

Diplomarbeit

**Histopathologische Nachweismöglichkeiten eines akuten
Myokardinfarktes bei kurzer Überlebenszeit.**

eingereicht von

Benedikta Bettina Maria Kersten

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor(in) der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am

Diagnostik- & Forschungsinstitut für Pathologie

der Medizinischen Universität Graz

Dr. med. univ. Verena Maria Stangl

Assoz. Prof. Priv.-Doz. Dr. med. D. Med. Sci Peter Rainer

Graz, 20.05.2023

Eidesstattliche Erklärung:

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 20.05.2023 Benedikta Kersten eh.

Inhaltsverzeichnis:

I.	Abkürzungsverzeichnis	1
II.	Abbildungsverzeichnis	5
III.	Tabellenverzeichnis	6
IV.	Zusammenfassung	7
V.	Abstract	8
1	Einleitung	9
2	Zielsetzung	11
3	Aktueller Kenntnisstand zum Myokardinfarkt	12
3.1	Definition	12
3.1.1	pathologische Definition	12
3.1.2	klinische Definition	12
3.2	Ätiologie & Pathogenese	13
3.3	klinische Stadien	14
3.4	klinische Diagnostik	15
3.4.1	klinische Diagnostik – STEMI	16
3.4.2	klinische Diagnostik – NSTEMI	18
3.5	Makroskopie	20
3.6	Histologie (Gewebeveränderungen im zeitlichen Verlauf)	26
4	Material und Methoden	32
4.1	Übersichtstabelle	32
4.2	Beschreibung der Immunhistochemie-Marker	33
5	Ergebnisse	47
5.1	Zusammenfassung der Studienergebnisse	47
5.2	Resultattabelle	60

5.3	Zeitstrahl	72
6	Diskussion	74
6.1	Schlussfolgerung	83
7	Literaturverzeichnis	86

I. Abkürzungsverzeichnis:

Abb.	Abbildung
ACS	akutes Koronarsyndrom
AMI	akuter Myokardinfarkt
AP-1	Aktivator-Protein1
Bcl-2	B-Zell-Lymphom 2/ Apoptoseregulator Bcl-2
Bax	Bcl-2 assoziiertes X Protein/ Apoptoseregulator Bax
Bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CABG	Koronararterien-Bypass (coronary artery bypass grafting)
CANP	Calcium-activated neutral protease
CASP3	Caspase 3
CD	Cluster of differentiation
CD59	Protectin
CK	Creatin-Kinase
CK-MB	myokardiale Isoform der Creatin-Kinase
cm	Zentimeter
CPR	Kardiopulmonale Reanimation
cTn	kardiales Troponin (cTnI: kardiales Troponin I; cTnT: kardiales Troponin T; cTnC: kardiales Troponin C)
Cx43	Connexin 43 (phosphoryliert)

npCx43	dephosphoryliertes Connexin 43
C5b-9	(„terminaler“) Komplementkomplex C5b-9 bzw. Membranangriffskomplex (MAC)
C9	Komplementfaktor C9 (gilt auch für andere Komplementfaktoren: C1, C1q, C2, C3, C3a, C3d, C4, C4d, C5, C5a, C6, C7, C8)
DAMP	damage-associated molecular pattern
Etc.	et cetera
EKG	Elektrokardiographie
Epo	Erythropoietin
ESC	European Society of Cardiology
evtl.	eventuell
FN	Fibronektin
Fg	Fibrinogen
GAL-1	Galectin 1
g	Gramm
h	Stunde
H.E.	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
hFABP	kardiales Fettsäure-Bindungsprotein
HIF-1alpha	Hypoxie- induzierter Faktor 1alpha
HO-1	Hämoxygenase 1
HSP70	Hitzeschockprotein 70

ICAM-1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
IRAK1	Interleukin-1 Rezeptor aktivierte Kinase 1
i.v.	intravenös
kDa	Kilodalton
Ki-67	Kiel Antigen 67
KHK	Koronare Herzkrankheit
LAD	Ramus interventricularis anterior (left anterior descending artery)
LCA	linke Koronararterie (left coronary artery)
LCX	Ramus circumflexus (left circumflex coronary artery)
MB	Myoglobin
MCP-1	Monozyten-chemotaktisches Protein 1 (Synonym: CC-Chemokinligand 2 (CCL2))
MI	Myokardinfarkt
Min	Minuten
mm	Millimeter
n	Anzahl
nm	Nanometer
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NSTEMI	Nicht-ST-Hebungsinfarkt

PCI	perkutane Koronarintervention
RCA	rechte Koronararterie (right coronary artery)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
STEMI	ST-Hebungsinfarkt
SORBS2	Sorbin und SH3-Domäne enthaltendes Protein 2
Tab.	Tabelle
TLR	toll-like Rezeptor
TNF-alpha	Tumornekrosefaktor alpha
TUNEL	terminale Desoxynukleotidyltransferase vermittelte Desoxyuridinetriphosphat Bruchenden Markierung
u.a.	unter anderem
Ubq	Ubiquitin
v.a.	vor allem
VEGF	Endothelwachstumsfaktor
ZO-1	Zonula Occludens 1

II. Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1: Differenzierung eines akuten Koronarsyndroms	16
Abbildung 2: EKG eines STEMI	17
Abbildung 3: Ischämische und nicht-ischämische Ursachen, die zu erhöhten herzspezifischen Troponinwerten führen können	19
Abbildung 4: Makroskopie – Schnitt durch die Ventrikelwand: ausgedehnter Myokardinfarkt; lehmgelb-verändertes Myokard mit Einblutungen	22
Abbildung 5: Koronararterien bei einem Normalversorgungstyp	23
Abbildung 6: Versorgungsbereiche der Koronararterien in Schnittebenen der Echokardiographie	24
Abbildung 7: Topografie verschiedener Myokardinfarkte	25
Abbildung 8: Kontraktionsbandnekrose, H.E.	28
Abbildung 9: diffuses Infiltrat polymorphkerniger Zellen, H.E.	29
Abbildung 10: Neovaskularisiertes Granulationsgewebe, H.E.	30
Abbildung 11: straffes, fibrotisches Narbengewebe, H.E.	31
Abbildung 12: IHC-Färbung Myoglobin	35
Abbildung 13: IHC-Färbung Dystrophin.....	37
Abbildung 14: IHC-Färbung npCx43	39
Abbildung 15: IHC-Färbung Fibronektin	40
Abbildung 16: TUNEL-Methode	42
Abbildung 17: Darstellung des zeitlichen Verlaufs der zellpathophysiologischen Prozesse während eines Herzinfarktes	43
Abbildung 18: IHC-Färbung Galectin 1.....	45
Abbildung 19: Zeitliche Darstellung der Studienergebnisse	73

III. Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1: Makroskopische Veränderungen eines Myokardinfarktes	20
Tabelle 2: Mikroskopische Veränderungen eines Myokardinfarktes	26
Tabelle 3: Übersichtstabelle untersuchter IHC-Marker	32
Tabelle 4: Zusammenfassung der Studienergebnisse	60
Tabelle 5: Mögliche Kombination verschiedener IHC-Marker zur Diagnostik eines Myokardinfarktes mit kurzer Überlebenszeit.....	84

IV. Zusammenfassung:

Einleitung: Der Nachweis eines Myokardinfarktes mit kurzer Überlebenszeit stellt für Patholog*innen und Forensiker*innen eine Herausforderung dar.

Myokardinfarkte müssen einige Stunden überlebt werden, damit es histologisch unter Anwendung einer H.E. Färbung zur nachweisbaren histomorphologischen Veränderungen kommt. Zur Sicherstellung der Diagnose eines akuten Myokardinfarktes mit einer kurzen Überlebenszeit werden histologische Methoden und spezielle immunhistochemische Untersuchungen benötigt. Einige Immunhistochemie-Marker wurden bereits in Studien untersucht, jedoch wurde bisher kein Antikörper als hoch-spezifischer und sensitiver Goldstandard bei kurzer Überlebenszeit identifiziert.

Methoden: Diese Diplomarbeit soll vorrangig die immunhistochemischen Nachweismethoden, die in den Studien bereits angewendet wurden, anhand einer Literaturrecherche zusammenfassen und einen Überblick schaffen, welche Marker Potential für weiterführende Untersuchungen hätten.

Dazu wurden die immunhistochemischen Marker abhängig von deren zellpathophysiologischen Eigenschaften in 8 Gruppen gegliedert und deren Reaktion in Bezug auf Sensibilität und Spezifität geprüft und verglichen.

Ergebnisse: Mittels Immunhistochemie war der Nachweis von Myokardveränderungen bereits innerhalb der ersten Stunde nach Ischämiebeginn möglich. S100A1, hFABP, Dystrophin, npCx43, JunB, HIF-1alpha, GAL-1 und bcl-2 zählen zu den sensitiven IHC-Markern, die einen besonders frühen Nachweis ermöglichen. C5b-9 scheint aktuell der spezifischste Marker für irreversibel geschädigte Kardiomyozyten zu sein. Das Vorhandensein von Entzündungsmediatoren in der Infarktregion wurde immunhistochemisch ebenfalls vor der Einwanderung von Entzündungszellen beobachtet.

Schlussfolgerungen: Bei klinischem Verdacht auf einen akuten Myokardinfarkt, welcher sich mit der reinen H.E. Färbung nicht sicher nachweisen lässt, ist die Verwendung einer Kombination aus IHC-Markern verschiedener Gruppen

empfehlenswert. Diesbezüglich sind weitere Studien an größeren Kohorten dringend notwendig.

V. Abstract:

Introduction: The detection of a myocardial infarction with a short survival time is a challenging task for pathologists and forensic doctors. Myocardial infarctions have to be survived for a few hours so histomorphological changes can be identified by using H.E. staining. For confirming the diagnosis of an acute myocardial infarction with a short survival time histological methods and specific immunohistochemical investigations are needed. Many immunohistochemical markers have been investigated, but no antibody has been announced for being highly specific and sensitive gold standard yet.

Methods: Based on literature search, this work is intended to summarize immunohistochemical methods that have already been examined in studies. Markers with potential for further investigations should be identified.

For this, the immunohistochemical markers have been classified into 8 groups, based on their different cell pathophysiological features. Their sensitivity and specificity were examined.

Results: The identification of myocardial changes using immunohistochemistry was already possible within the first hour after the onset of ischemia. S100A1, hFABP, dystrophin, npCx43, JunB, HIF-1alpha, GAL-1 and bcl-2 are among the sensitive IHC markers which enable a particularly early detection. C5b-9 seems to be the most specific marker for irreversibly damaged cardiomyocytes at the moment. The presence of inflammatory mediators in the infarct region prior to the inflammatory cell migration was also observed immunohistochemically.

Conclusions: The use of a combination of IHC markers from different groups is recommended, if there is a clinical suspicion of an acute myocardial infarction, which cannot be reliably detected with H.E. staining. In this regard, further studies on larger cohorts are needed.

1 Einleitung:

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen die häufigste Todesursache in Europa dar.(1) In den westlichen Industrieländern erleiden jährlich 300 von 100.000 Menschen einen Herzinfarkt, wovon 30% einen tödlichen Ausgang haben.(2) Die Inzidenzen atherosklerotischer und kardiovaskulärer Erkrankungen haben weltweit stark zugenommen.(3) Die Statistik Austria registrierte im Jahr 2021 91.962 Todesfälle in Österreich, von denen 31.403 an Herz-Kreislauf-Erkrankungen starben. Bei 13,7% (4.301) wurde ein akuter Myokardinfarkt als Todesursache diagnostiziert.(4)

Das akute Koronarsyndrom (ACS) umfasst ein Spektrum an klinischen Erkrankungen, welche aus einem akuten oder subakuten Ungleichgewicht zwischen Sauerstoffangebot und Bedarf im Myokard resultieren. Abhängig von der Dauer und dem Schweregrad der Minderversorgung des Herzmuskels (relative/ absolute Ischämie) kann sich das ACS in Form einer instabilen Angina pectoris, eines Nicht-ST-Hebungsinfarktes (NSTEMI), eines ST-Hebungsinfarktes (STEMI) oder eines plötzlichen Herztodes manifestieren. Die epidemiologischen Zahlen und der potentielle Schweregrad eines ACS unterstreichen die Bedeutung einer rechtzeitigen Diagnose und angemessenen Behandlung.(5) Innerhalb der letzten 30 Jahre konnten in der Akuttherapie eines Myokardinfarktes große Fortschritte erzielt werden. Obwohl durch hocheffiziente Therapiemaßnahmen, wie frühinterventionelle Infarktbehandlung und moderne Plättchenhemmung, die Mortalität deutlich gesenkt werden konnte, ist die Prähospitalmortalität des Herzinfarktes nahezu unverändert hoch.(6) Etwa die Hälfte der Todesfälle eines Myokardinfarktes ereignen sich außerhalb eines klinischen Umfeldes beziehungsweise noch vor Eintreffen in einem Krankenhaus.(7)

Bei unklarer Todesursache oder zu dessen klinischer Bestätigung erfolgt eine Obduktion zur Diagnosesicherung. Die Diagnose eines Myokardinfarktes bei nur kurzer Überlebenszeit kann allerdings mit den gängigen Nachweismethoden eine Herausforderung für Patholog*innen und Gerichtsmediziner*innen darstellen.(8) Die histologischen Merkmale mittels Standard-Hämatoxylin-Eosin-(H.E.) -Färbung sind bei einer Überlebenszeit unter 4 Stunden in der Regel nicht ausreichend

spezifisch, um eindeutig einen akuten Myokardinfarkt als Ischämie-Ursache auszumachen.(9)

2 Zielsetzung:

Zur Diagnose eines akuten Myokardinfarktes mit kurzer Überlebenszeit ist der Nachweis frischer Herzmuskelnekrosen erforderlich. Atherosklerotisch-veränderte Koronararterien mit Plaqueruptur oder ein frischer Lumen-verlegenden Thrombus bestätigen makroskopisch einen Herzinfarkt. Da am myokardialen Gewebe der makroskopische und histopathologische Nachweis bei frühen ischämischen Ereignissen jedoch nicht immer sicher gelingt, werden alternative Nachweismethoden benötigt.

In diversen Studien wurden bereits alternative Färbungen und immunhistochemische Nachweismethoden für frische Herzmuskelnekrosen beschrieben. Ziel dieser Diplomarbeit ist es die Ergebnisse der Studien zusammenzufassen, einen Überblick über bereits untersuchte immunhistochemische (IHC)-Marker zu schaffen, die Nachweismethoden zu vergleichen und in Bezug auf dessen Spezifität, Sensitivität und deren zeitlichen Anfärbbarkeit kritisch zu diskutieren.

Neue Erkenntnisse in diesem Bereich sind für die Forensik und Pathologie von Bedeutung. Daher besteht das Ziel dieser wissenschaftlichen Arbeit darin, vielversprechende IHC-Marker ausfindig zu machen, die sich zum Nachweis eines akuten Myokardinfarktes mit kurzer Überlebenszeit eignen. Des Weiteren sollen mögliche Einflussfaktoren beleuchtet werden, die die Sensitivität oder Spezifität der Nachweismethoden beeinflussen könnten.

Für klinisch tätige Kardiolog*innen ist es von Bedeutung die Zellpathophysiologie im Rahmen eines Myokardinfarktes und die Gewebe-Reparaturmechanismen genauer zu untersuchen. Anhand eines besseren Verständnisses der Ereignisse innerhalb des ischämischen Gewebes können neue Behandlungsmöglichkeiten entwickelt und deren mögliche Komplikationen eruiert werden. Von neuen Behandlungsansätzen verspricht man sich Zelluntergänge reduzieren und in weiterer Folge das Ausmaß der Infarktregion verringern zu können.

3 Aktueller Kenntnisstand zum Myokardinfarkt:

3.1 Definition:

3.1.1 pathologische Definition:

Der Myokardinfarkt wird in der Pathologie als myokardialer Zelltod aufgrund einer prolongierten Ischämie definiert.(10) Die irreversible Herzmuskelschädigung beginnt, sobald eine Koronararterie bzw. dessen Ast über mehr als ca. 20 Minuten verschlossen ist.(11) Makroskopisch und histologisch manifestiert sich der Zelluntergang bei einem Herzinfarkt als Koagulationsnekrose, die durch Denaturierung zellulärer Proteine gekennzeichnet ist.(12)

3.1.2 klinische Definition:

Ein Herzinfarkt entsteht in der Regel durch eine abrupte Unterbrechung des Blutflusses in einem Abschnitt der Herzkranzarterien. In der Hälfte der Fälle geht dem ischämischen Ereignis eine körperliche oder emotionale Belastung voraus.(7) Im nachgeschalteten Versorgungsgebiet der okkludierten Arterie entsteht ein Sauerstoffmangel des Gewebes und in weiterer Folge ein anämischer Infarkt.(13)

Die meisten Patient*innen nehmen einen spontan einsetzenden retrosternalen Schmerz wahr, der in Nacken, Hals, Unterkiefer, Arm, Rücken und Oberbauch ausstrahlen kann und häufig von vegetativen Symptomen, Luftnot, Schweißausbruch, Blässe, Übelkeit und Erbrechen begleitet wird. Allerdings können Patient*innen mit einem Herzinfarkt auch diffuse Beschwerden äußern. Bei älteren Patient*innen, Frauen und Diabetiker*innen kann eine Myokardischämie gar stumm verlaufen.(1, 7)

Die klinische Diagnose eines akuten Myokardinfarktes kann anhand der WHO-Kriterien gestellt werden. Es müssen 2 der folgenden Kriterien vorhanden sein: Akut einsetzende, über 20 Minuten andauernde Brustschmerzen; neu auftretende charakteristische Elektrokardiographie- (EKG-)Veränderungen; erhöhte Serumspiegel der Herzmarker.(2) Ein Anstieg der kardialen Biomarker cTnT und cTnI weisen auf eine akute myokardiale Schädigung hin. Ein NSTEMI wird diagnostiziert, wenn die Serumwerte im zeitlichen Verlauf ansteigen oder abfallen, jedoch keine spezifischen EKG-Veränderungen festgestellt werden können. Bei

gleichbleibend hohen oder im Normalbereich befindlichen kardialen Biomarkern kann ein akuter Myokardinfarkt ausgeschlossen werden.(10)

3.2 Ätiologie & Pathogenese:

Die Koronararterienthrombose ist die häufigste Ursache für einen akuten Myokardinfarkt und plötzlichen Herztod.(11) Atherosklerotisch veränderte Koronararterien-Abschnitte sind Prädilektionsorte für eine thrombotische Auflagerung bzw. für eine Plaque-Ruptur mit anschließendem thrombotischen Ereignis. In 80% der Fälle kann ein Thrombus nachgewiesen werden.(2) Die Formation eines intrakoronaren Blutgerinnsels kann initiiert werden durch die Ruptur einer vulnerablen atherosklerotischen Plaque oder durch eine Plaqueerosion, an deren intakter Oberfläche ein Thrombus anhaftet.(5)

Gefäßstenosen können abhängig von ihrer Lumeneinengung als geringgradig (<30-50%) oder hochgradig (>70-75%) klassifiziert werden. Eine koronare atherosklerotische Lumeneinengung von 75% oder mehr wird als kritische Stenose bezeichnet, da durch funktionelle Veränderungen, wie Belastung oder Koronarspasmus, irreversible Myokardschädigungen entstehen können. Eine Koronarstenose von 90% oder mehr führt bereits im Ruhezustand zur Myokardischämie.(8)

Atherosklerose ist die Hauptursache für die Entstehung einer koronaren Herzkrankheit (KHK), welche sich in weiterer Folge als Herzinfarkt manifestieren kann.(2) Die kardialen Risikofaktoren umfassen u.a. Diabetes mellitus, Nikotinabusus, arterielle Hypertonie, Hyperlipidämie, eine positive Familienanamnese für koronare Herzkrankheiten, das Alter und männliche Geschlecht, Adipositas und eine bewegungsarme Lebensweise.(14)

Seltenere Ursachen für ein ischämisches Koronarereignis sind beispielsweise Koronarspasmus, Spontandissektion, Embolisation, angeborene Fehlbildung, koronare mikrovaskuläre Dysfunktion und Vaskulitis. Weitere Gründe für einen erhöhten Sauerstoffbedarf bei unzureichender myokardialer Versorgung können anhaltende Tachyarrhythmien, Bradyarrhythmien, schwere Hypertonie,

linksventrikuläre Hypertrophie und/ oder Dilatation, respiratorisches Versagen, schwere Anämie oder ein hypovolämischer Schock sein.(8)

3.3 klinische Stadien:

Die European Society of Cardiology (ESC) definiert 5 Myokardinfarkt-Typen, die sich in ihrer Ätiologie, der Pathologie, der Klinik, in den Behandlungsstrategien und ihrer Prognose unterscheiden.(10)

Der Typ 1 entspricht dem am häufigsten vorkommenden Herzinfarkt: Der akuten thrombotischen Koronararterienokklusion, die überwiegend auf dem Boden einer KHK entsteht.(10)

Typ 2 Myokardinfarkt ist gekennzeichnet durch ein Ungleichgewicht zwischen Sauerstoffversorgung und -bedarf, dem keine koronare Atherothrombose oder akute Plaqueruptur zugrunde liegt. In diese Gruppe fällt beispielsweise das klinische Syndrom MINOCA („Myokardinfarkt mit nicht-obstruktiven Koronararterien“) bei dem die Koronararterien maximal eine geringgradige Stenosierung ($\leq 50\%$) aufweisen.(8) Einige Studien weisen darauf hin, dass Frauen häufiger von Typ 2 Infarkten betroffen sind als Männer. Weiterhin wurde gezeigt, dass sich dieser Subtyp im Vergleich zum Typ1 Myokardinfarkt deutlich seltener (in nur 3-24%) mit einer ST-Streckenhebung im EKG präsentiert. In einigen Studien wurde eine höhere Sterblichkeitsrate bei Patient*innen mit Typ 2, infolge einer erhöhten Prävalenz an Komorbiditäten, beschrieben.(10)

Unter dem Typ 3 Herzinfarkt werden jene Patient*innen zusammengefasst, die in einem klinischen Umfeld versterben, deren Symptome stark auf eine Myokardischämie hindeuten (Brustschmerzen, ischämischen EKG-Veränderungen oder Kammerflimmern), jedoch vor Eintreten des Todes keine kardialen Biomarker oder deren Anstieg im Serum mehr nachgewiesen werden konnten.(8, 10)

Die Typ 4 und Typ 5 stehen im Zusammenhang mit Koronareingriffen. Eine Myokardverletzung kann während eines Eingriffs erfolgen oder als Komplikation nach einer perkutanen Koronararterienintervention (PCI) oder einer Koronararterien-Bypass-Graft (CABG)-Operation auftreten. Ein signifikanter

Anstieg der kardialen Serumwerte nach einem Revaskularisierungsverfahren kann ein Hinweis für eine Eingriffs-assoziierte Myokardischämie sein.(10)

Typ 4 Myokardinfarkt kann in 3 weitere Subtypen untergliedert werden. Typ 4a ist definiert als Herzinfarkt, der innerhalb der ersten 48 Stunden nach PCI entsteht.

