Aus der Klinik für Kardiologie, Pneumologie
und Angiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ. Prof. Dr. med. M. Kelm

Verbesserte Gefäßfunktion und reduzierte Konzentration zirkulierender endothelialer Mikropartikel nach Transkatheter-Aortenklappen-Implantation

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der

Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine- Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Daniel William Stern

2017

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

gez.

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Malte Kelm

Zweitgutachter: PD Dr. med. Christian Buchbender

Für Meine Familie

Auflistung der Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Horn P, Stern D, Veulemans V, Heiss C, Zeus T, Merx MW, Kelm M, Westenfeld R.

Improved endothelial function and decreased levels of endothelium-derived microparticles after transcatheter aortic valve implantation.
EuroIntervention 2015;10:1456-1463

Zusammenfassung

Fragestellung: In der vorliegenden Studie soll die Hypothese überprüft werden, ob die Therapie der Aortenklappen-Stenose (AKS) mittels eines transaortalen Aortenklappen-Ersatzes (TAVI) zu einer Verbesserung der endothelialen Funktion und Integrität führt.

Hintergrund: Die hochgradige AKS führt nicht nur zu Umbauprozessen des Myokards, wie zu einer konzentrischen Hypertrophie, sondern ist auch mit peripheren vaskulären Veränderungen, systemischer endothelialer Dysfunktion und einer erhöhten Konzentration von endothelialen Mikropartikeln (EMP) im Plasma assoziiert.

Methodik: 56 Patienten mit hochgradiger symptomatischer AKS wurden prospektiv vor und drei Monate nach TAVI untersucht. Dabei wurden die physikomechanischen Eigenschaften bestimmt, welche die Endothelfunktion beeinflussen, wie der brachiale Scherstress, die Blutdruckamplitude und die arterielle Steifigkeit. Die endotheliale Funktion wurde mittels ultraschall-basierter flussvermittelter Dilatation (FMD) gemessen. Im Plasma wurden zirkulierende Mikropartikel (MP) mittels Durchflusszytometrie nach Expression spezifischer Oberflächenantigene diskriminiert und quantifiziert. Die Oberflächenantigene wurden wie folgt definiert: $CD41^+$ als Thrombozyten-abstammende MPs (PMPs), $CD31^+/CD41^-$, $CD\ 144^+$ und $CD\ 62E^+$ als Endothel-abstammende MPs (EMPs).

Ergebnisse: Bei Patienten mit hochgradiger AKS, war neben dem Diabetes der verringerte brachiale Scherstress ein unabhängiger Prädiktor für eine niedrige FMD. Bei der *Follow-up*-Untersuchung drei Monate nach TAVI wurde im Vergleich zu den prä-TAVI-Kontrollen ein gesteigerter brachialer Scherstress und eine verbesserte FMD gemessen, während sich die Konzentration zirkulierender EMP reduzierte. Die Abnahme der $CD62E^+$-, $CD144^+$-, und $CD31^+/CD41^-$-EMP Konzentration im Plasma korrelierte mit der Zunahme der FMD.

