

Aus der Klinik für Innere Medizin V

Universitätskliniken des Saarlandes, Homburg/Saar

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Robert Bals

**Durchflusszytometrische Untersuchung endothelialer Mikro-  
partikel pulmonal- und peripher-vaskulären Ursprungs bei  
PAH- und CTEPH-Patienten**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der

UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

**2017**

vorgelegt von Carlos Christian Metz

geboren am 02.03.1987 in Santa Cruz / Bolivien

## Inhaltsverzeichnis

<b>I Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>5</b>
<b>II Zusammenfassung.....</b>	<b>9</b>
<b>1. Abstract .....</b>	<b>11</b>
<b>2. Einleitung.....</b>	<b>13</b>
2.1 Definition der pulmonalen Hypertonie .....	14
2.2 Geschichte der pulmonalen Hypertonie.....	15
2.3 Klassifikation und Epidemiologie der pulmonalen Hypertonie .....	16
2.4 Pathogenese der pulmonalen Hypertonie.....	18
2.5 Diagnostik der pulmonalen Hypertonie.....	20
2.6 Einteilung des Schweregrades .....	21
2.7 Therapie der PAH.....	22
2.7.1 Prostacyclinanaloga.....	23
2.7.2 Phosphodiesterase 5 Inhibitoren (PDE5I).....	23
2.7.3 Endothelinrezeptorantagonisten (ERA's) .....	24
2.8 Mikropartikel (MPs) .....	24
2.8.1 MPs als Krankheitsindikatoren? .....	26
2.8.2 Pathogenetische Rolle von MPs bei pulmonaler Hypertonie .....	27
2.8.3 Endotheliale Mikropartikel bei PH.....	29
2.9 Ziel der Arbeit .....	30
<b>3. Material und Methodik.....</b>	<b>32</b>
<b>3.1 Geräte und Material .....</b>	<b>32</b>
3.1.1 Geräte.....	32
3.1.2 Verbrauchsmaterial.....	33
3.1.3 Antikörper und Calibration Beads .....	34
3.1.4 Chemikalien und Lösungen .....	35
<b>3.2 Probenmaterial.....</b>	<b>36</b>
3.2.1 Gewinnung und Weiterverarbeitung der Blutproben .....	36
3.2.2 Antikoagulation der Proben mit CTAD.....	36
3.2.3 Thrombozytenarmes Plasma (PPP) .....	37
<b>3.3 Grundlagen der Durchflusszytometrie (FACS - Fluorescence activated cell sorting) .....</b>	<b>37</b>
<b>3.4 Vorversuche – Erstellung des Versuchsprotokolls.....</b>	<b>38</b>
3.4.1 Messung von MPs .....	38

3.4.2 Verarbeitung der Proben.....	39
3.4.3 Antikörper und verschiedene Fluorochrome.....	42
<b>3.5 Messung der Proben nach Protokoll .....</b>	<b>45</b>
3.5.1 Vorbereitung der Proben und Herstellung der Pufferlösung.....	45
3.5.2 Durchführung der Messung .....	47
3.5.3 Festlegung der Mikropartikel-Populationen .....	48
<b>3.6 Automatische Zellzählung mittels CASY® .....</b>	<b>49</b>
3.6.1 Prinzip der CASY® Zellzählmethode.....	49
3.6.2 Vorbereitung und Durchführung der Messung .....	50
<b>3.7 Datenerfassung und Statistik.....</b>	<b>51</b>
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>53</b>
<b>4.1 Patientenkollektiv .....</b>	<b>53</b>
4.1.1 Ein- und Ausschlusskriterien der Patienten .....	53
4.1.2 Charakterisierung des Patientenkollektivs .....	54
<b>4.2 Erfassung klinischer Daten der Patienten.....</b>	<b>55</b>
4.2.1 Transthorakale Echokardiographie.....	56
4.2.2 Rechtsherzkatheteruntersuchung.....	61
4.2.3 Medikation der Patienten.....	65
<b>4.3 Mikropartikel .....</b>	<b>66</b>
4.3.1 Pulmonale EMPs vs. periphere EMPs.....	70
<b>4.4 Mikropartikel und klinische Parameter .....</b>	<b>76</b>
4.4.1 WHO Funktionsklasse und EMPs.....	76
4.4.2 Zusammenhang zwischen WHO Funktionsklasse und rechtsventrikulärer Arbeit .....	78
4.4.3 Zusammenhang invasiv gemessener hämodynamischer Parameter und pulmonaler EMPs.....	79
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>82</b>
<b>5.1 Mikropartikel .....</b>	<b>82</b>
5.1.1 Endotheliale Mikropartikel .....	84
5.1.2 ACE als Marker für MPs pulmonalen Ursprungs.....	87
<b>5.2 Studienkollektiv .....</b>	<b>91</b>
5.2.1 Basischarakteristika und anthropometrische Daten .....	91
5.2.2 Medikamentöse Begleitfaktoren .....	92
<b>5.3 Zusammenhänge zwischen klinischen Parametern und Mikropartikeln .....</b>	<b>94</b>
<b>5.4 Methodenkritik und Limitationen dieser Arbeit .....</b>	<b>97</b>

<b>5.5 Zusammenfassung und Perspektive.....</b>	<b>99</b>
<b>III Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>101</b>
<b>IV Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>103</b>
<b>V Literaturverzeichnis .....</b>	<b>104</b>
<b>VI Publikationen und Danksagung .....</b>	<b>114</b>

# I Abkürzungsverzeichnis

<b>ACE</b>	Angiotensin Converting Enzyme
<b>ALK 1</b>	Activin receptor like kinase 1
<b>APAH</b>	Assoziierte pulmonal arterielle Hypertonie
<b>BMPR2</b>	Bone Morphogenetic Proteine Receptor 2
<b>BNP</b>	Brain Natriuretic Peptide
<b>cAMP</b>	Cyclisches Adenosinmonophosphat
<b>CCB</b>	Calcium Chanel Blocker
<b>cGMP</b>	Cyclic Guanosin Monophosphate
<b>CI</b>	Cardiac Index
<b>CRP</b>	C-reaktives Protein
<b>CTAD</b>	Citrat Theophyllin Adenosin Dipyridamol
<b>CTEPH</b>	Chronisch thrombembolische pulmonale Hypertonie
<b>CVP</b>	Central Venous Pressure
<b>CW</b>	Continuous Wave
<b>DIC</b>	Disseminierte intravasale Gerinnung
<b>DPG</b>	Diastolisch pulmonaler Gradient
<b>ED</b>	Enddiastolisch
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>EF</b>	Ejektionsfraktion
<b>EKG</b>	Elektrokardiogramm
<b>EMP</b>	Endotheliale Mikropartikel
<b>eNOS</b>	Endothelial Nitric Oxide Synthase
<b>ERA</b>	Endothelin Rezeptor Antagonist
<b>ES</b>	Endsystolisch
<b>ET</b>	Endothelin
<b>ET-1</b>	Endothelin-1
<b>ETA</b>	Endothelin receptor type A
<b>ETB</b>	Endothelin receptor type B
<b>evts.</b>	Events
<b>FACS®</b>	Fluorescence-activated cell sorting
<b>FC</b>	Functional Class

<b>FSC</b>	Forward Scatter
<b>FMD</b>	Flow mediated dilation
<b>FS</b>	Fractional shortening
<b>HIV</b>	Human immunodeficiency virus
<b>HPAH</b>	Hereditäre pulmonal arterielle Hypertonie
<b>HF</b>	Herzfrequenz
<b>HZV</b>	Herzzeitvolumen
<b>IPAH</b>	Idiopathische pulmonal arterielle Hypertonie
<b>IVSd</b>	Intraventrikuläre Septumsdicke, diastolisch
<b>IVSs</b>	Intraventrikuläre Septumsdicke, systolisch
<b>KHK</b>	Koronare Herzkrankheit
<b>KÖF</b>	Körperoberfläche
<b>LAAd</b>	Linksatriale Fläche, diastolisch
<b>LMP</b>	Leukozytäre Mikropartikel
<b>LV</b>	Linker Ventrikel
<b>LVAd</b>	Linksventrikuläre Fläche, diastolisch
<b>LVEDd</b>	Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser diastolisch
<b>LVEDs</b>	Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser systolisch
<b>LV-EF (B-M)</b>	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion, B-Modus (Simpson)
<b>LV-EF (M-M)</b>	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion, M-Modus (Teichholz)
<b>LVEVd</b>	Linksventrikuläres enddiastolisches Volumen diastolisch
<b>LVEVs</b>	Linksventrikuläres enddiastolisches Volumen systolisch
<b>LV-SV</b>	Linksventrikuläres Schlagvolumen
<b>m</b>	Männlich
<b>Max</b>	Maximum
<b>Min</b>	Minnimum
<b>MP</b>	Mikropartikel
<b>MW</b>	Mittelwert
<b>n.s.</b>	Nicht signifikant
<b>NO</b>	Stickstoffmonoxid
<b>NT-pro-BNP</b>	N-terminal pro Brain Natriuretic Peptide
<b>PAH</b>	Pulmonal arterielle Hypertonie
<b>PAOP</b>	Pulmonal arterieller Verschlussdruck
<b>PAPm</b>	Pulmonal arterieller Mitteldruck

<b>PAWP</b>	Pulmonalkapillärer Verschlussdruck
<b>PC</b>	Prostacyclin
<b>PDE</b>	Phosphodiesterase
<b>PDEI</b>	Phosphodiesterase Inhibitor
<b>PDGF</b>	Platelet-derived Growth factor
<b>PFP</b>	Platelet free Plasma
<b>PH</b>	Pulmonale Hypertonie
<b>PMP</b>	Thrombozytäre Mikropartikel
<b>PPP</b>	Platelet poor Plasma
<b>PRP</b>	Platelet rich Plasma
<b>PTPRC</b>	Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type C
<b>PVOD</b>	Pulmonary Veno-Occlusive Disease
<b>PVR</b>	Pulmonalvaskulärer Widerstand
<b>PW</b>	Pulsed Wave
<b>RAAd</b>	Rechtsatriale Fläche, diastolisch
<b>RAAS</b>	Renin Angiotensin Aldosteron System
<b>RAP</b>	Right Atrial Pressure
<b>RRdia</b>	Blutdruck diastolisch
<b>RRsys</b>	Blutdruck systolisch
<b>RV</b>	Rechter Ventrikel
<b>RVAd</b>	Rechtsventrikuläre Fläche, diastolisch
<b>RVAs</b>	Rechtsventrikuläre Fläche, systolisch
<b>RV-EF</b>	Rechtsventrikuläre Auswurfraction
<b>RVFAC</b>	Right Ventricular Fractional Area Change (=Verkürzungsfraction)
<b>RVFW</b>	Dicke der rechtsventrikulären freien Wand
<b>RVIDd-base</b>	Rechtsventrikulärer Querdurchmesser basal
<b>RVIDd-mid</b>	Rechtsventrikulärer Querdurchmesser Mitte
<b>RV-length</b>	Rechtsventrikulärer Längsdurchmesser
<b>RVP</b>	Right ventricular Pressure
<b>RVSP</b>	Rechtsventrikulärer Spitzendruck
<b>RVSV</b>	Rechtsventrikuläres Schlagvolumen
<b>RVW</b>	Right ventricular Work
<b>SD</b>	Standard Deviation

<b>SSC</b>	Sideward Scatter
<b>SVR</b>	Systemic Vascular Resistance
<b>TAPSE</b>	Tricuspid Annular Plane Systolic Excursion
<b>TASV</b>	Tricuspid Annular Systolic Velocity
<b>TF</b>	Tissue Factor
<b>TPG</b>	Transpulmonaler Gradient
<b>TTP</b>	Thrombotisch thrombozytopenische Purpura
<b>VIP</b>	Vasoaktives intestinales Peptid
<b>vWF</b>	Von Willebrand Faktor
<b>w</b>	Weiblich
<b>WHO</b>	World Health Organisation

## II Zusammenfassung

**Hintergrund:** Mikropartikel (MPs) sind Zellabschnürungen aus der Membran verschiedener Zelltypen mit einer Größe von unter einem 1µm. MPs sind entscheidend an der interzellulären Kommunikation beteiligt und gelten als biologische Marker für Prozesse wie Apoptose, Zellaktivierung und endotheliale Dysfunktion. Die pulmonale Hypertonie (PH) ist eine Erkrankung, die mit endothelialer Dysfunktion speziell in der pulmonalen Strombahn einhergeht. Es wurde mehrfach gezeigt, dass unterschiedliche MP-Gruppen im Blut von PH-Patienten erhöht waren, die genaue pathophysiologische Rolle ist jedoch noch größtenteils ungeklärt.

**Methoden:** 26 PH-Patienten (55,5±15,5 Jahre; PAPm 48,0±13,7mmHg), von denen 11 an einer PAH und 15 an einer CTEPH litten sowie 14 gesunde Kontrollprobanden wurden in diese Studie eingeschlossen. Einschlusskriterium für PH-Patienten und Probanden war, dass sie keine kardiovaskulären Erkrankungen hatten. Zum Zeitpunkt der Untersuchung standen 17 Patienten unter einer gezielten medikamentösen PH Therapie. Die MPs wurden mittels Durchflusszytometrie gemessen. Als Probenmaterial diente thrombozytenfreies Plasma (PFP) aus venösem Blut, das mittels CTAD antikoaguliert wurde.

Um absolute Werte der MPs (counts/µl) zu messen, wurde zusätzlich zur Durchflusszytometrie noch eine Messung mittels CASY®-Zellzähltechnik durchgeführt. Die verschiedenen MP-Populationen wurden folgendermaßen festgelegt: Endotheliale MPs (EMPs): PECAM<sup>+</sup> (CD31<sup>+</sup>/CD41<sup>-</sup>); aktivierte EMps: E-Selectin<sup>+</sup> (CD62<sup>+</sup>); thrombozytäre MPs (PMPs): GpIIb<sup>+</sup> (CD41<sup>+</sup>); apoptotische MPs: Annexin V<sup>+</sup> und pulmonale EMps: ACE<sup>+</sup> (CD143<sup>+</sup>).

**Ergebnisse:** Die Konzentrationen endothelialer Mikropartikel (CD31<sup>+</sup>/CD41<sup>-</sup>) waren bei den PH-Patienten signifikant niedriger als bei den gesunden Kontrollprobanden (PH 116,32 ± 91,99 vs. Kontrolle 189,63 ± 138,69; p = 0,039). Innerhalb der PH-Subgruppen fanden sich unterschiedliche MP-Konzentrationen. PAH-Patienten zeigten die höchsten Konzentrationen apoptotischer (AnnexinV<sup>+</sup>) EMps. Diese Konzentrationen waren signifikant höher als die der CTEPH-Patienten (PAH 79,544 ± 78,33 vs.

CTEPH  $19,62 \pm 40,13$  ;  $p = 0,034$ ). Dies galt sowohl für pulmonale ( $ACE^+$ ) (PAH  $11,45 \pm 8,95$  vs. CTEPH  $2,87 \pm 3,48$   $p = 0,023$ ) als auch für periphere ( $ACE^-$ ) EMPs (PAH  $68,09 \pm 72,86$  vs. CTEPH  $16,74 \pm 37,07$  ;  $p = 0,030$ ). Keine signifikanten Konzentrationsunterschiede zeigten sich bei PH-Patienten und Kontrollen bezüglich der thrombozytären MPs ( $CD41^+$ ). Eine weitere endotheliale MP-Population mit einem starken  $ACE^+$  Signal im FACS, die als „bright“ bezeichnet wurde und vermutlich pulmonal-endothelialen Ursprungs ist, zeigte eine positive Korrelation mit der rechtsventrikulären Arbeit ( $RVW = PAPm \times RSV$ ) ( $r = 0,631$ ) und dem pulmonal vaskulären Widerstand (PVR) ( $r = 0,628$ ). Patienten der WHO Funktionsklasse I und II zeigten ein signifikant höheres Verhältnis  $ACE^{bright}$  EMPs zu schwächer  $ACE^{dim}$  EMPs als Patienten in den WHO Funktionsklasse III und IV (WHO FC III-IV  $1,489 \pm 0,94$  vs WHO FC I-II  $0,713 \pm 0,80$  ;  $p = 0,011$ ).

**Schlussfolgerung:** Im Gegensatz zu vorausgegangenen Studien waren die EMP-Konzentrationen ( $CD31^+$  ;  $CD41^-$ ) bei PH-Patienten in dieser Arbeit deutlich niedriger als bei gesunden Kontrollprobanden. Der Befund, dass Annexin V<sup>+</sup> EMP Konzentrationen signifikant höher bei PAH als bei CTEPH waren, könnte darauf hinweisen, dass die endotheliale Dysfunktion in der Pathogenese der PAH eine wichtigere Rolle als bei CTEPH spielt. Die positive Korrelation von pulmonalen EMPs mit dem PVR und der rechtsventrikulären Arbeit sowie die Tatsache, dass sich die Spiegel pulmonaler EMPs bei verschiedenen WHO Funktionsklassen signifikant unterscheiden, zeigen, dass EMPs möglicherweise in der Zukunft als Marker zur Beurteilung des Schweregrades der Erkrankung dienen können. Noch ist die pathophysiologische Rolle der Mikropartikel unzureichend geklärt und auch die Nachweismethodik ist noch nicht ausreichend standardisiert, sodass keine endgültigen Schlüsse zur Rolle von MPs bei pulmonaler Hypertonie möglich sind.

## 1. Abstract

**Background:** Microparticles (MPs) are submicron membrane fragments ( $<1\mu\text{m}$ ) that are shed by different types of cells. MPs play an important role in intercellular communication and are biological markers associated with apoptosis, cell activation and endothelial dysfunction. Pulmonary Hypertension (PH) is a disease associated with endothelial dysfunction especially in the pulmonary vascular bed. It has been reported that different subgroups of circulating MPs are elevated in patients with PH, their pathophysiological role in the development of PH still remains poorly understood.

**Methods:** 26 Patients ( $55,5\pm 15,5$  age ; PAPm  $48,0\pm 13,7$ mmHg) with PAH (n=11) and CTEPH (n=15) without any other cardiovascular diseases as well as 14 healthy age- and sex-matched control subjects were included into the study. At the time most patients (n=17) received endothelial-active vasodilator therapy. Microparticles were measured by flow cytometry in platelet-free plasma from venous blood anticoagulated with CTAD. Additional samples were measured with CASY®- cell sorting technique to obtain absolute microparticle counts (counts/ $\mu\text{l}$ ). Different MP-subgroups were characterized as followed: Endothelial microparticles (EMPs) were PECAM<sup>+</sup> (CD31<sup>+</sup>/CD41<sup>-</sup>), activated EMPs E-Selectin<sup>+</sup> (CD62E<sup>+</sup>), platelet derived MPs (PMPs) were GpIIb<sup>+</sup> (CD41<sup>+</sup>) , pulmonary EMPs were ACE<sup>+</sup> (CD143<sup>+</sup>) and apoptotic MPs were Annexin V<sup>+</sup>.

**Results:** Endothelial Microparticles (CD31<sup>+</sup>/CD41<sup>-</sup>) were significantly reduced in PH-patients compared with control-subjects (PH  $116,32 \pm 91,99$  vs. Control  $189,63 \pm 138,69$  ;  $p = 0,039$ ). PH subgroups displayed significantly different MP levels. PAH patients showed significantly higher levels of Annexin V<sup>+</sup> EMPs than CTEPH patients (PAH  $79,54 \pm 78,33$  vs. CTEPH  $19,62 \pm 40,13$  ;  $p = 0,034$ ). This observation was made for both pulmonary (ACE<sup>+</sup>) EMPs (PAH  $11,45 \pm 8,95$  vs. CTEPH  $2,87 \pm 3,48$   $p = 0,023$ ) and for peripheral EMPs (ACE<sup>-</sup>) (PAH  $68,09 \pm 72,86$  vs. CTEPH  $16,74 \pm 37,07$  ;  $p = 0,030$ ). No differences between levels of circulating PMPs (CD41<sup>+</sup>) were observed. Higher levels of a new EMP-population with a very strong ACE<sup>+</sup> signal in FACS named bright correlated positively with right ventricular work (RVW = PAPm \* SV)

( $r = 0,631$ ) and pulmonary vascular resistance (PVR) ( $r = 0,628$ ). Patients in WHO Functional Classes I and II showed significantly higher ratio of ACE<sup>bright</sup> EMPs compared with less strong ACE<sup>dim</sup> than patients in WHO Functional classes III and IV (WHO FC III-IV  $1,489 \pm 0,94$  vs WHO FC I-II  $0,713 \pm 0,80$  ;  $p = 0,011$ ).

**Conclusions:** In contrast to previous studies PH-patients showed lower levels of circulating EMPs (CD31<sup>+</sup>; CD41<sup>-</sup>). The fact that Annexin V<sup>+</sup> EMP concentrations are significantly elevated in PAH Patients compared to CTEPH patients suggests that endothelial dysfunction plays a more important role in the pathogenesis of PAH than in CTEPH. The positive correlation between pulmonary EMPs and haemodynamic parameters such as PVR and RV-Work and the fact that pulmonary EMP levels differ between different WHO functional classes point out that pulmonary EMPs could become a new tool to assess the severity of pulmonary Hypertension in the future. The pathophysiology of MPs in PH still remains partially understood. Because of this and the lack of standardization concerning the methodology it is not possible to make definitive comments on the the role of MPs in pulmonary hypertension.

## 2. Einleitung

Während Krankheiten wie Herzinfarkt oder Vorhofflimmern sowohl in der kardiovaskulären Forschung als auch in den öffentlichen Medien einen breiten Raum einnehmen, ist die präkapilläre pulmonale Hypertonie ein Krankheitsbild, mit dem sich in der Fachwelt nur eine begrenzte Anzahl von Arbeitsgruppen auseinandersetzt.

Dies ist möglicherweise die Folge der geringen Inzidenz der Erkrankung. Für die Betroffenen jedoch hat die Krankheit schwerwiegende Folgen. Sie leiden unter verminderter körperlicher Belastbarkeit, eingeschränkter Lebensqualität und einer drastisch verminderten Lebenserwartung, welche oft der mit einem Lungenhochdruck einhergehenden chronischen Rechtsherzinsuffizienz geschuldet ist.

Risikofaktoren bzw. assoziierte Bedingungen einer präkapillären pulmonalen Hypertonie sind familiäre Disposition, Erkrankungen (HIV, Kollagenosen v.a. Sklerodermie), Medikamente (Aminorex), Toxine oder rezidivierende thrombembolische Ereignisse.

Die Beschwerden der Patienten sind oft sehr unspezifisch. Sie reichen von Luftnot bei Belastung über Müdigkeit bis hin zu Angina Pectoris Beschwerden.

Diese vielfältigen Symptome und die niedrige Inzidenz der Erkrankung führen dazu, dass die Krankheit schwer zu diagnostizieren ist und daher oft erst spät erkannt wird. Häufige Fehldiagnosen sind Erschöpfungssyndrom, Asthma bronchiale, Depression oder mangelnde Fitness (Olschewski H, Olschewski A 2011).

	<b>Erste klinische Zeichen in der Spezialambulanz</b>	<b>Symptome bei Diagnosesicherung</b>
<b>Luftnot bei Belastung</b>	60%	98%
<b>Müdigkeit</b>	20%	73%
<b>Thorakale Schmerzen</b>	7%	47%
<b>Schwächeanfälle</b>	12%	41%
<b>Beinödeme</b>	3%	37%
<b>Herzstolpern</b>	5%	33%
<b>Raynaud Syndrom</b>	10%	

Tabelle 1 Erste Beschwerden bei idiopathischer oder hereditärer PAH (nach Rich et al. 1987)

PH-Patienten konsultieren durchschnittlich mindestens 3 Ärzte, bis die Diagnose der Erkrankung gestellt wird (Wilkens et al. 2010). Die Zeitspanne zwischen Erstsymptom und Diagnose beträgt 2,3 Jahre (Wilkens et al. 2010).

Da es sich bei der pulmonalen Hypertonie um eine chronische, fortschreitende Erkrankung handelt, in deren Verlauf die körperliche Leistungsfähigkeit immer weiter abnimmt, hat die verzögerte Diagnose verhängnisvolle Folgen. Im Fall der pulmonal arteriellen Hypertonie beispielsweise betrug die Lebenserwartung nach Diagnose ohne Therapie im Mittel nur noch 2,8 Jahre (D'Alonzo et al. 1991). Durch eine frühzeitige, gezielte Therapie ließ sich die Prognose dieser Patienten jedoch verbessern (Galie et al. 2009; Macchia et al. 2010).

Trotz des bisher erreichten Fortschritts ist eine Heilung der Erkrankung noch nicht möglich.

Frühe Diagnostik und gezielte, sofortige Therapiemaßnahmen könnten dazu beitragen, pathogenetische Mechanismen reversibel zu machen und so die Prognose der Patienten zu verbessern.

## **2.1 Definition der pulmonalen Hypertonie**

Für alle Formen der pulmonalen Hypertonie gilt seit der ersten WHO-Konferenz in Genf, dass diese hämodynamisch durch einen pulmonal arteriellen Mitteldruck größer oder gleich 25mmHg in Ruhe definiert ist. Dieser muss durch eine Rechtsherzkatheteruntersuchung bestimmt werden.

Der normale pulmonal arterielle Mitteldruck beträgt  $14,0 \pm 3,3$ mmHg (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) (Kovacs, Berghold et al. 2009). Die obere Grenze der Normwerte endet bei 20,6mmHg, der Bereich zwischen 21 und 25mmHg wird in der Literatur als „borderline pulmonary hypertension“ bezeichnet (Olschewski H, Olschewski A 2011). Dieser Bereich ist jedoch nicht in die Definition mit aufgenommen.

Auf der Dana Point Konferenz 2008 entschloss man sich dazu, die Belastungsdruckwerte als Definitionskriterium nicht mehr zu verwenden, da gesunde, ältere oder gut trainierte Personen bei der Untersuchung einen starken Anstieg der pulmonalen Druckwerte haben können und somit der Normbereich zu sehr verbreitert ist.

## 2.2 Geschichte der pulmonalen Hypertonie

Die Erstbeschreibung der idiopathischen PAH erfolgte 1865 durch Prof. Dr. Julius Klob, der als Prosector am Wiener Rudolfsspital tätig war. Dieser fand bei der Obduktion eines Patienten, der wegen der Zeichen eines isolierten Cor pulmonales behandelt wurde, charakteristische Veränderungen der Lungenstrombahn, die er als „endarteritis pulmonalis deformans“ bezeichnete (Olschewski H, Olschewski A 2011).

1891 sprach Ernst von Romberg von der „isolierten Sklerose der Lungenarterien“ und nahm Bezug auf die Arbeit von Klob. Kurze Zeit später beschrieb Viktor Eisenmenger ähnliche Veränderungen der Pulmonalarterien bei einem Patienten mit großem Ventrikelseptumdefekt. Eine Erklärung für die beobachteten Veränderungen bestand zu dieser Zeit noch nicht.

1902 beschrieb Abel Ayerza an der Universität von Buenos Aires Symptome der Erkrankung wie Zyanose, Dyspnoe und Polyglobulie. Er vermutete, dass die Sklerose der Pulmonalarterien Folge der Syphilis sei, was sich jedoch nicht bestätigte.

Ein weiterer Pionier in der Erforschung der pulmonalen Hypertonie war André Cournand, der in den 50er Jahren die diagnostische Rechtsherzkatheterisierung klinisch zur Anwendung brachte und fortentwickelte (Cournand 1947).

Der englische Kardiologe Paul Wood prägte 1958 den Begriff „primäre pulmonale Hypertonie“, betonte die pathogenetische Rolle der Vasokonstriktion der Pulmonalarterien und etablierte die Normwerte des pulmonal arteriellen Mitteldrucks, die bis heute gültig sind.

In den 60er Jahren kam es mit der Markteinführung des Appetitzüglers Menocil® (Aminorex) vermehrt zu Fällen pulmonaler Hypertonie. Dies brachte die Krankheit verstärkt ins Bewusstsein und in der Folge kam es zu den ersten erfolgreichen Therapieversuchen mit Prostacyclinen.

Unter anderem bedingt durch die „Appetitzügler Epidemie“ fand 1973 in Genf die erste WHO Konferenz zur pulmonalen Hypertonie statt. Auf ihr wurde erstmals eine hämodynamische Definition der PH festgelegt.

## 2.3 Klassifikation und Epidemiologie der pulmonalen Hypertonie

Auf der WHO-Weltkonferenz von 1973 einigte man sich das erste Mal auf eine allgemeingültige Klassifikation der pulmonalen Hypertonie in eine primäre (PPH) und sekundäre pulmonale Hypertonie. Diese Unterteilung hatte Bestand bis zur zweiten WHO-Weltkonferenz in Evian 1998, wo man sich dazu entschloss, die Erkrankung in fünf Untergruppen aufzuteilen. Der Begriff der PPH wich dem der pulmonal arteriellen Hypertonie (PAH), welcher zur Gruppe 1 der PH-Klassifikation wurde.

Der Begriff sekundäre pulmonale Hypertonie wurde in 4 Untergruppen aufgeteilt. Die beobachtete familiäre Häufung der Erkrankung machte eine genetische Disposition wahrscheinlich und erforderte somit auch eine eigene PAH Untergruppe.

Die Klassifikation der PH wurde auf der WHO-Weltkonferenz in Venedig 2003 nochmals verändert und 2008 auf der Dana Point Konferenz erneut überarbeitet. Die Dana Point Kriterien galten als Maßstab während der Datenerhebung dieser Studie. Sie wurden zwischenzeitlich durch die Nizza Klassifikation von 2013 ergänzt. Die aktuelle Einteilung stammt aus den Europäischen Leitlinien zur Diagnostik und Behandlung der pulmonalen Hypertonie von 2015 und ist in Tabelle 2 aufgeführt. Für die Klassifikation der eingeschlossenen Patienten hat sich durch die neue Einteilung allerdings nichts geändert.

Epidemiologische Daten hinsichtlich des Auftretens der PH sind noch nicht ausreichend vorhanden (Hoeper et al. 2016). Bezüglich Inzidenz und Prävalenz der PAH basieren die Zahlen vor allem auf den Daten des Nationalen französischen Registers für die PH. In einer Studie, die den Zeitraum von Oktober 2002 bis Oktober 2003 beleuchtete, wurden 121 Neuerkrankungen diagnostiziert. Auf die französische Gesamtbevölkerung gerechnet würde das eine Inzidenz von eins zu einer Million bedeuten. Die Prävalenz der idiopathischen pulmonalen Hypertonie (IPAH) liegt bei schätzungsweise sechs zu einer Million Einwohner. Die Prävalenz der PAH liegt bei 15 zu einer Million Einwohner (Humbert et al. 2006; Hoeper et al. 2016). Prävalenzdaten zu den anderen PH Klassen sind nicht ausreichend vorhanden. Bei der CTEPH geht man von einer hohen Dunkelziffer aus, da bis zu 4% aller Patienten mit einer Lungenembolie eine CTEPH entwickeln (Hoeper et al. 2009). Bei 40.000 Lungenembolien pro Jahr in Deutschland könnte dies bis zu 800 CTEPH Neuerkrankungen bedeuten (Iversen 1994), speziell bei Patien-

ten mit rezidivierenden Embolien (Bonderman et al. 2009). Insgesamt sind Frauen 1,7 mal häufiger von einer PH betroffen als Männer (Rich et al. 1987).

Klinische Klassifikation der pulmonalen Hypertonie nach den European Guidelines von 2015
<p><b>1. Pulmonal-arterielle Hypertonie (PAH)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>1.1 Idiopathisch (IPAH)</li> <li>1.2 Hereditär (HPAH) <ul style="list-style-type: none"> <li>1.2.1 BMPR2- Mutation</li> <li>1.2.2 Andere Mutationen</li> </ul> </li> <li>1.3 Medikamenten-, drogen- und strahlen-induziert</li> <li>1.4 Assoziiert mit (APAH) <ul style="list-style-type: none"> <li>1.4.1 Kollagenosen</li> <li>1.4.2 HIV- Infektion</li> <li>1.4.3 Portale Hypertension</li> <li>1.4.4 Kongenitale Herzerkrankungen</li> <li>1.4.5 Schistosomiasis</li> </ul> </li> </ul> <p>Γ Pulmonale venookklusive Erkrankungen (PVOD) und pulmonal-kapilläre Hämangiomatose (PCH)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Γ.1 Idiopathisch</li> <li>Γ.2 Erblisch <ul style="list-style-type: none"> <li>Γ.2.1 EIF2AK4 Mutation</li> <li>Γ.2.2 Andere Mutationen</li> </ul> </li> <li>Γ.3 Medikamenten-, drogen- und strahleninduziert</li> <li>Γ.4 Assoziiert mit <ul style="list-style-type: none"> <li>Γ.4.1 Kollagenosen</li> <li>Γ.4.2 HIV Infektion</li> </ul> </li> </ul> <p>Γ` Persistierende pulmonale Hypertonie bei Neugeborenen</p> <p><b>2. Pulmonale Hypertonie bei Linksherzerkrankungen</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>2.1 systolische Herzinsuffizienz</li> <li>2.2 diastolische Herzinsuffizienz</li> <li>2.3 Klappenerkrankung</li> <li>2.4 Angeboren/ oder erworbene Obstruktion des linken Ein- oder Ausflusstrakts/ angeborene Kardiomyopathie</li> <li>2.5 Angeborene oder erworbene Pulmonalvenenstenose</li> </ul> <p><b>3. Pulmonale Hypertonie bei Lungenerkrankungen und/ oder Hypoxie</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>3.1 chronisch- obstruktive Lungenerkrankungen</li> <li>3.2 Interstitielle Lungenerkrankungen</li> <li>3.3 Andere Lungenkrankheiten mit gemischter Ventilationsstörung</li> <li>3.4 Schlafassoziierte Atmungsstörungen</li> <li>3.5 Alveoläre Hypoventilation</li> <li>3.6 Chronischer Aufenthalt in Höhenlagen</li> <li>3.7 Pulmonale Entwicklungsstörungen</li> </ul> <p><b>4. Chronisch- thromboembolische pulmonale Hypertonie (CTEPH) oder anderweitige Pulmonalarterien-Obstruktion</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>4.1 Chronisch-thromboembolische pulmonale Hypertonie</li> <li>4.2 Anderweitige Obstruktionen der Pulmonalarterie <ul style="list-style-type: none"> <li>4.2.1 Angiosarkom</li> <li>4.2.2 Andere intravaskuläre Tumoren</li> <li>4.2.3 Arteritis</li> <li>4.2.4 Angeborene Pulmonalarterienstenose</li> <li>4.2.5 Parasiten (Hydatidose)</li> </ul> </li> </ul> <p><b>5. Pulmonale Hypertonie bei unklarer oder multifaktorieller Ursache</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>5.1 Hämatologischer Erkrankungen</li> <li>5.2 Systemerkrankungen: Sarkoidose, Langerhanszellgranulomatose, Neurofibromatose, Vaskulitis</li> <li>5.3 Metabolische Erkrankungen Glykogenspeicherkrankheiten, M.Gaucher, Schilddrüsenerkrankungen</li> <li>5.4 Sonstige tumorbedingte Obstruktion, fibrosierende Mediastinitis, chronisches Nierenversagen (mit und ohne Dialyse), segmentale pulmonale Hypertonie</li> </ul>

Tabelle 2 Nomenklatur und Klassifikation der pulmonalen Hypertonie (ERS Guidelines 2015). BMPR2= Bone morphogenic protein receptor 2. EIF2AK4= eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 4. HIV= Human immunodeficiency virus (ERS Guidelines. 2015)

## 2.4 Pathogenese der pulmonalen Hypertonie

Ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Pathomechanismen ist für die Entstehung der pulmonalen Hypertonie verantwortlich. In Gang gesetzt werden diese Abläufe sowohl durch exogene Noxen/Trigger sowie genetische Dispositionen, wie z.B. die BMPR2 und die ALK1 Mutationen.

Die PH ist eine strukturelle Erkrankung des pulmonalen Gefäßsystems, welche durch eine Druckerhöhung charakterisiert ist. Dadurch kommt es zu einer Verengung des Gefäßdurchmessers, der einen erhöhten Widerstand in der Lungenstrombahn erzeugt.

Das histopathologische Korrelat hierzu ist ein sowohl vasokonstriktiver als auch proliferativer Umbau, vor allem der kleinen Lungenarterien, der als Remodelling bezeichnet wird.

Betroffen sind alle drei Gefäßschichten. Die Verdickung von Intima und Media, die zur Verengung des Gefäßlumens führt, ist durch überregulierte Fibroblastenproliferation, Kollagenablagerung und Proliferation der glatten Muskelzellen bedingt. Die Intima kann sowohl konzentrisch, als auch exzentrisch fibrosieren (Tuder et al. 1994).

Auch die Adventitia hypertrophiert durch verstärkten Kollageneinbau und Fibroblastenproliferation. Dies hat zur Folge, dass die Arterien steifer (stiffening) werden und die Compliance des Gefäßes abnimmt. Der pulmonal arterielle Widerstand steigt weiter, es kommt zu mechanischem Stress (shear stress), der schließlich zu einem Endothelschaden führt (Botney 1999).

Die endotheliale Dysfunktion hat eine verstärkte Adhäsivität für Thrombozyten und Granulozyten, eine verminderte antikoagulatorische Fähigkeit und eine verminderte Syntheseleistung vasodilatativer Mediatoren zur Folge (Giaid et al. 1995). Hierdurch ist die flussabhängige Vasodilatation (FMD-flow-mediated vasodilation), die durch das Endothel gewährleistet wird, gestört (Esposito et al. 2006).

Eine verstärkte Bildung der 5-Lipoxygenase, des 5-Lipoxygenase aktivierenden Peptids (FLAP) im Endothel und den anliegenden Makrophagen weist auch auf eine chronische Inflammationsreaktion hin, die vom Endothel ausgeht (Wright et al. 1998).

Price et al. 2012 konnten auch eine verstärkte, perivaskuläre Infiltration durch Makrophagen, dendritische Zellen, T- und B-Lymphozyten bei PH Patienten nachweisen und

erhöhte Serumspiegel von IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  mit einem schlechteren klinischen Verlauf in Verbindung bringen.

Entscheidend für die Vasokonstriktion ist eine Dysbalance zwischen vasokonstriktiven, proliferativen und prothrombotischen Mediatoren auf der einen und vasodilatativen, antiproliferativen Mediatoren auf der anderen Seite. Ob dieses Ungleichgewicht zum Remodelling der Gefäße führt oder selbst eine Folge davon ist, bleibt noch ungeklärt.

Die verminderte Bildung vasodilatativer Mediatoren wie Prostacyclin und NO ist durch eine herabgesetzte Expression der endothelialen Prostacyclinsynthetase (Tuder et al. 1999) und der endothelialen Stickstoffmonooxidsynthetase (eNOS) bedingt (Giaid et al. 1995).

