für die Mediane der MFI der verschiedenen Proben zeigte sich ein globaler signifikanter Unterschied zu allen Zeitpunkten bis auf Minute 0. Paarweise Vergleiche zeigten zu allen Zeitpunkten einen signifikanten Unterschied zwischen Probe 1 und Probe 2 sowie signifikante Unterschiede zwischen Probe 2 und Probe 3 zu den Zeitpunkten 8 und 32 Minuten. Nach Zugabe von Zymosan A zur dritten Probe bestanden keine weiteren signifikanten Unterschiede zur alleinigen Phagozytose von Zymosan A. Der paarweise Vergleich für die Koinkubation und PFOB fiel für alle Zeitpunkte nicht signifikant aus (siehe Tabelle 17 und Abb. 13 B).

Ein ähnliches Bild wie für die Gesamtmonozyten und die CD14⁺CD16⁻-Monozyten zeigte sich bei den CD14⁺CD16⁺-Monozyten. Der Median der MFI stieg im Falle der Koinkubation zwischen Minute 64 und 128 von *Mdn* = 12.82 auf *Mdn* = 743.70 und überstieg die MFI zum Zeitpunkt 128 Minuten nach alleiniger Zymosaninkubation, *Mdn* = 550.78. Es zeigte sich ein globaler signifikanter Unterschied zwischen den Proben eins bis drei zu allen Zeitpunkten bis auf Minute 64 (siehe Tabelle 16). Paarweise Vergleiche ergaben signifikante Unterschiede zwischen PFOB und Zymosan A zu allen Zeitpunkten bis auf Minute 8. Zwischen PFOB und Koinkubation zeigten sich zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede. Der paarweise Vergleich zwischen Zymosan A und Koinkubation fiel zu den Zeitpunkten 8, 16 und 32 Minuten signifikant aus, jedoch nicht mehr ab Minute 64, nach Zugabe von Zymosan A (siehe Tabelle 17 und Abb. 13 C).

Zellpopulation	Zeit (min)	MFI (<i>Mdn</i>)			χ^2	<i>p</i>
		PFOB	Zymosan A	Koinkubation		
Gesamtmonozyten	0	1.18	137.00	1.10	2.33	.311
	8	4.81	438.00	3.35	9.33	.009
	16	4.99	500.43	5.86	9.33	.009

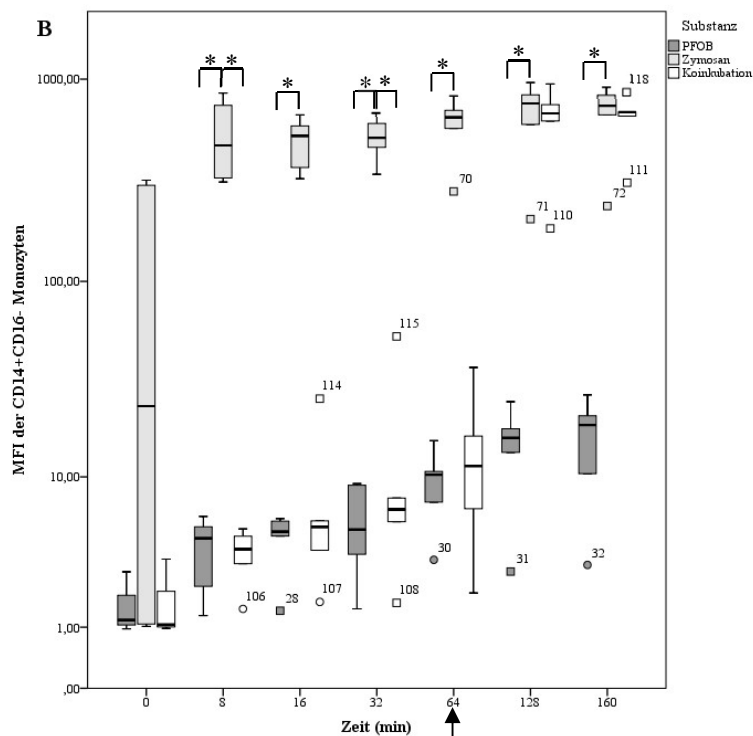
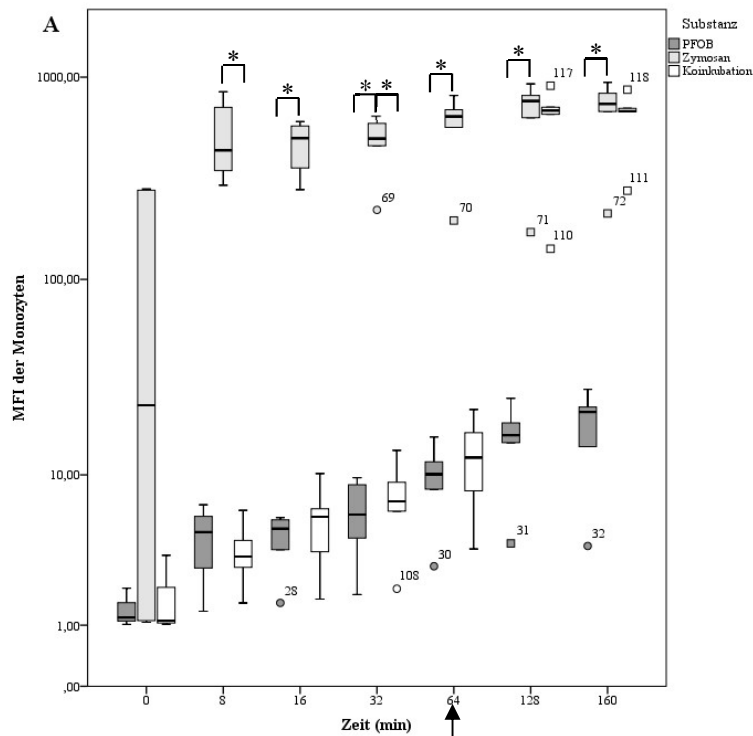
Zellpopulation	Zeit (min)	MFI (Mdn)			χ^2	p
		PFOB	Zymosan A	Koinkubation		
	32	6.11	497.84	7.17	9.00	.011
	64	10.07	641.26	12.46	10.33	.006
	128	16.30	763.81	685.43	10.33	.006
	160	21.45	738.72	679.47	9.33	.009
CD14 ⁺ CD16 ⁻ -Monozyten	0	1.17	141.63	1.06	2.33	.310
	8	4.48	472.15	3.88	9.00	.011
	16	4.92	524.84	5.24	9.33	.009
	32	5.24	513.75	6.66	9.00	.011
	64	10.26	648.58	11.46	9.33	.009
	128	16.17	760.39	678.43	10.33	.006
	160	18.81	740.75	687.32	9.33	.009
CD14 ⁺ CD16 ⁺ -Monozyten	0	1.20	112.76	1.17	7.00	.030
	8	4.69	472.26	3.47	9.33	.009
	16	5.07	383.38	4.85	9.00	.011
	32	6.54	413.50	6.95	9.00	.011
	64	9.82	550.78	12.82	10.33	.006
	128	18.16	789.25	743.70	10.33	.006
	160	23.19	784.81	750.78	9.33	.009

Tabelle 16: Friedmann-Test für die mittleren Fluoreszenzintensitäten FITC-positiver Monozytenpopulationen in Abhängigkeit von der Substanz. min = Minute, MFI = mittlere Fluoreszenzintensität, Mdn = Median, CD = cluster of differentiation, $df = 2$, $N = 6$. Signifikante p -Werte $< .05$ sind grau unterlegt.

Zellpopulation	Zeit (min)	Standardteststatistik (korrigierte Signifikanz, Effektstärke r)		
		PFOB-Zymosan A	Zymosan A-Koinkubation	Koinkubation-PFOB
Gesamtmonozyten	0	-	-	-
	8	-2.31 (.063, -0.67)	2.89 (.012, 0.83)	0.56 (1.0, 0.17)
	16	-2.89 (.012, -0.83)	2.31 (.063, 0.67)	-0.58 (1.0, -0.17)
	32	-2.60 (.028, -0.75)	2.60 (.028, 0.75)	0.00 (1.0, 0.00)
	64	-3.18 (.004, -0.92)	2.02 (.130, 0.58)	-1.16 (.745, -0.33)
	128	-3.18 (.004, -0.92)	1.16 (.745, 0.33)	-2.02 (.130, -0.58)
	160	-2.89 (.012, -0.83)	0.58 (1.0, -0.67)	-2.31 (.063, 0.17)
CD14 ⁺ CD16 ⁻ -Monozyten	0	-	-	-
	8	-2.60 (.028, -0.75)	2.60 (.028, 0.75)	0.00 (1.0, 0.00)
	16	-2.89 (.012, -0.83)	2.31 (.063, 0.67)	-0.58 (1.0, -0.17)
	32	-2.60 (.028, -0.75)	2.60 (.028, 0.75)	0.00 (1.0, 0.00)
	64	-2.89 (.012, -0.83)	2.31 (.063, 0.67)	-0.58 (1.0, -0.17)
	128	-3.18 (.004, -0.92)	1.16 (.745, 0.33)	-2.02 (.130, -0.58)
	160	-2.89 (.012, 0.75)	0.58 (1.0, 0.00)	-2.31 (.063, 0.75)
CD14 ⁺ CD16 ⁺ -Monozyten	0	-2.60 (.028, -0.75)	1.73 (.250, 0.50)	-0.87 (1.0, -0.25)
	8	-2.31 (.063, -0.67)	2.89 (.012, 0.83)	0.58 (1.0, 0.17)
	16	-2.60 (.028, -0.75)	2.60 (.028, 0.75)	0.00 (1.0, 0.00)
	32	-2.60 (.028, -0.75)	2.60 (.028, 0.75)	0.00 (1.0, 0.00)

Zellpopulation	Zeit (min)	Standardteststatistik (korrigierte Signifikanz, Effektstärke r)		
		PFOB-Zymosan A	Zymosan A-Koinkubation	Koinkubation-PFOB
CD14 ⁺ CD16 ⁺ - Monozyten	64	-3.18 (.004, -0.92)	2.02 (.130, 0.58)	-1.16 (.745, -0.33)
	128	-3.18 (.004, -0.92)	1.16 (.745, 0.33)	-2.02 (.130, -0.58)
	160	-2.89 (.012, -0.83)	0.58 (1.0, 0.17)	-2.31 (.063, -0.67)

Tabelle 17: Paarweise Vergleiche der Mediane der mittleren Fluoreszenzintensitäten für die verschiedenen Zellpopulationen in Abhängigkeit von der Substanz zu verschiedenen Zeitpunkten. min = Minute, CD = cluster of differentiation, N = 6. Signifikante p-Werte < .05 sind grau unterlegt.



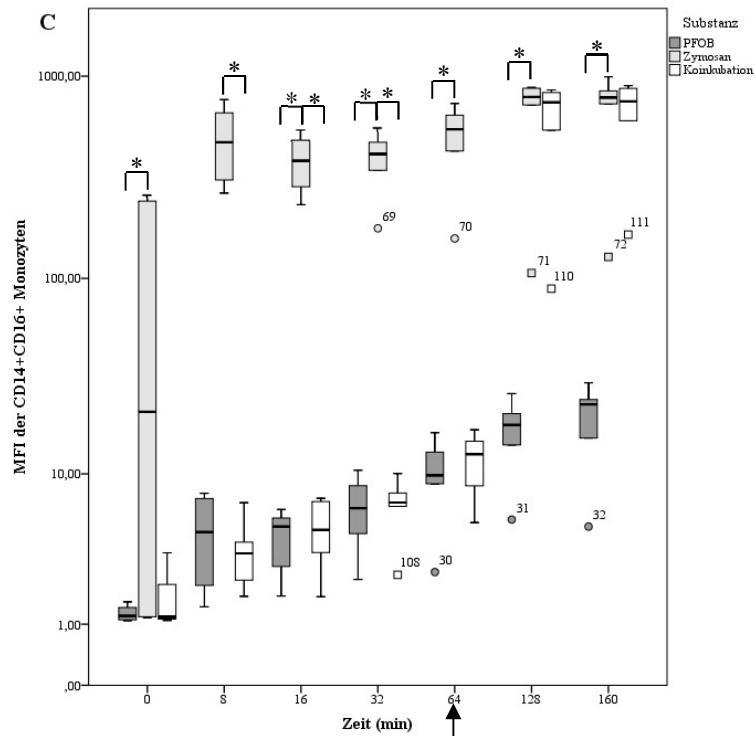


Abb. 13: Mediane der mittleren Fluoreszenzintensitäten der Monozytensubpopulationen in Abhängigkeit von der Substanz zu verschiedenen Zeitpunkten. Mediane Fluoreszenzintensität der Gesamtmonozyten (A), mediane Fluoreszenzintensität der CD14⁺CD16⁻-Monozyten (B), mediane Fluoreszenzintensität FITC der CD14⁺CD16⁺-Monozyten (C). Der Pfeil gibt den Zeitpunkt an, an dem Zymosan A zur Probe 3 hinzugegeben wurde. PFOB = Perfluorocetyl bromid, FITC = Fluoresceinisothiocyanat, MFI = mediane Fluoreszenzintensität, min = Minuten, CD = *cluster of differentiation*. Die Daten sind als Boxplot mit dem Median und dem 25.-75. Perzentil (Box) sowie dem 5.-95. Perzentil (*Whisker*) dargestellt. Bei den Kreisen handelt es sich um Ausreißer, bei den Quadraten um Extremwerte. Die Ordinaten sind logarithmisch skaliert. $N = 6$, $*p < .05$.

Für die jeweiligen Monozytensubpopulationen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den Medianen der MFI zwischen Probe 2 zum Zeitpunkt 64 Minuten (Zymosan A) und Probe 3 (Koinkubation) zum Zeitpunkt 128 Minuten (64 Minuten nach der Phagozytose von Zymosan A), $z = 0.73$, $p = .463$ für CD14⁺CD16⁻-Monozyten und $z = 1.57$, $p = .116$ für CD14⁺CD16⁺-Monozyten.

3.2.3 Vergleich der Monozytensubpopulationen nach Koinkubation

Der prozentuale Anteil der CD14⁺CD16⁻-Monozyten ($Mdn = 76.89$) unterschied sich nach 160 Minuten nicht signifikant vom prozentualen Anteil der CD14⁺CD16⁺-Monozyten ($Mdn = 23.11$), $z = -2.20$, $p = .028$ (siehe Abb. 14). Der Unterschied zwischen dem prozentualen Anteil der CD14⁺CD16⁻-Monozyten ($Mdn = 55.20$) und dem der CD14⁺CD16⁺-Monozyten ($Mdn = 44.80$) zum Zeitpunkt 0 Minuten war ebenfalls nicht signifikant $z = -1.16$, $p = .248$. Der prozentuale Anteil der CD14⁺CD16⁻-Monozyten und der CD14⁺CD16⁺-Monozyten unterschied sich zwischen den Zeitpunkten 0 und 160 Minuten nicht signifikant, $z = -1.16$, $p = .248$ (siehe Abb. 14). Das Signifikanzniveau lag nach Bonferroni-Korrektur bei $\alpha = .0125$.

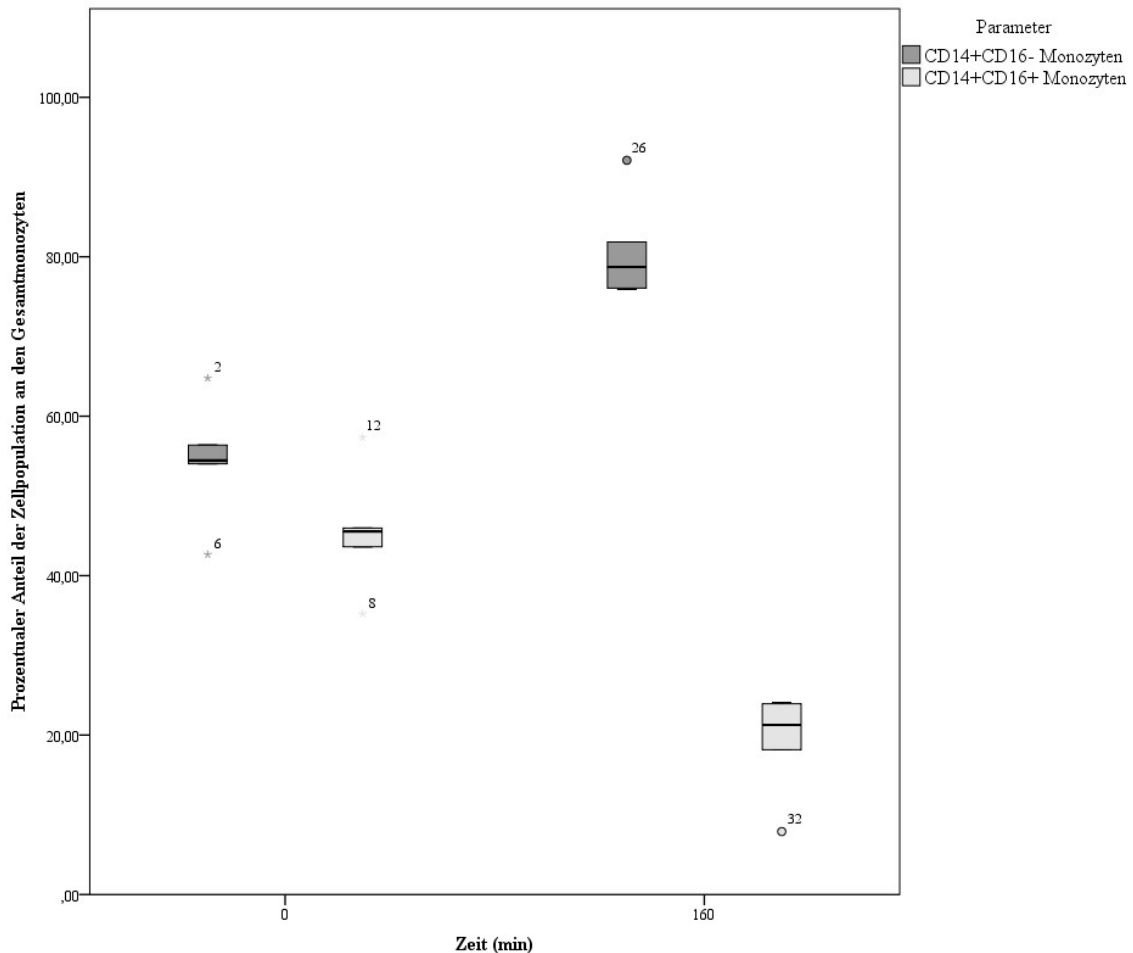


Abb. 14: Prozentualer Anteil der CD14⁺CD16⁻- und CD14⁺CD16⁺-Monozyten an den Gesamtmonozyten für Probe 3 (Koinkubation von PFOB-NE und Zymosan A) zum Zeitpunkt 0 und 160 Minuten. CD = *cluster of differentiation*, min = Minuten. Die Daten sind als Boxplot mit dem Median und dem 25.-75. Perzentil (Box) sowie dem 5.-95. Perzentil (Whisker) dargestellt. Bei den Kreisen handelt es sich um Ausreißer, bei den Sternen um Extremwerte. $N = 6$, $*p < .05$.

3.3 Phagozytose der PFOB-NE bei Patientinnen und Patienten mit STEMI und KHK

3.3.1 Grundcharakteristika der Studienteilnehmerinnen und Studienteilnehmer

Für den Vergleich der Phagozytose von PFOB-NE zwischen Patientinnen und Patienten mit KHK und STEMI wurden pro Gruppe acht Patientinnen und Patienten eingeschlossen, davon jeweils zwei Frauen und sechs Männer. Tabelle 18 zeigt, dass sich die beiden Gruppen bezüglich des Alters, der Geschlechterverteilung, des Blutdrucks, des Raucherstatus nicht signifikant unterschieden. Bezüglich der Therapie, der Medikation mit Prasugrel, Ticagrelor bzw. Clopidogrel und der Anzahl der Leukozyten unterschieden sie sich signifikant.

Charakteristik	STEMI	KHK	<i>p</i>
Alter (Jahre)	66.75 ± 7.73	67.25 ± 9.13	.914
Geschlecht, <i>n</i>			
männlich	6	6	1
weiblich	2	2	
Größe (cm)	174.13 ± 7.64	170.40 ± 6.34 (<i>n</i> = 5)	.420
Gewicht (kg)	79.63 ± 10.59	84.40 ± 12.04 (<i>n</i> = 5)	.505
BMI (kg/cm ²)	26.24 ± 2.95	29.09 ± 3.93 (<i>n</i> = 5)	.198
Systolischer Druck (mmHg)	135.38 ± 31.83	155.43 ± 26.02 (<i>n</i> = 7)	.239
diastolischer Druck (mmHg)	80.38 ± 18.80	76.00 ± 11.16 (<i>n</i> = 7)	.625
<u>kardiovaskuläre Risikofaktoren, <i>n</i> (%)</u>			
arterielle Hypertension	6 (75)	8 (100)	.467
Hyperlipoproteinämie	5 (63)	2 (25)	.315
Diabetes mellitus	0 (0)	2 (25)	.467
Nikotinabusus	2 (25)	1 (13)	1
pos. Familienanamnese	2 (25)	4 (50)	.282
<u>weitere Erkrankungen, <i>n</i> (%)</u>			
Herzinsuffizienz	4 (50)	1 (13)	.282
Vorhofflimmern	1 (13)	1 (13)	1
Onk. Erkrankungen	1 (13)	0 (0)	1
Niereninsuffizienz	0 (0)	1 (13)	1
<u>Erkrankte Gefäße, <i>n</i> (%)</u>			
LAD	4 (50)	3 (38)	.619
RCX	1 (13)	4 (50)	.282
RCA	5 (63)	6 (75)	1
LCA	0 (0)	1 (13)	1
<u>Therapie, <i>n</i> (%)</u>			
Stent Implantation	8 (100)	1 (13)	.001
Thrombektomie	2 (25)	0 (0)	.467

Charakteristik	STEMI	KHK	<i>p</i>
<u>Medikation, <i>n</i> (%)</u>			
β-Blocker	7 (88)	5 (63)	.200
ACE-Hemmer	4 (50)	5 (63)	1
AT ₁ -Rezeptor-Antagonist	3 (38)	5 (63)	.608
ASS	7 (88)	5 (63)	.200
Clopidogrel/Prasugrel/Ticagrelor	7 (88)	2 (25)	.007
Statine	7 (88)	7 (88)	1
Aldosteron-Antagonist	1 (13)	0 (0)	.467
Diuretikum	3 (38)	2 (25)	.608
<u>Laborparameter, <i>M</i> ± <i>SD</i></u>			
Leukozyten x1000/μl	14.23 ± 6.44	6.90 ± 1.40 (<i>n</i> = 5)	.020
Troponin (max.) ng/l	3779.86 ± 3813.46 (<i>n</i> = 7)	-	
CK (max.) U/l	2416.63 ± 4254.18	-	
CK-MB (max.) U/l	75.75 ± 33.71 (<i>n</i> = 4)	-	
CRP mg/dl	4.01 ± 3.89	-	

Tabelle 18: Grundcharakteristika der Studienteilnehmer. Die Daten sind als Mittelwerte ± Standardabweichung oder die Anzahl der Patientinnen und Patienten (Prozentzahlen) dargestellt. Wenn nicht anders angegeben ist die Anzahl der Patientinnen und Patienten pro Gruppe *n* = 8. STEMI = ST-Strecken-Hebungsinfarkt, KHK = koronare Herzkrankheit, BMI = *body mass index*, LAD = *left ateria descending*, RCX = *Ramus circumflexus*, LCA = *left coronnary artery*, RCA = *right coronary artery*, ACE = *angiotensin converting enzyme*, AT = Angiotensin, ASS = Acetylsalicylsäure, max. = maximal, cm = Zentimeter, kg = Kilogramm, μl = Mikoliter, ng = Nanogramm, l = Liter, mg = Milligramm, dl = Deziliter, U = Units. Signifikante *p*-Werte < .05 sind grau unterlegt.

3.3.2 Vergleich der Phagozytose

Das dritte Ziel der Arbeit war es die Phagozytose von PFOB-NE durch humane Monozyten bei Patientinnen und Patienten nach einem STEMI mit der von Patientinnen und Patienten mit einer stabilen, nicht stenosierenden KHK zu vergleichen. Dazu wurden Vollblutproben wie in Abschnitt 2.8.3.3 beschrieben präpariert und analysiert. Trotz einiger nicht signifikanter Ergebnisse des Shapiro-Wilk-Tests wurden aufgrund der geringen Teststärke bei geringer

Patientenzahl zusätzlich die Q-Q-Plots, Histogramme und die deskriptiven Statistiken inspiziert. Diese zeigten Abweichungen von einer Normalverteilung. Die Homoskedastizität und Gleichheit der Kovarianzen fielen in einigen Fällen signifikant aus. Dennoch wurde explorativ eine gemischte Varianzanalyse durchgeführt. Bei verletzter Sphärizität wurde eine Greenhouse-Geisser Korrektur vorgenommen (Field, 2013). Um Patientinnen und Patienten mit KHK und STEMI zu den einzelnen Zeitpunkten zu vergleichen wurden Analyse zu den einfachen Effekten durchgeführt. Die deskriptiven Statistiken des prozentualen Anteils FITC-positiver Zellen und der MFI der Zellen für die einzelnen Zellpopulationen zu den verschiedenen Zeitpunkten sind für Patientinnen und Patienten mit STEMI und KHK in Tabelle 19 angegeben.