Schlussfolgerung: Die Therapie einer hochgradigen AKS mittels TAVI ist mit einer verbesserten endothelialen Funktion und Integrität assoziiert.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACE	*Angiotensin converting enzyme*
AK	Antikörper
AKE	Aortenklappenersatz
AKS	Aortenklappenstenose
Art.	Arteria
AUC	*Area under the curve*
AVC	*Aortic valve calcification*
***baseline*-WSS**	basaler Scherstress
BMI	Body Mass Index
Bpm	*beats per minute*
bzw.	beziehungsweise
CAC	*coronary artery calcification*
CI	Konfidenzintervall
CRP	C-reaktives Protein
cm	Zentimeter
CT	Computertomografie
d	Wanddicke
d_{BL}	Ausgangsdurchmesser
d_{BL}	Ruhedurchmesser
dL	Deziliter
d_{MAX}	maximaler Gefäßdurchmesser
dPmax	maximaler transvalvuläre Druckgradient
dPmean	mittlerer transvalvuläre Druckgradient
ELAM-1	*endothelial-leukocyte-adhesion molecule-1*
EMP	endotheliale Mikropartikel
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase
FACS	Durchflusszytometrie
FDC	relative Diameteränderung
FMD	flussvermittelte Dilatation
FSC	Vorwärtsstreulicht
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HKT	Hämatokrit
K	Wandspannung
KHK	koronare Gefäßerkrankung
L-NMMA	L-NG-Monomethyl-Arginin
LDL	*Low-Density-Lipoprotein*
mg	Milligramm
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
MP	Mikropartikel
MSCT	Mehrschicht-Computertomografie
NO	Stickstoffmonoxid
P	transmuraler Druck
PECAM-1	*Platelet endothelial cell - adhesion-molecule -1*
PFP	Blutplättchen-freies Plasma
PMP	thrombozytäre Mikropartikel
PRP	Blutplättchen-reiches Plasma
R^2	Bestimmtheitsmaß
R_P	Pearson-Korrelationskoeffizient
R_S	Spearman-Korrelationskoeffizient
r	Gefäßradius
ROI	*region of interest*
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SD	Standardabweichung
SSC	Seitwärtsstreulicht
TAVI	Transkatheter-Aortenklappen--Implantation
V	Blutfluss
VE-Cadherin	*vascular endothelial-Cadherin*
Vmax	Spitzengeschwindigkeit
VWF	Von-Willebrand-Faktor
WSS	Scherstress
μ	Blutviskosität
(-)AKS	Patienten ohne AKS
(+)AKS	Patienten mit AKS
Δ	Delta

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung ..... **I**

Abkürzungsverzeichnis ..... **II**

Inhaltsverzeichnis ..... **III**

1 Einleitung **1**
1.1 Aortenklappenstenose 1
1.2 Aortenklappenstenose und Gefäßfunktion 4
1.3 Mikropartikel (MP) als Marker der endothelialen Integrität 7
1.4 Therapie der hochgradigen Aortenklappenstenose 10
1.5 Fragestellung dieser Arbeit 12

2 Material und Methoden **15**
2.1 Studienkollektiv 15
2.2 Eingriffstechnik der TAVI 17
2.3 Blutentnahme und Herstellung von plättchenfreiem Plasma 18
2.4 Durchflusszytometrie (FACS) 20
2.5 Bestimmung der Gefäßfunktion mittels etablierter Ultraschall-diagnostik: Flow-mediated vasodilatation (FMD) 24
2.6 Messung koronarer Kalzifizierung anhand etablierter Score Systeme mittels Kardio-CT: Koronarer Mehrschicht-computertomografie (MSCT) 29
2.7 Statistische Analyse der Messergebnisse 31

3 Ergebnisse **32**
3.1 Charakterisierung der endothelialen Funktion bei Patienten mit hochgradiger AKS 32
3.2 Determinanten der FMD bei Patienten mit AKS 37
3.3 Die Konzentration zirkulierender MPs korreliert positiv mit dem Grad der koronaren Kalzifizierung bei Patienten mit hochgradiger AKS 39
3.4 Verbesserte Endothelfunktion und eine erniedrigte Konzentration an zirkulierenden EMPs nach TAVI 42

4 Diskussion **50**
4.1 Evaluation der Methodiken zur Messung der endothelialen Funktion und Integrität 51
4.2 Endotheliale Funktion und Integrität bei Patienten mit AKS und bei Patienten ohne AKS 54
4.3 MPs als zirkulierende Marker der vaskulären Kalzifizierung 57
4.4 MPs und valvuläre Kalzifizierung 58
4.5 Effekt der TAVI auf die endotheliale Funktion 59
4.6 Effekt der TAVI auf die endotheliale Integrität 61
4.7 Limitationen der Studie 63