Typ 4b steht in Zusammenhang mit einer Stentthrombose, die entweder akut (innerhalb von 24 Stunden), subakut (24 Stunden bis 30 Tage), spät (über 30 Tage bis 1 Jahr) oder sehr spät (über 1 Jahr nach Stentimplantation mittels PCI) auftreten kann.(10) Akute Stentthrombosen sind ein sehr seltenes Ereignis, können jedoch durch Fehlpositionierung des implantierten Stents, Dissektion, lange oder abgewinkelte Stentsegmente, Überempfindlichkeitsreaktion oder unzureichende Plättchenhemmung bedingt sein. Eine späte Stentthrombose nach über einem Jahr nach Implantation ist bei einigen Patient*innen auf das Absetzen der Thrombozytenaggregationshemmer zurückzuführen. Sie stellt eine seltene, aber lebensbedrohliche Komplikation dar.(8) Typ 4c Myokardinfarkt ist ebenfalls assoziiert mit einer PCI und ist gekennzeichnet durch eine fokale oder diffuse Restenose.(10) Eine fibrozelluläre Restenose wird überwiegend bei Patient*innen mit unbeschichtetem Stent (non-coated bare metal stent) beobachtet. Typ 5 beschreibt eine Myokardischämie, die in Zusammenhang eines CABG innerhalb der ersten 48 Stunden nach Operation auftritt.(8)

3.4 klinische Diagnostik:

Eine Myokardischämie kann häufig anhand der Anamnese des Patienten/ der Patientin und mithilfe eines EKGs identifiziert werden.(10)

Wird ein/e Patient/in mit thorakalen Schmerzen und/ oder anderen ischämischen Symptomen im Krankenhaus vorstellig, lautet die Arbeitsdiagnose „Akutes Koronarsyndrom“ (ACS). Anschließend erfolgt ein 12-Kanal-EKG, anhand dessen Auffälligkeiten wird zwischen STEMI und NSTEMI unterschieden.(7)

Die rasche Differenzierung von STEMI, NSTEMI und instabiler Angina pectoris ist aufgrund ihrer unterschiedlichen Bedrohlichkeit und verschiedener Behandlungsstrategien entscheidend.(5, 15)

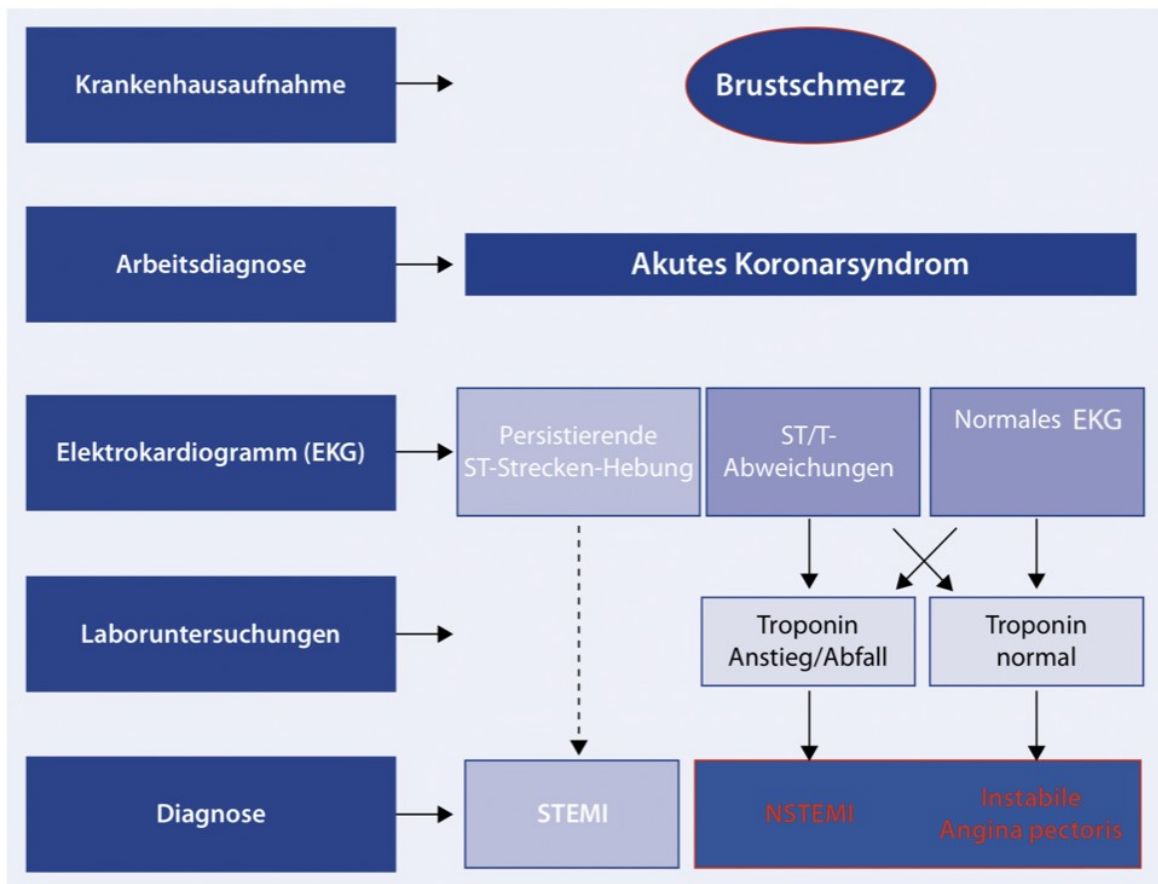


Abbildung 1: Differenzierung eines akuten Koronarsyndroms (modifiziert nach Verhoff et al. (16))

3.4.1 klinische Diagnostik – STEMI:

Als STEMI werden ST-Streckenhebungen in zumindest 2 benachbarten EKG-Ableitungen oder neu aufgetretene Schenkelblöcke mit ischämischen Repolarisationsmustern bezeichnet.(10) ST-Streckenhebungen sind hinweisend für eine transmurale Ischämie. Auf die Lokalisation der okkludierten Koronararterie kann anhand der Veränderungen der einzelnen EKG-Ableitungen geschlossen werden. Ein Hinterwandinfarkt, bzw. ein Verschluss der rechten Koronararterie (RCA), ist gekennzeichnet durch ST-Streckenhebungen in den EKG-Ableitungen II, III und aVF und reziprok durch die ST-Streckensenkungen in Ableitung I und aVL. Ein Verschluss des Ramus interventricularis anterior (LAD) führt zu einer ST-Streckenhebung in zumindest 2 (benachbarten) Brustwandableitungen V1, V2, V3 und V4. Eine Okklusion des Ramus circumflexus (LCX) präsentiert sich durch ST-

Streckenhebungen in I und aVL und reziproken ST-Streckensenkungen III und aVF.(17)

Die Entwicklung pathologischer Q-Zacken in den EKG-Ableitungen, die der Infarktregion zuzuordnen sind, kann ebenfalls auf einen akuten Myokardinfarkt hinweisen.(10)

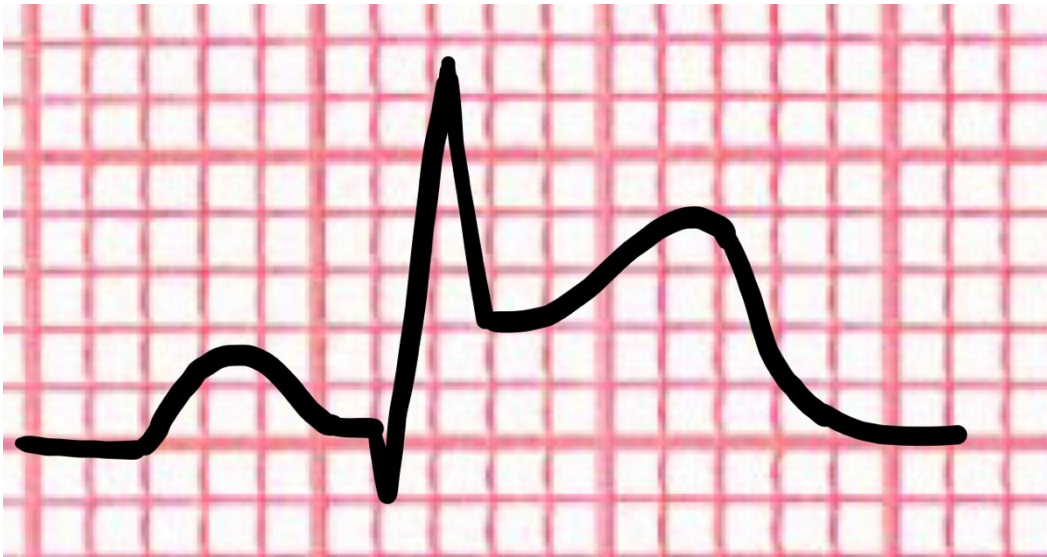


Abbildung 2: EKG eines STEMI

ST-Streckenhebungen können ebenso durch einen Schenkelblock, Hypertrophie und Perikarditis hervorgerufen werden.(17)

Nach Diagnosesicherung eines akuten STEMI ist eine sofortige Reperfusionstherapie einzuleiten.(7) Die Patient*innen sollten so früh wie möglich in ein Krankenhaus mit Katheterlabor gebracht werden. Die primäre PCI ist die bevorzugte Reperfusionsmaßnahme bei Patient*innen mit STEMI innerhalb der ersten 12 Stunden nach Symptombeginn.(18) Die PCI sollte innerhalb der ersten 2 Stunden nach dem ersten medizinischen Kontakt erfolgen, um das Leben des Patienten/ der Patientin zu verlängern, die Symptome zu lindern und das Ausmaß der Myokardnekrose zu minimieren.(7, 8) Die Therapieentscheidung darf nicht durch fehlende kardiale Troponinwerte verzögert werden. Klinische Studien beweisen, dass die primäre PCI der Fibrinolyse-Therapie bei Reduzierung der Mortalität, eines Schlaganfalls oder eines Reinfarktes überlegen ist. Dennoch gibt es Situationen, in denen der Transport in ein Krankenhaus mit Katheterlabor zu

erheblicher zeitlicher Verzögerung führen würde. In diesem Fall sollte man zügig, innerhalb der ersten 10 Minuten nach Diagnosestellung, eine medikamentöse Lyse-Therapie einleiten und anschließend den Transfer in ein PCI fähiges Krankenhaus veranlassen.(18)

3.4.2 klinische Diagnostik - NSTEMI:

Der NSTEMI wird anhand einer Blutabnahme laborchemisch bestätigt.(10) Im Gegensatz zum STEMI weist der NSTEMI keine charakteristischen EKG-Veränderungen auf. Negative T-Wellen können jedoch hinweisend auf einen NSTEMI sein. Jedoch können auch andere Ursachen, wie Medikamente und Elektrolytstörungen Veränderungen der T-Welle verursachen.(17)

Zur Differenzierung zwischen NSTEMI und instabiler Angina pectoris erfolgt die Bestimmung der kardialen Troponinwerte (cTn) im Serum.(7) Ansteigende und/oder fallende cTnI und cTnT Biomarker, mit mindestens einem Wert über der 99. Perzentile des oberen Referenzwertes, sind hinweisend auf eine akute Myokardschädigung.(10) Ein NSTEMI ist charakterisiert durch fehlende ST-Streckenhebungen im EKG, aber signifikant erhöhten kardialen Markern im Serum. Die Diagnose einer instabilen Angina pectoris dagegen erfolgt anhand der ischämischen Symptomatik und nicht-signifikant erhöhten cTn-Spiegeln.(11)

cTnI und cTnT sind Proteine, die fast ausschließlich im Herz exprimiert werden.(10) Ein Anstieg der kardialen Troponine im Serum kann jedoch nicht unmittelbar nach Ischämiebeginn detektiert werden. Bei Patient*innen mit initial negativen Messwerten müssen weitere serielle Troponin-Bestimmungen erfolgen, bevor eine Myokardischämie ausgeschlossen werden kann.(1) Erhöhte cTn-Spiegel weisen zwar auf Myokardverletzungen hin, jedoch nicht auf den zugrunde liegenden Pathomechanismus der Zellschädigung.(10) Myokarditis, Kardiomyopathien, Strahlungs-induzierte Verletzungen, Drogen, endogene Katecholamine, kardiale Interventionen, Traumen (z.B. CPR-bedingte Gewebeschädigung), Niereninsuffizienz, etc. können ebenfalls zu myokardialer Gewebeschädigung führen.(8) Ein Anstieg und/oder Abfall der kardialen Troponinwerte wird/ werden mit einem akuten Zelluntergang assoziiert. Unverändert erhöhte cTn-Werte dagegen sprechen für eine chronische

Herzmuskelschädigung bzw. für Schädigungen, die mit strukturellen Herzerkrankungen assoziiert sind.(10)

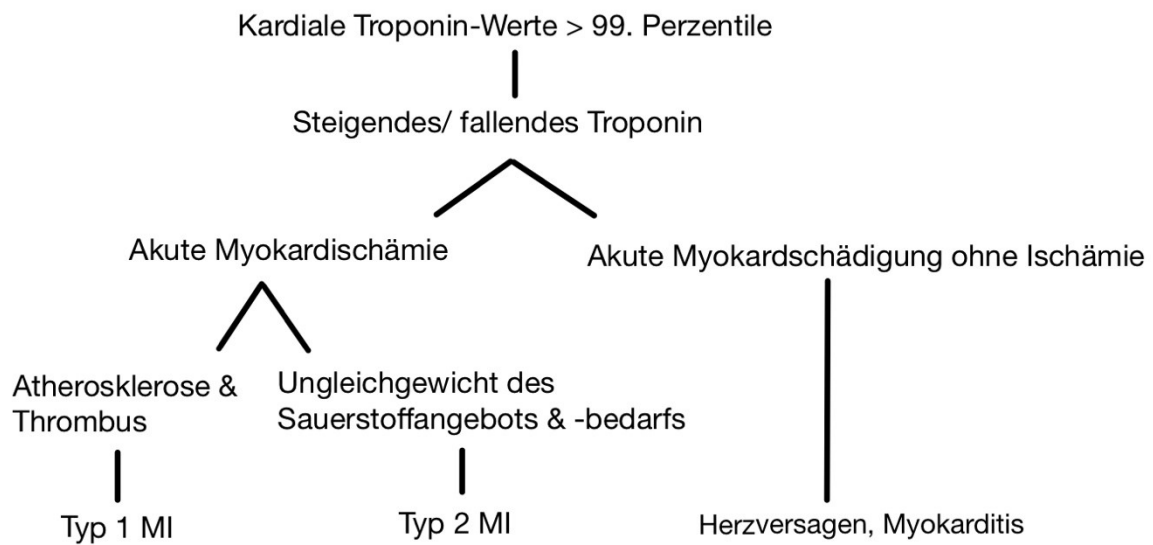


Abbildung 3: Ischämische und nicht-ischämische Ursachen, die zu erhöhten herzspezifischen Troponinwerten führen können (modifiziert nach Thygesen et al. (10))

Es gibt weitere kardiale Serummarker, wie Myoglobin, Creatin-Kinase (CK) oder dessen Isoformen (CK-MB), etc.. Allerdings spielen sie aufgrund ihrer geringeren Konzentration oder ihres späteren Anstiegs im Serum, ihrer geringeren Sensitivität und Spezifität für einen Myokardinfarkt in der praktischen Anwendung heutzutage eine untergeordnete Rolle.(1)

Die Echokardiographie stellt ein bildgebendes Verfahren dar, welches beispielsweise bei nicht eindeutigem EKG weitere Informationen liefern kann. Mittels Echokardiographie können Wandbewegungsstörungen des Herzens identifiziert und die ventrikuläre Auswurfraction beurteilt werden.(7) Bei STEMI Patient*innen mit kardiogenem Schock kann diese Untersuchungsmethode Aufschluss über potentielle Komplikationen des Myokardinfarktes geben und eine Risikostratifizierung erlauben.(15) Herzwandaneurysmen, Pseudoaneurysmen, Septumruptur, Ventrikelwandruptur mit Herzbeutelamponade, Papillarmuskelruptur, Mitralklappeninsuffizienz und Ventrikelthromben sind

Komplikationen eines Myokardinfarktes, die mithilfe einer Echokardiographie detektiert werden können.(6)

3.5 Makroskopie:

Bei der Obduktion wird die Größe und Form des Herzens beurteilt. Das Herz sollte in etwa der Größe der Faust des/ der Verstorbenen entsprechen. Der Längsdurchmesser von der Herzbasis bis zur Spitze misst im Normalfall 9-10 Zentimeter (cm), der Querdurchmesser des Herzens 8-9 cm.(19) Das physiologische Gewicht eines Herzens ist abhängig vom Geschlecht, dem Alter, der Körpergröße und dem Körpergewicht der Person. Kitzman et al publizierten auf der Basis ihrer Studienergebnisse altersspezifische Durchschnittswerte für Herzgewicht, Herzwanddicke und Durchmesser der Herzklappen.(20) Ein Herzgewicht von 500g oder mehr wird als kritisch bezeichnet, da die koronare Versorgung der gesteigerten Herzmuskelmasse zunehmend insuffizient wird.(19) Es kommt zur Ischämie in der Grenzzone zweier Versorgungsbezirke. Dieses Phänomen wird als Prinzip der „letzten Wiese“ bezeichnet.(13) Insbesondere bei hypertrophierten und dilatierten Herzen kann es bevorzugt im subendokardialen Bereich zu mikrovaskulären Dysfunktionen, aufgrund von funktionellen Beeinträchtigungen des Blutflusses und Drucks in kleinen intramyokardialen Gefäßen kommen.(8) Im Rahmen der Obduktion wird die Wandstärke der Herzkammern an der Herzbasis gemessen. Ein weiteres Augenmerk wird auf die Weite des linken Ventrikels gelegt. Ein normales Herz weist eine gotische Spitzbogenform auf. Eine romanische Rundbogenform und abgeplattete Papillarmuskeln deuten auf eine Ventrikeldilatation hin.(19)

Tabelle 1: Makroskopische Veränderungen eines Myokardinfarktes (2, 11, 12, 19, 21)

Zeit	Makroskopische Veränderungen
6-12 Stunden (Früh-Phase)	herdförmige Abblassung; Nekroseareal fest und geschwollen

12-24 Stunden	lehmigelbe Bezirke mit trockener und prominierender Oberfläche (Koagulationsnekrose); Gewebe wirkt weicher, brüchig
36 Stunden	hämorrhagischer Randsaum
nach 10 Tagen	Granulationsgewebe: grau-rot, feucht, eingesunken
ab 2. Woche	Narbenbildung
nach 2 Monaten	Abgeschlossene Narbenbildung: grau-weiß, derb (Herzmuskelschwiele)

Die Schnittfläche des Myokards erscheint im Normalfall braun-rot.(19) Frische Infarktregionen, die weniger als 4-6 Stunden überlebt wurden, sind postmortem nicht immer sicher zu identifizieren.(11) Makroskopische Veränderungen sind innerhalb der ersten 6-12 Stunden nach Koronarverschluss durch herdförmige Abblassungen gekennzeichnet.(19) In der frühen Myokardinfarkt-Phase wirkt das Nekroseareal fest und geschwollen.(12) 12-24 Stunden alte Infarkte sind durch lehmigelbe Bezirke mit trockener und prominierender Oberfläche charakterisiert(19) und wirken im Vergleich zum umliegenden Parenchym weicher. Dieses Erscheinungsbild deutet auf eine beginnende Leukozyten-Infiltration und proteolytische Degradierung hin. Die Koagulationsnekrose ist durch eine erhöhte Brüchigkeit gekennzeichnet.(12) 36 Stunden nach Koronarverschluss beginnt sich ein hämorrhagischer Randsaum um die Läsion zu bilden und ist Mitte der ersten Woche am ausgeprägtesten.(21) Nach 10 Tagen beginnt die Bildung des Granulationsgewebes und lässt das Nekroseareal grau-rot, feucht und eingesunken erscheinen.(19) Ab der zweiten Woche beginnt ausgehend von der Peripherie die Bildung einer fibrösen grauen Narbe, die nach 2 Monaten normalerweise vollständig abgeschlossen ist.(11) Das abgeheilte, vernarbte Infarktgebiet manifestiert sich als derb, grau-weiße Schwiele.(2, 19)



Abbildung 4: Makroskopie – Schnitt durch die Ventrikelwand: ausgedehnter Myokardinfarkt; lehmgelb-verändertes Myokard mit Einblutungen

Die Topografie eines Myokardinfarktes kann anhand verschiedener Muster klassifiziert werden. Ein regionaler Infarkt entsteht im nachfolgenden Versorgungsgebiet der jeweils verschlossenen Koronararterie.(8) Abhängig von dem Verlauf und der Verästelung der Koronararterien können drei Hauptversorgungstypen unterschieden werden: Normalversorgungstyp, Rechts- und Linksversorgungstyp.(22)

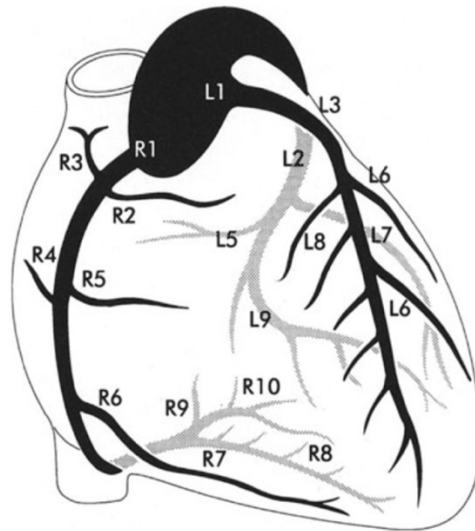


Abbildung 5: Koronararterien bei einem Normalversorgungstyp (Roskamm H., Herzkrankheiten, Seite 383 (22))

Die Koronararterien bei einem Normalversorgungstyp sind in etwa gleich stark ausgeprägt. Die linke Koronararterie (L1, LCA) teilt sich in Ramus interventricularis anterior (L3, LAD) und Ramus circumflexus (L2, LCX) und deren weiteren Äste auf. Die rechte Koronararterie (R1, RCA) gibt den Ramus interventricularis posterior (R7) ab. Bei dem Normalversorgungstyp versorgen die rechte und die linke Koronararterie die Herzhinterwand über den Ramus interventricularis posterior (R7), den Ramus posterolateralis dexter (R10) und die Äste des Ramus circumflexus (L2).(22)

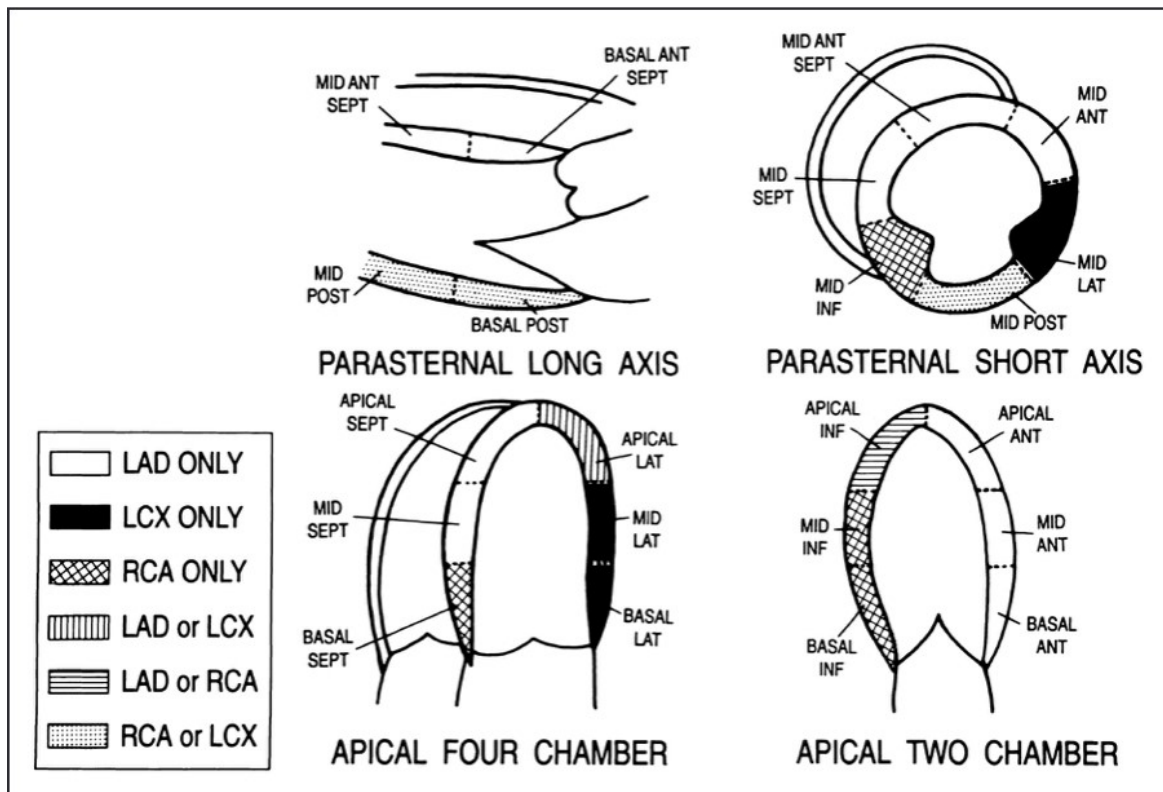


Abbildung 6: Versorgungsbereiche der Koronararterien in Schnittebenen der Echokardiographie (ANT: anterior, POST: posterior, SEPT: septal, INF: inferior, LAT: Lateral) (23)

Die Koronararterien sind funktionelle Endarterien. Ein plötzlicher Verschluss führt zu einer unzureichenden Versorgung des nachfolgenden Stromgebietes. Im Akutfall kann durch die Kollateralen keine ausreichende Perfusion gewährleistet werden. Der regionale Infarkt breitet sich anhand des Perfusionsgradienten von endokardial nach epikardial aus.(11) Eine frühzeitige Reperfusion kann die wellenfrontartige Ausbreitung der Nekrose unterbrechen und auf die subendokardiale Region beschränken. Es wird daher ein regionaler subendokardialer Infarkt von einem transmuralen regionalen Infarkt unterschieden.(8) Das Ausmaß der regionalen Myokardischämie ist abhängig von der Größe des Versorgungsgebietes der okkludierten Arterie, dem Schweregrad der Lumenverlegung, der kollateralen Zirkulation und der Dauer der Ischämie.(11) Ein weiteres topografisches Verteilungsmuster stellt der zirkuläre Myokardinfarkt dar. Eine zirkumferierende Ischämie ist in der Regel auf die subendokardiale Region beschränkt und entsteht infolge eines allgemeinen Abfalls des koronaren Perfusionsdrucks häufig im Zuge einer schweren Mehrgefäß-KHK.(8) Des

Weiteren kann sich ein Herzinfarkt als diffuse multifokale Nekrosen im gesamten Myokard verstreut manifestieren. Thrombotische Mikroembolien können zu diesen kleinen, herdförmigen, disseminierten Infarkten führen.(24) Diese Art des Verteilungsmusters eines Myokardinfarktes wurde auch bei Patient*innen nach Wiederbelebung oder bei Patient*innen, die im Rahmen eines septischen Schocks verstarben, beschrieben.(8)

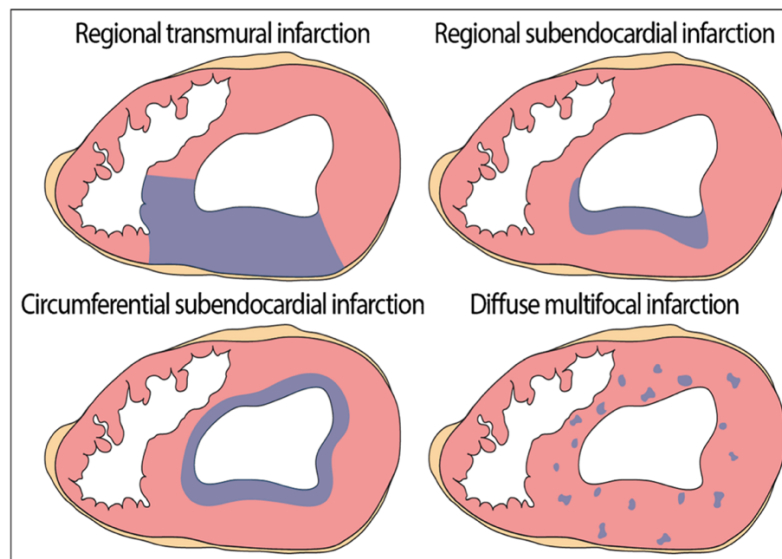


Abbildung 7: Topografie verschiedener Myokardinfarkte (nach Michaud et al. (8))

Bei der Untersuchung der Herzkranzgefäße wird auf Thromben, das Ausmaß der Atherosklerose und auf subintimale Blutungen geachtet. Bei Blutgerinnseln muss zwischen Thrombus und Leichengerinnsel (Cruor) differenziert werden.(19) Sie unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung und ihrem Erscheinungsbild. Ein Thrombus wird als matt, trocken, geriffelt, gekörnt, brüchig, graurot bis blauschwarz und an die vulnerable Plaque anhaftend bzw. abhängig vom Alter des Embolus als organisiert beschrieben. Ein Leichengerinnsel dagegen ist nicht an der Gefäßwand befestigt und erscheint glänzend, elastisch, speckig-grauweißlich oder schwarzrot.(11, 19) Ein wandständiger oder ein komplett obstruierender Thrombus ist ein zuverlässiger Marker für ein Myokardinfarkt auch ohne mikroskopisch sichtbare Nekrose. Koronarspasmen dagegen können bei einer Obduktion nicht nachgewiesen werden.(8) Außerdem werden die Herzhoren auf wandständige Blutgerinnsel untersucht.(19)

Bei vorhandenen Stents oder Bypassgefäßen sind diese auf Durchgängigkeit zu prüfen.(19) Bei Patient*innen, die zuvor mittels PCI behandelt wurden, können im nachfolgenden Stromgebiet mikrovaskuläre Thrombembolisationen nachweisbar sein.(8)

Der alleinige Nachweis einer atherosklerotischen Koronarstenose reicht jedoch für die Bestimmung der Todesursache nicht aus.(25)

3.6 Histologie (Gewebeveränderungen im zeitlichen Verlauf):

Ein sicherer postmortaler Nachweis eines humanen Myokardinfarktes ist häufig erst möglich, wenn dieser mehrere Stunden überlebt wurde. In Tiermodellstudien dagegen werden mittels Elektronenmikroskopie erste Veränderungen, die mit Zelltod durch Apoptose in Zusammenhang gebracht werden, bereits 10 Minuten nach Ischämiebeginn beschrieben.(10) Schwellung der Mitochondrien mit Fragmentierung der Cristae und Dilatation des sarkoplasmatischen Retikulums sind Hinweise auf eine noch potenziell reversible Läsion.(2, 24) Vermindertes zelluläres Glykogen, relaxierte Myofibrillen und Sarkolemm-Störungen zählen zu den ersten ultrastrukturellen Veränderungen, die 10-15 Minuten nach Koronarverschluss beobachtet werden können.(10) Diese frühen elektronenmikroskopischen Veränderungen sind allerdings in der Praxis nicht darstellbar, aufgrund von Überlagerungen durch Autolyse und die Entnahme einer aussagekräftigen Probe ohne makroskopische Hinweise auf die Lokalisation eines Myokardinfarktes stellt ebenso eine Herausforderung dar.(2)

Ein zeitlicher Überblick über die mikroskopischen Veränderungen eines Myokardinfarktes ergibt sich aus Tabelle 2.