Hingegen ist die Synthese des physiologischen Gegenspielers des Prostacyclins Thromboxan A<sub>2</sub> erhöht (Christman et al. 1992). Auch eine erhöhte Endothelin 1 (ET-1) Konzentration war bei PH Patienten festzustellen (Giaid et al. 1993). Zusätzlich sind auch Wachstumsfaktoren wie PDGF (Platelet derived Growth Factor) erhöht, welche ebenfalls stark vasokonstriktiv (Berk et al. 1986) und proliferativ auf die Gefäße wirken. Die heutigen Therapien der PH, wie Endothelinrezeptor Antagonisten (Bosentan, Ambrisentan, Mazitentan), Phosphodiesterase-5-Hemmer (Sildenafil, Tadalafil), Prostacyclin Analoga (Iloprost, Treprostinil) oder lösliche Guanylatcyclase (sGC) Stimulatoren (Riociguat), sollen dem entstandenen Mediatoren-Ungleichgewicht entgegensteuern.

Neben der Vasokonstriktion ist auch die thrombotische Komponente entscheidend für das Voranschreiten der Krankheit. Dies gilt nicht nur für die CTEPH, sondern auch für andere Formen der PH. Bei IPAH Patienten wurden in-situ Thrombosen vor allem der kleinen Gefäße (Durchmesser < 200 $\mu$ m) festgestellt (Wagenvoort 1970). Auch der prothrombotisch wirksame Plasminogenaktivatorinhibitor 1 ist erhöht (Christ et al. 2001). Dies könnte eine Erklärung dafür sein, weshalb auch PAH Patienten von einer Antikoagulation, z.B. mit Phenprocoumon, profitieren (Rich et al. 1991).

Durch die aktuellen Therapieverfahren zeigt sich zwar kein „reverses Remodelling“ der Gefäße, aber die klinische Symptomatik der Patienten besserte sich und auch das Fortschreiten der Erkrankung wurde verlangsamt (Rosenkranz 2008).

## 2.5 Diagnostik der pulmonalen Hypertonie

Die bereits angesprochenen unspezifischen Symptome, die niedrige Inzidenz und die Fülle an potentiellen Differentialdiagnosen machen die Diagnostikstellung der PH zu einer Herausforderung. Konkrete klinische Hinweise, die eine PH vermuten ließen, sind oft erst bei typischen Zeichen der rechtsventrikulären Dekompensation zu sehen.

Die Diagnostik der PH erfolgt nach einem Stufenschema (Galie et al. 2016). Am Anfang der Diagnostik stehen Anamnese und körperliche Untersuchung gefolgt von unspezifischeren Tests wie EKG, Röntgen-Thorax und Echokardiographie. Besteht der Verdacht auf eine pulmonale Hypertonie, schließen sich weitere Untersuchungen wie Lungenfunktionsprüfung, Ventilations-Perfusions-Szintigraphie oder eine Computertomographie mit Kontrastmittel an. Bestätigt sich hier der Verdacht auf eine PH, erfolgt im letzten Schritt die Diagnosesicherung mittels Rechtsherzkatheteruntersuchung (Galie et al. 2016).

Eine wichtige nichtinvasive Untersuchungsmethode ist die Echokardiographie. Sie ist sowohl im Screening (höchste Sensitivität und Spezifität der nichtinvasiven Methoden) als auch in der Verlaufsbeurteilung der PAH entscheidend (Galie et al. 2016).

Die Vermessung der Herzhöhlen und die Beurteilung der Klappenfunktion geben wichtige Hinweise sowohl auf die Ätiologie (z.B. Linksherzerkrankungen) als auch zur Schwere der Erkrankung. Die Berechnung verschiedener Parameter wie z.B. der systolische pulmonale Druck (SPAP), der tricuspidale Reflux-Jet oder die tricuspidal anular plane systolic excursion (TAPSE) geben bedeutende Aufschlüsse über die Funktion des rechten Herzens.

Goldstandard der PH Diagnostik ist jedoch die Rechtsherzkatheteruntersuchung, die meist mittels Swan-Ganz Katheter über ein großes, venöses Gefäß durchgeführt wird. Sie erlaubt die präzise Messung sämtlicher Druckwerte im rechten Herzen und im Pulmonalisstromgebiet wie den rechtsatrialen Druck, den rechtsventrikulären systolischen bzw. end-diastolischen Druck, den pulmonal arteriellen systolischen, diastolischen und mittleren Druck sowie den pulmonal arteriellen Verschlussdruck (Wedge Pressure) und das Herzzeitvolumen.

Auch die Bestimmung der pulmonal arteriellen und systemischen Sauerstoffsättigung sowie die Berechnung des pulmonal arteriellen Widerstands (PVR) sind von großer Bedeutung um weitere Schlüsse zu ziehen.

Selbstverständlich haben aber auch andere Untersuchungsmethoden wie Bildgebung (HRCT, MRT oder Ventilations-Perfusions Szintigraphie bei der CTEPH), laborchemische Parameter (BNP, NT-proBNP) und Belastungstests (6 Minuten Gehstrecke, Spiroergometrie) ihren Stellenwert. Speziell die Spiroergometrie hat in der Diagnostik bzw. der Differentialdiagnostik der CTEPH eine gesonderte Bedeutung (Held et al. 2014).

## 2.6 Einteilung des Schweregrades

Nach dem Vorbild der NYHA (New York Heart Association) Klassifikation des Schweregrades der Herzinsuffizienz, entschloss man sich auf der Evian WHO-Weltkonferenz 1998 eine an das Krankheitsbild der PH adaptierte Einteilung des funktionellen Schweregrades zu etablieren (siehe Tab. 3). Diese Einteilung ist heute als „modifizierte NYHA Klasse“ oder „WHO Funktionsklasse (WHO FC)“ bekannt (Olschewski 2011) und wurde auf den beiden folgenden Weltkonferenzen der PH ohne Veränderung übernommen. Diese funktionelle Schweregradeinteilung ist neben dem 6-Minuten Gehtest einer der wichtigsten Prognosefaktoren bezüglich der Mortalität und der Therapiewahl von PH Patienten (Badesch et al. 2009).

<b>Klasse 1</b>
Patienten mit pulmonaler Hypertonie ohne Einschränkung der körperlichen Aktivität*. Normale körperliche Belastungen führen nicht zu vermehrter Dyspnoe oder Müdigkeit, thorakalen Schmerzen oder Schwächeanfällen.
<b>Klasse 2</b>
Patienten mit pulmonaler Hypertonie mit einer leichten Einschränkung der körperlichen Aktivität. Keine Beschwerden in Ruhe. Normale körperliche Aktivität führt zu vermehrter Dyspnoe oder Müdigkeit, thorakalen Schmerzen oder Schwächeanfällen.
<b>Klasse 3</b>
Patienten mit pulmonaler Hypertonie mit deutlicher Einschränkung der körperlichen Aktivität. Keine Beschwerden in Ruhe. Bereits leichtere als normale Belastungen führen zu Dyspnoe oder Müdigkeit, thorakalen Schmerzen oder Schwächeanfällen.
<b>Klasse 4</b>
Patienten mit pulmonaler Hypertonie mit Unfähigkeit, irgendwelche körperliche Belastung ohne Beschwerden auszuführen. Zeichen der manifesten Rechtsherzinsuffizienz. Dyspnoe und/oder Müdigkeit können bereits in Ruhe vorhanden sein. Bei geringster Aktivität werden die Beschwerden verstärkt.

Tabelle 3 Funktioneller Schweregrad der pulmonalen Hypertonie. Modifiziert nach NYHA Klassifikation und WHO Konferenz von Evian (Galie et al. 2009). \* steht für Alltagsbelastung, nicht für sportliche Aktivität.

## 2.7 Therapie der PAH

In den 50er Jahren begann man mit den ersten gezielten Behandlungsversuchen der PAH. Aufgrund der Hypothesen Paul Woods, dass der Gefäßumbau Folge der Vasokonstriktion sei (Wood 1958), versuchte man, den pulmonal arteriellen Druck über verschiedene Gruppen von Vasodilatoren (Thromboxanantagonisten, Dihydralazin oder Kaliumkanal-Agonisten) zu senken. Der Krankheitsverlauf konnte hierdurch jedoch nicht positiv beeinflusst werden (Hoeper 2010).

Später zeigte sich, dass ein geringer Teil (<10%) aller Patienten von einer hochdosierten Calciumantagonisten-Therapie profitiert (Sitbon et al. 2005). Diese Patienten, die man als „Responder“ bezeichnet, werden über eine pharmakologische Testung mittels inhalativem NO, intravenösem bzw. inhalativem Prostacyclin (Epoprostenol) oder Adenosin während einer Rechtsherzkatheteruntersuchung erkannt (Gallagher et al. 1998). Patienten, deren pulmonaler Mitteldruck um mindestens 10mmHg sinkt und einen Wert von unter 40mmHg erreicht, kommen für eine Calciumantagonisten-Therapie in Frage.

1980/81 begann man mit der gezielten intravenösen Prostacyclin-Behandlung (Epoprostenol) der PAH (Higenbottam et al. 1984). Diese war primär als Bridging Therapie bis zur Herzlungentransplantation gedacht, die ebenfalls in diesem Zeitraum erstmalig erfolgreich durchgeführt wurde (Reitz et al. 1982). Die Prostacyclin-Therapie war die erste pharmakologische Behandlung, die einen prognostisch günstigen Effekt für die Patienten aufwies (Barst et al. 1996).

Neben Allgemeinmaßnahmen wie Muskeltraining, Infektprophylaxe, oraler Antikoagulation, Langzeitsauerstofftherapie, Diuretika, Digitalis etc. (Galie et al. 2009) gibt es heutzutage neben den Calciumantagonisten vier Stoffklassen mit mehreren Präparaten, die zur gezielten Therapie der PAH zugelassen sind. Diese sind Prostacyclinanaloga, Phosphodiesterase-5-Inhibitoren, Endothelinrezeptorantagonisten und Guanylatzyklase-stimulatoren. Auch eine Kombinationstherapie der unterschiedlichen Wirkstoffklassen ist möglich und sinnvoll (Wilkens et al. 2001; Behr et al. 2005). Neue Daten zeigen, dass eine initiale Kombinationstherapie einen positiven Effekt auf Symptomatik und Prognose der Erkrankung hat. Somit wurde eine initiale Kombinationstherapie in die neuen Leitlinien der Behandlung der PH aufgenommen (Galie et al. 2016).

Patienten mit CTEPH sollten wenn möglich eine chirurgische Therapie mittels pulmonaler Thrombendarteriektomie (PEA) in einem erfahrenen Zentrum erhalten (Archibald et al. 1999). Bei inoperablen Befunden gibt es bisher als zugelassenes Medikament nur Riociguat, ein Stimulator der löslichen Guanylatzyklase (sGC), zur Therapie der CTEPH (Ghofrani et al. 2013).

### **2.7.1 Prostacyclinanaloga**

Die Wirkung von Prostacyclinanaloga beruht teilweise auf dem Ersatz des bestehenden PGI<sub>2</sub>-Mangels der Patienten. PGI<sub>2</sub> setzt den Tonus der glatten Gefäßmuskelzelle stark herab. Vor allem über den G-Protein gekoppelten Prostaglandin I Rezeptor (IP) kommt es zu einer Aktivierung der intrazellulären Adenylatzyklase (AC) und einem damit verbundenen Anstieg des cyclischen Adenosinmonophosphats (cAMP).

Neben der gefäßrelaxierenden Wirkung haben sich auch ein antiproliferativer und anti-thrombotischer Effekt gezeigt (Rosenkranz 2008). Eine frühe antiinflammatorische Komponente wird ebenfalls diskutiert.

Das in den USA seit 1995 zugelassene intravenöse Prostacyclin (Epoprostenol) zeigte einen positiven Einfluss auf das Langzeitüberleben von PAH Patienten (McLaughlin et al. 2002).

Nachteil dieser Therapie ist, dass Prostacyclin über eine permanente, transportable i.v. Pumpe appliziert werden muss und dies septische Komplikationen nach sich ziehen kann. Daneben stehen weitere inhalative und subkutan anwendbare Prostacyclinanaloga zur Verfügung. Die Markteinführung des oral applizierbaren Prostanoid Rezeptoragonisten Selexipag erfolgte in Deutschland im Jahr 2016.

### **2.7.2 Phosphodiesterase 5 Inhibitoren (PDE5I)**

Die Phosphodiesterase 5 Inhibitoren wirken ebenfalls in den pulmonalen, glatten Muskelzellen. Die durch vasodilatative Mediatoren gebildeten second messenger cAMP und cGMP werden enzymatisch durch die Phosphodiesterasen abgebaut und somit in ihrer gefäßrelaxierenden Wirkung begrenzt. Durch die Inhibition der Phosphodiesterase 5

steigt die Konzentration des intrazellulären cGMP's. Ebenfalls wird in geringem Ausmaß die Phosphodiesterase 3 (PDE3) gehemmt und damit steigt auch die Konzentration des cAMP's. Somit kommt es zu einer verstärkten Vasodilatation.

Kontrollierte randomisierte Studien zeigten sowohl für Sildenafil (Galie et al. 2005) als auch für das langwirksamere Tadalafil (Ghofrani et al. 2004) einen signifikanten positiven Effekt auf Hämodynamik und Belastbarkeit.

### **2.7.3 Endothelinrezeptorantagonisten (ERA's)**

Der zirkulierende Endothelinspiegel im pulmonal vaskulären System ist bei Patienten mit einer pulmonalen Hypertonie unterschiedlicher Genese erhöht. Bei Gesunden oder nicht pulmonal vaskulär Erkrankten ist Endothelin kaum nachweisbar (Giaid et al. 1993; Giaid 1998).

Endothelin wirkt vasokonstriktiv, proliferativ und proinflammatorisch auf glatte Muskelzellen und Fibroblasten. Dies legt nahe, die Endothelin Rezeptoren am Endothel und in der glatten Gefäßmuskulatur zu blockieren.

Bosentan, der erste zugelassene ERA, blockiert beide Subtypen des Endothelin Rezeptors (ETA und ETB). Es verlängert die 6 Minuten Gehstrecke der Patienten und verzögert die Zeit bis zu einer klinischen Verschlechterung (Rubin et al. 2002). Ambrisentan, das später zugelassen wurde, blockiert lediglich den ETA Rezeptor, führte jedoch auch zu einer Verbesserung der körperlichen Belastbarkeit und einer Verlangsamung der Krankheitsprogression (Oudiz et al. 2009). Es wurde bisher kein Unterschied bezüglich der Wirksamkeit zwischen beiden festgestellt, allerdings gibt es keine vergleichbaren Studien.

### **2.8 Mikropartikel (MPs)**

MPs sind 0,05-1µm große Abschnürungen der Zellmembran eukaryotischer Zellen, die als Folge verschiedener Stimuli (Apoptose, Inflammation, Aktivierung) freigesetzt werden (Roos et al. 2010).

Trotz ausgiebiger Forschung zu diesem Thema ist der genaue Mechanismus und die Abfolge entscheidender Prozesse wie der Neuverteilung der Phosphatidylserine auf die

Vesikel oder die Veränderung des Zytoskeletts während der Freisetzung der MPs noch nicht genau verstanden (Montoro-García et al. 2011).

MPs sind keine Exosomen. Diese überlappen zwar in ihrer Größe (30-90 nm) mit kleinen MPs, jedoch entstehen sie über mehrere endozytotische Prozesse in der Zelle und haben auch einen geringeren Proteinanteil als MPs (Roos et al. 2010).

Eine Größeneinteilung ist sinnvoll, denn MPs, die größer als 1µm sind, wären leicht mit apoptotischen Zellkörpern und Thrombozyten zu verwechseln.

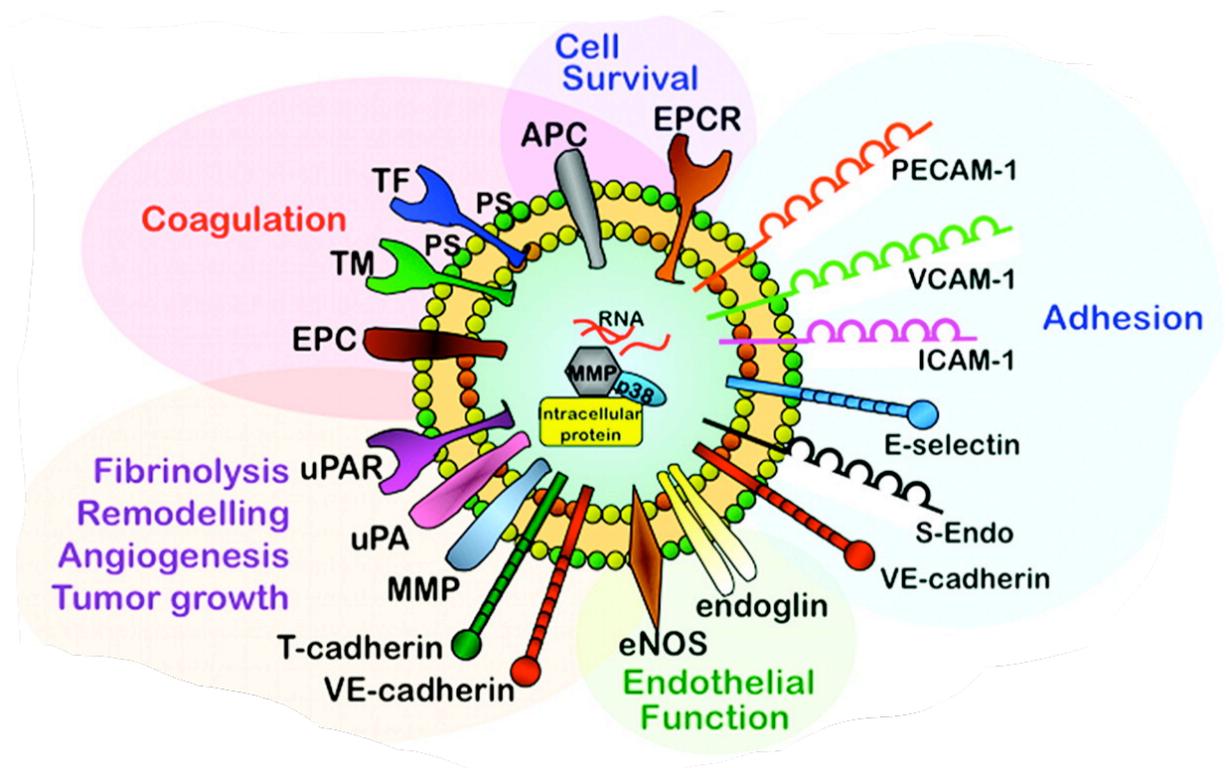


Abbildung 1 Schematische Darstellung eines MPs und seiner Oberflächenantigene. Autorisierte Freigabe durch den Autor (Dignat-George, et al. 2011)

Früher hat man all diesen kleineren Teilchen keine Bedeutung beigemessen und sie als Zelldedritus abgetan (Boulanger 2011). Jedoch weiß man heute, dass sie bei verschiedenen Prozessen eine wichtige Funktion haben.

Die Hülle der MPs, die sie von der Außenwelt abgrenzt, besteht aus Phospholipiden. An ihrer Oberfläche tragen sie Proteine, die auf ihre zelluläre Herkunft Hinweise geben (Gelderman et al. 2008). Typische Ursprungszellen von MPs sind Endothelzellen, Leukozyten, Thrombozyten und Erythrozyten.

Die Zusammensetzung der einzelnen MPs, ihre Funktion und ihr biologischer Effekt werden durch ihre Abstammungszelle und den Stimulus, der zu ihrer Freisetzung führte, bestimmt (Amabile et al. 2013).

Einen schematischen Überblick hierzu gibt Abbildung 1.

MPs spielen bei der interzellulären Kommunikation sowohl parakrin als auch endokrin eine Rolle und sind somit entscheidend an der Homöostase des Organismus beteiligt. Neuere Studien zeigen, dass MPs sogar am Transport von Molekülen z.B. Cytokinen, Caspasen, Adhäsionsrezeptoren und miRNA zwischen verschiedenen Zellen beteiligt sind (Morel et al. 2009).

Das Standardverfahren zum Nachweis der MPs ist die Durchflusszytometrie (FACS). Mittels Fluoreszenz markierten Antikörpern, die an spezifische Antigene an der Oberfläche binden, kann die Herkunft der MPs bestimmt werden. Somit sind mittels FACS nicht nur MPs zu quantifizieren und Aussagen zu ihrer Größe zu treffen, sondern auch Angaben zu ihrer zellulären Herkunft und folglich auch zu ihrer Funktion zu machen.

Ein anderes vielversprechendes Verfahren zum Nachweis von MPs ist der enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA) (Osumi et al. 2001). Direkte Vergleiche beider Methoden könnten interessante Erkenntnisse über Vor- und Nachteile dieser Verfahren liefern.

MPs werden im Blut von gesunden Menschen gefunden. Man hat jedoch bei verschiedensten Erkrankungen einen Anstieg ihres Plasmaspiegels beobachtet. Diese Beobachtung legte den Verdacht nahe, dass MPs vielleicht bei der Krankheitsentstehung eine wichtige Rolle spielen könnten.

### **2.8.1 MPs als Krankheitsindikatoren?**

Bei unterschiedlichsten Krankheitsbildern zeigten sich erhöhte Level von MPs. Dazu gehörten infektiöse Erkrankungen wie Malaria oder Sepsis, Krankheiten aus dem rheumatoiden Formenkreis wie Poly- und Dermatomyositis, hämatologische Erkrankungen wie die disseminierte intravasale Gerinnung (DIC) oder die thrombotisch thrombozytopenische Purpura (TTP) (Roos et al. 2010).

Ein Großteil des Wissens, das man heute über MPs und ihre Rolle bei der Entstehung von Krankheiten besitzt, stammt aus der Forschung zu kardiovaskulären bzw. Erkrankungen atherosklerotischer Genese (Amabile et al. 2013).

Erhöhte Plasmaspiegel von verschiedenen endothelialen MP-Untergruppen konnten bei Patienten mit ischämischem Schlaganfall nachgewiesen werden, die auch mit dem Ausmaß der damit verbundenen Hirnläsion korrelierten (Simak et al. 2006).

In Bezug auf die koronare Herzkrankheit (KHK) stellten sich sowohl endotheliale als auch apoptotische MP's als unabhängige Risikofaktoren bei Patienten mit einer stabilen KHK dar (Werner et al. 2006).

Bei dem Versuch, einem möglichen Zusammenhang zwischen endothelialer Dysfunktion und erhöhten Plasmaspiegeln endothelialer Mikropartikel (EMPs) nachzugehen, fand man sowohl bei übergewichtigen Frauen als auch bei Patienten mit Nierenversagen im Endstadium eine positive Korrelation zwischen den MP-Plasmaspiegeln und dem Ausmaß der Einschränkung der endothelialen Funktion in Form der flow mediated Dilation (FMD) (Esposito et al. 2006; Amabile et al. 2005).

All diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass MPs sich schädlich auf den Organismus auswirken. Jedoch haben einige in vitro Studien gezeigt, dass vor allem EMPs, die endotheliale Integrität wahren, an vaskulären Reparaturvorgängen teilhaben, zytoprotektiv wirken und zu einem geregelten Zelltod beitragen (Dignat-George 2011).

### **2.8.2 Pathogenetische Rolle von MPs bei pulmonaler Hypertonie**

In verschiedenen Studien zur pulmonalen Hypertonie zeigten sich ebenfalls erhöhte Plasmaspiegel unterschiedlicher MP-Subpopulationen (endothelial, thrombozytär, leukozytär), die einen Zusammenhang dieser „kleinen Teilchen“ mit der bis heute noch nicht vollständig verstandenen Pathogenese dieser Erkrankung nahelegen.

Sowohl in vivo als auch in vitro Experimente zeigten, dass MPs eine wichtige modulierende Funktion bei der endothelialen Funktion (v.a. die Vasodilatation) haben. MPs greifen aktiv in die Gerinnungskaskaden ein, modulieren inflammatorische Reaktionen und beeinflussen die Neoangiogenese bzw. Gefäßproliferation (Amabile et al. 2013).

Diese pathogenetischen Mechanismen sind essentielle Bestandteile der Entstehung sowie der weiteren Entwicklung und Festigung der PH.

Die Inflammation hat sich als ein wichtiger Faktor in der Pathogenese der PH beim Menschen gezeigt. Histologisch zeigte sich bei PAH Patienten verstärkte vaskuläre Infiltration von Makrophagen, T- und B-Lymphozyten und Mastzellen. Auch proinflammatorische Marker wie z.B IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  waren erhöht (Price et al 2012).

MPs sind hierfür ein wichtiger Trigger. Sie stimulieren die Freisetzung entzündlicher Mediatoren wie IL-1 $\beta$ , IL-6 und CCL2. Außerdem vermitteln MPs die Expression von VCAM-1, ICAM-1 und E-Selectin, die zu einer Adhäsionsreaktion am Endothel führen und somit die Infiltration von Entzündungszellen im Endothel propagieren (MacKenzie et al. 2001; Rautou et al. 2011; Vince et al. 2009). Endotheliale MPs sind daher in der Lage, in der Lunge eine inflammatorische Kaskade von pathophysiologischer Relevanz zu unterhalten (Densmore et al. 2006). Diese und weitere Ergebnisse unterstützen die These, dass MPs Trigger der inflammatorischen Komponente der PH sind (Amabile et al. 2013)

Eine weitere wichtige Komponente der PH Pathogenese ist die verstärkte Gerinnungsneigung und die damit verbundenen in situ Thrombosen (Bjornsson et al. 1985).

PH Patienten haben erhöhte Plasmaspiegel von von Willebrand Faktor (vWF) und Fibrinpeptiden (Johnson et al. 2006). Auch Tissue Factor (TF), ein potenter Initiator der Gerinnungskaskade, ist bei ihnen hochreguliert (White et al. 2007).

MPs können auf verschiedene Weise in das menschliche Gerinnungssystem eingreifen. Über die Präsentation von Phospholipiden bilden sich prothrombotische Komplexe mit Faktor VIIIa oder Faktor X und greifen somit in die Thrombinaktivierung ein. Auch die Präsentation weiterer Antigene an der Oberfläche wie TF, GPIIb/IIIa, GPIb, Thromboxan A<sub>2</sub> oder vWF kann eine prokoagulatorische Antwort hervorrufen (Morel et al. 2006).

Für sämtliche MP-Subtypen, thrombozytäre (PMP), endotheliale (EMP) und leukozytäre (LMP) wurde eine prothrombotische Wirkung nachgewiesen (Müller et al. 2003; Combes et al. 1999; Satta et al. 1994).

Das Ungleichgewicht zwischen vasodilatativen und vasokonstriktiven Mediatoren wird ebenfalls durch MPs beeinflusst, da diese zu einer Herabsetzung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) führen und somit der Gefäßtonus in der pulmonalen Strombahn erhöht ist (Dignat-George 2011 ; Tual-Chalot et al. 2010).

Auch die Tatsache, dass Patienten unter einer Epoprostenol-Therapie niedrigere PMP und LMP Plasmaspiegel erreichen (Tamburrelli et al. 2011), scheint den Verdacht zu

erhärten, dass MPs eine Rolle bei der Pathogenese der PH einnehmen und vielleicht nicht nur als Marker oder Prognosefaktor, sondern auch als potentieller Therapiemonitor dienen könnten.

Tabelle 4 gibt einen Überblick über die Funktion einzelner Oberflächenantigene verschiedener MP-Populationen, die bei der PH-Pathogenese eine Rolle spielen könnten.

<b>Funktionen der MPs</b>	<b>Zuständige Oberflächenantigene</b>
<b>Gerinnung</b>	Aktiviertes Protein C (APC) Tissue Factor (TF) Thrombomodulin (TM) Endotheliales Protein C (EPC)
<b>Fibrinolyse</b>	Urokinase-Plasminogen-Aktivator-Rezeptor (uPAR) Urokinase-Plasminogen-Aktivator (uPA)
<b>Angiogenese, Remodelling, Tumorwachstum</b>	Matrix Metalloproteinase (MMP) Vascular Endothelial Cadherin (VE-Cadherin)
<b>Endothelfunktion</b>	Endotheliale NO-Synthase (eNOS) Endoglin
<b>Adhesion</b>	Platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1) Vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) Endothelial Selectin (E-Selectin)

Tabelle 4 Funktion verschiedener EMP-Oberflächenantigene (nach Dignat-George 2011)

### 2.8.3 Endotheliale Mikropartikel bei PH

Unter den verschiedenen Subtypen der MPs scheinen EMPs besonders stark mit der PH-Pathogenese verbunden zu sein. EMPs sind in sich wieder eine sehr heterogene Gruppe. Die verschiedenen MPs zeichnen sich durch unterschiedliche Oberflächenantigene mit daraus resultierenden verschiedenen Funktionen aus (siehe Abb. 3). EMPs sind an allen vorher im Detail beschriebenen pathogenetischen Mechanismen (Inflammation, veränderte vasodilatative/vasokonstriktive Mediatorenbalance, Thromboseneigung und unkontrollierte Endothelproliferation) beteiligt, die zur Entstehung und zur weiteren Entwicklung der PH führen.

Paradoxerweise übernehmen sie auch positive Funktionen im vaskulären System: sie verlängern das Überleben endothelialer Zellen, regulieren die Apoptose, oder sie führen

durch verstärkte Expression von aktiviertem Protein C (APC) bei Sepsis zu einer verringerten Thromboseneigung (Abid Hussein et al. 2007; Morel et al. 2009). Die richtige Balance von EMPs scheint also für die vaskuläre Homöostase von großer Bedeutung zu sein.

In vitro-Versuche haben verschiedene Trigger entdeckt, die zur Bildung und Freisetzung von EMPs führen. Darunter sind TNF- $\alpha$ , verschiedene inflammatorische Zytokine, Thrombin, Plasminogen-Aktivator-Inhibitor (PAI), bakterielle Lipopolysaccharide oder C-reaktives Protein (CRP) (Dignat-George et al. 2011). Der genaue Mechanismus, der zur Freisetzung der EMPs führt, ist bisher aber nur teilweise verstanden.

Diese Arbeit beschäftigt sich schwerpunktmäßig mit endothelialen Microparticles (EMPs) und deren Funktion in der Pathogenese der pulmonalen Hypertonie.

Wir wissen, dass die endotheliale Dysfunktion entscheidend an den Umbauprozessen beteiligt ist, die in der pulmonalen Strombahn stattfinden. Scheinbar spielen EMPs hierbei eine Schlüsselrolle, da hohe EMP Spiegel im Plasma mit einer niedrigen FMD einhergehen (Amabile et al. 2005; Werner et al. 2006).

Einige Studien konnten interessante Zusammenhänge zwischen EMPs und klinischen Daten wie Prognose oder Schweregrad der pulmonalen Hypertonie herstellen.

Amabile et al. zeigten z.B., dass EMPs (CD31<sup>+</sup>/ CD41<sup>-</sup> und CD 144<sup>+</sup>) mit dem hämodynamischer Schweregrad der PH korrelierten (Amabile et al. 2008).

Erhöhte Plasmaspiegel von E-Selectin<sup>+</sup> (CD62e<sup>+</sup>) EMPs könnten sogar als prognostischer Faktor für das Überleben bei PH eingesetzt werden, hohe CD62E<sup>+</sup> MP-Level waren mit einer kürzeren Überlebenszeit der Patienten assoziiert (Amabile et al. 2009).

Es besteht also ein begründeter Verdacht, dass es eine Verbindung zwischen EMPs und der PH gibt. Zusammenhänge und Mechanismen sind bisher nur unzureichend geklärt.

## **2.9 Ziel der Arbeit**

Ziel dieser Arbeit ist es, weitere Zusammenhänge zwischen endothelialen MPs und verschiedenen Formen der PH herauszuarbeiten. Dazu wurde vor allem die Bedeutung pulmonaler EMPs untersucht. Es wurde der Versuch unternommen, pulmonale EMPs zu detektieren und Zusammenhänge zwischen verschiedenen EMP Populationen und klinischen Parametern der PH Patienten herauszuarbeiten. Folgende Fragestellungen wurden bearbeitet:

1) Bestehen funktionelle Unterschiede zwischen pulmonalen und peripheren EMPs? Um pulmonale EMPs von peripheren EMPs zu unterscheiden, wurde die Expression von ACE (CD143<sup>+</sup>) auf der Oberfläche der EMPs pulmonalen Ursprungs als Marker eingeführt.

ACE (Angiotensin converting enzyme) wird vom Endothel in mehreren Organen produziert, jedoch verstärkt vom pulmonal-vaskulärem Endothel (Schuster et al. 1996). Es hat eine tragende Rolle im RAAS-System, wo es vor allem über den Gefäßtonus die Blutdruckregulation mitbestimmt, es spielt jedoch auch eine Rolle beim vaskulären und kardialen Remodelling.

Sowohl in einigen Tierversuchen mit Ratten als auch bei Menschen mit beginnendem Lungenemphysem hat sich ACE als guter Marker für das pulmonal vaskuläre Endothel erwiesen (Balyasnikova et al. 2005; Gordon et al. 2011).

2) Neben der gesonderten Betrachtung des vaskulären Ursprungs der EMPs wurde nach Konzentrationsunterschieden verschiedener MP Populationen zwischen gesunden Probanden und PH Patienten gesucht.

3) Zusätzlich wurde der Frage nachgegangen, ob eine unterschiedliche Pathogenese der Erkrankung (PAH vs. CTEPH) die MP-Zusammensetzung bzw. Konzentration beeinflusst.

Um gegebenenfalls MPs in der Zukunft als Screening-, Prognose- oder Therapieerfolgs-Marker bei PH zu etablieren, wurden Zusammenhänge mit klinischen Parametern der Patienten geprüft.

### 3. Material und Methodik

Die Messung verschiedener MPs erfolgte aus venösen Blutproben von PAH-, CTEPH-Patienten und gesunden Kontrollprobanden. In diesem Kapitel wird die Methodik der Studie beschrieben.

#### 3.1 Geräte und Material

Folgende Geräte und Materialien wurden in der Studie verwendet:

##### 3.1.1 Geräte

Produkt	Hersteller	Ort
<b>FACS CantoII</b>	BD Biosciences	San Jose, USA
<b>Computer Z200 Workstation- BD FACSDiva Software</b>	Hewlett Packard	Bad Homburg, Deutschland
<b>CASY® TT Innovatis</b>	Schärfe Systems	Reutlingen, Deutschland
<b>Schüttler MS2 Minishaker</b>	IKA	Staufen, Deutschland
<b>Schüttler VF2</b>	IKA	Staufen, Deutschland
<b>Kühlschrank Gastroline 4°C</b>	Liebherr	Ochsenhausen, Deutschland
<b>Gefrierschrank -20°C</b>	Liebherr	Ochsenhausen, Deutschland
<b>Gefrierschrank-20°C IMV</b>	Liebherr	Ochsenhausen, Deutschland
<b>Pipette Gilson Pipetman 0,5-10µl 20-200µl 200-1000µl</b>	Gilson	Villiers-le-Bel, Frankreich
<b>Pipette Eppendorf Research 2-20µl 20-200µl 100-1000µl</b>	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
<b>Pipette Eppendorf Transfer 2-20µl 100-1000µl</b>	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
<b>Transfer Pipette IM V</b>	Eppendorf	Hamburg, Germany
<b>Zentrifuge Rotixa/P</b>	Hettich	Tuttlingen, Deutschland
<b>Zentrifuge Fresco 21</b>	Heraeus	Hanau, Deutschland
<b>Waage ALS 120-4</b>	Kern	Balingen, Deutschland
<b>PH Messgerät Inolab ph720</b>	WTW	Weilheim, Deutschland
<b>Ultraschall-Bad Sonorex RK52 H</b>	Bandelin	Berlin, Deutschland

Tabelle 5 Auflistung der verwendeten Geräte

### 3.1.2 Verbrauchsmaterial

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ort</b>
<b>Falcon 5ml Polystyrene Sterile Round Bottom Tubes (12-75mm)</b>	BD, Biosciences	Heidelberg, Deutschland
<b>Cryotube Vials 1,8ml</b>	Nunc	Roskilde, Dänemark
<b>Casy®-Probenröhrchen</b>	Schärfe Systems	Reutlingen, Deutschland
<b>Reagiergefäß PP 0,5ml 1,5ml 2ml</b>	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
<b>Pipettenspitzen-D1000 Diamond 100-1000µl</b>	Gilson	Villiers-le-Bel, Frankreich
<b>Pipettenspitzen-D200 Diamond 2-200µl</b>	Gilson	Villiers-le-Bel, Frankreich
<b>Pipettenspitzen-DL10 Diamond 0,1-20µl</b>	Gilson	Villiers-le-Bel, Frankreich
<b>Pipettenspitzen Microguard Barriertips 10µl</b>	Sorenson	Salt Lake City, USA
<b>Pipettenspitzen Eppendorf</b>	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
<b>S-Monovette 7,5ml</b>	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
<b>21G Safety-Multifly®</b>	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
<b>Rotilabo® steriler 0,2µm Spritzenfilter</b>	Roth	Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 6 Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien

### 3.1.3 Antikörper und Calibration Beads

Folgende primäre Antikörper wurden eingesetzt:

Art	Isotyp	Fluoreszenz-Farbstoff	Hersteller	Ort
<b>CD31 (PECAM-1)</b>	Mouse IgG1	Pacific Blue	Exbio	Prag, Tschechische Republik
<b>CD41 (GPIIb)</b>	Mouse IgG1	Alexa Fluor	Exbio	Prag, Tschechische Republik
<b>Anti-human E-Selectin (CD62E) /P-Selectin (CD62P)</b>	Mouse IgG1	Allophycocyanin (APC)	R&D	Minneapolis, USA
<b>Human-lung (CD143) (Angiotensin-converting enzyme)</b>	Mouse IgG1	FITC	Acris	San Diego, USA
<b>Annexin V</b>		Allophycocyanin (APC)	BD Pharmingen	San Jose, USA

Tabelle 7 Auflistung der verwendeten Erstantikörper

Diese sekundären Antikörper wurden verwendet:

Art	Isotyp	Konzentration	Hersteller	Ort
<b>Purified Rat Anti-Mouse CD16/CD32 (Mouse BD Fc Block)</b>	Rat IgG2b $\kappa$	0,5 mg/ml	BD Pharmingen	San Jose, USA

Tabelle 8 Auflistung der verwendeten Zweitantikörper.