5 Klinische Schlussfolgerung **64**

6 Literatur- und Quellenverzeichnis **66**

1. Einleitung

1.1 Aortenklappenstenose

Epidemiologie

Die valvuläre Aortenklappenstenose (AKS) ist nach der arteriellen Hypertonie und der koronaren Herzkrankheit die dritthäufigste kardiovaskuläre Erkrankung in der westlichen Welt [1]. Unter den verschiedenen Ursachen einer AKS, wie dem rheumatischen Fieber oder den kongenitalen valvulären Anomalien, spielt in den Industrienationen ätiologisch die degenerative (= kalzifizierende) AKS die dominierende Rolle [2]. Die degenerative AKS tritt in Europa und Nordamerika bei den über 65-Jährigen mit einer mit dem Alter ansteigenden Prävalenz von 2-7 % auf und stellt somit das häufigste Klappenvitium dar [3, 4]. Mit einer zunehmend älter werdenden Bevölkerung geht man davon aus, das sich die Prävalenz dieser Erkrankung in den nächsten 20 Jahren verdoppeln wird [4]. Demnach kommt der Früherkennung und Therapie der degenerativen AKS eine enorme sozioökonomische Bedeutung zu.

Klinik

Die normale Öffnungsfläche einer gesunden Aortenklappe beträgt beim Erwachsenen etwa 3–4 cm². Erst bei einer Reduktion der Öffnungsfläche von unter 1 cm² kommt es zu einer hämodynamisch relevanten Auswirkung auf den Gesamtkreislauf [5]. Die Abnahme der Klappenöffnungsfläche ist ein schleichender Prozess und beträgt im Mittel 0,1-0,2 cm² pro Jahr [6]. Daher bleiben Patienten mit einer AKS oft jahrelang klinisch asymptomatisch, während sich durch die chronisch progrediente Stenosierung der Aortenklappe ein steigender transaortaler Druckgradient zwischen dem linken Ventrikel und der Aorta ascendens aufbaut. Die zunehmende Druckbelastung des linken Ventrikels führt kompensatorisch zu einer konzentrischen Hypertrophie des linksventikulären Myokards [7, 8]. Gemäß dem Laplaceschen Gesetz kann die Wandspannung, trotz des erhöhten endsystolischen Druckes, über die Zunahme der Wanddicke in einem normalen Bereich gehalten werden. Durch diesen Prozess ist der linke Ventrikel über längere Zeit in der Lage, den wachsenden Gradienten an der Klappe zu kompensieren und auf diese Weise das Herzzeitvolumen aufrechtzuerhalten. Während die systolische Ventrikelfunktion

zunächst erhalten bleibt, kann dieser Anpassungsvorgang bedingt durch fibrotische Umbauprozesse zu einer diastolischen Dysfunktion führen [9]. Die Folge ist eine abnehmende Dehnbarkeit *(Compliance)* des linken Ventrikels mit konsekutiver pulmonaler Stauung und Symptomen wie Leistungsminderung und Dyspnoe. Die linksventrikuläre Hypertrophie bedingt einen gesteigerten myokardialen Sauerstoffverbrauch. Darüber hinaus kann es infolge der ventrikulären Relaxationsstörung und der erhöhten Wandspannung mit Beeinträchtigung des subendokardialen Blutflusses zu einer verminderten diastolischen Perfusion der Koronarien kommen [10, 11]. Mit fortschreitender Erkrankung erschöpfen sich die Kompensationsmechanismen, sodass die Zunahme der Wanddicke nicht mehr ausreicht, um eine normale Wandspannung gegen die steigende Nachlasterhöhung aufrechtzuerhalten [7]. In diesem Stadium verbleibt nach der Systole vermehrt Blut im Ventrikel und das enddiastolische Volumen steigt an. Es ensteht eine Herzinsuffizienz mit linksventrikulärer Dilatation [7]. Weiter ist die Kapazitätsreserve der Koronararterien, im Vergleich zu Gesunden mit einer koronaren Flussreserve von 500—800%, im hypertrophen Myokard auf etwa 200-300% reduziert [12]. Daher können betroffene Patienten, bevorzugt unter Belastung, auch ohne nachweisbare hämodynamisch relevante Koronarstenosen pectanginöse Beschwerden entwickeln.