Tabelle 2: Mikroskopische Veränderungen eines Myokardinfarktes (2, 8, 9, 12)

Zeit	Lichtmikroskopie	Elektronenmikroskopie
<6 Stunden	Unspezifisch, evtl. reversibel: Hypereosinophilie, Kontraktionsbandnekrosen,	Schwellung der Mitochondrien mit amorpher Matrix, Veränderungen an

	gewellte Muskelfasern („wavy fibers“)	Zellorganellen, Ruptur der Zellmembran mit Freisetzung sarkoplasmatischer Proteine
6-24 Stunden	Spezifisch: Karyolyse, Pyknose; Koagulationsnekrose mit interstitiellem Ödem und beginnende Infiltration neutrophiler Granulozyten	
1-3 Tage	Stark ausgeprägtes Infiltrat neutrophiler Granulozyten; Kernfragmentierung und Karyorrhesis	
3-7 Tage	Beginnende Einwanderung von Makrophagen, Lymphozyten, Plasmazellen, Fibroblasten	
1-2 Wochen	Kollagenfaserbildung, Granulationsgewebe	
6 Wochen	Fibrose	

Frühe lichtmikroskopische Zeichen, die auf einen weniger als 6 Stunden alten Infarkt hindeuten, sind Hypereosinophilie und Kontraktionsbandnekrosen. Diese Merkmale gelten jedoch als nicht-spezifisch und möglicherweise reversibel.(9) Die Hypereosinophilie der nekrotischen Zellen entsteht durch Verlust der RNA und die vermehrte Bindung von Eosin an die denaturierten sarkoplasmatischen Proteine(12), als Zeichen einer beginnenden Koagulationsnekrose.(8) Kontraktionsbandnekrosen sind das Erscheinungsbild hyperkontrahierter Sarkomere. In den zugrunde gehenden Myozyten werden vermehrt Calcium-Ionen in das Sarkoplasma freigesetzt. Dies führt zu einer intensiven Hyperkontraktion der Muskelfasern.(11) Kontraktionsbandnekrosen sind ein häufig beobachtetes Phänomen, die jedoch auch in anderen Situationen, wie z.B. bei Stromschlag, Defibrillation, Kokain- und Amphetaminabusus oder massiver Adrenalinausschüttung vorkommen.(25) Nach Kammerflimmern wurden ebenfalls Kontraktionsbandnekrosen beschrieben, die diffus in der gesamten Herzwand nachweisbar waren. Fokale Kontraktionsbandnekrosen hingegen deuten eher auf

einen frühen Infarkt hin.(24) Ein regionales Wellenmuster der Muskelfasern, auch bekannt als „wavy fibers“, entsteht durch die Dehnung nicht-kontraktiler Myozyten.(8) Die Dehnung der Myokardfasern erfolgt durch die rhythmische Kontraktion der nicht ischämisch betroffenen Kardiomyozyten.(26)

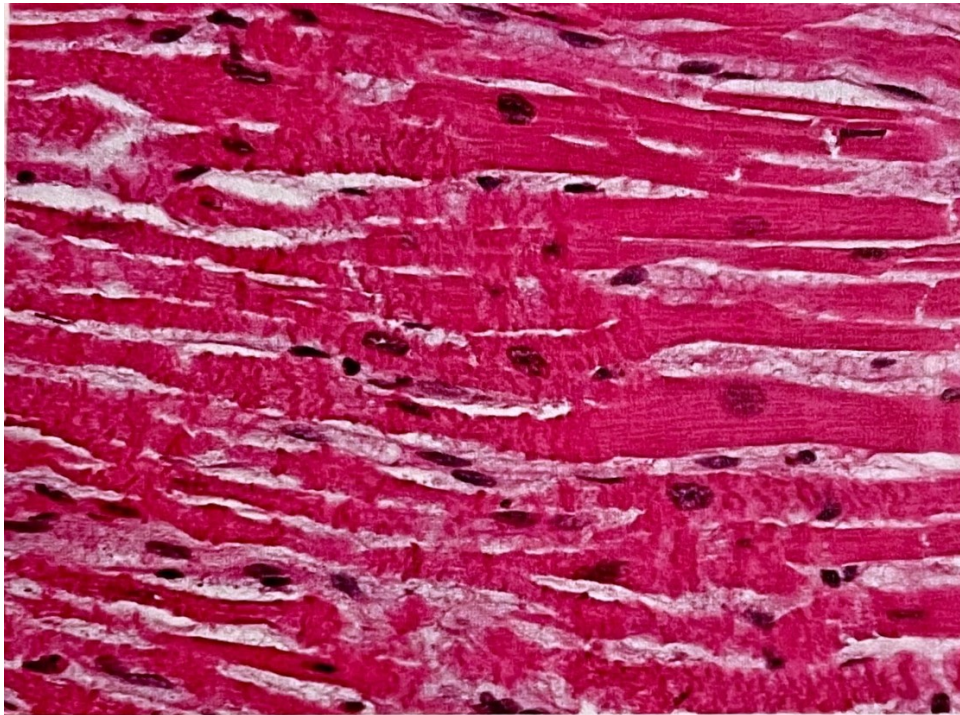


Abbildung 8: Kontraktionsbandnekrose, H.E.: Hypereosinophile Kardiomyozyten (Michaud K. Ischemic Heart Disease. In: Suvarna SK, editor. Cardiac Pathology: A Guide to Current Practice, Seite125 (11))

Der Myokardinfarkt kann lichtmikroskopisch anhand der zellulären Veränderungen in 4 Phasen eingeteilt werden: Zelltod (in den ersten Stunden), Inflammation (in der ersten Woche), Granulationsgewebe (nach der ersten Woche) und fibrotisches Narbengewebe (nach mehreren Wochen).(8)

In Tiermodellstudien wurde nachgewiesen, dass es nach 15 bis maximal 30 Minuten andauerndem Sauerstoffmangel zu irreversiblen Schädigungen der Herzmuskelzellen kommt.(25)

Erste sichere, histologisch nachweisbare Indikatoren einer irreversiblen Schädigung sind die Karyolyse und Pyknose der Myozyten-Zellkerne, welche 6 Stunden nach Ischämiebeginn sichtbar werden.(9) Als Pyknose wird die

Kondensation von Chromatin bezeichnet. Im Rahmen der Karyorhexis erfolgt die Fragmentierung des Zellkerns.(27) Die ischämischen Muskelfasern weisen zunächst einen unregelmäßigen Verlust ihrer Querstreifung auf. Weiterhin kommt es innerhalb der ersten 8 Stunden nach Infarktbeginn zu einem interstitiellen Ödem.(11) Durch Aktivierung von Entzündungsmediatoren ist ein 6-24 Stunden alter Infarkt durch eine beginnende Infiltration von Entzündungszellen gekennzeichnet. Zunächst sind es hauptsächlich neutrophile Granulozyten, die aus dem hyperämischen Randbereich in das Zentrum der Nekrose einwandern.(2)

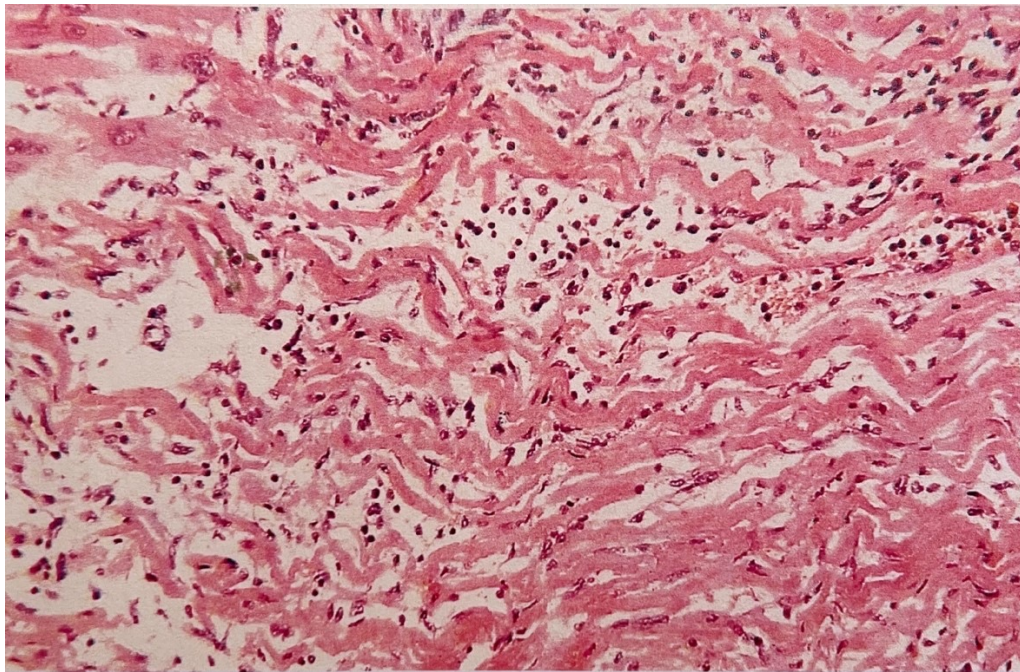


Abbildung 9: diffuses Infiltrat polymorphkerniger Zellen im interstitiellen Gewebe; gewellte Myozyten, H:E. (Sheppard M.N., Practical Cardiovascular Pathology, Seite 46 (24))

Ein Fortschreiten der Koagulationsnekrose wird durch den Zellkern- und Myozytenzerfall ersichtlich. Zu diesem Zeitpunkt (1 bis 3 Tage nach Ischämiebeginn) ist das Infiltrat neutrophiler Granulozyten voll ausgeprägt(8) und es ist noch keine fibroblastische Aktivität erkennbar.(24) Aufgrund der gestörten Membranfunktion kommt es zur Freisetzung von Lipofuszin(24) und weiterer zytoplasmatischer lysosomaler und mitochondrialer Enzyme.(2) Das Entzündungszellinfiltrat besteht in den darauf folgenden Tagen (Tag 3-7) aus einer zunehmenden Anzahl an Makrophagen, Lymphozyten und Plasmazellen.(11) Die

nekrotischen Zellfragmente werden durch die Makrophagen und neutrophilen Granulozyten phagozytiert.(11) Die am Ende der ersten Woche einwandernden Fibroblasten beginnen Kollagenfasern zu synthetisieren.(8)

Die Koagulationsnekrose wird durch fibrovaskuläres Granulationsgewebe ersetzt.(11) Das Granulationsgewebe ist gekennzeichnet durch ein marginales Einsprossen von Kapillaren in das Nekroseareal, dem Einwandern der Fibroblasten und der initialen Ablagerung locker angeordneter Kollagenfasern. Die fibrovaskuläre Reaktion ist nach etwa 2-3 Wochen am stärksten ausgeprägt.(8)

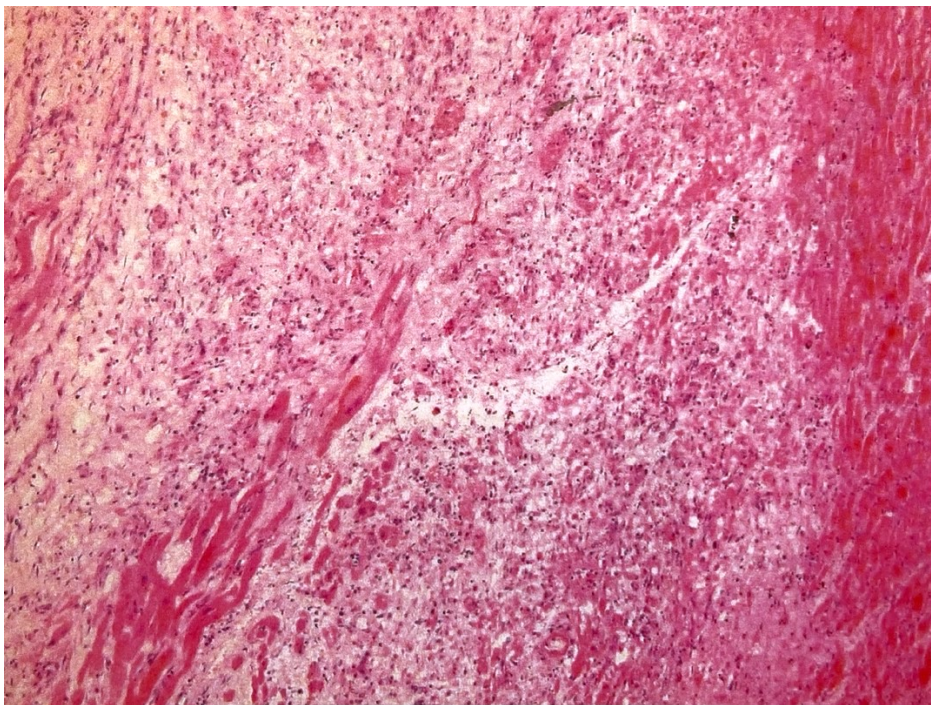


Abbildung 10: Neovaskularisiertes Granulationsgewebe, H.E.: einsprossende Gefäße und eingewanderte Bindegewebszellen in der Infarktregion (Sheppard M.N., Practical Cardiovascular Pathology, Seite 50 (24))

Das Granulationsgewebe wird allmählich durch straffes kollagenhaltiges, hypozelluläres Bindegewebe ersetzt.(8, 11) Die Narbenbildung ist nach 2-3 Monaten abgeschlossen.(8) Die Fibrosierung des Gewebes führt zu einer gestörten Ventrikelwandbewegung in der Infarktregion.(6) Es kommt zur vermehrten Belastung des umliegenden, funktionsfähigen Gewebes. Dessen Herzmuskelfasern kompensatorisch hypertrophieren.(2) Des Weiteren kommt es

zum Ausbau der kapillären Netzwerke und einer Zunahme an interstitiellem Kollagen im nicht infarzierten Myokard.(26)

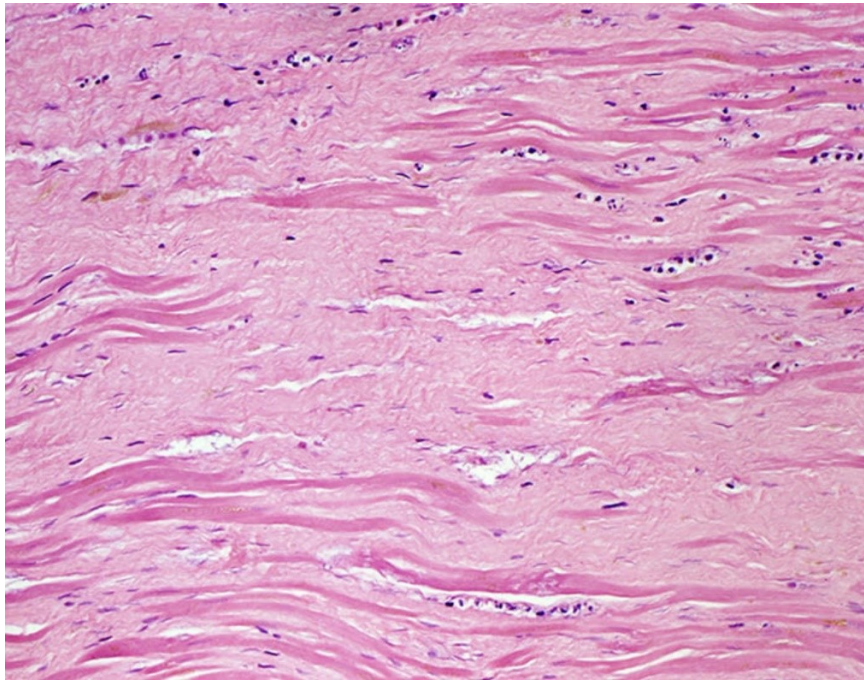


Abbildung 11: straffes, fibrotisches Narbengewebe, H.E.: Die Kardiomyozyten wurden durch kollagenfaseriges Bindegewebe ersetzt. (nach Michaud, K. et al. (8))

Anhand dieses zeitlichen Verlaufs der histologischen Gewebeveränderungen kann in etwa das Alter des Herzinfarktes abgeschätzt werden. Allerdings gibt es zahlreiche Faktoren, die Einfluss auf die zellulären Prozesse haben können. Dazu zählen unter anderem das Alter des Patienten/ der Patientin, die Größe des Infarktes, bestehende entzündliche Erkrankungen und Störungen des Immunsystems, vorhandene Kollateralkreisläufe, ischämische Präkonditionierung, vorausgegangene ischämische Ereignisse und Reperfusion der minderversorgten Region.(8)

Zusammenfassend ist ein sicherer Nachweis eines Herzinfarktes mit kurzer Überlebenszeit daher nach aktuellem Kenntnisstand nur makroskopisch durch einen wandständigen Thrombus(8) oder durch histologische Merkmale einer über 6 Stunden andauernden Ischämie möglich.(9)

4 Material und Methoden:

4.1 Übersichtstabelle:

In Tabelle 3 erfolgte der Versuch die immunhistochemischen Marker anhand ihres Vorkommens und ihrer Eigenschaften zu Gruppen zusammenzufassen.

In die Literaturrecherche wurden sowohl humane Autopsie-Studien als auch experimentelle Tiermodell-Studien der PubMed Datenbank aufgenommen, die die immunhistochemische Anfärbarkeit eines akuten Myokardinfarktes untersuchten.

Tabelle 3: Übersichtstabelle untersuchter IHC-Marker

	Eigenschaften	Marker
Gruppe 1	Depletion kardialer Antigene; Depletionsmarker	MB, cTnI, cTnT, cTnC, CK-MB, hFABP, S100A1, Cathepsin S
Gruppe 2	Veränderungen zytoskelettaler und sarkolemmaler Proteine	CD59, Dystrophin, Vinkulin, alpha-Aktinin, Desmin, SORBS2
Gruppe 3	Zelladhäsionsproteine, Zellverbindungen	Cx43, npCx43, ZO-1
Gruppe 4	Akkumulation von Plasmaelementen	C1-C9, C5b-9 (MAC), Fg, FN
Gruppe 5	Nukleäre Marker	Jun B, TUNEL
Gruppe 6	Mediatoren der frühen Inflammation	CD15, IL-1beta, IL-6, TNF-alpha, IL-15, IL-8, MCP-1, ICAM-1, Tryptase
Gruppe 7	Stress- oder Hypoxie-induzierte Faktoren	HIF-1alpha, GAL-1, HO-1, HSP, VEGF, Ki-67, Ubq
Gruppe 8	Zelltod-Marker	bcl2, BAX, Fas, CASP3

4.2 Beschreibung der Immunhistochemie-Marker:

Der Untergang der Zelle stellt ein irreversibles Endstadium der Zellschädigung dar. Es wird unterschieden zwischen akzidentellem und reguliertem Zelltod. Die unkontrollierte Form des Zelltods tritt aufgrund extremer Reize, wie plötzlich einsetzende Ischämie, ein. Die Nekrose geht mit Denaturierung von Proteinen und/ oder enzymatischer Auflösung von Zell- und Gewebestrukturen einher.(12) Eine akute kardiale Ischämie führt bereits nach 10-15 Minuten zu einer Schädigung der Zellmembran, des Zytoskelettes und der Zellorganellen.(10, 28) Im Rahmen des ischämischen Zelltods formieren sich subsarkolemmale Bläschen. Es erfolgt eine Reduktion der Glykokalyx und fokale Unterbrechungen in der Lipiddoppelschicht entstehen.(29) In weiterer Folge diffundieren die myokardialen Proteine aus den geschädigten Kardiomyozyten. Es kommt zum Verlust der Gewebeintegrität.(30) Im Zuge der Nekrose erfolgt die Aktivierung von Entzündungsmediatoren, die ein Infiltrat von Entzündungszellen in der Infarktregion zur Folge haben.(2)

Einige Autor*innen gehen davon aus, dass der regulierte Zelltod bei Myokardischämie ebenfalls von Bedeutung ist. Der regulierte Zelltod kann in 6 Formen unterteilt werden: Apoptose, Nekroptose, Mitochondrien-vermittelte Nekrose, Pyroptose, Ferroptose und Autophagie.(31) Der Ablauf des regulierten Zelluntergangs ist in einem genetischen Programm definiert und kann von der Zelle selbst eingeleitet werden, wenn deren Anpassungsversuche auf äußere Einflüsse erfolglos waren.(12) Apoptose und Autophagie zeichnen sich durch eine bestehende Zellmembranintegrität und dem Ausbleiben inflammatorischer Prozesse aus. Bei Pyroptose und Nekroptose werden zytoplasmatische Inhalte, inklusive Zytokinen, durch die geschädigte Zellmembran freigesetzt. Die Zytokine aktivieren inflammatorische Prozesse und dienen als Alarmsignal für benachbarte Zellen.(31)

Der Zelltod vieler Herzmuskelzellen ist lebensbedrohlich, da die Kardiomyozyten enddifferenziert sind und nur eine begrenzte Teilungsfähigkeit besitzen. Der Untergang der Zellen führt zur Beeinträchtigung der Kontraktilität der Herzmuskulatur und zur weiteren Funktionsstörung des Myokards.(31)

Es wurden einige Studien durchgeführt, die mit Hilfe von Immunhistochemie die Akkumulation und den Abfluss der Moleküle im betroffenen Gewebe nachweisen und daraus Schlüsse über das Ausmaß der ischämischen Schädigung bei einem akuten Myokardinfarkt ziehen.(32)

Gruppe 1 – Depletionsmarker:

Zytoplasmatische Proteine treten im Rahmen der akuten Ischämie durch das geschädigte Sarkolemm aus den Kardiomyozyten aus und werden über den zirkulierenden Blutkreislauf abtransportiert. Die Depletionsmarker weisen den Verlust der zellulären Antigene im Ischämiebereich nach. Demzufolge ist die Infarktregion immunhistochemisch mit diesen Markern nicht mehr oder weniger anfärbbar, weshalb sie auch als „Negativ-Marker“ bzw. Verlust-Marker bezeichnet werden.(33, 34)

Die Permeabilität des Sarkolemmes der irreversibel geschädigten Kardiomyozyten ist abhängig von dem Schweregrad der Ischämie. Der Zeitpunkt der Freisetzung der intrazellulären Proteine wird durch verschiedene Faktoren, wie dem Ausmaß der Hypoxie, der Lokalisation des intrazellulären Moleküls, sowie dessen physikalisch-chemischen Eigenschaften bestimmt. Kardiale Komponenten mit niedrigem Molekulargewicht diffundieren beispielsweise früher aus den geschädigten Herzmuskelzellen, als Proteine mit höherem Molekulargewicht.(33)

Zytoplasmatische Proteine, wie Myoglobin (MB) (16,7kDa) und Creatin Kinase (CK-MB), sind essenziell für die normale Funktion der kardialen Myozyten.(30)