Zur Eichung wurden folgende Partikel (Calibration Beads) eingesetzt:

<b>Art</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ort</b>
<b>Flow Cytometry Size Calibration Kit (F-13838) 1µm,2µm,4µm,6µm,10µm,15µm- Diameter Polystyrene Micropheres</b>	Molecular Probes	Leiden, Niederlande

Tabelle 9 Auflistung der verwendeten Eichungspartikel (Calibration Beads)

### 3.1.4 Chemikalien und Lösungen

Folgende Chemikalien wurden verwendet:

<b>Produkt</b>	<b>Stoffmengen/Konzentration</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ort</b>
<b>HEPES</b>	10mM	Roth	Karlsruhe, Deutschland
<b>NaCl</b>	140mM	Roth	Karlsruhe, Deutschland
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	2,5mM	Merck	Darmstadt, Deutschland
<b>NaOH</b>	0,1mmol/l	Roth	Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 10 Auflistung der verwendeten Chemikalien

Diese Lösungen kamen zum Einsatz:

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ort</b>
<b>FACS Flow</b>	BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland
<b>FACS Clean</b>	BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland
<b>FACS Shut Down Solution</b>	BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland
<b>CASY@ton</b>	Schärfe Systems	Reutlingen, Deutschland
<b>Aqua bidest</b>	Eigenherstellung	Homburg Saar, Deutschland

Tabelle 11 Auflistung der verwendeten Lösungen

## **3.2 Probenmaterial**

### **3.2.1 Gewinnung und Weiterverarbeitung der Blutproben**

Bei allen Probanden wurde eine peripher venöse Blutprobe, meist aus einer kubitalen Armvene, entnommen. Hierzu wurde eine 21G Nadel (Safety-Multifly® Sarstedt, Nümbrecht) und eine Standard-Serum-Monovette (Sarstedt S-Monovette, 7,5 ml) verwendet. Diese Probenbehälter (Sarstedt S-Monovette 7,5 ml) wurden zuvor mit 1 ml CTAD (Citrat, Theophyllin, Adenosin, Dipyridamol) Lösung befüllt. Die hierfür verwendeten Konzentrationen des CTAD Ansatzes betragen: Citrat 109 mmol/l, Theophyllin 15mmol/l, Adenosin 3,7mmol/l und Dipyridamol 0,198mmol/l (Contant et al. 1983). Nach der Blutentnahme wurden die Proben sofort bei ca. 4°C gekühlt und kurz darauf zentrifugiert. Die Zentrifugation (Hettich Rotixa/P) der Proben erfolgte bei 2°C und 1800 g über einen Zeitraum von 20 Minuten.

Im Anschluss daran wurde der Serumüberstand mittels einer Transferpipette (100-1000µl, Eppendorf) in Polypropylen Cryotubes (Nunc Cryotube Vials, 1,8 ml No Ref:347627) gefüllt. Diese wurden unmittelbar danach bei -20°C tiefgefroren.

### **3.2.2 Antikoagulation der Proben mit CTAD**

Blutproben müssen für die weitere Analyse im Labor einer Antikoagulation unterzogen werden, um eine ex-vivo Gerinnung und Klümpchenbildung (Clotting) zu verhindern. Hierzu werden üblicherweise Stoffe wie EDTA (Ethyldiamintetraesigsäure) oder Citrat verwendet, die über eine Komplexbildung mit freiem  $\text{Ca}^{2+}$  in die Gerinnungskaskade eingreifen.

In dieser Studie fiel die Wahl auf CTAD (Citrat, Theophyllin, Adenosin, Dipyridamol). CTAD wurde speziell für die Analyse von PPP (Platelet poor Plasma) entwickelt, da es auf die wechselseitigen Effekte zwischen den Plättchen einwirkt und speziell die Aktivierung der Thrombozyten inhibiert (Yokota et al. 2003). Theophyllin und Dipyridamol hemmen die cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) Phosphodiesterase und Adenosin seinerseits stimuliert die membranständige Adenylatcyclase. Dies führt zu einem Anstieg des zellulären cAMPs und einer damit verbundenen Hemmung der  $\text{Ca}^{2+}$  vermittelten Plättchenaktivierung (Macey et al. 2003).

Bei den meisten Studien zu MPs wurde Citrat zur Gerinnungshemmung verwendet. In einer Studie, die Citrat-Blut und eine Kombination aus EDTA- und CTAD-Blut verglich, zeigte sich anfänglich kein signifikanter Unterschied zwischen Anzahl und Herkunft der MPs. Nach 180min bei Raumtemperatur veränderten sich jedoch die PMP Level in vitro signifikant in beiden Proben. Wurden die antikoagulierten Blutproben jedoch bei 4°C für 180min aufbewahrt, so blieben die MP-Spiegel in den EDTA + CTAD Proben konstant, während sie sich bei den Citrat Proben deutlich veränderten (Macey et al. 2003).

### **3.2.3 Thrombozytenarmes Plasma (PPP)**

Die antikoagulierten Vollblutproben wurden anschließend mittels Zentrifugation (1800g, 20min Hettich Rotixa/P) zu PPP weiterverarbeitet. Dieser Schritt entfernt Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten aus den Proben. Dies soll mögliche Störungen der durchflusszytometrischen Analyse der Proben minimieren. Hierzu zählen neu entstandene Zellabschnürungen aus den Blutzellen, Zellfragmente, die beim Zerfall der Blutzellen entstehen können oder Messinterferenzen, die durch größere Zellen verursacht werden (Chandler 2013).

Auch ungebundene Antikörper im Plasma, die die Analyse der MPs beeinträchtigen könnten, werden durch die Hoch-Geschwindigkeits-Zentrifugation entfernt (Chandler 2013). Unmittelbar vor der Antikörperfärbung und der Messung im FACS fand noch eine zweite Zentrifugierung (5000g bei 4°C für 5min) der Proben statt und somit eine Weiterverarbeitung zu thrombozytenfreien Plasma (PFP).

## **3.3 Grundlagen der Durchflusszytometrie (FACS - Fluorescence activated cell sorting)**

Das Prinzip des FACS (Fluorescence-activated cell sorting) basiert darauf, dass eine Zellsuspension über einen feinen Kanal in laminarem Fluss durch eine Messküvette geführt wird. Hier trifft ein fokussierter Laserstrahl auf die Zellen/Partikel. Das hierbei entstandene Streulicht wird von verschiedenen Detektoren eingefangen und in ein quantitatives Signal übersetzt.

Das in einem flachen Brechungswinkel entstandene Vorwärtsstreulicht (FSC-Forward Scatter) ist ein Maß für Größe und Volumen der Zellen. Die seitliche Lichtstreuung (SSC-Side Scatter), die aus einem 90° Brechungswinkel des Lichts mit der Zelle hervorgeht, korreliert mit der Granularität, der Größe des Zellkerns und der Anzahl der Vesikel in einer Zelle.

Somit ist es möglich, verschiedene Zellpopulationen gut voneinander abzugrenzen. Über die große Anzahl an Zellen, die in kurzer Zeit analysiert werden (>1000/sec), erhält man schnell ein repräsentatives Ergebnis.

Um mehr Informationen über die Zellen zu gewinnen, kann zusätzlich noch eine Fluoreszenz-Färbung der Zellsuspension vorgenommen werden. Hierzu werden meist Fluoreszenzfarbstoff-markierte Antikörper verwendet. Diese richten sich gegen spezifische Oberflächenantigene der Zellen, an die sie binden. Zusätzlich zum vorwärts und seitwärts gerichteten Streulicht gibt es nun auch ein Fluoreszenz Signal, das ebenfalls von geeigneten Detektoren eingefangen wird. Über den Einsatz verschiedenfarbiger Laser und mehrerer Antikörper mit diversen Fluoreszenzfarbstoffen ist es möglich, verschiedene Subpopulationen nach ihren Oberflächeneigenschaften voneinander abzugrenzen. Die Ergebnisse der Analyse werden dann in einem Koordinatensystem mit x- und y-Achse als Dot Plots dargestellt. Jeder Punkt (dot) im Koordinatensystem repräsentiert eine Zelle bzw. einen Partikel.

### **3.4 Vorversuche – Erstellung des Versuchsprotokolls**

#### **3.4.1 Messung von MPs**

Die Messung von MPs mittels Durchfluszytometrie ist eine empfindliche Methode, deren Ergebnisse stark durch die Verarbeitung der Proben und ihrer Aufbewahrung beeinflusst wird (Shah et al. 2008). Daher ist eine genaue Standardisierung des Messprotokolls unabdinglich.

Size Calibration Beads dienen der Größenorientierung und somit dem Finden der MPs. Das Gate, in dem die MPs analysiert wurden, lag im Bereich von einem  $1\mu\text{m}$ . Die folgende Abbildung zeigt die Signale der einzelnen Beads:

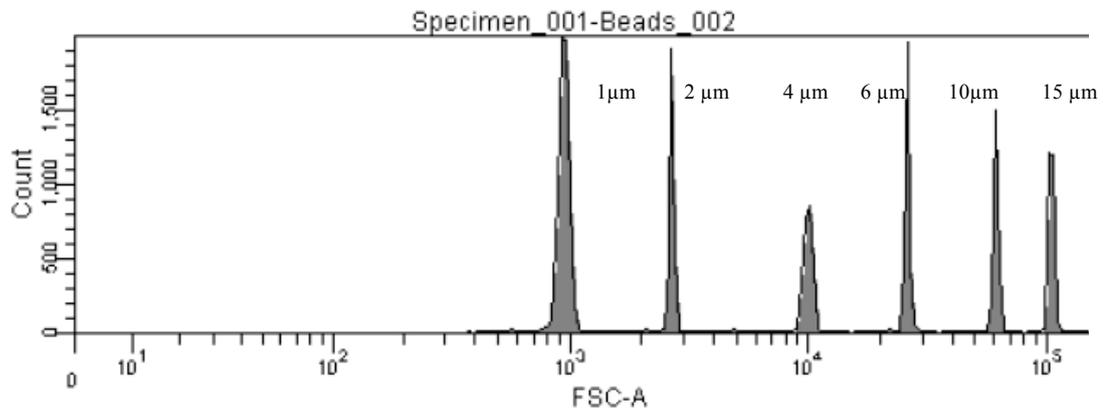


Abb. 2 FACS: Signale der Size Calibration Beads: Der Spike im Bereich  $10^3$  ist das Signal der  $1,0\mu\text{m}$  Beads.

Die in einigen Versuchen von uns verwendeten Latex Beads konnten keine vergleichbar klaren Signale und Ergebnisse erbringen.

Die Mesungen wurden mit einer langsamen Flowrate durchgeführt, welche vom Hersteller mit einem Fluss von  $10\mu\text{l}/\text{min}$  angegeben wurde. Um genau zu wissen, wie viel Probenmaterial bei jeder Messung aufgenommen wurde, wurden sowohl die leeren Falcons, die befüllten Falcons und schließlich auch die Falcons nach der Messung gewogen, um die genaue Menge der entnommenen Probe zu bestimmen.

Messungen mit höheren Flußraten (z.B.  $60\mu\text{l}/\text{min}$  oder  $120\mu\text{l}/\text{min}$ ) ergaben zu viele events (evts.) in kürzester Zeit und führten zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen. Es wurde daher eine Flowrate von  $10\mu\text{l}/\text{min}$  eingestellt.

### 3.4.2 Verarbeitung der Proben

Als Probenmaterial für die Messungen wurde PFP verwendet, das mittels CTAD anti-koagulierte wurde. Einige Vorversuche wurden mittels reiner Citrat-Antikoagulation durchgeführt. Die Entscheidung fiel jedoch zu Gunsten der CTAD-Methode aus, da

diese bei längerer Lagerung der Proben zu konstanteren Ergebnissen führt (Macey et al. 2003).

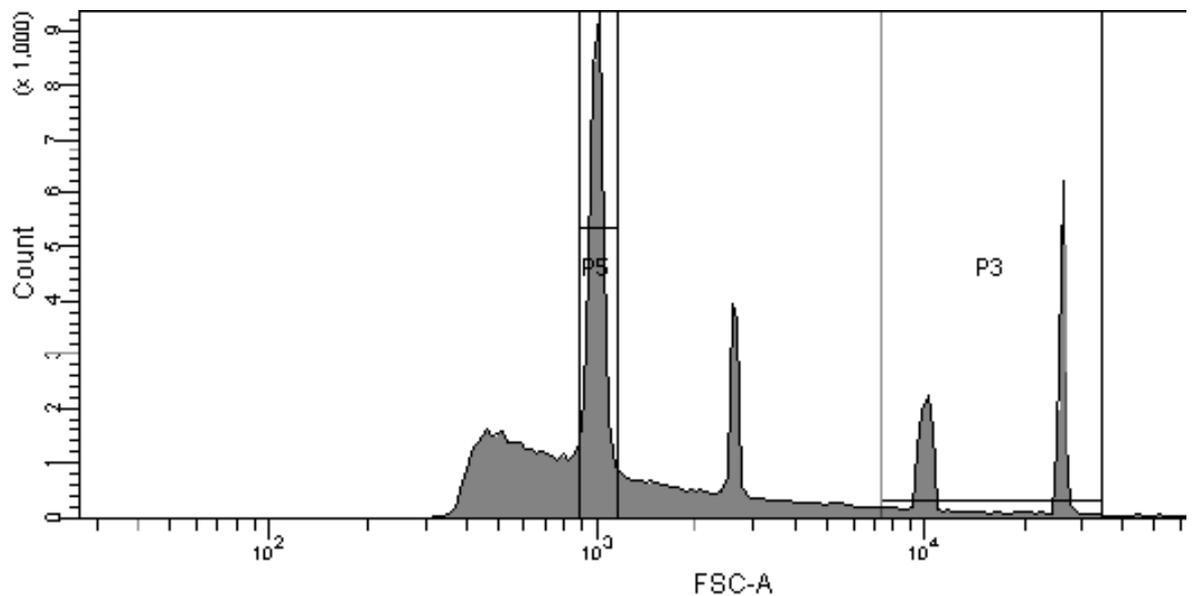


Abb. 3 FACS: Freeze-Thaw Cycle. Probe FMD 09 bei einmaligem Auftauen. Das Gate P5 liegt im Bereich  $1\mu\text{m}$ . In diesem Bereich ist die Mehrzahl der MPs zu finden.

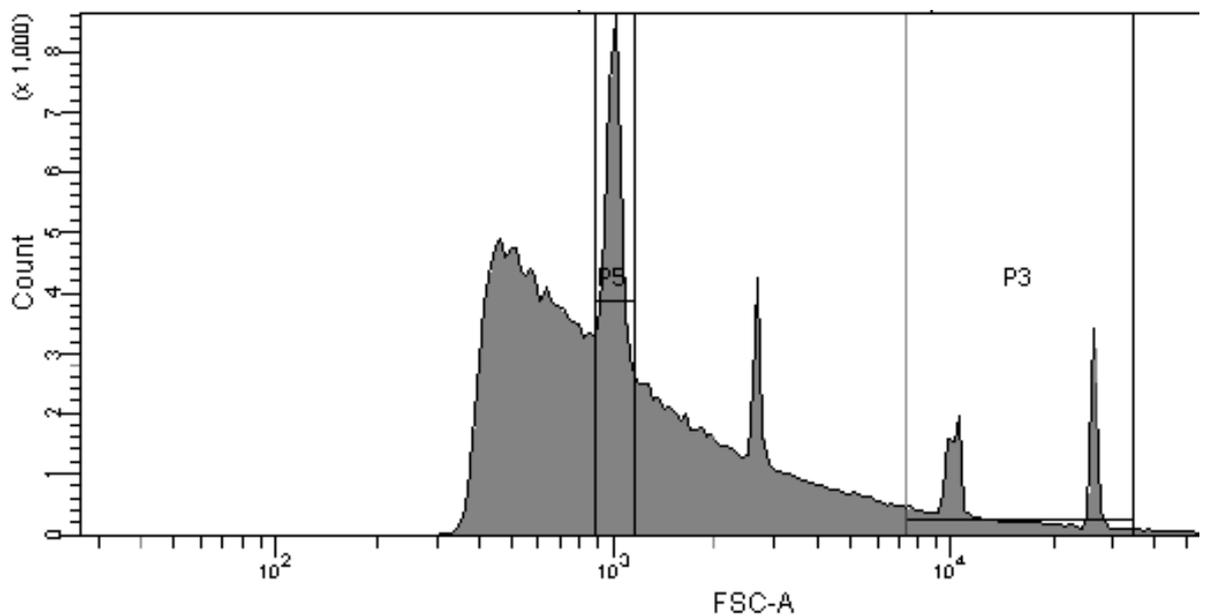


Abb. 4 FACS: Freeze-Thaw Cycle II. Probe FMD09 nach mehrfachem Auftauen und Einfrieren. Es zeigt sich, dass nun deutlich mehr Signale im Bereich um P5 zu finden sind.

Mehrfaches Auftauen und Einfrieren der Proben kann die Ergebnisse der MP-Messung deutlich verändern (Chandler 2013). Dies zeigte sich auch bei den hier durchgeführten

Freeze-Thaw-Cycles, sodass bei den endgültigen Messungen nur Proben verwendet wurden, die noch keinen Auftauprozess durchlaufen hatten. Abb. 3 und Abb. 4 zeigen, wie sich die MP-Konzentration im Bereich der Population P5 nach mehrfachem Auftauen verändert hat.

Auch die Zentrifugation der Plasma-Proben spielt eine entscheidende Rolle bei der Messung der MP-Level. Verschiedene Zentrifugationszeiten und -stärken führen zu unterschiedlichen Ergebnissen und beeinflussen die verschiedenen MP-Populationen entscheidend (Chandler 2013). Deshalb wurden ebenfalls Zentrifugationsreihen mit verschiedenen Beschleunigungen (20000g und 5000g) durchgeführt, bei denen die Ergebnisse unterschiedlich ausfielen.

Abbildungen 5 und Abbildung 6 zeigen stellvertretend die deutlichen Unterschiede in der MP-Konzentration bei verschiedenen Zentrifugationsgeschwindigkeiten:

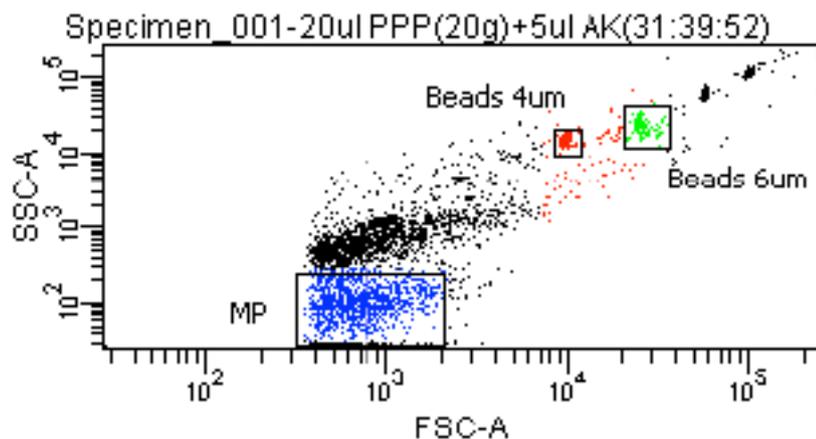


Abb. 5 FACS: Zentrifugationsreihe 20000g. Die blau eingefärbten evts sind die MP-Population.

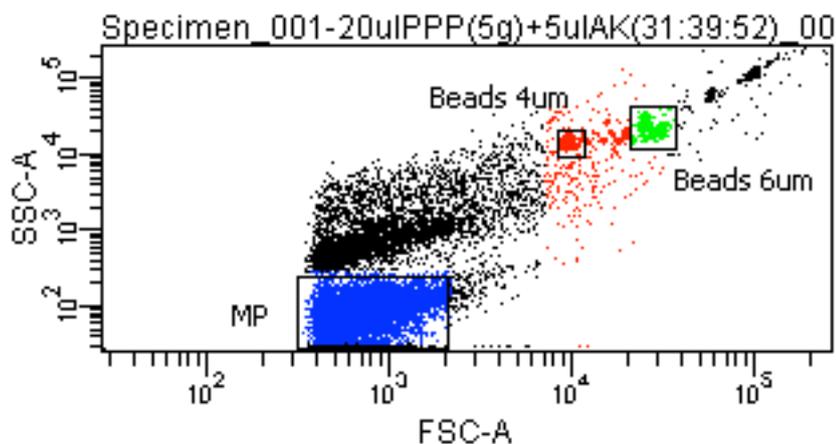


Abb. 6 FACS: Zentrifugationsreihe 5000g. Die blau eingefärbten evts. sind die MP-Population.

Rein optisch lässt sich hier bereits erkennen, dass bei höherer Zentrifugationsgeschwindigkeit die Anzahl an evts. in diesem Gate stark verringert ist. Die beobachteten Ergebnisse entsprechen denen anderer Studiengruppen, die einen Verlust von MPs bei mehrfacher Zentrifugation festgestellt haben.

### 3.4.3 Antikörper und verschiedene Fluorochrome

Bevor ein endgültiges Protokoll feststand, wurden verschiedene Antikörper und Fluorochrome getestet. An endothelialen Markern wurden PECAM-1 (CD31), E-Selectin (CD62E) und VE-Cadherin (CD144) verwendet. Bei den thrombozytären Markern wurde GpIIb (CD41a) und GpIb (CD42b) eingesetzt. Zur Identifizierung leukozytärer MPs wurde PTPRC (CD45) benutzt. Zudem wurde AnnexinV zur Erkennung apoptotischer MPs verwendet und ACE (CD143) zur Identifizierung MPs pulmonal endothelialen Ursprungs.

Aufgrund der Mehrfachfärbungen musste auch mit verschiedenen Fluorochromen experimentiert werden. Zur Optimierung des Protokolls wurde der gleiche Antikörper mehrfach benutzt, jedoch an verschiedene Fluorochrome gekoppelt.

Als Beispiel dient hier CD31, der sowohl auf dem FITC Kanal, dem PE Kanal und auf dem Pacific Blue Kanal getestet wurde. Auch für CD62E wurde sowohl PE, FITC als auch APC als Farbstoff verwendet. Ziel war es, eine geeignete Kombination zu finden.

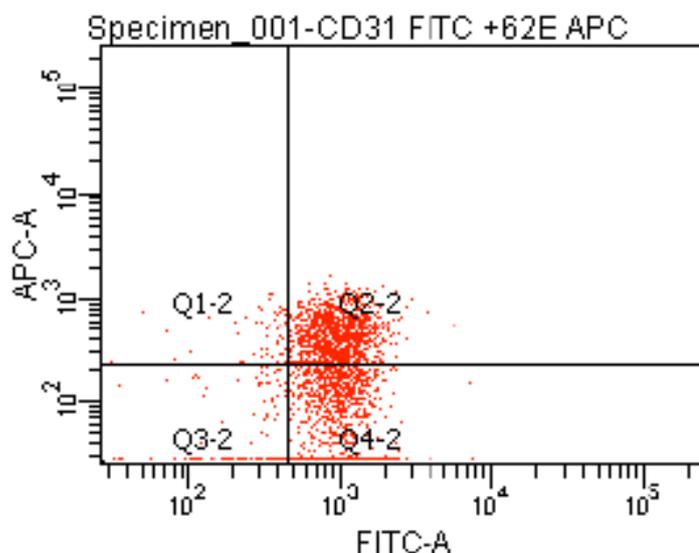


Abb. 7 FACS: Vergleich verschiedener CD31-Antikörper (FITC)

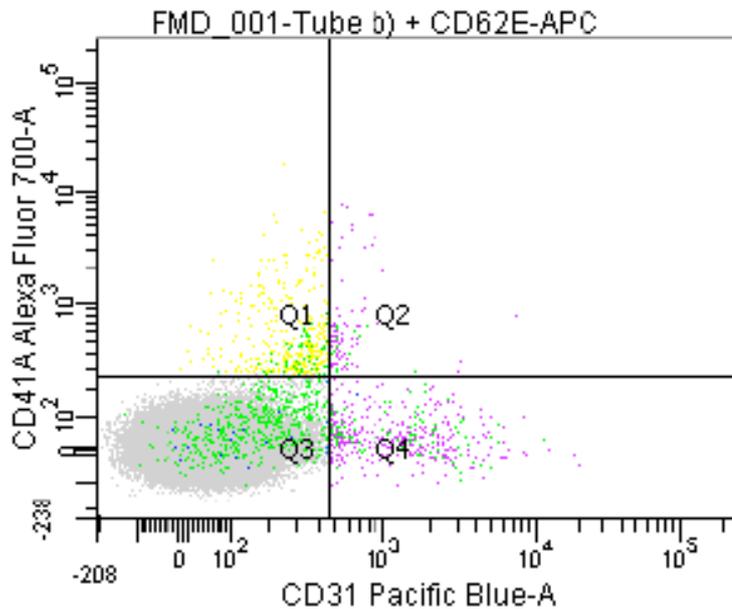


Abb. 8 FACS: Vergleich verschiedener CD31-Antikörper (Pacific Blue)

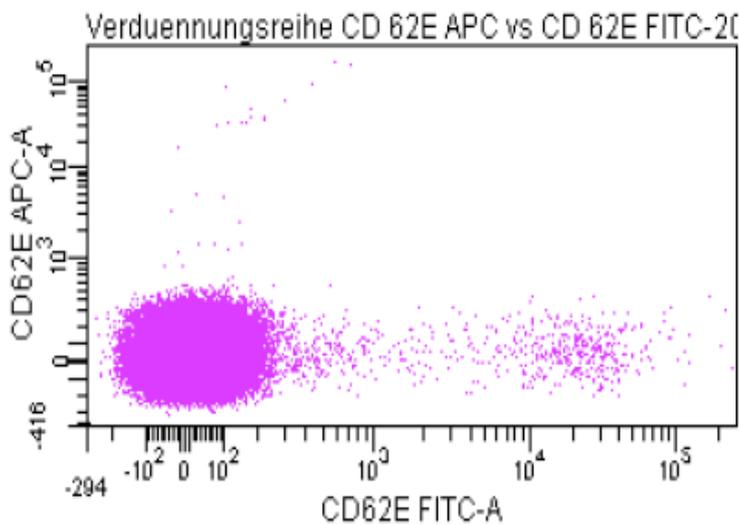


Abb. 9 FACS: Vergleich verschiedener CD62E-Antikörper (APC vs. FITC) , APC ungeeignet

Zur Bestimmung der richtigen Menge des zuzugebenden Antikörpers wurden die Angaben der jeweiligen Hersteller berücksichtigt. Zusätzlich wurde zu jedem verwendeten Antikörper eine systematische Konzentrationsreihe mit unterschiedlichen Mengen an Antikörpern durchgeführt, um eine optimale Dosierung und Verdünnung jedes Antikörpers zu finden, da es vom Hersteller keine Empfehlungen zur Mikropartikelmessung gibt.

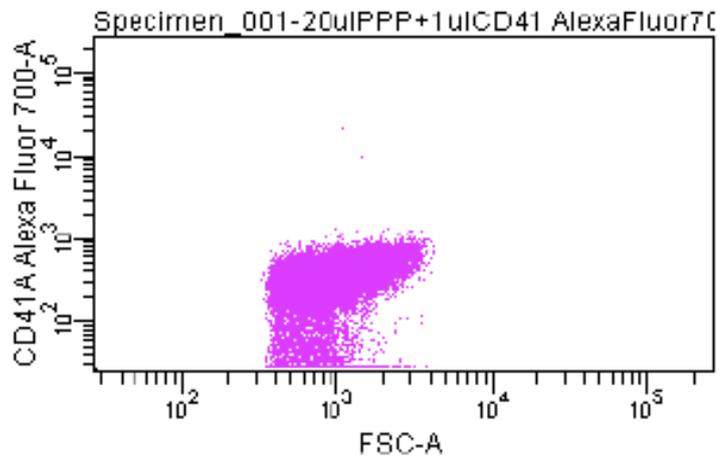


Abb. 10 FACS: Konzentrationsreihe CD41 Alexa Fluor (1µl)

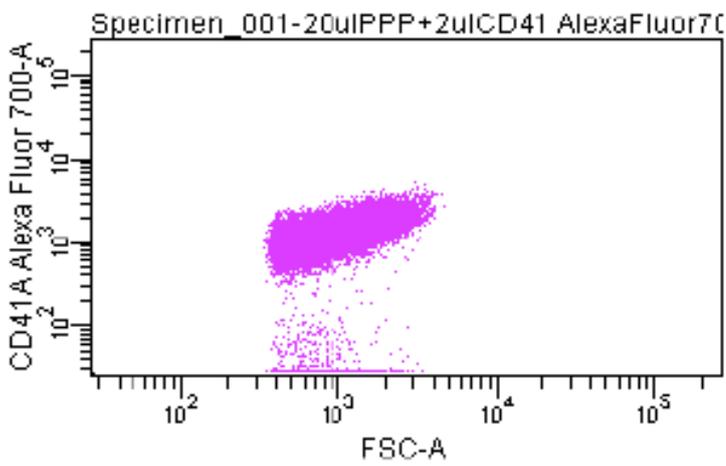


Abb. 11 FACS: Konzentrationsreihe CD 41 Alexa Fluor (2µl)

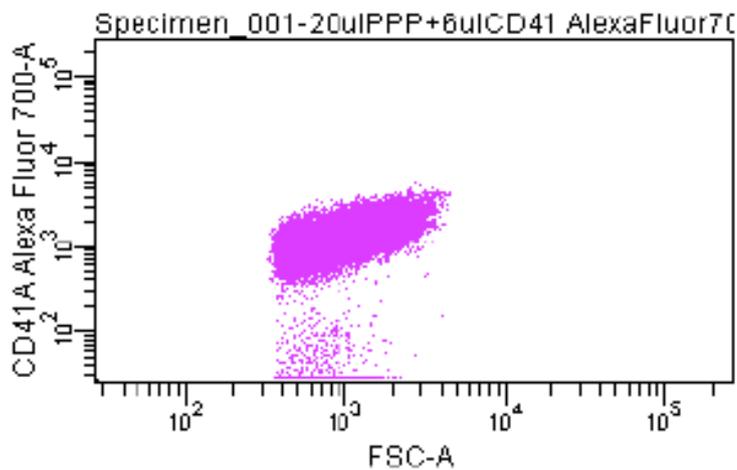


Abb. 12 FACS: Konzentrationsreihe CD 41 Alexa Fluor (6µl)

Als Beispiel hierfür dient eine Konzentrationsreihe mit CD41 Alexa Fluor 700 (1µl, 2µl, 6µl pro Probe). Hier wird deutlich, wie Antikörper-Konzentrationen eine MP-Population beeinflussen. Über die optimale Konzentration werden somit die Sensitivität und Spezifität eines Antikörpers optimiert (Shapiro 2003).

Auch hier zeigt sich, wie die Menge des verwendeten Antikörpers die gemessene Population beeinflusst. Verglichen mit der kleineren, deutlich unschärfer begrenzten CD41<sup>+</sup> Population mit 1µl Antikörper, zeigt sich eine größere, weitaus klarer abgetrennte Population bei 6µl Antikörper.

Über solche Konzentrationsreihen mit allen verwendeten Antikörpern wurde versucht, die optimalen Antikörperkonzentrationen für das endgültige Protokoll herauszufinden.

### **3.5 Messung der Proben nach Protokoll**

#### **3.5.1 Vorbereitung der Proben und Herstellung der Pufferlösung**

Die tiefgefrorenen thrombozytenarmen Plasma-Proben (PPP) wurden langsam bei Zimmertemperatur (24°C) aufgetaut. 100µl Plasma jeder Probe wurden entnommen und in ein 0,5ml Reagenzgefäß (Sarstedt) gefüllt. Dieses wurde dann bei 5000g und 4°C für 5min zentrifugiert (Zentrifuge Fresco 21, Heraeus), um thrombozytenfreies Plasma (PFP) zu erhalten.

20µl PFP wurden dann jeweils in ein Falcon Round bottom tube (BD) gegeben und mit 2µl Mouse Fc-Block (BD Pharmingen) zur Inkubation im Kühlschrank aufbewahrt (15min bei 4°C im Dunkeln). Anschließend erfolgte die Antikörperfärbung.

Der erste Ansatz aus 20µl PFP + 2µl FC Block wurde nun mit 4µl CD143-FITC (Acris), 2µl CD31-Pacific Blue (Exbio), 2µl CD41-Alexa Fluor (Exbio) und 4µl Annexin V-APC (BD Pharmingen) versetzt.

Der zweite Ansatz aus 20µl PFP + 2µl FC Block wurde nun mit 4µl CD143-FITC (Acris), 2µl CD31-Pacific Blue (Exbio), 2µl CD41-Alexa Fluor (Exbio) und 4µl CD62E/P-APC versetzt.

Beide Ansätze wurden nun jeweils 2 Minuten geschüttelt (Schüttler MS2 Minishaker, IKA) und dann wiederum für 15 Minuten bei 4°C zur Inkubation in den Kühlschrank gebracht.

Danach wurden die Ansätze mit 500µl des hergestellten Binding-Buffers verdünnt und die Calibration Beads (F-13838, Molecular Probes) zur Größenbestimmung hinzugefügt.

Hierzu wurden die Calibration Beads in den Größen 1µm; 2µm; 4µm; 6µm in ihren Originalbehältern in ein Ultraschallbad bei 35kHz gegeben (Sonorex RK52H, Bandelin), um alle Partikel zu lösen, die eventuell an der Wand des Gefäßes hingen. Die Calibration Beads wurden im Verhältnis 1:4 mit Binding Buffer verdünnt und dann wurden je 5µl (1µm; 2µm; 4µm; 6µm Beads) zu jedem Ansatz hinzugefügt. Bevor die Falcons (Round Bottom Tubes, BD) in die Messvorrichtung gestellt wurden, erfolgte ein erneutes Vortexen (MS2 Minishaker, IKA) für eine Minute.

Bei jeder Probe wurde zusätzlich noch ein dritter Ansatz zur Kontrolle hergestellt. Dieser Ansatz bestand aus 20µl PFP + 500µl Binding Buffer und jeweils 5µl aller verdünnten Calibration Beads (Verhältnis 1:4). Mit diesem Ansatz sollte herausgefunden werden, ob MPs, übriggebliebene Zellen oder die Calibration Beads eine Eigenfluoreszenz besitzen, die später die Ergebnisse verfälschen würden.

Bei der Herstellung eines Binding Buffers zur Verdünnung der Proben erfolgte die Orientierung an den Protokollen ähnlicher Studien, um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Verwandt wurde 10mM HEPES (Konzentration: 0,59g/250ml), 140mM NaCl (Konzentration: 2,045g/250ml) und 2,5mM CaCl<sub>2</sub> (Konzentration: 0,091g/250ml). Zum Wiegen der Stoffe diente eine ALS 120-4 Waage (Kern, Balingen, Deutschland). Darauf folgte die Titration mit NaOH auf einen pH von 7,4. Die Messung erfolgte mit einem Inolab pH720 pH-Messgerät (WTW, Weilheim, Deutschland). Um die Partikelfreiheit des Puffers zu gewährleisten, wurde die Lösung durch einen sterilen Rotilab Spritzenfilter mit einer Porengröße von 0,2µm gegeben. Bei einer späteren Messung des Puffers im FACS wurden keine Partikel/events gemessen.

### 3.5.2 Durchführung der Messung

Zur Messung wurde ein FACSCantoII (BD, Biosciences) als Durchflusszytometer verwendet. Die Analyse der Ergebnisse erfolgte mit der Software FACSDiva (BD, Biosciences) und wurde nach allgemeinem Standard durchgeführt.

Für den FSC (Forward Scatter) wurde eine Spannung von 277 V gewählt, der SSC (Side Scatter) auf 279 V eingestellt und der Threshold auf 400 V festgesetzt.

Die Aufnahmegeschwindigkeit für die Probe wurde auf „low“ eingestellt, was laut Hersteller in etwa einer Menge von ca. 10µl/min entspricht.

Die Zahl der gewerteten Events wurde auf 10.000 festgelegt, um eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Die gewerteten Events stammten aus der definierten Population (P1), die vor allem aus den Calibration Beads der Größen 4µm und 6µm bestand.

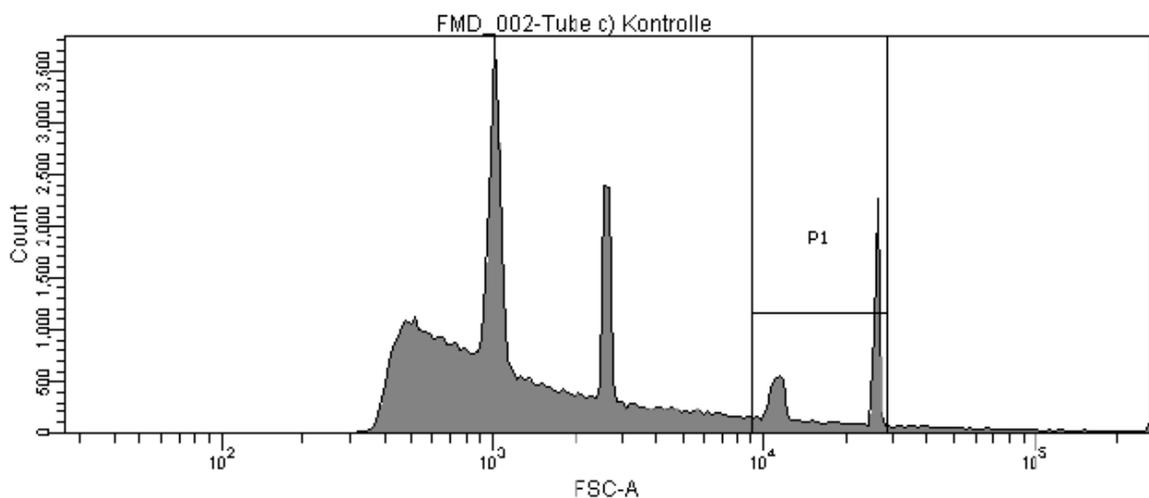


Abb. 13 FACS: P1- Festlegung der gezählten evts. Größenbereich zwischen 4µm und 6µm.

Die zu untersuchenden MPs wurden im Größenbereich < 1µm erwartet. Dies wurde als Kriterium zur Festsetzung der Population P2 verwendet. In diesem Bereich wurden die MP's vermutet.

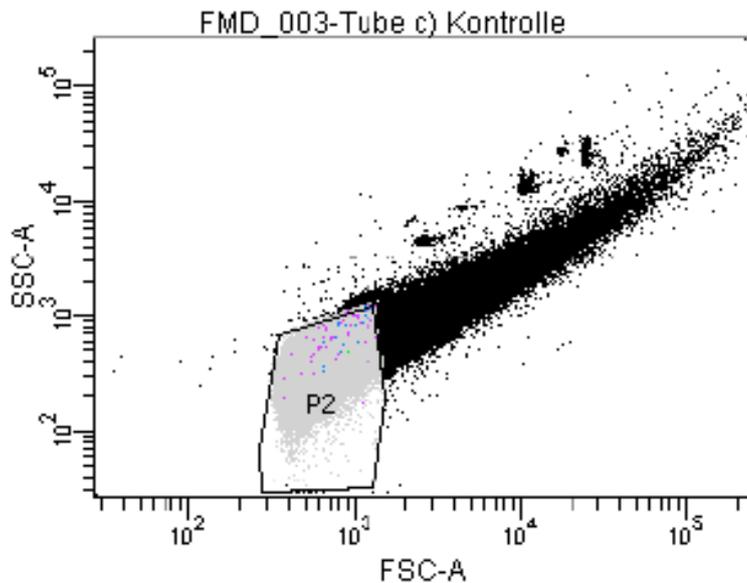


Abb. 14 FACS: P2-Festlegung der MP-Population.