Durch eine AKS-bedingte, zerebrale Minderperfusion kann es insbesondere bei körperlicher Anstrengung zu Synkopen und Schwindel kommen. Für diese Symptomatik ist hauptsächlich eine Fehlfunktion des Barorezeptor-Mechanismus mit einer peripheren Vasodilatation [13] in Kombination mit einer abnehmenden Ventrikelfunktion und einem unzureichenden Anstieg des Herzzeitvolumens unter Belastung verantworlich. Zudem kann die progrediente Minderdurchblutung des Myokards zu Ischämie-bedingten Herzrhythmusstörungen (z. B. Kammerflimmern) und nachfolgender erniedrigter kardialer Auswurfsleistung führen, bis hin zum plötzlichen Herztod.

Auf die oben genannten pathophysiologischen Mechanismen lassen sich die Kardinalsymptome der AKS zurückführen: Belastungsdyspnoe, Synkopen, pektanginöse Beschwerden (auch ohne zusätzliche Koronarerkrankung), Linksherzinsuffizienz sowie plötzlicher Herztod.

Typischerweise manifestieren sich klinische Beschwerden erst bei einer Aortenklappen-Öffnungsfläche < 1 cm², einem mittleren systolischen transvalvulären Druckgradienten > 40 mmHg oder einer maximalen systolischen Blutflussgeschwindigkeit von >4,0 m/s [14]. Das Auftreten von Symptomen hat derweil entscheidenden Einfluss auf den natürlichen Verlauf. Die kalzifizierende AKS ist ein chronischer, progressiver Prozess. Patienten mit einer hochgradigen AKS bleiben über einen langen Zeitraum asymptomatisch und haben in dieser Zeit, mit einer Inzidenz für den plötzlichen Herztod von unter 1%, eine annähernd gleiche Überlebensrate wie Patienten ohne Stenose [15]. Mit dem Auftreten klinischer Symptome haben AKS-Patienten dagegen eine erheblich eingeschränkte Lebenserwartung, die unter der von vielen Tumorerkrankungen liegt [16]. Bei symptomatischen Patienten beträgt die durchschnittliche Lebenserwartung fünf Jahre nach dem Auftreten pektanginöser Beschwerden , drei Jahre bei Synkopen und zwei Jahre bei Herzinsuffizienz [17, 18]. In einer prospektiven Studie an Patienten mit inoperabler hochgradiger AKS, zeigte sich unter einer rein konservativen Standardtherapie (medikamentös) eine Mortalitätsrate von 50,7% nach einem Jahr [19] und von 68% nach zwei Jahren [20]

Diagnose

Die Verdachtsdiagnose einer AKS wird auf der Basis der Symptome Belastungsdyspnoe, Angina pectoris und Schwindel bis hin zur Synkope, sowie des charakteristischen kardialen Auskultationsgeräusches des Patienten (spindelförmiges rauhes Systolikum mit Punctum maximum im zweiten Intercostalraum parasternal rechts mit Fortleitung in die Karotiden) gestellt. Die Echokardiografie (transthorakal und ggf. transösophageal) gilt aktuell als Goldstandard bei der Diagnose der AKS [21].

Pathogenese

In der vorliegenden Studie wurden ausschließlich Patienten mit erworbener degenerativer (=kalzifizierender) AKS untersucht. Die degenerative AKS ist Folge einer fortschreitenden Fibrosierung und Zunahme nodulärer Calciumablagerungen

innerhalb der Aortenklappensegel . Diese Prozesse führen zu einer Minderbeweglichkeit der Klappentaschen und progressiven Verengung des linksventrikulären Ausflusstraktes mit hämodynamischen Einschränkungen [22].

Pathogenetisch ist die degenerative AKS nicht nur ein altersbedingter, passiver Degenerationsprozess [23]. Vielmehr handelt es sich wahrscheinlich um ein aktives inflammatorisches und proliferatives Geschehen, das mit den gleichen kardiovaskulären Risikofaktoren wie die Atherosklerose assoziiert ist. Dazu zählen die arterielle Hypertonie, ein höheres Alter, erhöhte Serumspiegel von Low-Density-Lipoprotein (LDL), Cholesterin und Lipoprotein (a), Rauchen, Diabetes und das metabolische Syndrom [24-26].