Zellpopulation	Zeit (min)	Anteil FITC-positiver Zellen $M \pm SD$		MFI der Zellen $M \pm SD$	
		STEMI	KHK	STEMI	KHK
Gesamtmonozyten	0	45.26 ± 25.08	48.16 ± 19.93	3.14 ± 1.30	2.44 ± 0.88
	8	46.07 ± 14.15	44.58 ± 15.84	4.12 ± 2.69	2.67 ± 0.83
	16	68.96 ± 21.41	52.31 ± 15.93	5.15 ± 2.35	3.06 ± 0.95
	32	88.13 ± 8.96	63.60 ± 16.71	8.37 ± 4.44	4.40 ± 1.86
	64	96.73 ± 3.06	88.23 ± 5.93	16.15 ± 7.35	8.26 ± 4.17
	128	99.31 ± 0.69	97.30 ± 2.18	25.43 ± 12.15	13.00 ± 6.73
CD14 ⁺ CD16 ⁻ - Monozyten	0	40.31 ± 27.22	41.15 ± 19.13	3.31 ± 1.94	2.26 ± 0.85
	8	39.21 ± 15.01	38.40 ± 15.29	4.76 ± 4.68	2.43 ± 0.75
	16	64.05 ± 23.72	45.25 ± 15.55	4.67 ± 2.52	2.70 ± 0.86
	32	83.70 ± 12.15	56.13 ± 19.23	7.78 ± 4.81	4.10 ± 2.03
	64	94.99 ± 4.50	84.88 ± 7.87	14.12 ± 6.90	7.10 ± 3.35
	128	99.38 ± 0.61	97.39 ± 2.49	21.76 ± 11.58	10.65 ± 5.94
CD14 ⁺ CD16 ⁺ - Monozyten	0	52.66 ± 19.49	54.98 ± 20.45	3.05 ± 1.36	2.61 ± 0.93
	8	57.48 ± 13.51	50.81 ± 16.46	3.76 ± 1.47	2.92 ± 0.98
	16	76.41 ± 17.19	58.17 ± 15.73	6.50 ± 4.18	3.39 ± 1.10
	32	91.84 ± 6.33	68.97 ± 14.73	9.07 ± 4.14	4.61 ± 1.71
	64	97.74 ± 2.04	91.43 ± 4.80	17.69 ± 8.28	9.36 ± 5.53
	128	99.06 ± 1.12	96.70 ± 5.49	29.34 ± 13.10	15.43 ± 7.93

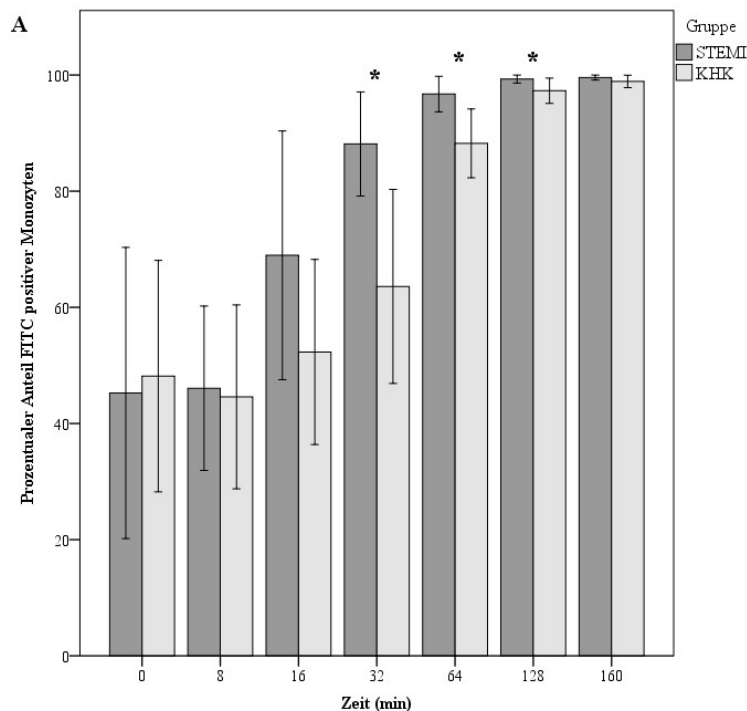
Tabelle 19: Mittelwerte und Standardabweichung der Anteile FITC-positiver Zellen und mittleren Fluoreszenzintensitäten der unterschiedlichen Zellpopulationen bei Patientinnen und Patienten mit STEMI und KHK zu verschiedenen Zeitpunkten. STEMI = STEMI = *ST-elevated myocardial infarction* (ST-Strecken Hebungsinfarkt), KHK = koronare Herzkrankheit, min = Minuten, FITC = Fluoresceinisothiocyanat, MFI = mittlere Fluoreszenzintensität, M = Mittelwert, SD = Standardabweichung, CD = *cluster of differentiation*, $n = 8$.

Der Haupteffekt der Zeit sowie der Interaktionseffekt zwischen Zeit und Gruppenzugehörigkeit wurden für den prozentualen Anteil FITC-positiver Gesamtmonozyten signifikant, jeweils $F(2.63, 36.75) = 69.44, p < .001, \eta^2 = .832$ und $F(2.63, 36.75) = 3.12, p =$

.044, $\eta^2 = .182$ (siehe Tabelle 20). Der Anstieg der prozentualen Anteile FITC-positiver Monozyten war bei Patientinnen und Patienten mit STEMI signifikant größer als für Patientinnen und Patienten mit KHK. Bei der Analyse der einfachen Effekte zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen zu den Zeitpunkten den Zeitpunkten 32, 64 und 128 Minuten (siehe Tabelle 21). Obwohl der prozentuale Anteil FITC-positiver Monozyten für beide Gruppen mit der Zeit zunahm, war diese Zunahme für die STEMI-Gruppe größer als für die KHK-Gruppe (siehe Abb. 15 A).

Der Anstieg der prozentualen Anteile FITC-positiver CD14⁺CD16⁻-Monozyten unterschied sich zwischen Patientinnen und Patienten mit STEMI und KHK signifikant voneinander. Der Haupteffekt der Zeit wurde signifikant, $F(2.78, 38.96) = 72.95, p < .001, \eta^2 = .839$, der Interaktionseffekt zwischen Zeit und Gruppenzugehörigkeit ebenfalls, $F(2.78, 38.96) = 3.14, p = .039, \eta^2 = .183$ (siehe Tabelle 20). Der prozentuale Anteil FITC-positiver CD14⁺CD16⁻-Monozyten war zu den Zeitpunkten 32, 64, 128 und 160 Minuten für die STEMI-Gruppe signifikant größer als für die KHK-Gruppe. (siehe Abb. 15 B und Tabelle 21).

Zuletzt ergab sich für den prozentualen Anteil FITC-positiver CD14⁺CD16⁺-Monozyten ein signifikanter Haupteffekt der Zeit, $F(2.62, 36.63) = 65.53, p < .001, \eta^2 = .824$ und ein signifikanter Interaktionseffekt zwischen Zeit und Gruppenzugehörigkeit, $F(2.62, 36.63) = 3.65, p = .026, \eta^2 = .207$ (siehe Tabelle 20). Der prozentuale Anteil FITC-positiver CD14⁺CD16⁺-Monozyten war für die STEMI-Gruppe zu den Zeitpunkten 16, 32 und 64 Minuten signifikant größer als für die KHK-Gruppe (siehe Abb. 15 C und Tabelle 21).



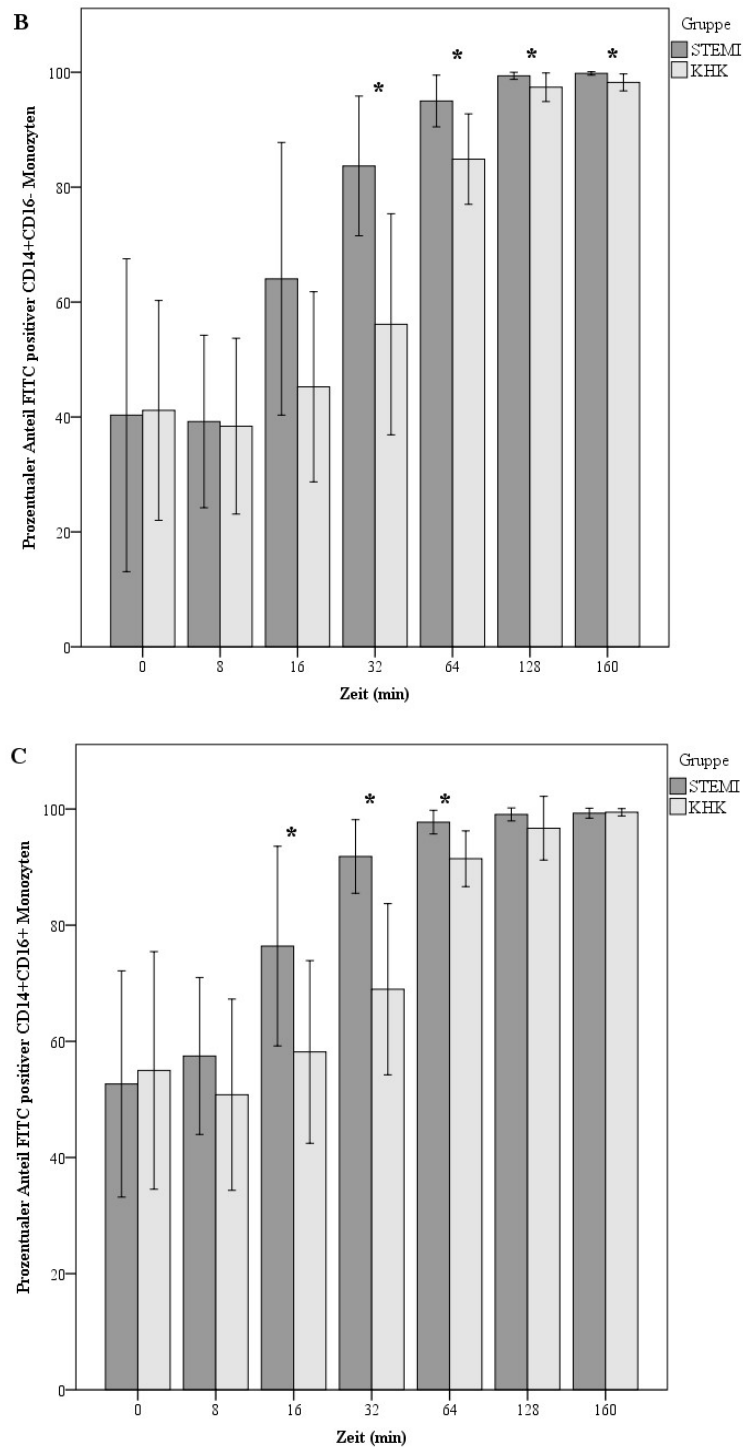


Abb. 15: Prozentualer Anteil FITC-positiver Zellen der jeweiligen Zellpopulation nach Inkubation von PFOB-Nanoemulsion im Vergleich zwischen Patientinnen und Patienten mit KHK und STEMI. (A) prozentualer Anteil FITC-positiver Monozyten, (B) prozentualer Anteil FITC-positiver CD14⁺CD16⁺-Monozyten, (C) prozentualer Anteil FITC-positiver CD14⁺CD16⁻-Monozyten. PFOB = Perfluorocetyl bromid, FITC = Fluoresceinisothiocyanat, KHK = Koronare Herzkrankheit, STEMI = *ST-elevated myocardial infarction* (ST-Strecken Hebungsinfarkt), CD = *cluster of differentiation*, min = Minuten. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung, $n = 8$, $*p < .05$.

Zellpopulation	Quelle der Varianz	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	η^2
Gesamtmonozyten	Zwischensubjekteffekte						
	Gruppe	1	1482.17	1482.17	2.77	.118	.165
	Fehler	14	7497.58	535.54			
	Innersubjekteffekte						
	Messzeitpunkt	2.63	53084.65	20222.77	69.44	<.001	.832
	Gruppe x Messzeitpunkt	2.63	2382.36	907.57	3.12	.044	.182
	Fehler	36.75	10703.18	291.24			
CD14 ⁺ CD16 ⁻ - Monozyten	Zwischensubjekteffekte						
	Gruppe	1	2056.71	2056.71	3.40	.086	.200
	Fehler	14	8459.87	604.28			
	Innersubjekteffekte						
	Messzeitpunkt	2.78	65749.87	23629.72	72.95	<.001	.839
	Gruppe x Messzeitpunkt	2.78	2834.78	1018.79	3.15	.039	.183
	Fehler	38.96	12618.14	323.92			
CD14 ⁺ CD16 ⁺ - Monozyten	Zwischensubjekteffekte						
	Gruppe	1	1663.98		3.54	.081	.202
	Fehler	14	6573.33	469.52			
	Innersubjekteffekte						
	Messzeitpunkt	2.62	38411.32	14682.11	65.53	<.001	.824
	Gruppe x Messzeitpunkt	2.62	2138.35	817.35	3.65	.026	.207
	Fehler	36.63	8206.94	224.07			

Tabelle 20: Gemischte Varianzanalyse für die Effekte von Zeit und Gruppenzugehörigkeit auf den prozentualen Anteil FITC-positiver Zellen für die verschiedenen Zellpopulationen. Messzeitpunkt: Verglichen wurden die Zeitpunkte 0, 8, 16, 32, 64, 128 und 160 Minuten. Gruppe: Verglichen wurden Patientinnen und Patienten mit STEMI und KHK. FITC = Fluoresceinisothiocyanat, KHK = Koronare Herzkrankheit, STEMI = *ST-elevated myocardial infarction* (ST-Strecken Hebungsinfarkt), CD = *cluster of differentiation*, *df* = Freiheitsgrade, *SS* = Quadratsumme, *MS* = mittleres Quadrat. *n* = 8. Signifikante *p*-Werte < .05 sind grau unterlegt.

Zellpopulation	Zeit (min)	<i>F</i> (1,14)	<i>p</i>
Gesamtmonozyten	0	0.07	.802
	8	0.04	.847
	16	3.11	.099
	32	13.39	.003
	64	12.98	.003
	128	6.16	.026
	160	2.67	.125
CD14 ⁺ CD16 ⁻ -Monozyten	0	0.005	.944
	8	0.011	.916
	16	3.38	.087
	32	11.74	.004
	64	9.94	.007
	128	4.83	.045
	160	8.62	.011

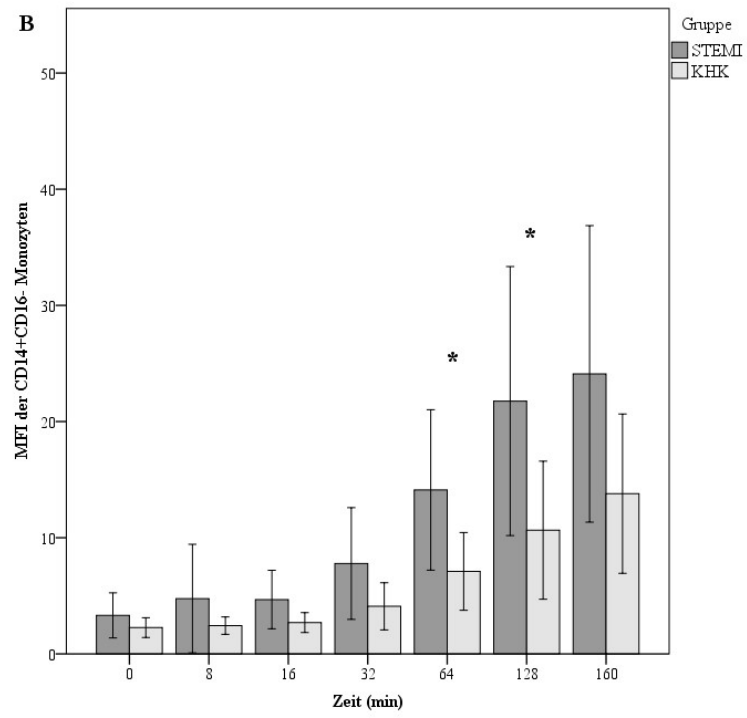
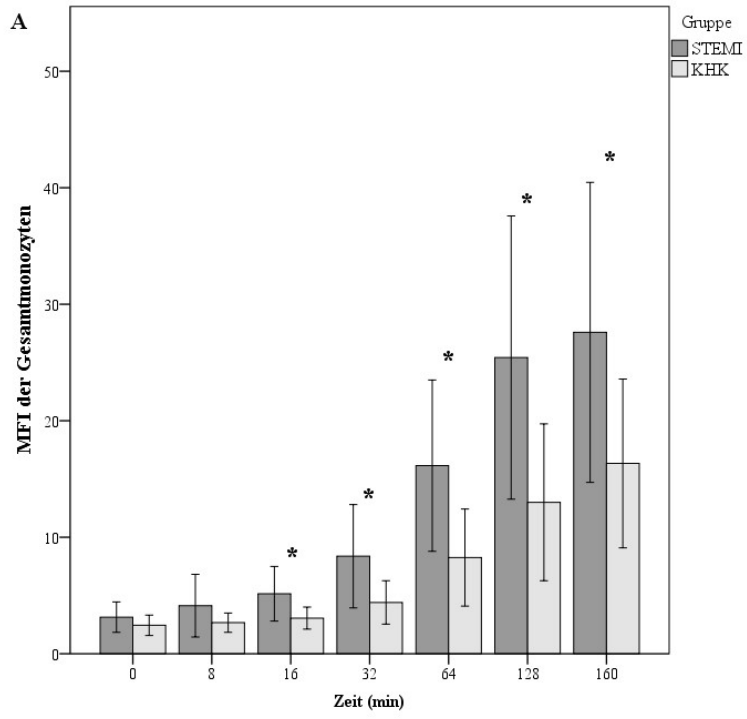
Zellpopulation	Zeit (min)	$F(1,14)$	p
CD14 ⁺ CD16 ⁺ -Monozyten	0	0.05	.819
	8	0.78	.391
	16	4.90	.044
	32	16.27	.001
	64	11.69	.004
	128	1.43	.252
	160	0.16	.692

Tabelle 21: Ergebnisse der Analyse der einfachen Effekte für die Unterschiede im prozentualen Anteil FITC-positiver Zellen im Vergleich zwischen KHK und STEMI zu verschiedenen Zeitpunkten und Zellpopulationen. STEMI = *ST-elevated myocardial infarction* (ST-Strecken Hebungsinfarkt), KHK = koronare Herzkrankheit CD = *cluster of differentiation*, min: Minuten, $n = 8$. Signifikante p -Werte < .05 sind grau unterlegt.

Die MFI der drei Zellpopulationen war für Patientinnen und Patienten nach STEMI durchgängig höher als bei Patientinnen und Patienten mit KHK (siehe Abb. 16 A bis C). Für die MFI der Gesamtmonozyten wurde der Haupteffekt für den Faktor Zeit global signifikant, $F(1.17, 16.32) = 54.57$, $p < .001$, $\eta^2 = .796$. Sowohl der Haupteffekt für den Faktor der Gruppenzugehörigkeit, als auch der Interaktionseffekt zwischen Messzeitpunkt und Gruppenzugehörigkeit wurden signifikant, $F(1, 14) = 5.99$, $p = .028$, $\eta^2 = .300$ und $F(1.1.7, 16.32) = 5.07$, $p = .034$, $\eta^2 = .266$ (siehe Tabelle 22). Es zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen Patientinnen und Patienten mit STEMI und KHK bei der MFI der Gesamtmonozyten zu den Zeitpunkten 16, 32, 64, 128 und 160 (siehe Abb. 16 A und Tabelle 23).

Für die MFI FITC-positiver CD14⁺CD16⁺-Monozyten wurden sowohl die Haupteffekte als auch der Interaktionseffekt signifikant, $F(1.23, 17.16) = 44.42$, $p < .001$, $\eta^2 = .760$ für den Haupteffekt der Zeit, $F(1, 14) = 5.12$, $p = .040$, $\eta^2 = .268$ für den Haupteffekt der Gruppenzugehörigkeit und $F(1.23, 17.16) = 4.40$, $p = .040$, $\eta^2 = .239$ für den Interaktionseffekt. Die MFI FITC-positiver CD14⁺CD16⁺-Monozyten war für die STEMI-Gruppe zu den Zeitpunkten 64 und 128 Minuten signifikant größer als für die KHK-Gruppe (siehe Abb. 16 B und Tabelle 23).

Zuletzt ergab sich für die MFI FITC-positiver CD14⁺CD16⁺-Monozyten ein globaler Haupteffekt für den Faktor Zeit, $F(1.33, 18.55) = 53.96$, $p < .001$, $\eta^2 = .794$ und den Faktor der Gruppenzugehörigkeit $F(1, 14) = 7.00$, $p = .019$, $\eta^2 = .333$. Der Interaktionseffekt zwischen Messzeitpunkt und Gruppenzugehörigkeit war ebenfalls signifikant, $F(1.33, 18.55) = 4.56$, $p = .037$, $\eta^2 = .246$. Die Analysen der einfachen Effekte zeigten, dass sich die MFI für die STEMI-Gruppe signifikant von der KHK-Gruppe zu den Zeitpunkten 32, 64, 128 und 160 Minuten unterschieden (siehe Abb. 16 C und Tabelle 23).



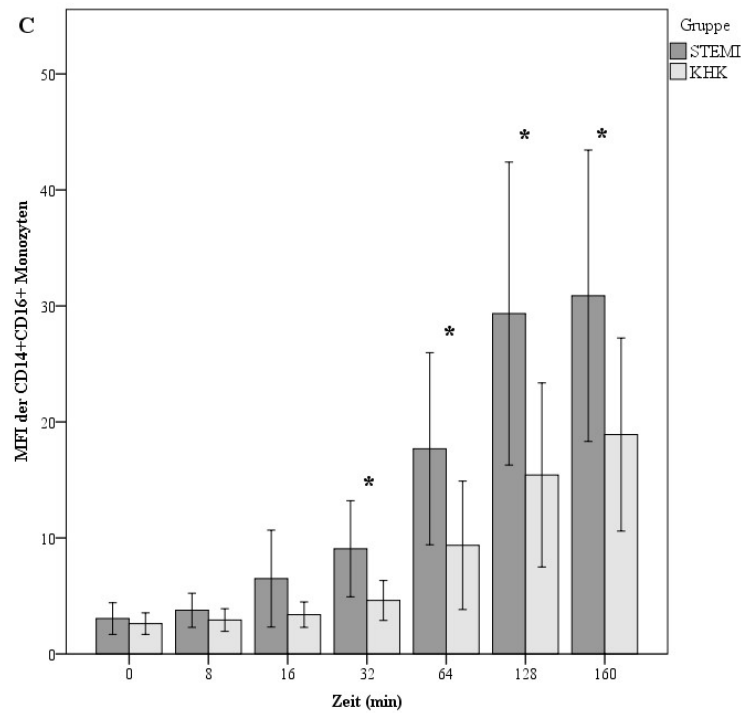


Abb. 16: Mittlere Fluoreszenzintensitäten der Zellpopulationen nach Inkubation mit PFOB-Nanoemulsion im Vergleich zwischen Patientinnen und Patienten mit KHK und STEMI. (A) mittlere Fluoreszenzintensität der Gesamtmonozyten, (B) mittlere Fluoreszenzintensität CD14⁺CD16⁺-Monozyten, (C) mittlere Fluoreszenzintensität CD14⁺CD16⁻-Monozyten. MFI = mittlere Fluoreszenzintensität, PFOB = Perfluorocetyl bromid, FITC = Fluoresceinisothiocyanat, KHK = Koronare Herzkrankheit, STEMI = *ST-elevated myocardial infarction* (ST-Strecken Hebungsinfarkt), CD = *cluster of differentiation*, min = Minuten. $n = 8$, $*p < .05$.

Zellpopulation	Quelle der Varianz	df	SS	MS	F	p	η^2
Gesamtmonozyten	Zwischensubjekteffekte						
	Gruppe	1	904.77	904.77	5.99	.028	.300
	Fehler	14	2114.03	151.00			
	Innersubjekteffekte						
	Messzeitpunkt	1.17	6019.62	5163.48	54.57	.000	.796
CD14 ⁺ CD16 ⁻ -Monozyten	Zwischensubjekteffekte						
	Gruppe	1	802.27	802.27	5.13	.040	.268
	Fehler	14	2190.92	156.49			
	Innersubjekteffekte						
CD14 ⁺ CD16 ⁺ -Monozyten	Zwischensubjekteffekte						
	Gruppe	1	1059.27	1059.27	6.99	.019	.333
	Fehler	14	2120.61	151.47			
	Innersubjekteffekte						
Messzeitpunkt	1.23	4137.11	3375.54	44.42	.000	.760	
Gruppe x Messzeitpunkt	1.23	409.48	334.11	4.40	.044	.239	
Fehler	17.16	1303.93	75.99				

Zellpopulation	Quelle der Varianz	df	SS	MS	F	p	η^2
	Innersubjekteffekte						
	Messzeitpunkt	1.33	8128.00	6134.31	53.96	.000	.794
	Gruppe x Messzeitpunkt	1.33	687.41	518.80	4.56	.040	.246
	Fehler	18.55	2108.92	113.69			

Tabelle 22: Gemischte Varianzanalyse für die Effekte von Zeit und Gruppenzugehörigkeit auf die mittleren Fluoreszenzintensitäten FITC-positiver Zellen für die verschiedenen Zellpopulationen. Messzeitpunkt: Verglichen wurden die Zeitpunkte 0, 8, 16, 32, 64, 128 und 160 Minuten. Gruppe: Verglichen wurden Patientinnen und Patienten mit STEMI und KHK, FITC = Fluoresceinisothiocyanat, CD = cluster of differentiation, df = Freiheitsgrade, SS = Quadratsumme, MS = mittleres Quadrat, KHK = Koronare Herzkrankheit, STEMI = ST-elevated myocardial infarction (ST-Strecken Hebungsinfarkt). $n = 8$. Signifikante p -Werte sind grau unterlegt.

Zellpopulation	Zeit (min)	F(1,14)	p
Gesamtmonozyten	0	1.59	.228
	8	2.13	.167
	16	5.48	.035
	32	5.46	.035
	64	6.98	.019
	128	6.40	.024
	160	4.64	.049
CD14 ⁺ CD16 ⁻ -Monozyten	0	1.98	.181
	8	1.92	.187
	16	4.42	.054
	32	3.97	.066
	64	6.69	.022
	128	5.84	.030
	160	4.05	.064
CD14 ⁺ CD16 ⁺ -Monozyten	0	0.56	.467
	8	1.81	.199
	16	4.14	.061
	32	7.92	.014
	64	5.59	.033
	128	6.63	.022
	160	5.05	.041

Tabelle 23: Ergebnisse der Analyse der einfachen Effekte für die Unterschiede der mittleren Fluoreszenzintensitäten FITC-positiver Zellen im Vergleich zwischen KHK und STEMI zu verschiedenen Zeitpunkten und Zellpopulationen. FITC = Fluoresceinisothiocyanat, STEMI = ST-elevated myocardial infarction (ST-Strecken Hebungsinfarkt), KHK = koronare Herzkrankheit, CD = cluster of differentiation, min = Minuten. $n = 8$. Signifikante p -Werte $< .05$ sind grau unterlegt.

3.3.3 Vergleich der Monozytenpopulationen nach Phagozytose

Abbildung 17 zeigt die prozentualen Anteile der CD14⁺CD16⁻-Monozyten an den Gesamtmonozyten zwischen KHK- und STEMI-Patientinnen und -Patienten zu den Zeitpunkten 0 und 160 Minuten. Der prozentuale Anteil der CD14⁺CD16⁻-Monozyten unterschied sich zwischen KHK ($M = 47.11$, $SD = 14.12$) und STEMI ($M = 64.15$, $SD = 12.71$) weder zum Zeitpunkt 0 Minuten, $t(14) = 4.11$, $p = .024$, Cohens $d = 1.27$, noch zum Zeitpunkt

160 Minuten, $t(14) = 4.11$, $p = .98$, Cohens $d = 0.01$. Bei Patientinnen und Patienten mit STEMI fiel der prozentuale Anteil der CD14⁺CD16⁻-Monozyten zwischen den Zeitpunkten 0 ($M = 64.16$, $SD = 12.71$) und 160 ($M = 43.46$, $SD = 18.32$) Minuten signifikant ab, $t(7) = 4.11$, $p = .005$, Cohens $d = 1.33$, (siehe Abb. 17). Für die Gruppe Patientinnen und Patienten mit KHK war dieser Unterschied nicht signifikant, $t(7) = 0.74$, $p = .486$, Cohens $d = 0.26$ (siehe Abb. 17). Das Signifikanzniveau lag nach Bonferroni-Korrektur bei $\alpha = .0125$.