### 3.5.3 Festlegung der Mikropartikel-Populationen

Bei der Messung der Mikropartikel wurde in dieser Arbeit der Fokus auf die MPs endothelialen Ursprungs gelegt. Als EMPs wurden alle  $CD31^+$  und  $CD41^-$  MPs gewertet. Nun erfolgte eine weitere Differenzierung der endothelialen MPs in weitere Subpopulationen:  $CD143^+ ACE^+$  EMPs wurden als pulmonal gewertet, während  $ACE^-$  EMPs als peripher gewertet wurden. Diese Annahme beruht auf der Tatsache, dass ACE vor allem im pulmonalen Endothel hergestellt wird (Schuster et al. 1996) und ACE somit als Marker für endotheliale MPs pulmonalen Ursprungs geeignet sein könnte.

Eine Besonderheit ergab sich bei den nicht-apoptotischen pulmonalen EMPs ( $CD31^+/CD41^-/ACE^+/AnnexinV^-$ ): Hier zeigten sich zwei klar voneinander abgegrenzte Populationen (siehe Abbildung 29), wobei eine Population (P5) ein stärkeres  $ACE^+$  Signal im FACS hatte und von uns gesondert als  $ACE^{bright}$  klassifiziert wurde, die Population mit dem weniger starken  $ACE^+$  Signal wurde als  $ACE^{dim}$  gewertet.

Zur Differenzierung aktivierter und ruhender (act. vs. rest.) EMPs diente der Marker  $CD62E$ , wobei  $CD62E^+$  EMPs als aktiviert betrachtet wurden. Als Unterscheidungskriterium zwischen „lebender“ und apoptotischer EMPs (viable. vs. apo.) wurde AnnexinV als Oberflächenantigen ausgewählt.

Neben MPs endothelialen Ursprungs wurden auch PMPs (MPs thrombozytären Ursprungs) betrachtet. Als thrombozytär wurden alle  $CD31^+$ ;  $CD41^+$  und  $CD31^-$ ;  $CD41^+$  MPs gewertet. In dieser Studie wurden nicht nur die Unterschiede in den Konzentrationen der MP-Populationen zwischen gesunden Kontrollprobanden und an PH erkrankten Patienten beleuchtet, es erfolgte ebenfalls ein Vergleich zwischen Patienten, die den Diagnosekriterien einer CTEPH bzw. einer PAH entsprachen.

Die Messung der Calibration Beads im CASY und FACS machte eine Bestimmung der absoluten Konzentrationen im Plasma möglich.

Abb. 15 gibt einen Überblick über die Einteilung der endothelialen Mikropartikel (EMPs).

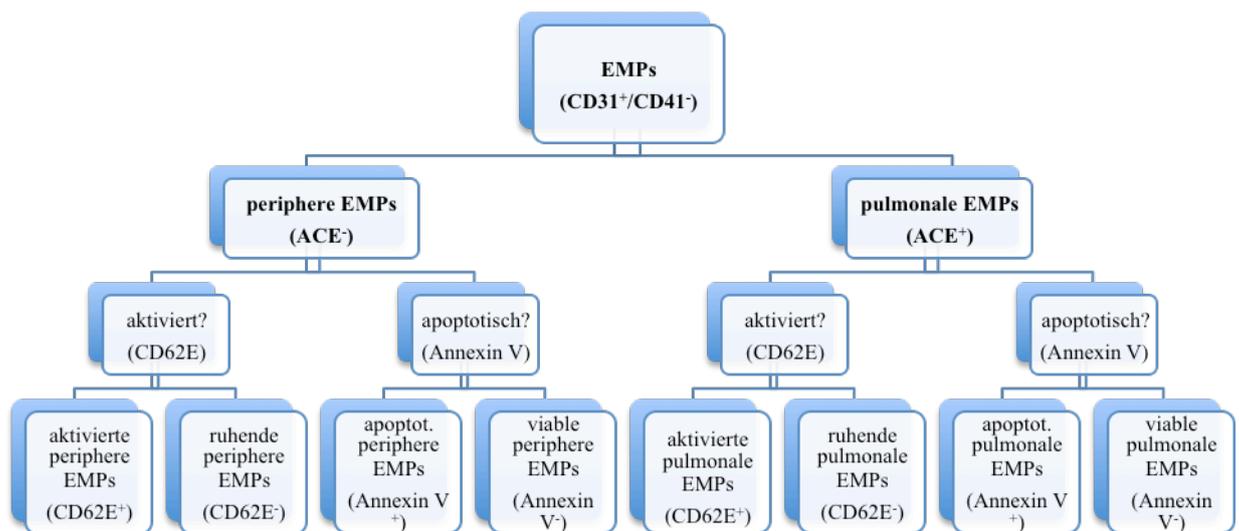


Abb. 15 Schematischer Überblick über die EMP-Einteilung

## 3.6 Automatische Zellzählung mittels CASY<sup>®</sup>

### 3.6.1 Prinzip der CASY<sup>®</sup> Zellzählmethode

Das Prinzip des CASY<sup>®</sup> Cell Counter and Analyser Systems, Modell TT (Schärfe Systems/ Roche Innovatis AG) beruht auf der Kombination zweier Messtechniken: zum einen die Widerstandsmessung, zum anderen die Pulsflächenanalyse, die das Messsignal der Widerstandsmessung graphisch darstellt und auswertet.

Die zu messenden Zellproben werden in eine schwache Elektrolytlösung (CASYS<sup>®</sup> ton) gegeben und durch Unterdruck bei gleichmäßiger Geschwindigkeit in eine Messkapillare gezogen. Der Messkapillare liegt ein konstantes Spannungsfeld an, das durch zwei Platin-Elektroden hergestellt wird. Die Zellen laufen so einzeln durch eine Präzisionsmesspore (aus künstlich hergestelltem Rubin) mit konstantem elektrischen Widerstand. Zellen oder Partikel mit einer intakten Membran wirken wie elektrische Isolatoren in der Messpore und führen zu einer Erhöhung des Widerstands. Das Volumen der Zellen oder Partikel korreliert mit der Widerstandserhöhung. Sowohl Amplitude als auch Form des Messsignals werden von CASYS<sup>®</sup> aufgezeichnet.

Die Pulsflächenanalyse bildet sämtliche Messsignale als Integral ab und berechnet hieraus die durchmesserlineare Größenverteilung der Zellen.

Jede Probe durchläuft eine dreimalige Messung. Auf einem LCD-Display wird zuerst eine graphische Auswertung der Größenverteilung angezeigt. Danach werden in der numerischen Darstellung Parameter wie absolute counts (Zellzahl bzw. Partikelanzahl), counts/ml (Konzentration) und das Gesamtvolumen aller Partikel angegeben.

### **3.6.2 Vorbereitung und Durchführung der Messung**

Die CASYS<sup>®</sup>-Probenröhrchen wurden mit jeweils 10ml CASYS<sup>®</sup> ton Elektrolytlösung gefüllt. Die CASYS<sup>®</sup> ton Elektrolytlösung wurde, um Verunreinigungen zu vermeiden, noch durch einen Partikelfilter (Rotilabo<sup>®</sup> 0,2µm, Roth) gegeben. Jedem Probenröhrchen wurden nun 50µl Probenmaterial aus einem der drei Ansätze (aus 3.4.2) hinzugefügt. Vor der Messung wurde jedes CASYS<sup>®</sup>-Probenröhrchen 1 Minute auf einen Schüttler (MS2 Minishaker, IKA) gevortext.

Das Probenröhrchen wird auf den Probensockel des Geräts gestellt, sodass die Messkapillare in die Lösung eintaucht. Über die Messkapillare wird die Probe nun angesaugt. Drei Leuchtdioden geben die Steighöhe der Probe an. Das Gerät nimmt drei Messungen vor und gibt dann das Ergebnis auf dem LCD-Display wieder.

Die gewählten Messeinstellungen betragen: 150µm Messkapillare, 400µl Einzelhubvolumen, 3 Messungen, Partikelgröße 2,5-8µm, Probenverdünnung:  $2.000e^{+02}$ , x-Achse: 30µm, y-Achse: Auto und Debris-Filter ausgestellt. Hierdurch werden MPs bewusst aus der Messung ausgelassen und lediglich die Calibration Beads gezählt.

Der definierte Messbereich beinhaltete speziell die Calibration Beads der Größen 4µm - 6µm. Diese wurde auch bei der FACS Messung als Population (P1) definiert und als Eventgrenze von 10.000 festgelegt. Da das FACS jedoch keine genaue Konzentration von counts/ml liefert, wurden die absoluten Konzentrationen von Beads mittels CASY® bestimmt.

Da bei dieser Methode die Bead-Konzentration in Counts/ml angegeben wird, konnte hieraus die Konzentration der Probe und in der Folge die Konzentration von Mikropartikeln in der Probe errechnet werden. Dies sei im Folgenden erläutert.

Dem Ansatz, von der Konzentration der Partikel (counts/ml) im CASY auf die Konzentration der Partikel (counts/ml) beim FACS zu schließen, liegt folgende Überlegung zu Grunde:

$$\text{FACS Counts [counts]} / \text{CASY Conc. [counts/ml]} = \text{Probenvolumen [ml]}$$

→

$$\text{FACS Counts [counts]} / \text{Probenvolumen [ml]} = \text{FACS Conc. [counts/ml]}$$

Somit war es möglich, über die CASY® Analyse der Proben auf die absolute Konzentration der MPs zu schließen.

Um von den Probenansätzen auf die Konzentration der MPs in 1µl Plasma zu schließen, musste zusätzlich der Verdünnungsfaktor 26,7 berücksichtigt werden, der sämtliche Verdünnungsschritte der Proben mit einbezieht.

### **3.7 Datenerfassung und Statistik**

Die Datenerfassung der FACS Messungen erfolgte über die Software FACSDiva (BD Biosciences). Von dort wurden die Ergebnisse als CSV-Dateien in Microsoft® Excel® für Mac 2011 (Microsoft) importiert. Die weitere statistische Analyse wurde mit der Statistik Software R Project® durchgeführt.

Falls nicht anders gekennzeichnet, wurden die Daten als Mittelwert (MW) ± Standardabweichung (SD) angegeben. Im Vorhinein wurden stetige Daten außerhalb eines Intervalls von drei Standardabweichungen um den Mittelwert (MW ± 3 SD) ausgeschlossen. Die Prüfung der stetigen Daten auf Normalverteilung erfolgte mittels Kolmogorov-Smirnov- bzw. Shapiro-Wilks-Test. Die Kriterien zur Durchführung paramet-

rischer Tests waren nicht erfüllt, so dass als nicht parametrisches Analyseverfahren der Mann-Whitney-U-Test zum Zwischengruppenvergleich verwandt wurde.

Zur Zusammenhangsanalyse wurde bei gegebener Normalverteilung die Produkt-Moment-Korrelation nach Pearson angewendet. Bei nicht normal verteilten Daten erfolgte eine Korrelationsanalyse mit Bildung des Spearman Rangkorrelationskoeffizienten. Als Signifikanzniveau aller Testverfahren wurde  $p < 0,05$  festgelegt.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1 Patientenkollektiv**

Das Patientenkollektiv, das die Grundlage der Untersuchungen bildet, umfasst 26 Patienten mit pulmonaler Hypertonie. Bei 15 Patienten lag eine chronisch thrombembolische pulmonale Hypertonie (CTEPH) vor, 11 Patienten litten an einer pulmonal arteriellen Hypertonie (PAH).

Mit Ausnahme einer Patientin (PAH, Dana Point I), bei der ein Elternteil asiatischer Herkunft war, waren alle anderen Studienteilnehmer kaukasischer Abstammung.

Die Auswahl der Patienten erfolgte im Zeitraum zwischen Dezember 2009 und August 2011 in der Schwerpunktambulanz für pulmonale Hypertonie und auf den Normalstationen der Klinik für Pneumologie, Allergologie, Beatmungs- und Umweltmedizin des Universitätsklinikums des Saarlandes. Es handelt sich dabei um das selbe Patientenkollektiv, das bereits im Rahmen der Promotionsarbeit von Christian Lensch zur Bedeutung der FMD bei PH erhoben und diskutiert wurde. Die anthropometrischen Grunddaten und die klinischen Parameter sind somit übereinstimmend und werden der Vollständigkeit halber erneut aufgeführt (Lensch 2013).

#### **4.1.1 Ein- und Ausschlusskriterien der Patienten**

In die Studie wurden Patienten aufgenommen, die entweder zur Operabilitätsabklärung für eine pulmonale Thrombendarteriektomie bei CTEPH in der Klinik waren oder einen vereinbarten Untersuchungstermin in der Ambulanz hatten. Ausschlusskriterium für die Aufnahme in die Studie war eine klinische Verschlechterung oder eine kardiale Dekompensation der Patienten.

Die Kontrollgruppe bestand aus 14 gesunden Probanden, die keine relevanten internistischen Vorerkrankungen, speziell kardiovaskulärer Genese, aufwiesen.

Bei der Auswahl der Kontrollgruppe wurde auf eine weitgehend übereinstimmende Verteilung von Alter, Geschlecht und anthropometrischer Grunddaten (Größe, Gewicht, Körperoberfläche) mit dem Patientenkollektiv geachtet.

Sowohl Patienten als auch Kontroll-Probanden wurden vor Beginn der Studie umfassend aufgeklärt. Die Einwilligung zur Teilnahme an der Studie erfolgte durch eine schriftliche Einverständniserklärung. Zu diesem Zeitpunkt waren alle Teilnehmer an der Studie volljährig.

Die Ethik-Kommission der Ärztekammer des Saarlandes bestätigte mit ihrem Votum die Zulässigkeit der Studie.

Voraussetzung zum Einschluss in die Studie war die Diagnose PAH und CTEPH.

Ausgeschlossen waren Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen wie koronarer Herzkrankheit (vorausgegangene Myokardinfarkte, Angina Pectoris), peripher arterieller Verschlusskrankheit (pAVK), Schlaganfall und bekannte Gefäßstenosen. Auch Patienten mit operativen oder interventionellen Eingriffen im Gefäßsystem (koronare Revascularisation, Interventionen an den extrakraniellen hirnversorgenden Gefäßen, Thrombendarterektomien oder jegliche Eingriffe an peripheren Gefäßen) blieben unberücksichtigt.

Weitere Ausschlusskriterien bei den Kontrollprobanden waren Diabetes Mellitus, Fettstoffwechselstörungen und aktiver Nikotinkonsum bzw. vorausgegangener Nikotinkonsum von mehr als 2 packyears.

#### 4.1.2 Charakterisierung des Patientenkollektivs

An der Studie nahmen 26 Patienten mit PH und 14 gesunde Kontrollprobanden teil.

		Kontrolle	PH (gesamt)	PAH	CTEPH
<b>Anzahl</b>	[n]	14	26	11	15
<b>Alter</b> [Min-Max]	[Jahre]	50,35 ± 15,50 [31- 62]	55,46 ± 15,50 [19 -79]	50,36 ± 16,42 [19 -71]	59,20 ± 14,17 <sup>#</sup> [34 -79]
<b>Geschlecht</b>	[m\w]	5 \ 9	7 \ 19	3 \ 8	4 \ 11
<b>Weiblich</b>	[%]	55	73	72	73
<b>#: p &lt; 0,05 CTEPH vs. PAH</b>					

Tabelle 12 Basischarakteristika der Studienteilnehmer

Das mittlere Alter des Studienkollektivs betrug 53,67 ± 13,4 Jahre. Das mittlere Alter des Patientenkollektivs betrug 55,46 ± 15,5 Jahre. Das mittlere Alter der Kontrollgruppe

betrug  $50,35 \pm 15,50$  Jahre. Die Daten waren nicht normalverteilt und in nicht-parametrischen Testverfahren zeigte sich kein signifikanter Altersunterschied zwischen der Patienten- und der Kontrollgruppe.

Die CTEPH Patienten waren durchschnittlich älter als die PAH-Patienten ( $59,20 \pm 14,17$  vs.  $50,36 \pm 16,42$  Jahre,  $p = 0,04$ ).

Insgesamt überwog der Anteil des weiblichen Geschlechts in allen Studiengruppen. (Kontrollen: 72% weiblich; gesamte PH Patienten 73% weiblich). Zwischen den Gruppen wurde kein signifikanter Unterschied bei der Geschlechterverteilung festgestellt.

	<b>Kontrolle</b>	<b>PH(gesamt)</b>	<b>PAH</b>	<b>CTEPH</b>
<b>Parameter</b>	MW $\pm$ SD	MW $\pm$ SD	MW $\pm$ SD	MW $\pm$ SD
<b>Gewicht [kg]</b>	$68,79 \pm 14,84$	$72,25 \pm 16,65$	$75,06 \pm 14,16$	$75,40 \pm 16,65$
<b>Größe [cm]</b>	$167,50 \pm 9,48$	$165,26 \pm 7,81$	$166,82 \pm 7,41$	$164,13 \pm 7,81$
<b>KÖF [m<sup>2</sup>]</b>	$1,76 \pm 0,21$	$1,78 \pm 0,23$	$1,78 \pm 0,24$	$1,79 \pm 0,26$
<b>*: <math>p &lt; 0,05</math> vs. Kontrollgruppe; (*): <math>p &lt; 0,1</math> vs. Kontrollgruppe</b>				

Tabelle 13 Anthropometrische Grunddaten der Studienteilnehmer. Dargestellt ist MW  $\pm$  SD

Bei der Untersuchung der Patienten wurden zuerst die anthropometrischen Daten wie Gewicht, Körpergröße und Körperoberfläche ermittelt. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

## 4.2 Erfassung klinischer Daten der Patienten

Neben den anthropometrischen Grunddaten wurden der systolische und diastolische Blutdruck sowie die Herzfrequenz in Ruhe ermittelt.

Die Blutdruckmessung erfolgte am linken Arm mittels einer Blutdruckmanschette nach Riva-Rocci.

Die Ergebnisse der 6-Minuten-Gehstrecke wurden nach einem standardisierten Protokoll festgehalten. Die funktionelle Belastbarkeit (WHO Funktionsklasse) wurde anhand klinischer Parameter festgestellt.

		<b>Kontrolle</b>	<b>PH (gesamt)</b>	<b>PAH</b>	<b>CTEPH</b>
<b>Parameter</b>		MW ± SD	MW ± SD	MW ± SD	MW ± SD
<b>Herzfrequenz</b>	[bpm]	63,37 ± 11,47	74,04 ± 11,58 *	72,2 ± 69,49 (*)	75,22 ± 11,58 *
<b>RR (syst.)</b>	[mmHg]	128,57 ± 12,16	115,38 ± 18,54 *	115,00 ± 22,91 *	115,67 ± 18,54
<b>RR (diast)</b>	[mmHg]	84,2 ± 86,46	77,88 ± 10,97 (*)	76,82 ± 11,01 *	78,67 ± 10,97
*: p<0,05 vs. Kontrollgruppe; (*): p<0,1 vs. Kontrollgruppe					

Tabelle 14 Blutdruckwerte (syst./diast.) und Herzfrequenz der Studienteilnehmer. Dargestellt ist MW ± SD

Im Mittel betrug der systolische Blutdruck bei den PH-Patienten  $115,38 \pm 18,54$  mmHg, der diastolische Blutdruck war  $77,88 \pm 10,97$  mmHg. Im Kontrollkollektiv zeigte sich ein signifikant höherer systolischer Ruheblutdruck ( $128,57 \pm 12,16$  mmHg,  $p = 0,01$ ), der diastolische Ruheblutdruck war tendenziell höher ( $84,28 \pm 6,46$  mmHg,  $p = 0,09$ ).

Die Ruhfrequenz des Kontrollkollektivs war signifikant niedriger als die des Patientenkollektivs ( $63,37 \pm 11,47$  vs.  $74,04 \pm 11,58$  bpm,  $p = 0,008$ ).

#### 4.2.1 Transthorakale Echokardiographie

Zur genauen Beurteilung der rechtskardialen- sowie der linkskardialen Funktion der Patienten und der Kontrollgruppe wurden alle Studienteilnehmer echokardiographisch untersucht. Speziell bei den Patienten mit pulmonaler Hypertonie ging es darum, hämodynamisch relevante Linksherzerkrankungen auszuschließen.

Die transthorakale Echokardiographie erfolgte nach internationalen Richtlinien (Hagendorff 2008; Rudzki et al. 2010). Die Untersuchung fand in einem abgedunkelten Raum statt. Als Ultraschallgerät diente ein Vivid E9 der Firma General Electrics mit der BT 11 Software. Die Patienten befanden sich in Linksseitenlage und die Echokardiographie erfolgte mit EKG-Triggerung. Bei allen Patienten lag zum Zeitpunkt der Untersuchung ein Sinusrhythmus vor.

Folgende standardisierte Schnitte bzw. Modi wurden durchgeführt:

- Parasternal lange und kurze Achse im M-Modus und B-Modus
- Apikaler 2-, 3-, 4-, und 5- Kammerblick im B-Modus

- Beurteilung der linksventrikulären Funktion nach Teichholz im M-Modus, bzw. nach der Scheibchen-Summationsmethode biplan nach Simpson
- Beurteilung der Klappenfunktion im Farbduplex, Pulsed Wave (PW)- und Continuous Wave (CW)- Doppler

#### 4.2.1.1 Beurteilung der linksventrikulären Funktion:

Die PH-Patienten zeigten im M-Modus in der parasternalen Achse einen geringeren linksventrikulären enddiastolischen Diameter als die gesunde Kontrollgruppe (LVEDd:  $40,85 \pm 7,78$  vs.  $46,37 \pm 4,96$  mm,  $p = 0,02$ ). Der Vierkammerblick (B-Modus) zeigte einen statistischen Trend zur kleineren linksventrikulären diastolischen Fläche (LVAd) bei PH-Patienten (LVAd:  $23,24 \pm 6,11$  vs.  $27,34 \pm 4,87$  mm,  $p = 0,06$ ).

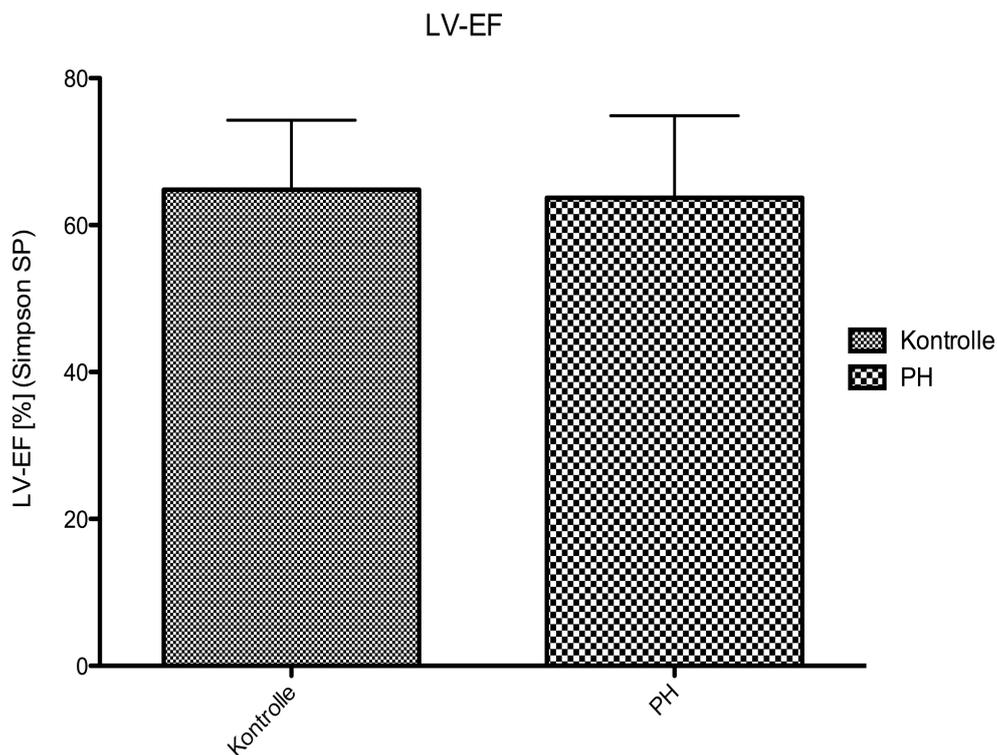


Abbildung 16 Vergleich der systolischen LV-EF. Vergleich zwischen PH-Patienten und gesunden Kontrollen. Gemessen durch transthorakale Echokardiografie im apikalen Vierkammerblick, B-Modus, berechnet nach Simpson.

Die Parameter der linksventrikulären Funktion lagen bei den PH-Patienten sowie bei der Kontrollgruppe im Normbereich. Diese wurde über die im M-Mode gemessene ventrikuläre Verkürzungsfraction (FS-fractional shortening) und die Ejektionsfraction nach Teichholz-Methode quantifiziert (FS:  $37,37 \pm 10,10$  vs.  $37,62 \pm 11,27$  %,  $p = 0,94$ ), (EF:  $66,54 \pm 13,17$  vs.  $66,10 \pm 14,85$  %,  $p = 0,92$ ). Die Unterschiede zwischen PH-Patienten und gesunden Kontrollen waren nicht signifikant.

Die genauere Messung mit Hilfe der biplanen Methode nach Simpson im B-Modus bestätigte dieses Ergebnis einer normwertigen linksventrikulären Ejektionsfraction bei PH-Patienten und gesunden Kontrollen (EF:  $63,72 \pm 11,19$  vs.  $64,82 \pm 9,47$  %,  $p = 0,76$ ). Vergleiche Abbildung 16.

#### 4.2.1.2 Parameter der rechtsventrikulären Funktion:

		Kontrolle	PH Patienten
Parameter		MW $\pm$ SD	MW $\pm$ SD
RAAd (B-Modus)	[cm <sup>2</sup> ]	15,63 $\pm$ 4,39	21,68 $\pm$ 6,63 *
RVAd (B-Modus)	[cm <sup>2</sup> ]	19,84 $\pm$ 5,14	25,59 $\pm$ 6,99 *
RVAs (B-Modus)	[cm <sup>2</sup> ]	11,81 $\pm$ 2,50	17,84 $\pm$ 6,60 **
RVFAC (B-Modus)	[%]	39,50 $\pm$ 7,95	31,55 $\pm$ 11,55 *
RV-length (B-Modus)	[mm]	74,58 $\pm$ 8,76	78,55 $\pm$ 8,26
RVIDd-base (BModus)	[mm]	37,49 $\pm$ 8,33	44,86 $\pm$ 9,03 (*)
RVIDd-mid (BModus)	[mm]	26,22 $\pm$ 7,30	33,60 $\pm$ 7,17 *
RVFW (B-Modus)	[mm]	10,13 $\pm$ 1,71	11,02 $\pm$ 1,71
TAPSE (M-Modus)	[mm]	24,30 $\pm$ 1,95	22,10 $\pm$ 5,80
(*) : $p < 0,1$ vs. Kontrollgruppe; * : $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe; ** : $p < 0,01$ vs. Kontrollgruppe			

Tabelle15 Rechtskardiale echokardiografische Parameter. Dargestellt ist MW  $\pm$  SD.

Die Kontrollgruppe zeigte, verglichen mit den PH-Patienten, planimetrisch systolisch wie diastolisch einen vergrößerten rechten Ventrikel (RVAd:  $25,59 \pm 6,99\text{cm}^2$  vs.  $19,84 \pm 5,14\text{cm}^2$ ,  $p = 0,02$ ), (RVAs:  $17,84 \pm 6,60\text{cm}^2$  vs.  $11,81 \pm 2,50\text{cm}^2$ ,  $p = 0,006$ ).

Die resultierende rechtsventrikuläre Flächenänderung (right ventricular fractional area change, RVFAC) war dementsprechend niedriger (RVFAC:  $31,55 \pm 11,55$  vs.  $39,50 \pm 7,95$  %,  $p = 0,01$ ), wie Abbildung 17 zeigt.

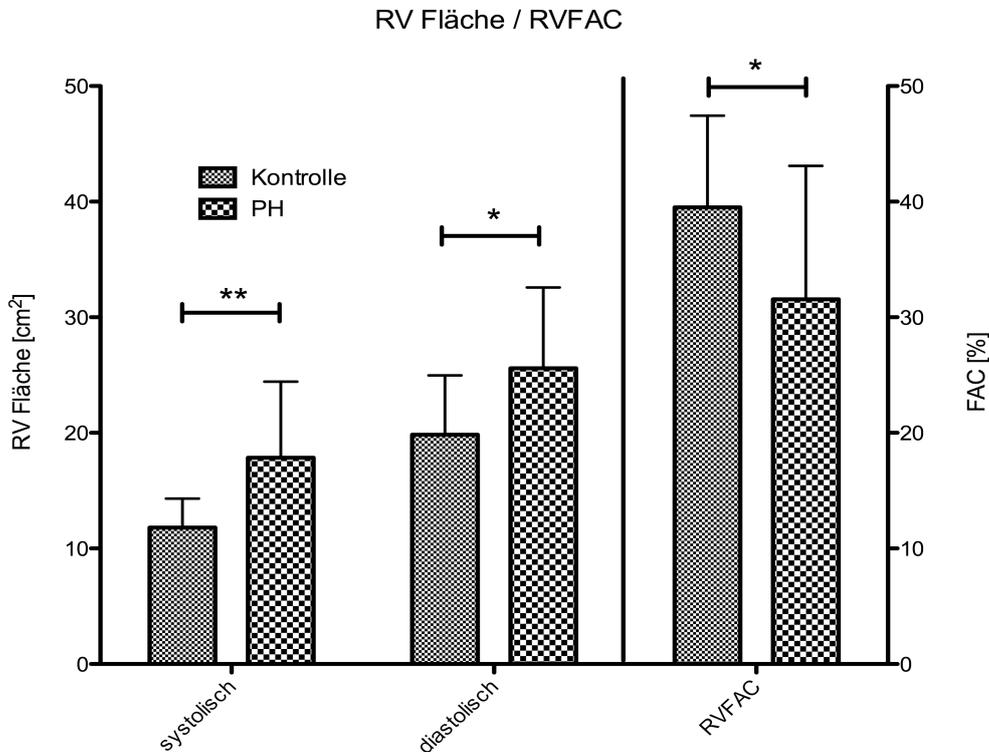


Abbildung 17 Planimetrie des rechten Ventrikels und RVFAC. Vergleich zwischen Kontrollen und PH-Patienten. Messung durch transthorakale Echokardiografie, 4-Kammerblick, B-Modus. Dargestellt ist MW ± SD, \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$ .

Die planimetrische Vermessung des rechten Vorhofs zeigte bei den PH-Patienten neben der ventrikulären Vergrößerung auch eine Vergrößerung des rechten Atriums (RAAd:  $21,68 \pm 6,63$  vs.  $15,63 \pm 4,39$ cm<sup>2</sup>,  $p = 0,01$ ).

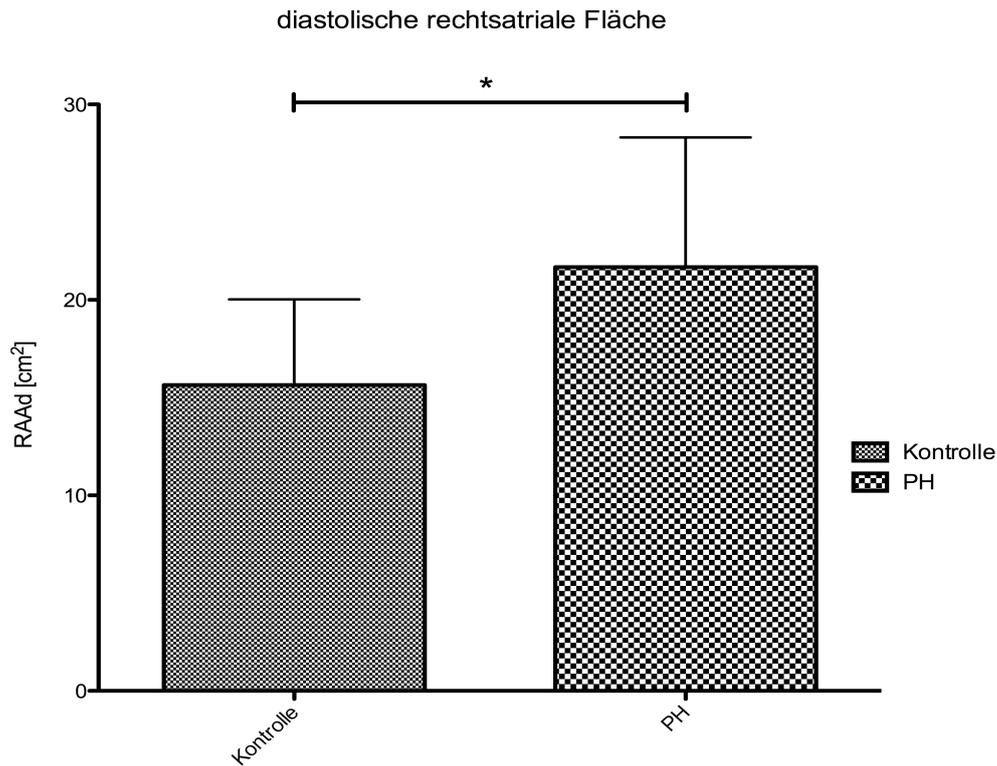


Abbildung 18 Diastolische rechtsatriale Fläche. Vergleich zwischen Kontrollen und PH-Patienten. Messung durch transthorakale Echokardiografie, 4-Kammerblick, B-Modus. Dargestellt ist MW ± SD, \*  $p < 0,05$

Der mittlere diastolische rechtsventrikuläre Diameter (RVIDd-mid) war bei der Gruppe der PH-Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe signifikant erhöht (RVIDd-mid:  $33,60 \pm 7,17$  vs.  $26,22 \pm 7,30$ mm,  $p = 0,02$ ). Der basale diastolische rechtsventrikuläre Diameter (RVIDd-base) zeigte einen Trend zu höheren Werten bei PH-Patienten (RVIDd-base:  $44,86 \pm 9,03$  vs.  $37,48 \pm 8,33$ mm,  $p = 0,06$ ). Normale Werte des basalen Diameters (RVIDd-base) entsprechend ATS-Leitlinien liegen unterhalb 42mm (Rudzki et al. 2010).

Im Längsdurchmesser (RVD-length) zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten und gesunden Kontrollen (RVD-length:  $78,55 \pm 8,26$  vs.  $74,58 \pm 8,76$ mm,  $p = 0,29$ ).

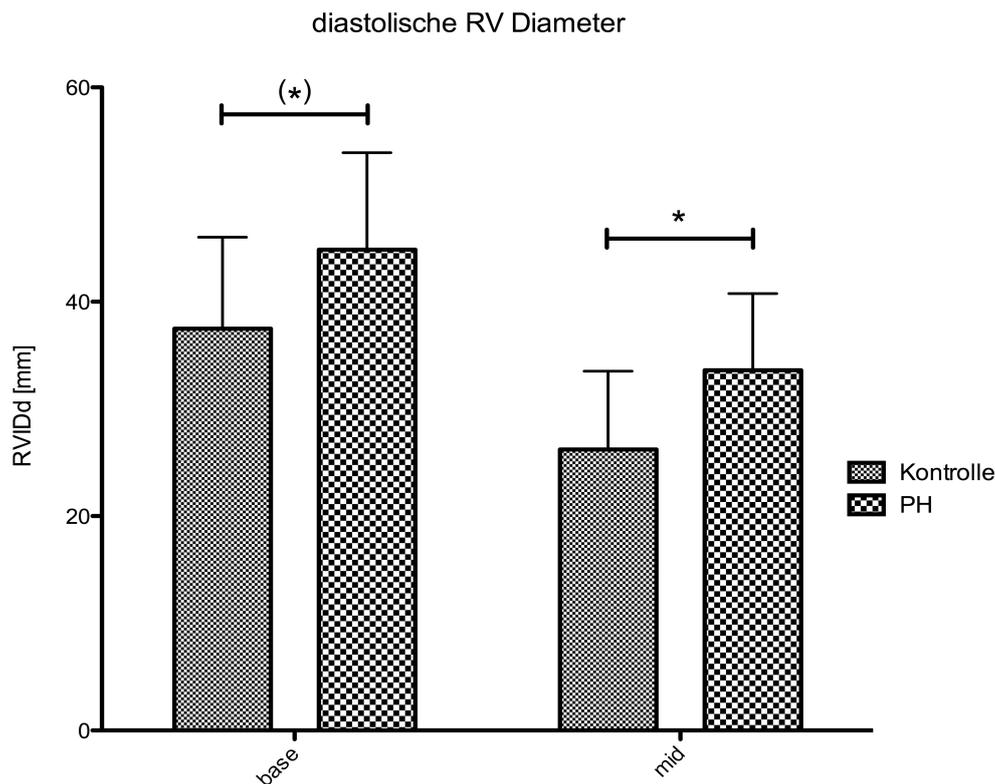


Abbildung 19 Diastolischer RV-Diameter. Vergleich zwischen Kontrollen und PH-Patienten. Messung durch transthorakale Echokardiografie, 4-Kammerblick, B-Modus. Dargestellt ist MW  $\pm$  SD  
 \*  $p < 0,05$ ; (\*)  $p < 0,05$

Die im M-Modus bestimmte TAPSE (tricuspid annular plane systolic excursion) als longitudinaler Funktionsmarker und indirekter Marker der rechtsventrikulären Kontraktilität war bei den PH-Patienten gegenüber gesunden Kontrollen etwas niedriger. Der Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant (TAPSE:  $22,10 \pm 5,80$  vs.  $24,30 \pm 1,95$  mm,  $p = 0,11$ ).

#### 4.2.2 Rechtsherzkatheteruntersuchung

Bei allen Patienten, die an der Studie teilnahmen, fand im Rahmen der Routinediagnostik eine Rechtsherzkatheteruntersuchung statt. Diese durfte in einem zeitlichen Abstand von maximal einem Jahr zu den restlichen klinischen Untersuchungen liegen.

Dieser diagnostische Eingriff erfolgte unter Ruhebedingungen in den Funktionsräumen der Klinik für Pneumologie, Allergologie, Beatmungs- und Umweltmedizin des Universitätsklinikums des Saarlandes.