Der auslösende Schlüsselfaktor für die Entwicklung einer degenerativen AKS scheint ein erhöhter mechanischer Stress zu sein, der zu einem endothelialen Schaden der Taschenklappen führt. Vergleichbar mit der Pathogenese der Arteriosklerose begünstigt diese frühe Läsion die Akkumulation von Lipoproteinen, bestehend aus LDL und Lipoprotein A (Apo A) [27, 28], sowie die Infiltration von inflammatorischen T-Lymphozyten und Makrophagen mit einer konsekutiven Entzündungsreaktion [22, 29]. Diese Befunde deuten darauf hin, dass die Degeneration der Aortenklappe einen der Arteriosklerose ähnlichen Prozess darstellt, der neben der Aortenklappe auch das Gefäßsystem betrifft [23, 30].

1.2 Aortenklappenstenose und Gefäßfunktion

Das vaskuläre Endothel kleidet als einschichtiges flaches Plattenepithel die innere Oberfläche von Blutgefäßen aus. Bei jedem Herzzyklus wird das Blut unter pulsatilem Druck über die Aorta entlang eines dicht verzweigten arteriellen Gefäßsystems zu den peripheren Organen transportiert. Das Zusammenspiel der pulsierenden Blutströmung mit der arteriellen Geometrie erzeugt komplexe, auf die Gefäßwand einwirkende, räumlich und zeitlich variable, biomechanische Kräfte [31]. Zu diesen biomechanischen Kräften gehören der intravaskuläre Druck und der Blutfluss. Der intravaskuläre Druck erzeugt eine intraluminale, senkrecht zur Gefäßwand ausgerichtete Kraft. Aus der dadurch bedingten Ausdehnung des Umfangs und der Länge der zylindrischen Gefäßstruktur resultiert eine Wandspannung. Das Laplacesche Gesetz beschreibt die Längen-Spannungs-

Beziehung des Druckes auf Hohlorgane, wie sie idealisiert für Blutgefäße und für das Herz angenommen wird. Hierbei verhält sich die Wandspannung proportional zur transmuralen Druckdifferenz und dem Innenradius eines Gefäßes und umgekehrt proportional zur Wanddicke (siehe Formel 1). Im Gegensatz zum intravaskulären Druck beschreibt der Scherstress (*WSS* = *wall-shear-stress*) eine in Längsrichtung auf die Gefäßwand wirkende axiale Kraft, die durch die Reibung zwischen dem Blutfluss und der sich nicht bewegenden (statischen) Gefäßwand entsteht. Der WSS ist durch die Viskosität des Blutes, den Blutfluss und den Kehrwert des Gefäßradius definiert (siehe Formel 2) [32].

Formel 1)

Laplacesches Gesetz: $K = P \times r / (2 \times d)$

K = Wandspannung; P = transmuraler Druck; r = Gefäßradius; d = Wanddicke

Formel 2)

Scherstress: $WSS = 8 \times \mu \times V / r$

μ = Blutviskosität; V= Blutfluss; r = Gefäßradius

Die Aufrechterhaltung eines physiologischen laminaren WSSs ist entscheidend für eine normale Gefäßstruktur und -funktion. Die atheroprotektive Wirkung des laminaren WSS beruht auf der Freisetzung von antikoagulativen, anti-inflammatorischen [33-35] und vasodilatorischen [36, 37] Substanzen. Das von Endothelzellen produzierte Stickstoffmonoxid (NO) fungiert als ein wichtiger Vasodilatator der glatten Gefäßmuskulatur [38]. NO wird in Endothelzellen von der endothelialen NO-Synthase (eNOS) aus der basischen Aminosäure L-Arginin synthetisiert und führt über eine Erhöhung der Aktivität der löslichen Guanylatzyklase zur Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur [39]. Schlüsselreiz für die NO-Freisetzung ist ein auf das Endothel einwirkender erhöhter laminarer WSS [36, 40]. Dieser führt bei den Endothelzellen zu einer gesteigerten Expression der endothelialen NO-Synthase [41, 42]. Zusätzlich wirkt NO durch die Inhibition der Leukozytenadhäsion, Plättchenaktivierung (Adhäsion und Aggregation) [43] und