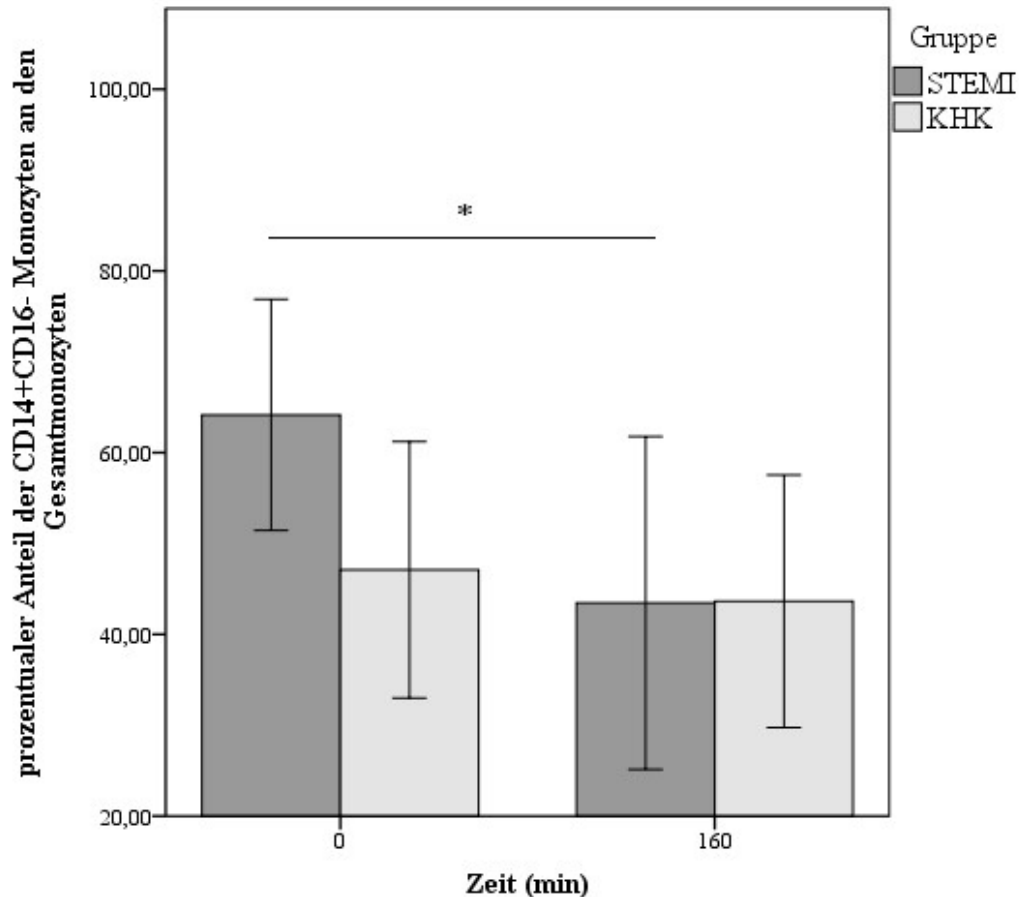


Abb. 17: Prozentualer Anteil der CD14⁺CD16⁻-Monozyten an den Gesamtmonozyten zu den Zeitpunkten 0 und 160 Minuten für Patientinnen und Patienten mit KHK und STEMI. KHK = Koronare Herzkrankheit, STEMI = ST-elevated myocardial infarction (ST-Strecken Hebungsinfarkt), CD = cluster of differentiation, min = Minuten. $n = 8$, Werte sind angegeben als Mittelwert \pm eine Standardabweichung, * $p < .05$.

Wie in Abb. 18 zu erkennen ist, unterscheiden sich die mittleren Fluoreszenzintensitäten der CD14⁺CD16⁻-Monozyten ($M = 13.79$, $SD = 6.86$) und der CD14⁺CD16⁺-Monozyten ($M = 18.91$, $SD = 8.32$) bei den Patientinnen und Patienten mit KHK zum Zeitpunkt 160 Minuten signifikant voneinander $t(7) = 3.47$, $p = .010$, Cohens $d = 0.73$. Für die Patientinnen und Patienten mit STEMI ist dieser Unterschied ebenfalls signifikant (für CD14⁺CD16⁻-Monozyten $M = 24.10$, $SD = 12.76$ und für CD14⁺CD16⁺-Monozyten $M = 30.88$, $SD = 12.56$), $t(7) = 5.32$, $p = .001$, Cohens $d = 0.57$. Das Signifikanzniveau lag nach Bonferroni-Korrektur bei $\alpha = .025$.

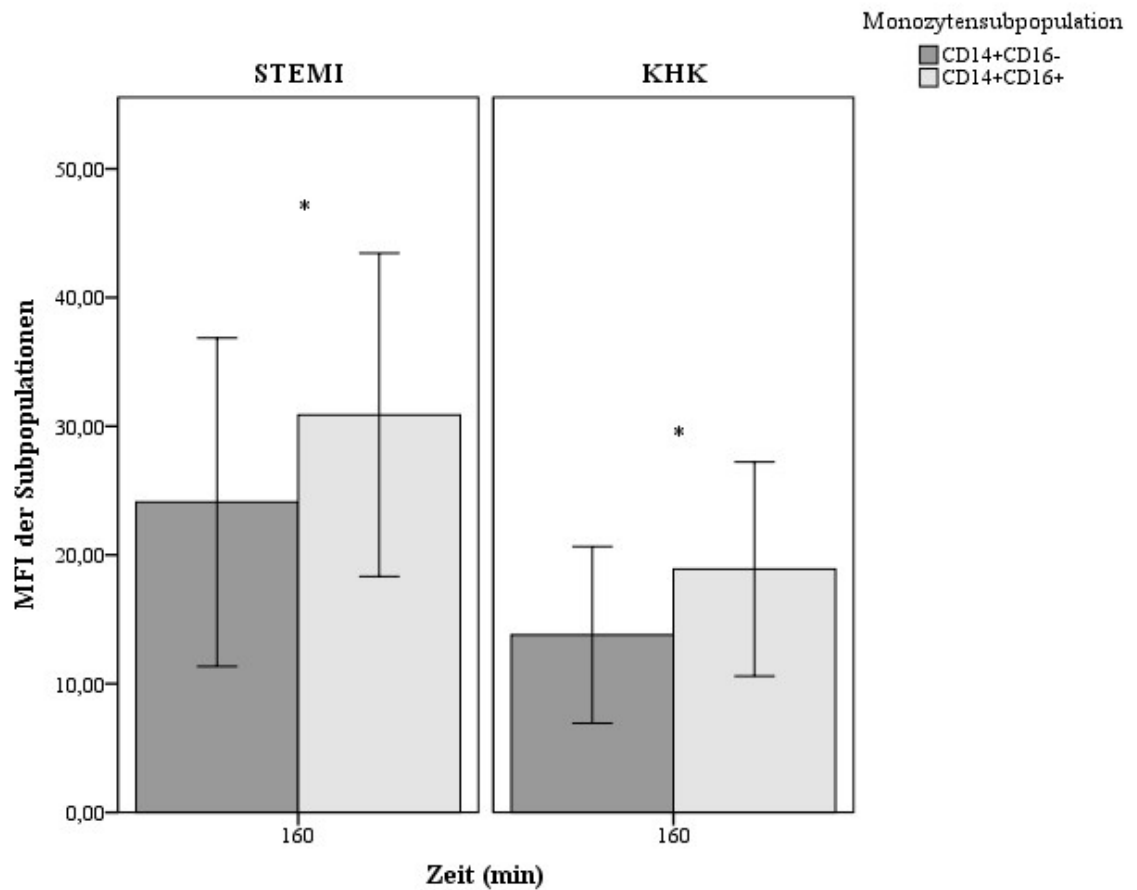


Abb. 18: Vergleich der mittleren Fluoreszenzintensitäten der CD14⁺CD16⁻- und CD14⁺CD16⁺-Monozyten zum Zeitpunkt 160 Minuten für Patientinnen und Patienten mit STEMI und KHK. KHK = Koronare Herzkrankheit, STEMI = ST-elevated myocardial infarction (ST-Strecken Hebungsinfarkt), CD = cluster of differentiation, min = Minuten, MFI = mittlere Fluoreszenzintensität. $n = 8$, Werte sind angegeben als Mittelwert \pm eine Standardabweichung, * $p < .05$.

4 Diskussion

Der Herzinfarkt zählt trotz diagnostischer und therapeutischer Fortschritte weiterhin zu den häufigsten Todesursachen in vielen Industrienationen (Meinertz et al., 2017; Statistisches Bundesamt, 2019; World Health Organisation (WHO), 2018). Für die Entwicklung neuer Therapie- und Diagnostikansätze ist ein besseres Verständnis der Heilungsprozesse nach einem Herzinfarkt wichtig. Während der Heilungsphase spielen Monozyten eine entscheidende Rolle. In der vorliegenden Arbeit wurde die Phagozytose von PFOB-NE durch humane Monozyten sowohl bei gesunden als auch bei erkrankten Probandinnen und Probanden untersucht, um die Möglichkeit molekularer Makrophagenbildung mittels 19F MRT zu evaluieren. Des Weiteren wurde anders als bisher zwischen Subpopulationen der Monozyten, CD14⁺CD16⁻- und CD14⁺CD16⁺-Monozyten, unterschieden. Diese Unterscheidung ist essenziell, da sich die Monozytensubpopulationen nicht nur phänotypisch, sondern auch funktionell unterscheiden (Auffray et al., 2009; Italiani & Boraschi, 2014; Kapellos et al., 2019; Thomas et al., 2015; Weber et al., 2016; Wong et al., 2012). Es konnte gezeigt werden, dass PFOB-NE zeitabhängig unter Flussbedingungen durch Monozyten phagozytiert werden. Dabei zeigten sich Unterschiede zwischen den Monozytensubpopulationen, Granulozyten und B-Zellen. Die weitere Phagozytosefähigkeit der Monozyten wurde durch die Aufnahme der PFOB-NE nicht beeinträchtigt, die Zellen phagozytierten auch danach Zymosan A. Des Weiteren zeigten sich Unterschiede in der Phagozytose der PFOB-NE bei Patientinnen und Patienten mit Zustand nach STEMI und Patientinnen und Patienten mit stabiler KHK.

4.1 Das BioFlux

4.1.1 Phagozytose unter Flussbedingungen

Ein wichtiger Aspekt der Untersuchung von Phagozytosevorgängen ist eine möglichst genaue Simulation der *in vivo* Bedingungen. Dazu gehören beispielsweise Fluss- und Temperaturbedingungen, Vollblutproben und Beschichtungen, da diese Bedingungen und insbesondere der physiologische Fluss einen starken Einfluss auf verschiedenste biologische Prozesse haben (Djaldetti & Bessler, 2015; Pramanik, Thapa, & Saikia, 2004; Rinkenauer et al., 2015; Samar Shurbaji et al., 2020; Vu et al., 2020; Q. Yang, Wijerathne, Langston, Kiani, & Kilpatrick, 2021; Yazdimamaghani et al., 2018). Vollblutproben wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet, da die Untersuchung von einzelnen Blutkomponenten die Komplexität des Zusammenspiels unterschätzt und die Interaktion zwischen Nanoemulsionen und Zellen beeinflusst. Zudem zeigen beide unterschiedliches Flussverhalten, weshalb statische

Bedingungen diese Dynamik nicht akkurat wiedergeben können (Vu et al., 2020; Q. Yang et al., 2021). Die Aufnahme von Nanopartikeln und die Interaktion mit Zellen unterscheidet sich unter statischen und Flussbedingungen in Abhängigkeit von Faktoren wie der Größe, Geometrie und Oberflächenladung (Samar Shurbaji et al., 2020; Thurn et al., 2007). Um die Phagozytose von PFOB-NE durch humane Monozyten gesunder Probandinnen und Probanden unter Flussbedingungen zu untersuchen, wurde das BioFlux verwendet. Derartige Untersuchungen sind in der Literatur bisher nicht beschrieben. Das BioFlux ermöglicht die Simulation von *in vivo* Flussbedingungen unter kontrollierten Temperaturbedingungen. Die Untersysteme der Well Platten bestehen aus einem *inlet* und einem *outlet* Well, die über einen 350µm x 70µm Kanal miteinander verbunden sind, durch den die Probe fließen kann (Benoit et al., 2010). In der vorliegenden Untersuchung wurde die Scherkraft auf 10 dyn/cm² eingestellt, die Temperatur auf 37 °C. Mit einem Mikroskop wurde überprüft, ob Luftblasen im Kanal vorhanden sind, die den kontinuierlichen Fluss behindern würden. Die Aufnahme der PFOB-NE durch verschiedene Zellpopulationen wurde nachfolgend durchflusszytometrisch analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass humane Monozyten die PFOB-NE unter kontrollierten Temperatur- und weitestgehend laminaren Flussbedingungen in definierter Kinetik aufnehmen. 92 ± 3 % der Zellen hatten nach 128 Minuten die Nanoemulsion phagozytiert und zeigten eine MFI von 2.78 ± 0.45 . Die Phagozytose verlief jedoch langsamer als auf einem Rollenmischer im Inkubator. Dort hatten 96 ± 4 % der Monozyten nach 128 Minuten die Nanoemulsion aufgenommen. Die MFI fiel nach 128 Minuten mit 6.88 ± 1.79 zudem höher aus. Der Unterschied im Anteil FITC-positiver Monozyten fiel zum Zeitpunkt 128 Minuten zwischen beiden Methoden nicht signifikant aus ($p = .081$). Jedoch zeigten sich signifikante Unterschiede zu den Zeitpunkten 8 bis 32 Minuten. Hier war der Anteil FITC-positiver Monozyten im Inkubator höher als im BioFlux. Die MFI der Monozyten war im Inkubator zu den Zeitpunkten 64 und 128 Minuten signifikant größer als im BioFlux. In bisherigen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Scherkraft die Phagozytose signifikant beeinflusst, höhere Scherkräfte korrelierten mit einer vermehrten zellulären Aufnahme (Rinkenauer et al., 2015; Samar Shurbaji et al., 2020). Eine mögliche Erklärung für die geringere Phagozytose der PFOB-NE im BioFlux könnten fehlende Flussbedingungen in den Wells sein (siehe Kapitel 4.1.2). Mahto et al. (2010) und Yazdimamaghani et al. (2018) konnten zeigen, dass das Material unter statischen Bedingungen sedimentiert und aggregiert, wodurch die Aufnahme durch die Zellen beeinflusst wird. Auf dem Rollenmischer war die Rotation durchgehend gegeben. Zudem ist nicht auszuschließen, dass die Scherkräfte dort höher ausfielen, wodurch die Wahrscheinlichkeit für die Phagozytose beeinflusst würde. Unter laminaren Flussbedingungen zeigen Nanopartikel verschiedenster Größen und geometrischer

Formen zudem unterschiedliches Flussverhalten, die die Wahrscheinlichkeit für die Adhäsion beeinflussen (Blackwell et al., 2001; Journey et al., 2017; Moghimi, Hunter, et al., 2012). Zukünftig könnte die Phagozytose im BioFlux unter verschiedensten Scherströmungen untersucht werden, um auch für Pathologien, wie die Arteriosklerose, eine Kinetik aufzuzeigen. Da die Phagozytose der PFOB-NE nur bei gesunden Probandinnen und Probanden unter Flussbedingungen untersucht wurde, wären Vergleiche mit Patientinnen und Patienten mit inflammatorischen Erkrankungen von Interesse. Auch der Einfluss verschiedenster PFOB-NE Konzentrationen, Größe und längerer Zeitintervalle auf die Phagozytose ist im Hinblick auf die Expression verschiedenster Marker und Zytokine, beispielsweise CD80, CD86, MHC-II, INF- γ , TNF- α und IL-1 sowie die Apoptose, relevant (Ghattas et al., 2013; Schlitt et al., 2004).

Bei den B-Zellen zeigte sich ein umgekehrtes Bild für die Phagozytose der PFOB-NE vergleiche mit Monozyten. Der prozentuale Anteil FITC-positiver B-Zellen war im BioFlux höher als im Inkubator. Im BioFlux zeigten B-Zellen zudem eine höhere MFI als Monozyten und B-Zellen im Inkubator, jedoch fielen die Unterschiede nicht signifikant aus. Eine mögliche Erklärung für die abweichenden Ergebnisse der B-Zellen wäre ein größerer Anteil apoptotischer Zellen. Dieser Faktor sollte als Kontrollvariable untersucht werden.

Insgesamt konnte die erste Hypothese bestätigt werden, humane Monozyten nehmen die PFOB-NE unter Flussbedingungen auf. In Übereinstimmung mit der Literatur konnte des Weiteren gezeigt werden, dass auch Granulozyten und B-Zellen die Nanoemulsion aufnehmen, jedoch zu einem geringeren Anteil als Monozyten (Ebner et al., 2010; Flögel et al., 2008; Nienhaus et al., 2019).

4.1.2 Vergleich zur *in vivo* Situation

Die Kanäle des BioFlux entsprechen von ihren Maßen den Arteriolen und Venolen des Menschen statt größeren Venen (Ehmke, 2019), weshalb die venöse Situation nicht vollständig erreicht werden konnte. Bei Simulation der intravenösen Applikation in kubitale Venen wären größere Durchmesser von ca. 2.5 bis 5 mm nötig (Ehmke, 2019). Des Weiteren betragen die durchschnittlichen Scherkräfte in Venen ein bis sechs dyn/cm² (Malek, Alper, & Izumo, 1999; Papaioannou et al., 2006; Papaioannou & Stefanadis, 2005). Sie sind somit niedriger als in der vorliegenden Untersuchung, bei der die Scherkräfte denen in Arterien ähneln (Malek et al., 1999). Diese Scherkraft musste jedoch gewählt werden, da anderweitig keine ausreichende Menge an Vollblut aus dem *outlet* Well hätte entnommen werden können. Es ist anzunehmen, dass der prozentuale Anteil FITC-positiver Zellen und die MFI der Zellen nach Phagozytose der PFOB-NE unter anderen Scherkräften und größeren Durchmessern der Kanäle veränderte Werte aufweisen (Rinkenauer et al., 2015; Samar Shurbaji et al., 2020). Untersuchungen der

Phagozytose unter Flussbedingungen bilden physiologische Zustände besser ab als Untersuchungen unter statischen Bedingungen. Dennoch ist die hier verwendete BioFlux Wellplatte trotz der vorhandenen Flussmöglichkeiten eine Vereinfachung der *in vivo* Bedingungen. Die Kanäle der Wellplatten weisen zwar Windungen auf, jedoch wurde der Einfluss von Bifurkationen und Änderungen des Querschnitts, die ebenfalls einen Einfluss auf die Phagozytose haben, nicht betrachtet. In Systemen mit Bifurkationen zeigen Partikel signifikant unterschiedliches Fluss- und Adhäsionsverhalten (Moghimi, Hunter, et al., 2012; Rosano et al., 2009). Die fehlenden Flussbedingungen im *in-* und *outlet* Well sowie die anfängliche turbulente Strömung stellen eine Limitation des BioFlux dar, da in diesen Bereichen keine laminare Strömung erreicht werden konnte. In den Wells findet weiterhin die Phagozytose ohne Flussbedingungen statt, so dass die Phagozytose der Nanoemulsionen im BioFlux geringer ausfällt als auf einem Rollenmischer, da die PFOB-NE unter statischen Bedingungen sedimentieren und aggregieren können (Mahto et al., 2010). Die Sedimentation konnte trotz vorhandener Rüttelplatte nicht vollständig verhindert werden. Es ist möglich die Vollblutproben und die PFOB-NE gleichzeitig über jeweils ein *inlet* Well hinzuzugeben. Die Substanzen würden unter Fluss über einen gemeinsamen Kanal in ein *outlet* Well münden. Dadurch könnten die Bedingungen einer intravenösen Situation genähert und der Einfluss einer Bifurkation betrachtet werden.

Die Kanäle des BioFlux können zudem beschichtet werden, um den Einfluss der *in vivo* Bedingungen auf die Phagozytose zu simulieren. Bei Venen zeigt sich im Aufbau eine Dreischichtung der Wand in *Tunica intima*, *Tunica media* und *Tunica adventitia*. Im Bereich der *Tunica media* befinden sich glatte Muskelzellen und kollagenes Bindegewebe. Die *Tunica intima*, als innerste Schicht der Gefäßwand, besteht aus Endothelzellen, die dem Gas-, Flüssigkeits- und Stoffaustausch dienen, an der Regulation des Gefäßtonus beteiligt sind und für eine glatte Oberfläche sorgen (Busse & Fleming, 1998). Normalerweise stößt die Oberfläche feste Blutbestandteile ab, die sich jedoch im Rahmen einer Entzündung anlagern können. Des Weiteren produziert sie Zelladhäsionsmoleküle, ist an der Blutgerinnung und Angiogenese beteiligt und setzt vasokonstriktorisch und vasodilatativ wirkende Substanzen wie beispielsweise Stickstoffmonoxid frei (Kruger-Genge, Blocki, Franke, & Jung, 2019; Sturtzel, 2017). Durch die Basalmembran ist das Endothel von einer subendothelialen Bindegewebsschicht getrennt. Diese enthält elastische Fasern, Fibroblasten und einzelne glatte Muskelfasern (Ehmke, 2019). Aufgrund des Aufbaus der Gefäßwände und der Interaktion der Zellen mit dem Endothelium ist eine Beschichtung der Kanäle von Interesse, um die *in vivo* Phagozytose besser nachstellen zu können und den Einfluss verschiedenster Faktoren zu untersuchen. Modifikationen ähnlicher Systeme hatten in Wechselwirkung mit verschiedenen

Scherkräften Einfluss auf weitere biologische Prozesse, wie die Adhäsion von Zellen und ihre Zirkulation (Moghimi, Hunter, et al., 2012; Vu et al., 2020; Q. Yang et al., 2021). Die Beschichtung der Kanäle des BioFlux findet aus Richtung des *outlet wells* statt. Zunächst sollten die Kanäle mit PBS gefüllt werden, damit sich keine Luftblasen bilden. Je nachdem, womit die Kanäle beschichtet werden sollen, beispielsweise mit Kollagen oder Endothelzellen, und je nach Größe der Wellplatte, werden Scherströmungen verschiedener Höhe angewendet, 10 dyn/cm² für die Beschichtung mit Kollagen. Die Wellplatten werden je nach Beschichtung über einen bestimmten Zeitraum inkubiert und die Wells und Kanäle mit PBS bei ca. 2 dyn/cm² ausgewaschen. Bei der Beschichtung sollte die Dichte je nach Zelltyp 2×10^6 - 1×10^9 Zellen/ml betragen (Fluxion BioSciences, 2008b).

4.2 Phagozytose von Zymosan A und Koinkubation mit PFOB-NE

Monozyten spielen eine wichtige Rolle bei steriler und infektiöser Inflammation. Änderungen in ihrer Funktion, Lebensfähigkeit oder Veränderungen der Monozytensubpopulationen könnten zu einer dysregulierten Immunantwort führen und somit zu Immundysfunktion oder ineffizienter Heilung der Infarktnarbe nach Myokardinfarkt (Dobaczewski et al., 2010; Frangogiannis, 2012; Kempf et al., 2011; van der Laan, Hirsch, et al., 2012). Um zu zeigen, dass die Phagozytose der PFOB-NE die Phagozytosefähigkeit der Zellen nicht verändert, wurden Vollblutproben mit PFOB-NE und Zymosan A ko-inkubiert. Da PFCs inerte Substanzen sind, die nicht metabolisiert werden, war zu erwarten, dass Monozyten nach Aufnahme der PFOB-NE weiterhin in der Lage zur Phagozytose sind (Riess, 2001, 2005, 2006; Spahn, 1999). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Monozyten nach Aufnahme von PFOB-NE weiterhin Zymosan A phagozytieren. Bei der Koinkubation beider Substanzen zeigte sich sowohl für die CD14⁺CD16⁻-Monozyten als auch die CD14⁺CD16⁺-Monozyten nach Zugabe des Zymosan A ab Minute 64 ein mehr als 50-facher Anstieg der MFI. Es zeigte sich zudem, dass nach 64 Minuten der Koinkubation die MFI die bei alleiniger Inkubation mit Zymosan A übersteigt. Der Unterschied der MFI war jedoch nicht signifikant, $p > .1$. Die zweite Hypothese konnte somit bestätigt werden. Allerdings ist zu beachten, dass die Phagozytose der PFOB-NE ebenfalls zur MFI beiträgt und ihr Anteil nicht differenziert werden kann. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit der Literatur. Wohlhaupter (2003) konnte zeigen, dass auch längere Zeitintervalle einer Vorinkubation zu nur geringen Änderungen der Phagozytoserate und der MFI führten. Mit Perfluoropolyether, ebenfalls ein PFC, beladene dendritische Zellen von Mäusen zeigten keine Änderungen der zellulären Integrität, Proliferation, des Phänotyps und Metabolismus (Ahrens et al., 2005). Es wäre möglich, dass

sich bei einem größeren Probandenkollektiv und der Durchführung sensitiverer Tests signifikante Unterschiede zu späteren Zeitpunkten zeigen. Welchen Anteil die PFOB-NE an der MFI hat ist aufgrund der gleichen Fluoreszenzmarkierung wie bei Zymosan A nicht auszumachen. Um den genauen Anteil der jeweiligen Substanz an der MFI herauszurechnen, sollten beide Substanzen unterschiedlich markiert werden, beispielsweise mit FITC und pHrodo™ Red. Somit ließe sich die alleinige Zymosan A Inkubation besser mit der Koinkubation vergleichen. Da Zymosan A ein starkes Phagozytose-Stimulanz ist (Johnson, Richardson, & Epstein, 1989), sollten weitere Substanzen wie beispielsweise fluoreszenzmarkierte *Escherichia coli* oder *Staphylococcus aureus* Bakterien für die Koinkubation herangezogen werden (Joeinig, 2008; Wohlhaupter, 2003).

Der prozentuale Anteil FITC-positiver Subpopulationen und die MFI der Monozytensubpopulationen unterschied sich nur geringfügig zu den einzelnen Zeitpunkten für die verschiedenen Substanzen. Es wäre zu erwarten, dass CD14⁺CD16⁻-Monozyten wie bisher beschrieben eine höhere Phagozytosekapazität aufzeigen als CD14⁺CD16⁺-Monozyten (Joeinig, 2008; Shantsila et al., 2011; Skrzeczynska et al., 2002). Je nach Substanz zeigten jedoch CD14⁺CD16⁺-Monozyten höhere MFI als CD14⁺CD16⁻-Monozyten. In Übereinstimmung mit Nienhaus et al. (2019), zeigte sich kein signifikanter Unterschied im prozentualen Anteil der CD14⁺CD16⁻- und CD14⁺CD16⁺-Monozyten nach Koinkubation (Zeitpunkt 160 Minuten). Die Autoren und Autorinnen konnten zeigen, dass sich die Lebensfähigkeit der Monozyten sowie die Verteilung der Subpopulationen nach Phagozytose von PFOB-NE nicht ändern. Des Weiteren bleibt auch die Migration der Zellen erhalten. In diesem Teil der vorliegenden Arbeit wurden jedoch gesunde Probandinnen und Probanden statt Patientinnen und Patienten untersucht. Die Funktionsfähigkeit der Monozyten nach Phagozytose der PFOB-NE wurde nur in einem kurzen Zeitintervall von wenigen Stunden untersucht. Eine verlängerte Dauer der Phagozytose, verschiedene Konzentrationen beider Substanzen, Versuche unter Flussbedingungen und in Medium könnten zu anderen Ergebnissen führen. Da es sich bei den Versuchen um Vollblutproben handelte, kam dies den *in vivo* Bedingungen näher als Zellkulturstudien. Zudem sollte zwischen phagozytierten und adhätierenden Partikeln unterschieden werden, da die Fluoreszenzintensitäten in diesem Zusammenhang nochmals geringfügig niedriger ausfallen (Bjerknes & Bassoe, 1983).