Die Untersuchung fand nach einem standardisiertem Protokoll und internationalen Richtlinien (Galie et al. 2004) statt. Über ein großes venöses Gefäß (Vena jugularis interna; Vena cephalica) des in Rückenlage positionierten Patienten wurde ein flussgerichteter Swan Ganz Katheter mit Ballonspitze in die pulmonale Strombahn eingeführt.

Unter anderem wurden der rechtsatriale Druck, der rechtsventrikuläre Druck, der pulmonal arterielle Druck (systolisch; diastolisch; Mitteldruck) und der pulmonal arterielle Verschlussdruck gemessen.

Mittels Thermodilution wurde das Herzzeitvolumen bestimmt und anschließend der pulmonal vaskuläre Widerstand errechnet ( $PVR = (PAP - PAWP) / HZV$ ). Der PVR wird in  $[\text{dyn} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}^{-5}]$  angegeben. Die rechtsventrikuläre Arbeit ( $RVW = PAP_m \times RSV$ ) wurde berechnet und mit der linksventrikulären Arbeit verglichen.

Die vom Ventrikel verrichtete Arbeit ist das Produkt aus dem mittleren arteriellen Druck (entweder pulmonal arteriell beim rechten Ventrikel oder systemischer Blutdruck beim linken Ventrikel) und dem Schlagvolumen des jeweiligen Ventrikels. Folglich ist die Einheit der Ventrikelarbeit  $[\text{mmHg} \times \text{l}/\text{min}]$ .

Aus den verschiedenen Gefäßen wurden ebenfalls Blutproben entnommen, um die systemisch arterielle-, die pulmonale- und die venöse Sauerstoffsättigung zu bestimmen und um Shuntvitien auszuschließen.

Tabelle 16 gibt einen Überblick über die ermittelten hämodynamischen Werte:

		PH (gesamt)		PAH		CTEPH	
Parameter		MW ± SD	Range	MW ± SD	Range	MW ± SD	Range
PAPsys	[mmHg]	78,69 ± 22,35	34-120	81,71 ± 22,48	42-117	76,46 ± 22,77	34-120
PAPdia	[mmHg]	29,50 ± 12,36	14-66	35,9±14,24	19-66	24,80 ± 8,50*	14-45
PAPm	[mmHg]	48,00 ± 13,73	25-76	51,90 ± 14,39	29-76	45,13 ± 12,96	25-72
PAWP	[mmHg]	9,61 ± 3,13	5-16	8,54 ± 2,77	5-14	10,40 ± 3,24	5-15
TPG	[mmHg]	38,57 ± 14,06	10-66	43,90 ± 13,7	21-66	34,66 ± 13,42	10-60
CVP	[mmHg]	12,27 ± 8,21	3-32	10,00 ± 5,35	4-20	15,12 ± 10,50	3-32
HZV	[l/min]	4,23 ± 1,40	2,00-8,10	4,43 ± 1,32	2,41-6,90	4,08 ± 1,48	2,01-8,10
CI	l/min/m <sup>2</sup>	2,29 ± 0,72	1,17-4,55	2,53 ± 0,91	1,48-4,55	2,09 ± 0,44	1,17-2,72
PVR	[dyn·s·cm <sup>-5</sup> ]	837,60 ± 476,70	210-1702	904,00 ± 483,0	300-1711	788,90 ± 482,8	210-1720
DPG	mmHg	20,83±12,68	2-54	27,36±13,55	11-54	15,31±9,11	2-33
HR	1/sec	77,00 ± 11,92	53-100	76,00 ± 12,00	53-98	77,53 ± 11,58	60-100
RRsys	[mmHg]	122,0 ± 17,31	95-160	116,20 ± 16,60	95-154	126,60 ± 17,04	100-160
RRdia	[mmHg]	72,20 ± 9,84	55-90	74,0 ± 9,80	60-90	70,80 ± 10,03	55-90
SVR	[dyn·s·cm <sup>-5</sup> ]	1825,6 ± 701,7	1022-3400	1546,3 ± 427,6	1022-2337	2035,1 ± 806,6	1159-3400

\*: p<0,05 CTEPH vs. PAH

Tabelle 16 Hämodynamische Parameter des Patientenkollektivs. Daten stammen aus letztem zurückliegenden Rechtsherzkatheter. Dargestellt ist MW ± SD, ( PAH vs. CTEPH: \* p<0,05; (\*) p<0,1)

Das gesamte Patientenkollektiv zeigte deutlich erhöhte pulmonal arterielle Mitteldrücke (PAPm: 48,0 ± 13,73mmHg) und PA-Verschlussdrücke im Sinne einer präkapillären pulmonalen Hypertonie (PAWP: 9,61 ± 3,13mmHg). 7 Patienten (27%) hatten höhere pulmonal arterielle Mitteldrücke als 55mmHg. Der pulmonal arterielle Widerstand war

ebenso insgesamt deutlich höher als bei Gesunden (PVR:  $837,62 \pm 467,77 \text{ dyn}\cdot\text{s}\cdot\text{cm}^{-5}$ ).  
Siehe Abbildungen 20 und 21:

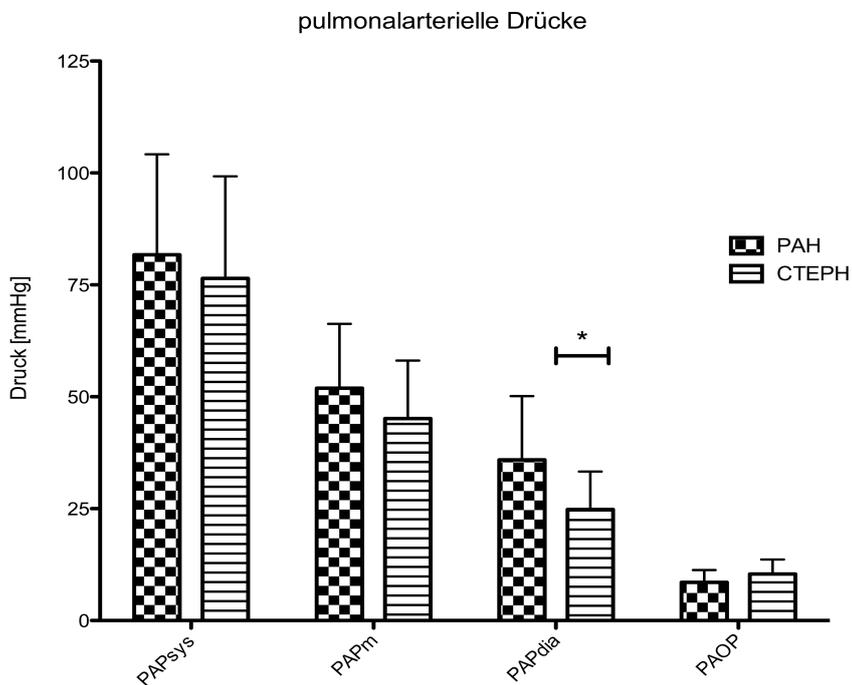


Abbildung 20 Pulmonal arterielle Drücke (syst./ mittel/diast.) und PAWP. Vergleich zwischen CTEPH und PAH. Dargestellt ist MW  $\pm$  SD, (\*  $p < 0,05$ )

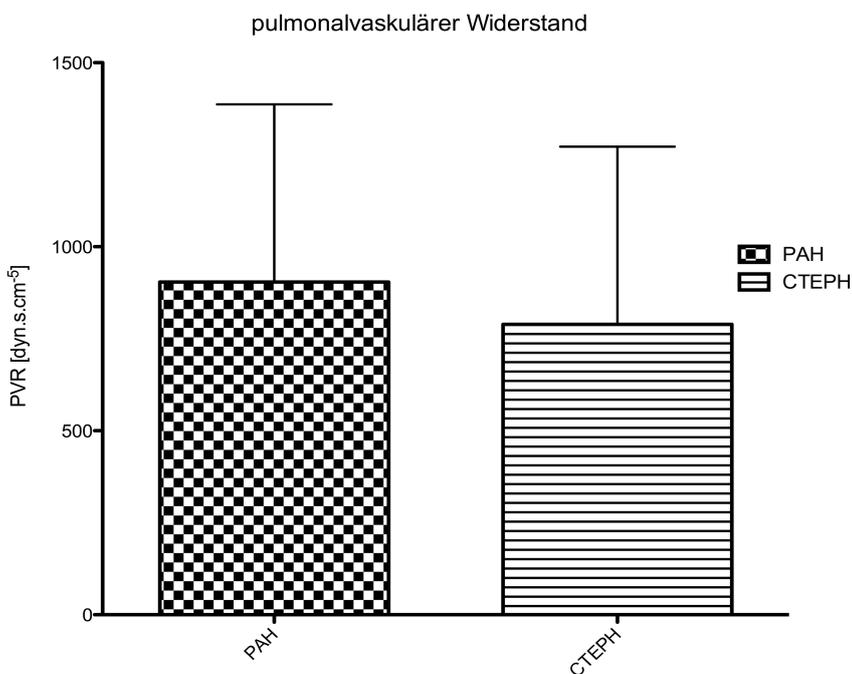


Abbildung 21 Pulmonalvaskulärer Widerstand (PVR). Vergleich zwischen CTEPH und PAH. Dargestellt ist MW  $\pm$  SD.

Das invasiv gemessene Herzzeitvolumen in Ruhe war leichtgradig eingeschränkt und betrug  $4,23 \pm 1,41/\text{min}$  (vgl. Abbildung 22).

Die Hämodynamik der PAH Patienten unterschied sich von den CTEPH Patienten lediglich durch einen höheren diastolischen pulmonal arteriellen Druck (PAPdia:  $35,90 \pm 14,24\text{mmHg}$  vs.  $24,80 \pm 8,50\text{mmHg}$ ,  $p = 0,02$ ). Die restlichen hämodynamischen Parameter zeigten in der retrospektiven Auswertung keine Unterschiede zwischen den Patientengruppen (PAH vs. CTEPH).

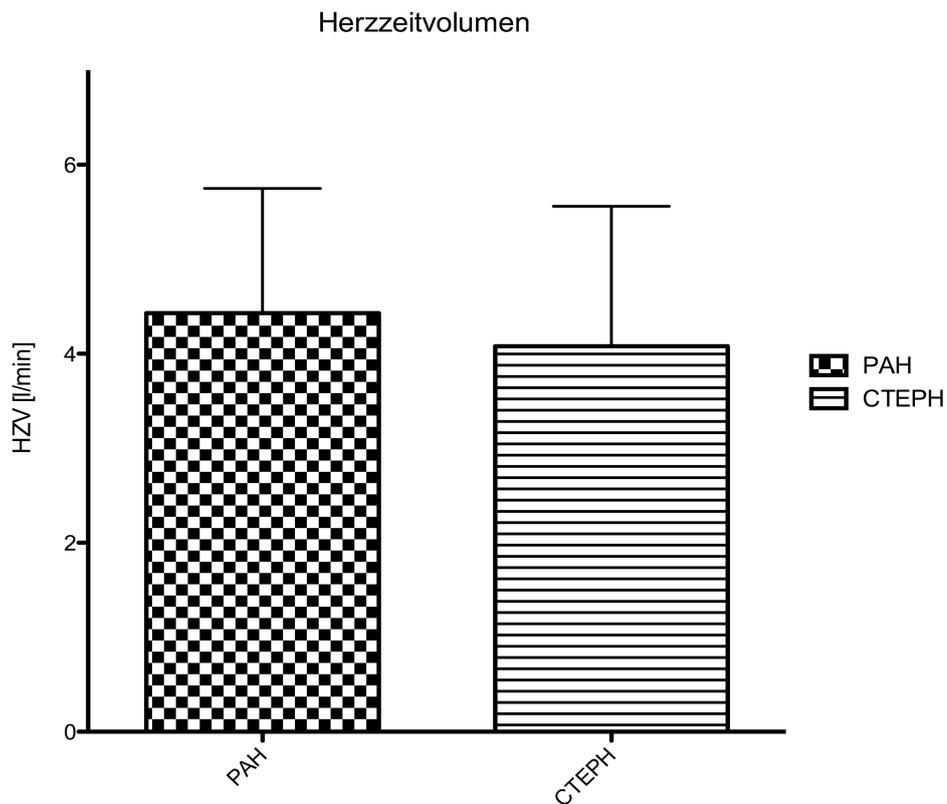


Abbildung 22 Herzzeitvolumen (HZV) der Patienten. Vergleich zwischen CTEPH und PAH. Dargestellt ist  $MW \pm SD$ . Keine signifikanten Unterschiede nachweisbar.

### 4.2.3 Medikation der Patienten

In einem standardisierten Erfassungsbogen wurden Informationen über die Medikation (speziell die Endothelfunktion beeinflussende Medikamente) der Patienten erhoben.

17 von 26 Patienten nahmen gezielte PH-Medikamente sowohl in Mono-Therapie als auch in Kombinations-Therapie. Zum Untersuchungszeitpunkt nahm lediglich einer von

11 PAH-Patienten keine Medikamente, während 8 von 15 CTEPH Patienten keine gezielten PH-Medikamente nahmen.

Nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über die Häufigkeit der jeweiligen Medikamentenklassen:

	<b>Absolute Häufigkeit</b>
<b>Keine gezielte PH-Medikation</b>	9
<b>Phosphodiesterase-Inhibitor (PDEI)</b>	14
<b>Endothelin-Rezeptorantagonisten (ERA)</b>	13
<b>Prostacycline (PC)</b>	2
<b>Calciumantagonisten (CCB)</b>	5
<b>Kombination: PDEI + ERA</b>	12
<b>Kombination PDEI + ERA + PC</b>	2

Tabelle 17 Häufigkeiten der PH-spezifischen Medikamentenklassen. Dargestellt sind absolute Häufigkeiten.

Phosphodiesterase-Inhibitoren (54%) und Endothelinrezeptorantagonisten (50%) sind die am häufigsten verwendeten Medikamente. Nur 5 Patienten (19%) nahmen einen Calciumantagonisten (19%). Insgesamt hatten zum Untersuchungszeitpunkt bereits 14 Patienten (54%) eine Kombinationstherapie erhalten.

### 4.3 Mikropartikel

Die folgenden Ausführungen stellen die Ergebnisse der MP-Messungen dar. Der Schwerpunkt der Untersuchung lag auf den Mikropartikeln endothelialen Ursprungs (EMPs). Neben verschiedenen EMP Subpopulationen wurden auch Mikropartikel thrombozytären Ursprungs (PMPs) gemessen. Es erfolgte neben dem Vergleich der MPs zwischen PH-Patienten und Kontrollprobanden noch eine gesonderte Betrachtung der MPs bei CTEPH und PAH. Die genaue Einteilung der MP-Populationen ist in Kapitel 3.5.3 detailliert geschildert. Abb. 15 gibt einen schematischen Überblick über die unterschiedlichen EMP-Subpopulationen.

	<b>Kontrolle</b>	<b>PH</b>	<b>PAH</b>	<b>CTEPH</b>
<b>absMP</b> [counts/ $\mu$ l]	16302,8 $\pm$ 20106,3	17586,6 $\pm$ 14292	19872,5 $\pm$ 12988,70	16015 $\pm$ 15333,40
<b>absEMP</b> [counts/ $\mu$ l]	189,63 $\pm$ 138,69	116,32 $\pm$ 91,99*	136,362 $\pm$ 81,32	102,546 $\pm$ 98,80*
<b>absPMP</b> [counts/ $\mu$ l]	186,359 $\pm$ 188,45	279,19 $\pm$ 433,85	267,987 $\pm$ 462,02	287,401 $\pm$ 428,34
<b>apoEMPabs</b> [counts/ $\mu$ l]	64,507 $\pm$ 84,04	44,031 $\pm$ 64,72	79,544 $\pm$ 78,33	19,616 $\pm$ 40,13 <sup>(*)#</sup>
<b>actEMPabs</b> [counts/ $\mu$ l]	21,413 $\pm$ 29,74	8,833 $\pm$ 11,85	13,546 $\pm$ 10,42	15,668 $\pm$ 13,01

Tabelle 18 Konzentrationen aller gemessenen MPs, EMPs und PMPs [counts/ $\mu$ l]. Dargestellt sind MW  $\pm$  Standardabweichung. \* p < 0,05 vs. Kontrolle ; (\*) p < 0,1 vs. Kontrolle ; # p < 0,05 CTEPH vs. PAH; (#) p < 0,1 CTEPH vs. PAH.

Bei den Konzentrationen aller MPs im Plasma (unabhängig vom zellulären Ursprung) zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den gesunden Kontrollen und den PH-Patienten. Auch die PH-Subgruppen unterschieden sich nicht signifikant voneinander.

Die Konzentrationen thrombozytärer Mikropartikel (PMPs) zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Studienpopulationen.

Die Konzentration der EMPs war in der Kontrollgruppe insgesamt am höchsten und signifikant höher als die Konzentration der EMPs in der PH-Gruppe (Kontrolle 189,63  $\pm$  138,69 vs. PH 116,323  $\pm$  91,99 ; p = 0,039). Beim Vergleich der Kontrollen mit den PH-Subgruppen waren die EMP Konzentration der Kontrollen verglichen mit den Konzentrationen der CTEPH-Gruppe signifikant erhöht (Kontrolle 189,63  $\pm$  138,69 vs. CTEPH 102,546  $\pm$  98,80; p = 0,018). Ein signifikanter Unterschied der EMP-Konzentrationen der Kontrollen und der PAH-Gruppe bestand nicht.

Im PH-Subgruppenvergleich der PAH- und CTEPH-Gruppe wiesen die PAH Patienten mit 136,362  $\pm$  81,32 höhere EMP Konzentrationen auf als die CTEPH Patienten (CTEPH 102,546  $\pm$  98,80). Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant.

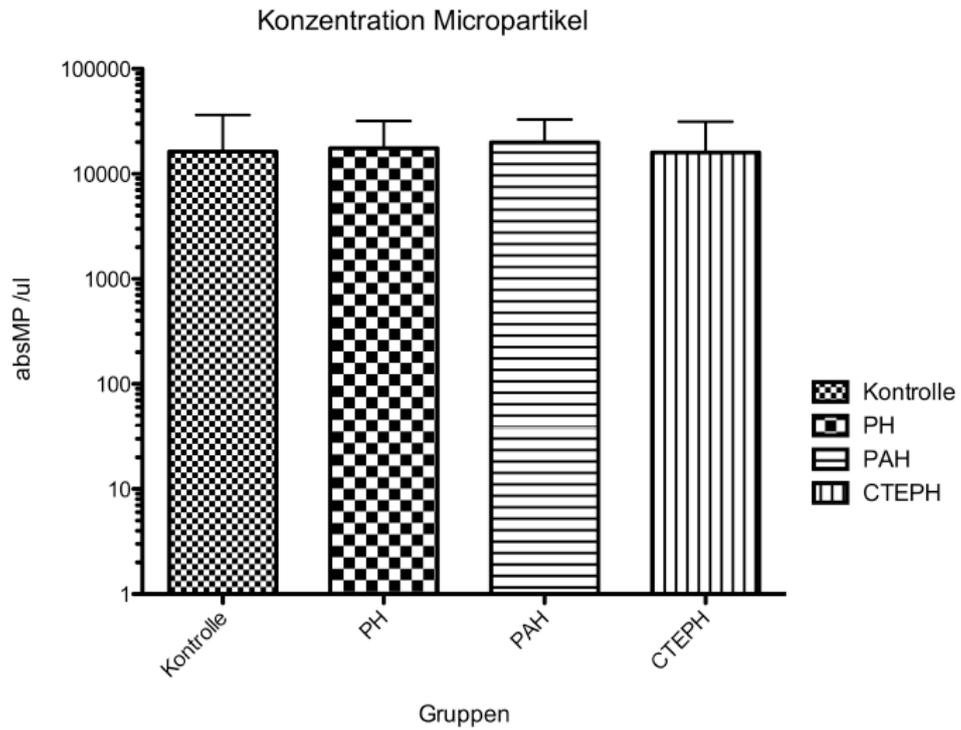


Abb. 23 Konzentrationen der MPs im Plasma. Vergleich zwischen Kontrollen und PH-Patienten. Dargestellt ist MW ± SD.

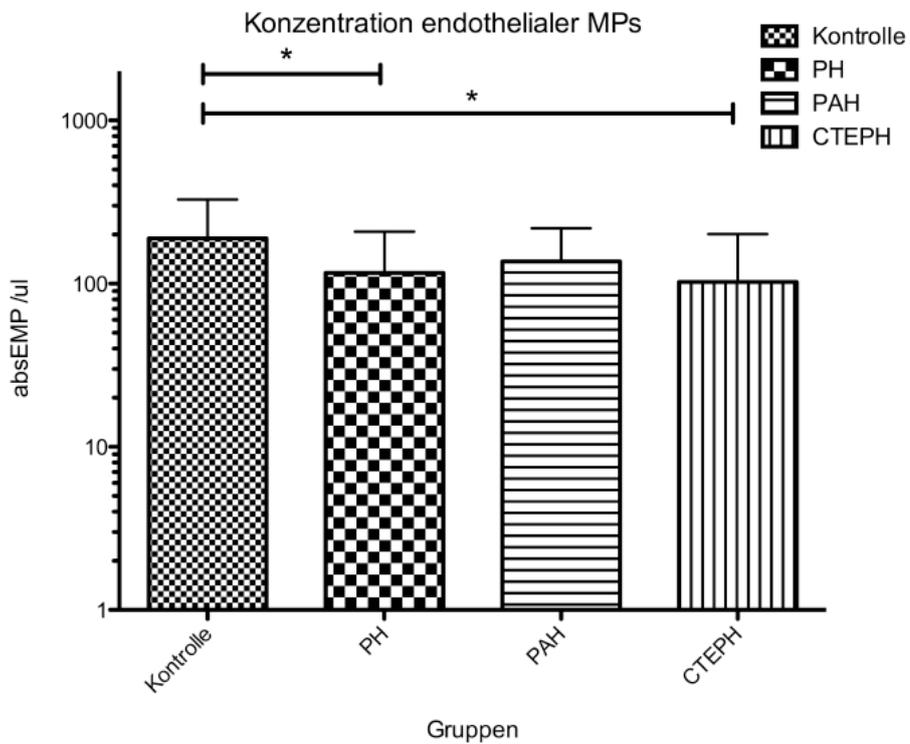


Abb. 24 Konzentration der EMPs. Vergleich zwischen Kontrollen und PH-Patienten. Dargestellt ist MW ± SD. \*  $p < 0,05$  vs. Kontrolle .

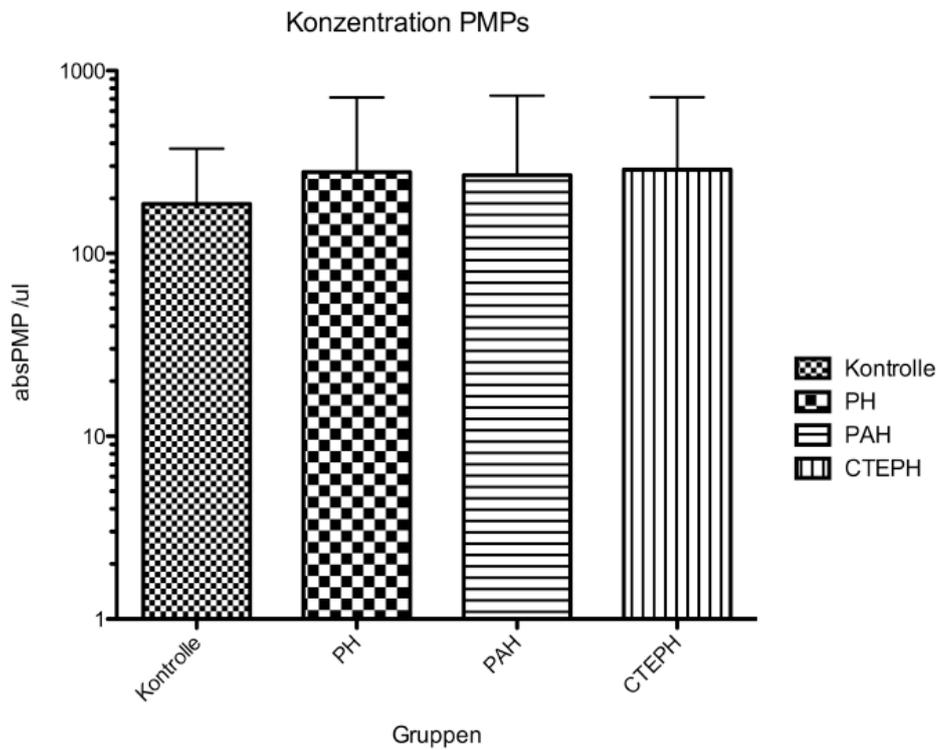


Abb. 25 Konzentration der PMPs. Vergleich zwischen Kontrollen und PH-Patienten. Dargestellt ist MW  $\pm$  SD.

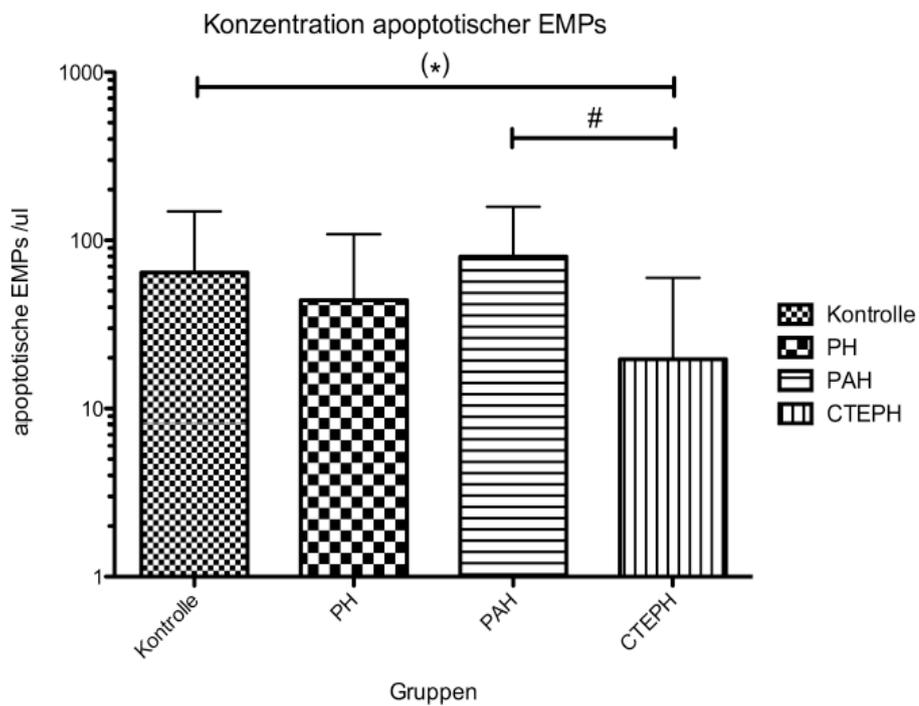


Abb. 26 Konzentrationen apoptotischer EMPs. Vergleich zwischen Kontrollen und PH-Patienten. Dargestellt ist MW  $\pm$  SD. (\*)  $p < 0,1$  vs. Kontrolle #  $p < 0,05$  CTEPH vs. PAH

Die höchste Konzentration apoptotischer EMPs trat bei PAH-Patienten auf. Hier lag die Konzentration signifikant höher als bei den CTEPH Patienten (PAH  $79,544 \pm 78,33$  vs. CTEPH  $19,616 \pm 40,13$ ;  $p = 0,034$ ). Apoptotische EMPs waren bei CTEPH Patienten, verglichen mit der Kontrollgruppe, verringert. Hier zeigte sich ein statistischer Trend: (Kontrolle  $64,507 \pm 84,04$  vs. CTEPH  $19,616 \pm 40,13$ ;  $p = 0,067$  ; siehe Abbildung 26).

### 4.3.1 Pulmonale EMPs vs. periphere EMPs

Zur weiteren Differenzierung zwischen EMPs pulmonalen endothelialen Ursprungs und peripheren endothelialen Ursprungs wurde CD143 (ACE, angiotensin converting enzyme) als Oberflächenantigen analysiert. ACE<sup>+</sup> MPs wurden als pulmonal (pulmEMP) klassifiziert, ACE<sup>-</sup> als peripher (periEMP). Die Unterscheidung bezügl. der Aktivierung wurde mittels CD62E (E-Selectin) ermittelt: CD62E<sup>+</sup> wurde demnach als actEMP klassifiziert.

	<b>Kontrolle</b>	<b>PH</b>	<b>PAH</b>	<b>CTEPH</b>
<b>aktiviert peripher EMP [counts/<math>\mu</math>l]</b>	$0,150 \pm 0,17$	$0,082 \pm 0,08$	$0,098 \pm 0,07$	$0,071 \pm 0,08$
<b>aktiviert pulmonal EMP [counts/<math>\mu</math>l]</b>	$0,665 \pm 1,14$	$0,472 \pm 0,42$	$0,409 \pm 0,37$	$0,516 \pm 0,46$
<b>ruhend peripher EMP [counts/<math>\mu</math>l]</b>	$1,539 \pm 1,04$	$1,714 \pm 1,17$	$2,045 \pm 0,90$	$0,471^{(\#)} \pm 1,30$
<b>ruhend pulmonal EMP [counts/<math>\mu</math>l]</b>	$0,852 \pm 0,92$	$1,050 \pm 0,94$	$1,038 \pm 0,90$	$1,058 \pm 1,00$

Tabelle 19 Konzentration der aktivierten und nicht-aktivierten (ruhenden) EMPs. Dargestellt sind MW  $\pm$  SD.

Die Konzentrationen der aktivierten und nicht-aktivierten pulmonalen EMPs wiesen keinerlei signifikante Unterschiede zwischen Kontrollprobanden, PH-Patienten und den PH-Subgruppen auf. Die aktivierten-peripheren EMPs zeigten ebenso keine signifikanten Konzentrationsunterschiede zwischen den einzelnen Gruppen.

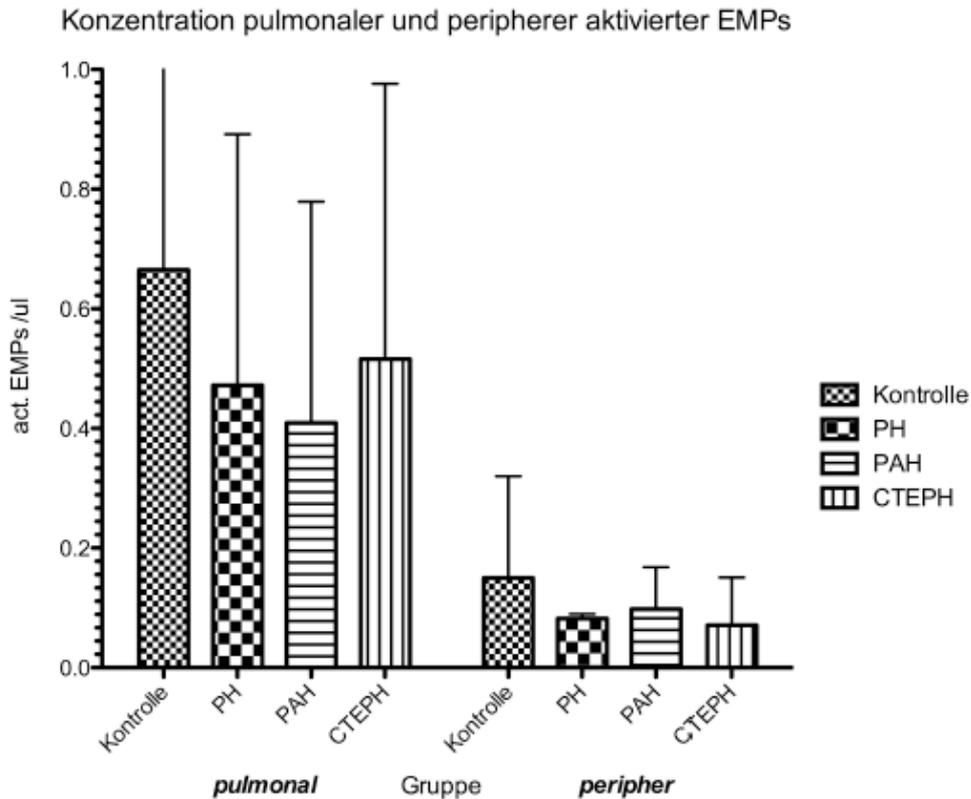


Abb. 27 Konzentration pulmonal- und peripher-aktivierter EMPs. Vergleich zwischen Kontrollen und PH-Patienten. Dargestellt ist MW  $\pm$  SD.

Die aktivierten pulmonalen EMPs waren höher als die peripheren aktivierten EMPs bei allen Studienpopulationen (Kontrollen und Patienten). Zwischen den gesunden Kontrollen und den PH Patienten bestanden jedoch keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der EMP Konzentrationen pulmonalen Ursprungs.

Bei den nicht-aktivierten peripheren EMPs zeigte sich im PH Zwischengruppenvergleich, dass die Konzentrationen bei den PAH-Patienten höher als bei den CTEPH-Patienten (PAH  $2,045 \pm 0,9$  vs. CTEPH  $0,471 \pm 1,30$ ;  $p = 0,029$ ) waren (siehe Abbildung 28).

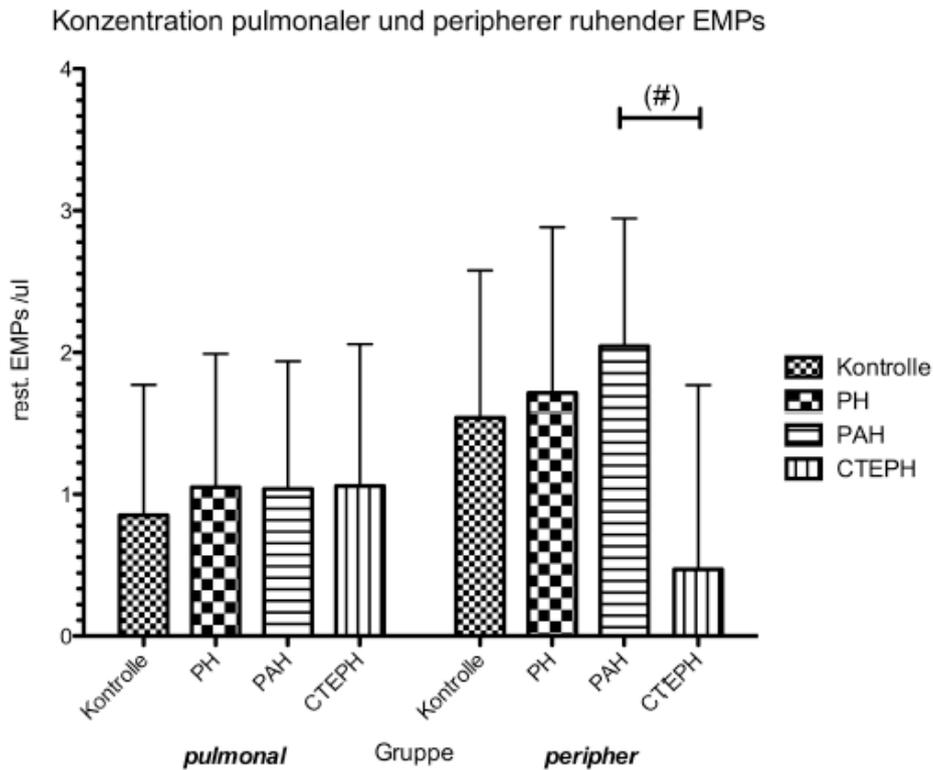


Abb. 28 Konzentration pulmonal- und peripher nicht-aktivierter EMPs. Vergleich zwischen Kontrollen und PH-Patienten. Dargestellt ist MW ± SD.

\*  $p < 0,05$  vs. Kontrolle (\*)  $p < 0,1$  vs. Kontrolle

#  $p < 0,05$  CTEPH vs. PAH (#)  $p < 0,1$  CTEPH vs. PAH

Im folgenden Abschnitt wird zwischen pulmonalen EMPs und peripheren EMPs differenziert. Es fiel eine neue  $ACE^+/Annexin V^-$  EMP Population auf, die im FACS ein stärkeres  $ACE^+$  Signal aufwies. Diese neue Population ist in der Abbildung 29 als Population P5 zu sehen.

Diese Population wurde zu den viablen pulmEMPs gezählt, wurde aber ebenfalls gesondert als  $ACE^{bright}$  von der restlichen schwächeren  $ACE^+$  Population (P4)  $ACE^{dim}$  abgegrenzt.

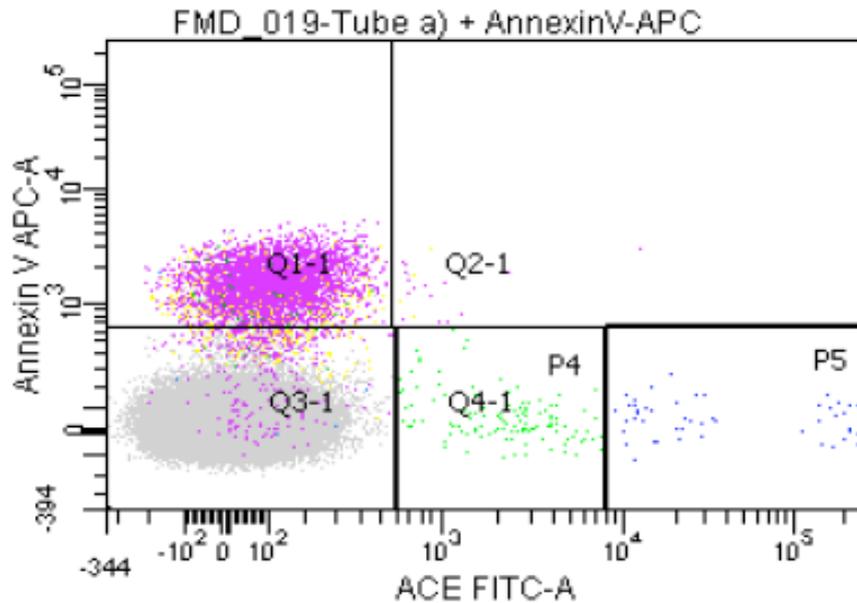


Abb. 29 FACS: Neue ACE<sup>+</sup> Population P5 zeigt eine stärkere ACE<sup>+</sup> Population (viablepulmEMP) „bright“, die als P5 markiert und als viablepulmEMP deklariert wurde. P4 ist ebenfalls viablepulmEMP wird jedoch als „dim“ bezeichnet (bright vs. dim).