Proliferation glatter Muskelzellen [44] protektiv und anti-atherogen. Folglich ist die Scherkraft-induzierte NO-Freisetzung ein essentieller Bestandteil der intakten endothelialen Schutzbarriere. Vaskuläre Erkrankungen sind durch eine eingeschränkte NO-Bioverfügbarkeit [45, 46], durch veränderte antikoagulative und antiinflammatorische Eigenschaften des Endothels [47, 48] und durch eine reduzierte flussvermittelte Dilatation [49] charakterisiert. Diese pathologischen Veränderungen werden unter dem Oberbegriff der endothelialen Dysfunktion zusammengefasst und gelten als Schlüsselereignis sowohl für die Entstehung als auch für die Progression einer Arteriosklerose [50, 51].

Die Entwicklung der endothelialen Dysfunktion umfasst neben funktionellen, auch strukturelle und physikomechanische Veränderungen der Gefäßwand. Bei Patienten mit erhöhtem kardiovaskulärem Risiko ist eine Zunahme der lokalen arteriellen Gefäßsteifigkeit, gemessen über die relative Diameteränderung (*fractional diameter change* = FDC), nachweisbar [52]. Das Prinzip dieses Untersuchungsverfahrens basiert auf der systolisch-diastolischen Diameteränderung des Gefäßes während eines Herzzyklus .

Die AKS führt nicht nur zu einem erhöhtem WSS und einer endothelialen Adaptation auf Höhe der Stenose [53], sondern beeinflusst auch das Endothel distal von der Stenose gelegener peripherer Arterien. In Bereichen arterieller Stenosen (verminderte Lumen-Fläche und damit Radius) wird die gleiche Blutmenge durch einen geringeren Querschnitt gepresst, wodurch innerhalb des stenotischen Bereichs die Blutgeschwindigkeit und konsekutiv der WSS ansteigt [32]. Ferner ist das Endothel distal der Stenose einem gestörtem Fluss und einem oszillierenden WSS ausgesetzt [32]. Daher finden sich bei Patienten mit einer AKS stromabwärts in den peripheren Arterien als Zeichen einer endothelialen Dysfunktion ein verringerter WSS [54] und eine verminderte flussvermittelte Dilatation (*FMD*), [55, 56].

In der nachfolgenden Abbildung 1 sind die physikomechanischen, Endothelzell-beeinflussenden Eigenschaften dargestellt.. Hierzu gehören der WSS, die Blutdruckamplitude und die FDC, als Maß für die arterielle Steifigkeit. Indizes der endothelialen Funktion und Integrität werden durch die FMD und Plasmaspiegel zirkulierender endothelialer Mikropartikel (EMPs) bewertet.