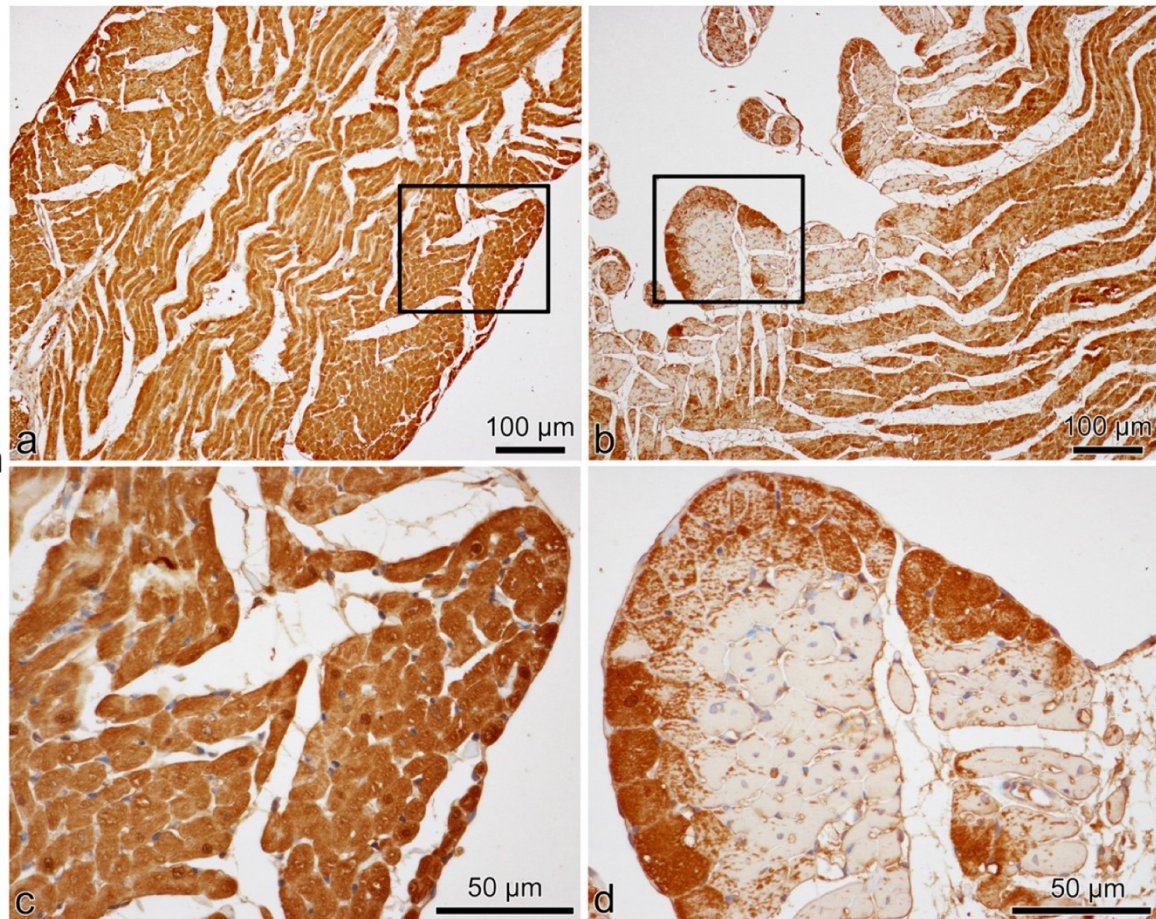


Abbildung 12: Myoglobin-Färbung: a, c: kontinuierliche Färbung des nicht-ischämischen Myokards des rechten Ventrikels bei Ratten; b, d: Myoglobin-Depletion überwiegend in Kardiomyozyten der subendokardialen Region nach 1h LAD-Verschluss (nach Sabatasso, S. et al. (28))

Troponin reguliert die Aktin-Myosin-Filamente bei der Muskelkontraktion und besteht aus drei Untereinheiten: cTnT (37 kDa), cTnC (18 kDa), und cTnI (24 kDa).(30, 32, 35)

Das kardiale Fettsäure-Bindungsprotein (hFABP) (14-15 kDa) hat eine hohe Gewebespezifität und ist überwiegend im Zytoplasma der Kardiomyozyten zu finden. Ihm wird eine Rolle bei der Aufnahme und Oxygenierung langkettiger Fettsäuren zugeschrieben.(34)

S100 Kalzium (Ca^{2+}) bindendes Protein A1 (S100A1) (10,5 kDa) wird hauptsächlich in Kardiomyozyten exprimiert. Aufgrund seines geringen Molekulargewichtes tritt das kardiale Protein bei Schädigung des Sarkolemm

rasch aus den Kardiomyozyten aus und reichert sich im Serum an. Es wird angenommen, dass S100A1 im Ca^{2+} -Kreislauf, bei der Energiehomöostase und bei der Kopplung von Erregung und Kontraktion der Herzmuskelzellen beteiligt ist.(33)

Cathepsin S wird ebenfalls in Kardiomyozyten exprimiert. Diese Cysteinprotease ist in Lysosomen lokalisiert.(32) Buğra et al beobachteten einen Verlust von Cathepsin S in der Infarktregion. Sie gehen davon aus, dass bei der Nekrose eine extrazelluläre Freisetzung des lysosomalen Proteins erfolgt.(32)

Gruppe 2 – Veränderungen zytoskelettaler und sarkolemmaler Proteine:

Alpha-Aktinin, Desmin und Vinkulin sind Komponenten des Zytoskeletts. Sie bilden ein intrazelluläres Netzwerk aus und sind an der mechanischen Kraftübertragung in der Zelle, auf benachbarte Zellen und die Extrazellulärmatrix beteiligt. Des Weiteren ist das Zytoskelett für die interne Organisation der Zellorganellen und der Stabilität der Zellmembran von großer Bedeutung. Alpha-Aktinin (95 kDa) ist hauptsächlich an Z-Scheiben und Glanzstreifen lokalisiert. Vinkulin (117 kDa) ist an Glanzstreifen, der Zellmembran, um Z-Scheiben und diffus im Zytoplasma zu finden. Desmin (56 kDa) ist ein Intermediärfilament und dessen Vorkommen wird hauptsächlich an Z-Scheiben und Glanzstreifen beschrieben. Es ist unklar was zur Verminderung der zytoskelettalen Proteine im Rahmen eines Myokardinfarktes führt. Es wird vermutet, dass sie nicht aus den geschädigten Kardiomyozyten freigesetzt werden, sondern ein intrazellulärer Abbau erfolgt. Der Kalzium-Ionen-Einstrom in die Zelle führt vermutlich zur Aktivierung von Proteasen (calcium-activated neutral protease (CANP)), die wiederum für die Abnahme von Vinkulin, Desmin und alpha-Aktinin verantwortlich sein könnten. Eine andere Vermutung ist, dass es aufgrund von Dephosphorylierung zur Abnahme der Zytoskelett-Proteine kommen könnte.(36)

Strukturproteine, die die Zellmembran der Kardiomyozyten stabilisieren und die intrazelluläre und extrazelluläre Umgebung verknüpfen, können wie folgt unterteilt werden: Dystrophin-bindender Proteinkomplex, Vinkulin-Integrin-Verbindung und Spektrin-basierendes Zytoskelett.(29)

Dystrophin (427kDa) ist ein zytoskelettales Protein. Es bildet mit Dystrophin-bindenden Proteinen einen Komplex, der an der kontraktile Kraftübertragung und der Stabilisation des Sarkolemms beteiligt ist. Dystrophin verknüpft den transmembranären Dystrophin-Komplex mit dem Lamininrezeptor des Aktin und Talin.(29)

Ein Verlust von Dystrophin führt zur Abnahme der Kontraktilität der Kardiomyozyten, zur Destabilisierung des Sarkolemms und macht die ischämischen Kardiomyozyten anfälliger für Folgeschäden. Schäden der Zellmembran führen zu einer erhöhten Permeabilität.(29)

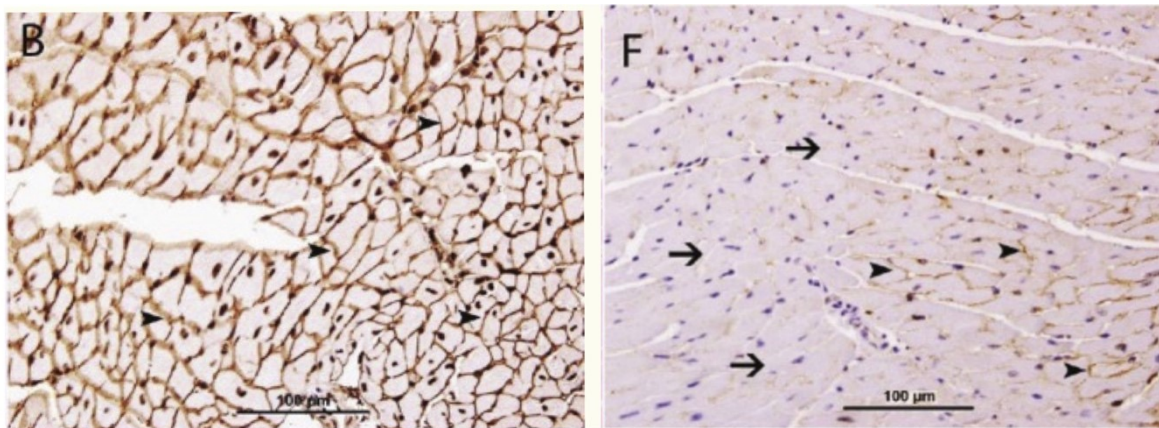


Abbildung 13: Dystrophin-Färbung: B: zirkulär durchgängige, deutliche Dystrophin-Färbung der Zellmembran der Kardiomyozyten in der Kontrollgruppe; F: fokale vollständige Abwesenheit von Dystrophin (Pfeile), in Umgebung inkomplette Dystrophin-Färbung des Sarkolemms der Kardiomyozyten (Pfeilspitzen) im Maus-Myokard nach 20-30 min Ischämie (nach Hashmi, S. et al. (29))

Ein weiterer Marker der Gruppe 2 ist SORBS2 (Sorbin und SH3-Domäne enthaltendes Protein 2). Es handelt sich um ein Adapterprotein, welchem eine Rolle bei der Organisation des Zytoskeletts, der Zelladhäsion und den Signalwegen zugeschrieben wird. Im Herz werden weitaus höhere Konzentrationen an SORBS2 exprimiert als in anderen Geweben. SORBS2 ist entlang der Z-Scheiben und an Glanzstreifen lokalisiert.(37)

CD59 (Protectin) ist an der Zelloberfläche der Kardiomyozyten lokalisiert und hemmt die zytolytische Aktivität des Komplementsystems, indem es an C8 und C9

bindet und somit die Formation des terminalen Komplement-Komplexes (C5b-9) verhindert. Daher wird der Verlust von CD59 vor der Ablagerung des Komplementkomplexes in der Infarktregion vermutet.(35)

Gruppe 3 – Zelladhäsionsproteine, Zellverbindungen:

Connexin 43 (Cx43) ist ein Hauptprotein der kardialen Gap Junctions und zählt somit zur Gruppe 3, den Zellverbindungen. Gap Junctions erlauben durch den interzellulären Austausch von Ionen und kleinen regulatorischen Molekülen eine schnelle elektrische Ausbreitung zwischen den Kardiomyozyten, was zur synchronisierten Herzkontraktionen führt.(30) Phosphoryliertes Cx43 ist physiologisch an Glanzstreifen der Kardiomyozyten im Ventrikelmyokard lokalisiert.(38) Im Zuge der Ischämie beginnen die hypoxischen Zellen sich aus dem Zellverband zu isolieren. Die Entkopplung erfolgt durch Dephosphorylierung von Connexin 43 (npCx43).(30) Neben der Akkumulation von npCx43 innerhalb der Gap Junctions, kommt es außerdem zur Umverteilung des Proteins.(28) npCx43 lagert sich an die laterale Zellmembran an und reichert sich vermehrt im Zytoplasma an. Die Umverteilung des Gap Junction Proteins ist möglicherweise ein Schlüsselpunkt in der Myokardischämie und trägt möglicherweise zur Entstehung der, zum plötzlichen Herztod führenden, terminalen Arrhythmie bei.(25)

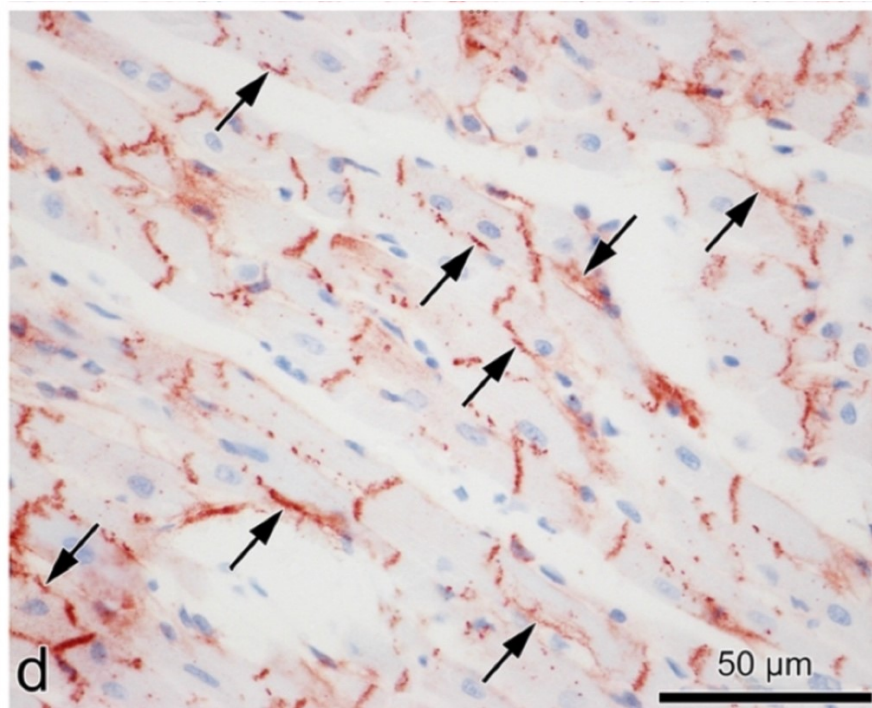


Abbildung 14: npCx43-Färbung: npCx43 nach 15 min Ischämie an Glanzstreifen, im Zytoplasma und am lateralen Zellrand (Pfeile) nachweisbar (nach Sabatasso, S. et al (28))

Zonula occludens 1 (ZO-1) scheint wichtig für die funktionelle Modifikation der Herzmuskelfasern zu sein.(25) Das Tight Junction Protein ist ebenfalls an Glanzstreifen lokalisiert und ist vermutlich bei der Verankerung von Cx43 an das Zytoskelett beteiligt. Möglicherweise reguliert ZO-1 die Größe und Stabilität der Gap Junctions.(38)

Gruppe 4 – Akkumulation von Plasmaelementen:

Während eines Myokardinfarktes tritt Plasma-Fibronektin (FN) aus geschädigten Blutgefäßen aus und akkumuliert in den ischämisch geschädigten Kardiomyozyten.(39) Eine weitere mögliche Erklärung für die Herkunft des in der Infarktregion anreichernden FNs ist die de-novo-Synthese in Bindegewebszellen und Endothelzellen der einsprossenden Kapillaren. Es gibt Hinweise, dass FN thrombotische, inflammatorische, angiogene und fibrotische Prozesse im Rahmen der Infarktheilung beeinflussen könnte.(40)

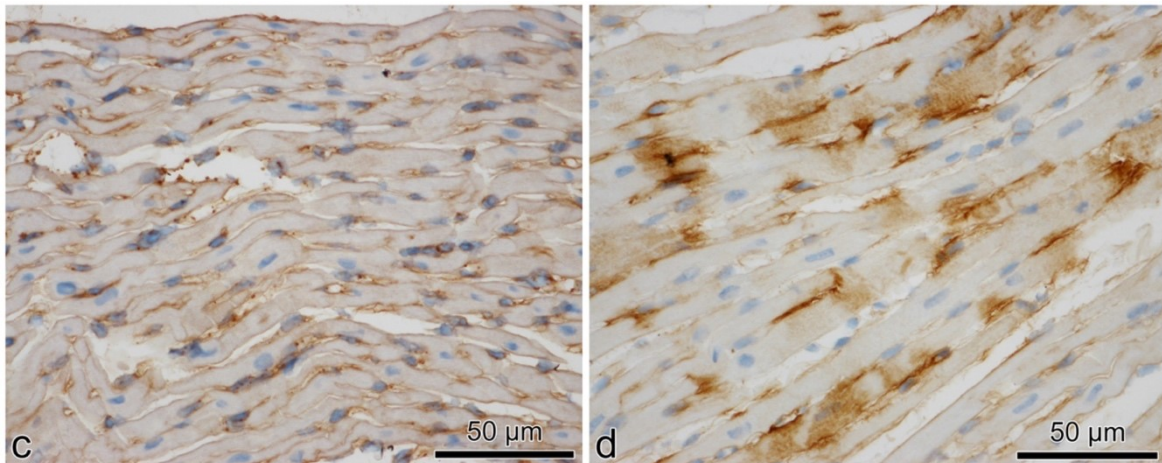


Abbildung 15: Fibronektin-Färbung: c: keine intrazelluläre FN-Färbung der Kardiomyozyten außerhalb der Infarktregion (rechter Ventrikel); d: FN-Akkumulation in ischämischen Kardiomyozyten 1 h nach LAD-Verschluss (nach Sabatasso, S. et al. (28))

Fibrinogen (Fg) reichert sich ebenfalls in geschädigten Kardiomyozyten während der Myokardischämie an.(41)

Die Komplementproteine C1-C9 sind Plasmaproteine des Komplementsystems, die unter anderem am klassischen Aktivierungsweg der Komplementkaskade beteiligt sind. C1-C9 liegen zunächst inaktiv im Plasma vor. Dessen Aktivierung erfolgt durch proteolytische Spaltung. Durch Anlagerung von Komplementkomponenten an der Zellmembran entsteht schließlich der terminale Membranangriffskomplex, zusammengesetzt aus C5b, C6, C7, C8 und C9 (C5b-9).(42) Das Komplementsystem spielt eine wesentliche Rolle bei der Pathogenese der Entzündungsreaktion, als Antwort auf die ischämisch-bedingte Gewebeschädigung. Bei der Komplementkaskade entstehen die Anaphylatoxine C3a, C4a und C5a, die gleichzeitig als Chemokine fungieren. Sie dienen als Botenstoffe um neutrophile Granulozyten in das Infarktgebiet zu rekrutieren, indem sie die Kontraktion, die Durchlässigkeit und die Exozytose des vaskulären Endothels, sowie die Sekretion von P-Selektin in den Endothelzellen fördern. P-Selektin begünstigt die Adhäsion der neutrophilen Granulozyten.(9) C4 ist eine zentrale Komponente in der klassischen Komplementkaskade. Der aktivierte Komplementfaktor C1 legt durch Spaltung eine Thiolestergruppe am C4b Fragment frei, welche eine irreversible kovalente Bindung an den geschädigten

Kardiomyozyten ausbildet. Der membrangebundene C4b geht einen Komplex mit C2a ein (C4bC2a), welcher C3 spaltet. Die freigelegte Thiolestergruppe an C3b bildet ebenfalls eine kovalente Bindung mit der Zielzelle aus. Der Oponierungsprozess wird durch dessen Komplexbildung (C2aC4bC3b) vervollständigt. Der Komplementkomplex C2aC4bC3b spaltet C5, was den grundlegenden Schritt zur Bildung des terminalen Membranangriffskomplexes (MAC/ C5b-9) ausmacht. C4b und C3b werden zu C4d und C3d abgebaut und können somit als Marker, hinweisend auf die Aktivierung des Komplementkaskade, dienen. Das Vorhandensein von C5b-9 bestätigt die vollständige Aktivierung der Komplementkaskade.(43) Es polymerisieren bis zu 12-15 C9 Moleküle an ein C5b-8 Komplex, wodurch die Insertion an die Zielzelle verstärkt wird und Transmembranporen von ca. 11 nm entstehen. Die Zellen verlieren ihre osmotische Barriere zwischen Zytoplasma und Extrazellularraum. Es folgt ein passiver Einstrom von Wasser und Kalzium-Ionen in die Zelle. Dies führt letztendlich zur Zellyse. Der immunhistochemische Nachweis von C5b-9 bestätigt somit die irreversible Schädigung der Kardiomyozyten.(9) Die Zelle ist sowohl zytolytischen als auch phagozytischen Prozessen ausgesetzt.(43)

Gruppe 5 – nukleäre Marker:

Die TUNEL-Methode (terminale Desoxynukleotidyltransferase vermittelte Desoxyuridinetriphosphat Bruchenden Markierung) stellt eine nukleäre Färbung zum Nachweis des Zelltods dar. Mithilfe der Aktivität des terminalen Desoxynukleotidtransferase Enzyms können die 3' Enden der DNA-Strangbrüche in den Nuklei angefärbt werden. Die vorhandenen DNA-Fragmente der zugrunde gehenden Zellen werden mit der TUNEL-Methode dargestellt.(31)

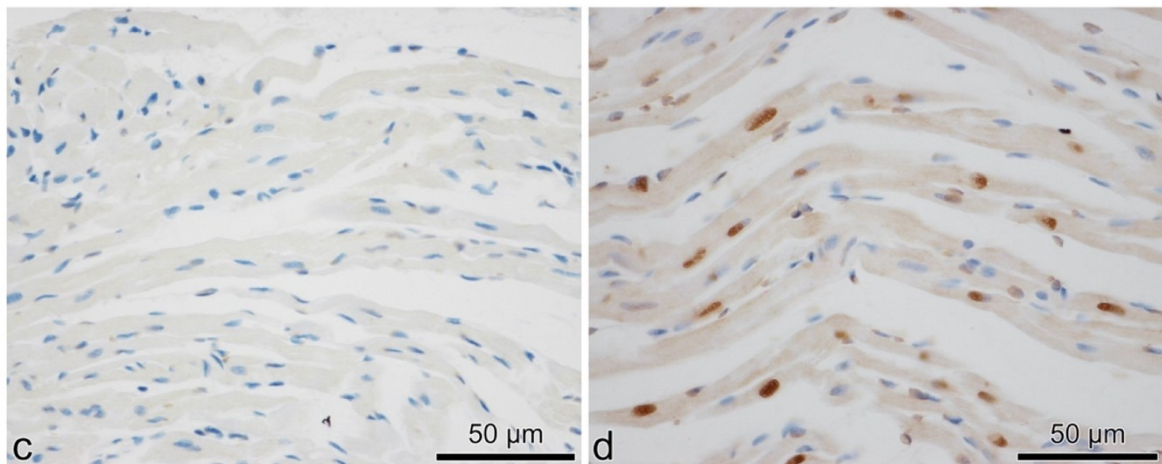


Abbildung 16: TUNEL-Methode: c: keine IHC-Färbung der Kardiomyozyten außerhalb der Infarktregion (rechter Ventrikel); d: Färbung der Nuklei, sowie leicht positives Zytoplasma ischämischer Kardiomyozyten nach 1 h LAD-Okklusion (nach Sabatasso, S. et al. (28))

JunB ist ein Transkriptionsfaktor, der der Aktivator-Protein 1 (AP-1) -Familie angehört. AP-1 Transkriptionsfaktoren sind sowohl bei der Förderung als auch bei der Hemmung von Apoptose beteiligt. JunB wird unter anderem bei Differenzierung, Proliferation und Apoptose induziert. Es ist jedoch nicht bekannt, ob JunB eine pro- oder antiapoptotische Funktion im Rahmen der Myokardischämie besitzt.(28)

Gruppe 6 – Mediatoren der frühen Inflammation:

Die geschädigten Kardiomyozyten setzen Alarmsignale, sog. „damage-associated molecular patterns“ (DAMPs), frei. Es folgt die Initiierung der inflammatorischen Kaskade. Interleukin-6 (IL-6), IL-1beta, IL-1alpha, Interleukin-1 Rezeptor aktivierte Kinase 1 (IRAK1) und Monozyten-chemotaktisches Protein 1 (MCP-1) sind Beispiele für Entzündungsmarker, deren Expression unmittelbar nach Gewebeschädigung ansteigt.(30)

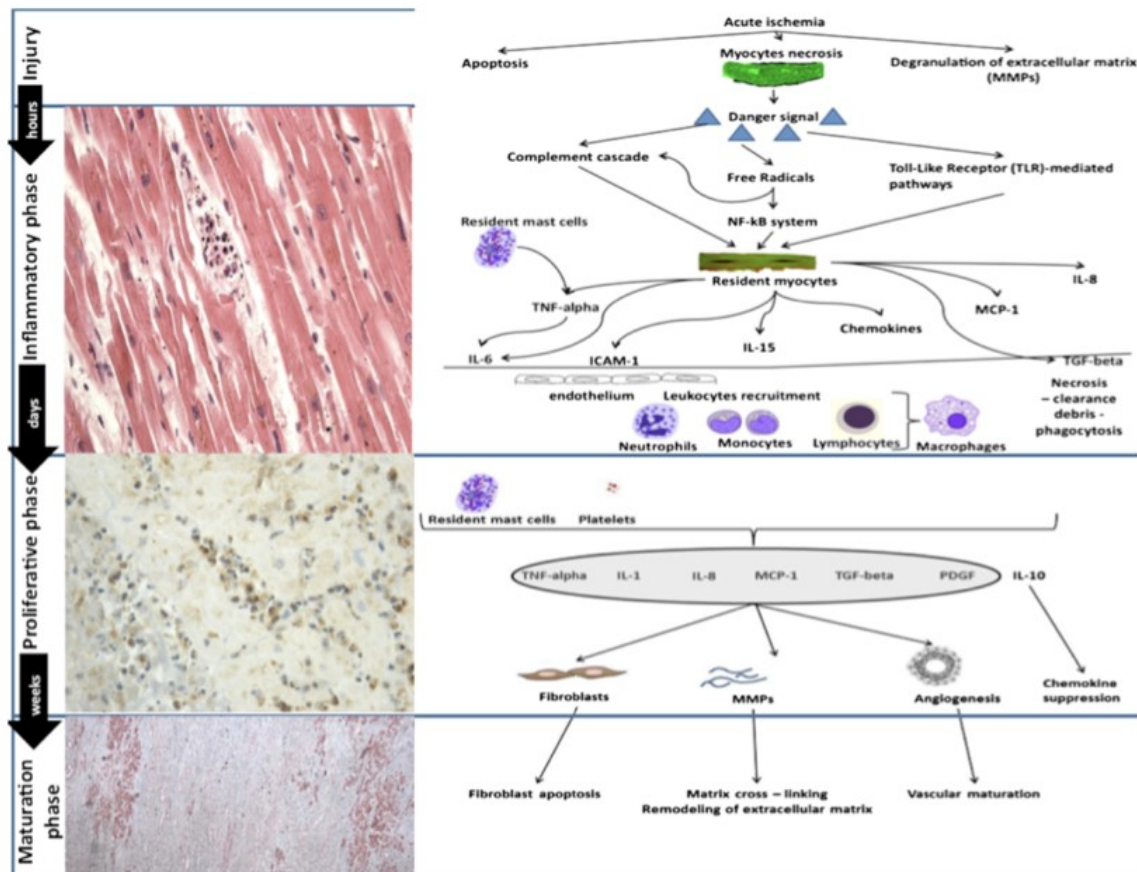


Abbildung 17: Darstellung des zeitlichen Verlaufs der zellpathophysiologischen Prozesse während eines Herzinfarktes und der Beteiligung von Mediatoren, Entzündungszellen und Reparaturmechanismen (nach Turillazzi, E. et al(44))