4.3 Phagozytose von PFOB-NE bei Patientinnen und Patienten mit Myokardinfarkt und KHK

4.3.1 Unterschiede in der Phagozytose zwischen den Patientengruppen

Der Einfluss verschiedener inflammatorischer Erkrankungen auf die Phagozytoseaktivität der PFOB-NE durch humane Monozyten ist bisher nicht untersucht worden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Aufnahmekinetik der PFOB-NE durch humane Monozyten *in vitro* an Vollblutproben von Patientinnen und Patienten mit KHK und STEMI untersucht. Um zu zeigen, dass humane Monozyten nach Herzinfarkt eine verstärkte und beschleunigte Phagozytose zeigen, wurden Vollblutproben von Patientinnen und Patienten mit KHK und von Patientinnen und Patienten drei Tage nach STEMI mit PFOB-NE inkubiert und zu definierten Zeitpunkten durchflusszytometrisch untersucht. In der Literatur ist ein Unterschied der Monozytensubpopulationen zwischen STEMI- und KHK-Patientinnen und -Patienten gut untersucht (Ghattas et al., 2013; Tsujioka et al., 2009; X. Zhou et al., 2016). Die Gesamtzahl der Monozyten nach Myokardinfarkt ist erhöht und das Verhältnis der Monozytensubpopulationen ändert sich in der Akutphase nach Infarkt. An Tag drei nach Myokardinfarkt zeigt sich ein signifikanter Anstieg der CD14⁺CD16⁻-Monozyten (Ghattas et al., 2013; Tsujioka et al., 2009; van der Laan et al., 2014). CD14⁺CD16⁻-Monozyten werden auch als klassische Monozyten bezeichnet und mit der Phagozytose in Verbindung gebracht (Auffray et al., 2009; Italiani & Boraschi, 2014; Wong et al., 2012). In Übereinstimmung mit diesen Befunden zeigten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit signifikante Unterschiede im Anteil der CD14⁺CD16⁻-Monozyten, die PFOB-NE phagozytiert hatten zu den Zeitpunkten 32 bis 160 Minuten sowie signifikante Unterschiede der MFI zu den Zeitpunkten 64 und 128 Minuten zwischen beiden Patientengruppen. CD14⁺CD16⁻-Monozyten von Patientinnen und Patienten mit Zustand nach Myokardinfarkt zeigten bereits zu Beginn eine 1.46-fach höhere MFI im Vergleich mit Monozyten von Patientinnen und Patienten mit KHK. Im Verlauf stieg dieser Unterschied auf das 2-fache an. CD14⁺CD16⁻-Monozyten von Patientinnen und Patienten drei Tage nach STEMI nahmen ab Zeitpunkt 32 Minuten signifikante mehr PFOB-NE auf als CD14⁺CD16⁻-Monozyten von Patientinnen und Patienten mit stabiler KHK.

Dieses Ergebnis zeigte sich ebenfalls bei CD14⁺CD16⁺-Monozyten. Patientinnen und Patienten mit Zustand nach STEMI hatten einen signifikant größeren Anteil FITC-positiver CD14⁺CD16⁺-Monozyten zu den Zeitpunkten 16 bis 64 Minuten, sowie signifikant höhere MFI zu den Zeitpunkten 32 bis 160 Minuten. CD14⁺CD16⁺-Monozyten von Patientinnen und Patienten mit Zustand nach STEMI zeigten im Verlauf eine 1.9-fach höhere MFI im Vergleich mit Monozyten von Patientinnen und Patienten mit KHK. Die Aufnahmekinetik der Monozyten

für die PFOB-NE durch mögliche Infarkt-assoziierte, systemische inflammatorische Signale von Patientinnen und Patienten mit Infarkt unterscheidet sich im Vergleich zu Monozyten von Patientinnen und Patienten mit KHK. Monozyten von Patientinnen und Patienten nach STEMI zeigten eine verstärkte und beschleunigte Phagozytose verglichen mit Monozyten von Patientinnen und Patienten mit KHK. In der Literatur angegebene Untersuchungen hingegen zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Aufnahme von PFOB-NE zwischen den beiden Patientengruppen und im Vergleich zu Gesunden (Nienhaus et al., 2019). Anders als in der Studie von Nienhaus et al. (2019) wurde in der vorliegenden Arbeit zwischen den Monozytensubpopulationen der Patientengruppen unterschieden. Diese Differenzierung könnte zu signifikanten Unterschieden zwischen den Patientengruppen geführt haben. Der Unterschied zu gesunden Probandinnen und Probanden wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Die weitere Phagozytosefähigkeit der Zellen nach Phagozytose der PFOB-NE bei nicht gesunden Probandinnen und Probanden wurde ebenfalls nicht untersucht. Djurdjevic et al. (2001) konnten zeigen, dass die Fähigkeit mononuklearer Zellen Hefepartikel zu phagozytieren an Tag 0 und 1 nach Myokardinfarkt erhöht ist. Daher wäre anzunehmen, dass sich die Phagozytosefähigkeit von Monozyten nach Aufnahme der PFOB-NE bei Patientinnen und Patienten mit STEMI im Vergleich zu Patientinnen und Patienten mit KHK und Gesunden unterscheidet.

4.3.2 Unterschiede zwischen den Monozytensubpopulationen

Anders als in bisherigen Untersuchungen konnten signifikante Unterschiede im Verhältnis der Monozytensubpopulationen zwischen den Patientengruppen festgestellt werden. Der Anteil der CD14⁺CD16⁻-Monozyten war bei Patientinnen und Patienten nach STEMI zum Zeitpunkt 0 Minuten mit 64.15 % signifikant höher als bei Patientinnen und Patienten mit KHK mit 47.11 %, $p = .024$. Tsujioka et al. (2009) zeigten, dass sich die Zellzahl zwischen Patientinnen und Patienten mit STEMI und KHK für CD14⁺CD16⁻-Monozyten nicht unterscheidet, die CD14⁺CD16⁺-Monozyten bei Patientinnen und Patienten mit STEMI hingegen signifikant reduziert sind. Tapp et al. (2012) und X. Zhou et al. (2016) hingegen stellten signifikant höhere Zellzahlen sowohl für klassische als auch intermediäre Monozyten bei Patientinnen und Patienten mit STEMI fest verglichen mit Gesunden und Patientinnen und Patienten mit KHK. Unterschiede bei den nicht klassischen Monozyten waren nicht signifikant. Die Ergebnisse lassen sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit jedoch nur bedingt vergleichen, da unterschiedliche Auswertungsfenster verwendet und zeitliche Verläufe untersucht wurden und keine Differenzierung der nicht klassischen und intermediären Monozyten vorgenommen wurde. Die CD16⁺-Monozyten wurden hier als eine Subpopulation gezählt. Jedoch sollten die

Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit Vorsicht interpretiert werden, da aufgrund des kleinen Patientenkollektivs und verletzter Voraussetzungen der Analysen die Daten nur explorativ ausgewertet werden konnten. Für aussagekräftigere Ergebnisse sollte die Anzahl der Patientinnen und Patienten in beiden Gruppen erhöht werden. Da CD14⁺CD16⁻-Monozyten mit der Phagozytose in Verbindung gebracht werden (Auffray et al., 2009; Italiani & Boraschi, 2014; Wong et al., 2012), wäre zu erwarten gewesen, dass diese Zellen eine verstärkte Phagozytose von PFOB-NE gemessen an der MFI zeigen verglichen mit CD14⁺CD16⁺-Monozyten. In der vorliegenden Arbeit jedoch war die MFI der CD14⁺CD16⁺-Monozyten trotz des geringeren Anteils sowohl bei Patientinnen und Patienten mit STEMI als auch bei Patientinnen und Patienten mit KHK signifikant höher als die der CD14⁺CD16⁻-Monozyten, jeweils $p = .01$. Nienhaus et al. (2019) hingegen stellten fest, dass klassische (CD14⁺⁺CD16⁻) und intermediäre (CD14⁺⁺CD16⁺) Monozyten eine höhere Phagozytosefähigkeit zeigen im Vergleich zu nicht klassischen Monozyten (CD14⁺CD16⁺⁺). In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch nur zwischen CD14⁺CD16⁻- und CD14⁺CD16⁺-Monozyten unterschieden. Eine Differenzierung zwischen intermediären und nicht klassischen Monozyten fand nicht statt. Da auch intermediäre Monozyten zur Phagozytose in der Lage sind (Cros et al., 2010; Shantsila et al., 2011; Weber et al., 2016) und mit nicht klassischen Monozyten zu einer Zellpopulation zusammengefasst wurden, könnte dies erklären, warum CD14⁺CD16⁺-Monozyten eine höhere Phagozytosefähigkeit zeigten als CD14⁺CD16⁻-Monozyten. Neben einer Erhöhung der Patientenzahl wäre die weitere Differenzierung der CD14⁺CD16⁺-Monozyten nötig. Bei Erhöhung der klassischen und intermediären Monozyten um Tag drei nach STEMI und vermehrter Phagozytose der PFOB-NE durch diese Zellpopulationen, wäre dieser Zeitpunkt ein Ansatzpunkt für die klinische Applikation der PFOB-NE bei Patientinnen und Patienten mit Myokardinfarkt. Aufgrund der teils widersprüchlichen Ergebnisse sollten jedoch weitere Untersuchungen und Meta-Analysen in diesem Bereich durchgeführt werden. Im Tiermodell zeigten sich in der Bildgebung mittels ¹⁹F-MRT signifikante ¹⁹F-Signale im Myokard nach PFOB Injektion an Tag drei nach Myokardinfarkt (Bönner et al., 2015; Rothe et al., 2019). Für die klinische Anwendung wäre eine frühe Gabe von PFOB-NE bei Patientinnen und Patienten mit STEMI daher ideal.

In der Literatur werden die Monozytensubpopulationen nicht nur zu Tag drei, sondern auch zu Tag fünf nach Myokardinfarkt untersucht. Dabei zeigt sich fünf Tage nach Myokardinfarkt ein umgekehrtes Bild mit erhöhten Zellzahlen an CD14⁺CD16⁺-Monozyten und Verringerung der CD14⁺CD16⁻-Monozyten (Tsujioka et al., 2009; van der Laan et al., 2014). An Tag fünf ergeben sich zwischen Patientinnen und Patienten mit STEMI und Patientinnen und Patienten mit KHK keine signifikanten Unterschiede im Anteil der CD14⁺CD16⁻-Monozyten. Jedoch

zeigt sich ein signifikanter Unterschied der CD14⁺CD16⁺-Monozyten zwischen beiden Patientengruppen (Tsujioka et al., 2009). CD14⁺CD16⁺-Monozyten werden anders als CD14⁺CD16⁻-Monozyten nicht mit Phagozytose assoziiert, sondern mit Reparaturmechanismen nach Myokardinfarkt (Shantsila et al., 2011). Es wäre zu vermuten, dass sich, wie in der Literatur angegeben, das Verhältnis der Monozytensubpopulationen zu späteren Zeitpunkten nicht mehr unterscheidet zwischen Patientinnen und Patienten mit Zustand nach STEMI und Patientinnen und Patienten mit KHK. Die Anteile FITC-positiver Zellen und die MFI sollten im Vergleich dann nicht mehr signifikant ausfallen. Weiterführende Untersuchungen sollten einen Vergleich zwischen Tag drei und Tag fünf nach Myokardinfarkt betrachten sowie Unterschiede in der Phagozytose durch die Monozytensubpopulationen zwischen Patientinnen und Patienten mit Myokardinfarkt, mit KHK und auch gesunden Probandinnen und Probanden. Des Weiteren ist die Phagozytose von PFOB-NE bei Patientinnen und Patienten mit unterschiedlichen Erkrankungen wie beispielsweise Pneumonie, Myokarditis und Transplantationsabstoßungen von Interesse. Im Mausmodell konnte bereits gezeigt werden, dass intravenös applizierte PFCs als Kontrastmittel zur Darstellung inflammatorischer Areale bei diesen Erkrankungen genutzt werden können (Ebner et al., 2010; Flögel et al., 2008; Flögel et al., 2011; Galbarz, 2014; Jacoby, Borg, et al., 2014).

Nienhaus et al. (2019) haben gezeigt, dass Monozyten ihre Antigenklassifikation nach der Phagozytose von PFOB-NE beibehalten. In dieser Arbeit jedoch zeigte sich ein signifikanter Unterschied im Anteil der CD14⁺CD16⁻-Monozyten zwischen den Zeitpunkten 0 und 160 Minuten für Patientinnen und Patienten nach STEMI. Auch in diesem Fall könnte die fehlende Differenzierung zwischen intermediären und nicht klassischen Monozyten sowie die Untersuchung von Patientinnen und Patienten mit STEMI statt Gesunden die Ursache für diesen Unterschied sein. Anders als in der Literatur angegeben machten in der vorliegenden Arbeit klassische Monozyten nur 64.16 % an den Gesamtmonozyten aus, nicht klassische Monozyten hingegen 35.84 %. Bisherige Untersuchungen geben diesen Anteil mit 80-90 % für klassische und 10-20 % für nicht klassische Monozyten an (Nienhaus et al., 2019; van der Laan et al., 2014; Wong et al., 2012; Ziegler-Heitbrock et al., 1993). Weiterführende Untersuchungen sollten wie von Weber et al. (2016) vorgeschlagen die CD16⁺-Monozyten durchflusszytometrisch weiter unterscheiden in intermediäre CD14⁺⁺CD16⁺- und nicht klassische CD14⁺CD16⁺⁺-Monozyten. Sie schlagen vor weitere Marker wie CD45, CD86, HLA-DR und CCR2 zu verwenden, um zwischen den CD16⁺-Subpopulationen zu unterscheiden.

4.4 Weiterführende Untersuchungen

Der Aufnahmemechanismus der PFOB-NE wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Da die PFOB-NE hauptsächlich von Monozyten phagozytiert werden und nicht von T-Zellen (Ebner et al., 2010; Jacoby, Borg, et al., 2014; Temme et al., 2012) könnten spezifische Mechanismen und Rezeptoren für die Phagozytose essenziell sein. Nienhaus et al. (2019) konnten zeigen, dass Cytochalasin D, ein Inhibitor der Aktin-Polymerization, die Aufnahme von PFOB-NE nahezu vollständig inhibierte, jedoch nicht die Bindung an Oberflächenproteine der Zellen. Ein Unterschied der MFI zeigte sich ab 32 Minuten. Dies unterstützt, dass das Fluoreszenzsignal von aufgenommenen und nicht von anhaftenden Zellen stammt und die aktive Phagozytose ab Minute 32 beginnt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme von PFOB-NE nach Plasmaentzug und Blockierung des CD11b-Rezeptors signifikant reduziert ist. Dies lässt vermuten, dass komplementabhängige Phagozytose und Opsonierung von Plasmaproteinen an der Aufnahme von PFOB-NE beteiligt sind. Weitere Mechanismen und Rezeptoren sollten für ein besseres Verständnis untersucht werden.

Zudem wäre der Einfluss größerer Zeitspannen auf die Phagozytose von PFOB-NE durch humane Monozyten von Interesse, da Fluoreszenzsignale im ¹⁹F-MRT als Verlaufskontrolle nach Inflammation genutzt werden könnten. So konnte bereits im Tiermodell gezeigt werden, dass die Fluoreszenzsignale nach Entzündung über die Zeit hinweg abnehmen, mit steigender Konzentration jedoch zunehmen. Die Fluoreszenzsignale wurden über mehrere Stunden analysiert. Hier ergab sich eine Halbwertszeit zwischen zwei und 20 Stunden in Abhängigkeit von der Modifizierung der PFC (Flögel et al., 2008; Flögel et al., 2011; Jacoby, Temme, et al., 2014; Temme et al., 2015). Zudem ist der Einfluss verschiedener Konzentrationen von PFOB-NE auf die Phagozytose durch humane Monozyten und die Fluoreszenzintensität bisher nicht untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Konzentration von 1:20 verwendet, im Tiermodell wurden intravenös zwischen 100 und 500 µl bzw. 1 und 3 mmol/kg Körpergewicht bei der Maus und 5 ml/kg Körpergewicht beim Schwein injiziert (Bönner et al., 2014; Bönner et al., 2015; Ebner et al., 2010; Flögel et al., 2008; Rothe et al., 2019; Temme et al., 2015; Temme et al., 2014). Ob sich die Fluoreszenzsignale bei menschlichen Zellen bei verschiedenen Konzentrationen, von denen im Tiermodell unterscheiden und wie sich die Halbwertszeiten in Abhängigkeit verändern ist zu analysieren. Auch verschiedene inflammatorische Erkrankungen könnten einen unterschiedlichen Einfluss auf die Phagozytose der PFOB-NE bei unterschiedlichen Konzentrationen haben und die Funktion der Zellen und die Vitalität beeinflussen, daher sollten sie mit einbezogen werden. Verschiedene Größen, die Geometrie der Partikel und unterschiedliche PFCs sind bei humanen Monozyten bisher nur unzureichend untersucht, wären jedoch für die klinische Translation von Bedeutung, da diese Merkmale einen

Einfluss auf die Phagozytose und die Clearance haben (Amoozgar & Yeo, 2012; Hoshyar, Gray, Han, & Bao, 2016; Moghimi, Hunter, et al., 2012; Moghimi et al., 2001; Moghimi, Parhamifar, et al., 2012).

Zwar konnten Zusammenhänge zwischen der Anzahl intermediärer Monozyten und maximalen Troponinniveau und Plasmazytokinen sowie klassischen Monozyten und der Infarktgröße und der maximalen Anzahl der Monozyten mit CRP und CK gefunden werden (Maekawa et al., 2002; Tapp et al., 2012; van der Laan, Hirsch, et al., 2012), so dass ein Zusammenhang der MFI mit diesen Parametern möglich wäre. Jedoch fanden Nienhaus et al. (2019) keine signifikanten Korrelationen der MFI der Zellen und klinischen Marker wie CK und CRP, Komorbiditäten und der Infarktgröße bei Myokardinfarkt. Eine Korrelation der Laborparameter mit der MFI war in der vorliegenden Arbeit nicht möglich, da fehlende Werte bei Patientinnen und Patienten mit KHK vorhanden waren bzw. einige Parameter nicht erhoben wurden. Für die Berechnung der Korrelationen sollten neben der maximalen MFI der Gesamtzahl der Monozyten wiederum die Subpopulationen unterschieden und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Myokardinfarkt untersucht werden, da diese in unterschiedlichem Maße phagozytieren, die Anzahl sich nach Myokardinfarkt dynamisch verändert und somit Varianz in der MFI zeigen (Auffray et al., 2009; Italiani & Boraschi, 2014; Shantsila et al., 2011; Tapp et al., 2012; Tsujioka et al., 2009; Wong et al., 2012; X. Zhou et al., 2016).

Aufgrund der geringen Probandenzahl war eine Differenzierung nach Geschlecht in der vorliegenden Arbeit nicht möglich. Die natürliche epidemiologische Häufung von Herzinfarkten bei Männern lässt eine unmittelbare Übertragung der Studienergebnisse auf Frauen nicht sicher zu (A. K. Beery & Zucker, 2011; T. A. Beery, 1995; Mann et al., 2015; Spencer & Grace, 2016). Aufschluss über die Geschlechtsspezifität lieferten Studien, die an Frauen und Männern durchgeführt wurden. Es konnte gezeigt werden, dass Männer eine signifikant höhere Leukozyten- und Monozytenzahl haben als Frauen, sowie einen höheren prozentualen Anteil an Monozyten. Zudem zeigten sich signifikante Unterschiede der Zytokinsekretion und der Auflösung von Inflammation zwischen den Geschlechtern (Y. Chen et al., 2016; Lefevre, Corazza, Duchateau, Desir, & Casimir, 2012; Rathod et al., 2017; Starr & Deary, 2011). Auch in der Zusammensetzung der Monozytensubpopulationen zeigten sich Unterschiede. Der Anteil nicht klassischer Monozyten ($CD14^+CD16^{++}$) bei Frauen ist signifikant höher als bei Männern, der Anteil klassischer Monozyten ($CD14^{++}CD16^-$) bei Frauen signifikant reduziert. Für die prozentualen Anteile intermediärer Monozyten ($CD14^{++}CD16^+$) ergaben sich keine geschlechtsbezogenen Unterschiede (Jiang, Zhang, Lang, Li, & Gilkeson, 2014). Bei Frauen zeigt sich zudem eine höhere Phagozytosekapazität als bei

Männern, Männer hingegen zeigen eine höhere Produktion pro-inflammatorischer Zytokine (S. L. Klein & K. L. Flanagan, 2016). Ein Einfluss des Geschlechts auf die Phagozytose der PFOB-NE durch Monozyten und die Funktionalität der Zellen wäre demnach möglich und sinnvoll klinisch zu untersuchen.

4.5 Statistik

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern einen ersten Hinweis auf die Phagozytose von PFOB-NE unter Flussbedingungen, die weitere Phagozytosekapazität der Zellen nach Aufnahme der PFOB-NE und Unterschiede in der Phagozytose bei Patientinnen und Patienten mit STEMI und KHK, sowie Unterschiede in der Phagozytose der verschiedenen Monozytensubpopulationen. Die statistische Auswertung fand jedoch aufgrund der geringen Probandenzahl und der vielen Ausreißer und Extremwerte für alle Versuche explorativ statt. Trotz verletzter Voraussetzungen wurde die parametrische Variante der Tests in einigen Fällen durchgeführt. Daher sind die Ergebnisse mit Vorsicht zu interpretieren. Dennoch zeigten sich für einige Hypothesen signifikante Ergebnisse. Die Anzahl der Probandinnen und Probanden für den ersten Versuch betrug fünf, für den zweiten sechs und für den dritten Versuch insgesamt 16. Fehlende Signifikanzen könnten auf eine zu geringe Probandenzahl zurückzuführen sein. Da bisherige Untersuchungen zur Phagozytose von PFOB-NE durch humane Monozyten nicht vorliegen ließen sich die Effektstärken *a priori* lediglich schätzen. Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche können zur Berechnung der Effektstärken weiterer Untersuchungen herangezogen werden. Die Power lag für die dritte Hypothese zwischen 59 % und 70 %. Cohen (1992) empfiehlt einen Wert von mindestens 80 %. Bei einem α -Fehler von .05 und einer Power von 80 % wären bei den in Kapitel 3.3 angegebenen Effektstärken bei einer gemischten Varianzanalyse durchschnittlich 23 Probandinnen und Probanden nötig, um die Haupteffekte der Gruppenzugehörigkeit für die verschiedenen Zellpopulationen gezielter zu überprüfen. Die Berechnungen wurden mit G-Power durchgeführt (Faul, Erdfelder, Lang, & Buchner, 2007).

Kovariaten, die ebenfalls Einfluss auf die Phagozytose haben könnten und daher betrachtet werden sollten, sind beispielsweise das Alter und das Geschlecht (Bischof et al., 2019; Butcher et al., 2001; Castelo-Branco & Soveral, 2014; Emanuelli et al., 1986; Sabra L Klein & Katie L Flanagan, 2016; Nelson, Warden, & Lenz, 2017; Plowden, Renshaw-Hoelscher, Engleman, Katz, & Sambhara, 2004; Wenisch, Patruta, Daxbock, Krause, & Horl, 2000). Tapp et al. (2012), van der Laan, Hirsch, et al. (2012) und Tsujioka et al. (2009) konnten einen Zusammenhang der Monozytensubpopulationen und dem Troponinspiegel, der CRP und der Creatininkinase-MB zeigen. Daher sollten auch diese Patientencharakteristika in die

Auswertungen mit einbezogen werden. Korrelationen zwischen Patientencharakteristika und der MFI gemessen in der Durchflusszytometrie konnten bisher jedoch nicht bestätigt werden (Nienhaus et al., 2019).

Da es sich bei den Probandinnen und Probanden in der vorliegenden Arbeit lediglich um eine Gelegenheitsstichprobe und keine Zufallsstichprobe handelt haben inferenzstatistische Schlüsse nur eine eingeschränkte Aussagekraft (Gollwitzer & Jäger, 2014). Die Fehlende Normalverteilung, die Heteroskedastizität und Ausreißer führen zudem zu einer Verzerrung des Standardfehlers und somit ebenfalls zu statistischen Fehlschlüssen (Eid, Gollwitzer, & Schmitt, 2015). Des Weiteren wurde die α -Adjustierung nur innerhalb der Tests vorgenommen, jedoch nicht zwischen den Tests, so dass eine Akkumulation des α -Fehlers nicht auszuschließen ist. Die Anzahl der Probandinnen und Probanden wirkt sich auf die Robustheit von Varianzanalysen bei Abweichungen von den Voraussetzungen der Normalverteilung und Homoskedastizität aus. Nach Field (2013) und Döring and Bortz (2016) sind Varianzanalysen erst mit zunehmender Anzahl der Untersuchungseinheiten relativ robust gegenüber Abweichungen der Normalverteilung. Statistische Analysen ab 30 Untersuchungseinheiten sind nach dem zentralen Grenzwerttheorem nicht mehr auf die Normalverteilung der Messwerte angewiesen (Döring & Bortz, 2016). Daher sollten mehr Probandinnen und Probanden in die Analysen eingeschlossen werden oder robustere Verfahren nach Wilcox (2005) angewendet werden.

Darüber hinaus könnte es sinnvoll sein die Phagozytose als Konstrukt zu betrachten, das aus den abhängigen Variablen der MFI und dem prozentualen Anteil FITC-positiver Zellen besteht. In diesem Fall sollte eine multivariate Varianzanalyse durchgeführt werden. Der α -Fehler wäre geringer als bei multiplen Tests, die Teststärke größer und Zusammenhänge zwischen den abhängigen Variablen könnten untersucht werden, (Field, 2013; Huberty & Morris, 1989). Alternativ würde sich eine hierarchische lineare Modellierung mit den Zeitpunkten als unterste Analyseebene anbieten. Diese wäre bei einer größeren Stichprobe auch bei verletzten Voraussetzungen und einzelnen fehlenden Daten durchführbar (Field, 2013)

Für den Umgang mit fehlenden Werten wurde aufgrund der geringen Stichprobengröße ein paarweiser Ausschluss oder die Substitution des fehlenden Wertes mit dem Mittelwert gewählt. Für viele Verfahren wird ein *missing completely at random* oder *missing at random* vorausgesetzt. Dies war jedoch im vorliegenden Fall nicht gegeben, da gehäuft Werte zum Zeitpunkt Null fehlten. Daher könnte es zu verzerrten Schätzungen gekommen sein und es bleibt unklar, welche Stichprobengröße letztendlich zu Grunde gelegt werden kann, was wiederum zu nicht akkuraten Schätzungen der Standardfehler führt. Der paarweise Ausschluss ist nach Lüdtke, Robitzsch, Trautwein, and Köller (2007) nicht empfehlenswert. Die

Parameterschätzungen sind verzerrt und weniger effizient und die Power ist geringer. Die Substitution mit dem Mittelwert verringert die Varianz und wird nach Graham, Cumsille, and Shevock (2012) und Lüdtke et al. (2007) ebenfalls nicht empfohlen. Bei größeren Stichproben sollten imputationsbasierte Verfahren wie die multiple Imputation oder modellbasierte Verfahren wie die *Full Information Maximum Likelihood* Methode verwendet werden. Bei diesen Methoden werden fehlende Werte durch sinnvolle Schätzungen ersetzt bzw. in der Analyse berücksichtigt. *Missing at random* wird dabei vorausgesetzt. Hilfsvariablen wie die oben genannten Patientencharakteristika führen dabei zu einer besseren Schätzung der Parameter (Lüdtke et al., 2007).

4.6 Fazit

Da die ¹⁹F-MRT bereits Möglichkeiten zur Bildgebung inflammatorischer Prozesse im Tiermodell gezeigt hat (Bönner et al., 2015; Rothe et al., 2019), könnten die Befunde dieser Arbeit relevant für eine spätere Translation sein. Gesunde Probandinnen und Probanden sowie Patientinnen und Patienten mit STEMI und stabiler KHK wurden untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Monozyten die PFOB-NE unter Flussbedingungen aufnehmen, die weitere Phagozytosefähigkeit der Zellen nach Aufnahme der PFOB-NE nicht eingeschränkt ist und es Unterschiede zwischen den Patientengruppen bei der Phagozytose gibt.

Trotz statistischer Schwächen bieten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit eine erste Grundlage für weitere Forschungsarbeiten. Weitere Untersuchungen zu den Aufnahmemechanismen, den Effekten der Größe und Konzentration der Partikel sowie zu anderen inflammatorischen Erkrankungen und unter optimierten Flussbedingungen werden benötigt, um den Einfluss auf die Phagozytose der PFOB-NE durch humane Monozyten zu untersuchen.