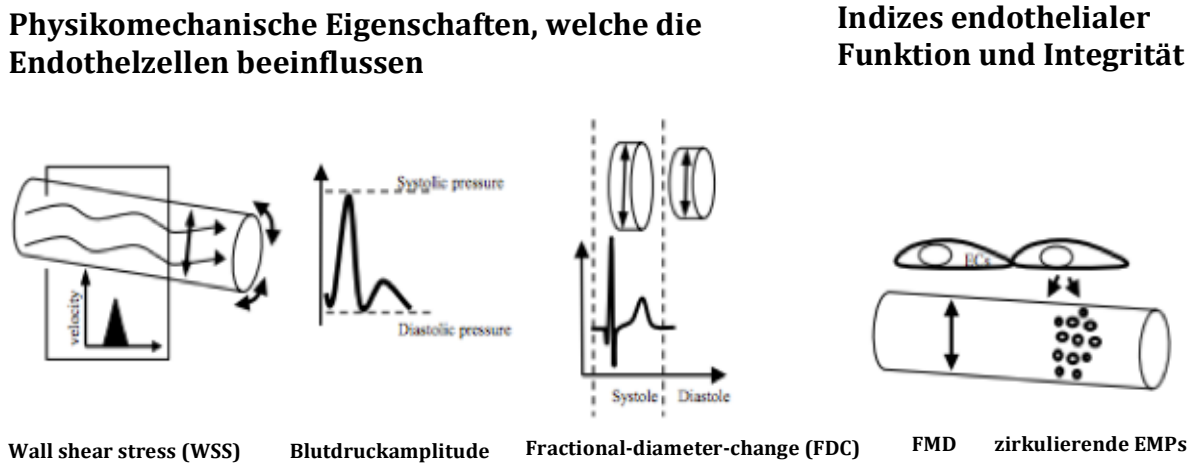


Abb. 1: Physikomechanische Eigenschaften mit Einfluss auf die Endothelzellen und Indizes der endothelialen Funktion und Integrität
Zu den physikomechanischen Eigenschaften gehören der Scherstress (WSS), die Blutdruckampitude und die arterielle Steifigkeit (gemessen anhand der relativen Diameteränderung (FDC)); Indizes der endothelialen Funktion und Integrität werden durch die flussvermittelte Dilatation (FMD) und Plasmaspiegel zirkulierender endothelialer Mikropartikel (EMP) bewertet.

1.3 Mikropartikel (MP) als Marker der endothelialen Integrität

Bei anhaltender Exposition des Gefäßendothels gegenüber den kardiovaskulären Risikofaktoren entwickeln endotheliale Zellen einen proinflammatorischen Phänotyp. Dieser Phänotyp ist mit einer erhöhten Seneszenz und Apoptose der Zellen assoziiert [57]. Als Konsequenz dieses Prozesses wird die endotheliale Integrität unterbrochen, so dass ganze Endothelzellen oder Teile dieser Zellen gelöst und in den Kreislauf freigesetzt werden [58]. Die Konzentration dieser Membranabschnürungen, der EMPs, kann daher als zirkulierender Marker einer beeinträchtigten endothelialen Integrität gewertet werden [59, 60]. MPs sind definiert als kleine Zellmembranvesikel, die im Durchmesser etwa 0,1 bis 1 µm messen. Sowohl Endothelzellen als auch Blutzellen wie Thrombozyten, Leukozyten und Erythrozyten sind in der Lage, MPs aus ihren Zellmembranen abzuspalten und in die Blutbahn freizusetzen [59, 61, 62]. Zu den unterschiedlichen Stimuli der MP-Freisetzung gehören die Apoptose, die zytokinvermittelte Zell-Aktivierung, oxidativer Stress oder WSS [63, 64]. Für die Bildung und Freisetzung der MPs sind Veränderungen im asymmetrischen Aufbau der Lipid-Doppelschicht der Zellmembran verantwortlich. In intakten Zellen besteht die äußere Schicht der

Zellmembran physiologisch überwiegend aus Phosphatidylcholinen, während in der zum Zellinneren gerichteten Schicht die negativ geladenen Aminophospholipide, wie beispielsweise Phosphatidylserin dominieren. Bei der Aufrechterhaltung dieses Ungleichgewichtes im Phospholipidverhältnis der Zellmembran spielen die Enzyme Translocase (transportiert aktiv Phospatidylserin von der äußeren zur inneren Schicht der Zellmembran) und Scramblase (ermöglicht den Phospholipiden die freie Beweglichkeit zwischen innerer und äußerer Zellmembran) eine entscheidende Rolle [65-68]. Bis heute sind die genauen, zur MP-Bildung führenden intrazellulären Vorgänge noch weitestgehend ungeklärt. Unabhängig vom auslösenden Stimulus scheint ein Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration der entscheidende Auslöser für den Beginn der MP-Abschnürung zu sein [65-68]. Die gleichzeitige kalziumabhängige Inhibierung der Translokase und Aktivierung der Scramblase bewirkt eine verstärkte Relokalisation von Phosphatidylserin von der Innen- auf die Außenseite der Zellmembran. Zudem wird durch das intrazellulär erhöhte Kalzium das proteolytische Enzym Calpain aktiviert. Calpain spaltet Zytoskelettfilamente, die die Membran in der Zelle fest verankern, woraufhin das Membranskelett zusammenbricht [65-68]. Diese Veränderungen in der Membran-Asymmetrie, mit vermehrter Expression von Phospatidylserin auf der Membranaußenseite, sowie der enzymatische Abbau der Membranintegrität, scheinen ausschlaggebend für die Abschnürung von MPs aus der Mutterzelle zu sein.