Bevor die Infiltration von Entzündungszellen im Infarkt histologisch nachweisbar ist, können immunhistochemisch zelluläre und humorale Mediatoren nachgewiesen werden. Unter humorale Faktoren der Immunantwort fallen Zytokine, induzierbare Chemokine, Komplementfaktoren und toll-like-Rezeptoren (TLR). Der rasche Anstieg der Zytokin-Expression in der Infarktregion wird vermutlich durch verschiedene Mechanismen reguliert, u.a. durch Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), Komplementaktivierung und NF-kappaB Aktivierung.(44)

MCP-1 wird von einigen Entzündungszellen und Stromazellen, wie Endothelzellen gebildet. Die MCP-1 Expression wird durch proinflammatorische Stimuli oder nach Gewebeverletzung rasch hochreguliert und bewirkt die Rekrutierung mononukleärer Zellen in die Infarktregion.(44)

Neutrophile Granulozyten lassen sich ebenfalls immunhistochemisch anfärben durch den Nachweis von Antigenen an ihrer Zelloberfläche, wie CD15.(44)

IL-15 wird u.a. von neutrophilen Granulozyten exprimiert.(44)

Gruppe 7 – Stress-/ Hypoxie-induzierte Faktoren:

Zur Gruppe 7 zählen adaptive Moleküle, die versuchen die ischämische Schädigung einzudämmen. Unmittelbar nach Beginn der Unterversorgung der Kardiomyozyten reagiert das Gewebe mit einer vermehrten Expression an u.a. Hypoxie-induziertem Faktor 1-alpha (HIF-1alpha), Endothelwachstumsfaktor (VEGF) und Hitzeschockproteinen (HSP).(30)

HIF-1alpha ist der wichtigste Transkriptionsfaktor, der an der zellulären Anpassungsreaktion bei Hypoxie beteiligt ist.(45) HIF-1alpha unterliegt unter normalen Bedingungen einem kontinuierlichen intrazellulären Abbau durch Proteasomen. Bei Hypoxie entkommt HIF-1alpha dem Abbau und gelangt in den Zellkern der hypoxischen Zelle. Als Reaktion auf die Myokardischämie induziert HIF-1alpha u.a. die Transkription von Erythropoietin, (Epo), VEGF, Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) und Hämoxxygenase-1 (HO-1).(46) VEGF besitzt eine wichtige Funktion bei der Angiogenese der Kapillaren, die in das ischämische Myokard einsprossen.(39) Des Weiteren steigt die nukleäre Expression von Ki-67 in den Endothelzellen an, welches durch seine proliferative Aktivität ebenfalls zur gesteigerten Vaskularität der ischämischen Region beiträgt.(46)

Galectin 1 (GAL-1) ist ein Protein, welches von vaskulären, interstitiellen, Epithel- und Immunzellen gebildet wird. Es ist sowohl in der Zelle als auch außerhalb der Zelle lokalisiert. Ihm werden intrazelluläre Funktionen, wie Regulation des Zellzyklus, RNA-Spleißen und Transkription, und extrazellulär die Beteiligung an Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen, Immunantwort und Apoptose zugeschrieben. Studien beschreiben GAL-1 als Hypoxie-induziertes Protein. Außerdem wird vermutet, dass HIF-1alpha die Transkription von GAL-1 direkt reguliert und dessen Expression bei Hypoxie steigert.(46)

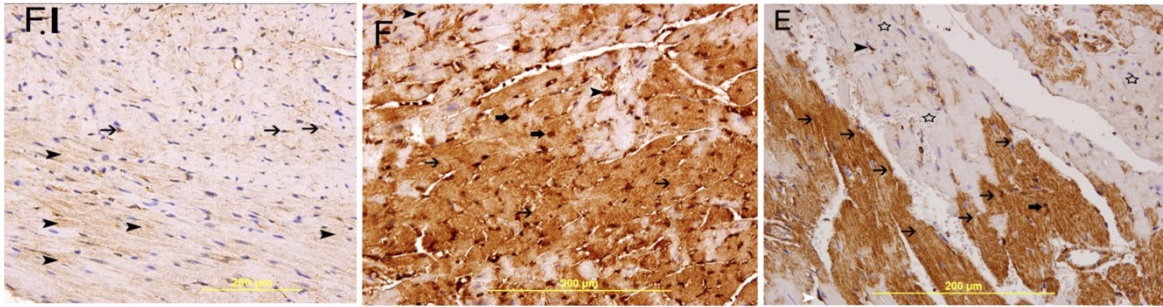


Abbildung 18: Galectin 1 Färbung: F.I: basale GAL-1 Expression im rechten Ventrikel nicht-ischämischer Mäuse: geringe Zytosma-Färbung der Kardiomyozyten (Pfeilkopf) und leichte GAL-1 Expression in Endothelzellen (dünne Pfeile); F: gesteigerte GAL-1 Expression in Nuklei (dicke Pfeile) und Zytosma (dünne Pfeile) der ischämischen Kardiomyozyten sowie in Nuklei der Endothelzellen (Pfeilkopf) in der Infarktregion nach 20 min LAD-Verschluss; E: deutliche Abnahme der GAL-1 Expression nach 4 h Ischämie. GAL-1 färbte kaum mehr Nuklei der Herzmuskelzellen (dicker Pfeil). Das Zytosma der Kardiomyozyten (dünne Pfeile) und Endothelzellen (Pfeilkopf) waren weiterhin positiv für GAL-1, umgeben von Arealen ohne/ mit geringer GAL-1 Expression (Sterne). (nach Al-Salam, S. et al. (46))

HSP umfassen viele Familien zytosmatischer Chaperone. Sie werden von geschädigten Zellen in den Extrazellularraum freigesetzt und können pro-inflammatorische Signalwege induzieren.(30) Ubiquitin (Ubq) zählt ebenso wie HSP70 zu den Hitzeschockproteinen. Unmittelbar nach Ischämiebeginn wird die Expression dieser zytosmatischen Proteine hochreguliert.(39) HSP70 beginnt sich in den lebensfähigen Kardiomyozyten im Randbereich des MI anzureichern, unterdrückt die Aktivierung von CASP3 und hemmt somit den Zelltod.(30)

Hämoxygenase 1 (HO-1) ist ein Stress-induziertes Protein, welches eine antioxidative, antiapoptotische und antiinflammatorische Wirkung besitzt. HO-1 baut Häm ab, wobei Bilirubin und Kohlenmonoxid (CO) als Reaktionsprodukte entstehen. Diese schützen vor ischämischen Veränderungen, indem sie der durch oxidativen Stress bedingten Vasokonstriktion entgegenwirken.(47)

Gruppe 8 – Zelltod-Marker:

Waren die zellulären Anpassungsreaktionen auf die ischämische Situation unzureichend, setzt der regulierte Zelltod ein. Die Apoptose ist eine Form des regulierten Zelltods und kann extrinsisch durch z.B. FAS-Ligand und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-alpha) oder intrinsisch aufgrund von oxidativem Stress und DNA-Schäden induziert werden. Ist das Verhältnis von Apoptose-hemmenden Faktoren, Bcl-2 Proteinen, und Apoptose-fördernden Faktoren, Bax-Proteinen, zugunsten der Tumorsuppressorgene (Bax) verschoben, erfolgt die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien. Cytochrom C aktiviert Caspase 9, welche wiederum aus der Vorstufe Procaspase 3 die Caspase 3 (CASP3) aktiviert.(12) Bei CASP3 handelt es sich um eine zentrale Effektorcaspase, die die Aktivierung von DNase zur Folge hat und zur DNA-Fragmentierung führt.(48)

Chromatinkondensierung, Abnahme des Zytoplasmas, Kernfragmentierung und sarkolemmale Invagination ohne Verlust der Membranintegrität, sowie die Phagozytose der apoptotischen Körperchen durch Makrophagen sind charakteristische morphologische Merkmale einer apoptotischen Zelle.(48)

Es wird vermutet, dass die Apoptose der Nekrose bei der Myokardischämie vorausgeht. In Studien wurde bestätigt, dass die kardiale Expression von FAS bei Ischämie steigt.(49) Apoptotische Körperchen konnten ebenfalls anhand ihrer gesteigerten CASP3 Aktivität in der Infarktregion identifiziert werden.(46)

5 Ergebnisse:

5.1 Zusammenfassung der Studienergebnisse:

Fishbein et al (2003) studierten die Depletion von **cTnT** und **cTnI** an 50 Gewebeproben (Hunde, Schweine, Ratten) im Zuge einer Tierversuchsstudie mit experimenteller Koronarokklusion zwischen 0,5-6 Stunden. Bereits nach 30 Minuten wurde vereinzelt eine Depletion von cTnT und cTnI beobachtet. Der Verlust der kardialen Troponine war zunächst ungleichmäßig und erschien in der Peripherie deutlicher als im Zentrum der Infarktregion. In der Regel erschien der Verlust von cTnT stärker und trat früher ein als die cTnI-Depletion.(50)

Meng et al (2006) beschrieben im Rahmen ihres Tierversuchs (Ratten) bereits 15 Minuten nach Beginn der Ischämie erste Verluste der **hFABP**-Färbung in einzelnen Herzmuskelzellen der Infarktregion. Mit zeitlich andauerndem Verschluss der LAD wurde eine zunehmende hFABP Depletion beobachtet. Meng et al berichten von ersten Anzeichen der Depletion (nach 15 min) in einigen disseminierten Zellen der subendokardialen Schicht und Papillarmuskeln. Im zeitlichen Verlauf breitet sich der Verlust von hFABP über das gesamte Ventrikelmyokard Richtung Epikard aus. Meng et al erkennen eine starke Ähnlichkeit im Depletionsmuster von hFABP mit dem von MB.(34)

Meng et al (2006) untersuchten außerdem Myokardproben von 22 humanen Autopsien. Sie verglichen 7 Fälle mit makroskopisch und mikroskopisch bestätigtem Myokardinfarkt (Positivkontrolle – totaler hFABP Verlust in der Infarktregion), 6 Fälle ohne kardiale Todesursache (Negativkontrolle – starke hFABP Färbung des Zytoplasmas der Kardiomyozyten in der gesamten Gewebeprobe) mit 9 Fällen, bei denen ein akuter Myokardinfarkt (AMI) vermutet wurde und innerhalb von 6 Stunden nach Beginn der Ischämiesymptome verstarben. Die Depletion von hFABP bei den untersuchten AMI Fällen erstreckte sich von umfangreichem Verlust (n=3, Überlebensdauer: 1-3 h), über fokale Verluste (n=4, Überlebensdauer: 0,5-2 h) bis hin zu schwachen Verlusten (n=2, Überlebensdauer: 0,5 h).(34)

Bi et al (2013) studierten die Freisetzung von **S100A1** aus den kardialen Myozyten sowohl im Rattenmyokard als auch in humanen Gewebeproben. Bei der

Tiermodellstudie erfolgte ein unterschiedlich lang andauernder Verschluss der LAD. Bereits nach 15-minütiger Ischämiedauer wurden erste S100A1 Depletionen aus Kardiomyozyten in subendokardialen Schichten und in Papillarmuskeln beschrieben. Mit anhaltender Okklusionsdauer konnten ausgedehntere Bereiche mit S100A1 Verlusten beobachtet werden, die sich nach 4-stündiger Ischämie über die gesamte Ventrikelwand im Bereich des Versorgungsgebietes der LAD erstreckten. Die S100A1 Depletionsareale korrelierten mit den Regionen der unsicheren Zeichen eines MIs (gewellte Kardiomyozyten mit eosinophilem Zytoplasma,..) in H.E. Färbung.(33)

Die 30 humanen Autopsiefälle, die Bi et al in die Studie miteinschlossen, wurden in 3 Gruppen unterteilt. In allen 10 Fällen mit bestätigtem MI war ein gut abgrenzbares Areal ohne S100A1 Anfärbung zu sehen. Bei den vermuteten AMI Fällen zeigten 4/10 Fälle mit einer Überlebenszeit von 1-3 Stunden ausgeprägte S100A1 Depletionsbereiche, während 4/10 AMI Fälle mit einer Überlebenszeit von bis zu einer Stunde vereinzelte, ungleichmäßig verteilte Regionen aufwiesen, die nicht mehr immunhistochemisch mit S100A1 anfärbbar waren. 2/10 AMI Fälle verstarben innerhalb von 30 Minuten nach Symptombeginn, in dessen Myokardproben wurde ein spärlicher Verlust von S100A1 in einzelnen Kardiomyozyten beobachtet. Die 10 Negativ-Kontrollen (akute traumatische, nicht kardial-bedingte Todesfälle) zeigten eine durchgängige S100A1 Färbung aller Kardiomyozyten.(33)

Hashmi et al (2013) untersuchten anhand eines Mausmodells den Verlust von **Dystrophin** in ischämischen Kardiomyozyten. Das Sarkolemm der Kardiomyozyten der Mäuse in der Kontrollgruppe und der schein-operierten Mäuse war durchgängig Dystrophin positiv. Nach 20-30 Minuten Ischämie waren histologisch noch keine Merkmale eines MI erkennbar, immunhistochemisch jedoch hob der Verlust von Dystrophin ein Infarktareal deutlich hervor. In der Umgebung zeigten die Kardiomyozyten ebenfalls eine partielle Dystrophin-Entfärbung ihrer Zellmembran. Die Region mit Dystrophinverlust war nach 30 Minuten LAD Verschluss größer als bei einem 20 Minuten alten MI. Die Gewebeschnitte der 1 und 4 Stunden alten Infarkte repräsentierten ein ähnliches Färbungsmuster, wie die der ersten beiden Versuchsgruppen. Stark eosinophile

Myozyten (nach 4 Stunden MI) zeigten einen kompletten membranösen Verlust an Dystrophin, während die kardialen Zellen in der Nähe eines interstitiellen Ödems noch partiell Dystrophin positiv waren. Nach 24 Stunden war histologisch im Versorgungsgebiet der LAD eine Koagulationsnekrose erkennbar, die sich immunhistochemisch negativ für Dystrophin präsentierte. In der Umgebung der Infarktregion wurden Kardiomyozyten beschrieben, die sich aus dem Zellverband gelöst hatten und eine runde Morphologie auswiesen. In deren Sarkolemm war ebenfalls kein Dystrophin nachweisbar. Je länger die Ischämie andauerte, desto größer war die Region der Dystrophin-negativen Kardiomyozyten. Das Ausmaß ging zum Teil weit über die histologisch vermutete Infarktgröße hinaus.(29)

Zhang et al (1996) schlossen 14 Patient*innen, die innerhalb von 6 Stunden nach Ischämiebeginn verstarben, und 13 Patient*innen mit nicht-koronar-arteriosklerotischer Todesursache in ihre Studie ein. In den Gewebeschnitten der Infarkte mit 1 Stunde Überlebenszeit und länger (8/14), war ein unregelmäßiger bis ausgeprägter Verlust der zytoskelettalen Proteine **Vinkulin**, **Desmin** und **alpha-Aktinin** zu beobachten. Die Desmin-Färbung nahm in den nekrotischen Kardiomyozyten nicht so stark ab, wie Vinkulin und alpha-Aktinin. Desmin färbte weiterhin Z-Scheiben und Glanzstreifen an. Bei den Koronar-Toten mit einer Überlebenszeit unter 1 Stunde (6/14) waren keine oder nur minimale immunhistochemische Veränderungen der zytoskelettalen Proteine nachweisbar. Die Immunhistochemie-Färbung von Vinkulin, Desmin und alpha-Aktinin in der Kontrollgruppe war nicht eindeutig. Allerdings waren bei 4 der 13 Patient*innen kardiale Veränderungen zu erwarten (Myokarditis, stumpfe Verletzungen mit Beteiligung des Herzens, Verblutung). Ausgeprägte MB Depletionen wurden bei allen 27 Fällen beschrieben. Aus den Studienergebnissen geht hervor, dass die Verwendung von Vinkulin, Desmin oder alpha-Aktinin als IHC-Marker zuverlässiger war als MB. Die Autor*innen bewerten alpha-Aktinin als am sensitivsten und spezifischsten.(36)

Kakimoto et al (2013) verglichen die IHC-Reaktion von **SORBS2** bei 5 Patient*innen, die innerhalb von 7 Stunden an einem AMI verstarben, mit 5 Proben einer Kontrollgruppe. Bei jedem AMI Fall wurden 3 Gewebeareale beurteilt: Ein Areal mit Kontraktionsbandnekrosen oder gewellten Fasern („wavy

fibers“), die Infarktumgebung mit histologisch geringen zellulären Veränderungen und eine Kontrollregion mit histologisch unauffälligem Myokard. Bei AMI konnte eine deutliche Abnahme von SORBS2 im Infarktgewebe bestätigt werden. Während SORBS2 in den Kontrollherzen entlang der Z Scheiben und an den Glanzstreifen nachweisbar war, wurden im Bereich der Kontraktionsbandnekrosen und gewellten Fasern zunehmend kollabierte Z-Scheiben beschrieben, die durch eine schwächere, verschwommene IHC-Färbung gekennzeichnet waren. Im angrenzenden Myokard wurde keine IHC Anfärbung der Z-Scheiben mehr beobachtet und einzelne Glanzstreifen schienen gerissen zu sein, hinweisend auf den Verlust der Zellverbindungen zwischen den Kardiomyozyten.(37)

Robert-Offerman et al (2000) untersuchten 57 humane Gewebeproben auf die immunhistochemische Anfärbbarkeit von **C9** bzw. MAC. 19 Gewebeproben wurden anhand ihrer unsicheren histologischen Merkmale als AMI Fälle klassifiziert, die innerhalb der ersten 6 Stunden nach Ischämiebeginn verstarben. 9/19 zeigten eine deutliche C9 Färbung eines zusammenhängenden Gewebeareals, bei 1/19 wurde eine mittelgradige Intensität beschrieben und bei 8/19 AMI Fällen waren einzelne Kardiomyozyten verstreut (kein zusammenhängender Zellverband) C9 positiv. Alle 13 Myokardinfarktregionen mit 6-24 Stunden Überlebenszeit waren positiv für C9 (4/13 mit geringer, 3/13 mit mittelgradiger, 6/13 mit hochgradiger Intensität). Alle 4 Gewebeproben mit 24-72 Stunden alten Infarkten zeigten eine maximale Färbungsintensität für C9. Die Gewebeproben alter MI (2 Wochen bis Jahre) waren ebenfalls positiv für C9, jedoch mit einer geringen Färbungsintensität. Hierbei ist jedoch unklar, ob die C9 Färbung auf eine persistierende Ischämie unterschiedlichen Ausmaßes oder auf eine rezidivierende ischämische Attacke zurückzuführen ist. Alle 9 Negativkontrollen und das Myokard außerhalb der Infarktregion waren C9 negativ. Das Endothel der intrakardialen Blutgefäße war durchgehend positiv für C9. Die Studienergebnisse bestätigen, dass die IHC-Färbung von C9 zur Unterscheidung von reversibel geschädigten und nekrotisch zugrunde gehenden Kardiomyozyten im Rahmen der Myokardischämie nützlich ist.(9)

Casscells et al (1990) studierten die Akkumulation von **Fibronektin (FN)** in der Infarktregion anhand eines Tierversuchs mit Ratten. 4 Stunden nach

Koronarverschluss wurde eine unregelmäßige FN Anreicherung im Zytoplasma einzelner Kardiomyozyten und im interstitiellen Raum zwischen den Zellen beschrieben. Nach 24 Stunden war eine kontinuierliche FN-Anreicherung in den nekrotischen Myozyten mit einer stärkeren Färbungsintensität zu sehen. Im Randbereich des Infarktes waren zu diesem Zeitpunkt die kapillären Endothelzellen und die Extrazellulärmatrix um die Myozyten und Endothelzellen immunhistochemisch für FN anfärbbar. Die IHC-Färbung für FN erreichte ihre maximale Intensität in und um die nekrotischen Kardiomyozyten im Zentrum der 48 Stunden alten Infarkte. Einwandernde Kapillaren und Fibroblasten im Randbereich waren FN positiv. In Makrophagen war FN ebenfalls nachweisbar. Die Gewebeproben der 3 und 7 Tage alten Myokardinfarkte zeigten ein ähnliches Färbungsmuster, jedoch mit abnehmender Intensität. In der Kontrollgruppe war FN im interstitiellen Raum und im Zytoplasma von Myozyten um kapilläre, arterielle und venöse Endothelzellen herum nachweisbar.(40)

Xiaohong et al (2002) untersuchten die **Myoglobin (MB)** Depletion und die **Fibrinogen (Fg)** Anreicherung in der Infarktregion bei Ratten. In der Versuchsgruppe mit 30-minütiger Ischämiedauer wurden bereits erste, unregelmäßige MB Verluste und eine gesteigerte Fg Färbung in einzelnen Kardiomyozyten subendokardial beschrieben. Mit andauernder LAD-Ligation erfolgte eine wellenfrontartige Ausbreitung der MB Depletion und Fg Färbung von subendokardial nach subepikardial. Nach 2-3 Stunden erstreckte sich der MB Verlust und die Fg-Anreicherung über die gesamte Ventrikelwand in der betroffenen minderversorgten Myokardregion. Im zeitlichen Verlauf wurde eine Intensitätszunahme der Fg Färbung beobachtet, jedoch wurde die Fg-Anreicherung in den geschädigten Zellen als ungleichmäßig beschrieben. Fg war in allen Gewebeproben intravaskulär nachweisbar. Endokard und Epikard waren ebenfalls positiv für Fg. Die mittels Fg identifizierte Infarktregion stimmte mit der MB Depletion überein und zeigte einen ähnlichen zeitlichen Verlauf.(41)

Kawamoto et al (2014) untersuchten **Cx43** und **ZO-1** als potentielle Marker bei akuter Myokardischämie und verglichen diese mit **C5b-9** und **FN**. Das Zytoplasma der ischämischen Kardiomyozyten zeigte eine durchgängige Färbung für ZO-1 und FN. Die Gewebeproben der Fälle mit MI (n=15) und mit AMI (n=8, ohne

morphologische Anzeichen einer Koagulationsnekrose) zeigten tendenziell eine stärkere Intensität der IHC-Färbung für ZO-1 und FN als die Negativkontrollgruppe (Asphyxie (n=24)). C5b-9 färbte spezifisch die Ischämiezone bei MI (10/15) und bei AMI (6/8). Die Kontrollgruppe war durchgehend negativ für C5b-9. npCx43 war bei den Kontrollfällen mit Asphyxie überwiegend an Glanzstreifen nachweisbar, während bei 14/15 Fällen mit MI und 5/8 AMI Fällen eine Umverteilung von npCx43 in das Zytoplasma und an den lateralen Zellrand beobachtet wurde. Eine Umverteilung wurde auch in 3/24 Fällen mit Asphyxie beobachtet.(38)

Ortmann et al (2000) untersuchten einige IHC-Marker bei 8 humanen AMI Fällen mit einer Überlebenszeit von 0,5-12 Stunden (, bzw. 1 Fall mit 216 Stunden). Nach bereits 30 Minuten Ischämiedauer war **C5b-9** bei AMI nachweisbar. Die Depletion der zellulären Antigene begann früher als die Ansammlung von Plasmaantigenen im Infarktgebiet. Die Ablagerung von **Fg** und **FN** erfolgte früher als die Anreicherung von C5b-9. In 8/8 Fällen mit AMI war ein ausgeprägter Verlust der Depletionsmarker (**hFABP**, **cTnC**, **cTnT**, **Desmin**, **MB**) sichtbar. Sie zeigten untereinander Übereinstimmungen in der Intensität der Färbung (bzw. des Farbverlustes) und der Größe des Infarktareals. In 6/8 Fällen mit AMI war ein Verlust von **CD59** nachweisbar, sowie die Ansammlung von C5b-9 in den ischämischen Zellgruppen. In den 2/8 AMI Fällen ohne Verlust von CD59 waren einzelne Zellen positiv für C5b-9. Die Fg und FN gefärbten Areale der AMI Fälle waren ebenfalls stark positiv und entsprachen dem detektierten Bereich der Depletionsmarker.(35)

Sabatasso et al veröffentlichten zunächst 2016 ihre Ergebnisse einer Tiermodellstudie. Sie untersuchten die IHC-Reaktion diverser Marker nach unterschiedlicher Ischämiedauer, induziert durch Ligation der LAD bei 27 Ratten. Sie identifizierten **npCx43** und **JunB** als frühe Marker für einen AMI, welche innerhalb der ersten 30 Minuten nachweisbar waren. Bereits 15 Minuten nach Beginn des Koronarverschlusses wurde eine npCx43 Expression in den Gap Junctions und seine Lateralisation, eine Anreicherung von npCx43 entlang der Längsachse der Kardiomyozyten, beobachtet. Mit andauernder Ischämie konnte eine zunehmende IHC-Färbung von npCx43 beobachtet werden. In nicht-ischämischem Myokard (rechtsventrikulär) waren nur vereinzelte, subendokardial-

gelegene Kardiomyozyten npCx43 positiv. JunB wurde nach 30-minütiger LAD-Okklusion zunächst nur in einzelnen Nuklei subendokardialer Kardiomyozyten detektiert. Mit anhaltender Ischämie wurde eine zunehmende Expression von npCx43 und JunB mit diffuser Ausbreitung Richtung Epikard beschrieben. JunB war außerhalb der Ischämiezone nicht anfärbbar. Die Anreicherung von **FN** in den ischämischen Kardiomyozyten begann 1 Stunde nach Ischämiebeginn. Das nicht-ischämische Myokard zeigte intrazellulär keine FN Akkumulation. Zeitgleich war auch ein Verlust von **cTnl**, **cTnT** und **MB** in fokal gruppierten Kardiomyozyten erkennbar. Eine Stunde nach LAD-Verschluss war **TUNEL** in den Nuklei der ischämischen Herzmuskelzellen positiv. Die Autor*innen beschrieben ebenfalls eine zytoplasmatische Färbung der Kardiomyozyten mittels TUNEL-Methode. Außerhalb der Infarktzone war kein TUNEL-Signal zu beobachten. **C5b-9** dagegen war erst nach 2 Stunden in vereinzelt Kardiomyozyten nachweisbar. Das nicht-ischämische Myokard war negativ für C5b-9.(28)