Bei den peripheren EMPs hatten die nicht-apoptotischen (viablen) EMPs im Vergleich zu apoptotischen (dead) EMPs insgesamt höhere Konzentrationen sowohl bei PH-Patienten als auch bei gesunden Kontrollprobanden. Die höchste Konzentration viabler peripherer EMPs war in der Kontrollgruppe zu beobachten, diese waren gegenüber den PH-Patienten nicht signifikant, sondern nur tendenziell höher (Kontrolle  $83,012 \pm 49,95$  vs. PH  $70,249 \pm 87,99$ ;  $p = 0,097$ ). Gegenüber den CTEPH Patienten waren die Konzentrationen peripherer viabler EMPs signifikant höher (Kontrolle  $83,012 \pm 49,95$  vs. CTEPH  $67,906 \pm 105,76$ ;  $p = 0,035$ ). Die viablen peripheren EMP-Konzentrationen der PAH-Gruppe war höher als die der CTEPH-Gruppe, der Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant.

Bei den pulmonalen, viablen EMPs ergaben sich die höchsten EMP-Konzentrationen bei der Kontrollgruppe. Diese waren tendenziell höher als in der PH-Gruppe (Kontrolle  $70,405 \pm 112,48$  vs. PH  $20,733 \pm 18,37$ ;  $p = 0,054$ ) und der CTEPH-Gruppe (Kontrolle  $70,405 \pm 112,48$  vs. CTEPH  $18,719 \pm 15,33$ ;  $p = 0,051$ ).

In der PAH Gruppe war die Konzentration der viablen pulmonalen EMPs höher als in der CTEPH Gruppe, der Unterschied war nicht signifikant (siehe Abbildung 30).

	Kontrolle	PH	PAH	CTEPH
<b>deadperiEMP</b> [counts/ $\mu$ l]	56,358 $\pm$ 75,13	37,663 $\pm$ 59,12	68,091 $\pm$ 72,86	16,743 $\pm$ 37,07 <sup>(*)#</sup>
<b>deadpulmEMP</b> [counts/ $\mu$ l]	8,160 $\pm$ 9,92	6,369 $\pm$ 7,50	11,453 $\pm$ 8,95	2,873 $\pm$ 3,48 <sup>#</sup>
<b>viableperiEMP</b> [counts/ $\mu$ l]	83,012 $\pm$ 49,95	70,249 $\pm$ 87,99 <sup>(*)</sup>	73,657 $\pm$ 57,72	67,906 $\pm$ 105,76 <sup>*</sup>
<b>viablepulmEMP</b> [counts/ $\mu$ l]	70,405 $\pm$ 112,48	20,733 $\pm$ 18,37 <sup>(*)</sup>	23,661 $\pm$ 22,57	18,719 $\pm$ 15,33 <sup>(*)</sup>

Tabelle 20 Konzentrationen der apoptotischen und nicht-apoptotischen EMPs. Dargestellt sind MW und Standardabweichung. \*  $p < 0,05$  vs. Kontrolle #  $p < 0,05$  CTEPH vs. PAH

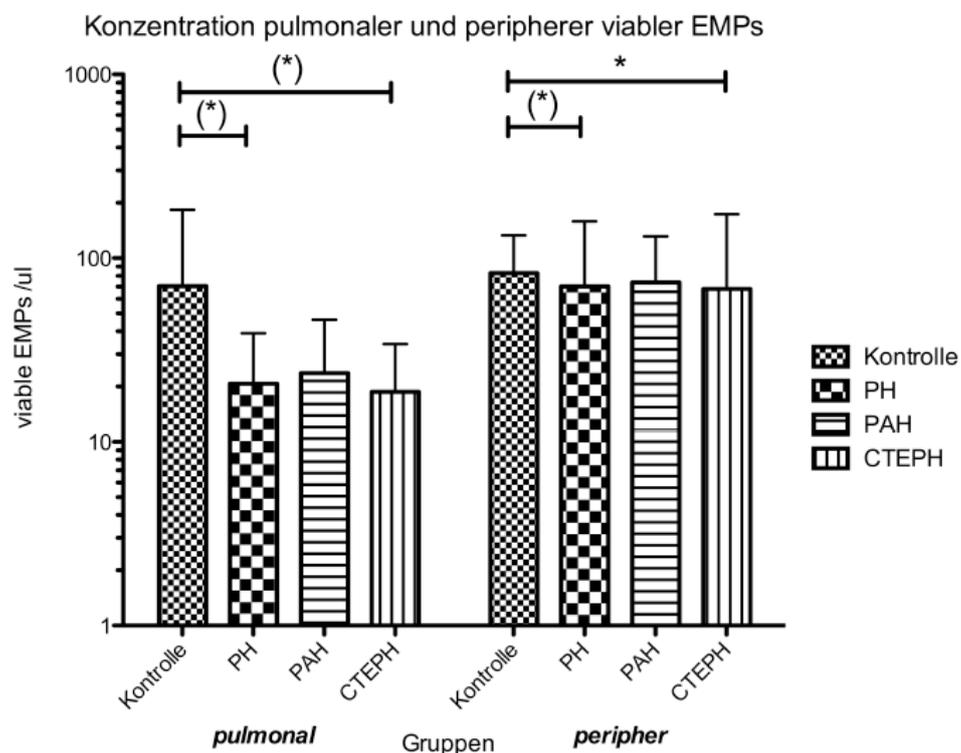


Abb. 30 Konzentration pulmonal und peripher viabler EMPs. Vergleich zwischen Kontrollen und PH-Patienten. Dargestellt ist MW  $\pm$  SD. \*  $p < 0,05$  vs. Kontrolle (\*)  $p < 0,1$  vs. Kontrolle

Sowohl bei den peripheren als auch bei den pulmonalen apoptotischen EMPs wurde die höchste EMP-Konzentration in der PAH-Gruppe beobachtet. Bei den pulmonalen apoptotischen EMPs (deadpulmEMPs) zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Konzentration der EMPs zwischen der PAH- und der CTEPH-Gruppe (PAH  $11,453 \pm 8,95$  vs. CTEPH  $2,873 \pm 3,48$   $p = 0,023$ ). Eine ähnliche Konstellation wurde auch bei den peripheren apoptotischen EMPs erkennbar: PAH vs. CTEPH ( $20,757 \pm 72,86$  vs.  $2,663 \pm 37,07$   $p = 0,030$ ).

In der Kontrollgruppe wurden tendenziell höhere Konzentrationen peripher apoptotischer EMPs gemessen als in der CTEPH-Gruppe (Kontrolle  $56,358 \pm 75,13$  vs. CTEPH  $16,743 \pm 37,07$   $p = 0,081$ ).

Die Konzentrationen apoptotischer EMPs sowohl pulmonalen wie peripheren Ursprungs waren in der CTEPH-Gruppe am niedrigsten (siehe Abb. 31).

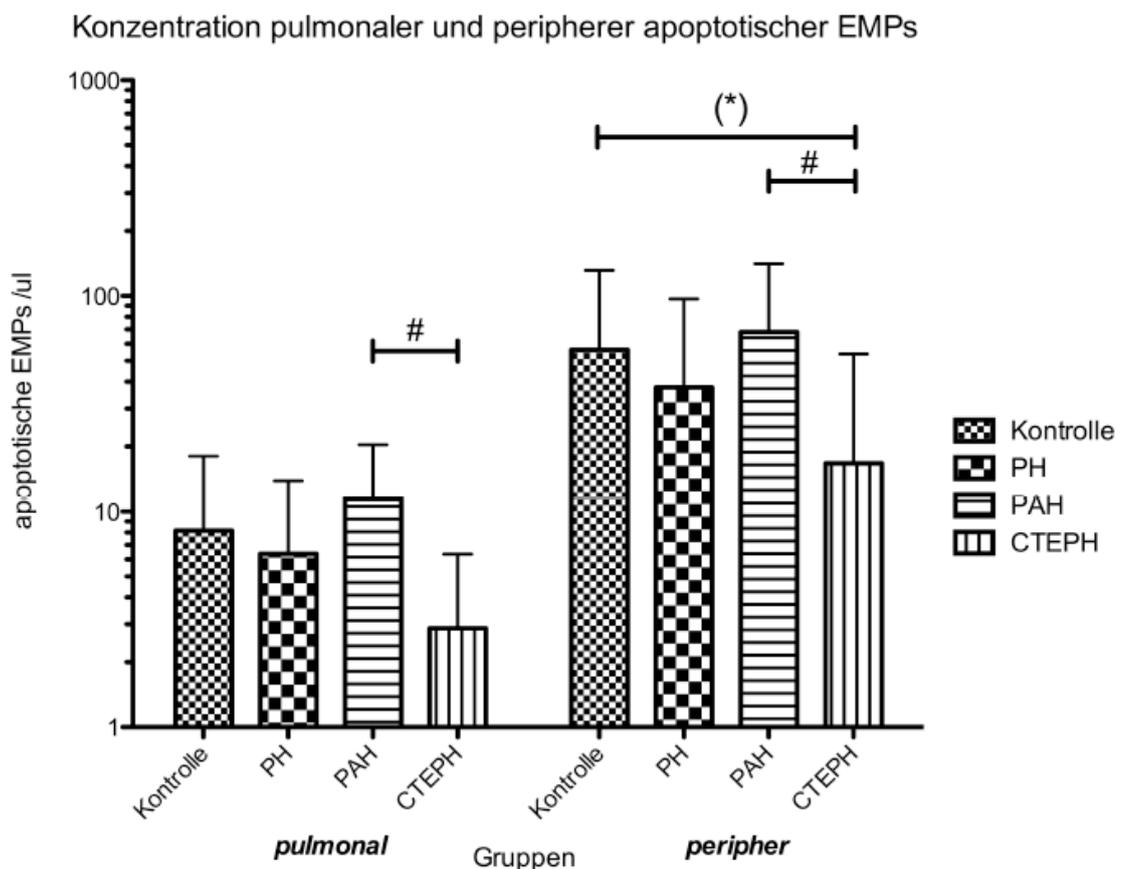


Abb. 31 Konzentration pulmonal- und peripher-apoptotischer EMPS- Vergleich zwischen Kontrollen und PH-Patienten. Dargestellt ist MW ± SD.

(\*)  $p < 0,1$  vs. Kontrolle #  $p < 0,05$  CTEPH vs. PAH

## 4.4 Mikropartikel und klinische Parameter

Um der Vermutung nachzugehen, dass MPs in einem direkten Zusammenhang mit den klinischen Daten der Patienten stehen, erfolgte eine Überprüfung der Korrelationen sämtlicher erhobener Untersuchungsergebnisse mit den unterschiedlichen MP-Konzentrationen.

Hierzu wurden alle klinischen Parameter aus der Basisdiagnostik (Blutdruck, Ruhefrequenz, 6MWD), der Echokardiographie und der Rechtsherzkatheteruntersuchung herangezogen.

Zusammenhänge zwischen den echokardiographisch erhobenen Daten und Mikropartikeln konnten nicht beobachtet werden.

### 4.4.1 WHO Funktionsklasse und EMPs

Im folgenden Abschnitt werden die WHO Funktionsklassen FC I und II sowie die WHO FC III und IV zusammengefasst.

Es zeigten sich unterschiedliche Verteilungen verschiedener MP Klassen bei den Patienten mit niedriger und hoher WHO FC.

	WHO FC I-II	WHO FC III-IV
<b>restpulgEMP [counts/<math>\mu</math>l]</b>	0,713 $\pm$ 0,80	1,488 $\pm$ 0,94*
<b>bright-dim-ratio [counts/<math>\mu</math>l]</b>	0,214 $\pm$ 0,104	0,156 $\pm$ 0,105*
* p < 0,05 vs. FCI-II (*) p < 0,1 vs. FC I-II <b>restpulgEMP (CD31<sup>+</sup>/CD41<sup>-</sup>/CD62E<sup>-</sup>/ACE<sup>+</sup>) ;</b> <b>brightEMP (CD31<sup>+</sup>/CD41<sup>-</sup>/ACE<sup>+</sup>/AnnexinV<sup>-</sup>)</b> <b>dimEMP (CD31<sup>+</sup>/CD41<sup>-</sup>/ACE<sup>+</sup>/AnnexinV<sup>-</sup>)</b>		

Tabelle 21 Pulmonale EMP-Populationen unterschiedlicher WHO Funktionsklasse. Dargestellt ist MW  $\pm$  SD.

Patienten mit einer WHO FC III-IV zeigten eine erhöhte Konzentration nicht aktivierter pulmonaler EMPs (CD31<sup>+</sup>/CD41<sup>-</sup>/CD62E<sup>-</sup>/ACE<sup>+</sup>) verglichen mit Patienten mit WHO FC I-II (WHO FC III-IV 1,489  $\pm$  0,94 vs WHO FC I-II 0,713  $\pm$  0,80 ; p = 0,011 ; vgl. Abb.32).

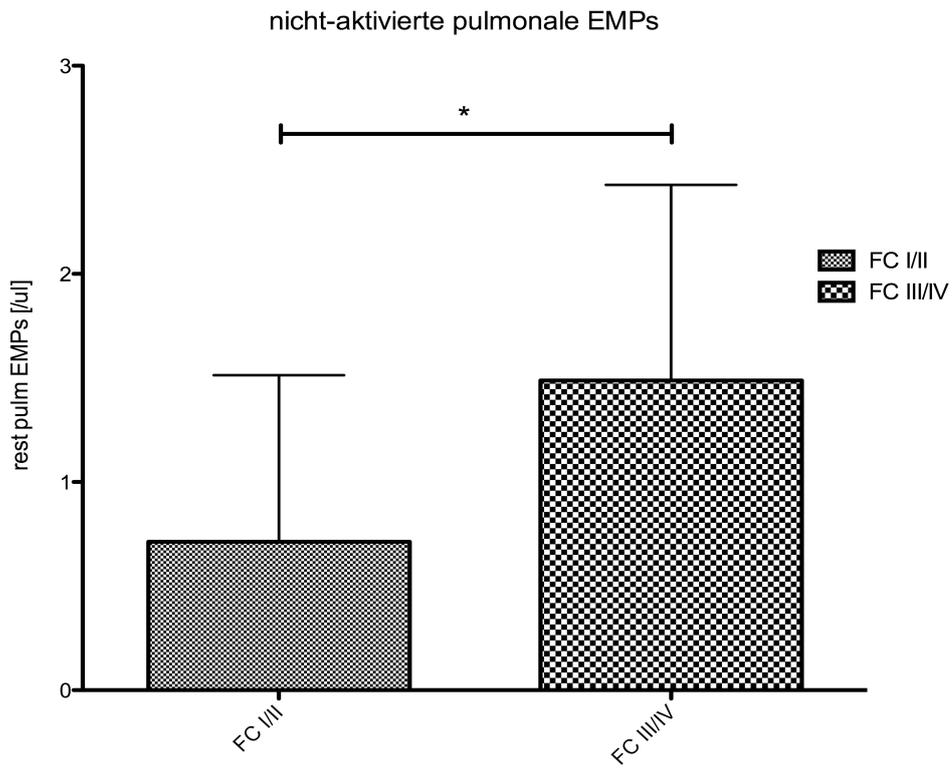


Abbildung 32 Nicht-aktivierte pulmonale EMPs bei unterschiedlicher WHO Funktionsklasse. Dargestellt sind MW ± SD.

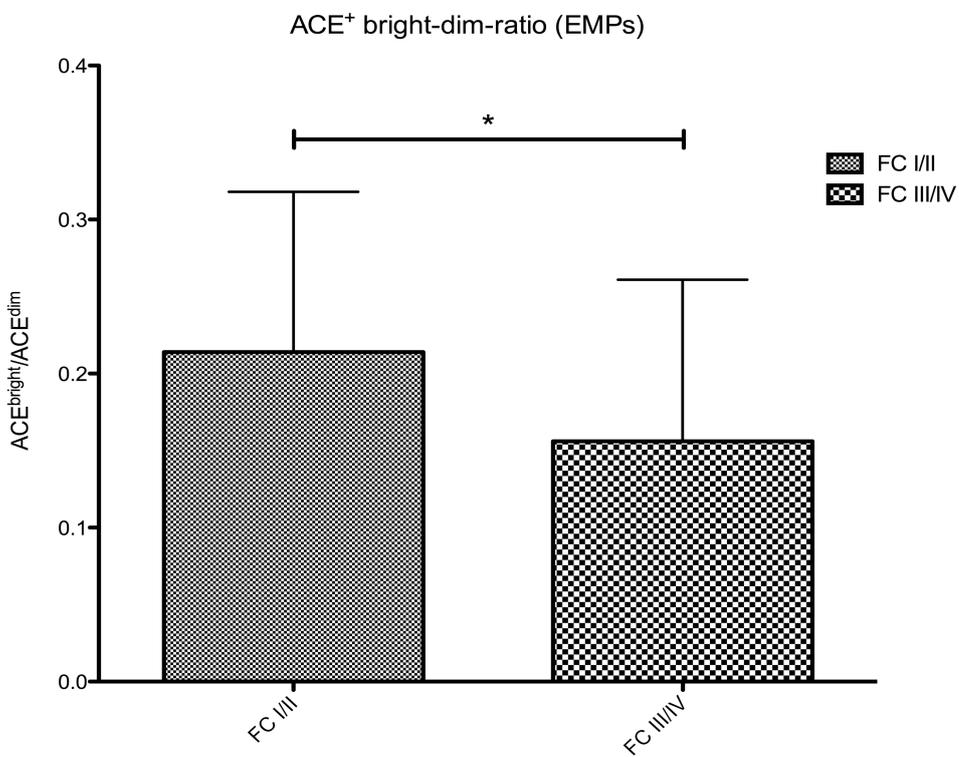


Abb. 33 ACE<sup>+</sup> Bright-dim-ratio (EMPs) bei unterschiedlicher WHO Funktionsklasse. Dargestellt sind MW ± SD.

Der Anteil ACE<sup>bright</sup> EMPs gegenüber ACE<sup>dim</sup> EMPs war bei Patienten mit einer niedrigen WHO FC also signifikant höher als bei denen mit einer höheren WHO FC (WHO FC I-II 0,214 ± 0,104 vs. WHO FC III-IV 0,156 ± 0,105; p = 0,038) (vgl. Abb. 33).

#### 4.4.2 Zusammenhang zwischen WHO Funktionsklasse und rechtsventrikulärer Arbeit

Es wurde ein Zusammenhang zwischen der WHO Funktionsklasse und der rechtsventrikulären Arbeit (RV-Work) festgestellt. Hier zeigte sich mit zunehmendem Schweregrad der Erkrankung eine verminderte rechtsventrikuläre Arbeit pro Schlag.

	WHO FC I	WHO FC II	WHO FC III	WHO FC IV
<b>RV-Work [mmHG * l/min]</b>	231	211,3±89,9 <sup>(*)</sup>	184,7±61,6	143,8±7,7

Tabelle 22 RV-Arbeit bei unterschiedlicher WHO Functional Class. Dargestellt sind MW ± SD. (\*) p < 0,1 vs. FC IV

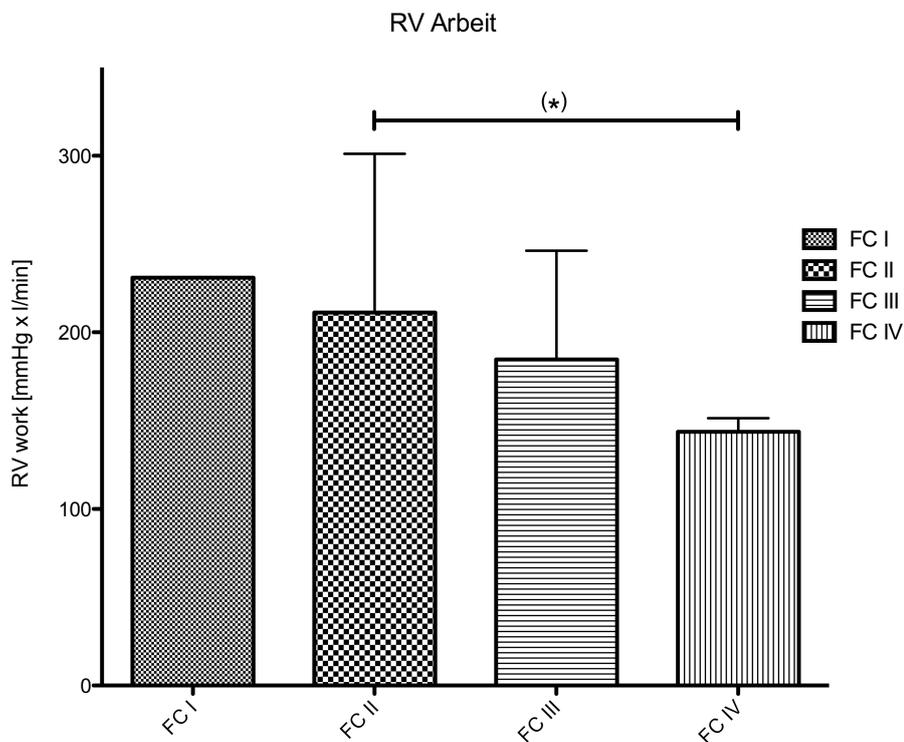


Abb. 34 Vergleich des RV-Arbeit bei unterschiedlicher WHO Funktionsklasse. Dargestellt sind MW ± SD. (\*) p = 0,056

Abbildung 34 stellt graphisch dar, wie bei zunehmendem Schweregrad der PH die Arbeit des rechten Ventrikels abnimmt. Die Unterschiede waren nicht signifikant, es zeigte sich jedoch ein statistischer Trend zwischen den Patienten der WHO FC II und der WHO FC IV (FC II  $211,3 \pm 89,9$  vs. FC IV  $143,7 \pm 7,6$ ;  $p = 0,056$ ).

#### 4.4.3 Zusammenhang invasiv gemessener hämodynamischer Parameter und pulmonaler EMPs

Die viablen pulmonalen EMPs ( $\text{AnnexinV}^-/\text{ACE}^+$ ) zeigten Korrelationen mit hämodynamischen Parametern der Patienten, die in der Rechtsherzkatheteruntersuchung gemessen wurden. Speziell die  $\text{ACE}^{\text{bright}}$  Population zeigte eine statistisch signifikante Korrelation sowohl mit der verrichteten Arbeit der Ventrikel (RV-Work / LV-Work) als auch mit dem pulmonal vaskulären Widerstand (PVR).

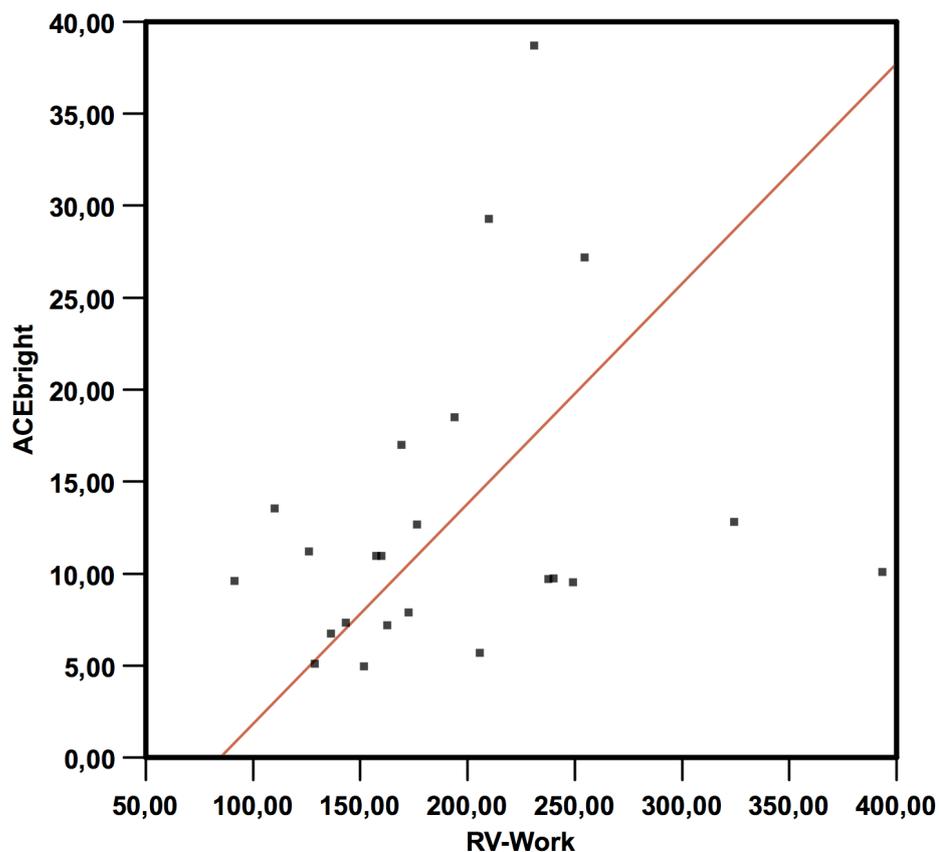


Abb. 35 Reduced major Axis Gerade (RMA-Gerade) zwischen rechtsventrikulärer Arbeit und den  $\text{ACE}^{\text{bright}}$  EMPs.

Abbildung 35 zeigt die RMA-Gerade zwischen den  $ACE^{\text{bright}}$  EMPs [counts/ul], die pulmonal endothelialen Ursprungs sind und der rechtsventrikulären Arbeit [mmHg\*l/min]. Hier zeigt sich eine positive Korrelation zwischen beiden Parametern ( $r = 0,63$  ;  $p = 0,001$ ).

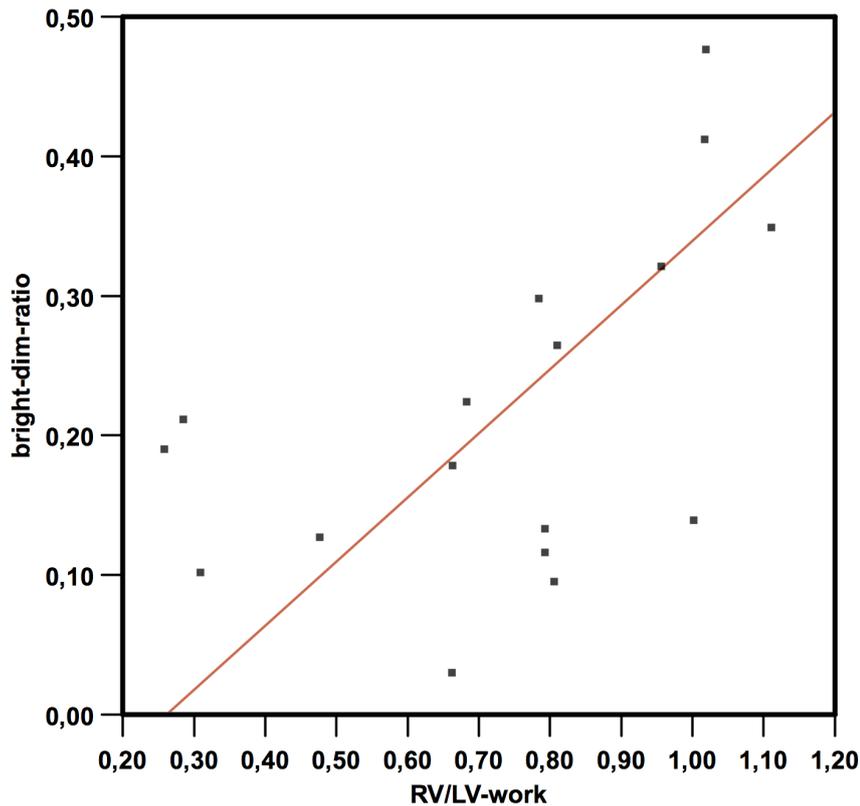


Abb. 36 Reduced major axis Gerade (RMA-Gerade) zwischen der ACE+ EMP (bright-dim-ratio) und der RV/LV Work ratio.

Die in Abbildung 36 dargestellte RMA-Gerade zeigt die Korrelation zwischen dem Verhältnis der  $ACE^+$  EMPs ( $ACE^{\text{bright}}/ACE^{\text{dim}}$  EMPs) zueinander und der Verhältnis zwischen der Arbeit des rechten Ventrikels und des linken Ventrikels (RV/LV Work) zueinander. Hier zeigt sich eine positive Korrelation zwischen beiden Variablen ( $r = 0,72$ ;  $p = 0,001$ ).

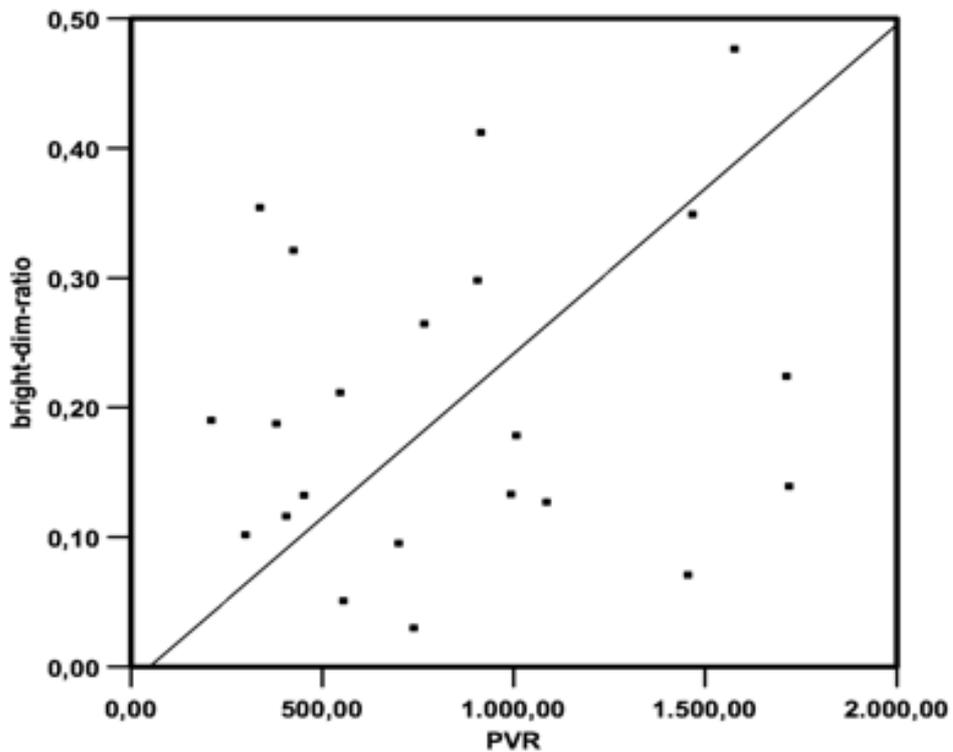


Abb. 37 Reduced major axis Gerade (RMA-Gerade) zwischen dem PVR und der ACE<sup>+</sup> EMP (bright-dim-ratio).

Auch die in Abbildung 37 dargestellte RMA-Gerade zwischen der „bright-dim-ratio“ und dem PVR zeigt ebenfalls einen positiven Zusammenhang ( $r = 0,63$  ;  $p < 0,001$ ) zwischen diesen Variablen.

## **5. Diskussion**

Zirkulierende Mikropartikel sind bei einer Reihe kardiovaskulärer Erkrankungen beobachtet worden, aber ihr zellulärer Ursprung und ihre pathogenetische Bedeutung bei PAH und CTEPH sind unzureichend verstanden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Mikropartikel-Konzentrationen verschiedener Zellreihen im Plasma bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie nachzuweisen und Zusammenhänge mit klinischen Eigenschaften der Patienten zu untersuchen. Endotheliale MPs (EMPs) wurden gesondert betrachtet und nach peripher-endotheliale oder pulmonal-endotheliale Ursprung differenziert.

Es war zu überprüfen, ob sich die Mikropartikel-Konzentrationen bzw. Zusammensetzungen bei verschiedenen Ätiologien der PH (PAH vs. CTEPH) unterscheiden und ob sich ein Zusammenhang mit globalen hämodynamischen Kenndaten darstellen lässt.

Diese Ergebnisse sowie Besonderheiten des Patientenkollektivs und methodische Limitationen der Arbeit werden im folgenden Kapitel diskutiert und den aktuellen Ergebnissen der Literatur gegenübergestellt.

### **5.1 Mikropartikel**

Die Gesamtzahl der Mikropartikel bei PH-Patienten (PAH und CTEPH) war höher als bei den Kontroll-Probanden. Die höchste Konzentration aller MPs zeigte die PAH Gruppe. Diese Konzentration unterschied sich jedoch nicht signifikant von den anderen Gruppen (Kontrollen, CTEPH). Die Gesamtzahl aller gemessenen Mikropartikel jeglicher Herkunft (z.B. endothelialen-, thrombozytären-, leukozytären- und erythrozytären-Ursprungs usw.) wird in anderen Studien nicht angegeben, sodass ein Vergleich mit anderen Arbeiten nicht vorgenommen werden kann.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der Betrachtung endothelialer Mikropartikel. Diese Ergebnisse werden detailliert im Unterkapitel 5.1.1 diskutiert.

Neben der genauen Betrachtung verschiedener EMPs erfolgte zusätzlich die Messung thrombozytärer Mikropartikel. In dieser Studie konnten keine signifikanten Unterschiede in der Konzentration der thrombozytären Mikropartikel (PMPs) zwischen PH-

Patienten und Kontrollprobanden nachgewiesen werden. Dies entspricht den Ergebnissen vieler anderer Studien. Auch hier konnten keine signifikanten Unterschiede der PMP-Konzentrationen (CD31<sup>+</sup>/CD41<sup>+</sup>) festgestellt werden (Amabile et al. 2008/2009; Bakouboula et al. 2007). Dies erscheint bei einer Erkrankung mit thrombembolischer Komponente auf den ersten Blick verwunderlich. Bei PH kommt es zu einer Thrombozyten-Aktivierung und in diesem Zuge zu einer Ausschüttung von proinflammatorischen und pro-koagulatorischen Zytokinen, die wesentlich an den thrombembolischen Komplikationen der Erkrankung beteiligt sein können. PMPs selbst enthalten Arachidonsäure und Thromboxan A<sub>2</sub>, sodass es denkbar erscheint, dass sie zu einer verstärkten Vasokonstriktion führen (Diehl et al 2011).

Es gibt mehrere Erklärungsmöglichkeiten, weshalb keine signifikanten Unterschiede bei den PMP-Konzentrationen zwischen PH-Patienten und Kontrollprobanden gefunden wurden. Denkbar ist z.B. ein erhöhter Verbrauch bzw. Umsatz von PMPs im Zuge der konstanten Aktivierung des Gerinnungssystems bei präkapillärer PH. Wissenschaftliche Belege für diese Theorie gibt es jedoch nicht. Ein anderer Grund dafür, dass sich keine erhöhten PMP-Spiegel zeigen, könnte die medikamentöse PH-Therapie der meisten Patienten sein. Tamburelli et al. 2011 zeigten eine verminderte PMP-Freisetzung unter Epoprostenol-Therapie. Diese ist die einzige Studie, die bislang gezielt den Einfluss einer PH-Therapie auf die Freisetzung von Mikropartikeln untersucht hat.

Möglicherweise sind auch methodische Ursachen dafür verantwortlich, dass sich keine signifikanten Unterschiede bei den PMPs zwischen PH-Patienten und gesunden Kontrollprobanden zeigen. Andere Studiengruppen versuchten durch verschiedene Antikörper oder veränderte Messprotokolle ein möglicherweise methodisches Problem zu umgehen. Nadaud et al. 2013 konnten eine erhöhte PMP Subpopulation (CD31<sup>+</sup>/CD41<sup>+</sup>) bei PH-Patienten feststellen, die lediglich einen Durchmesser von 0,3-0,5µm hatte. Andere Studien (Dean et al. 2009) zeigen, dass es verschiedene Größensubtypen bei PMPs gibt. Kleinere PMP Subpopulation wurden häufig im Rahmen des Gatingprozesses übersehen und folglich nicht beachtet. Es scheint jedoch lohnenswert, eine genauere Betrachtung von PMP-Subklassen zu erwägen. Aussagen über Funktion und Herkunft dieser kleineren PMPs sind jedoch erst möglich, wenn sie genauer untersucht wurden.

Diehl et al. 2011 konnte ebenfalls erhöhte PMP-Spiegel mit einem anderen thrombozytären Marker (CD31<sup>+</sup>/CD61<sup>+</sup>) bei PH-Patienten messen. Da sämtliche Studien bislang CD41 (GPIIb) als thrombozytären Marker eher erfolglos genutzt hatten und keine erhöhten PMP-Konzentrationen feststellen konnten, fiel nun die Wahl auf CD61 (GPII-

IA). Hierbei handelt es sich ebenfalls um ein Protein der Integrin-Gruppe, welches auf Thrombozyten exprimiert wird und für die Zelladhäsion zwischen Endothel und Thrombozyten zuständig ist. Ein Direktvergleich beider thrombozytärer Marker bezüglich ihrer Eignung bei der Messung von PMPs steht jedoch aus, sodass eine Aussage zu ihrer jeweiligen Qualität nicht getroffen werden kann.

Zur Studie von Diehl et al. bestehen einige wesentliche methodische Unterschiede, die möglicherweise die Ergebnisse stark beeinflussten. Diehl et al. benutzten ausschließlich frische Blutproben die innerhalb von zwei Stunden zur Messung verwandt wurden, ein Gefrierprozess fand nicht statt. Die Verarbeitung (z.B. Einfrieren, Auftauen oder Zentrifugieren) der Proben führt zu signifikanten Messunterschieden bei Mikropartikeln (Chandler 2013).

Die unterschiedlichen Ergebnisse bei der Messung von PMPs könnten somit durch pathophysiologische Unterschiede bei PH-Subgruppen bzw. durch methodische Differenzen erklärt werden. Abschließend muss festgestellt werden, dass die pathophysiologischen Prozesse, an denen PMPs beteiligt sind, bisher kaum ansatzweise verstanden werden. Deshalb müssen thrombozytäre Mikropartikel weiter Gegenstand der Forschung zum Thema PH bleiben.

### **5.1.1 Endotheliale Mikropartikel**

In der vorliegenden Arbeit war die Konzentration aller endothelialen Mikropartikel bei PH-Patienten signifikant niedriger als bei den Kontrollprobanden (vgl. Abb. 23). Insbesondere CTEPH-Patienten zeigten niedrige EMP-Konzentrationen. Dieses Ergebnis war unerwartet und wurde so noch nicht beschrieben.

Die Mehrzahl der Studien zeigte erhöhte Konzentrationen verschiedener EMP Populationen bei PH-Patienten verglichen mit gesunden Kontrollprobanden (Amabile et al. 2008; Amabile et al. 2009; Diehl et al. 2011; Nadaud et al. 2013;).

Ähnliche Ergebnisse zeigen sich bei anderen vaskulären und kardialen Erkrankungen wie Atherosklerose, arterielle Hypertonie, koronare Herzkrankheit und Herzinsuffizienz (Sinning et al. 2010). Krankheiten, die mit endothelialer Dysfunktion einhergehen, wie z.B. die koronare Herzerkrankung, weisen erhöhte EMPs Konzentrationen auf. Kommt es in der Folge zu einer hämodynamischen Kompromittierung z.B. im Rahmen einer ischämisch bedingten Herzinsuffizienz, sind die EMP Konzentrationen ebenfalls erhöht

und korrelieren teilweise mit der klinischen Prognose der Patienten (Berezin et al. 2015).