5 Literaturverzeichnis

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2019). *Basic Immunology E-Book: Functions and Disorders of the Immune System*: Elsevier Health Sciences.
- Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., & Nalbant, A. (2017). Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol*, 37(2), 163-176. doi:10.3109/07388551.2015.1128876
- Adonai, N., Adonai, N., Nguyen, K. N., Walsh, J., Iyer, M., Toyokuni, T., . . . Gambhir, S. S. (2002). Ex vivo cell labeling with ⁶⁴Cu-pyruvaldehyde-bis(N4-methylthiosemicarbazone) for imaging cell trafficking in mice with positron-emission tomography. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(5), 3030-3035. doi:10.1073/pnas.052709599
- Ahn, K. T., Song, Y. B., Choe, Y. H., Yang, J. H., Hahn, J. Y., Choi, J. H., . . . Gwon, H. C. (2013). Impact of transmural necrosis on left ventricular remodeling and clinical outcomes in patients undergoing primary percutaneous coronary intervention for ST-segment elevation myocardial infarction. *Int J Cardiovasc Imaging*, 29(4), 835-842. doi:10.1007/s10554-012-0155-9
- Ahrens, E. T., Flores, R., Xu, H., & Morel, P. A. (2005). In vivo imaging platform for tracking immunotherapeutic cells. *Nat Biotechnol*, 23(8), 983-987. doi:10.1038/nbt1121
- Akira, S., Takeda, K., & Kaisho, T. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol*, 2(8), 675-680. doi:10.1038/90609
- Alam, S. R., Shah, A. S., Richards, J., Lang, N. N., Barnes, G., Joshi, N., . . . Semple, S. I. (2012). Ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide in patients with acute myocardial infarction: early clinical experience. *Circ Cardiovasc Imaging*, 5(5), 559-565. doi:10.1161/CIRCIMAGING.112.974907
- Albus, C., Barkhausen, J., Fleck, E., Haasenritter, J., Lindner, O., & Silber, S. (2017). The Diagnosis of Chronic Coronary Heart Disease. *Dtsch Arztebl Int*, 114(42), 712-719. doi:10.3238/arztebl.2017.0712
- Allen, L. A., & Aderem, A. (1996). Molecular definition of distinct cytoskeletal structures involved in complement- and Fc receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *J Exp Med*, 184(2), 627-637. doi:10.1084/jem.184.2.627
- Allen, L. H., & Aderem, A. (1995). A role for MARCKS, the alpha isozyme of protein kinase C and myosin I in zymosan phagocytosis by macrophages. *J Exp Med*, 182(3), 829-840. doi:10.1084/jem.182.3.829
- Allen, T. M., Brandeis, E., Hansen, C. B., Kao, G. Y., & Zalipsky, S. (1995). A new strategy for attachment of antibodies to sterically stabilized liposomes resulting in efficient targeting to cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1237(2), 99-108. doi:10.1016/0005-2736(95)00085-h
- Allport, J. R., Muller, W. A., & Luscinskas, F. W. (2000). Monocytes induce reversible focal changes in vascular endothelial cadherin complex during transendothelial migration under flow. *J Cell Biol*, 148(1), 203-216. doi:10.1083/jcb.148.1.203
- AMBOSS GmbH. (2022). Myokardinfarkt. Retrieved from <https://www.amboss.com/de/wissen/Myokardinfarkt/>
- Amoozgar, Z., & Yeo, Y. (2012). Recent advances in stealth coating of nanoparticle drug delivery systems. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 4(2), 219-233. doi:10.1002/wnan.1157
- Ancuta, P., Moses, A., & Gabuzda, D. (2004). Transendothelial migration of CD16+ monocytes in response to fractalkine under constitutive and inflammatory conditions. *Immunobiology*, 209(1-2), 11-20. doi:10.1016/j.imbio.2004.04.001
- Ancuta, P., Rao, R., Moses, A., Mehle, A., Shaw, S. K., Luscinskas, F. W., & Gabuzda, D. (2003). Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes. *J Exp Med*, 197(12), 1701-1707. doi:10.1084/jem.20022156

- Ancuta, P., Weiss, L., & Haeffner-Cavaillon, N. (2000). CD14+CD16++ cells derived in vitro from peripheral blood monocytes exhibit phenotypic and functional dendritic cell-like characteristics. *European Journal of Immunology*, *30*(7), 1872-1883. doi:10.1002/1521-4141(200007)30:7<1872::Aid-immu1872>3.0.Co;2-2
- Antman, E. M. (2008). Time is muscle: translation into practice. *J Am Coll Cardiol*, *52*(15), 1216-1221. doi:10.1016/j.jacc.2008.07.011
- Antman, E. M., Anbe, D. T., Armstrong, P. W., Bates, E. R., Green, L. A., Hand, M., . . . Canadian Cardiovascular, S. (2004). ACC/AHA guidelines for the management of patients with ST-elevation myocardial infarction--executive summary. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to revise the 1999 guidelines for the management of patients with acute myocardial infarction). *J Am Coll Cardiol*, *44*(3), 671-719. doi:10.1016/j.jacc.2004.07.002
- Arnett, D. K., Blumenthal, R. S., Albert, M. A., Buroker, A. B., Goldberger, Z. D., Hahn, E. J., . . . Ziaeian, B. (2019). 2019 ACC/AHA Guideline on the Primary Prevention of Cardiovascular Disease: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Circulation*, *140*(11), e596-e646. doi:10.1161/CIR.0000000000000678
- Auffray, C., Sieweke, M. H., & Geissmann, F. (2009). Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, *27*, 669-692. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132557
- Bae, P. K., Jung, J., Lim, S. J., Kim, D., Kim, S. K., & Chung, B. H. (2013). Bimodal perfluorocarbon nanoemulsions for nasopharyngeal carcinoma targeting. *Mol Imaging Biol*, *15*(4), 401-410. doi:10.1007/s11307-013-0622-2
- Baenkler, H.-W., Goldschmidt, H., Hahn, J.-M., Hinterseer, M., & Knez, A. (2015). Kardiologie und Angiologie. In M. Hinterseer & A. Knez (Eds.), *Kurzlehrbuch Innere Medizin* (Vol. 3). Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Baines, C. P. (2009). The mitochondrial permeability transition pore and ischemia-reperfusion injury. *Basic Res Cardiol*, *104*(2), 181-188. doi:10.1007/s00395-009-0004-8
- Balducci, A., Helfer, B. M., Ahrens, E. T., O'Hanlon, C. F., 3rd, & Wesa, A. K. (2012). Visualizing arthritic inflammation and therapeutic response by fluorine-19 magnetic resonance imaging (19F MRI). *J Inflamm (Lond)*, *9*(1), 24. doi:10.1186/1476-9255-9-24
- Bavry, A. A., & Bhatt, D. L. (2009). *Acute coronary syndromes in clinical practice* (Vol. 1). London: Springer-Verlag.
- Beery, A. K., & Zucker, I. (2011). Sex bias in neuroscience and biomedical research. *Neurosci Biobehav Rev*, *35*(3), 565-572. doi:10.1016/j.neubiorev.2010.07.002
- Beery, T. A. (1995). Gender bias in the diagnosis and treatment of coronary artery disease. *Heart & Lung*, *24*(6), 427-435. doi:10.1016/s0147-9563(95)80020-4
- Belge, K. U., Dayyani, F., Horelt, A., Siedlar, M., Frankenberger, M., Frankenberger, B., . . . Ziegler-Heitbrock, L. (2002). The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol*, *168*(7), 3536-3542. doi:10.4049/jimmunol.168.7.3536
- Benita, S. (1998). *Submicron emulsions in drug targeting and delivery* (Vol. 9): CRC Press.
- Benoit, M. R., Conant, C. G., Ionescu-Zanetti, C., Schwartz, M., & Matin, A. (2010). New device for high-throughput viability screening of flow biofilms. *Appl Environ Microbiol*, *76*(13), 4136-4142. doi:10.1128/AEM.03065-09
- Bentzon, J. F., Otsuka, F., Virmani, R., & Falk, E. (2014). Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circ Res*, *114*(12), 1852-1866. doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.302721
- Bertilla, S. M., Thomas, J. L., Marie, P., & Krafft, M. P. (2004). Cosurfactant effect of a semifluorinated alkane at a fluorocarbon/water interface: impact on the stabilization of

- fluorocarbon-in-water emulsions. *Langmuir*, 20(10), 3920-3924. doi:10.1021/la036381m
- Biasucci, L. M., Vitelli, A., Liuzzo, G., Altamura, S., Caligiuri, G., Monaco, C., . . . Maseri, A. (1996). Elevated levels of interleukin-6 in unstable angina. *Circulation*, 94(5), 874-877. doi:10.1161/01.cir.94.5.874
- Bischof, J., Gärtner, F., Zeiser, K., Kunz, R., Schreiner, C., Hoffer, E., . . . Zimecki, M. (2019). Immune cells and immunosenescence. *Folia biologica*, 65(2), 53-63.
- Bjerknes, R., & Bassoe, C. F. (1983). Human leukocyte phagocytosis of zymosan particles measured by flow cytometry. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand C*, 91(5), 341-348.
- Blackwell, J. E., Dagia, N. M., Dickerson, J. B., Berg, E. L., & Goetz, D. J. (2001). Ligand Coated Nanosphere Adhesion to E- and P-Selectin under Static and Flow Conditions. *Annals of Biomedical Engineering*, 29(6), 523-533. doi:10.1114/1.1376697
- Bondeson, J., Browne, K. A., Brennan, F. M., Foxwell, B. M., & Feldmann, M. (1999). Selective regulation of cytokine induction by adenoviral gene transfer of IkappaBalpha into human macrophages: lipopolysaccharide-induced, but not zymosan-induced, proinflammatory cytokines are inhibited, but IL-10 is nuclear factor-kappaB independent. *The Journal of Immunology*, 162(5), 2939-2945.
- Bönnner, F., Jacoby, C., Temme, S., Borg, N., Ding, Z., Schrader, J., & Floegel, U. (2014). Multifunctional MR monitoring of the healing process after myocardial infarction. *Basic Res Cardiol*, 109(5), 430. doi:10.1007/s00395-014-0430-0
- Bönnner, F., Merx, M. W., Klingel, K., Begovatz, P., Floegel, U., Sager, M., . . . Schrader, J. (2015). Monocyte imaging after myocardial infarction with 19F MRI at 3 T: a pilot study in explanted porcine hearts. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*, 16(6), 612-620. doi:10.1093/ehjci/jev008
- Bonvini, R. F., Hendiri, T., & Camenzind, E. (2005). Inflammatory response post-myocardial infarction and reperfusion: a new therapeutic target? *European Heart Journal Supplements*, 7(suppl_1), I27-I36. doi:10.1093/eurheartj/sui077
- Brown, G. D., & Gordon, S. (2001). Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. *Nature*, 413(6851), 36-37. doi:10.1038/35092620
- Buffon, A., Biasucci, L. M., Liuzzo, G., D'Onofrio, G., Crea, F., & Maseri, A. (2002). Widespread Coronary Inflammation in Unstable Angina. *New England Journal of Medicine*, 347(1), 5-12. doi:10.1056/NEJMoa012295
- Burke, A. P., Kolodgie, F. D., Farb, A., Weber, D. K., Malcom, G. T., Smialek, J., & Virmani, R. (2001). Healed plaque ruptures and sudden coronary death: evidence that subclinical rupture has a role in plaque progression. *Circulation*, 103(7), 934-940. doi:10.1161/01.cir.103.7.934
- Burke, A. P., Tracy, R. P., Kolodgie, F., Malcom, G. T., Zieske, A., Kutys, R., . . . Virmani, R. (2002). Elevated C-reactive protein values and atherosclerosis in sudden coronary death: association with different pathologies. *Circulation*, 105(17), 2019-2023. doi:10.1161/01.cir.0000015507.29953.38
- Busse, R., & Fleming, I. (1998). Pulsatile stretch and shear stress: physical stimuli determining the production of endothelium-derived relaxing factors. *J Vasc Res*, 35(2), 73-84. doi:10.1159/000025568
- Butcher, S. K., Chahal, H., Nayak, L., Sinclair, A., Henriquez, N. V., Sapey, E., . . . Lord, J. M. (2001). Senescence in innate immune responses: reduced neutrophil phagocytic capacity and CD16 expression in elderly humans. *Journal of Leukocyte Biology*, 70(6). doi:10.1189/jlb.70.6.881
- Castelo-Branco, C., & Soveral, I. (2014). The immune system and aging: a review. *Gynecol Endocrinol*, 30(1), 16-22. doi:10.3109/09513590.2013.852531
- Champion, J. A., & Mitragotri, S. (2006). Role of target geometry in phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(13), 4930-4934. doi:10.1073/pnas.0600997103

- Chan, A. W., Kornder, J., Elliott, H., Brown, R. I., Dorval, J. F., Charania, J., . . . Simkus, G. J. (2012). Improved survival associated with pre-hospital triage strategy in a large regional ST-segment elevation myocardial infarction program. *JACC: Cardiovascular Interventions*, 5(12), 1239-1246. doi:10.1016/j.jcin.2012.07.013
- Chen, G. Y., & Nuñez, G. (2010). Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nature Reviews Immunology*, 10(12), 826-837. doi:10.1038/nri2873
- Chen, W., & Frangogiannis, N. G. (2013). Fibroblasts in post-infarction inflammation and cardiac repair. *Biochim Biophys Acta*, 1833(4), 945-953. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.08.023
- Chen, Y., Zhang, Y., Zhao, G., Chen, C., Yang, P., Ye, S., & Tan, X. (2016). Difference in Leukocyte Composition between Women before and after Menopausal Age, and Distinct Sexual Dimorphism. *PLoS One*, 11(9), e0162953. doi:10.1371/journal.pone.0162953
- Christia, P., & Frangogiannis, N. G. (2013). Targeting inflammatory pathways in myocardial infarction. *Eur J Clin Invest*, 43(9), 986-995. doi:10.1111/eci.12118
- Chu, H. X., Kim, H. A., Lee, S., Broughton, B. R. S., Drummond, G. R., & Sobey, C. G. (2016). Evidence of CCR2-independent transmigration of Ly6C(hi) monocytes into the brain after permanent cerebral ischemia in mice. *Brain Res*, 1637, 118-127. doi:10.1016/j.brainres.2016.02.030
- Cleutjens, J. P., Verluyten, M. J., Smiths, J. F., & Daemen, M. J. (1995). Collagen remodeling after myocardial infarction in the rat heart. *Am J Pathol*, 147(2), 325-338.
- Cohen, J. (1992). Statistical power analysis. *Current directions in psychological science*, 1(3), 98-101.
- Corti, M. C., Salive, M. E., & Guralnik, J. M. (1996). Serum albumin and physical function as predictors of coronary heart disease mortality and incidence in older persons. *Journal of clinical epidemiology*, 49(5), 519-526. doi:10.1016/0895-4356(95)00562-5
- Cros, J., Cagnard, N., Woollard, K., Patey, N., Zhang, S. Y., Senechal, B., . . . Geissmann, F. (2010). Human CD14^{dim} monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity*, 33(3), 375-386. doi:10.1016/j.immuni.2010.08.012
- Cuzzocrea, S., Zingarelli, B., O'Connor, M., Salzman, A. L., Caputi, A. P., & Szabo, C. (1997). Role of peroxynitrite and activation of poly (ADP-ribose) synthase in the vascular failure induced by zymosan-activated plasma. *Br J Pharmacol*, 122(3), 493-503. doi:10.1038/sj.bjp.0701387
- Daum, T., & Rohrbach, M. S. (1992). Zymosan induces selective release of arachidonic acid from rabbit alveolar macrophages via stimulation of a β -glucan receptor. *FEBS Letters*, 309(2), 119-122. doi:10.1016/0014-5793(92)81077-y
- Dayyani, F., Belge, K. U., Frankenberger, M., Mack, M., Berki, T., & Ziegler-Heitbrock, L. (2003). Mechanism of glucocorticoid-induced depletion of human CD14⁺CD16⁺ monocytes. *J Leukoc Biol*, 74(1), 33-39. doi:10.1189/jlb.1202612
- Dayyani, F., Joenig, A., Ziegler-Heitbrock, L., Schmidmaier, R., Straka, C., Emmerich, B., & Meinhardt, G. (2004). Autologous stem-cell transplantation restores the functional properties of CD14⁺CD16⁺ monocytes in patients with myeloma and lymphoma. *J Leukoc Biol*, 75(2), 207-213. doi:10.1189/jlb.0803386
- de Lemos, J. A., Morrow, D. A., Blazing, M. A., Jarolim, P., Wiviott, S. D., Sabatine, M. S., . . . Braunwald, E. (2007). Serial measurement of monocyte chemoattractant protein-1 after acute coronary syndromes: results from the A to Z trial. *J Am Coll Cardiol*, 50(22), 2117-2124. doi:10.1016/j.jacc.2007.06.057
- Decuzzi, P., Godin, B., Tanaka, T., Lee, S. Y., Chiappini, C., Liu, X., & Ferrari, M. (2010). Size and shape effects in the biodistribution of intravascularly injected particles. *J Control Release*, 141(3), 320-327. doi:10.1016/j.jconrel.2009.10.014

- Decuzzi, P., Pasqualini, R., Arap, W., & Ferrari, M. (2009). Intravascular delivery of particulate systems: does geometry really matter? *Pharm Res*, *26*(1), 235-243. doi:10.1007/s11095-008-9697-x
- Del Re, D. P., Amgalan, D., Linkermann, A., Liu, Q., & Kitsis, R. N. (2019). Fundamental Mechanisms of Regulated Cell Death and Implications for Heart Disease. *Physiol Rev*, *99*(4), 1765-1817. doi:10.1152/physrev.00022.2018
- Devitt, A., Moffatt, O. D., Raykundalia, C., Capra, J. D., Simmons, D. L., & Gregory, C. D. (1998). Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature*, *392*(6675), 505-509. doi:10.1038/33169
- Dewald, O., Zymek, P., Winkelmann, K., Koerting, A., Ren, G., Abou-Khamis, T., . . . Frangogiannis, N. G. (2005). CCL2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts. *Circ Res*, *96*(8), 881-889. doi:10.1161/01.RES.0000163017.13772.3a
- Di Carlo, F. J., & Fiore, J. V. (1958). On the composition of zymosan. *Science*, *127*(3301), 756-757.
- Dillon, S., Agrawal, S., Banerjee, K., Letterio, J., Denning, T. L., Oswald-Richter, K., . . . Pulendran, B. (2006). Yeast zymosan, a stimulus for TLR2 and dectin-1, induces regulatory antigen-presenting cells and immunological tolerance. *J Clin Invest*, *116*(4), 916-928. doi:10.1172/JCI27203
- Djaldetti, M., & Bessler, H. (2015). High temperature affects the phagocytic activity of human peripheral blood mononuclear cells. *Scand J Clin Lab Invest*, *75*(6), 482-486. doi:10.3109/00365513.2015.1052550
- Djurdjevic, P. M., Arsenijevic, N. N., Baskic, D. D., Djukic, A. L., Popovic, S., & Samardzic, G. (2001). Systemic response of peripheral blood leukocytes and their phagocytic activity during acute myocardial infarction. *Experimental & Clinical Cardiology*, *6*(3), 159-166.
- Dobaczewski, M., Xia, Y., Bujak, M., Gonzalez-Quesada, C., & Frangogiannis, N. G. (2010). CCR5 signaling suppresses inflammation and reduces adverse remodeling of the infarcted heart, mediating recruitment of regulatory T cells. *Am J Pathol*, *176*(5), 2177-2187. doi:10.2353/ajpath.2010.090759
- Döring, N., & Bortz, J. (2016). *Forschungsmethoden und Evaluation in den Sozial-und Humanwissenschaften* (Vol. 5). Berlin Springer-Verlag.
- dos Santos, T., Varela, J., Lynch, I., Salvati, A., & Dawson, K. A. (2011). Quantitative assessment of the comparative nanoparticle-uptake efficiency of a range of cell lines. *Small*, *7*(23), 3341-3349. doi:10.1002/sml.201101076
- Dreyer, W. J., Michael, L. H., West, M. S., Smith, C. W., Rothlein, R., Rossen, R. D., . . . Entman, M. L. (1991). Neutrophil accumulation in ischemic canine myocardium. Insights into time course, distribution, and mechanism of localization during early reperfusion. *Circulation*, *84*(1), 400-411. doi:10.1161/01.cir.84.1.400
- Dutta, P., & Nahrendorf, M. (2015). Monocytes in myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *35*(5), 1066-1070. doi:10.1161/ATVBAHA.114.304652
- Ebner, B., Behm, P., Jacoby, C., Burghoff, S., French, B. A., Schrader, J., & Fogel, U. (2010). Early assessment of pulmonary inflammation by 19F MRI in vivo. *Circ Cardiovasc Imaging*, *3*(2), 202-210. doi:10.1161/CIRCIMAGING.109.902312
- Ehmke, H. (2019). Das Gefäßsystem. In H.-C. Pape, A. Kurtz, & S. Silbernagl (Eds.), *Physiologie* (9., vollständig überarbeitete Auflage ed., Vol. 9). Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Eid, M., Gollwitzer, M., & Schmitt, M. (2015). *Statistik und Forschungsmethoden: Mit Online-Materialien* (Vol. 4. überarbeitete und erweiterte). Weinheim, Basel: Beltz.
- Elmaleh, D. R., Fischman, A. J., Tawakol, A., Zhu, A., Shoup, T. M., Hoffmann, U., . . . Zamecnik, P. C. (2006). Detection of inflamed atherosclerotic lesions with diadenosine-

- 5',5'''-P₁P₄-tetrphosphate (Ap₄A) and positron-emission tomography. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(43), 15992-15996. doi:10.1073/pnas.0607246103
- Emanuelli, G., Lanzio, M., Anfossi, T., Romano, S., Anfossi, G., & Calcamuggi, G. (1986). Influence of age on polymorphonuclear leukocytes in vitro: phagocytic activity in healthy human subjects. *Gerontology*, 32(6), 308-316. doi:10.1159/000212809
- Erdmann, E. (2005). *Klinische Kardiologie: Krankheiten des Herzens, des Kreislaufs und der herznahen Gefäße* (Vol. 6). Heidelberg: Springer-Verlag.
- Erdmann, E. (2011). *Klinische Kardiologie: Krankheiten des Herzens, des Kreislaufs und der herznahen Gefäße*: Springer-Verlag.
- Estrada, A., Yun, C.-H., Kessel, A. V., Li, B., Hauta, S., & Laarveld, B. (1997). Immunomodulatory activities of oat β -glucan in vitro and in vivo. *Microbiology and immunology*, 41(12), 991-998. doi:10.1111/j.1348-0421.1997.tb01959.x
- Eyre, D. R. (1980). Collagen: molecular diversity in the body's protein scaffold. *Science*, 207(4437), 1315-1322.
- Ezekowitz, R. A., Sastry, K., Bailly, P., & Warner, A. (1990). Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeasts in Cos-1 cells. *J Exp Med*, 172(6), 1785-1794. doi:10.1084/jem.172.6.1785
- Ezekowitz, R. A., Sim, R. B., Hill, M., & Gordon, S. (1984). Local opsonization by secreted macrophage complement components. Role of receptors for complement in uptake of zymosan. *J Exp Med*, 159(1), 244-260. doi:10.1084/jem.159.1.244
- Ezekowitz, R. A., Sim, R. B., MacPherson, G. G., & Gordon, S. (1985). Interaction of human monocytes, macrophages, and polymorphonuclear leukocytes with zymosan in vitro. Role of type 3 complement receptors and macrophage-derived complement. *J Clin Invest*, 76(6), 2368-2376. doi:10.1172/JCI112249
- Farr, T. D., Seehafer, J. U., Nelles, M., & Hoehn, M. (2011). Challenges towards MR imaging of the peripheral inflammatory response in the subacute and chronic stages of transient focal ischemia. *NMR Biomed*, 24(1), 35-45. doi:10.1002/nbm.1553
- Faul, F., Erdfelder, E., Lang, A. G., & Buchner, A. (2007). G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behavior Research Methods*, 39(2), 175-191. doi:10.3758/bf03193146
- Field, A. (2013). *Discovering statistics using IBM SPSS Statistics* (4 ed.). London: Sage Publications Ltd.
- Finger, E. B., Puri, K. D., Alon, R., Lawrence, M. B., von Andrian, U. H., & Springer, T. A. (1996). Adhesion through L-selectin requires a threshold hydrodynamic shear. *Nature*, 379(6562), 266-269. doi:10.1038/379266a0
- Fingerle-Rowson, G., Angstwurm, M., Andreesen, R., & Ziegler-Heitbrock, H. W. (1998). Selective depletion of CD14⁺ CD16⁺ monocytes by glucocorticoid therapy. *Clin Exp Immunol*, 112(3), 501-506. doi:10.1046/j.1365-2249.1998.00617.x
- Fingerle, G., Pforte, A., Passlick, B., Blumenstein, M., Strobel, M., & Zieglerheitbrock, H. W. L. (1993). The Novel Subset of Cd14⁺/Cd16⁺ Blood Monocytes Is Expanded in Sepsis Patients. *Blood*, 82(10), 3170-3176.
- Flögel, U., Burghoff, S., van Lent, P. L., Temme, S., Galbarz, L., Ding, Z., . . . Schrader, J. (2012). Selective activation of adenosine A_{2A} receptors on immune cells by a CD73-dependent prodrug suppresses joint inflammation in experimental rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med*, 4(146), 146ra108. doi:10.1126/scitranslmed.3003717
- Flögel, U., Ding, Z., Hardung, H., Jander, S., Reichmann, G., Jacoby, C., . . . Schrader, J. (2008). In vivo monitoring of inflammation after cardiac and cerebral ischemia by fluorine magnetic resonance imaging. *Circulation*, 118(2), 140-148. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.737890

- Flögel, U., Su, S., Kreideweiss, I., Ding, Z., Galbarz, L., Fu, J., . . . Schrader, J. (2011). Noninvasive detection of graft rejection by in vivo (19) F MRI in the early stage. *Am J Transplant*, *11*(2), 235-244. doi:10.1111/j.1600-6143.2010.03372.x
- Floyd, K. C., Yarzebski, J., Spencer, F. A., Lessard, D., Dalen, J. E., Alpert, J. S., . . . Goldberg, R. J. (2009). A 30-year perspective (1975-2005) into the changing landscape of patients hospitalized with initial acute myocardial infarction: Worcester Heart Attack Study. *Circulation: Cardiovascular Quality and Outcomes*, *2*(2), 88-95. doi:10.1161/CIRCOUTCOMES.108.811828
- Fluxion BioSciences. BioFlux flow rate, velocity, and run time calculator. Retrieved from <https://bioflux.fluxionbio.com/library-docs/2016/9/2/bioflux-flow-rate-velocity-and-run-time-calculator>
- Fluxion BioSciences. BIOFLUX™200 Automated microfluidic system for live cell imaging. Retrieved from https://static1.squarespace.com/static/57c9f47bbe65946223f07f86/t/57cfla572e69cf96e1c51e5c/1473190491201/bioflux_200_user%27s_guide_rev_a.pdf
- Fluxion Biosciences. (2008a). BioFlux™200 Automated solution for live cell assays under shear flow. Retrieved from https://static1.squarespace.com/static/57c9f47bbe65946223f07f86/t/5c378ad621c67cb e2d45d57d/1547143895782/bioflux_bf200productdatasheet_1019-02.pdf
- Fluxion BioSciences. (2008b). Cellular monolayers Growing mammalian cells in the BioFlux microfluidic channels. Retrieved from <https://il-biosystems.com/media/pdf/ed/8e/64/Cellular-Monolayer-in-microfluidic-channels.pdf>
- Fogg, D. K., Sibon, C., Miled, C., Jung, S., Aucouturier, P., Littman, D. R., . . . Geissmann, F. (2006). A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science*, *311*(5757), 83-87. doi:10.1126/science.1117729
- Fox, K. A., Steg, P. G., Eagle, K. A., Goodman, S. G., Anderson, F. A., Jr., Granger, C. B., . . . Grace Investigators. (2007). Decline in rates of death and heart failure in acute coronary syndromes, 1999-2006. *JAMA*, *297*(17), 1892-1900. doi:10.1001/jama.297.17.1892
- Frangogiannis, N. G. (2000). Myofibroblasts in reperfused myocardial infarcts express the embryonic form of smooth muscle myosin heavy chain (SMemb). *Cardiovascular Research*, *48*(1), 89-100. doi:10.1016/s0008-6363(00)00158-9
- Frangogiannis, N. G. (2002). The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovascular Research*, *53*(1), 31-47. doi:10.1016/s0008-6363(01)00434-5
- Frangogiannis, N. G. (2006). The Mechanistic Basis of Infarct Healing. *Antioxidants & Redox Signaling*, *8*(11-12), 1907-1939. doi:10.1089/ars.2006.8.1907
- Frangogiannis, N. G. (2007). Chemokines in ischemia and reperfusion. *Thrombosis and Haemostasis*, *97*(05), 738-747. doi:10.1160/th07-01-0022
- Frangogiannis, N. G. (2008). The immune system and cardiac repair. *Pharmacol Res*, *58*(2), 88-111. doi:10.1016/j.phrs.2008.06.007
- Frangogiannis, N. G. (2012). Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. *Circ Res*, *110*(1), 159-173. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.243162
- Frangogiannis, N. G., Ren, G., Dewald, O., Zymek, P., Haudek, S., Koerting, A., . . . Entman, M. L. (2005). Critical role of endogenous thrombospondin-1 in preventing expansion of healing myocardial infarcts. *Circulation*, *111*(22), 2935-2942. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.510354
- Frankenberger, M., Sternsdorf, T., Pechumer, H., Pforte, A., & Ziegler-Heitbrock, H. W. (1996). Differential cytokine expression in human blood monocyte subpopulations: a polymerase chain reaction analysis. *Blood*, *87*(1), 373-377.
- Frantz, S., Bauersachs, J., & Ertl, G. (2009). Post-infarct remodelling: contribution of wound healing and inflammation. *Cardiovascular Research*, *81*(3), 474-481. doi:10.1093/cvr/cvn292