2018 präsentierten Sabatasso et al ihre Ergebnisse der Untersuchung humaner Autopsieproben. Sabatasso et al untersuchten die IHC-Färbung von **npCx43**, **JunB**, **TUNEL**, **MB** und **cTnT** bei 14 makroskopisch und/ oder histologisch bestätigten MI Fällen, bei 14 AMI Fällen und 15 Negativkontrollen (globale Hypoxie). Die AMI Fälle waren makroskopisch durch Koronarsklerose gekennzeichnet, wiesen histologisch frühe Merkmale einer Ischämie auf und waren alle durch eine positive IHC-Reaktion für **FN** und **C5b-9** gekennzeichnet. npCx43 und JunB waren in der Gruppe der Erhängten-Fälle signifikant stärker exprimiert als bei MI und AMI. Die Färbungsintensität von npCx43 und JunB war am stärksten im Myokard der Fälle mit globaler Hypoxie und am schwächsten bei AMI Fällen. Die untersuchten Gruppen zeigten jedoch unterschiedliche Verteilungsmuster der IHC-Färbung. Bei Fällen mit globaler Hypoxie war npCx43 und JunB diffus im Myokard anfärbbar, während bei MI und AMI Fällen die beiden Marker überwiegend subendokardial nachweisbar waren. TUNEL war bei AMI stärker exprimiert als bei MI Fällen. Für den Verlust von MB und cTnT wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen beobachtet. Im Gegensatz zu den Beobachtungen der Depletionsmarker im Rahmen der Tiermodellstudie, war die Beurteilung der MB und cTnT Färbung bei den Autopsiefällen schwieriger. Die

Kardiomyozyten wiesen oft eine ungleichmäßige Färbung und keine vollständige Depletion von MB und cTnT auf.(51)

Visonà et al (2018) studierten die IHC-Reaktion verschiedener Marker bei 17 AMI Fällen. Im Vergleich zur Kontrollgruppe (n=10) wurde ein signifikanter Anstieg von **FN** in der Extrazellulärmatrix bei AMI beschrieben. In keinem der insgesamt 27 Fälle war das Zytoplasma der Kardiomyozyten immunhistochemisch für FN anfärbbar. **Cx43** zeigte in den Gewebeproben der Kontrollgruppe geringgradig eine stärkere Intensität an den Glanzstreifen als bei AMI Fällen. Im Rahmen der Ischämie war eine leichte Zunahme von Cx43 im Zytoplasma der Kardiomyozyten nachweisbar. **npCx43** dagegen wies einen deutlichen Unterschied in Färbungsintensität und Verteilungsmuster zwischen den beiden untersuchten Gruppen auf. Bei AMI war eine deutliche Akkumulation von npCx43 im Zytoplasma der Kardiomyozyten in der Infarktregion zu sehen. **ZO-1** war nicht oder nur schwach an den Glanzstreifen nachweisbar, sowohl in der Kontrollgruppe als auch in AMI Fällen und zeigte somit keinen wesentlichen Unterschied in Färbungsintensität oder Verteilungsmuster zwischen den beiden untersuchten Gruppen.(25)

Buğra et al (2022) verglichen die Anfärbbarkeit von IHC-Markern bei 11 humanen AMI Proben, die innerhalb der ersten 8 Stunden verstarben, mit 9 Myokardinfarktpatient*innen mit einer Überlebenszeit von 8-24 Stunden. Das Alter des Infarktes wurde anhand der morphologischen Veränderungen (Infiltration neutrophiler Granulozyten) geschätzt. Alle 20 Gewebeproben wiesen eine ausgeprägte **MB** Depletion auf. **Desmin** zeigte in allen 20 Infarktregionen einen schwachen bis mittelgradigen Verlust. In 16/20 Fällen (80%) war eine ausgeprägte **Cathepsin S** Depletion zu sehen. Bei 2 AMI Fällen mit einer Überlebenszeit unter 8 Stunden war nur ein schwacher Cathepsin S Verlust erkennbar und in 2 weiteren Fällen wurde kein Verlust des IHC-Markers beschrieben. Bei dem Vergleich der **cTnT** Depletion der unterschiedlich alten Infarkte wurde ein signifikanter Unterschied in der Ausprägung beobachtet. Während das Myokard der sehr frühen Infarkte einen eher geringgradigen Verlust aufwies, war der cTnT Verlust bei den AMIs mit 8-24 Stunden Überlebenszeit bereits deutlicher. Der Nachweis von **FN** unterschied sich ebenfalls signifikant in den beiden

untersuchten Gruppen. Mit zunehmender Ischämiedauer nahm die Anfärbarkeit von FN in seiner Ausprägung zu. In 2 Fällen mit einer Überlebenszeit unter 8 Stunden und in einem Fall aus der Gruppe der älteren Infarkte konnte FN nicht nachgewiesen werden. In 16/20 Fällen wurde eine ausgeprägte **CD59** Färbung beschrieben. Buğra et al beobachteten einen Verlust von CD59 in der Infarktregion, jedoch berichteten sie von einer ausgeprägten Akkumulation von CD59 in der Zellmembran der intakten Kardiomyozyten um die Koagulationsnekrose herum. Das Ausmaß der CD59 Expression in der Infarkt-Nachbarschaft erschien ausgeprägter als in anderen intakten Herzmuskelzellen.(32)

Turillazzi et al. (2014) studierten die Reaktion des angeborenen Immunsystems und den darauffolgenden Entzündungsprozess im Myokard bei 26 Patient*innen mit frühem MI. In der MI Gruppe mit kurzer Überlebenszeit (0-6 Stunden) wurde histologisch kein Infiltrat polymorphkerniger Zellen beobachtet. Die IHC-Färbung für **CD15, Tryptase, IL-1beta, IL-6, TNF-alpha, IL-8, und ICAM-1** war leicht positiv, während **IL-15** und **MCP-1** eine starke Intensität zeigten. Patient*innen, die 6-8 Stunden nach Symptombeginn verstarben, präsentierten histologisch ein Nekroseareal mit neutrophiler Granulozyten- und Monozyten-Infiltration. Die IHC-Reaktion für CD15 war progredient mit zunehmender Ischämiedauer (bis >12 Stunden). Die ischämische Myokardregion der MI Gruppe mit 6-8 Stunden Überlebenszeit zeigte eine ausgeprägte IHC-Färbung für CD15, Tryptase, IL-1beta, IL-6, TNF-alpha und IL-8. IL15 und MCP-1, die in der frühen MI Gruppe stark exprimiert wurden, waren bei den Infarkten mit 6-8 Stunden Ischämiedauer nur leicht anfärbbar. Weiterhin wurde die **cTnI** und **cTnT** Depletion untersucht, die bei den frühen Infarkten schwach ausgeprägt war und mit anhaltender Ischämiedauer einen progredienten Verlauf zeigte. Die Studienergebnisse der Immunhistochemie konnten mittels Western Blot Analyse bestätigt werden. In der Kontrollgruppe, 25 Patient*innen, die Schusswaffenverletzungen erlitten, zeigten keine IHC-Reaktionen für pro-inflammatorische Marker und wiesen auch keine cTnI und cTnT Depletion auf.(44)

Al-Salam et al (2014) untersuchten die **HIF-1alpha** und **GAL-1** Expression bei Mäusen. Im Myokard der Kontrollmäuse war HIF-1alpha vorwiegend in Nuklei von

Endothelzellen zu finden. GAL-1 war in der Kontrollgruppe rechtsventrikulär sowohl in Kardiomyozyten als auch in Endothelzellen nachweisbar, während GAL-1 linksventrikulär überwiegend in Endothelzellen exprimiert wurde. Die GAL-1 Expression zeigte in der Gruppe mit 20 Minuten und 30 Minuten LAD-Verschluss (linksventrikulär) einen signifikanten Anstieg im Vergleich zu den scheinoperierten Mäusen. HIF-1alpha wies ebenfalls einen signifikanten Anstieg im Zytoplasma der Kardiomyozyten nach 20 Minuten Ischämiedauer auf. Die HIF-1alpha Färbung in der Gruppe mit 30 Minuten bestehender Ischämie erreichte keinen signifikanten Unterschied verglichen mit den scheinoperierten Mäusen. Die Gruppen mit 1 Stunde und 4 Stunden LAD-Verschluss wiesen ebenfalls eine gesteigerte Expression von GAL-1 und HIF-1alpha auf, jedoch war der Unterschied im Vergleich zu den scheinoperierten Mäusen nicht signifikant. Mit progredienter Ischämiedauer nahm die Intensität von HIF-1alpha und GAL-1 ab. Das Verhältnis von positiven Kardiomyozyten und Endothelzellen veränderte sich zunehmend zugunsten der Endothelzellen. 24 Stunden alte Infarkte waren im Zentrum der Infarktregion nicht mehr positiv für HIF-1alpha und GAL-1. Das Areal um die Nekrose herum war positiv für GAL-1 und die Endothelzellen der Gefäße um die Infarktregion herum HIF-1alpha positiv. Außerdem waren zu diesem Zeitpunkt die eingewanderten neutrophilen Granulozyten für HIF-1alpha und GAL-1 nukleär anfärbbar. Das Myokard der scheinoperierten Mäuse wies nach 24 Stunden einen höheren GAL-1 und HIF-1alpha Spiegel auf, als die Mäuse mit 24 Stunden altem Infarkt. Im Vergleich zu den nicht operierten Mäusen, war der Nachweis beider IHC-Marker in allen MI Gruppen deutlich ausgeprägter.(46)

Al-Salam et al. beobachteten, dass alle Kardiomyozyten und Endothelzellen, die eine nukleäre Expression von HIF-1alpha zeigten, GAL-1 im Nukleus und Zytoplasma exprimierten. Zellen, die HIF-1alpha negativ waren, exprimierten kein GAL-1. Die Autor*innen studierten außerdem die Aktivität von **Ki-67**, **CASP-3** und **Bcl-2** im ischämischen Maus-Myokard. Die Gewebeproben nach 20 und 30 Minuten, sowie nach 1 und 4 Stunden LAD-Okklusion zeigten eine geringe proliferative Aktivität von Ki-67 in den Endothelzellen. In den Nuklei der Endothelzellen um die Infarktregion herum konnte nach 24 Stunden Ischämie ein starker Anstieg von Ki-67 verzeichnet werden. Weiterhin beobachteten sie nach 24 Stunden LAD-Verschluss eine gesteigerte Aktivität der CASP3 in

Kardiomyozyten und Endothelzellen in der Infarktregion, verglichen mit CASP3 Expression der MI Gruppen mit kürzerer Infarktdauer. 30 Minuten nach Koronarverschluss wurde bereits eine gesteigerte Bcl-2 Expression vereinzelt in Kardiomyozyten, jedoch im Wesentlichen in Endothelzellen der Infarktregion beschrieben. Die frühe Bcl-2 Expression korreliert mit der raschen HIF-1alpha und GAL-1 Expression in der Infarktregion hin.(46)

Blanco Pampín et al (2006) verglichen die **HIF-1alpha** Expression bei 24 AMI Fällen, ohne sichere makroskopische oder histologische Anzeichen einer Myokardischämie, mit 15 nicht-kardialen Todesfällen (Negativkontrollgruppe) und 9 makroskopisch bestätigten MI Fällen. Die Negativkontrollgruppe (n=15) zeigte keine IHC-Färbung für HIF-1alpha. Während alle 9 Fälle mit makroskopisch bestätigtem MI eine ausgeprägte HIF-1alpha Färbung der Nuklei und des Zytoplasmas der ischämisch geschädigten Kardiomyozyten aufwiesen. Endothelzellen kleiner Gefäße waren ebenfalls positiv für HIF-1alpha. Im Randbereich des Infarktes wurde HIF-1alpha im Zytoplasma der Kardiomyozyten beschrieben. Diese Herzmuskelzellen wiesen jedoch keine nukleäre Färbung auf. Diese Beobachtung ist mit Vorsicht zu bewerten, da es sich bei HIF-1alpha um einen Transkriptionsfaktor handelt. Die 24 AMI Fälle können in weitere Untergruppen gegliedert werden. 7/9 AMI Fälle mit einer Überlebenszeit unter 2 Stunden zeigten eine nukleäre Färbung für HIF-1alpha, bei 1/9 Fällen waren Nuklei und Zytoplasma in der Infarktregion HIF-1alpha positiv und 1 AMI Fall war nicht anfärbbar. Der frühestmögliche Nachweis von HIF-1 alpha war in dieser Gruppe nach 30 Minuten bestehender Ischämie möglich. Bei AMI Fällen, die nach über 2 Stunden Ischämiedauer verstarben, war bei 1/7 HIF-1alpha nukleär nachweisbar, bei 4/7 Zytoplasma und Nukleus der Kardiomyozyten positiv und 2/7 zeigten keine IHC-Färbung für HIF-1alpha. Patient*innen, die ohne vorausgegangene ischämische Symptome an einem plötzlichen Herztod verstarben, machen die dritte Untergruppe der AMI Fälle aus. In 2/8 Fällen war HIF-1alpha im Zellkern der ischämischen Kardiomyozyten nachweisbar, in 4/8 Fällen waren Zytoplasma und Nuklei positiv und 2/8 Fälle exprimierten kein HIF-1alpha. Die Fälle mit AMI zeigten insgesamt eine eher schwach ausgeprägte zytoplasmatische HIF-1alpha Färbung.(45)

Kuninaka et al (2021) untersuchten die intrakardiale **HO-1** Expression bei akuter Myokardischämie und bei Verstorbenen mit nicht-kardialer Todesursache. Mittels H.E. Färbung wurden weder in den AMI-Fällen noch in der Kontrollgruppe spezifische Infarktzeichen beobachtet. In 78,2% (18/23) AMI Fällen konnte HO-1 in Nuklei der Kardiomyozyten nachgewiesen werden. 24,2% (8/33) der Kontrollfälle waren ebenfalls positiv für HO-1. Dennoch besteht ein statistischer Unterschied zwischen den beiden untersuchten Gruppen.(47)

Weiterhin untersuchten Kuninaka et al die Gewebeproben auf einen Verlust von **MB**. Die Depletion des kardialen Proteins unterschied sich bei den sehr frühen AMI Fällen nicht ausreichend von der Kontrollgruppe. Zusätzlich wiesen sie immunhistochemisch eine Leukozyteninfiltration nach. Die Anzahl der im Gewebe vorhandenen neutrophilen Granulozyten und Makrophagen ergab keinen Unterschied zwischen der AMI und der Nicht-AMI Gruppe.(47)

Ishikawa et al (2000) untersuchten die Expression und Lokalisation verschiedener IHC-Marker in 40 humanen Autopsieproben bei akuten und alten Myokardinfarkten. Das Alter der ischämischen Läsion wurde anhand der histologisch, morphologischen Veränderungen ermittelt. Aus den Studienergebnissen geht hervor, dass **FN** ausschließlich in geschädigten Kardiomyozyten in der Infarktregion akkumulierte. **cTnT**, **HSP70**, **Ubq** und **VEGF** dagegen waren beim fortgeschrittenen MI nicht im Nekroseareal, sondern in dessen Randbereich in den funktionsfähigen Kardiomyozyten deutlich anfärbbar. Während der frühen Phase eines AMI (, gekennzeichnet durch gewellte Myokardfasern bis hin zu vermehrter neutrophiler Granulozyten-Infiltration) waren die ischämischen Herzmuskelzellen, die noch einen Nukleus besaßen, leicht positiv für Ubq, VEGF, cTnT und HSP70. Die Makrophagen, die im fortgeschrittenen MI-Stadium die fragmentierten Myozyten phagozytierten, waren positiv für cTnT und HSP70. Die Fibroblasten und Endothelzellen der in die Infarktregion einsprossenden Kapillaren exprimierten Ubq und VEGF. Im normalen Myokard der 3 Autopsieproben mit nicht-kardialer Todesursache wurde kein Ubq und kein VEGF beobachtet. HSP70 wurde vereinzelt in Kardiomyozyten um intramyokardiale Arterien herum beschrieben.(39)

Feng et al (2003) untersuchten die zeitliche und räumliche Beziehung zwischen der **Fas** Expression und der Apoptose von Kardiomyozyten induziert durch Myokardischämie. Apoptose konnte mittels **TUNEL**-Methode in ischämischen Regionen des Rattenmyokards nach 3-36 Stunden LAD-Verschluss nachgewiesen werden. Die Autor*innen beobachteten apoptotische Kardiomyozyten im Zentrum des Infarktes, während eine gesteigerte Fas Expression in Kardiomyozyten im Randbereich der Infarktregion immunhistochemisch nachgewiesen wurde. Fas war im Gegensatz zur Apoptose auch noch nach 7 Tagen Koronarokklusion anfärbbar. In nicht-ischämischem Myokard wurde ebenfalls Fas Expression ohne Apoptose nachgewiesen.(49)

Misao et al (1996) verglichen die IHC-Reaktion von **Bcl-2** und **Bax** in Gewebeproben von 15 Patient*innen, die einen AMI 6 Stunden bis 20 Tage überlebten, mit 12 Autopsien alter MI (Überlebenszeit: >1 Monat) und 10 Negativ-Kontrollherzen. Bcl-2 war in 9/15 AMI Fällen in Kardiomyozyten im Randbereich um die Infarktregion herum anfärbbar. Die Myozyten in der Infarktregion selbst und das nicht vom Infarkt unmittelbar betroffene Myokard waren Bcl-2 negativ. Bcl-2 wurde in den Gewebeproben der alten MI und der Kontrollherzen ebenfalls nicht nachgewiesen. Bax dagegen war in Myozyten von Gewebeproben mit und ohne Infarkt anfärbbar. Eine positive immunhistochemische Reaktion für Bax wurde im Zytoplasma der Kardiomyozyten, die den Infarkt umgaben, bei 2/15 AMI Patienten (mit einer Überlebenszeit von über 14 Tagen) und bei 10/12 alten MI Fällen beschrieben. Die geschädigten Herzmuskelzellen im Zentrum der Infarktregion waren für Bax negativ. Bax war allerdings in Kontrollherzen nachweisbar. Außerdem exprimierten einzelne mononukleäre Entzündungszellen, die das Myokard infiltrierten, Bcl-2 und Bax Proteine.(52)

Zidar et al (2006) untersuchten die Aktivierung der **Caspase-3 (CASP3)**, dem Schlüsselenzym der Apoptose, bei 50 Patient*innen mit MI. Bei 18/30 Patient*innen, die an einem MI innerhalb der ersten 24 Stunden verstarben, wurde CASP3 im Zytoplasma der Kardiomyozyten ausschließlich im Randbereich der Infarktregion beschrieben. CASP3 war außerdem bei 3 Patient*innen nach etwa 48-stündiger Ischämiedauer anfärbbar. Der Nachweis der CASP3 positiven kardialen Myozyten war bei Patient*innen nach Reperfusionstherapie stärker

ausgeprägt. Bei 48 Stunden alten Infarkten zeigten auch neutrophile Granulozyten positive IHC-Reaktionen für CASP3. Bei subakuten (1-4 Wochen alten) MI konnte mittels CASP3 Färbung auch die Apoptose von mononukleären Entzündungszellen, Myofibroblasten und vaskulären Endothelzellen nachgewiesen werden. In der aus 5 Unfallopfern bestehenden Kontrollgruppe kamen keine CASP3 positiven Zellen vor.(48)

5.2 Resultattabelle:

Tabelle 4: Zusammenfassung der Studienergebnisse

Marker	Zeitpunkt des ersten Nachweises/ Überlebenszeit	Autor*in, Studie	Ergebnisse
Gruppe 1 – Depletionsmarker:			
cTnT, cTnI	>= 30 min	Fishbein et al. 2003, (50), Tierstudie	Nach 30 min erste Anzeichen von Depletion; stärkerer und früherer Verlust von cTnT im Vergleich zu cTnI; zunächst deutlichere Depletion in Peripherie des Infarktes
hFABP	Tierstudie: >= 15 min; humane Autopsiestudie: 0,5-3 h	Meng et al. 2006, (34), Tierstudie und humane Autopsiestudie	Im Tierversuch erste Verluste von hFABP in subendokardialen Myokardschichten und Papillarmuskeln nach 15 min. Nach 1 h waren die ischämischen Zellen mit hoher Sicherheit identifizierbar. Nach 4 h Depletion über gesamte Ventrikelwand sichtbar. In humanen AMI Fällen mit 0,5-3 h Überlebenszeit konnten

			vereinzelt bis größere Bereiche mit hFABP Depletion nachgewiesen werden.
S100A1	>= 15 min	Bi et al. 2013, (33), Tierstudie	Im Tierversuch erste Verluste von S100A1 in subendokardialen Myokardschichten und Papillarmuskeln nach 15 min. Nach 4h Depletion über gesamte Ventrikelwand sichtbar. 30 min nach Symptombeginn waren erste S100A1 Depletionen in vereinzelt Kardiomyozyten in humanem Myokard detektierbar. Nach 3h Überlebenszeit ausgeprägte Verlustregionen nachweisbar.
Gruppe 2 – Veränderung zytoskelettaler und sarkolemmaler Proteine:			
Dystrophin	>= 20 Min	Hashmi et al. 2013, (29), Tierstudie	Bereits nach 20 min LAD Verschluss konnte anhand des sarkolemmalen Verlustes von Dystrophin ein Infarktreal abgegrenzt werden. Mit zunehmender Ischämiedauer dehnte sich die Region mit Dystrophin-negativen Kardiomyozyten aus.
alpha-Aktinin, Vinkulin, Desmin	>= 1-6 h	Zhang et al. 1996, (36), humane Autopsiestudie	Eine Abnahme der Anfärbung der zytoskelettalen Proteine war nach 1h Überlebenszeit zu beobachten. Vinkulin und alpha-Aktinin zeigten einen

			<p>stärkeren Verlust als Desmin.</p> <p>Alpha-Aktinin wird als sensitivster und spezifischster der 3 Marker eingeschätzt.; Die 3 IHC-Marker wurden im Vergleich zu MB als zuverlässiger bewertet.</p>
SORBS2	< 7 h	<p>Kakimoto et al. 2013, (37), humane Autopsiestudie</p>	<p>Deutliche Abnahme von SORBS2 entlang der Z-Scheiben und Glanzstreifen der ischämischen Kardiomyozyten bei AMI mit Überlebenszeit <7 h.</p>
Gruppe 4 – Akkumulation von Plasmaelementen:			
C9/ MAC	6 h	<p>Robert-Offerman et al. 2000, (9), humane Autopsiestudie</p>	<p>C9 färbt MI mit 6 h Überlebenszeit; zeigt eine maximale Färbungsintensität bei 24-72 h alten Infarkten; alte MI sind ebenfalls positiv für C9, jedoch mit geringerer Intensität.; C9 färbt ausschließlich nekrotische Kardiomyozyten an.</p>
FN	4 h	<p>Casscells et al. 1990, (40), Tierstudie</p>	<p>4 h nach Verschluss der linken Koronararterie war FN im Zytoplasma einzelner Myozyten unregelmäßig nachweisbar, sowie im interstitiellen Raum zwischen den Zellen. Nach 24 h Ischämiedauer zeigten die nekrotischen Kardiomyozyten ein homogenes und stärker</p>

			<p>angefärbtes Zytoplasma. Einwandernde Kapillaren und Fibroblasten im Randbereich des Infarktes waren ebenfalls FN positiv. Maximale Färbungsintensität der nekrotischen Kardiomyozyten nach 48 h Ischämiedauer.</p>
Gruppe 7 – Stress- oder Hypoxie-induzierte Faktoren			
HIF-1alpha	0-10 h Überlebenszeit	Blanco Pampín et al. 2006, (45), humane Autopsiestudie	19/24 AMI Fälle (ohne makroskopische oder histologische Hinweise auf einen MI) exprimierten HIF-1alpha.; Bei makroskopisch bestätigten MI waren die ischämischen Kardiomyozyten nukleär und zytoplasmatisch HIF-1alpha positiv. In Endothelzellen kleiner, einsprossender Gefäße war HIF-1alpha ebenfalls nachweisbar.; Die Negativkontrollen waren negativ für HIF-1alpha.
HO-1		Kuninaka et al. 2021, (47), humane Autopsiestudie	Nukleäre HO-1 Expression wurde in AMI und in Nicht-AMI Fällen beobachtet, dennoch besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden untersuchten Gruppen (78,2% vs. 24,2%).
Gruppe 8 – Zelltod-Marker			

Bcl-2, Bax	6 h	Misao et al. 1996, (52), humane Autopsiestudie	Bcl-2 war im Zytoplasma der Kardiomyozyten im Randbereich der Infarktregion bei einem AMI mit 6 h Überlebenszeit nachweisbar.; Die Bax-Überexpression wurde v.a. bei alten MI beschrieben und wurde bei den AMI (Überlebenszeit: 6 h bis 20 Tage) nur vereinzelt beschrieben. Bax war auch in Herzen ohne Infarkt nachweisbar.
CASP3	<24-48 h	Zidar et al. 2006, (48), humane Autopsiestudie	Bei 18/30 MI mit einer Überlebenszeit <24 h war CASP3 im Zytoplasma der Kardiomyozyten im Randbereich der Infarktregion nachweisbar. Bei 48 h alten Infarkten wurden ebenfalls CASP3 positive Myozyten beobachtet. CASP3 färbte außerdem Entzündungszellen, Myofibroblasten und vaskuläre Endothelzellen an. Im Gegensatz zur TUNEL Methode wird die CASP3 als spezifischer IHC-Nachweis von Apoptose angesehen.
Studien zu Markern aus verschiedenen Gruppen			
MB, Fg	>= 30 min	Xiaohong et al. 2002, (41), Tierstudie	Nach 30 min LAD-Ligation erste Anzeichen einer MB Depletion und Fg Anreicherung

			<p>in subendokardialen Kardiomyozyten. Nach 2-3 h erstreckte sich der MB Verlust und Fg Färbung über die gesamte Ventrikelwand. Die beiden Marker bildeten zeitgleich ein ähnliches Muster an Gewebeveränderungen aus. MB und Fg haben die gleiche Sensitivität, mit der Ausnahme, dass die Kontamination des Gewebes mit Blut zu falsch positiven Ergebnissen bei Fg führen kann.</p>
<p>Cx43, npCx43, ZO-1, C5b-9, FN</p>	<p>30 min</p>	<p>Kawamoto et al. 2014, (38), humane Autopsiestudie</p>	<p>Während in der Kontrollgruppe Cx43 und npCx43 überwiegend an Glanzstreifen lokalisiert waren, wurde in 14/15 MI und 5/8 AMI Fällen eine Umverteilung von Cx43 und npCx43 in das Zytoplasma und an den lateralen Zellrand beobachtet. ZO-1 und FN waren diffus im Zytoplasma der Kardiomyozyten nachweisbar. MI und AMI Fälle zeigten tendenziell eine stärkere Intensität für ZO-1 und FN als in der Kontrollgruppe. C5b-9 färbte spezifisch die Ischämierregion bei 10/15 MI und 6/8 AMI Fällen. Die</p>