Zwischen PAH-Patienten und den Kontrollprobanden gab es keinen signifikanten Unterschied bei den EMP-Spiegeln. Dies entspricht den Ergebnissen der Studie von Bakouboula et al. 2007 bezüglich der Gesamtkonzentration von EMPs (CD31<sup>+</sup>/CD41<sup>-</sup>) und aktivierten EMPs (CD62E<sup>+</sup>) bei PAH-Patienten. Jedoch konnten Bakouboula et al. eine andere EMP-Subpopulation (CD105<sup>+</sup>) nachweisen, deren Konzentration bei PAH erhöht war.

Der methodische Ansatz beider Studien ist vergleichbar und die PAH-Patienten bei Bakouboula et al. 2007 standen häufig ebenfalls unter einer PH-spezifischen Therapie.

Die meisten anderen Studien, die erhöhte EMP-Spiegel bei PH-Patienten fanden, untersuchten Patienten ohne medikamentöse PH-Therapie bzw. mit einem geringeren Anteil medikamentös therapierter Patienten. Daten, die spezifisch die Frage behandeln wie sich Mikropartikel Konzentrationen vor und nach PH-spezifischer Therapie verändern, sind jedoch nicht ausreichend vorhanden. Auch ein unterschiedliches Patientenkollektiv mit anderer Ätiologie der PH (z.B. PH bei chronischer Lungenerkrankung) könnte Einfluss auf die unterschiedlichen Ergebnisse haben (Amabile et al. 2008; Amabile et al. 2009). Es stellt sich daher einerseits die Frage nach dem möglichen Einfluss der PH-gezielten Therapie auf die MP-Konzentrationen, andererseits ob die divergierenden Ergebnisse durch eine unterschiedliche Ätiologie der PH erklärt werden können.

Neben den erwähnten Unterschieden beim Patientenkollektiv können erneut methodische Unterschiede für die abweichenden Ergebnisse verantwortlich sein. Es wurden z.B. andere endotheliale Marker wie VE-Cadherin oder Endoglin (CD144<sup>+</sup> bzw. CD105<sup>+</sup>) verwendet, was die Vergleichbarkeit der Arbeiten erschwert. Bei Endoglin handelt es sich um einen Rezeptor für Tumor Growth Factor beta (TGF-β), der entscheidend an der endothelialen Zellproliferation und hochregulierten Angiogenese beteiligt ist (Bakouboula et al. 2007), beides wichtige pathogenetische Prozesse bei PAH. Somit erscheint es sinnvoll, weiter nach anderen endothelialen Markern zu suchen, die in den pathogenetischen Prozess der PH involviert sind.

Bei der derzeitigen Studienlage überwiegt insgesamt die Meinung, dass bei pulmonaler Hypertonie, speziell bei der PAH, erhöhte endotheliale Mikropartikel Konzentrationen messbar sind.

Bei der Betrachtung der aktivierten EMPs (CD62E<sup>+</sup>) waren diese sowohl bei PH-Patienten als auch bei gesunden Probanden nicht signifikant verändert. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Bakouboula et al. 2007. Diese konnten keine signifikanten Veränderungen der aktivierten (CD62E<sup>+</sup>) EMP-Konzentrationen bei PAH-Patienten unter PH-spezifischer Therapie feststellen. Amabile et al. 2009 hingegen konnten signifikant erhöhte Spiegel CD62E<sup>+</sup> EMPs messen. Erhöhte CD62 E<sup>+</sup> EMP-Spiegel gingen mit einer schlechteren Prognose einher, definiert als kombinierter Endpunkt aus Tod oder Rechtsherzversagen (Amabile et al. 2009). Sie korrelierten auch mit erhöhten Spiegeln leukozytärer MPs (CD45<sup>+</sup>) und höheren Spiegeln hoch sensitiven C-Reaktiven Proteins. Das betont die Rolle der Inflammation als ein wichtiger Prozess bei der endothelialen Aktivierung und deutet darauf hin, dass Inflamationsprozesse einen maßgeblichen Einfluss auf die klinische Prognose haben (Price et al. 2012).

Die Studien von Amabile unterscheiden sich in mehreren Punkten von der vorliegenden Studie. Bei Amabile bestand ein hoher Anteil des Kollektivs aus Patienten mit PH bei chronischer Lungenerkrankung (n=8/21). Ebenso war nur ein geringerer Anteil der Patienten unter einer gezielten PH-Therapie.

Neben nicht aktivierten EMPs und aktivierten EMPs wurden in dieser Arbeit auch Annexin V<sup>+</sup> EMPs gemessen, die als apoptotisch klassifiziert wurden. Die höchste Konzentration apoptotischer EMPs war bei den PAH-Patienten zu beobachten. Diese war signifikant höher als bei den CTEPH-Patienten, zeigte aber keinen Unterschied auf Signifikanzniveau zu den Kontrollprobanden.

Die unterschiedlichen Konzentrationen apoptotischer EMPs bei PAH- und CTEPH-Patienten sind mit den verschiedenen pathophysiologischen Entstehungsmechanismen der Erkrankungen vereinbar. Speziell bei PAH beobachtet man eine Dysbalance zwischen endothelialer Zellproliferation und endothelialer Apoptose (Tu et al. 2011). Initial scheint die PAH mit einer verstärkten Apoptoseaktivität einherzugehen und im fortgeschrittenen Stadium kommt es dann zu einer verminderten Apoptoseaktivität. Diese ist durch einen Apoptose-resistenten endothelialen Phänotyp bedingt (Tu et al. 2011). Die unkontrollierte endotheliale Zellproliferation nimmt in der Folge im fortgeschrittenen Erkrankungsstadium zu (Sakao et al. 2005).

In der frühen Phase der Apoptose kommt es zu einer deutlichen Veränderung der Zelloberfläche, es kommt zu einer Verlagerung von Phosphatidylserin vom Zellinneren auf die Außenseite der Zellmembran. Annexin V bindet Calcium-abhängig Phosphatidylse-

rin mit hoher Affinität und ist somit geeignet, apoptotische Zellen zu detektieren. Annexin V bietet eine einfache und sensitive Möglichkeit apoptotische Zellen zu markieren. Eine spezifische Diskriminierung zwischen nekrotischen und apoptotischen Zellen ist jedoch mit einer einfachen Annexin V-Färbung, wie in dieser Studie, nicht sicher möglich, da Phosphatidylserin auch bei Nekrose exprimiert wird. Zur sicheren Diskriminierung zwischen Nekrose und Apoptose ist somit eine Doppelfärbung mit Annexin V und einem Marker, der eine intakte Zellmembran anzeigt, z.B. Propidium Iodid (Vermees et al. 1995) oder 7-Aminoactinomycin (7-AAD), angezeigt. Diese Methoden sind jedoch bei der Färbung von Zellen mit intakter Zellmembran und intakter Doppelstrang DNA etabliert – somit scheint eine Verwendung bei Mikropartikeln weder sinnvoll noch etabliert.

Aufgrund der bereits verwandten Vierfachfärbung musste auch aus technischen Gründen auf eine ergänzende Färbung verzichtet werden. Es kann daher nicht mit Sicherheit zwischen Mikropartikeln mit Ursprung aus einer Apoptose oder Nekrose unterschieden werden. Trotzdem wurde Annexin V<sup>+</sup> in der vorliegenden Untersuchung, wie in den meisten Arbeiten, als Apoptosemarker verwandt, der als Zeichen eines geschädigten Endothels interpretiert wird und bei Patienten mit pulmonalen Erkrankungen vermehrt auftritt (z.B. Gordon et al. 2011).

### **5.1.2 ACE als Marker für MPs pulmonalen Ursprungs**

Da speziell die PAH als vaskuläre Systemerkrankung gilt, war es von besonderem Interesse festzustellen, ob die verschiedenen EMP Subpopulationen eher aus der pulmonalen Strombahn kommen oder stärker vom peripheren Endothel abstammen.

Bereits Bakouboula et al. 2007 gingen in ihrer Studie dieser Frage nach, indem die Blutproben sowohl aus dem Systemkreislauf (V. jugularis) als auch aus der Lungenstrombahn (A. pulmonalis über Swan Ganz Katheter in Wedge Position) entnommen wurden. Hier fanden sich bei PAH Patienten erhöhte Konzentrationen Annexin V<sup>+</sup> und CD105<sup>+</sup> EMP-Konzentration verglichen mit Proben, die aus dem Systemkreislauf (V. jugularis) entnommen wurden. Diese Technik ist zur Klärung dieser Problematik nur unzureichend geeignet, da eine gewisse Clearance-Funktion der Lunge nicht berücksichtigt wird. Technisch ist es nicht bei allen Patienten möglich, in Wedge-Position

überhaupt Blut zu gewinnen. Zusätzlich kann es sich hierbei auch um arterialisiertes Blut handeln, welches bereits das linke Atrium passiert hat und somit ist eine Differenzierung pulmonaler und peripherer EMPs nicht sicher gegeben.

In unserer Arbeit wurde Angiotensin Converting Enzyme (ACE) als Marker für pulmonales Endothel gewählt, weil ACE verstärkt vom pulmonalen Endothel gebildet wird und somit ein potenzieller Marker für Mikropartikel pulmonale-endothelialen Ursprungs sein kann (Schuster et al. 1996; Gordon et al. 2011).

ACE ist eine Zink-abhängige Peptidase, die im ganzen Körper von verschiedenen Zelltypen exprimiert wird (Schuster et al. 1996) und eine entscheidende Rolle bei der Blutdruckregulation über das RAAS-System besitzt.

Bereits im Tiermodell stellte sich ACE als guter Marker des pulmonalen Endothels dar, der über einen monoklonalen Antikörper detektierbar war (Balyasnikova et al. 2010). Gordon et al. 2011 verwandten den monoklonalen Antikörper gegen ACE (CD143), um pulmonal-endotheliale EMPs ( $CD31^+/CD42b^-/CD62^+/Annexin V^+$ ) als Zeichen eines pulmonalen Schadens bei Rauchern festzustellen. Es zeigten sich bei den Rauchern erhöhte Spiegel von apoptotischen EMPs ( $CD31^+/CD42^-/Annexin V^+$ ), von denen die Mehrzahl  $ACE^+$  waren. Dies legte den Verdacht nahe, dass diese EMPs pulmonalen Ursprungs waren.  $ACE^+$  EMPs wurden in der vorliegenden Arbeit ebenfalls als pulmonal klassifiziert.

ACE wird verstärkt im pulmonalen Endothel exprimiert, besonders in Fällen, bei denen ein verstärktes vaskuläres Remodelling stattgefunden hat. Schuster et al. 1996 zeigten über immunhistochemische Färbungen der Pulmonalarterien bei PAH-Patienten, die zur Herz-Lungen-Transplantation anstanden, eine deutlich verstärkte Expression von ACE im pulmonalen Endothel gegenüber den Kontrollen.

Eine interessante und neue Beobachtung dieser Arbeit war der Nachweis zweier nicht-apoptotischer ACE-exprimierender EMP Populationen ( $ACE^+ / Annexin V^-$ ). Eine dieser Populationen, die ein stärkeres FSC-Signal zeigte, wurde als  $ACE^{bright}$  deklariert, während die quantitativ größere aber schwächere  $ACE^+$  Population als  $ACE^{dim}$  bezeichnet wurde (vgl. Abbildung 28). Unsere Hypothese geht davon aus, dass es sich bei den  $ACE^+$  EMPs um pulmonale EMPs handelt, da das pulmonale Endothel der Ort der stärksten ACE-Expression ist.

Für diese zwei unterschiedlichen  $ACE^+$  EMP Populationen gibt es jedoch mehrere denkbare Erklärungen. Es wäre z.B. möglich, dass es sich bei beiden Populationen um

pulmonale EMPs (des gleichen zellulären Ursprungs) mit lediglich unterschiedlicher ACE Exprimierung auf der Oberfläche handelt. ACE<sup>bright</sup> und ACE<sup>dim</sup> könnten jedoch auch 2 unterschiedliche Phänotypen pulmonaler Endothelzellen darstellen. Es ist letztlich auch nicht ausgeschlossen, dass es sich bei einer oder gar den beiden Populationen überhaupt um EMPs handelt, die aus der Pulmonalstrombahn stammen, da ACE auch in geringerem Maße von anderen Zellen produziert wird. Eine definitive Erklärung für das beschriebene Phänomen zweier unterschiedlicher ACE<sup>+</sup> Populationen kann an dieser Stelle nicht gegeben werden. Eine gesonderte Betrachtung beider Populationen (ACE<sup>bright</sup> und ACE<sup>dim</sup>) ist jedoch lohnenswert, wie die folgenden Ausführungen zeigen:

Die pulmonale EMP-Population ACE<sup>bright</sup> wurde in dieser Studie nochmals gesondert betrachtet und zeigte sowohl mit dem PVR als auch mit der RV-Arbeit der Patienten eine positive Korrelation. Ein solcher Zusammenhang wurde bisher in der Literatur noch nicht beschrieben.

Diese Hypothese kann unter der Annahme weiterverfolgt werden, dass es durch pathologische Veränderungen des Endothels der Lungenstrombahn zu einer Veränderung der Scherkräfte als Basis für eine Bildung von Mikropartikeln kommt. Demnach wäre die Freisetzung von MPs aus der Pulmonalstrombahn abhängig von der notwendigen Arbeit des rechten Ventrikels, während die Freisetzung peripherer EMPs von der Arbeit des linken Ventrikels abhängt. Dies wurde untermauert durch die Korrelation des Verhältnisses der ACE<sup>bright</sup> / ACE<sup>dim</sup> EMPs mit dem Verhältnis der ventrikulären Arbeit RV / LV (vgl. Abb. 36). Die rechtsventrikuläre Arbeit ist als das Produkt aus dem Schlagvolumen und dem mittleren pulmonal arteriellen Druck definiert (Katz 2011). Bei PH kommt es durch den erhöhten PVR auch zu einem erhöhten PAPm und somit steigert sich die rechtsventrikuläre Arbeit. Im pulmonalen Stromgebiet kommt es folglich zu einer erhöhten Fließgeschwindigkeit des Blutes und zu erhöhten Scherkräften, die auf das Endothel und die Thrombozyten wirken. Dies ist eine mögliche Grundlage für eine verstärkte MP-Ausschüttung (Nomura et al. 2001).

Die höchsten Konzentrationen apoptotischer EMPs fanden sich bei den PAH Patienten. Sowohl die pulmonalen EMPs als auch die peripheren EMPs der PAH-Patienten waren signifikant höher als bei den CTEPH-Patienten, nicht jedoch gegenüber den Kontrollprobanden. Die erhöhten Konzentrationen apoptotischer EMPs bei PAH Patienten verglichen mit CTEPH Patienten sind als mögliche Zeichen des endothelialen Schadens bzw. der endothelialen Dysfunktion bei PAH zu sehen. Die Tatsache, dass nicht nur ein Schaden des pulmonalen Endothels (ACE<sup>+</sup>), sondern auch des gesamten Endothels

(ACE<sup>-</sup>) bei den PAH Patienten gegenüber den CTEPH Patienten zu beobachten war, ist mit der Pathogenese der PAH vereinbar und unterstützt die These, dass es sich bei der PAH tatsächlich um eine Panvaskulopathie handelt.

Lensch 2013 zeigte, dass eine periphere Dysfunktion des Endothels bei Patienten mit PH besteht. Zu ähnlichen Ergebnissen waren bereits die Autoren Dibble et al. 2012 im Rahmen der MESA-Studie gekommen. Hier konnte ein Zusammenhang zwischen der rechtsventrikulären Funktion und dem Durchmesser der A. brachialis (stellvertretend für die periphere endotheliale Funktion) gezeigt werden. Trotz der unterschiedlichen Methoden zur Kennzeichnung pulmonal-endothelialer Mikropartikel zeigen die Ergebnisse dieser Studie deutliche Parallelen zur Studie Bakouboulas et al. 2007. Die hier aus der Pulmonalarterie in Wedge Position entnommenen Proben von PAH-Patienten zeigten ebenfalls eine erhöhte Konzentration apoptotischer MPs. Diese Konzentration war im Gegensatz zur vorliegenden Studie sogar signifikant höher als die apoptotischen MP-Konzentrationen aus dem großen Kreislauf (Jugularvene/Peripherie).

Des Weiteren waren in der vorliegenden Untersuchung sowohl bei den Kontrollprobanden als auch bei den PH-Patienten insgesamt höhere Konzentrationen aktivierter pulmonaler EMPs zu beobachten als bei den aktivierten peripheren EMPs. Umgekehrt waren die Spiegel ruhender, peripherer EMPs (CD62E<sup>-</sup>) in allen Populationen höher als die pulmonalen EMP-Spiegel. Bei den peripheren EMPs war ebenfalls bei den PAH-Patienten die Konzentration am höchsten und zeigte einen statistischen Trend gegenüber den CTEPH-Patienten (PAH  $12,05 \pm 0,90$  vs. CTEPH  $0,47 \pm 1,30$   $p = 0,058$ ). Die methodisch bedingt hohen Streuungen der Messdaten würden zur Bestätigung dieser Beobachtungen erheblich höhere Patientenzahlen erfordern. Dies stößt angesichts der strengen Selektionskriterien dieser Untersuchung und des hohen Bedarfs an Ressourcen, welche eine Messung von Mikropartikeln erfordert, an die Grenzen der Machbarkeit.

Die endotheliale Aktivierung und der Endothelschaden sind entscheidende Bestandteile der Pathogenese der pulmonalen Hypertonie, die Prozesse des endothelialen Umbaus bleiben jedoch weiterhin größtenteils unverstanden. Ein klarer Zusammenhang zwischen aktivierten EMPs und dem damit verbundenen Endothelschaden kann anhand dieser Ergebnisse nicht getroffen werden.

Da sowohl AnnexinV<sup>+</sup> EMPs peripheren als auch pulmonalen Ursprungs bei den PAH-Patienten nachweisbar waren, wird die These unterstützt, dass es sich bei der PAH um eine Panvaskulopathie mit endothelialer Dysfunktion handelt.

Die Verwendung von ACE zur Differenzierung zwischen pulmonalem und peripherem Endothel könnte eine interessante Alternative zur weitaus invasiveren und aufwendigeren Probenentnahme aus dem pulmonalen Kreislauf sein. Eine direkte Vergleichsstudie beider Methoden an der gleichen Population wäre jedoch zur Klärung dieser Frage notwendig.

## **5.2 Studienkollektiv**

### **5.2.1 Basischarakteristika und anthropometrische Daten**

Das mittlere Alter der Patienten dieser Studie betrug  $55,46 \pm 15,50$  Jahre und unterschied sich nicht signifikant vom mittleren Alter der Kontrollgruppe ( $50,35 \pm 15,50$  Jahre). Die Geschlechterverteilung zeigte mit 73% einen wesentlich höheren Anteil weiblicher Patienten. Sowohl die Geschlechterverteilung als auch das Durchschnittsalter entsprechen in etwa den epidemiologischen Daten des REVEAL Registers aus den USA. Hierbei handelt es sich um eine multizentrische US-amerikanische Studie, die Patienten mit PAH rekrutiert und über mindestens 5 Jahre nachverfolgt. Das mittlere Alter der Patienten betrug  $53 \pm 14$  Jahre, 79% der PAH Patienten waren weiblich (Badesch et al. 2010). Das multizentrische europäische COMPERA-Register rekrutiert seit 2007 Patienten mit PAH und sammelt Daten zu Inzidenz, Prognose und Therapie. Das Durchschnittsalter liegt hier bei 71 Jahren und 59% der Patienten sind weiblich (Hoepfer 2013).

Vergleichbare Studien, die sich mit Mikropartikeln bei pulmonaler Hypertonie auseinandersetzten, zeigten ein ähnliches mittleres Alter und eine ähnliche Geschlechterverteilung wie das Patientenkollektiv der vorliegenden Studie:  $53,7 \pm 3,0$  Jahre und 63% weiblich (Amabile et al. 2008),  $54 \pm 17$  Jahre und 60% weiblich (Bakouboula et al. 2007). Dies entspricht auch der höheren Inzidenz und Prävalenz der PAH beim weiblichen Geschlecht.

Bei der Altersverteilung in unserer Studie war in der Subgruppenanalyse das Alter in der CTEPH-Gruppe mit  $59,20 \pm 14,17$  Jahren signifikant höher als in der PAH-Gruppe mit  $50,36 \pm 16,42$  Jahren. Diese Verteilung in unserer Studienpopulation entspricht epidemiologischen Daten, die ein höheres medianes Alter bei CTEPH Patienten feststellten (Bonderman et al. 2009). Eine Erklärung hierfür könnte in der Ätiologie der PH zu fin-

den sein. So liegt gemäß der o.g. Klassifikation der PH von 2015 bei Patienten mit PAH eine familiäre, genetische, medikamenten-assoziierte Genese oder ein angeborenes kardiales Shuntvitium vor. Diese Erkrankungen haben naturgemäß eine frühere Manifestation. Hingegen wird der CTEPH ein chronisch thromboembolisches Geschehen zugeschrieben und die Erkrankung tritt häufiger in einem höheren Lebensalter auf.

Die anthropometrischen Grunddaten wie Gewicht und Körpergröße zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Studienpopulationen, was die Homogenität des gesamten Studienkollektivs unterstreicht.

### **5.2.2 Medikamentöse Begleitfaktoren**

Zum Zeitpunkt der Untersuchung nahmen 17 von 26 Studienteilnehmern eine gezielte Medikation (PDEI, ERAs, PC, CCB) ein, sowohl als Monotherapie als auch als Kombinationstherapien. Nur einer von 11 PAH-Patienten nahm zum Zeitpunkt der Untersuchung noch keine gezielten PH-Medikamente ein. Bei den anderen 8 Studienteilnehmern ohne medikamentöse PH-Therapie handelte es sich um CTEPH-Patienten. Das erklärt sich durch die zum Zeitpunkt der Studie fehlenden medikamentösen Optionen für Patienten mit CTEPH. Erst nach der CHEST-1 Studie 2013 wurde Riociguat zugelassen (Ghofrani 2013).

Die gezielte Medikation bei Patienten mit PAH hatte eine Besserung der Hämodynamik, der Funktionsklasse, der klinischen Belastbarkeit und des Überlebens zur Folge. Nach den Zulassungsstudien waren daher keine placebokontrollierten Studien mehr durchgeführt worden, da dies zu diesem Zeitpunkt nicht mehr ethisch vertretbar gewesen wäre. Es war daher auch in dieser Studie nicht möglich, die Medikation zu pausieren oder eine ausreichende Anzahl Therapie-naiver Patienten zu rekrutieren.

Die Tatsache, dass die Mehrzahl der Patienten zum Zeitpunkt der Untersuchungen eine suffiziente medikamentöse Therapie erhielt, verändert den Hintergrund, vor dem die Ergebnisse dieser Studie zu betrachten sind. So zeigte sich in mehreren Studien, dass Medikamente, die die Endothelfunktion (Prostaglandine, Prostacycline, Kalziumkanalblocker) oder die Thrombozytenfunktion (Abciximab, Cilostazol, Clopidogrel, Aspirin) beeinträchtigen, zu signifikanten Senkungen sowohl der EMP- als auch der PMP-Konzentrationen im Plasma führen können (Morel et al. 2006; Tamburrelli et al. 2011).

Speziell der Kalziumkanalblocker Nifedipin führte im Verlauf einer Studie mit Patienten, die eine transitorisch ischämische Attacke erlitten hatten, zu einer deutlichen Verringerung der thrombozytären Mikropartikel (Lee et al. 1993).

Auch andere Medikamente wie Fibrate, Statine,  $\beta$ -Blocker, Sartane und Antioxidantien, z.B. Vitamin C, erzeugten eine relevante Senkung verschiedener zirkulierender MP-Populationen im Plasma (Morel et al. 2006).

Sämtliche PH-spezifischen Medikamente haben einen starken Einfluss sowohl auf die Endothelfunktion als auch auf die Thrombozytenfunktion. Ein Einfluss auf die MP-Freisetzung bzw. auf die MP-Spiegel im Plasma ist somit auch bei den PH-spezifischen Medikamenten sehr wahrscheinlich. Tamburelli et al. 2011 zeigten eine verminderte thrombozytäre MP-Freisetzung unter Epoprostenol. Für die anderen PH-gezielten Medikamentengruppen (ERA, PDEI, sGC) gibt es keine Studien, die deren direkten Einfluss auf die MP-Freisetzung untersuchen. Auch ein direkter Vergleich der Mikropartikel zwischen Therapie-naiven PH-Patienten und PH-Patienten unter medikamentöser Therapie steht aus.

Die teilweise niedrigeren EMP- und PMP-Konzentrationen in dieser Studie bei PH-Patienten im Vergleich mit den gesunden Kontrollen könnten möglicherweise durch die medikamentöse Therapie der Patienten bedingt sein. Ein signifikanter Unterschied zwischen den therapierten und den nicht-therapierten Patienten im Gesamtkollektiv zeigte sich allerdings nicht. Um hier eine adäquate Analyse durchzuführen, müssten therapiebedingte Unterschiede innerhalb der Subgruppen detektiert werden. Die Patientenzahl der jeweiligen Subgruppe ist hierfür doch nicht ausreichend.

Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit konnten andere Studiengruppen (Amabile et al. 2008 und Amabile et al. 2009) erhöhte nicht-aktivierte und aktivierte EMP-Level ( $CD31^+/CD41^-$  und  $CD62E^+$ ) bei PH-Patienten nachweisen. Diese Patienten erhielten jedoch mehrheitlich noch keine PH-spezifischen Medikamente. Bakouboula et al. 2007 konnte, wie in der vorliegenden Arbeit, bei bereits therapierten PH-Patienten ebenfalls keine signifikant erhöhten EMP-Konzentrationen ( $CD31^+/CD41^-$  und  $CD62E^+$ ) nachweisen.

Die medikamentöse PH-Therapie könnte die verschiedenen MP-Konzentrationen beeinflussen und muss bei der Interpretation der teils unterschiedlichen Ergebnisse berücksichtigt werden.

### **5.3 Zusammenhänge zwischen klinischen Parametern und Mikropartikeln**

Während die vorgenannten Analysen der Frage nachgingen, ob es einen Zusammenhang der Mikropartikelkonzentration mit der Ätiologie der Erkrankung oder der spezifischen medikamentösen Therapie gibt, soll im Folgenden der Hypothese nachgegangen werden, ob die pulmonale Hämodynamik mit der Freisetzung von Mikropartikeln assoziiert ist.

Falls ein Zusammenhang zwischen der Ätiologie der Erkrankung und der Freisetzung von Mikropartikeln besteht, so könnte auch eine Assoziation mit dem Ausmaß der vaskulären Veränderungen assoziiert sein. Andererseits könnte unabhängig von der genauen Ätiologie eine vaskuläre Schädigung durch die Ausschüttung von Mikropartikeln angezeigt werden. Diese Fragen sind mit dem jetzigen Wissensstand jedoch noch nicht hinreichend zu beantworten.

Es scheint sich bei Mikropartikeln um einen Teil eines Regulationsmechanismus der Gefäße zu handeln. Mikropartikel könnten im Sinne eines „second messenger“ Systems die vaskuläre Homöostase positiv und negativ beeinflussen (Dignat-George 2011).

Die vorliegende Studie ergab keine Assoziationen zwischen den EMPs ( $CD31^+ CD41^-$ ) und hämodynamischen Parametern der Patienten. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von Amabile et al. 2008, welcher positive Korrelationen der EMPs mit dem PAPm und dem PVR nachweisen konnte. Amabile definierte die EMPs teilweise unterschiedlich z.B. mit anderen Markern ( $CD31^+/CD144^+$ ) und beobachtete damit eine geringfügig andere Subpopulation als die hier vorliegende Untersuchung. EMPs ( $CD31^+/CD41^-$ ;  $CD11^+$ ) konnten Hinweise auf den hämodynamischen Schweregrad (PAPm oder PVR) der Erkrankung geben. Erhöhte Konzentrationen E-Selectin<sup>+</sup> ( $CD62E^+$ ) EMPs gingen mit einer schlechten Prognose der Patienten einher, was sich aus der Analyse der jeweiligen Kaplan-Meier-Kurven ergab. Jedoch korrelierten diese aktivierten EMPs, die mit einer schlechteren klinischen Prognose einhergehen, nicht mit den hämodynamischen Parametern der Patienten (Amabile et al. 2009). Eine Analyse von Mortalitätsdaten erschien angesichts der geringen Patientenzahlen in unserer Arbeit als nicht sinnvoll.

Während die genannten Studien vornehmlich EMPs aus sämtlichen Stromgebieten ohne Differenzierung der Herkunft analysierten, bemüht sich die vorliegende Arbeit eine Unterscheidung zwischen pulmonalen und peripheren Mikropartikeln vorzunehmen. Es konnten in der Analyse der entsprechenden Subgruppen Zusammenhänge zwischen pulmonalen EMPs und hämodynamischen Kennzahlen bzw. zwischen dem Verhältnis von pulmonalen und peripheren EMPs und der globalen Hämodynamik festgestellt werden.

Es konnte in diesem Studienkollektiv eine Assoziation der ACE<sup>bright</sup> EMP Population sowohl mit dem PVR ( $r = 0,628$ ) als auch mit der rechtsventrikulären Arbeit ( $r = 0,631$ ) nachgewiesen werden. Die rechtsventrikuläre Arbeit setzt sich aus dem PAPm und dem Schlagvolumen des rechten Ventrikels zusammen und stellt einerseits ein Maß der Belastung des rechten Ventrikels dar, andererseits weist sie auf die Energieaufnahme der pulmonalen Strombahn hin. Hieraus könnte die Schlussfolgerung gezogen werden, dass eine erhöhte rechtskardiale Belastung bzw. ein erhöhter pulmonal arterieller Widerstand mit einer verstärkten Ausschüttung pulmonaler EMPs, z.B. durch stark erhöhte Scherkräfte im pulmonalen Stromgebiet, einhergeht.

Die pulmonale Hypertonie wird wesentlich durch hämodynamische Parameter in Ruhe definiert (PAPm). Oft wird die maßgebliche Einschränkung eines Patienten jedoch erst unter Belastung erkennbar und auch die Definition einer Herzinsuffizienz beschreibt (neben anderen Definitionen) das Unvermögen des Herzens zur Steigerung des Herzzeitvolumens zur Deckung eines gesteigerten Bedarfs unter Beibehaltung der Füllungsdrücke (Katz 2011).

Es erscheint daher sinnvoll, nach Assoziationen von Mikropartikeln sowohl mit hämodynamischen Variablen, als auch mit Parametern der Belastbarkeit zu suchen. Die Hämodynamik stellt zwar die Basis der Belastungseinschränkung dar, jedoch ist es nicht möglich, allein durch hämodynamische Kenngrößen auf die körperliche Einschränkung des Patienten zu schließen.

Es handelt sich bei den üblichen Parametern der Belastbarkeit um unterschiedliche Zielgrößen, d.h. um Parameter, welche zwar einerseits die körperliche Leistungsfähigkeit beschreiben, andererseits jedoch nicht vergleichbar sind, weil sie unterschiedliche Belastungsformen beinhalten. Somit sind Sechs-Minuten-Gehtest, Spiroergometrie oder die WHO Funktionsklasse keine austauschbaren Maße der Belastbarkeit und müssen einzeln betrachtet werden.

In der vorliegenden Untersuchung konnten Veränderungen der MP Populationen bei unterschiedlicher WHO Funktionsklasse festgestellt werden. Die Patienten aus den WHO Funktionsklassen III und IV zeigten gegenüber den Patienten der WHO Funktionsklassen I und II höhere Konzentrationen pulmonaler, nicht-aktivierter EMPs. Dieses Ergebnis widerspricht auf den ersten Blick den Ergebnissen von Amabile et al. aus dem Jahr 2009, die zeigten, dass erhöhte Konzentrationen CD62E<sup>+</sup> (aktivierter) EMPs mit einer schlechteren Prognose der Patienten einhergingen.

Es ist daher zu vermuten, dass auch Patienten in einer höheren WHO Funktionsklasse ebenfalls erhöhte Plasmaspiegel CD62E<sup>+</sup> EMPs aufweisen sollten. Zieht man jedoch in Betracht, dass die Patienten aus der vorliegenden Arbeit bereits eine gezielte PH-Therapie erhielten, speziell bei diesem fortgeschrittenen Schweregrad der Erkrankung, so sind die Ergebnisse dieser Studie mit der von Amabile et al. nicht direkt vergleichbar.

Zum Zeitpunkt der Untersuchung der MPs standen die meisten Patienten aus der anderen Studiengruppe nicht unter einer medikamentösen PH-Therapie, was auch eine deutlich veränderte hämodynamische Situation erzeugt. So zeigten die Patienten aus der vorliegenden Arbeit mit steigender WHO Funktionsklasse eine sinkende verrichtete rechtsventrikuläre Arbeit in Ruhe. Auch die Konzentrationen der pulmonalen ACE<sup>bright</sup> EMPs waren in den WHO Funktionsklassen I und II höher als in den Klassen III und IV ( $p=0,038$ ), möglicherweise weil der rechte Ventrikel hier bereits insuffizient arbeitete. Bakouboula et al. 2007 zeigten, dass PH-Patienten aus den WHO Funktionsklassen III und IV mit einer stark eingeschränkten 6-Minuten-Gehstrecke (6MWT) deutlich erhöhte Konzentrationen TF<sup>+</sup> (Tissue Factor<sup>+</sup>) MPs im Blut aufwiesen. Bei diesen MPs handelt es sich jedoch um prokoagulatorische MPs, die nicht direkt mit den in dieser Arbeit untersuchten Subpopulationen vergleichbar sind.

Hinsichtlich der Beurteilung der kardialen Funktion kommt der Echokardiografie eine herausragende Bedeutung zu. Während die Druckparameter die Domäne der invasiven Messung sind, ist die Echokardiografie in der Lage, kardiale Belastungssituationen anhand morphologischer Kriterien besser einzuordnen. Dennoch zeigten sich in dieser Studie keine greifbaren Zusammenhänge zwischen echokardiographischen Daten und MP-Konzentrationen.

## 5.4 Methodenkritik und Limitationen dieser Arbeit

Diese Arbeit ist verschiedenen Limitationen unterworfen. Die Messung von Mikropartikeln mit einer vierfach-Antikörperfärbung mittels Durchflusszytometrie stellt eine technische Herausforderung dar, die mit einer Reihe von Fehlermöglichkeiten verbunden sein kann.

Die erste Schwierigkeit liegt bereits in der Natur der Mikropartikel: Zellen reagieren schon auf geringste Reize mit der Freisetzung von Mikropartikeln, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Bei gesunden Menschen reicht z.B. eine Mahlzeit aus, um eine signifikante Erhöhung verschiedener Mikropartikel-Populationen hervorzurufen (Morel et al. 2006). Die besondere Stärke der vorliegenden Arbeit liegt in dem homogenen Patientenkollektiv infolge strenger Ausschlusskriterien und der Vereinheitlichung der Untersuchungsbedingungen. Zusätzlich zu den schwankenden Konzentrationen von Mikropartikeln *in vivo* kommen auch die erheblichen Einwirkungen auf die MP-Populationen hinzu, die bereits durch die Verarbeitung der Blutproben entstehen: Zentrifugation, die Wahl verschiedener Antikoagulanzen, der Aufbewahrungszeitraum und die Aufbewahrungstemperatur beeinflussen allesamt signifikant die Mikropartikel-Zusammensetzung in den Proben (Shah et al. 2008). Auch hier wurde besonderer Wert auf die präanalytische Behandlung des Probenmaterials gelegt, so dass von einer minimalen Schwankung der Bedingungen zwischen den Probanden ausgegangen werden kann. Zentrifugation gilt als einer der Hauptgründe für die Schwankungen von Mikropartikeln in Proben. Bereits eine zweifache Zentrifugation des Blutes zu Platelet free Plasma (PFP) reduzierte die Anzahl von PMPs um 99% und von Annexin V<sup>+</sup> MPs um 80% verglichen mit dem Ausgangswert im Platelet rich Plasma (PRP) (Chandler 2013).

Die in dieser Arbeit durchgeführte zweifach Zentrifugation der Proben, zuerst bei (1800g für 20min) und dann bei (1500g für 5min), entspricht in etwa den Protokollen anderer Studien (Diehl et al. 2011). In unserer Studie erfolgte die Zentrifugation der Proben jedoch nicht bei Raumtemperatur, sondern bei 4°C, da die Proben zuvor bei 4°C im Kühlschrank mit Antikörpern inkubiert wurden. Die ausführlichen Vorversuche zu dieser Studie wurden bereits im Methodik-Teil dargelegt. Sie umfassten sowohl verschiedene Schemata der Zentrifugation und wiederholte Auftauvorgänge.

Die Aufbewahrung der Plasmaproben fand bei -20°C statt und die Proben waren teilweise über einen Zeitraum von mehr als einem Jahr gelagert. Die Lagerung gefrorener

Proben führt bereits nach vier Wochen zu einer signifikanten Erniedrigung von PMPs, EMPs und apoptotischer MPs (Shah et al. 2008). Dies könnte eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse der verschiedenen Studiengruppen sein. So wurden für die erste Untersuchung, in der erhöhte PMP-Level bei PH-Patienten festgestellt wurden, maximal zwei Stunden alte Proben verwendet, die nicht gefroren waren (Diehl et al. 2011). Es war in der vorliegenden Arbeit in Hinblick auf die Komplexität des Protokolls nicht möglich, frische Proben von Patienten zu generieren, die letztlich unter einer sehr seltenen Erkrankung leiden und zusätzlich den genannten strengen Einschluss- bzw. Ausschlusskriterien unterliegen. Eine Besonderheit der vorliegenden Arbeit ist die Verwendung von CTAD als Antikoagulanzen. Das standardmäßig verwendete Antikoagulanzen bei der Untersuchung von MPs bei PH-Patienten ist ausschließlich Citrat. CTAD soll zu einer geringeren Aktivierung der Thrombozyten und damit zu einer niedrigeren Freisetzung von MPs in vitro führen als Citrat (Macey et al. 2003). Es steht jedoch fest, dass die Wahl der gerinnungshemmenden Substanz Einfluss auf die MP-Konzentrationen nimmt (Shah et al. 2008).

Methodisch muss zusätzlich angemerkt werden, dass üblicherweise bei der FACS-Messung Laufzeiten verwendet werden, um indirekt Rückschlüsse auf die MP-Konzentration der Probe zu ziehen. In der aktuellen Studie wurde jedoch eine absolute Konzentration über die Messung mit Hilfe eines CASY-Systems durchgeführt, um eine Alternative zum etablierten Konzept der Counting Beads zu schaffen, welches noch keine optimale Methode zur Messung absoluter Konzentrationen darstellt (schwankende Konzentrationen bei Verdünnungen, hohe Varianz bei Zentrifugationsprozessen, hohe Kosten).