- Frantz, S., Hofmann, U., Fraccarollo, D., Schafer, A., Kranepuhl, S., Hagedorn, I., . . . Bauersachs, J. (2013). Monocytes/macrophages prevent healing defects and left ventricular thrombus formation after myocardial infarction. *FASEB J*, *27*(3), 871-881. doi:10.1096/fj.12-214049
- Freire, M. G., Dias, A. M., Coelho, M. A., Coutinho, J. A., & Marrucho, I. M. (2005). Aging mechanisms of perfluorocarbon emulsions using image analysis. *J Colloid Interface Sci*, *286*(1), 224-232. doi:10.1016/j.jcis.2004.12.036
- Friedman, G. D., Klatsky, A. L., & Siegelau, A. B. (1974). The leukocyte count as a predictor of myocardial infarction. *N Engl J Med*, *290*(23), 1275-1278. doi:10.1056/NEJM197406062902302
- Fu, X., Ohta, S., Kamihira, M., Sakai, Y., & Ito, T. (2019). Size-Controlled Preparation of Microsized Perfluorocarbon Emulsions as Oxygen Carriers via the Shirasu Porous Glass Membrane Emulsification Technique. *Langmuir*, *35*(11), 4094-4100. doi:10.1021/acs.langmuir.9b00194
- Galbarz, L. (2014). *19F-MR-Bildgebung zur nicht-invasiven Darstellung entzündlicher Prozesse bei Organabstoßung und Arthritis*. (Dissertation), Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf.
- Garcia-Dorado, D., Ruiz-Meana, M., Inserte, J., Rodriguez-Sinovas, A., & Piper, H. M. (2012). Calcium-mediated cell death during myocardial reperfusion. *Cardiovasc Res*, *94*(2), 168-180. doi:10.1093/cvr/cvs116
- Geissmann, F., Jung, S., & Littman, D. R. (2003). Blood Monocytes Consist of Two Principal Subsets with Distinct Migratory Properties. *Immunity*, *19*(1), 71-82. doi:10.1016/s1074-7613(03)00174-2
- Gersh, B. J., Stone, G. W., White, H. D., & Holmes, D. R., Jr. (2005). Pharmacological facilitation of primary percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction: is the slope of the curve the shape of the future? *JAMA*, *293*(8), 979-986. doi:10.1001/jama.293.8.979
- Ghattas, A., Griffiths, H. R., Devitt, A., Lip, G. Y., & Shantsila, E. (2013). Monocytes in coronary artery disease and atherosclerosis: where are we now? *J Am Coll Cardiol*, *62*(17), 1541-1551. doi:10.1016/j.jacc.2013.07.043
- Giraudeau, C., Djemai, B., Ghaly, M. A., Boumezbeur, F., Meriaux, S., Robert, P., . . . Valette, J. (2012). High sensitivity 19F MRI of a perfluorooctyl bromide emulsion: application to a dynamic biodistribution study and oxygen tension mapping in the mouse liver and spleen. *NMR Biomed*, *25*(4), 654-660. doi:10.1002/nbm.1781
- Giraudeau, C., Geffroy, F., Meriaux, S., Boumezbeur, F., Robert, P., Port, M., . . . Valette, J. (2013). 19F molecular MR imaging for detection of brain tumor angiogenesis: in vivo validation using targeted PFOB nanoparticles. *Angiogenesis*, *16*(1), 171-179. doi:10.1007/s10456-012-9310-0
- Gödecke, A., Schrader, J., & Kelm, M. (2019). Das Herz. In H.-C. Pape, A. Kurtz, & S. Silbernagl (Eds.), *Physiologie* (Vol. 9., vollständig überarbeitete Auflage). Stuttgart: Thieme.
- Golia, E., Limongelli, G., Natale, F., Fimiani, F., Maddaloni, V., Pariggiano, I., . . . Calabro, P. (2014). Inflammation and cardiovascular disease: from pathogenesis to therapeutic target. *Curr Atheroscler Rep*, *16*(9), 435. doi:10.1007/s11883-014-0435-z
- Gollwitzer, M., & Jäger, R. S. (2014). *Evaluation kompakt* (Vol. 2). Basel: Beltz.
- Gordon, S., & Taylor, P. R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*, *5*(12), 953-964. doi:10.1038/nri1733
- Graham, J. W., Cumsille, P. E., & Shevock, A. E. (2012). Methods for handling missing data. In J. A. Schinka & W. F. Velicer (Eds.), *Handbook of Psychology* (Vol. 2). New York: John Wiley & Sons.

- Grapentin, C., Mayenfels, F., Barnert, S., Süß, R., Schubert, R., Temme, S., . . . Flögel, U. (2015). Optimization of perfluorocarbon nanoemulsions for molecular imaging by 19 F MRI. *Nanomedicine*, 268-286.
- Griselli, M., Herbert, J., Hutchinson, W. L., Taylor, K. M., Sohail, M., Krausz, T., & Pepys, M. B. (1999). C-reactive protein and complement are important mediators of tissue damage in acute myocardial infarction. *J Exp Med*, 190(12), 1733-1740. doi:10.1084/jem.190.12.1733
- Gu, L., Tseng, S. C., & Rollins, B. J. (1999). Monocyte chemoattractant protein-1. *Chem Immunol*, 72, 7-29. doi:10.1159/000058723
- Hammerschmidt, D. E., & Vercellotti, G. M. (1988). Limitation of complement activation by perfluorocarbon emulsions: superiority of lecithin-emulsified preparations. *Biomater Artif Cells Artif Organs*, 16(1-3), 431-438. doi:10.3109/10731198809132593
- Hansson, G. K., & Hermansson, A. (2011). The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol*, 12(3), 204-212. doi:10.1038/ni.2001
- Hansson, G. K., Robertson, A. K., & Soderberg-Naucler, C. (2006). Inflammation and atherosclerosis. *Annu Rev Pathol*, 1, 297-329. doi:10.1146/annurev.pathol.1.110304.100100
- Hartmann, F., & Stierle, U. (2017). Koronare Herzkrankheit. In U. Stierle (Ed.), *Klinikleitfaden Kardiologie* (Vol. 6). München: Elsevier
- Heeschen, C., Dimmeler, S., Hamm, C. W., Fichtlscherer, S., Boersma, E., Simoons, M. L., . . . Investigators, C. S. (2003). Serum level of the antiinflammatory cytokine interleukin-10 is an important prognostic determinant in patients with acute coronary syndromes. *Circulation*, 107(16), 2109-2114. doi:10.1161/01.CIR.0000065232.57371.25
- Heitzer, T., Schlinzig, T., Krohn, K., Meinertz, T., & Munzel, T. (2001). Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation*, 104(22), 2673-2678. doi:10.1161/hc4601.099485
- Hellermann, J. P., Goraya, T. Y., Jacobsen, S. J., Weston, S. A., Reeder, G. S., Gersh, B. J., . . . Roger, V. L. (2003). Incidence of heart failure after myocardial infarction: is it changing over time? *American Journal of Epidemiology*, 157(12), 1101-1107. doi:10.1093/aje/kwg078
- Herold, G. (2020). *Innere Medizin 2020*: Walter de Gruyter GmbH.
- Hinterseer, M., & Knez, A. (2015). Kardiologie und Angiologie. In H.-W. Baenkler, H. Goldschmidt, J.-M. Hahn, M. Hinterseer, & A. Knez (Eds.), *Kurzlehrbuch Innere Medizin*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Hirase, T., & Node, K. (2012). Endothelial dysfunction as a cellular mechanism for vascular failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 302(3), H499-505. doi:10.1152/ajpheart.00325.2011
- Hitchens, T. K., Ye, Q., Eytan, D. F., Janjic, J. M., Ahrens, E. T., & Ho, C. (2011). 19F MRI detection of acute allograft rejection with in vivo perfluorocarbon labeling of immune cells. *Magn Reson Med*, 65(4), 1144-1153. doi:10.1002/mrm.22702
- Holmes, J. W., Borg, T. K., & Covell, J. W. (2005). Structure and mechanics of healing myocardial infarcts. *Annu Rev Biomed Eng*, 7, 223-253. doi:10.1146/annurev.bioeng.7.060804.100453
- Hoshyar, N., Gray, S., Han, H., & Bao, G. (2016). The effect of nanoparticle size on in vivo pharmacokinetics and cellular interaction. *Nanomedicine (Lond)*, 11(6), 673-692. doi:10.2217/nnm.16.5
- Hoth, M., & Wischmeyer, E. (2016a). Herz. In J. C. Behrends, J. Bischofberger, R. Deutzmann, H. Ehmke, S. Frings, S. Grissmer, M. Hoth, A. Kurtz, J. Leipziger, F. Müller, C. Pedain, J. Rettig, C. Wagner, & E. Wischmeyer (Eds.), *Physiologie* (Vol. 3). Stuttgart: Thieme.
- Hoth, M., & Wischmeyer, E. (2016b). Immunsystem. In J. C. Behrends, J. Bischofberger, R. Deutzmann, H. Ehmke, S. Frings, S. Grissmer, M. Hoth, A. Kurtz, J. Leipziger, F.

- Müller, C. Pedain, J. Rettig, C. Wagner, & E. Wischmeyer (Eds.), *Physiologie* (Vol. 3). Stuttgart: Thieme.
- Huberty, C. J., & Morris, J. D. (1989). Multivariate analysis versus multiple univariate analyses. *Psychological Bulletin*, *105*(2), 302-308. doi:10.1037/0033-2909.105.2.302
- Huebener, P., Abou-Khamis, T., Zymek, P., Bujak, M., Ying, X., Chatila, K., . . . Frangogiannis, N. G. (2008). CD44 is critically involved in infarct healing by regulating the inflammatory and fibrotic response. *J Immunol*, *180*(4), 2625-2633. doi:10.4049/jimmunol.180.4.2625
- Humes, J. L., Sadowski, S., Galavage, M., Goldenberg, M., Subers, E., Bonney, R. J., & Kuehl, F. A., Jr. (1982). Evidence for two sources of arachidonic acid for oxidative metabolism by mouse peritoneal macrophages. *J Biol Chem*, *257*(4), 1591-1594.
- Ibanez, B., James, S., Agewall, S., Antunes, M. J., Bucciarelli-Ducci, C., Bueno, H., . . . Group, E. S. C. S. D. (2018). 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *European Heart Journal*, *39*(2), 119-177. doi:10.1093/eurheartj/ehx393
- Imanishi, T., Ikejima, H., Tsujioka, H., Kuroi, A., Ishibashi, K., Komukai, K., . . . Akasaka, T. (2010). Association of monocyte subset counts with coronary fibrous cap thickness in patients with unstable angina pectoris. *Atherosclerosis*, *212*(2), 628-635. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2010.06.025
- Ingram, D. A., Forman, M. B., & Murray, J. J. (1993). Activation of complement by Fluosol attributable to the pluronic detergent micelle structure. *J Cardiovasc Pharmacol*, *22*(3), 456-461. doi:10.1097/00005344-199309000-00017
- Inserte, J., Barba, I., Hernando, V., Abellan, A., Ruiz-Meana, M., Rodriguez-Sinovas, A., & Garcia-Dorado, D. (2008). Effect of acidic reperfusion on prolongation of intracellular acidosis and myocardial salvage. *Cardiovasc Res*, *77*(4), 782-790. doi:10.1093/cvr/cvm082
- Italiani, P., & Boraschi, D. (2014). From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Front Immunol*, *5*, 514. doi:10.3389/fimmu.2014.00514
- Jacoby, C., Borg, N., Heusch, P., Sauter, M., Bonner, F., Kandolf, R., . . . Floegel, U. (2014). Visualization of immune cell infiltration in experimental viral myocarditis by (19)F MRI in vivo. *MAGMA*, *27*(1), 101-106. doi:10.1007/s10334-013-0391-6
- Jacoby, C., Temme, S., Mayenfels, F., Benoit, N., Krafft, M. P., Schubert, R., . . . Floegel, U. (2014). Probing different perfluorocarbons for in vivo inflammation imaging by 19F MRI: image reconstruction, biological half-lives and sensitivity. *NMR Biomed*, *27*(3), 261-271. doi:10.1002/nbm.3059
- Janeway Jr, C. A., & Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annual review of immunology*, *20*(1), 197-216.
- Jennings, R. B., & Reimer, K. A. (1981). Lethal myocardial ischemic injury. *The American Journal of Pathology*, *102*(2), 241.
- Jennings, R. B., Reimer, K. A., Hill, M. L., & Mayer, S. E. (1981). Total ischemia in dog hearts, in vitro. 1. Comparison of high energy phosphate production, utilization, and depletion, and of adenine nucleotide catabolism in total ischemia in vitro vs. severe ischemia in vivo. *Circulation Research*, *49*(4), 892-900. doi:10.1161/01.res.49.4.892
- Jiang, W., Zhang, L., Lang, R., Li, Z., & Gilkeson, G. (2014). Sex differences in monocyte activation in systemic lupus erythematosus (SLE). *PLoS One*, *9*(12), e114589. doi:10.1371/journal.pone.0114589
- Joeinig, A. (2008). *Die Rolle der CD14+CD16+-Monozyten in der autologen peripheren Stammzelltransplantation*. (Dissertation), Ludwig-Maximilians-Universität zu München, München. Retrieved from https://edoc.ub.uni-muenchen.de/9157/1/Joeinig_Anke.pdf

- Johnson, D. H., Richardson, T. M., & Epstein, D. L. (1989). Trabecular meshwork recovery after phagocytic challenge. *Curr Eye Res*, 8(11), 1121-1130. doi:10.3109/02713688909000037
- Jones, D. A., Smith, C. W., & McIntire, L. V. (1996). Leucocyte adhesion under flow conditions: principles important in tissue engineering. *Biomaterials*, 17(3), 337-347. doi:10.1016/0142-9612(96)85572-4
- Jordan, J., Zhao, Z.-Q., & Vinten-Johansen, J. (1999). The role of neutrophils in myocardial ischemia–reperfusion injury. *Cardiovascular Research*, 43(4), 860-878. doi:10.1016/s0008-6363(99)00187-x
- Jurisch, D., & Laufs, U. (2021). Chronisches Koronarsyndrom : Neuklassifikation der stabilen koronaren Herzkrankheit. *Internist (Berl)*, 62(1), 47-57. doi:10.1007/s00108-020-00910-0
- Journey, P., Agarwal, R., Singh, V., Choi, D., Roy, K., Sreenivasan, S. V., & Shi, L. (2017). Unique size and shape-dependent uptake behaviors of non-spherical nanoparticles by endothelial cells due to a shearing flow. *J Control Release*, 245, 170-176. doi:10.1016/j.jconrel.2016.11.033
- Kabalnov, A. S., & Shchukin, E. D. (1992). Ostwald ripening theory: applications to fluorocarbon emulsion stability. *Advances in Colloid and Interface Science*, 38, 69-97. doi:10.1016/0001-8686(92)80043-w
- Kadayakkara, D. K., Ranganathan, S., Young, W. B., & Ahrens, E. T. (2012). Assaying macrophage activity in a murine model of inflammatory bowel disease using fluorine-19 MRI. *Lab Invest*, 92(4), 636-645. doi:10.1038/labinvest.2012.7
- Kaisers, U., Kelly, K. P., & Busch, T. (2003). Liquid ventilation. *Br J Anaesth*, 91(1), 143-151. doi:10.1093/bja/aeg147
- Kaito, M., Araya, S., Gondo, Y., Fujita, M., Minato, N., Nakanishi, M., & Matsui, M. (2013). Relevance of distinct monocyte subsets to clinical course of ischemic stroke patients. *PLoS One*, 8(8), e69409. doi:10.1371/journal.pone.0069409
- Kalogeris, T., Bao, Y., & Korthuis, R. J. (2014). Mitochondrial reactive oxygen species: a double edged sword in ischemia/reperfusion vs preconditioning. *Redox Biol*, 2, 702-714. doi:10.1016/j.redox.2014.05.006
- Kaneda, M. M., Caruthers, S., Lanza, G. M., & Wickline, S. A. (2009). Perfluorocarbon nanoemulsions for quantitative molecular imaging and targeted therapeutics. *Ann Biomed Eng*, 37(10), 1922-1933. doi:10.1007/s10439-009-9643-z
- Kapellos, T. S., Bonaguro, L., Gemund, I., Reusch, N., Saglam, A., Hinkley, E. R., & Schultze, J. L. (2019). Human Monocyte Subsets and Phenotypes in Major Chronic Inflammatory Diseases. *Front Immunol*, 10, 2035. doi:10.3389/fimmu.2019.02035
- Katayama, K., Matsubara, T., Fujiwara, M., Koga, M., & Furukawa, S. (2000). CD14+CD16+ monocyte subpopulation in Kawasaki disease. *Clin Exp Immunol*, 121(3), 566-570. doi:10.1046/j.1365-2249.2000.01321.x
- Katz, A. M. (2010). *Physiology of the Heart* (Vol. 5). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Kawanaka, N., Yamamura, M., Aita, T., Morita, Y., Okamoto, A., Kawashima, M., . . . Makino, H. (2002). CD14+,CD16+ blood monocytes and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 46(10), 2578-2586. doi:10.1002/art.10545
- Kelly, B. A., & Carchman, R. A. (1987). The Relationship between Lysosomal-Enzyme Release and Protein-Phosphorylation in Human-Monocytes Stimulated by Phorbol Esters and Opsonized Zymosan. *Journal of Biological Chemistry*, 262(36), 17404-17411.
- Kempf, T., Zarbock, A., Widera, C., Butz, S., Stadtmann, A., Rossaint, J., . . . Wollert, K. C. (2011). GDF-15 is an inhibitor of leukocyte integrin activation required for survival after myocardial infarction in mice. *Nat Med*, 17(5), 581-588. doi:10.1038/nm.2354

- Kim, R. J., Chen, E. L., Lima, J. A., & Judd, R. M. (1996). Myocardial Gd-DTPA kinetics determine MRI contrast enhancement and reflect the extent and severity of myocardial injury after acute reperfused infarction. *Circulation*, *94*(12), 3318-3326. doi:10.1161/01.cir.94.12.3318
- Kircher, M. F., Grimm, J., Swirski, F. K., Libby, P., Gerszten, R. E., Allport, J. R., & Weissleder, R. (2008). Noninvasive in vivo imaging of monocyte trafficking to atherosclerotic lesions. *Circulation*, *117*(3), 388-395. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.719765
- Kitamura, M. (1997). Identification of an inhibitor targeting macrophage production of monocyte chemoattractant protein-1 as TGF-beta 1. *The Journal of Immunology*, *159*(3), 1404-1411.
- Klein, S. L., & Flanagan, K. L. (2016). Sex differences in immune responses. *Nature Reviews Immunology*, *16*(10), 626.
- Klein, S. L., & Flanagan, K. L. (2016). Sex differences in immune responses. *Nat Rev Immunol*, *16*(10), 626-638. doi:10.1038/nri.2016.90
- Knuuti, J., Wijns, W., Saraste, A., Capodanno, D., Barbato, E., Funck-Brentano, C., . . . Group, E. S. C. S. D. (2020). 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes. *Eur Heart J*, *41*(3), 407-477. doi:10.1093/eurheartj/ehz425
- Kono, H., & Rock, K. L. (2008). How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol*, *8*(4), 279-289. doi:10.1038/nri2215
- Koshy, S. (2003). Collagen cross-linking: new dimension to cardiac remodeling. *Cardiovascular Research*, *57*(3), 594-598. doi:10.1016/s0008-6363(02)00877-5
- Krafft, M. P. (2001). Fluorocarbons and fluorinated amphiphiles in drug delivery and biomedical research. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *47*(2-3), 209-228. doi:10.1016/s0169-409x(01)00107-7
- Krafft, M. P., Postel, M., Riess, J. G., Ni, Y., Pelura, T. J., Hanna, G. K., & Song, D. (1992). Drop size stability assessment of fluorocarbon emulsions. *Biomater Artif Cells Immobilization Biotechnol*, *20*(2-4), 865-868. doi:10.3109/10731199209119732
- Krafft, M. P., & Riess, J. G. (2007). Perfluorocarbons: Life sciences and biomedical uses Dedicated to the memory of Professor Guy Ourisson, a true RENAISSANCE man. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, *45*(7), 1185-1198. doi:10.1002/pola.21937
- Krafft, M. P., Rolland, J. P., & Riess, J. G. (1991). Detrimental effect of excess lecithin on the stability of fluorocarbon/lecithin emulsions. *The Journal of Physical Chemistry*, *95*(14), 5673-5676. doi:10.1021/j100167a054
- Kruger-Genge, A., Blocki, A., Franke, R. P., & Jung, F. (2019). Vascular Endothelial Cell Biology: An Update. *Int J Mol Sci*, *20*(18). doi:10.3390/ijms20184411
- Kubinger, K. D., Rasch, D., & Moder, K. (2009). Zur Legende der Voraussetzungen des t-Tests für unabhängige Stichproben. *Psychologische Rundschau*, *60*(1), 26-27. doi:10.1026/0033-3042.60.1.26
- Kubista, M., Aakerman, B., & Norden, B. (1987). Characterization of interaction between DNA and 4', 6-diamidino-2-phenylindole by optical spectroscopy. *Biochemistry*, *26*(14), 4545-4553.
- Kurose, H. (2021). Cardiac Fibrosis and Fibroblasts. *Cells*, *10*(7). doi:10.3390/cells10071716
- Kuznetsova, I. N., & Yurchenko, V. S. (2006). Structural stability of perfluorocarbon and phospholipid emulsions on storage. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, *40*(12), 673-677. doi:10.1007/s11094-006-0217-1
- Lambert, E., & Janjic, J. M. (2021). Quality by design approach identifies critical parameters driving oxygen delivery performance in vitro for perfluorocarbon based artificial oxygen carriers. *Sci Rep*, *11*(1), 5569. doi:10.1038/s41598-021-84076-1

- Lambert, J. M., Lopez, E. F., & Lindsey, M. L. (2008). Macrophage roles following myocardial infarction. *Int J Cardiol*, *130*(2), 147-158. doi:10.1016/j.ijcard.2008.04.059
- Lawrence, M. B., Kansas, G. S., Kunkel, E. J., & Ley, K. (1997). Threshold levels of fluid shear promote leukocyte adhesion through selectins (CD62L,P,E). *J Cell Biol*, *136*(3), 717-727. doi:10.1083/jcb.136.3.717
- Leese, P. T., Noveck, R. J., Shorr, J. S., Woods, C. M., Flaim, K. E., & Keipert, P. E. (2000). Randomized safety studies of intravenous perflubron emulsion. I. Effects on coagulation function in healthy volunteers. *Anesth Analg*, *91*(4), 804-811. doi:10.1097/00000539-200010000-00008
- Lefevre, N., Corazza, F., Duchateau, J., Desir, J., & Casimir, G. (2012). Sex differences in inflammatory cytokines and CD99 expression following in vitro lipopolysaccharide stimulation. *Shock*, *38*(1), 37-42. doi:10.1097/SHK.0b013e3182571e46
- Lerman, R. H., Apstein, C. S., Kagan, H. M., Osmers, E. L., Chichester, C. O., Vogel, W. M., . . . Steffee, W. P. (1983). Myocardial healing and repair after experimental infarction in the rabbit. *Circ Res*, *53*(3), 378-388. doi:10.1161/01.res.53.3.378
- Lewis, E. F., Moye, L. A., Rouleau, J. L., Sacks, F. M., Malcolm O Arnold, J., Wayne Warnica, J., . . . Pfeffer, M. A. (2003). Predictors of late development of heart failure in stable survivors of myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*, *42*(8), 1446-1453. doi:10.1016/s0735-1097(03)01057-x
- Libby, P., & Ridker, P. M. (2006). Inflammation and Atherothrombosis. *Journal of the American College of Cardiology*, *48*(9), A33-A46. doi:10.1016/j.jacc.2006.08.011
- Lieberman, M. M., Sachanandani, D. M., & Pinney, C. A. (1996). Comparative study of neutrophil activation by chemiluminescence and flow cytometry. *Clin Diagn Lab Immunol*, *3*(6), 654-662.
- Liew, R., Sulfi, S., Ranjadayalan, K., Cooper, J., & Timmis, A. D. (2006). Declining case fatality rates for acute myocardial infarction in South Asian and white patients in the past 15 years. *Heart*, *92*(8), 1030-1034. doi:10.1136/hrt.2005.078634
- Lindena, J., & Burkhardt, H. (1990). Chemiluminescence properties of human, canine and rat polymorphonuclear cells. *J Biolumin Chemilumin*, *5*(3), 165-170. doi:10.1002/bio.1170050304
- Lindena, J., Burkhardt, H., & Dwenger, A. (1987). Mechanisms of non-opsonized zymosan-induced and luminol-enhanced chemiluminescence in whole blood and isolated phagocytes. *J Clin Chem Clin Biochem*, *25*(11), 765-778. doi:10.1515/cclm.1987.25.11.765
- Liuzzo, G., Biasucci, L. M., Gallimore, J. R., Grillo, R. L., Rebuffi, A. G., Pepys, M. B., & Maseri, A. (1994). The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid a protein in severe unstable angina. *The New England journal of medicine*, *331*(7), 417-424. doi:10.1056/nejm199408183310701
- Lopez-Sendon, J., & Lopez de Sa, E. (2008). Acute Heart Failure in the Setting of Acute Coronary Syndromes. In A. Mebazaa, M. Gheorghide, F. Zannad, & J. Parrillo (Eds.), *Acute Heart Failure* London: Springer.
- Lowe, G. D. O., Machado, S. G., Krol, W. F., Barton, B. A., & Forbes, C. D. (1985). White Blood Cell Count and Haematocrit as Predictors of Coronary Recurrence after Myocardial Infarction. *Thrombosis and Haemostasis*, *54*(03), 700-703. doi:10.1055/s-0038-1660101
- Löwel, H. (2006). Gesundheitsberichterstattung des Bundes Koronare Herzkrankheit und akuter Myokardinfarkt. In Robert Koch Institut (Ed.): Robert Koch Institut.
- Lüdtke, O., Robitzsch, A., Trautwein, U., & Köller, O. (2007). Umgang mit fehlenden Werten in der psychologischen Forschung. *Psychologische Rundschau*, *58*(2), 103-117. doi:10.1026/0033-3042.58.2.103