			Kontrollfälle waren C5b-9 negativ.
hFABP, cTnC, cTnT, MB, Desmin, FN, Fg, CD59, C5b-9	0,5-12 h	Ortmann et al. 2000, (35), humane Autopsiestudie	Die Ablagerung von Fg und FN wurde früher beobachtet als die Anreicherung von C5b-9, aber später als die Depletion von hFABP, cTnC, cTnT, MB und Desmin. Nach 30 min war C5b-9 im Infarktgebiet nachweisbar.
npCx43, JunB, FN, MB, cTnl, cTnT, TUNEL, C5b-9	npCx43 \geq 15 min; JunB \geq 30 min; FN, MB, cTnl, cTnT, TUNEL nach 1 h; C5b-9 nach 2 h	Sabatasso et al. 2016, (28), Tierstudie	Innerhalb der ersten 30 min war npCx43 und vereinzelt JunB nachweisbar. Nach 1 h Ischämie konnte eine FN Akkumulation in ischämischen Kardiomyozyten und eine Depletion von MB, cTnl und cTnT beobachtet werden. TUNEL färbte nach 1 h LAD-Verschluss Nuklei und das Zytoplasma ischämischer Kardiomyozyten an. Positive IHC-Reaktionen für C5b-9 wurden nach 2 h beschrieben.
npCx43, JunB, TUNEL, MB, cTnT		Sabatasso et al. 2018, (51), humane Autopsiestudie	Die IHC-Reaktion aller untersuchten Marker war sowohl bei AMI, MI als auch bei Fällen mit globaler Hypoxie nachweisbar. npCx43 und JunB wurden in der Gruppe mit globaler Hypoxie stärker exprimiert als im Myokard der AMI und MI Fälle. npCx43 und

			<p>JunB war bei AMI und MI überwiegend subendokardial nachweisbar, während sie bei globaler Hypoxie im gesamten Myokard diffus verteilt vorkamen.; TUNEL wies einen signifikanten Unterschied im Vergleich der AMI und MI Fälle, zugunsten der AMI Fälle auf.; Die MB und cTnT Depletion wies keinen signifikanten Unterschied zwischen den 3 Gruppen auf.</p>
<p>FN, Cx43, npCx43, ZO-1</p>		<p>Visonà et al. 2018, (25), humane Autopsiestudie</p>	<p>FN war ausschließlich in der Extrazellulärmatrix anfärbbar, zeigte jedoch in den AMI Fällen einen signifikanten Anstieg im Vergleich zur Kontrollgruppe.; An den Glanzstreifen der ischämischen Kardiomyozyten wurde eine Abnahme von Cx43 und eine Zunahme von npCx43 beobachtet. Im Vergleich zur Kontrollgruppe reicherten sich Cx43 und npCx43 im Zytoplasma der Kardiomyozyten in der Infarktregion an, jedoch war die Expression von npCx43 stärker ausgeprägt. npCx43 verlagerte sich außerdem an den lateralen Zellrand.; ZO-1 war in den AMI und Kontrollfällen</p>

			schwach nachweisbar, ein Unterschied in der Färbungsintensität oder Lokalisation von ZO-1 konnte zwischen den beiden untersuchten Gruppen nicht beobachtet werden.
MB, Desmin, Cathepsin S, cTnT, FN, CD59	<8 h, 8-24 h	Buğra et al. 2022, (32), humane Autopsiestudie	Ausgeprägte MB Depletion in allen untersuchten AMI Fällen; Die Desmin Depletion war schwächer, jedoch in allen 20 Fällen nachweisbar; deutlicher Cathepsin S Verlust in allen 9 Fällen mit Überlebenszeit zwischen 8-24h. Bei <8 h alten Infarkten: 7/11 starke, 2/11 schwache und bei 2/11 kein Cathepsin S Depletion nachweisbar.; cTnT wies einen signifikant stärker ausgeprägten Verlust in der Gruppe der 8-24 h überlebten Infarkte auf.; Der Anfärbbarkeit von FN war ebenfalls signifikant stärker ausgeprägt in der Gruppe mit 8-24 h Überlebenszeit.; bei 16/20 Fällen akkumulierte CD59 in großem Ausmaß in der Umgebung der Infarktregion.
MCP-1, IL-15; CD15, Tryptase,	<4 h	Turillazzi et al. 2014, (44),	Starke Expression von MCP-1 und IL-15 bei MI mit bis zu 4 h Überlebenszeit, die bei


IL-1beta, IL-6, TNF- alpha, IL-8, und ICAM- 1; cTnC, cTnl		humane Autopsiestudie	längerer Ischämiedauer (6-8 h) deutliche Abnahme der beiden Marker; CD15, Tryptase, IL- 1beta, IL-6, TNF-alpha, IL-8, und ICAM-1 schwach anfärbbar bei frühen Infarkten (4-6 h) und starke Intensität bei 6-8 h alten MI; cTnC und cTnl zeigten in der Gruppe der frühen Infarkte eine beginnende Depletion mit progredientem Verlauf bei andauernder Ischämie.
GAL-1, HIF- 1alpha, Ki- 67, CASP3, Bcl-2	GAL-1, HIF- 1alpha >=20 min; Bcl-2 >= 30 min; Ki-67, CASP3 <24 h	Al-Salam et al. 2014, (46), Tierstudie	GAL-1 und HIF-1alpha zeigten einen signifikanten Anstieg ihrer Expression nach 20 min LAD-Verschluss. Die nukleäre Expression von HIF-1alpha und GAL-1 in den ischämischen Kardiomyozyten nahm nach 1 h Ischämiedauer stetig ab. Die Expression von GAL-1 und HIF-1alpha zeigte keinen signifikanten Unterschied, war dennoch stärker nachweisbar als in der Kontrollgruppe.; Nach 24 h LAD-Verschluss waren GAL-1 und HIF-1alpha nur noch in der Region um den Infarkt herum anfärbbar, nicht im Zentrum.; GAL-1 und HIF-1alpha waren auch in Nuklei von Endothelzellen und

			<p>neutrophilen Granulozyten nachweisbar.;</p> <p>Die proliferative Aktivität von Ki-67 war nach 24 h Ischämiedauer in Endothelzellen der Infarktregion gesteigert.;</p> <p>Aktiviert CASP3 war ebenfalls nach 24 h LAD-Verschluss vermehrt in Kardiomyozyten und Endothelzellen im Infarkt nachweisbar.;</p> <p>Eine gesteigerte Bcl-2 Expression wurde v.a. in Endothelzellen und vereinzelt in Kardiomyozyten nach 30 min Ischämiedauer beschrieben.</p>
<p>FN, cTnT, HSP70, Ubq, VEGF</p>		<p>Ishikawa et al. 2000, (39), humane Autopsiestudie</p>	<p>FN akkumulierte ausschließlich in geschädigten Kardiomyozyten. cTnT war bis zur Infiltration neutrophiler Granulozyten in den ischämischen Herzmuskelzellen der Infarktregion nachweisbar. cTnT war im Randbereich des MI stärker anfärbbar als im normalen Myokard. HSP70, Ubq und VEGF zeigten ein ähnliches Verteilungsmuster wie cTnT, mit der Ausnahme, dass normale Kardiomyozyten negativ für HSP70, Ubq und VEGF waren. cTnT und HSP70</p>

			wurden in Makrophagen beobachtet. Fibroblasten und einsprossende Kapillaren exprimierten Ubq und VEGF.
Fas, TUNEL	> 3h	Feng et al. 2003, (49), Tierstudie	Eine gesteigerte Fas Expression war 3 h bis 7 Tage nach LAD-Okklusion in der Umgebung der Infarktregion nachweisbar. Apoptose wurde mittels TUNEL-Methode in den Gruppen mit Ischämiedauer zwischen 3-36 h im Zentrum des Infarktes beobachtet.

5.3 Zeitstrahl:

Beginn der Ischämie

- 
- >= 15 min: **hFABP** (subendokardial, Papillarmuskeln), Meng et al (2006)
S100A1 (subendokardial, Papillarmuskeln), Bi et al (2013)
npCx43 (beginnende intrazelluläre Umverteilung), Sabatasso et al (2016)
- >= 20 min: **Dystrophin**, Hashmi et al (2013)
GAL-1, HIF-1alpha, Al-Salamet al (2014)
- <=30 min: **HIF-1alpha** (nukleär), Blanco Pampín et al (2006)
- >= 30 min: **hFABP**; Überlebenszeit: 0,5-3 h, Meng et al (2006)
S100A1; Überlebenszeit: 0,5-3 h, Bi et al (2013)
cTnT > cTnI (in Infarktperipherie), Fishbein et al (2003)
MB, Fg (subendokardial), Xiaohong et al (2002)
hFABP, cTnC, cTnT, MB, Desmin > Fg, FN > C5b-9;
Überlebenszeit: 0,5-12 h, Ortmann et al (2000)
JunB (subendokardial), Sabatasso et al (2016)
Bcl-2 (in Endothelzellen > Kardiomyozyten), Al-Salam et al (2014)



1 h:	FN, MB, cTnl, cTnT, TUNEL, alpha-Aktinin, Vinkulin, Desmin; Überlebenszeit: >=1-6h, Zhang et al (1996)	Sabatasso et al (2016)
<2 h:	HIF-1alpha (nukleär und zytoplasmatisch); Überlebenszeit: 0-10 h,	Blanco Pampín et al (2006)
2 h:	C5b-9,	Sabatasso et al (2016)
3 h:	Fas, TUNEL,	Feng et al (2003)
<4 h:	MCP-1, IL-15 (stark exprimiert); CD15, IL-1beta, IL-16, TNF-alpha, IL-8, ICAM-1 Tryptase (schwach anfärbbar); cTnC und cTnl Depletion,	Turillazzi et al (2014)
4 h:	FN,	Casscells et al (1990)
6 h:	C9/MAC; Überlebenszeit: 6 h,	Robert-Offerman et al (2000)
	Bcl-2; Überlebenszeit: 6 h,	Misao et al (1996)
<7 h:	SORBS2; Überlebenszeit: <7 h,	Kakimoto et al (2013)
8 h:	MB > Desmin > Cathepsin S (<8 h); <u>vs.</u> cTnT, FN und CD59 signifikanter bei >8 h Überlebenszeit,	Buğra et al (2022)
<24 h:	CASP3; Überlebenszeit <24 h bis 48 h,	Zidar et al (2006)
	Ki-67 (in Endothelzellen), CASP3,	Al-Salam et al (2014)

Abbildung 19: Zeitliche Darstellung der Studienergebnisse: Zeitpunkte, zu denen der Marker in den jeweiligen Studien nachweisbar waren.; [Tiermodellversuche](#), [humane Autopsiestudien](#)

Die Studienergebnisse von Kawamoto et al(38), Sabatasso et al(51), Visonà et al(25), Kuninaka et al(47) und Ishikawa et al(39) konnten nicht in den Zeitstrahl mit aufgenommen werden. Es fehlten genaue Informationen zur Ischämiedauer. Die Gliederung der Fälle in frühe Myokardinfarkte (AMI) und länger bestehende bzw. ältere Myokardinfarkte (MI) erfolgte anhand von morphologischen Merkmalen, wie Koagulationsnekrose, Granulationsgewebe oder Narbengewebe. AMI war durch

die Abwesenheit histologisch spezifischer Veränderungen einer Myokardischämie definiert.

6 Diskussion:

Aus den Ergebnissen geht hervor, dass der Nachweis eines Myokardinfarktes mit einer Überlebenszeit unter 4 Stunden mittels IHC-Marken möglich war, im Gegensatz zur konventionellen Diagnostik mit H.E. Färbung.

Gruppe 1 – Depletionsmarker:

Die beginnende Depletion der kardialen Antigene (Gruppe 1) wurde bereits 15 Minuten nach Ischämiebeginn in Tiermodellstudien beobachtet und zählt somit zu den ersten immunhistochemisch-erkennbaren Veränderungen der Infarktregion. Der Verlust von hFABP(34) und S100A1(33) war früher nachweisbar als die Freisetzung von MB(41) und cTn(50) aus den ischämischen Kardiomyozyten. Dies bestätigt die Theorie, dass zunächst Proteine mit geringerem Molekulargewicht durch das geschädigte Sarkolemm in den Extrazellularraum austreten und über den zirkulierenden Blutkreislauf aus dem Infarktgewebe abtransportiert werden.(34) Einige Studien beschreiben, dass die ersten nekrotischen Kardiomyozyten subendokardial und in Papillarmuskeln nachweisbar waren.(33, 34, 41) Dies stützt das Prinzip der „letzten Wiese“(13). Die ischämischen Veränderungen entstehen zunächst im Endstromgebiet und breiten sich mit anhaltender Ischämiedauer wellenfrontartig nach subepikardial im Versorgungsgebiet des okkludierten Koronararterienastes aus.(8, 51)

Im Gegensatz dazu beobachteten Fishbein et al (2003) zunächst einen cTnI und cTnT Verlust in der Peripherie der Infarktregion. Ihre mögliche Erklärung für den früheren und stärkeren Verlust von cTnI und cTnT in der Peripherie war die vermehrte Durchblutung des an den Infarkt angrenzenden Myokards. Die kardialen Proteine werden daher voraussichtlich zuerst aus dem Randbereich freigesetzt, bevor der Abtransport der kardialen Proteine aus dem Infarktzentrum erfolgt.(50)

Ein vollständiger Verlust der kardialen Antigene in der Infarktregion über die gesamte Ventrikelwand war bei MB nach 2-3 Stunden(41) und bei hFABP und S100A1 nach 4 Stunden(33, 34) erkennbar. Demnach muss der Infarkt einige Stunden überlebt werden, bis die Infarktregion mittels IHC-Färbung eines Depletionsmarkers klar abgrenzbar ist. Sabatasso et al (2018) zweifeln die praktische Anwendbarkeit der Depletionsmarker bei unvollständigem Verlust in Autopsiefällen an. Beginnende Depletionen seien schwierig von Artefakten (Bereichen mit blasser Färbung) zu unterscheiden.(51) Während die MB und cTnT Depletion in der Tiermodellstudie von Sabatasso et al 2016 nach einer Stunde Ischämiedauer gut sichtbar war(28), konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den AMI, MI Fällen und der Negativkontrollgruppe der Autopsiestudie beobachtet werden(51).

Fishbein et al (2003) schätzen die IHC-Reaktion von cTnT und cTnI für die Erkennung einer Myokardnekrose sensitiver ein, als die Routine-H.E.-Färbung.(50) Meng et al (2006) identifizierten hFABP als nützlichen Marker zum postmortalen Nachweis sehr früher ischämisch bedingter Myokardschädigungen.(34) Bi et al (2013) kamen zu dem Schluss, dass der Nachweis der S100A1 Depletion hilfreich für die postmortem Diagnostik eines AMI mit kurzer Überlebenszeit sei. Zum einen hat S100A1 eine hohe Gewebespezifität und zum anderen erfolgt eine rasche Freisetzung aus den geschädigten Kardiomyozyten aufgrund seines geringen Molekulargewichts. Im Rahmen der Tiermodellstudie korrelierte der frühe Verlust des kardialen Antigens in der Ischämiezone mit einem signifikanten Serumanstieg von S100A1 bereits 15 Minuten nach Ischämiebeginn. Das Verteilungsmuster der S100A1 Depletion während der frühen Myokardischämie ähnelt der von Meng et al beschriebenen Depletion von hFABP. Dies legt die Sensitivität und Zuverlässigkeit dieser IHC-Marker für die AMI Diagnostik nahe.(33) hFABP wird aufgrund seiner hohen Gewebespezifität als sensitiver im Vergleich zu MB eingeschätzt. Meng et al (2006) berichten, dass nach ihren Beobachtungen die IHC-Reaktion von hFABP nicht durch Autolyse beeinflussbar war.(34)

Gruppe 2 – Veränderungen zytoskelettaler/ sarkolemmaler Proteine:

Ein Verlust von Dystrophin war ebenfalls sehr früh nachweisbar. Hashmi et al (2013) beobachteten in ihrer Tiermodellstudie bereits nach 20 Minuten Ischämiedauer Kardiomyozyten, deren Sarkolemm negativ für Dystrophin war. Sie untersuchten weiterhin die Korrelation zwischen den frühen histologischen Merkmalen einer Ischämie und dem Dystrophinverlust. Kardiomyozyten mit einem hypereosinophilen Zytoplasma wiesen einen kompletten membranösen Verlust an Dystrophin auf. Die Abnahme der sarkolemmalen Dystrophin-Färbung überschritt bei fortgeschrittener Ischämiedauer (nach 24 Stunden) die histologisch erkennbare Größe der Infarktregion (Koagulationsnekrose). Hashmi et al schätzen Dystrophin als einen hoch-sensitiven und zuverlässigen Marker für den Nachweis früher Myokardinfarkte ein.(29)

Kakimoto et al (2013) beschrieben einen Unterschied im Nachweis von SORBS2 zwischen den untersuchten Gruppen. Während in Kontrollherzen SORBS2 an Z-Scheiben und Glanzstreifen nachweisbar war, wiesen Kontraktionsbandnekrosen und gewellte Fasern („wavy fibers“) der AMI-Fälle mit einer Überlebensdauer unter 7 Stunden zunehmend kollabierte Z-Scheiben mit schwächerer und verschwommener IHC-Färbung auf.(37)

Zhang et al (1996) beschrieben Veränderungen von alpha-Aktinin, Vinkulin und Desmin in einzelnen AMI Fällen mit einer Stunde Überlebensdauer. Eine Abnahme der zytoplasmatischen Proteine war jedoch nicht in jeder Autopsieprobe der Patient*innen, die innerhalb der ersten 6 Stunden nach Symptombeginn verstarben, beschrieben. Der Vergleich mit der angeführten Kontrollgruppe erwies sich ebenfalls als schwierig, da Patient*innen mit Myokarditis, etc. eingeschlossen wurden.(36)

Gruppe 3 – Zelladhäsionsproteine, Zellverbindungen:

Die Umverteilung des dephosphorylierten Connexin 43 (npCx43) war laut Sabatasso et al (2016) bereits nach 15-minütigem Koronarverschluss nachweisbar. Sie schlussfolgerten daraus, dass zu diesem Zeitpunkt die Entkopplung der ischämischen Kardiomyozyten aus dem Zellverband beginnt und sich npCx43 als früher Marker für Myokardischämie eignet.(28) Kawamoto et al (2014) und Visonà et al (2018) beschrieben bei AMI und MI Fällen ebenfalls eine

signifikante Umverteilung des dephosphorylierten Gap Junction Proteins in das Zytoplasma und an den lateralen Zellrand im Vergleich zur Kontrollgruppe.(25, 38) Visonà et al (2018) schätzen den Nachweis von npCx43 und dessen Umverteilung in der ischämischen Herzmuskelzelle ebenfalls als nützlichen Marker zur Diagnosestellung eines sehr frühen Myokardinfarktes ein.(25) In der humanen Autopsiestudie von Sabatasso et al (2018) konnte npCx43 als früher Marker bestätigt werden. Im Gegensatz zur Tiermodellstudie 2016 konnte jedoch 2018 die Spezifität von npCx43 für MI nicht beobachtet werden. Sabatasso et al beschrieben 2018, dass npCx43 am stärksten in den Negativkontrollfällen (mit globaler Hypoxie) exprimiert wurde. Der npCx43 Nachweis in den verschiedenen Gruppen unterschied sich jedoch im Gewebeverteilungsmuster. Während npCx43 bei MI und AMI überwiegend subendokardial lokalisiert war, kam npCx43 bei globaler Hypoxie diffus verteilt im gesamten Myokard vor.(51) Bei dem Nachweis des phosphorylierten Connexin 43 (Cx43) dagegen war kein deutlicher Unterschied zwischen AMI und Kontrollfällen in der Umverteilung zu beobachten.(25) Bei Verwendung des IHC-Antikörpers anti-Cx43 muss außerdem beachtet werden, dass dieser möglicherweise sowohl das phosphorylierte als auch das dephosphorylierte Protein anfärbt. Dies war beispielsweise bei Kawamoto et al (2014) der Fall.(38)

Die Ergebnisse für ZO-1 waren sowohl bei Visonà et al (2018) als auch bei Kawamoto et al (2014) nicht eindeutig. Während Visonà et al (2018) eine eher schwache ZO-1 Färbung an den Glanzstreifen der Kardiomyozyten bei AMI und in nicht-ischämischen Myokard beobachteten(25), beschrieben Kawamoto et al (2014) eine tendenziell stärkere Färbungsintensität für ZO-1 in den ischämischen Kardiomyozyten(38).

Gruppe 4 – Plasmaelemente:

FN ist ein Marker, der im Rahmen des MIs bereits häufig untersucht und diskutiert wurde. Die Beschreibung über dessen Vorkommen in Myokardinfarkten und Negativkontrollen ist jedoch kontrovers. Casscells et al (1990) berichteten von Kontrollfällen, bei denen FN im Interstitium und Zytoplasma der Myozyten nachweisbar war.(40) Kawamoto et al (2014) beschrieben ebenfalls eine diffuse zytoplasmatische FN-Färbung, während die AMI Fälle eine tendenziell stärkere

zytoplasmatische Färbungsintensität für FN zeigten.(38) Ishikawa et al (2000) und Sabatasso et al (2016) beobachteten eine intrazelluläre FN Akkumulation ausschließlich in Kardiomyozyten der Infarktregion.(28, 39) Visonà et al (2018) beschrieben, dass sich FN während eines AMIs ausschließlich extrazellulär anreicherte. Visonà et al kamen zu dem Entschluss, dass FN als diagnostischer Marker für den Nachweis einer frühen Myokardischämie nicht spezifisch genug sei. FN kam ebenfalls in der Extrazellulärmatrix der Kontrollfälle vor und seine Expression sei durch zu viele Faktoren, wie beispielsweise Asphyxie, beeinflussbar.(25) Ishikawa et al (2000) dagegen schätzen FN als einen nützlichen IHC-Marker ein, da er sich in ihren Beobachtungen ausschließlich in irreversibel geschädigten Kardiomyozyten ablagerte und nicht im funktionsfähigen Myokard beobachtet wurde.(39)

Xiaohong et al (2002) beobachteten, dass die mittels Fg identifizierte Infarktregion mit dem Bereich der MB Depletion übereinstimmte und einen ähnlichen zeitlichen Verlauf zeigte. Sie bewerten die beiden IHC-Marker als ähnlich sensitiv für die Früherkennung einer akuten Myokardischämie. Allerdings ist Fg weniger zuverlässig, da durch Kontamination des Gewebes mit Blut falsch-positive Ergebnisse entstehen können. Daher muss bei der Probengewinnung während der Autopsie gesondert darauf geachtet werden.(41)

C5b-9/ MAC färbte ausschließlich irreversibel geschädigte Kardiomyozyten und war in der Lage einzelne Kardiomyozyten zu detektieren. Nicht-ischämisches Myokard war negativ für C5b-9, somit weist der terminale Komplementkomplex eine hohe Spezifität in der Myokardinfarkt-Diagnostik auf.(9) C5b-9 war später nachweisbar als FN. Eine mögliche Erklärung für die späte IHC-Reaktion von C5b-9 könnte sein, dass die Ausbildung des terminalen Membranangriffskomplexes von C3b und C5 bis hin zu C5b-9, deren Aktivierung und Ablagerung an der Zellmembran der ischämischen Kardiomyozyten länger dauert und von der Verfügbarkeit mehrerer Komplementkomponenten abhängt als die Akkumulation des zirkulierenden FN.(28) Kawamoto et al (2014) vermuten, dass eine Kombination von npCx43 und C5b-9 für die Diagnostik von frühen Myokardischämie-Läsionen hilfreich sein könnte. Die Umverteilung von npCx43 von den Glanzstreifen in das Zytoplasma ist möglicherweise früher nachweisbar

als die Ablagerung von C5b-9. Die Autor*innen beobachteten jedoch in 3/24 Kontrollfällen ebenfalls eine signifikante Umverteilung von npCx43. C5b-9 dagegen war ausschließlich in Ischämierregionen nachweisbar. Somit ist npCx43 vermutlich sensitiver, jedoch weniger spezifisch als C5b-9.(38)

Die Studienergebnisse von Ortmann et al (2000) legen nahe, dass zuerst die IHC-Reaktion der Marker der Gruppe 1 (hFABP, cTnT, cTnI, MB) und Gruppe 2 (Desmin) nachweisbar war, bevor eine Akkumulation der Plasmaelemente (Gruppe 4) erfolgte. FN und Fg waren vor C5b-9 in der Infarktregion positiv. Alle Marker hoben im Myokard eine ähnliche Infarktregion hervor. Die Beobachtungen von Ortmann et al stützen jedoch nicht die Hypothese, dass vor Ausbildung des Membranangriffskomplexes (C5b-9) es zu einem Verlust von CD59 an der Zellmembran der ischämischen Kardiomyozyten kommt. Sie beobachteten, dass in 2/8 AMI Fällen CD59 an der Zellmembran vorhanden war und gleichzeitig C5b-9 in einzelnen Kardiomyozyten nachweisbar war.(35)

Gruppe 5 – Nukleäre Marker:

Nukleäre Marker waren ebenfalls früh nachweisbar. Sabatasso et al beschrieben 2016, dass JunB bereits 30 Minuten nach LAD-Verschluss nachweisbar war und ausschließlich in ischämischen Kardiomyozyten exprimiert wurde.(28) 2018 zweifelten sie jedoch die Spezifität von JunB bei Autopsiefällen an. JunB wurde am stärksten in den Negativkontrollfällen (mit globaler Hypoxie) exprimiert. Der JunB Nachweis in den verschiedenen Gruppen unterschied sich jedoch im Gewebeverteilungsmuster. Während JunB bei MI und AMI überwiegend subendokardial lokalisiert war, kam JunB bei globaler Hypoxie diffus verteilt im gesamten Myokard vor.(51) Sabatasso et al merkten 2018 ebenfalls an, dass für die Beurteilung der nukleären Marker ein geschultes Auge bzw. ein/e erfahrene/r Patholog*in notwendig sei. Die TUNEL-Reaktion und die JunB Färbung in den Nuklei der Kardiomyozyten können mit der H.E. Färbung überlappen und eine Interpretation erschweren. Für die Beurteilung ist außerdem eine große mikroskopische Vergrößerung (mind. x40) notwendig, was die Untersuchung zeitlich aufwendiger macht.(51)