Die Verwendung des CASY® Zellzählers könnte eine technische Limitation der Arbeit darstellen. Diese ergänzende Methode, die in Kombination mit der Durchflusszytometrie zur Bestimmung absoluter Mikropartikelkonzentration verwendet wurde ist zur Zählung von Mikropartikeln nicht etabliert. Sie wurde als neuer Ansatz in dieser Arbeit gewählt, um Alternativen zu den bestehenden Zähltechniken von MPs zu testen.

Aufgrund verschiedener zusätzlicher Verdünnungsschritte und Messreihen ist bei der CASY® Methode jedoch auch die Gefahr höher, weitere Messfehler zu begehen.

Eine abschließende Beurteilung des CASY® Zellzählers zur Messung absoluter MP-Konzentrationen müsste einen systematischen Vergleich dieser Methode mit einem etablierten Verfahren wie der Verwendung von True Counting Beads® nach sich ziehen.

Eine weitere Limitation unserer Studie ist die geringe Anzahl der eingeschlossenen Patienten und Probanden, was weitere Subgruppenanalysen und die Anwendung multivariater Modelle deutlich erschwert. Dies ist zum Teil auch auf die niedrige Prävalenz der PAH und CTEPH in der Gesamtbevölkerung zurückzuführen. Zusätzlich kam die strenge Selektion dieser Studiengruppe hinzu, die Patienten mit klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren wie Diabetes Mellitus, Dyslipidämien oder Nikotinkonsum von vorne herein ausschlossen, da all diese Faktoren einen bewiesenen Einfluss auf die MP-Freisetzung haben (Morel et al. 2006). Die Anzahl an eingeschlossenen Patienten (n = 26) in unsere Arbeit ist vergleichbar mit denen anderer Studien zum gleichen Thema: 21 Patienten (Amabile et al. 2009); 19 Patienten (Diehl et al. 2011) und 20 Patienten (Bakouboula et al. 2007).

Die technischen und methodischen Schwierigkeiten bei der Messung von Mikropartikeln müssen bei der Interpretation von Ergebnissen besonders berücksichtigt werden. Die teils unterschiedlichen Ergebnisse verschiedener Studiengruppen zum Thema Mikropartikel bei pulmonaler Hypertonie könnten schon durch zum Teil marginale Unterschiede in den Versuchsprotokollen bedingt sein.

## **5.5 Zusammenfassung und Perspektive**

In dem untersuchten Kollektiv fanden wir signifikant niedrigere EMP-Konzentrationen im Plasma bei PH-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden.

Zusätzlich zeigten sich Unterschiede zwischen PAH-Patienten und CTEPH-Patienten hinsichtlich der Subpopulationen von EMPs: PAH-Patienten wiesen deutlich höhere Konzentrationen apoptotischer EMPs im Plasma auf als CTEPH Patienten.

Hinsichtlich der thrombozytären MPs lagen die hier präsentierten Ergebnisse in Übereinstimmung mit der einschlägigen Literatur (Amabile et al. 2008/2009; Bakouboula et al. 2007). So konnten auch in dieser Arbeit keine Veränderungen der PMP-Spiegel im Plasma von PH-Patienten und Kontrollen festgestellt werden.

Unsere Ergebnisse zu EMPs bei PH unterstützen die Vermutung, dass die MP-Konzentrationen vielen Einflüssen unterworfen sind. Möglicherweise beeinflusst z.B. die gezielte PH- Therapie die Freisetzung verschiedener MP-Populationen. Die gesonderte Betrachtung verschiedener PH-Subgruppen (PAH vs. CTEPH) hat gezeigt, dass

sich passend zu den unterschiedlichen pathogenetischen Prozessen der Erkrankungen auch die MP-Zusammensetzungen deutlich unterscheiden. Die Beobachtung, dass sowohl pulmonale apoptotische EMPs als auch periphere apoptotische EMPs bei PAH-Patienten gegenüber CTEPH-Patienten erhöht sind, unterstützt die Vermutung, dass es sich bei der PAH um eine systemische Erkrankung mit einem generellen Endothelschaden handelt.

Die Schwierigkeit, eindeutige Korrelationen zwischen MPs und verschiedensten klinischen Parametern herzustellen, bestand auch in dieser Arbeit.

Die genauere Betrachtung der Mikropartikel-Herkunft (peripher vs. pulmonal) zeigte, dass ein erhöhter pulmonal vaskulärer Widerstand (PVR) und eine erhöhte rechtsventrikuläre Arbeit mit erhöhten Konzentrationen pulmonaler EMPs einhergehen. Passend hierzu zeigte sich auch, dass Patienten mit einer niedrigen WHO Funktionsklasse (I-II), deren rechter Ventrikel noch höhere Arbeit (PAPm \* SV) verrichtet, auch höhere pulmonale EMP Konzentrationen im Blut aufweisen.

Diese Ergebnisse und die vielversprechenden Ergebnisse anderer Studiengruppen, die zum Teil eine direkte Verbindung zwischen erhöhten Konzentrationen aktivierter EMPs und der klinischen Prognose der Patienten herstellten (Amabile et al. 2007), lassen es sinnvoll erscheinen, in diesem Bereich weiter zu forschen. Insbesondere der in dieser Arbeit eingebrachte Aspekt, periphere und pulmonale EMPs zu differenzieren, erscheint erfolgversprechend.

Die teils abweichenden Ergebnisse einzelner Arbeitsgruppen zeigen auf, wie wichtig die Standardisierung der Methodik bei der Messung von Mikropartikeln ist.

Es scheint möglich, dass eine medikamentöse Therapie der PH auch Einfluss auf die Konzentration und Zusammenstellung der verschiedenen MP-Populationen hat. Ein direkter Vergleich zwischen einer größeren Gruppe therapierter und nicht-therapierter PH-Patienten bezüglich der MP-Spiegel im Plasma müsste erfolgen, um weitere Einblicke in die Pathophysiologie der MPs zu bekommen. Aktuelle Bestrebungen zur Vereinfachung der Nachweismethodik von MPs z.B. mittels ELISA-Testkits könnten einen Weg in Richtung klinischer Diagnostik bieten. Die aktuelle Methodik stellte sich jedoch als zu komplex und wenig standardisiert dar, als dass dieses Ziel in Kürze erreicht werden könnte.

### III Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Schematische Darstellung eines MPs und seiner Oberflächenantigene
Abbildung 2	FACS: Signale der Size Calibration Beads
Abbildung 3	FACS: Freeze-Thaw Cycle
Abbildung 4	FACS: Freeze-Thaw Cycle II
Abbildung 5	FACS: Zentrifugationsreihe 20000g
Abbildung 6	FACS: Zentrifugationsreihe 5000g
Abbildung 7	FACS: Vergleich verschiedener CD31-Antikörper (FITC)
Abbildung 8	FACS: Vergleich verschiedener CD31-Antikörper (Pacific Blue)
Abbildung 9	FACS: Vergleich verschiedener CD62E-Antikörper (APC vs. FITC)
Abbildung 10	FACS: Konzentrationsreihe CD41 Alexa Fluor (1µl)
Abbildung 11	FACS: Konzentrationsreihe CD41 Alexa Fluor (2µl)
Abbildung 12	FACS: Konzentrationsreihe CD41 Alexa Fluor (6µl)
Abbildung 13	FACS: P1-Festlegung der gezählten events
Abbildung 14	FACS: P2-Festlegung der MP-Population
Abbildung 15	Schematischer Überblick über die EMP-Einteilung
Abbildung 16	Vergleich systolische LV-Funktion
Abbildung 17	Planimetrie des rechten Ventrikels und RVFAC
Abbildung 18	Diastolische rechtsatriale Fläche (RAAd)
Abbildung 19	Diastolischer RV-Diameter
Abbildung 20	Pulmonal arterielle Drücke (mittel/syst./diast.) und PAOP
Abbildung 21	Pulmonalvaskulärer Widerstand (PVR)
Abbildung 22	Herzzeitvolumen (HZV) der Patienten
Abbildung 23	Konzentration der MPs
Abbildung 24	Konzentration der EMPs
Abbildung 25	Konzentration der PMPs
Abbildung 26	Konzentration apoptotischer EMPs
Abbildung 27	Konzentration pulmonal- und peripher-aktivierter EMPs
Abbildung 28	Konzentration pulmonal- und peripher-nicht-aktivierter EMPs
Abbildung 29	FACS: Neue ACE <sup>+</sup> Population ACE <sup>bright</sup> und ACE <sup>dim</sup>

Abbildung 30	Konzentration pulmonaler und peripherer viabler EMPs
Abbildung 31	Konzentration pulmonaler und peripherer, apoptotischer EMPs
Abbildung 32	Nicht-aktivierte pulmonale EMPs bei unterschiedlicher WHO FC
Abbildung 33	ACE <sup>+</sup> bright-dim-ratio (EMPs) bei unterschiedlicher WHO FC
Abbildung 34	Vergleich der RV-Arbeit bei unterschiedlicher WHO-Funktionsklasse
Abbildung 35	RMA-Gerade ACE <sup>+</sup> bright und RV-Arbeit
Abbildung 36	RMA-Gerade zwischen ACE <sup>+</sup> bright-dim ratio und RV/LV-Arbeit
Abbildung 37	RMA-Gerade zwischen ACE <sup>+</sup> bright-dim ratio und PVR

## IV Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Erste Beschwerden bei idiopathischer oder hereditärer PAH
Tabelle 2	Nomenklatur und Klassifikation der PH (Dana Point 2008)
Tabelle 3	Funktioneller Schweregrad der pulmonalen Hypertonie
Tabelle 4	Funktion verschiedener EMP-Oberflächenantigene
Tabelle 5	Auflistung der verwendeten Geräte
Tabelle 6	Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien
Tabelle 7	Auflistung der verwendeten Erstantikörper
Tabelle 8	Auflistung der verwendeten Zweitantikörper
Tabelle 9	Auflistung der verwendeten Eichungspartikel (Calibration Beads)
Tabelle 10	Auflistung der verwendeten Chemikalien
Tabelle 11	Auflistung der verwendeten Lösungen
Tabelle 12	Basischarakteristika der Studienteilnehmer
Tabelle 13	Anthropometrische Grunddaten der Studienteilnehmer
Tabelle 14	Blutdruckwerte (syst./diast.) und Herzfrequenz der Studienteilnehmer
Tabelle 15	Rechtskardiale echokardiographische Parameter
Tabelle 16	Hämodynamische Parameter des Patientenkollektivs
Tabelle 17	Häufigkeiten der PH-spezifischen Medikamentenklassen
Tabelle 18	Konzentrationen aller gemessenen MPs, EMPs und PMPs
Tabelle 19	Konzentrationen der aktivierten und nicht-aktivierten EMPs
Tabelle 20	Konzentrationen der apoptotischen und nicht-apoptotischen EMPs
Tabelle 21	Pulmonale EMP-Populationen bei unterschiedlicher WHO Funktions- klasse
Tabelle 22	RV-Arbeit bei unterschiedlicher WHO Funktionsklasse

## V Literaturverzeichnis

1. Abid Hussein MN, Böing AN, Sturk A, Hau CM, Nieuwland R (2007) Inhibition of microparticle release triggers endothelial cell apoptosis and detachment. *Thromb Haemost* 98: 1096-1107
2. Amabile N, Guerin AP, Leroyer A, Mallat Z, Nguyen C, Boddaert J, London GM, Tedgui A, Boulanger CM (2005) Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol* 16: 3381-3388
3. Amabile N, Heiss C, Real WM, Minasi P, McGlothlin D, Rame EJ, Grossman W, De Marco T, Yeghiazarians Y (2008) Circulating Endothelial Microparticle Levels Predict Hemodynamic Severity of Pulmonary Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 177: 1268-1275
4. Amabile N, Heiss C, Chang V, Angeli FS, Damon L, Rame EJ, McGlothlin D, Grossman W, De Marco T, Yeghiazarians Y (2009) Increased CD62e+ Endothelial Microparticle Levels Predict Poor Outcome in Pulmonary Hypertension Patients. *J Heart Lung Transplant* 28: 1081-1086
5. Amabile N, Guignabert C, Montani D, Yeghiazarians Y, Boulanger CM, Humbert M (2013) Cellular Microparticles In The Pathogenesis Of Pulmonary Hypertension. *ERJ Express* 42: 272-279
6. Archibald CJ, Auger WR, Fedullo PF, Channick RN, Kerr KM, Jamieson SW, Kapelanski DP, Watt CN, Moser KM (1999) Long-term outcome after pulmonary thromboendarterectomy. *Am J Respir Cit care Med* 166: 523-8
7. Badesch DB, Champion HC, Sanchez MA, Hoeper MM, Loyd JE, Manes A, McGoon M, Naeije R, Olschewski H, Oudiz RJ, Torbicki A (2009) Diagnosis and assesement of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 54: 55-66
8. Badesch DB, Raskob GE, Elliott CG, Krichman AM, Farber HW, Frost AE, Barst RJ, Benza RL, Liou TG, Turner M, Giles S, Feldkircher K, Miller DP, McGoon MD (2010) Pulmonary Arterial Hypertension Baseline Characteristics From the REVEAL Registry. *CHEST* 137: 376–387
9. Bakouboula B, Morel O, Faure A, Zobairi F, Jesel L, Trinh A, Zupan M, Canuet M, Grunebaum L, Brunette A, Weitzenblum E, Freyssinet JM, Chaouat A, Toti F (2007) Procoagulant Membrane Microparticles Correlate with the Severity of Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 177: 536-543
10. Balyasnikova IV, Metzger R, Visintine DJ, Dimasius V, Sun ZL, Berestetskaya YV, McDonald TD, Curiel DT, Minshall RD, Danilov SM (2005) Selective rat lung endothelial targeting with a new set of monoclonal antibodies to angiotensin I-converting enzyme. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 18: 251-267

11. Balyasnikova IV, Berestetskaya J, Visintine DJ, Nesterovich AB, Adamian L, Danilov SM (2010) Cloning and characterization of a single chain fragment of monoclonal antibody to ACE suitable for lung endothelial targeting. *Microvascular Research* 80: 355-364
12. Barst RJ, Rubin LJ, Long WA, et al. Primary Pulmonary Study Group (1996) A comparison of continuous intravenous Epoprostenol (Prostacyclin) with conventional therapy for primary pulmonary hypertension. The Primary Pulmonary Hypertension Study Group. *N Engl J Med* 334: 296-302
13. Behr J, Borst MM, Winkler J, Hoeper M, Halank M, Ghofrani A, Klose H, Wilkens H, Stähler G (2005) [A role for combination therapy in pulmonary arterial hypertension]. *Pneumologie* 59: 730-735
14. Berezin AE, Kremzer AA, Martovitskaya YV, Samura TA, Berezina TA (2015) The predictive role of circulating microparticles in patients with chronic heart failure. *BBA Clinical* 3: 18-23
15. Berk BC, Alexander RW, Brock TA, Gimbrone MA Jr, Webb RC (1986) Vasoconstriction: a new activity for platelet-derived growth factor. *Science* 232: 87-90
16. Bjornsson J, Edwards WD (1985) Primary pulmonary hypertension: a histopathologic study of 80 cases. *Mayo Clinic Proceedings Mayo Clinic* 60: 16-25
17. Bonderman D, Wilkens H, Wakounig S, Schäfers HJ, Jansa P, Lindner J, Simkova I, Martischnig AM, Dudczak J, Sadushi R, Skoro-Sajer N, Klepetko W, Lang IM (2009) Risk factors for chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 33: 325-331
18. Botney MD (1999) Role of haemodynamics in pulmonary vascular remodelling: implications for primary pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 159: 361-364
19. Boulanger CM, Dignat-George F (2011) Microparticles: an introduction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 31: 2-3
20. Chandler W (2013) Microparticle counts in platelet rich and platelet-free plasma, effect of centrifugation and sample-processing protocols. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 24: 125-132
21. Christ G, Graf S, Huber-Beckmann R, Zorn G, Lang I, Kneussi M, Binder BR, Huber K (2001) Impairment in the plasmin activation system in primary pulmonary hypertension: evidence for gender differences. *Thromb Haemost* 86: 557-562
22. Christman BW, McPherson CD, Newman JH, King GA, Bernard GR, Groves BM, Loyd JE (1992) An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 327: 70-75

23. Combes V, Simon AC, Grau GE, Arnoux D, Camoin L, Sabatier F, Mutin M, Sanmarco M, Sampol J, Dignat-George F (1999) In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *The Journal of clinical investigation* 104: 93-102
24. Contant G, Gouault-Heilmann M, Martinoli JL (1983) Heparin inactivation during blood storage: its prevention by blood collection in citric acid, theophylline, adenosine, dipyridamole-C.T.A.D. mixture. *Thromb Res.* 15;31(2): 365-374
25. Cournand A (1947) Recent Observations on the Dynamics of the Pulmonary Circulation. *Bull N Y Acad Med* 23: 27-50
26. D'Alonzo GE, Barst RJ, Ayres SM (1991) Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry. *Ann Intern Med* 115: 343-349
27. Dean WL, Lee MJ, Cummins TD, Schultz DJ, Powell DW (2009) Proteomic and functional characterisation of platelet microparticle size classes. *Thromb Haemost* 102: 711-718
28. Densmore JC, Signorino PR, Ou J, Hatoum OA, Rowe JJ, Shi Y, Kaul S, Jones DW, Sabina RE, Pritchard KG, Guice KS, Oldham KT (2006) Endothelium-derived microparticles induce endothelial dysfunction and acute lung injury. *Shock* 26: 464-471
29. Dibble CT, Shimbo D, Barr RG, Bagiella E, Chahal H, Ventetuolo CE, Herrington DM, Lima JA, Bluemke DA, Kawut SM (2012) Brachial artery diameter and the right ventricle: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis- right ventricle study. *Chest* 142: 1399-1405
30. Diehl P, Aleker M, Helbing T, Sossong V, Germann M, Sorichter S, Bode C, Moser M (2011) Increased platelet, leukocyte and endothelial microparticles predict enhanced coagulation and vascular inflammation in pulmonary hypertension. *J Thromb Thrombolysis* 31: 173-179
31. Dignat-George F, Boulanger CM (2011) The Many Faces of Endothelial Microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31: 27-33
32. Esposito K, Ciotola M, Schisano B, Gualdiero R, Sardelli L, Misso L, Gianetti G, Giugliano D (2006) Endothelial microparticles correlate with endothelial dysfunction in obese women. *J Clin Endocrinol Metab.* 91: 3676-3679
33. Galie N, Torbicki A, Barst R, Dartvelle P, et al. Task Force (2004) Guidelines on diagnosis and treatment of pulmonary arterial hypertension. *European Heart Journal* 25: 2243-2278
34. Galie N, Ghofrani HA, Torbicki A, Barst RJ, Rubin LJ, Badesch D, Fleming T, Parpia T, Burges A, Branzi A, Grimminger F, Kurzyna M, Simonneau G (2005)

- Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 353: 2148-2157
35. Galie N, Hoeper MM, Humbert M, Torbicki A, Vachiery JL, Barbera JA, Beghetti M, Corris P, Gaine S, Gibbs JS, Gomez-Sanchez MA, Jondeau G, Klepetko W, Opitz C, Peacock A, Rubin L, Zellweger M, Simonneau G (2009) Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 34: 1219-1263
  36. Galie N, Manes A, Negro L, Palazzini M, Bacchi-Reggiani ML, Branzi A (2009) A meta-analysis of randomized controlled trials in pulmonary arterial hypertension. *Eur Heart J* 30: 394-403
  37. Galie N, Humbert M, Vachiery JL, Gibbs S et al. (2016) 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 46: 903-975
  38. Gallagher AM, Yu H, Printz MP (1998) Bradykinin-induced reductions in collagen expression involve prostacyclin. *Hypertension* 32: 84-88
  39. Gelderman MP, Simak J (2008) Flow Cytometric Analysis of Cell Membrane Microparticles. *Methods in Molecular Biology* 484: 79-93
  40. Ghofrani HA, Voswinckel R, Reichenberger F, Olschewski H, Haredza P, Karadas B, Schermuly RT, Weissmann N, Seeger W, Grimminger F (2004) Differences in hemodynamic and oxygenation responses to three different phosphodiesterase-5 inhibitors in patients with pulmonary arterial hypertension: a randomized prospective study. *J Am Coll Cardiol* 44: 1488-1496
  41. Ghofrani HA, D'Armini AM, Grimminger F, Hoeper MM, Jansa P, Kim NH, Mayer E, Simonneau G, Wilkins MR, Fritsch A, Neuser D, Weimann G, Wang C, CHEST-1 Study Group (2013) Riociguat for the treatment of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 369: 319-29
  42. Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel RP, Levy R, Shennib H, Kimura S, Masaki T, Duguid WP, Stewart DJ (1993) Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 328: 1732-1739
  43. Giaid A, Saleh D (1995) Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 333: 214-221
  44. Giaid A (1998) Nitric oxide and endothelin-1 in pulmonary hypertension. *Chest* 114: 208S-212S
  45. Gordon C, Gudi K, Krause A, Sackrowitz R, Harvey BG, Strulovici-Barel Y, Mezey JG, Crystal RG (2011) Circulating endothelial microparticles as a measure of early lung destruction in cigarette smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 184: 224-232

46. Hagendorff A (2008) Die transthorakale Echokardiographie bei Patienten im Erwachsenenalter – Ablauf einer standardisierten Untersuchung. *Ultraschall in Med* 29: 344-374
47. Held M, Grün M, Holl R, Hübner G, Kaiser R, Karl S, Kolb M, Schäfers HJ, Wilkens H, Jany B (2014) Cardiopulmonary exercise testing to detect chronic thromboembolic pulmonary hypertension in patients with normal echocardiography. *Respiration* 87: 379-387
48. Higenbottam T, Wheeldon D, Wells F, Wallwork J (1984) Long-term treatment of primary pulmonary hypertension with continuous intravenous Epoprostenol (Prostacyclin). *Lancet* 1: 1046-1047
49. Hoeper MM, Barbera JA, Channick RN, Hassoun PM, Lanf IM, Manes A, Martinez JF, Naeije R, Olschewski H, Pepke-Zaba J, Redfield MM, Robbins Im, Souza R, Torbicki A, McGoon M (2009) Diagnosis, assessment, and treatment of non-pulmonary arterial hypertension pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 54: 85-96
50. Hoeper MM (2010) Die pulmonale Hypertonie - historische Entwicklung, derzeitiger Stand der Therapie und Ausblick. *Pneumologie* 64: 577-582
51. Hoeper MM, Huscher D, Ghofrani HA, Delcroix M et al. (2013) Elderly patients diagnosed with idiopathic pulmonary arterial hypertension: results from the COMPERA registry. *Int J Cardiol.* 168: 871-880
52. Hoeper MM, Humber M, Souza R, Idrees M, Kawut SM, Sliwa-Hahnle K, Jing ZC, Gibbs JSR (2016) A global view of pulmonary hypertension. *The Lancet* 4: 306-322
53. Humbert M, Sitbon O, Chaouat A, Bertocchi M, Habib G, Gressin V, Yaici A, Weitzenblum E, Cordier JF, Chabot F, Dromer C, Pison C, Reynaud-Gaubert M, Haloun A, Laurent M, Hachulla E, Simonneau G (2006) Pulmonary arterial hypertension in France: results from a national registry. *AM J Respir Crit Care Med* 173: 1023-1030
54. Iversen S (1994) [Surgical treatment of thrombolism-induced pulmonary hypertension]. *Z Kardiol* 83: 193-199
55. Johnson SR, Granton JT, Mehta S (2006) Thrombotic Arteriopathy and Anticoagulation in Pulmonary Hypertension. *Chest* 130: 545-552
56. Katz AM (ed) (2011) *Physiology of the Heart*. 5th ed. Lipincott Williams and Wilkins, Philadelphia
57. Kovacs G, Berghold A, Scheidl S, Olschewski H (2009). Pulmonary arterial pressure during rest and exercise in healthy subjects: A systematic review. *Eur Respir J* 34: 888-894

58. Lee YJ, Jy W, Horstman LL, Janania J, Reyes Y, Kelley RE, Ahn YS (1993) Elevated Platelet Microparticles in Transient Ischemic Attacks, Lacunar Infarcts and Multiinfarct Dementias. *Thrombosis Research* 72: 295-304
59. Lensch CR (2013) Untersuchung zur peripheren arteriellen Endothelfunktion bei Patienten mit pulmonal-arterieller Hypertonie (PAH) und chronisch thromboembolischer pulmonaler Hypertonie (CTEPH) [Dissertation] Homburg Saar: Universitätsklinikum des Saarlandes
60. Macchia A, Marchioli R, Tognoni G, Scarano M, Marfisi R, Tavazzi L, Rich S (2010) Systematic review of trials using vasodilators in pulmonary arterial hypertension: Why a new approach is needed. *Am Heart J* 159: 245-257
61. Macey M, Mc Carthy D, Azam U, Milne T, Golledge P, Newland A (2003) Ethylenediaminetetraacetic Acid Plus Citrate-Theophylline-Adenosine-Dipyridamole (EDTA-CTAD): A Novel Anticoagulant for the Flow Cytometric Assesment of Platelet and Neutrophil Activation Ex Vivo in Whole Blood. *Clinical Cytometry* 32B: 30-40
62. MacKenzie A, Wilson HL, Kiss-Toth E, Dower SK, North RA, Surprenant A (2001) Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding. *Immunity* 15: 825-835
63. McLaughlin VV, Shillington A, Rich S (2002) Survival in primary pulmonary hypertension: the impact of epoprostenol therapy. *Circulation* 106: 1477-1482
64. Montoro-García S, Shantsila E, Marín F, Blann A, Lip GY (2011) Circulating Microparticles: new insights into the biochemical basis of microparticle release and activity. *Basis Res Cardiol.* 106: 911-923
65. Morel O, Toti F, Hugel B, Bakouboula B, Camoin-Jau L, Dignat-George F, Freyssinet JM (2006) Procoagulant Microparticles. Disrupting the Vascular Homeostasis Equation? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 2594-2604
66. Morel O, Toti F, Freyssinet JM (2009) Microparticles in endothelial cell and vascular homeostasis: are they really noxious? *Haematologica* 94: 313-317
67. Müller I, Klocke K, Alex M, Kotsch M, Luther T, Morgenstern E, Zieseniss S, Zahler S, Preisser K, Engelmann B (2003) Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets. *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17: 476-478
68. Nadaud S, Poirier O, Girerd B, Blanc C, Montani D, Eyries M, Imbert-Bismut F, Pacheco A, Vigne J, Tregouet DA, Humbert M, Soubrier F (2013) Small platelet microparticle levels are increased in pulmonary arterial hypertension. *Eur J Clin Invest.* 43:64-71
69. Nomura S, Tandon NN, Nakamura T, Cone J, Fukuhara S, Kambayashi J (2001) High-shear-stress-induced activation of platelets and microparticles enhances

expression of cell adhesion molecules in THP-1 and endothelial cells. *Atherosclerosis* 158: 77-87

70. Olschewski H, Olschewski A (eds) (2011) *Pulmonale Hypertonie*. 2. Aufl. UNI-MED, Bremen
71. Osumi K, Ozeki Y, Saito S, Nagamura Y, Ito H, Kimura Y, Ogura H, Nomura S (2001) Development and assesement of enzyme immunoassay for platelet-derived microparticles. *Thromb Haemost.* 85: 326-330
72. Oudiz RJ, Galiè N, Olschewski H, Torres F, Frost A, Ghofrani HA, Badesch DB, McGoon MD, McLaughlin VV, Roecker RB, Harrison BC, Despain D, Dufton C, Rubin LJ; Aries Study Group (2009) Long-term ambrisentan therapy for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 54: 1971-1981
73. Price LC, Wort SJ, Perros F, Dorfmüller P, Huertas A, Montani D, Cohen-Kaminsky S, Humbert M (2012) Inflammation in pulmonary arterial hypertension. *Chest* 141: 210-221
74. Rautou PE, Leroyer AS, Ramkhelawon B, Devue C, Duflaut D, Vion AC, Nalbone G, Castier Y, Leseche G, Lehoux S, Tedgui A, Boulanger CM (2011) Microparticles from human arteriosclerotic plaques promote endothelial ICAM-1-dependent monocyte adhesion and transendothelial migration. *Circulation research* 108: 335-343
75. Reitz BA, Wallwork JL, Hunt SA, Pennock JL, Billingham ME, Oyer PE, Stinson EB, Shumway NE (1982) Heart-lung transplantation: succesful therapy for patients with pulmonary vascular disease. *N Engl J Med* 306: 557-564
76. Rich S, Dantzker DR, Ayres SM, Bergofsky EH, Brundage BH, Detre KM, Fishman AP, Goldring RM, Groves BM, Koerner SK, et al. (1987) Primary pulmonary hypertension. A national prospective study. *Ann Intern Med* 107: 216-223
77. Rich S, Kaufmann E (1991) High dose titration of calcium channel blocking agents for primary pulmonary hypertension: guidelines for short term drug testing. *J Am Coll Cardiol* 18: 1323-1327
78. Roos MA, Gennero L, Denysenko T, Reguzzi S, Cavallo G, Pescarmona GP, Ponzeto A (2010) Microparticles in physiological and in pathological conditions. *Cell Biochem Funct* 28: 539-548
79. Rosenkranz S (2008) [Novel concepts in the pathobiology of pulmonary arterial hypertension]. *Dtsch Med Wochenschr* 133: 167-169
80. Rubin LJ, Badesch DB, Barst RJ, Galie N, Black CM, Keogh A, Pulido T, Frost A, Roux S, Leconte I, Landzberg M, Simonneau G (2002) Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 346: 896-903

81. Rudski LG, Lai WW, Afilalo J, Hua L, Handschumacher MD, Chandrasekaran K, Solomon SD, Louie EK, Schiller NB (2010) Guidelines for the Echocardiographic Assessment of the Right Heart in Adults: A Report from the American Society of Echocardiography. *J Am Soc Echocardiography* 23: 685-713
82. Sakao S, Taraseviciene-Stewart L, Lee JD, Wood K, Cool CD, Voelkl NF (2005) Initial apoptosis is followed by increased proliferation of apoptosis-resistant endothelial cells. *FASEB J* 19: 1178-1180
83. Satta N, Toti F, Feugeas O, Bohbot A, Dachary-Prigent J, Eschwège V, Hedman H, Freyssinet JM (1994) Monocyte vesiculation is a possible mechanism for dissemination of membrane-associated procoagulant activities and adhesion molecules after stimulation by lipopolysaccharide. *J Immunol* 153: 3245-3255
84. Schuster DP, Crouch EC, Parks WC, Johnson T, Botney MD (1996) Angiotensin Converting Enzyme Expression in Primary Pulmonary Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 154: 1087-1091
85. Shah M, Bergeron AL, Dong JF, López JA (2008) Flow cytometric measurement of microparticles: Pitfalls and protocol modifications. *Platelets* 19(5): 365-372
86. Shapiro HM (2003) *Practical Flow Cytometry*. 4. Edt. John Wiley & Sons. Hoboken, New Jersey
87. Simak J, Gelderman MP, Yu H, Wright V, Baird AE (2006) Circulating endothelial microparticles in acute ischemic stroke: a link to severity, lesion volume and outcome. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 4: 1296-1302
88. Sinning JM, Losch J, Walenta K, Böhm M, Nickenig G, Werner N (2010) Circulating CD31+/Annexin V+ Microparticles correlate with cardiovascular outcomes. *European Heart Journal* 32: 2034-2041
89. Sitbon O, Humbert M, Jaïs X, Ioos V, Hamid AM, Provencher S, Garcia G, Parent F, Hervé P, Simonneau G (2005) Long-term response to calcium channel blockers in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 111: 3105-3111
90. Tamburrelli C, Crescente M, IZZI B, Barisciano M, Donati MB, de Gaetano G, Cerletti C (2011) Epoprostenol inhibits human platelet-leukocyte mixed conjugate and platelet microparticle formation in whole blood. *Thrombosis research* 120: 446-451
91. Tu L, DeWachter L, Gore B, Fadel E, Darteville P, Simonneau G, Humbert M, Eddahibi S, Guignabert C (2011) Autocrine fibroblast growth factor-2 signaling contributes to altered endothelial phenotype in pulmonary hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* 45: 311-322

92. Tual-Chalot S, Guibert C, Muller B, Savineau JP, Andriantsitohaina R, Martinez MC (2010) Circulating Microparticles from Pulmonary Hypertensive Rats Induce Endothelial Dysfunction. *Am J Respir Crit Care Med* 182: 261-268
93. Tuder RM, Groves B, Badesch DB, Voelkel NF (1994) Exuberant endothelial cell growth and elements of inflammation are present in plexiform lesions of pulmonary hypertension. *Am J Pathol* 144(2): 275-285
94. Tuder RM, Cool CD, Geraci MW, Wang J, Abman SH, Wright L, Badesch D, Voelkl NF (1999) Prostacyclin synthase expression is decreased in lungs from patients with severe pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 159: 1925-1932
95. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C (1995) A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of Immunological Methods* 184: 39-51
96. Vince RV, Mc Naughton LR, Taylor L, Midgley AW, Laden G, Madden LA (2009) Release of VCAM-1 associated endothelial microparticles following simulated SCUBA dives. *Eur J Appl Physiol* 105: 507-513
97. Wagenvoort CaNW (1970) Primary pulmonary hypertension. A pathologic study of the lung vessels in 156 clinically diagnosed cases. *Circulation* 42: 1184
98. Werner N, Wassmann S, Ahlers P, Kosiol S, Nickenig G (2006) Circulating CD31+ / Annexin V+ apoptotic microparticles correlate with coronary endothelial function in patients with coronary artery disease. *Arterioscler Throm Vasc Biol* 26: 112-116
99. White RJ, Meoli DF, Swarthout RF, Kallop DY, Galaria II, Harvey JL, Miller CM, Blaxall BC, Hall CM, Pierce RA, Cool CD, Taubman MB (2007) Plexiform-like lesions and increased tissue factor expression in a rat model of severe pulmonary arterial hypertension. *American Journal of Physiology- Lung Cellular and Molecular Physiology* 293: 583-590
100. Wilkens H, Guth A, König J, Forestier N, Cremers B, Hennen B, Böhm M, Sybrecht GW (2001) Effect of inhaled iloprost plus oral sildenafil in patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation* 11: 1218-1222
101. Wilkens H, Grimminger F, Hoepfer M, Stähler G, Ehlken B, Plesnila-Frank C, Berger K, Resch A, Ghofrani A (2010) Burden of pulmonary arterial hypertension in Germany. *Respiratory Medicine* 104: 902-910
102. Wood P (1958) Pulmonary Hypertension with special reference to the vasoconstrictive factor. *Br Heart J* 20: 557-570
103. Wright L, Tuder RM, Wang J, Cool CD, Lepley RA, Voelkel NF (1998) 5-Lipoxygenase and 5-lipoxygenase activating protein (FLAP) immunoreactivity

in lungs from patients with primary pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 157: 219-229

104. Yokota M, Tatsumi M, Tsuda I, Nishioka T, Takubo T (2003) CTAD as a universal anticoagulant. *Journal of Automated Methods & Management in Chemistry* 25: 17-20

## VI Publikationen und Danksagung

### Abstracts / Kongressbeiträge

2016

Analyse pulmonal-endothelialer Mikropartikel bei pulmonaler Hypertonie und deren Einfluss auf hämodynamische Parameter, sowie die funktionelle WHO-Klasse. **Carlos Metz**, Christian Lensch, Heinrike Wilkens, Robert Bals, Ralf Kaiser. P515. Kongress der deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V. (DGP), Leipzig, Deutschland, 02.03-05.03.2016

2015

Endothelial microparticles of pulmonary and peripheral origin in different subclasses of pulmonary hypertension (PAH and CTEPH). **Carlos Metz**. P15 . Pulmonary Hypertension: Next Generation. Imperial College, London, England, 12.11-14.11.2015

Analysis of pulmonary endothelial microparticles, haemodynamics and functional class in pulmonary hypertension. **Carlos Metz**, Heinrike Wilkens, Robert Bals, Ralf Kaiser PA 2432. European Respiratory Society (ERS) Annual Congress 2015, Amsterdam, Netherlands, 26.09-30.09.2015

## **Danksagung**

Schreiben musste ich diese Arbeit alleine, aber zu ihrem Gelingen haben einige Menschen maßgeblich beigetragen. An dieser Stelle möchte ich meinen Dank zum Ausdruck bringen.

Allen voran danke ich meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. med Heinrike Wilkens. Zum einen danke ich ihr für die Überlassung des Themas meiner Doktorarbeit und zum anderen für ihr großes Engagement und ihre Unterstützung zu jedem Zeitpunkt. Ihre fachliche Kompetenz und ihre guten, hilfreichen Verbesserungsvorschläge waren stets von großem Wert. Ihr Einsatz, ihre Empathie gegenüber Patienten, ihr großes Wissen und ihre kreativen Ideen werden mir in meiner Einstellung zum Arztberuf immer ein Vorbild sein.

Meinem Betreuer Dr. med. Ralf Kaiser gebührt ebenfalls größter Dank für die Anleitung in die Arbeitstechnik der Durchflusszytometrie und ELISA sowie für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Versuche. Ohne seine Ideen und geistreichen Vorschläge sowie sein großes statistisches und mathematisches Wissen hätte ich diese Arbeit nicht vollenden können.

Die gemeinsame Arbeit an diesem Projekt, seine Geduld, sein Optimismus und sein Humor werden mir stets in guter Erinnerung bleiben. Ich danke ihm für seine kompetente und freundschaftliche Betreuung.

Ebenfalls danke ich Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Robert Bals für die Möglichkeit, an seiner Klinik promovieren zu dürfen und seine Laboratorien zu nutzen. Großer Dank gebührt auch Frau Anja Hoecker für ihre Unterstützung im Labor, speziell für die anfängliche Anleitung bei der Durchflusszytometrie. Auch bei meinem ersten Oberarzt Dr. med. Christian Lensch möchte ich mich bedanken, der mich sowohl bei der Erstellung der Promotionsarbeit als auch bei meinen ersten Schritten im klinischen Alltag unterstützt hat.

Größter Dank gilt meinen Eltern, Friederike und Alfred Metz, deren Unterstützung und moralisches Vorbild meinen gesamten Bildungsgang und Lebensweg stets positiv begleiteten. Ihnen möchte ich diese Arbeit widmen.

Zu guter Letzt danke ich meiner Verlobten Madelaine für ihre unnachahmliche Geduld und Unterstützung. Ihre Interessen mussten sowohl bei Erstellung dieser Arbeit als auch im Rahmen meines Berufs oft zurückgestellt werden. Für dieses Verständnis bin ich ihr zu großem Dank verpflichtet.