- Ma, Y., Iyer, R. P., Jung, M., Czubryt, M. P., & Lindsey, M. L. (2017). Cardiac Fibroblast Activation Post-Myocardial Infarction: Current Knowledge Gaps. *Trends Pharmacol Sci*, 38(5), 448-458. doi:10.1016/j.tips.2017.03.001
- Maa, Y. F., & Hsu, C. C. (1999). Performance of sonication and microfluidization for liquid-liquid emulsification. *Pharm Dev Technol*, 4(2), 233-240. doi:10.1081/pdt-100101357
- Maekawa, Y., Anzai, T., Yoshikawa, T., Asakura, Y., Takahashi, T., Ishikawa, S., . . . Ogawa, S. (2002). Prognostic significance of peripheral monocytosis after reperfused acute myocardial infarction: a possible role for left ventricular remodeling. *Journal of the American College of Cardiology*, 39(2), 241-246. doi:doi:10.1016/S0735-1097(01)01721-1
- Mahdi Jafari, S., He, Y., & Bhandari, B. (2006). Nano-Emulsion Production by Sonication and Microfluidization—A Comparison. *International Journal of Food Properties*, 9(3), 475-485. doi:10.1080/10942910600596464
- Mahto, S. K., Yoon, T. H., & Rhee, S. W. (2010). A new perspective on in vitro assessment method for evaluating quantum dot toxicity by using microfluidics technology. *Biomicrofluidics*, 4(3). doi:10.1063/1.3486610
- Makki, N., Brennan, T. M., & Girotra, S. (2013). Acute coronary syndrome. *J Intensive Care Med*, 30(4), 186-200. doi:10.1177/0885066613503294
- Malek, A. M., Alper, S. L., & Izumo, S. (1999). Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis. *JAMA*, 282(21), 2035-2042. doi:10.1001/jama.282.21.2035
- Mann, D. L., Zipes, D. P., Libby, P., & Bonow, R. O. (2015). *Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine* (Vol. 10). Philadelphia: Elsevier.
- Manoonkitiwongsa, P. S., Jackson-Friedman, C., McMillan, P. J., Schultz, R. L., & Lyden, P. D. (2001). Angiogenesis after stroke is correlated with increased numbers of macrophages: the clean-up hypothesis. *J Cereb Blood Flow Metab*, 21(10), 1223-1231. doi:10.1097/00004647-200110000-00011
- Maury, C. P., & Teppo, A. M. (1989). Circulating tumour necrosis factor-alpha (cachectin) in myocardial infarction. *J Intern Med*, 225(5), 333-336. doi:10.1111/j.1365-2796.1989.tb00090.x
- Mazzone, A., De Servi, S., Vezzoli, M., Fossati, G., Mazzucchelli, I., Gritti, D., . . . Specchia, G. (1999). Plasma levels of interleukin 2, 6, 10 and phenotypic characterization of circulating T lymphocytes in ischemic heart disease. *Atherosclerosis*, 145(2), 369-374. doi:10.1016/s0021-9150(99)00104-5
- McDonald, B., Pittman, K., Menezes, G. B., Hirota, S. A., Slaba, I., Waterhouse, C. C., . . . Kubes, P. (2010). Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science*, 330(6002), 362-366. doi:10.1126/science.1195491
- McKay, R. G., Pfeffer, M. A., Pasternak, R. C., Markis, J. E., Come, P. C., Nakao, S., . . . Grossman, W. (1986). Left ventricular remodeling after myocardial infarction: a corollary to infarct expansion. *Circulation*, 74(4), 693-702. doi:10.1161/01.cir.74.4.693
- McKinnon, K. M. (2018). Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol*, 120, 5.1.1-5.1.11. doi:10.1002/cpim.40
- Meinertz, T., Hamm, C., Schlensak, C., Fleck, E., Cremer, J., Stiller, B., . . . Heinemann, M. (2017). *Deutscher Herzbericht 2016: 28. Bericht/Sektorenübergreifende Versorgungsanalyse zur Kardiologie, Herzchirurgie und Kinderherzmedizin in Deutschland* (Vol. 28). Frankfurt am Main: Deutsche Herzstiftung.
- Melichar, B., Tousekova, M., & Vesely, P. (2002). Effect of irinotecan on the phenotype of peripheral blood leukocyte populations in patients with metastatic colorectal cancer. *Hepato-gastroenterology*, 49(46), 967-970.
- Metz, S., Bonaterra, G., Rudelius, M., Settles, M., Rummeny, E. J., & Daldrup-Link, H. E. (2004). Capacity of human monocytes to phagocytose approved iron oxide MR contrast agents in vitro. *Eur Radiol*, 14(10), 1851-1858. doi:10.1007/s00330-004-2405-2

- Mizia-Stec, K., Gasior, Z., Zahorska-Markiewicz, B., Janowska, J., Szulc, A., Jastrzebska-Maj, E., & Kobielski-Gembala, I. (2003). Serum tumour necrosis factor-alpha, interleukin-2 and interleukin-10 activation in stable angina and acute coronary syndromes. *Coron Artery Dis*, *14*(6), 431-438. doi:10.1097/00019501-200309000-00003
- Mochizuki, S., & Neely, J. R. (1979). Control of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in cardiac muscle. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *11*(3), 221-236. doi:10.1016/0022-2828(79)90437-1
- Moghimi, S. M., Hunter, A. C., & Andresen, T. L. (2012). Factors controlling nanoparticle pharmacokinetics: an integrated analysis and perspective. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, *52*, 481-503. doi:10.1146/annurev-pharmtox-010611-134623
- Moghimi, S. M., Hunter, A. C., & Murray, J. C. (2001). Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol Rev*, *53*(2), 283-318.
- Moghimi, S. M., Parhamifar, L., Ahmadvand, D., Wibroe, P. P., Andresen, T. L., Farhangrazi, Z. S., & Hunter, A. C. (2012). Particulate systems for targeting of macrophages: basic and therapeutic concepts. *J Innate Immun*, *4*(5-6), 509-528. doi:10.1159/000339153
- Moldovan, L., & Moldovan, N. I. (2005). Role of monocytes and macrophages in angiogenesis. *EXS*(94), 127-146. doi:10.1007/3-7643-7311-3_9
- Molecular Probes Inc. (2001). BioParticles Fluorescent Particles and Opsonizing Reagents. Retrieved from <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/mp02701.pdf>
- Möllmann, H., Leistner, D. M., Schulze, P. C., Sechtem, U., & Bauersachs, J. (2020). Kommentar zu den Leitlinien (2019) der ESC zum chronischen Koronarsyndrom. *Der Kardiologe*, *14*(6), 482-491. doi:10.1007/s12181-020-00408-x
- Morawski, A. M., Winter, P. M., Yu, X., Fuhrhop, R. W., Scott, M. J., Hockett, F., . . . Wickline, S. A. (2004). Quantitative "magnetic resonance immunohistochemistry" with ligand-targeted (19)F nanoparticles. *Magn Reson Med*, *52*(6), 1255-1262. doi:10.1002/mrm.20287
- Moris, D., Spartalis, M., Spartalis, E., Karachaliou, G. S., Karaolani, G. I., Tsourouflis, G., . . . Theocharis, S. (2017). The role of reactive oxygen species in the pathophysiology of cardiovascular diseases and the clinical significance of myocardial redox. *Ann Transl Med*, *5*(16), 326. doi:10.21037/atm.2017.06.27
- Moser, M., Van de Loo, A., & Bode, C. (2009). Akute koronare Synrome. In M. Böhm, M. Hallek, & W. Schmiegler (Eds.), *Innere Medizin* (Vol. 6). München: Elsevier.
- Mosser, D. M., & Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*, *8*(12), 958-969. doi:10.1038/nri2448
- Muntean, D. M., Sturza, A., Danila, M. D., Borza, C., Duicu, O. M., & Mornos, C. (2016). The Role of Mitochondrial Reactive Oxygen Species in Cardiovascular Injury and Protective Strategies. *Oxid Med Cell Longev*, *2016*, 8254942. doi:10.1155/2016/8254942
- Naghavi, M., Libby, P., Falk, E., Casscells, S. W., Litovsky, S., Rumberger, J., . . . Willerson, J. T. (2003). From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I. *Circulation*, *108*(14), 1664-1672. doi:10.1161/01.CIR.0000087480.94275.97
- Nahrendorf, M., & Swirski, F. K. (2013). Monocyte and macrophage heterogeneity in the heart. *Circ Res*, *112*(12), 1624-1633. doi:10.1161/CIRCRESAHA.113.300890
- Nahrendorf, M., Swirski, F. K., Aikawa, E., Stangenberg, L., Wurdinger, T., Figueiredo, J. L., . . . Pittet, M. J. (2007). The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med*, *204*(12), 3037-3047. doi:10.1084/jem.20070885
- Nelson, L. H., Warden, S., & Lenz, K. M. (2017). Sex differences in microglial phagocytosis in the neonatal hippocampus. *Brain Behav Immun*, *64*, 11-22. doi:10.1016/j.bbi.2017.03.010

- Neumann, F. J., Marx, N., Gawaz, M., Brand, K., Ott, I., Rokitta, C., . . . Schomig, A. (1997). Induction of cytokine expression in leukocytes by binding of thrombin-stimulated platelets. *Circulation*, *95*(10), 2387-2394. doi:10.1161/01.cir.95.10.2387
- Neumann, F. J., Ott, I., Gawaz, M., Richardt, G., Holzapfel, H., Jochum, M., & Schomig, A. (1995). Cardiac release of cytokines and inflammatory responses in acute myocardial infarction. *Circulation*, *92*(4), 748-755. doi:10.1161/01.cir.92.4.748
- Nienhaus, F., Colley, D., Jahn, A., Pfeiler, S., Flocke, V., Temme, S., . . . Bönner, F. (2019). Phagocytosis of a PFOB-Nanoemulsion for (19)F Magnetic Resonance Imaging: First Results in Monocytes of Patients with Stable Coronary Artery Disease and ST-Elevation Myocardial Infarction. *Molecules*, *24*(11), 2058. doi:10.3390/molecules24112058
- Nockher, W. A., Bergmann, L., & Scherberich, J. E. (1994). Increased soluble CD14 serum levels and altered CD14 expression of peripheral blood monocytes in HIV-infected patients. *Clin Exp Immunol*, *98*(3), 369-374. doi:10.1111/j.1365-2249.1994.tb05499.x
- Noveck, R. J., Shannon, E. J., Leese, P. T., Shorr, J. S., Flaim, K. E., Keipert, P. E., & Woods, C. M. (2000). Randomized safety studies of intravenous perflubron emulsion. II. Effects on immune function in healthy volunteers. *Anesth Analg*, *91*(4), 812-822. doi:10.1097/00000539-200010000-00009
- O'Donoghue, M., Morrow, D. A., Cannon, C. P., Guo, W., Murphy, S. A., Gibson, C. M., & Sabatine, M. S. (2008). Association between baseline neutrophil count, clopidogrel therapy, and clinical and angiographic outcomes in patients with ST-elevation myocardial infarction receiving fibrinolytic therapy. *Eur Heart J*, *29*(8), 984-991. doi:10.1093/eurheartj/ehn112
- O'Hagan, D. (2008). Understanding organofluorine chemistry. An introduction to the C-F bond. *Chemical Society Reviews*, *37*, 308-319. doi:10.1039/b711844a
- Oben, J. A., & Foreman, J. C. (1988). A simple quantitative fluorimetric assay of in vitro phagocytosis in human neutrophils. *Journal of Immunological Methods*, *112*(1), 99-103. doi:10.1016/0022-1759(88)90039-7
- Okamoto, H., Mizuno, K., & Horio, T. (2003). Circulating CD14+ CD16+ monocytes are expanded in sarcoidosis patients. *J Dermatol*, *30*(7), 503-509. doi:10.1111/j.1346-8138.2003.tb00424.x
- Ong, S. B., Hernandez-Resendiz, S., Crespo-Avilan, G. E., Mukhametshina, R. T., Kwek, X. Y., Cabrera-Fuentes, H. A., & Hausenloy, D. J. (2018). Inflammation following acute myocardial infarction: Multiple players, dynamic roles, and novel therapeutic opportunities. *Pharmacol Ther*, *186*, 73-87. doi:10.1016/j.pharmthera.2018.01.001
- Ortega-Gomez, A., Perretti, M., & Soehnlein, O. (2013). Resolution of inflammation: an integrated view. *EMBO Mol Med*, *5*(5), 661-674. doi:10.1002/emmm.201202382
- Ouyang, W., Rutz, S., Crellin, N. K., Valdez, P. A., & Hymowitz, S. G. (2011). Regulation and Functions of the IL-10 Family of Cytokines in Inflammation and Disease. *Annual review of immunology*, *29*(1), 71-109. doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101312
- Owens, D. E., 3rd, & Peppas, N. A. (2006). Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int J Pharm*, *307*(1), 93-102. doi:10.1016/j.ijpharm.2005.10.010
- Ozanska, A., Szymczak, D., & Rybka, J. (2020). Pattern of human monocyte subpopulations in health and disease. *Scand J Immunol*, *92*(1), e12883. doi:10.1111/sji.12883
- Ozinsky, A., Smith, K. D., Hume, D., & Underhill, D. M. (2000). Co-operative induction of pro-inflammatory signaling by Toll-like receptors. *Journal of Endotoxin Research*, *6*(5), 393-396. doi:10.1177/09680519000060051101
- Ozinsky, A., Underhill, D. M., Fontenot, J. D., Hajjar, A. M., Smith, K. D., Wilson, C. B., . . . Aderem, A. (2000). The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *97*(25), 13766-13771. doi:10.1073/pnas.250476497

- Panizzi, P., Swirski, F. K., Figueiredo, J. L., Waterman, P., Sosnovik, D. E., Aikawa, E., . . . Nahrendorf, M. (2010). Impaired infarct healing in atherosclerotic mice with Ly-6C(hi) monocytosis. *J Am Coll Cardiol*, *55*(15), 1629-1638. doi:10.1016/j.jacc.2009.08.089
- Pannitteri, G., Marino, B., Campa, P. P., Martucci, R., Testa, U., & Peschle, C. (1997). Interleukins 6 and 8 as Mediators of Acute Phase Response in Acute Myocardial Infarction. *The American Journal of Cardiology*, *80*(5), 622-625. doi:10.1016/s0002-9149(97)00434-7
- Papaioannou, T. G., Karatzis, E. N., Vavuranakis, M., Lekakis, J. P., & Stefanadis, C. (2006). Assessment of vascular wall shear stress and implications for atherosclerotic disease. *Int J Cardiol*, *113*(1), 12-18. doi:10.1016/j.ijcard.2006.03.035
- Papaioannou, T. G., & Stefanadis, C. (2005). Vascular wall shear stress: basic principles and methods. *Hellenic J Cardiol*, *46*(1), 9-15.
- Partlow, K. C., Chen, J., Brant, J. A., Neubauer, A. M., Meyerrose, T. E., Creer, M. H., . . . Wickline, S. A. (2007). 19F magnetic resonance imaging for stem/progenitor cell tracking with multiple unique perfluorocarbon nanobeacons. *FASEB J*, *21*(8), 1647-1654. doi:10.1096/fj.06-6505com
- Passlick, B., Fliieger, D., & Ziegler-Heitbrock, H. W. L. (1989). Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood*, *74*(7), 2527-2534.
- Piepoli, M. F., Hoes, A. W., Agewall, S., Albus, C., Brotons, C., Catapano, A. L., . . . Group, E. S. C. S. D. (2016). 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts)Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). *Eur Heart J*, *37*(29), 2315-2381. doi:10.1093/eurheartj/ehw106
- Pierre, V. C., & Allen, M. J. (2017). *Contrast Agents for MRI: Experimental Methods* (Vol. 13): Royal Society of Chemistry.
- Pillemer, L., & Ecker, E. E. (1941). Anticomplementary factor in fresh yeast. *Journal of Biological Chemistry*, *137*(1), 139-142.
- Plowden, J., Renshaw-Hoelscher, M., Engleman, C., Katz, J., & Sambhara, S. (2004). Innate immunity in aging: impact on macrophage function. *Aging Cell*, *3*(4), 161-167. doi:10.1111/j.1474-9728.2004.00102.x
- Prabhu, S. D., & Frangogiannis, N. G. (2016). The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis. *Circ Res*, *119*(1), 91-112. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.303577
- Pramanik, T., Thapa, M., & Saikia, T. C. (2004). Effect of temperature on phagocytic activity of neutrophils. *Nepal Med Coll J*, *6*(1), 39-40.
- Putyatina, T. K., Aprosina, U. D., & Afonina, N. I. (1994). The elimination peculiarities of perfluorocarbon emulsions stabilized with egg yolk phospholipid. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*, *22*(4), 1281-1285. doi:10.3109/10731199409138827
- Rankin, J. A., Sylvester, I., Smith, S., Yoshimura, T., & Leonard, E. J. (1990). Macrophages cultured in vitro release leukotriene B4 and neutrophil attractant/activation protein (interleukin 8) sequentially in response to stimulation with lipopolysaccharide and zymosan. *J Clin Invest*, *86*(5), 1556-1564. doi:10.1172/JCI114875
- Rasch, D., Kubinger, K. D., & Moder, K. (2011). The two-sample t test: pre-testing its assumptions does not pay off. *Statistical Papers*, *52*(1), 219-231. doi:10.1007/s00362-009-0224-x
- Rathod, K. S., Kapil, V., Velmurugan, S., Khambata, R. S., Siddique, U., Khan, S., . . . Ahluwalia, A. (2017). Accelerated resolution of inflammation underlies sex differences

- in inflammatory responses in humans. *J Clin Invest*, 127(1), 169-182. doi:10.1172/JCI189429
- Ridker, P. M., Hennekens, C. H., Buring, J. E., & Rifai, N. (2000). C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med*, 342(12), 836-843. doi:10.1056/NEJM200003233421202
- Ridker, P. M., Hennekens, C. H., Roitman-Johnson, B., Stampfer, M. J., & Allen, J. (1998). Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men. *Lancet*, 351(9096), 88-92. doi:10.1016/S0140-6736(97)09032-6
- Riess, J. G. (1992). Overview of progress in the fluorocarbon approach to in vivo oxygen delivery. *Biomater Artif Cells Immobilization Biotechnol*, 20(2-4), 183-202. doi:10.3109/10731199209119635
- Riess, J. G. (2001). Oxygen carriers ("blood substitutes")--raison d'etre, chemistry, and some physiology. *Chem Rev*, 101(9), 2797-2920. doi:10.1021/cr970143c
- Riess, J. G. (2005). Understanding the fundamentals of perfluorocarbons and perfluorocarbon emulsions relevant to in vivo oxygen delivery. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*, 33(1), 47-63. doi:10.1081/bio-200046659
- Riess, J. G. (2006). Perfluorocarbon-based oxygen delivery. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*, 34(6), 567-580. doi:10.1080/10731190600973824
- Riess, J. G., Dalfors, J. L., Hanna, G. K., Klein, D. H., Krafft, M. P., Pelura, T. J., & Schutt, E. G. (1992). Development of highly fluid, concentrated and stable fluorocarbon emulsions for diagnosis and therapy. *Biomater Artif Cells Immobilization Biotechnol*, 20(2-4), 839-842. doi:10.3109/10731199209119726
- Rinkenauer, A. C., Press, A. T., Raasch, M., Pietsch, C., Schweizer, S., Schworer, S., . . . Schubert, U. S. (2015). Comparison of the uptake of methacrylate-based nanoparticles in static and dynamic in vitro systems as well as in vivo. *J Control Release*, 216, 158-168. doi:10.1016/j.jconrel.2015.08.008
- Rogacev, K. S., Cremers, B., Zawada, A. M., Seiler, S., Binder, N., Ege, P., . . . Heine, G. H. (2012). CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes independently predict cardiovascular events: a cohort study of 951 patients referred for elective coronary angiography. *J Am Coll Cardiol*, 60(16), 1512-1520. doi:10.1016/j.jacc.2012.07.019
- Rogacev, K. S., Seiler, S., Zawada, A. M., Reichart, B., Herath, E., Roth, D., . . . Heine, G. H. (2011). CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes and cardiovascular outcome in patients with chronic kidney disease. *Eur Heart J*, 32(1), 84-92. doi:10.1093/eurheartj/ehq371
- Rogacev, K. S., Zawada, A. M., Emrich, I., Seiler, S., Bohm, M., Fliser, D., . . . Heine, G. H. (2014). Lower Apo A-I and lower HDL-C levels are associated with higher intermediate CD14⁺⁺CD16⁺ monocyte counts that predict cardiovascular events in chronic kidney disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 34(9), 2120-2127. doi:10.1161/ATVBAHA.114.304172
- Roos, D., Bot, A. A. M., Vanschaik, M. L. J., Deboer, M., & Daha, M. R. (1981). Interaction between Human-Neutrophils and Zymosan Particles - the Role of Opsonins and Divalent-Cations. *Journal of Immunology*, 126(2), 433-440.
- Rosano, J. M., Tousi, N., Scott, R. C., Krynska, B., Rizzo, V., Prabhakarandian, B., . . . Kiani, M. F. (2009). A physiologically realistic in vitro model of microvascular networks. *Biomed Microdevices*, 11(5), 1051-1057. doi:10.1007/s10544-009-9322-8
- Ross, G. D., Cain, J. A., & Lachmann, P. J. (1985). Membrane complement receptor type three (CR3) has lectin-like properties analogous to bovine conglutinin as functions as a receptor for zymosan and rabbit erythrocytes as well as a receptor for iC3b. *The Journal of Immunology*, 134(5), 3307-3315.
- Rossol, M., Kraus, S., Pierer, M., Baerwald, C., & Wagner, U. (2012). The CD14(bright) CD16⁺ monocyte subset is expanded in rheumatoid arthritis and promotes expansion of the Th17 cell population. *Arthritis Rheum*, 64(3), 671-677. doi:10.1002/art.33418

- Rothe, M., Jahn, A., Weiss, K., Hwang, J. H., Szendroedi, J., Kelm, M., . . . Bönner, F. (2019). In vivo (19)F MR inflammation imaging after myocardial infarction in a large animal model at 3 T. *MAGMA*, 32(1), 5-13. doi:10.1007/s10334-018-0714-8
- Rovetto, M. J., Lamberton, W. F., & Neely, J. R. (1975). Mechanisms of glycolytic inhibition in ischemic rat hearts. *Circ Res*, 37(6), 742-751. doi:10.1161/01.res.37.6.742
- Ruggeri, Z. M. (2009). Platelet adhesion under flow. *Microcirculation*, 16(1), 58-83.
- Ruiz-Cabello, J., Barnett, B. P., Bottomley, P. A., & Bulte, J. W. (2011). Fluorine (19F) MRS and MRI in biomedicine. *NMR Biomed*, 24(2), 114-129. doi:10.1002/nbm.1570
- Sakakura, K., Nakano, M., Otsuka, F., Ladich, E., Kolodgie, F. D., & Virmani, R. (2013). Pathophysiology of atherosclerosis plaque progression. *Heart Lung Circ*, 22(6), 399-411. doi:10.1016/j.hlc.2013.03.001
- Samar Shurbaji, Gulsen G. Anlar, Essara A. Hussein, Ahmed Elzatahry, & Yalcin, H. C. (2020). Effect of Flow-Induced Shear Stress in Nanomaterial Uptake by Cells: Focus on Targeted Anti-Cancer Therapy. *Cancers (Basel)*, 12(7). doi:10.3390/cancers12071916
- Sanguedolce, M. V., Capo, C., Bongrand, P., & Mege, J. L. (1992). Zymosan-stimulated tumor necrosis factor-alpha production by human monocytes. Down-modulation by phorbol ester. *J Immunol*, 148(7), 2229-2236.
- Sato, M., Sano, H., Iwaki, D., Kudo, K., Konishi, M., Takahashi, H., . . . Kuroki, Y. (2003). Direct binding of Toll-like receptor 2 to zymosan, and zymosan-induced NF-kappa B activation and TNF-alpha secretion are down-regulated by lung collectin surfactant protein A. *J Immunol*, 171(1), 417-425. doi:10.4049/jimmunol.171.1.417
- Schächinger, V., Britten, M. B., & Zeiher, A. M. (2000). Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation*, 101(16), 1899-1906. doi:10.1161/01.cir.101.16.1899
- Schäfers, M., Flachskampf, F., Sehtem, U., Achenbach, S., Krause, B. J., Schwaiger, M., & Breithardt, G. (2008). *Nichtinvasive kardiale Bildgebung: Spektrum, Methodik, Indikation und Interpretation* (Vol. 1). Landsberg: Hüthing Jehle Rehm GmbH, ecomed Medizin.
- Scherberich, J. E. (2003). Proinflammatory blood monocytes: main effector and target cells in systemic and renal disease; background and therapeutic implications. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 41(10), 459-464. doi:10.5414/cpp41459
- Schlitt, A., Heine, G. H., Blankenberg, S., Espinola-Klein, C., Dopheide, J. F., Bickel, C., . . . Rupperecht, H. J. (2004). CD14+CD16+ monocytes in coronary artery disease and their relationship to serum TNF-alpha levels. *Thromb Haemost*, 92(2), 419-424. doi:10.1160/TH04-02-0095
- Schorlemmer, H. U., Edwards, J. H., Davies, P., & Allison, A. C. (1977). Macrophage responses to mouldy hay dust, *Micropolyspora faeni* and zymosan, activators of complement by the alternative pathway. *Clin Exp Immunol*, 27(2), 198-207.
- Schrijvers, D. M., De Meyer, G. R., Herman, A. G., & Martinet, W. (2007). Phagocytosis in atherosclerosis: Molecular mechanisms and implications for plaque progression and stability. *Cardiovasc Res*, 73(3), 470-480. doi:10.1016/j.cardiores.2006.09.005
- Shantsila, E., Wrigley, B., Tapp, L., Apostolakis, S., Montoro-Garcia, S., Drayson, M. T., & Lip, G. Y. (2011). Immunophenotypic characterization of human monocyte subsets: possible implications for cardiovascular disease pathophysiology. *J Thromb Haemost*, 9(5), 1056-1066. doi:10.1111/j.1538-7836.2011.04244.x
- Shi, C., & Pamer, E. G. (2011). Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol*, 11(11), 762-774. doi:10.1038/nri3070
- Shibata, Y., Metzger, W. J., & Myrvik, Q. N. (1997). Chitin particle-induced cell-mediated immunity is inhibited by soluble mannan - Mannose receptor-mediated phagocytosis initiates IL-12 production. *Journal of Immunology*, 159(5), 2462-2467.