Sabatasso et al (2018) beobachteten, dass TUNEL bei AMI Fällen signifikant stärker exprimiert war als bei MI Fällen. Sie bestätigten, dass TUNEL ein guter Marker für die Früherkennung eines AMI sei. Der apoptotische Prozess setzt rasch nach Ischämiebeginn ein und ist innerhalb von 6 Stunden abgeschlossen. Dies stellt eine mögliche Erklärung für die abnehmende Färbungsintensität in fortgeschritteneren Myokardinfarkten dar.(51) In der Tiermodellstudie 2016 wurde der TUNEL Nachweis nach 1 Stunde Ischämiedauer beschrieben. Allerdings berichteten sie von einer nukleären und zytoplasmatischen TUNEL Reaktion.(28) Sabatasso et al (2018) weisen darauf hin, dass Postmortem-Intervalle >20 Stunden die TUNEL Färbung möglicherweise beeinflussen können.(51)

Die Zuverlässigkeit der TUNEL-Methode zum Nachweis von Apoptose bei Myokardischämie wird angezweifelt, da DNA-Fragmentierung kein Alleinstellungsmerkmal apoptotischer Kardiomyozyten ist. DNA-Strangbrüche kommen auch bei Nekrose, bei Reparaturmechanismen reversibler DNA-Schäden und bei postmortalen Autolyse vor. Daher haben Zidar et al (2006) die IHC-Reaktion der Effektorcaspase, dem Schlüsselenzym der Apoptose, untersucht. Durch Spaltung der Procaspase 3 in die aktive Caspase 3 wird ein neues Epitop freigelegt, welches durch die immunhistochemischen Antikörper detektiert wird. Es wird angenommen, dass CASP3 ein spezifischerer Marker für Apoptose ist. CASP3 wurde ausschließlich bei AMI und MI Fällen beobachtet. Die Studienergebnisse stützen die Vermutung, dass Ischämie Apoptose induziert und Apoptose nach Reperfusionmaßnahmen verstärkt auftritt.(48)

Die Rolle der Apoptose bei Myokardischämie ist noch immer nicht vollständig geklärt und bleibt umstritten.(51)

Gruppe 7 – Stress- oder Hypoxie-induzierte Faktoren:

Blanco Pampín et al (2006) schätzen HIF-1alpha als nützlichen Marker für die Diagnosestellung eines frühen Myokardinfarktes ein. Der IHC-Marker färbte ischämische Läsionen im humanen Myokard innerhalb der ersten 2 Stunden nach Symptombeginn. Das Myokard außerhalb der Infarktregion und der Negativkontrollfälle war durchgehend negativ für HIF-1alpha.(45) Al Salam et al (2014) dagegen berichteten, von einer HIF-1alpha Expression im Maus-Myokard

der gesunden, nicht-Infarkt-induzierten Mäuse, vorwiegend in Zellkernen von Endothelzellen, jedoch auch in Nuklei vereinzelter Kardiomyozyten. Al-Salam et al berichteten ebenfalls über einen signifikanten Anstieg von HIF-1alpha und GAL-1 nach 20 Minuten Ischämiedauer. Das Ausmaß der Expression von HIF-1alpha und GAL-1 nahm 1 Stunde nach Ischämiebeginn ab und war bei 24 Stunden alten Infarkten im Zentrum nicht mehr nachweisbar.(46) Während Al-Salam et al (2014) HIF-1alpha ausschließlich nukleär beobachteten(46), beschrieben Blanco Pampín et al (2006) eine nukleäre und zytoplasmatische HIF-1alpha Färbung der geschädigten Kardiomyozyten im Infarktzentrum(45).

Al-Salam et al (2014) beobachteten eine Korrelation zwischen der Expression von HIF-1alpha und GAL-1. Alle ischämischen Kardiomyozyten deren Nukleus HIF-1alpha positiv war, zeigten ebenfalls eine nukleäre und zytoplasmatische GAL-1 Expression. Alle Kardiomyozyten, die negativ für HIF-1alpha waren, waren auch nicht für GAL-1 anfärbbar. Dies bestärkt die Vermutung, dass HIF-1alpha die Transkription von GAL-1 reguliert.(46) Blanco Pampín et al wiesen außerdem darauf hin, dass die HIF-1alpha Expression im Endothel mittelgroßer Gefäße deutlich schwächer ausfiel. Ihrer Meinung zufolge bestätigt dies die angiogene Wirkung von HIF-1alpha, die sich auf Endstromgefäße im Myokardgewebe begrenzt.(45)

HSP70, VEGF und Ubq sind weitere Marker der Gruppe 7, die bei fortgeschrittenem Infarkt nicht in Infarktzentrum, sondern im angrenzenden Myokard nachweisbar waren.(39)

Kuninaka et al (2021) untersuchten sehr frühe Myokardinfarkte mit kurzer Überlebenszeit, bei denen weder eine Leukozyteninfiltration noch eine MB-Depletion immunhistochemisch nachweisbar war. Die Gewebeproben unterschieden sich jedoch signifikant in der nukleären HO-1 Expression von den nicht-kardialen Todesfällen. Somit kann HO-1 als früher diagnostischer Marker angesehen werden.(47)

Gruppe 8 – Zelltod-Marker:

Feng et al (2003) beobachteten ebenfalls eine Fas-Expression im Randbereich des Infarktes. Im Gegensatz zum TUNEL-Nachweis apoptotischer Kardiomyozyten war Fas auch nach 7 Tagen Ischämiedauer noch positiv. Die Ergebnisse des Tierversuchs weisen darauf hin, dass Fas möglicherweise nicht durch die apoptotische Zelle selbst exprimiert wird und dass Fas Expression und Apoptose nicht unbedingt synchronisiert erfolgen. Feng et al vermuten, dass Fas möglicherweise die Apoptose in den Kardiomyozyten nicht direkt reguliert, da die Studienergebnisse keine Überexpression der Fas-Rezeptoren an der Zellmembran der apoptotischen Kardiomyozyten nachweisen konnten (gemäß der klassischen Theorie des Fas-Signalweges). Eine Fas-Expression war auch in nicht-ischämischem Myokard nachweisbar, somit erscheint Fas nicht spezifisch für Myokardischämie.(49)

Die Apoptose regulierenden Proteine Bax und Bcl-2 waren ebenfalls nicht im Zentrum der Infarktregion nachweisbar. Misao et al (1996) beobachteten Bcl-2 im Randbereich bei AMI Fällen, während Bax überwiegend in Kardiomyozyten alter Infarkte beschrieben wurde. Im Gegensatz zu Bcl-2 war Bax auch im Myokard der Negativkontrollen nachweisbar. Während eines frühen Myokardinfarktes scheinen die antiapoptotischen Prozesse zu dominieren, da Bcl-2 stärker exprimiert war.(52) Al-Salam et al (2014) beobachteten ebenfalls eine gesteigerte Bcl-2 Expression 30 Minuten nach Ischämiebeginn. CASP3 war dagegen erst später, nach 24-stündiger Koronar-Okklusion, vermehrt nachweisbar.(46)

Vorteile und Limitationen von Tiermodellstudien gegenüber humanen Autopsiestudien:

Vorteile einer Tiermodellstudie sind u.a. die exakte Bestimmung der Ischämiedauer und der Nachweis der IHC-Marker im zeitlichen Verlauf. Weiterhin erfolgen die Probenentnahme, Gewebefixierung und -verarbeitung unter standardisierten Bedingungen. In Paraffin eingebettete Gewebeproben sind zu einem späteren Zeitpunkt retrospektiv wiederverwendbar.(29) Faktoren, die die Studienergebnisse beeinflussen könnten (wie Agonie, kardiopulmonale Reanimation, Einfluss von Katecholaminen, i.v.-Drogenkonsum, Autolyse, etc.), können in experimentellen Studien minimiert werden.(28) Es sind standardisierte

Vorgaben zur Verwendung der Gewebeverarbeitung und -fixierung, sowie der IHC Färbung notwendig, um technische Einflussfaktoren zu minimieren.(25)

Ob die Studienergebnisse der Tiermodellstudien auf humane Autopsiefälle übertragen werden können, muss weiter untersucht werden. Die Physiologie und Anatomie des Tiers unterscheiden sich von der des Menschen (z.B. in Größe des Herzens, Herzfrequenz, kardialer Hämodynamik, Elektrophysiologie, etc.).(30)

Die Schwierigkeit bei der Interpretation der Studienergebnisse der humanen Autopsiestudien besteht darin, dass der Zeitpunkt des Ischämiebeginns häufig nicht genau bestimmt werden kann und eine große Heterogenität zwischen den Verstorbenen besteht (Dauer der Agonie, Wiederbelebungsversuche, Einfluss der postmortalen Autolyse, etc.).(30)

Ein Nachteil von IHC-Markern, die sowohl bei AMI als auch in Negativkontrollen nachweisbar waren, liegt darin, dass die Färbungsintensität immer im Vergleich zum benachbarten Gewebe und zu Negativkontrollfällen beurteilt werden muss, sowie die Beurteilung der Verteilung des Markers im Myokard berücksichtigt werden muss.(25)

Zur Diagnosesicherung eines frühen Myokardinfarktes bei humanen Autopsiefällen wird empfohlen mehrere Proben an verschiedenen Myokardstellen zu untersuchen, da bei sehr frühen Myokardinfarkten makroskopisch keine Ischämie-region abgrenzbar ist.(28)

6.1 Schlussfolgerung:

Zur Diagnosesicherung eines frühen Myokardinfarktes sind IHC-Marker geeignet, die innerhalb der ersten 3 Stunden nach Symptombeginn nachweisbar, einzigartig für Ischämie sind und nicht durch Umgebungsfaktoren beeinflusst werden.(30) Bei der Verwendung einer Kombination aus mehreren IHC-Markern ist der Nachweis der Myokardnekrose bereits 1 Stunde nach Symptombeginn möglich.(28)

Aus der Gegenüberstellung der Studienergebnisse wird ersichtlich, dass C5b-9 vermutlich aktuell der spezifischste IHC-Marker für nekrotische Kardiomyozyten bei einer Myokardischämie ist. C5b-9 war ausschließlich in der Infarktregion nachweisbar und hob selbst einzelne Kardiomyozyten hervor. Allerdings waren die IHC-Marker der Gruppe 1 (Depletionsmarker) und der Gruppe 7 (Stress- oder Hypoxie-induzierte Faktoren) deutlich früher nachweisbar und zählen somit zu den sensitivsten Markern der frühen Myokardinfarkt-Diagnostik.

Zur sicheren Diagnosestellung eines Myokardinfarktes mit kurzer Überlebenszeit ist die Verwendung einer Kombination von IHC-Markern verschiedener Gruppen zu empfehlen, da kein einzelner Marker sensitiv und spezifisch genug war.

In Tabelle 5 ist exemplarisch ein Vorschlag für die Kombination verschiedener IHC-Marker zur Diagnostik eines Myokardinfarktes mit kurzer Überlebenszeit angeführt.

Tabelle 5: Mögliche Kombination verschiedener IHC-Marker zur Diagnostik eines Myokardinfarktes mit kurzer Überlebenszeit

Mögliche Kombination verschiedener IHC-Marker		
>=15 min	S100A1 & hFABP	Gruppe 1 - Depletionsmarker
>=20 min	Dystrophin	Gruppe 2 - Veränderung zytoskelettaler und sarkolemmaler Proteine
>=15 min	npCx43	Gruppe 3 - Zelladhäsionsproteine
2 h	C5b-9	Gruppe 4- Akkumulation von Plasmaelementen
>=30 min	JunB	Gruppe 5 - nukleäre Marker
<4 h	IL-15 & MCP-1	Gruppe 6 - Mediatoren der frühen Inflammation
>=20 min	HIF-1alpha/ GAL-1	Gruppe 7 - Hypoxie-induzierte Faktoren
>= 30 min	Bcl-2	Gruppe 8 - Zelltod-Marker

Bei der Antikörper-Wahl für npCx43 sollte darauf geachtet werden, dass dieser ausschließlich npCx43 detektiert und Cx43 nicht mit anfärbt.(38)

JunB und npCx43 weisen eine geringe Spezifität auf. Um einen Myokardinfarkt von einer globalen Hypoxie zu differenzieren, ist das Verteilungsmuster im Gewebe zu beachten.(51)

HIF-1alpha und GAL-1 waren bei einem akuten Myokardinfarkt im Zentrum der Infarktregion nachweisbar. Bei Myokardinfarkten, die länger als 24 Stunden überlebt wurden, wurden die Marker in der Peripherie des Infarktareals beobachtet.(46) Der Nachweis von Bcl-2 erfolgte ebenfalls in der Infarktperipherie.(52)

IL-15 und MCP-1 wurden früher als die anderen untersuchten Entzündungsmediatoren in der Infarktregion exprimiert. Jedoch nahm ihre Färbungsintensität rasch mit steigender Infarktdauer ab.(44)

Es müssen weitere Studien durchgeführt werden, um mögliche Einflussfaktoren zu untersuchen, die in den meisten Studien ausgeschlossen wurden. Die zellpathophysiologischen Vorgänge während eines Myokardinfarktes sind ebenfalls noch nicht vollständig geklärt.

Die Fallzahlen der meisten Studien waren sehr klein und können gegebenenfalls eine Aussage über die Signifikanz der Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen verfälschen.

Dennoch geht aus dieser Arbeit deutlich hervor, dass die IHC-Diagnostik eine geeignete Alternative zur konventionellen H.E.-Färbung zum Nachweis eines Myokardinfarktes mit kurzer Überlebenszeit darstellt. Für die Erstellung einer standardisierten Kombination an IHC-Markern, zur diagnostischen Anwendung in der Früherkennung eines Myokardinfarktes, sind jedoch dringend weitere Studien erforderlich.

7 Literaturverzeichnis:

1. Erdmann E. Klinische Kardiologie: Krankheiten des Herzens, des Kreislaufs und der herznahen Gefäße. 8 ed. Heidelberg: Springer; 2011.
2. Baba HA, Kirkpatrick CJ, Wohlschläger J. Herz. In: Höfler G, Kreipe HH, Moch H, editors. Pathologie: Das Lehrbuch. 6 ed. München: Elsevier; 2019. p. 365-402.
3. Menon V, Sengupta JD. Chronic Coronary Artery Disease. In: Runge MS, Stouffer GA, Patterson C, editors. Netter's Cardiology. 2nd ed: Saunders; 2010. p. 97-105.
4. Austria S. Gestorbene 2021 nach Todesursachen, Alter und Geschlecht: Statistik Austria; 2022 [Available from: <https://www.statistik.at/statistiken/bevoelkerung-und-soziales/bevoelkerung/gestorbene/todesursachen>].
5. Yang EH, Steinhubl SR. Non—ST-Elevation Myocardial Infarction. In: Runge MS, Stouffer GA, Patterson C, editors. Netter's Cardiology. 2 ed: Saunders; 2010. p. 107-13.
6. Roskamm H, Gick M, Bubenheimer P, Jander N, Schnellbacher K. Klinik der koronaren Herzerkrankung III: Der Herzinfarkt im chronischen Stadium. In: Roskamm H, Neumann F-J, Kalusche D, Bestehorn H-P, editors. Herzkrankheiten: Pathophysiologie, Diagnostik, Therapie. 5 ed. Berlin, Heidelberg: Springer; 2004. p. 531-54.
7. Antman EM, Loscalzo J, Möckel M. ST-Sreckenhebungsinfarkt. In: Jameson JL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Loscalzo J, et al., editors. Harrisons Innere Medizin. 20th ed: ABW Wissenschaftsverlag GmbH; 2018. p. 2331-45.
8. Michaud K, Basso C, d'Amati G, Giordano C, Kholová I, Preston SD, et al. Diagnosis of myocardial infarction at autopsy: AECVP reappraisal in the light of the current clinical classification. Virchows Archiv. 2020;476(2):179-94.
9. Robert-Offerman SR, Leers MPG, van Suylen RJ, Nap M, Daemen MJAP, Theunissen PHMH. Evaluation of the membrane attack complex of complement for the detection of a recent myocardial infarction in man. Journal of Pathology. 2000;191(1):48-53.
10. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Chaitman BR, Bax JJ, Morrow DA, et al. Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). European Heart Journal. 2018;40(3):237-69.
11. Michaud K. Ischemic Heart Disease. In: Suvarna SK, editor. Cardiac Pathology: A Guide to Current Practice. Heidelberg, New York, London: Springer; 2013. p. 117-31.
12. Zatloukal K, Roth W, Weber A. Zell- und Gewebereaktionen. In: Höfler G, Kreipe HH, Moch H, editors. Pathologie: Das Lehrbuch. 6 ed. München: Elsevier; 2019. p. 19-41.
13. Baba HA, Wohlschläger J, Kirkpatrick CJ. Kreislaufferkrankungen. In: Höfler G, Kreipe HH, Moch H, editors. Pathologie: Das Lehrbuch. 6 ed. München: Elsevier; 2019. p. 179-205.
14. Runge MS, Ohman EM, Stouffer GA. The History and Physical Examination. In: Runge MS, Stouffer GA, Patterson C, editors. Netter's Cardiology. 2nd ed: Saunders; 2010. p. 3-14.

15. Moser M, Frey M, Bode C. ST-Elevation Myocardial Infarction. In: Runge MS, Stouffer GA, Patterson C, editors. *Netter's Cardiology*. 2 ed: Saunders; 2010. p. 115-21.
16. Verhoff MA, Ramsthaler F. Akuter Myokardinfarkt - Forensische Begutachtung von Diagnose- und Behandlungsfehlervorwürfen. *Rechtsmedizin*. 2013;23(4):236-42.
17. Green JM, Chiamida AJ. *12-Lead EKG Confidence : A Step-By-Step Guide*. New York: Springer Publishing Company 2014.
18. Ibanez B, James S, Agewall S, Antunes MJ, Bucciarelli-Ducci C, Bueno H, et al. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *European Heart Journal*. 2017;39(2):119-77.
19. Sedivy R. *Autopsie Leitfaden: Grundlagen der Totenbeschau und Obduktion*. 1 ed. Wien: facultas; 2020.
20. Kitzman DW, Scholz DG, Hagen PT, Ilstrup DM, Edwards WD. Age-related changes in normal human hearts during the first 10 decades of life. Part II (Maturity): A quantitative anatomic study of 765 specimens from subjects 20 to 99 years old. *Mayo Clinic Proceedings*. 1988;63(2):137-46.
21. Lodge-Patch I. The ageing of cardiac infarcts, and its influence on cardiac rupture. *British Heart Journal*. 1951;13(1):37-42.
22. Bestehorn H-P, Roskamm H. Koronarangiographie. In: Roskamm H, Reindell H, editors. *Herzkrankheiten - Pathophysiologie, Diagnostik, Therapie*. 4 ed. Berlin, Heidelberg: Springer; 1996. p. 375-400.
23. Smart SC, Knickelbine T, Stoiber TR, Carlos M, Wynsen JC, Sagar KB. Safety and accuracy of dobutamine-atropine stress echocardiography for the detection of residual stenosis of the infarct-related artery and multivessel disease during the first week after acute myocardial infarction. *Circulation*. 1997;95(6):1394-401.
24. Sheppard MN. *Practical Cardiovascular Pathology*. 2 ed. Boca Raton, Florida: CRC Press; 2011.
25. Visonà SD, Benati D, Monti MC, Galiè M, Andrello L, Frontini A, et al. Diagnosis of sudden cardiac death due to early myocardial ischemia: An ultrastructural and immunohistochemical study. *European Journal of Histochemistry*. 2018;62(2):2866.
26. Cleutjens JPM, Blankesteyn WM, Daemen MJAP, Smits JFM. The infarcted myocardium: simply dead tissue, or a lively target for therapeutic interventions. *Cardiovascular Research*. 1999;44(2):232-41.
27. Turillazzi E, Pomara C, Bello S, Neri M, Riezzo I, Fineschi V. The meaning of different forms of structural myocardial injury, immune response and timing of infarct necrosis and cardiac repair. *Current Vascular Pharmacology*. 2015;13(1):6-19.
28. Sabatasso S, Mangin P, Fracasso T, Moretti M, Docquier M, Djonov V. Early markers for myocardial ischemia and sudden cardiac death. *International Journal of Legal Medicine*. 2016;130(5):1265-80.
29. Hashmi S, Al-Salam S. Loss of dystrophin staining in cardiomyocytes: a novel method for detection early myocardial infarction. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 2013;6(2):249-57.

30. Aljakna A, Fracasso T, Sabatasso S. Molecular tissue changes in early myocardial ischemia: from pathophysiology to the identification of new diagnostic markers. *International Journal of Legal Medicine*. 2018;132(2):425-38.
31. Mishra PK, Adameova A, Hill JA, Baines CP, Kang PM, Downey JM, et al. Guidelines for evaluating myocardial cell death. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*. 2019;317(5):H891-h922.
32. Buğra A, Daş T. The Role of Immunohistochemical Markers in the Diagnosis of Early Myocardial Infarction. *Cureus*. 2022;14(2).
33. Bi H, Yang Y, Huang J, Li Y, Ma C, Cong B. Immunohistochemical detection of S100A1 in the postmortem diagnosis of acute myocardial infarction. *Diagnostic Pathology*. 2013;8(1):84.
34. Meng X, Ming M, Wang E. Heart fatty acid binding protein as a marker for postmortem detection of early myocardial damage. *Forensic Science International*. 2006;160(1):11-6.
35. Ortmann C, Pfeiffer H, Brinkmann B. A comparative study on the immunohistochemical detection of early myocardial damage. *International Journal of Legal Medicine*. 2000;113(4):215-20.
36. Zhang JM, Riddick L. Cytoskeleton immunohistochemical study of early ischemic myocardium. *Forensic Science International*. 1996;80(3):229-38.
37. Kakimoto Y, Ito S, Abiru H, Kotani H, Ozeki M, Tamaki K, et al. Sorbin and SH3 domain-containing protein 2 is released from infarcted heart in the very early phase: proteomic analysis of cardiac tissues from patients. *American Heart Association*. 2013;2(6).
38. Kawamoto O, Michiue T, Ishikawa T, Maeda H. Immunohistochemistry of connexin43 and zonula occludens-1 in the myocardium as markers of early ischemia in autopsy material. *Histology and Histopathology*. 2014;29(6):767-75.
39. Ishikawa Y, Akasaka Y, Ishii T, Itoh K, Masuda T, Zhang L, et al. Sequential changes in localization of repair-related proteins (heat shock protein 70, ubiquitin and vascular endothelial growth factor) in the different stages of myocardial infarction. *Histopathology*. 2000;37(6):546-54.
40. Casscells W, Kimura H, Sanchez JA, Yu Z-X, Ferrans VJ. Immunohistochemical study of fibronectin in experimental myocardial infarction. *American Journal of Pathology*. 1990;137(4):801-10.
41. Xiaohong Z, Xiaorui C, Jun H, Qisheng Q. The contrast of immunohistochemical studies of myocardial fibrinogen and myoglobin in early myocardial ischemia in rats. *Legal Medicine*. 2002;4(1):47-51.
42. Müller C, Höfler G, Imhof BA, Holländer GA. Entzündung. In: Höfler G, Kreipe HH, Moch H, editors. *Pathologie: Das Lehrbuch*. München: Elsevier; 2019. p. 43-73.
43. Yasojima K, Schwab C, McGeer EG, McGeer PL. Human heart generates complement proteins that are upregulated and activated after myocardial infarction. *Circulation Research*. 1998;83(8):860-9.

44. Turillazzi E, Di Paolo M, Neri M, Riezzo I, Fineschi V. A theoretical timeline for myocardial infarction: immunohistochemical evaluation and western blot quantification for Interleukin-15 and Monocyte chemoattractant protein-1 as very early markers. *Journal of Translational Medicine*. 2014;12:188.
45. Blanco Pampín J, García Rivero SA, Otero Cepeda XL, Vázquez Boquete A, Forteza Vila J, Hinojal Fonseca R. Immunohistochemical expression of HIF-1 α in response to early myocardial ischemia. *Journal of Forensic Sciences*. 2006;51(1):120-4.
46. Al-Salam S, Hashmi S. Galectin-1 in early acute myocardial infarction. *Public Library of Science One*. 2014;9(1).
47. Kuninaka Y, Ishida Y, Nosaka M, Ishigami A, Taruya A, Shimada E, et al. Forensic significance of intracardiac heme oxygenase-1 expression in acute myocardial ischemia. *Scientific Reports*. 2021;11(1).
48. Zidar N, Dolenc-Strazar Z, Jeruc J, Stajer D. Immunohistochemical expression of activated caspase-3 in human myocardial infarction. *Virchows Archiv*. 2006;448(1):75-9.
49. Feng QZ, Li TD, Wei LX, Qiao X, Yi J, Wang L, et al. Temporo-spatial dissociation between the expression of Fas and apoptosis after coronary occlusion. *Molekular Pathology*. 2003;56(6):362-7.
50. Fishbein MC, Wang T, Matijasevic M, Hong L, Apple FS. Myocardial tissue troponins T and I. An immunohistochemical study in experimental models of myocardial ischemia. *Cardiovascular Pathology*. 2003;12(2):65-71.
51. Sabatasso S, Moretti M, Mangin P, Fracasso T. Early markers of myocardial ischemia: from the experimental model to forensic pathology cases of sudden cardiac death. *International Journal of Legal Medicine*. 2018;132(1):197-203.
52. Misao J, Hayakawa Y, Ohno M, Kato S, Fujiwara T, Fujiwara H. Expression of bcl-2 protein, an inhibitor of apoptosis, and Bax, an accelerator of apoptosis, in ventricular myocytes of human hearts with myocardial infarction. *Circulation*. 1996;94(7):1506-12.