- Shinde, A. V., & Frangogiannis, N. G. (2014). Fibroblasts in myocardial infarction: a role in inflammation and repair. *J Mol Cell Cardiol*, 70, 74-82. doi:10.1016/j.yjmcc.2013.11.015
- Silber, S. (2019). ESC-Leitlinie 2019 zum chronischen Koronarsyndrom (CCS, vormals „stabile KHK“) Was ist neu? Was ist besonders wichtig? *Herz*, 44(8), 676-683. doi:10.1007/s00059-019-04862-6
- Simmons, D. L., Tan, S., Tenen, D. G., Nicholson-Weller, A., & Seed, B. (1989). Monocyte antigen CD14 is a phospholipid anchored membrane protein. *Blood*, 73(1), 284-289. doi:10.1182/blood.V73.1.284.284
- Skrzeczynska-Moncznik, J., Bzowska, M., Loseke, S., Grage-Griebenow, E., Zembala, M., & Pryjma, J. (2008). Peripheral blood CD14^{high} CD16⁺ monocytes are main producers of IL-10. *Scand J Immunol*, 67(2), 152-159. doi:10.1111/j.1365-3083.2007.02051.x
- Skrzeczynska, J., Kobylarz, K., Hartwich, Z., Zembala, M., & Pryjma, J. (2002). CD14+CD16+ monocytes in the course of sepsis in neonates and small children: monitoring and functional studies. *Scand J Immunol*, 55(6), 629-638. doi:10.1046/j.1365-3083.2002.01092.x
- Slattery, M. J., & Dong, C. (2003). Neutrophils influence melanoma adhesion and migration under flow conditions. *Int J Cancer*, 106(5), 713-722. doi:10.1002/ijc.11297
- Soehnlein, O., & Lindbom, L. (2010). Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol*, 10(6), 427-439. doi:10.1038/nri2779
- Soehnlein, O., Zernecke, A., Eriksson, E. E., Rothfuchs, A. G., Pham, C. T., Herwald, H., . . . Lindbom, L. (2008). Neutrophil secretion products pave the way for inflammatory monocytes. *Blood*, 112(4), 1461-1471. doi:10.1182/blood-2008-02-139634
- Solecki, K., Dupuy, A. M., Kuster, N., Leclercq, F., Gervasoni, R., Macia, J. C., . . . Roubille, F. (2015). Kinetics of high-sensitivity cardiac troponin T or troponin I compared to creatine kinase in patients with revascularized acute myocardial infarction. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 53(5), 707-714. doi:10.1515/cclm-2014-0475
- Spahn, D. R. (1999). Blood substitutes. Artificial oxygen carriers: perfluorocarbon emulsions. *Crit Care*, 3(5), R93-97. doi:10.1186/cc364
- Spahn, D. R., Waschke, K. F., Standl, T., Motsch, J., Van Huynegem, L., Welte, M., . . . European Perflubron Emulsion in Non-Cardiac Surgery Study Group. (2002). Use of perflubron emulsion to decrease allogeneic blood transfusion in high-blood-loss non-cardiac surgery: results of a European phase 3 study. *Anesthesiology*, 97(6), 1338-1349. doi:10.1097/00000542-200212000-00004
- Spencer, K. L., & Grace, M. (2016). Social Foundations of Health Care Inequality and Treatment Bias. *Annual Review of Sociology*, 42(1), 101-120. doi:10.1146/annurev-soc-081715-074226
- Srinivas, M., Morel, P. A., Ernst, L. A., Laidlaw, D. H., & Ahrens, E. T. (2007). Fluorine-19 MRI for visualization and quantification of cell migration in a diabetes model. *Magn Reson Med*, 58(4), 725-734. doi:10.1002/mrm.21352
- Srinivas, M., Turner, M. S., Janjic, J. M., Morel, P. A., Laidlaw, D. H., & Ahrens, E. T. (2009). In vivo cytometry of antigen-specific t cells using 19F MRI. *Magn Reson Med*, 62(3), 747-753. doi:10.1002/mrm.22063
- Stares, E., Rho, J., Ahrens, E. T., Foster, P., Li, A., & Bartha, R. (2018). Fluorine-based Contrast Agents. In V. C. Pierre & M. J. Allen (Eds.), *Contrast Agents for MRI: Experimental Methods* (pp. 479 - 498): The Royal Society of Chemistry.
- Starr, J. M., & Deary, I. J. (2011). Sex differences in blood cell counts in the Lothian Birth Cohort 1921 between 79 and 87 years. *Maturitas*, 69(4), 373-376. doi:10.1016/j.maturitas.2011.05.007
- Statistisches Bundesamt. (2018). Todesursachenstatistik. Retrieved from http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/dboowasys921.xwdevkit/xwd_init?gbe.isgbetol/xs_start_ne

- Statistisches Bundesamt. (2019). *Statistisches Jahrbuch 2019*. Wiesbaden Retrieved from https://www.destatis.de/DE/Themen/Querschnitt/Jahrbuch/jb-gesundheit.pdf?__blob=publicationFile.
- Stein, M., & Gordon, S. (1991). Regulation of tumor necrosis factor (TNF) release by murine peritoneal macrophages: role of cell stimulation and specific phagocytic plasma membrane receptors. *Eur J Immunol*, *21*(2), 431-437. doi:10.1002/eji.1830210227
- Stoll, G., Basse-Lusebrink, T., Weise, G., & Jakob, P. (2012). Visualization of inflammation using (19) F-magnetic resonance imaging and perfluorocarbons. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, *4*(4), 438-447. doi:10.1002/wnan.1168
- Stoll, G., & Bendszus, M. (2009). Imaging of inflammation in the peripheral and central nervous system by magnetic resonance imaging. *Neuroscience*, *158*(3), 1151-1160. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.06.045
- Sturtzel, C. (2017). Endothelial Cells. *Adv Exp Med Biol*, *1003*, 71-91. doi:10.1007/978-3-319-57613-8_4
- Sun, M., Dawood, F., Wen, W. H., Chen, M., Dixon, I., Kirshenbaum, L. A., & Liu, P. P. (2004). Excessive tumor necrosis factor activation after infarction contributes to susceptibility of myocardial rupture and left ventricular dysfunction. *Circulation*, *110*(20), 3221-3228. doi:10.1161/01.CIR.0000147233.10318.23
- Swirski, F. K., & Nahrendorf, M. (2013). Leukocyte behavior in atherosclerosis, myocardial infarction, and heart failure. *Science*, *339*(6116), 161-166. doi:10.1126/science.1230719
- Szaflarska, A., Baj-Krzyworzeka, M., Siedlar, M., Weglarczyk, K., Ruggiero, I., Hajto, B., & Zembala, M. (2004). Antitumor response of CD14+/CD16+ monocyte subpopulation. *Exp Hematol*, *32*(8), 748-755. doi:10.1016/j.exphem.2004.05.027
- Tabas, I., Williams, K. J., & Boren, J. (2007). Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications. *Circulation*, *116*(16), 1832-1844. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.676890
- Takahashi, T., Hiasa, Y., Ohara, Y., Miyazaki, S., Ogura, R., Suzuki, N., . . . Ohtani, R. (2008). Relationship of admission neutrophil count to microvascular injury, left ventricular dilation, and long-term outcome in patients treated with primary angioplasty for acute myocardial infarction. *Circ J*, *72*(6), 867-872. doi:10.1253/circj.72.867
- Takemura, G., Ohno, M., Hayakawa, Y., Misao, J., Kanoh, M., Ohno, A., . . . Fujiwara, H. (1998). Role of apoptosis in the disappearance of infiltrated and proliferated interstitial cells after myocardial infarction. *Circ Res*, *82*(11), 1130-1138. doi:10.1161/01.res.82.11.1130
- Tapp, L. D., Shantsila, E., Wrigley, B. J., Pamukcu, B., & Lip, G. Y. (2012). The CD14++CD16+ monocyte subset and monocyte-platelet interactions in patients with ST-elevation myocardial infarction. *J Thromb Haemost*, *10*(7), 1231-1241. doi:10.1111/j.1538-7836.2011.04603.x
- Temme, S., Bönner, F., Schrader, J., & Fogel, U. (2012). 19F magnetic resonance imaging of endogenous macrophages in inflammation. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, *4*(3), 329-343. doi:10.1002/wnan.1163
- Temme, S., Grapentin, C., Quast, C., Jacoby, C., Grandoch, M., Ding, Z., . . . Fogel, U. (2015). Noninvasive Imaging of Early Venous Thrombosis by 19F Magnetic Resonance Imaging With Targeted Perfluorocarbon Nanoemulsions. *Circulation*, *131*(16), 1405-1414. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.114.010962
- Temme, S., Jacoby, C., Ding, Z., Bonner, F., Borg, N., Schrader, J., & Fogel, U. (2014). Technical advance: monitoring the trafficking of neutrophil granulocytes and monocytes during the course of tissue inflammation by noninvasive 19F MRI. *J Leukoc Biol*, *95*(4), 689-697. doi:10.1189/jlb.0113032

- Thieblemont, N., Weiss, L., Sadeghi, H. M., Estcourt, C., & Haeffner-Cavaillon, N. (1995). CD14^{low}CD16^{high}: a cytokine-producing monocyte subset which expands during human immunodeficiency virus infection. *Eur J Immunol*, 25(12), 3418-3424. doi:10.1002/eji.1830251232
- Thomas, G., Tacke, R., Hedrick, C. C., & Hanna, R. N. (2015). Nonclassical patrolling monocyte function in the vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 35(6), 1306-1316. doi:10.1161/ATVBAHA.114.304650
- Thurn, K. T., Brown, E., Wu, A., Vogt, S., Lai, B., Maser, J., . . . Woloschak, G. E. (2007). Nanoparticles for applications in cellular imaging. *Nanoscale Res Lett*, 2(9), 430-441. doi:10.1007/s11671-007-9081-5
- Thygesen, K., Alpert, J. S., Jaffe, A. S., Chaitman, B. R., Bax, J. J., Morrow, D. A., & White, H. D. (2018). Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). *Journal of the American College of Cardiology*, 72(18), 2231-2264. doi:10.1016/j.jacc.2018.08.1038
- Timmers, L., Pasterkamp, G., de Hoog, V. C., Arslan, F., Appelman, Y., & de Kleijn, D. P. (2012). The innate immune response in reperfused myocardium. *Cardiovascular Research*, 94(2), 276-283. doi:10.1093/cvr/cvs018
- Torio, C. M., & Moore, B. J. (2016). National inpatient hospital costs: the most expensive conditions by payer, 2013: statistical brief# 204. *Healthcare cost and utilization project (HCUP) statistical briefs*. Retrieved from <https://www.hcup-us.ahrq.gov/reports/statbriefs/sb204-Most-Expensive-Hospital-Conditions.pdf>
- Troidl, C., Mollmann, H., Nef, H., Masseli, F., Voss, S., Szardien, S., . . . Elsasser, A. (2009). Classically and alternatively activated macrophages contribute to tissue remodelling after myocardial infarction. *J Cell Mol Med*, 13(9B), 3485-3496. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00707.x
- Tsujimoto, H., Ono, S., Hiraki, S., Majima, T., Kawarabayashi, N., Sugawara, H., . . . Mochizuki, H. (2004). Hemoperfusion with polymyxin B-immobilized fibers reduced the number of CD16⁺CD14⁺ monocytes in patients with septic shock. *Journal of Endotoxin Research*, 10(4), 229-237. doi:10.1177/09680519040100040501
- Tsujioka, H., Imanishi, T., Ikejima, H., Kuroi, A., Takarada, S., Tanimoto, T., . . . Akasaka, T. (2009). Impact of heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets on myocardial salvage in patients with primary acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 54(2), 130-138. doi:10.1016/j.jacc.2009.04.021
- Underhill, D. M. (2003). Macrophage recognition of zymosan particles. *J Endotoxin Res*, 9(3), 176-180. doi:10.1179/096805103125001586
- Underhill, D. M., Chen, J., Allen, L. A., & Aderem, A. (1998). MacMARCKS is not essential for phagocytosis in macrophages. *J Biol Chem*, 273(50), 33619-33623. doi:10.1074/jbc.273.50.33619
- Underhill, D. M., & Ozinsky, A. (2002). Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu Rev Immunol*, 20, 825-852. doi:10.1146/annurev.immunol.20.103001.114744
- Underhill, D. M., & Ozinsky, A. (2002). Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Current Opinion in Immunology*, 14(1), 103-110. doi:10.1016/s0952-7915(01)00304-1
- Underhill, D. M., Ozinsky, A., Hajjar, A. M., Stevens, A., Wilson, C. B., Bassetti, M., & Aderem, A. (1999). The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature*, 401(6755), 811-815. doi:10.1038/44605
- Urra, X., Villamor, N., Amaro, S., Gomez-Choco, M., Obach, V., Oleaga, L., . . . Chamorro, A. (2009). Monocyte subtypes predict clinical course and prognosis in human stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*, 29(5), 994-1002. doi:10.1038/jcbfm.2009.25
- Van de Werf, F., Ardissino, D., Betriu, A., Cokkinos, D. V., Falk, E., Fox, K. A. A., . . . Wijns, W. (2003). Management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. The Task Force on the Management of Acute Myocardial Infarction

- of the European Society of Cardiology. *European Heart Journal*, 24(1), 28-66. doi:10.1093/eurheartj/ehn416
- Van de Werf, F., Bax, J., Betriu, A., Blomstrom-Lundqvist, C., Crea, F., Falk, V., . . . E. S. C. Committee for Practice Guidelines. (2008). Management of acute myocardial infarction in patients presenting with persistent ST-segment elevation: the Task Force on the Management of ST-Segment Elevation Acute Myocardial Infarction of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J*, 29(23), 2909-2945. doi:10.1093/eurheartj/ehn416
- van den Borne, S. W., Cleutjens, J. P., Hanemaaijer, R., Creemers, E. E., Smits, J. F., Daemen, M. J., & Blankesteyn, W. M. (2009). Increased matrix metalloproteinase-8 and -9 activity in patients with infarct rupture after myocardial infarction. *Cardiovasc Pathol*, 18(1), 37-43. doi:10.1016/j.carpath.2007.12.012
- van der Laan, A. M., Hirsch, A., Robbers, L. F., Nijveldt, R., Lommerse, I., Delewi, R., . . . Piek, J. J. (2012). A proinflammatory monocyte response is associated with myocardial injury and impaired functional outcome in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: monocytes and myocardial infarction. *Am Heart J*, 163(1), 57-65 e52. doi:10.1016/j.ahj.2011.09.002
- van der Laan, A. M., Nahrendorf, M., & Piek, J. J. (2012). Healing and adverse remodelling after acute myocardial infarction: role of the cellular immune response. *Heart*, 98(18), 1384-1390. doi:10.1136/heartjnl-2012-301623
- van der Laan, A. M., Ter Horst, E. N., Delewi, R., Begieneman, M. P., Krijnen, P. A., Hirsch, A., . . . Piek, J. J. (2014). Monocyte subset accumulation in the human heart following acute myocardial infarction and the role of the spleen as monocyte reservoir. *Eur Heart J*, 35(6), 376-385. doi:10.1093/eurheartj/eh331
- van Heeswijk, R. B., De Blois, J., Kania, G., Gonzales, C., Blyszczuk, P., Stuber, M., . . . Schwitter, J. (2013). Selective in vivo visualization of immune-cell infiltration in a mouse model of autoimmune myocarditis by fluorine-19 cardiac magnetic resonance. *Circ Cardiovasc Imaging*, 6(2), 277-284. doi:10.1161/CIRCIMAGING.112.000125
- Varescon, C., Arlen, C., Le Blanc, M., & G. Riess, J. (2017). An easy, convenient way of describing the stability of fluorocarbon emulsions. *Journal de Chimie Physique*, 86, 2111-2117. doi:10.1051/jcp/1989862111
- Vinten-Johansen, J. (2004). Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, 61(3), 481-497. doi:10.1016/j.cardiores.2003.10.011
- Virani, S. S., Alonso, A., Benjamin, E. J., Bittencourt, M. S., Callaway, C. W., Carson, A. P., . . . Stroke Statistics, S. (2020). Heart Disease and Stroke Statistics-2020 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*, 141(9), e139-e596. doi:10.1161/CIR.0000000000000757
- Vöhringer, M., Mahrholdt, H., Yilmaz, A., & Sechtem, U. (2007). Significance of late gadolinium enhancement in cardiovascular magnetic resonance imaging (CMR). *Herz*, 32(2), 129-137. doi:10.1007/s00059-007-2972-5
- Vorob'ev, S. I. (2009). First- and second-generation perfluorocarbon emulsions. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 43(4), 209-218. doi:10.1007/s11094-009-0268-1
- Vu, M. N., Kelly, H. G., Wheatley, A. K., Peng, S., Pilkington, E. H., Veldhuis, N. A., . . . Truong, N. P. (2020). Cellular Interactions of Liposomes and PISA Nanoparticles during Human Blood Flow in a Microvascular Network. *Small*, 16(33), e2002861. doi:10.1002/smll.202002861
- Waiczies, H., Lepore, S., Janitzek, N., Hagen, U., Seifert, F., Ittermann, B., . . . Waiczies, S. (2011). Perfluorocarbon particle size influences magnetic resonance signal and immunological properties of dendritic cells. *PLoS One*, 6(7), e21981. doi:10.1371/journal.pone.0021981
- Weber, C., Belge, K. U., von Hundelshausen, P., Draude, G., Steppich, B., Mack, M., . . . Ziegler-Heitbrock, H. W. (2000). Differential chemokine receptor expression and

- function in human monocyte subpopulations. *J Leukoc Biol*, 67(5), 699-704. doi:10.1002/jlb.67.5.699
- Weber, C., Shantsila, E., Hristov, M., Caligiuri, G., Guzik, T., Heine, G. H., . . . Lip, G. Y. (2016). Role and analysis of monocyte subsets in cardiovascular disease. Joint consensus document of the European Society of Cardiology (ESC) Working Groups "Atherosclerosis & Vascular Biology" and "Thrombosis". *Thromb Haemost*, 116(4), 626-637. doi:10.1160/TH16-02-0091
- Weihrauch, D., Arras, M., Zimmermann, R., & Schaper, J. (1995). Importance of monocytes/macrophages and fibroblasts for healing of micronecroses in porcine myocardium. *Mol Cell Biochem*, 147(1-2), 13-19. doi:10.1007/BF00944778
- Weise, G., Basse-Luesebrink, T. C., Wessig, C., Jakob, P. M., & Stoll, G. (2011). In vivo imaging of inflammation in the peripheral nervous system by (19)F MRI. *Exp Neurol*, 229(2), 494-501. doi:10.1016/j.expneurol.2011.03.020
- Wenisch, C., Patruta, S., Daxbock, F., Krause, R., & Horl, W. (2000). Effect of age on human neutrophil function. *Journal of Leukocyte Biology*, 67(1), 40-45. doi:10.1002/jlb.67.1.40
- Werner, F., Jain, M. K., Feinberg, M. W., Sibinga, N. E., Pellacani, A., Wiesel, P., . . . Lee, M. E. (2000). Transforming growth factor-beta 1 inhibition of macrophage activation is mediated via Smad3. *J Biol Chem*, 275(47), 36653-36658. doi:10.1074/jbc.M004536200
- Westman, P. C., Lipinski, M. J., Luger, D., Waksman, R., Bonow, R. O., Wu, E., & Epstein, S. E. (2016). Inflammation as a Driver of Adverse Left Ventricular Remodeling After Acute Myocardial Infarction. *Journal of the American College of Cardiology*, 67(17), 2050-2060. doi:10.1016/j.jacc.2016.01.073
- Whelan, R. S., Kaplinskiy, V., & Kitsis, R. N. (2010). Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance. *Annu Rev Physiol*, 72, 19-44. doi:10.1146/annurev.physiol.010908.163111
- Wilcox, R. R. (2005). *Introduction to robust estimation and hypothesis testing* (Vol. 2). San Diego, CA: Academic Press.
- Williams, M. A., Rhoades, C. J., Newland, A. C., & Kelsey, S. M. (1999). The potential for monocyte-mediated immunotherapy during infection and malignancy--Part II: in vivo activation by exogenous cytokines and clinical applications. *Leuk Lymphoma*, 34(3-4), 207-230. doi:10.3109/10428199909050947
- Wohlhaupter, S. (2003). *Saccharide als Modulatoren von Leukozytenfunktionen im angeborenen Immunsystem*. (Dissertation), Universität Ulm, Ulm.
- Wolters, M., Mohades, S. G., Hackeng, T. M., Post, M. J., Kooi, M. E., & Backes, W. H. (2013). Clinical perspectives of hybrid proton-fluorine magnetic resonance imaging and spectroscopy. *Invest Radiol*, 48(5), 341-350. doi:10.1097/RLI.0b013e318277528c
- Wong, K. L., Tai, J. J., Wong, W. C., Han, H., Sem, X., Yeap, W. H., . . . Wong, S. C. (2011). Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood*, 118(5), e16-31. doi:10.1182/blood-2010-12-326355
- Wong, K. L., Yeap, W. H., Tai, J. J., Ong, S. M., Dang, T. M., & Wong, S. C. (2012). The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunol Res*, 53(1-3), 41-57. doi:10.1007/s12026-012-8297-3
- World Health Organisation (WHO). (2018). The top 10 causes of death. Retrieved from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
- Wu, Y. L., Ye, Q., Sato, K., Foley, L. M., Hitchens, T. K., & Ho, C. (2009). Noninvasive evaluation of cardiac allograft rejection by cellular and functional cardiac magnetic resonance. *JACC Cardiovasc Imaging*, 2(6), 731-741. doi:10.1016/j.jcmg.2009.01.013

- Yang, F., Liu, Y. H., Yang, X. P., Xu, J., Kapke, A., & Carretero, O. A. (2002). Myocardial infarction and cardiac remodelling in mice. *Exp Physiol*, *87*(5), 547-555. doi:10.1113/eph8702385
- Yang, L., Froio, R. M., Sciuto, T. E., Dvorak, A. M., Alon, R., & Lusinskas, F. W. (2005). ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF-alpha-activated vascular endothelium under flow. *Blood*, *106*(2), 584-592. doi:10.1182/blood-2004-12-4942
- Yang, Q., Wijerathne, H., Langston, J. C., Kiani, M. F., & Kilpatrick, L. E. (2021). Emerging Approaches to Understanding Microvascular Endothelial Heterogeneity: A Roadmap for Developing Anti-Inflammatory Therapeutics. *Int J Mol Sci*, *22*(15). doi:10.3390/ijms22157770
- Yazdimamaghani, M., Barber, Z. B., Hadipour Moghaddam, S. P., & Ghandehari, H. (2018). Influence of Silica Nanoparticle Density and Flow Conditions on Sedimentation, Cell Uptake, and Cytotoxicity. *Mol Pharm*, *15*(6), 2372-2383. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.8b00213
- Yeh, R. W., Sidney, S., Chandra, M., Sorel, M., Selby, J. V., & Go, A. S. (2010). Population trends in the incidence and outcomes of acute myocardial infarction. *New England Journal of Medicine*, *362*(23), 2155-2165. doi:10.1056/NEJMoa0908610
- Yilmaz, A., Dengler, M. A., van der Kuip, H., Yildiz, H., Rosch, S., Klumpp, S., . . . Sechtem, U. (2013). Imaging of myocardial infarction using ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles: a human study using a multi-parametric cardiovascular magnetic resonance imaging approach. *Eur Heart J*, *34*(6), 462-475. doi:10.1093/eurheartj/ehs366
- Young, S. H., Ye, J., Frazer, D. G., Shi, X., & Castranova, V. (2001). Molecular mechanism of tumor necrosis factor-alpha production in 1->3-beta-glucan (zymosan)-activated macrophages. *J Biol Chem*, *276*(23), 20781-20787. doi:10.1074/jbc.M101111200
- Zawada, A. M., Rogacev, K. S., Rotter, B., Winter, P., Marell, R. R., Fliser, D., & Heine, G. H. (2011). SuperSAGE evidence for CD14++CD16+ monocytes as a third monocyte subset. *Blood*, *118*(12), e50-61. doi:10.1182/blood-2011-01-326827
- Zeymer, U., Gitt, A., & Senges, J. (2005). Akuter ST-Strecken-Hebungs-Myokardinfarkt, Aktuelle Versorgungssituation der Patienten in Deutschland. *Herz Kardiovaskuläre Erkrankungen*, *30*(3), 241-248.
- Zhang, J., Liu, D., Zhang, M., & Zhang, Y. (2019). Programmed necrosis in cardiomyocytes: mitochondria, death receptors and beyond. *Br J Pharmacol*, *176*(22), 4319-4339. doi:10.1111/bph.14363
- Zhang, X., Li, H., Li, Y., Ma, Y., Luo, Y., Ji, W., . . . Li, Y. (2016). Increased circulating Ly6Chigh monocyte subsets are correlated with cerebral infarct size in cerebral ischemia/reperfusion mouse models. *Xi bao yu fen zi mian yi xue za zhi = Chinese journal of cellular and molecular immunology*, *32*(3), 294-298.
- Zhao, T., Zhao, W., Chen, Y., Ahokas, R. A., & Sun, Y. (2010). Vascular endothelial growth factor (VEGF)-A: role on cardiac angiogenesis following myocardial infarction. *Microvasc Res*, *80*(2), 188-194. doi:10.1016/j.mvr.2010.03.014
- Zhao, W., Lu, L., Chen, S. S., & Sun, Y. (2004). Temporal and spatial characteristics of apoptosis in the infarcted rat heart. *Biochem Biophys Res Commun*, *325*(2), 605-611. doi:10.1016/j.bbrc.2004.10.064
- Zhou, T., Chuang, C. C., & Zuo, L. (2015). Molecular Characterization of Reactive Oxygen Species in Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. *Biomed Res Int*, *2015*, 864946. doi:10.1155/2015/864946
- Zhou, X., Liu, X. L., Ji, W. J., Liu, J. X., Guo, Z. Z., Ren, D., . . . Heine, G. H. (2016). The Kinetics of Circulating Monocyte Subsets and Monocyte-Platelet Aggregates in the Acute Phase of ST-Elevation Myocardial Infarction: Associations with 2-Year

- Cardiovascular Events. *Medicine (Baltimore)*, 95(18), e3466. doi:10.1097/MD.0000000000003466
- Zhu, Z., Bao, Z., & Li, J. (1995). MacMARCKS mutation blocks macrophage phagocytosis of zymosan. *J Biol Chem*, 270(30), 17652-17655. doi:10.1074/jbc.270.30.17652
- Ziegler-Heitbrock, H. W. L. (2007). The CD14⁺ CD16⁺ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol*, 81(3), 584-592. doi:10.1189/jlb.0806510
- Ziegler-Heitbrock, H. W. L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D. N., . . . Lutz, M. B. (2010). Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*, 116(16), e74-80. doi:10.1182/blood-2010-02-258558
- Ziegler-Heitbrock, H. W. L., Fingerle, G., Strobel, M., Schraut, W., Stelter, F., Schutt, C., . . . Pforte, A. (1993). The novel subset of CD14⁺/CD16⁺ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages. *Eur J Immunol*, 23(9), 2053-2058. doi:10.1002/eji.1830230902
- Zylberberg, C., & Matosevic, S. (2016). Pharmaceutical liposomal drug delivery: a review of new delivery systems and a look at the regulatory landscape. *Drug Deliv*, 23(9), 3319-3329. doi:10.1080/10717544.2016.1177136

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen danken, die mich bei der Anfertigung und Bearbeitung meiner Dissertation unterstützt haben.

Besonders danken würde ich gerne PD Dr. Florian Bönner für die ausgezeichnete Betreuung und die Unterstützung bei der Durchführung der gesamten Arbeit sowie seine hilfreichen Anregungen, die konstruktiven Gespräche, Motivation und Korrekturen.

Des Weiteren möchte ich Prof. Dr. Dr. Christian Jung für seine Rolle als Doktorvater und seine Gutachtertätigkeit danken.

Außerdem danke ich Dr. med. vet. Annika Jahn, die mich im Rahmen der Dissertation bei der Versuchsdurchführung unterstützt hat sowie Dr. Fabian Nienhaus für die konstruktiven Gespräche.

Univ.-Prof. Dr. med. Tienush Rassaf möchte ich dafür danken, dass er mich auf die Idee gebracht hat, dieses Projekt anzugehen.

Heike, Jörg und Sebastian danke ich für ihre Geduld und Ermutigungen während des Studiums und der Arbeit an dieser Dissertation, die mich auf meinem Weg mit Rat, lieben Worten und mühevolem Korrekturlesen begleitet haben.