MPs bestehen aus einer Lipiddoppelschicht und einem intravesikulären Kompartiment. Entsprechend ihrer Ursprungszelle exprimieren MPs auf ihrer Oberfläche spezifische Membranproteine und Phospholipide, deren Zusammensetzung Rückschlüsse auf die Mutterzelle und die möglichen biologischen Funktionen zulassen [59, 61, 62]. Nach einer Markierung zellspezifischer Oberflächenantigene mittels immunologischer Färbetechniken können MPs durchflusszytometrisch quantifiziert und ihren jeweiligen Ursprungszellen zugeordnet werden [69].

Die MPs bilden eine heterogene Population, die sich in Größe, zellulärem Ursprung, Anteil an der Gesamtkonzentration und Antigen-Präsentation unterscheiden. Sie zirkulieren physiologisch in geringen Konzentrationen frei im Blut gesunder Individuen und Ihre Konzentration ist bei kardiovaskulären Erkrankungen erhöht [70].

Der Fokus der vorliegenden Arbeit lag primär auf den MPs endothelialen Ursprungs. EMPs sind komplexe vesikuläre Strukturen, die über Koagulation, Inflammation, Endothelfunktion und interzellulärer Kommunikation aktiv in die Modulation der vaskulären Homöostase eingreifen [71, 72]. EMPs dienen daher als Marker der endothelialen Integrität und Funktion. Eine erhöhte Konzentration zirkulierender EMPs ist bei verschiedenen Erkrankungen, die mit endothelialen Schäden einhergehen nachweisbar. So konnten bei Patienten mit koronarer Gefäßerkrankung (KHK), schwerer Hypertonie, metabolischem Syndrom oder Myokardinfarkt erhöhte EMP-Konzentrationen gemessen werden [73-75]. Bei Patienten, die durch eine nachgewiesene endotheliale Dysfunktion charakterisiert sind, korrelieren die Blutspiegel zirkulierender EMPs, unabhängig von Alter und Blutdruck, invers mit der Amplitude der flussvermittelten Dilatation (FMD). Diese inverse Korrelation zwischen EMPs und FMD wurde umfassend bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz, Diabetes, ischämischer linksventrikulärer Dysfunktion und Übergewicht untersucht [76-79].

Mechanische Faktoren sind wesentlich an der EMP-Freisetzung beteiligt. *In-vitro*- und *In-vivo*-Studien belegen, dass ein turbulenter WSS zu einer endothelialen Apoptose führt, während ein laminarer WSS die Endothelzellen vor der Apoptose schützt [33, 80]. Da die Apoptose die EMP-Sekretion fördert, werden bei turbulentem oder niedrigem WSS EMPs vermehrt freigesetzt. Diese Hypothese wird durch die inverse Korrelation zwischen EMPs und dem basalen arteriellen laminaren WSS bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz unterstützt [81]. Zudem zeigten Diehl et al., dass Patienten mit hochgradiger AKS im Vergleich zu Patienten ohne AKS eine erhöhte Konzentration von EMPs besitzen [82].

Die Konzentration zirkulierender EMPs gilt als unabhängiger Prognosefaktor für kardiovaskuläre Ereignisse und das Überleben der Patienten. Bei Patienten mit stabiler Angina Pectoris, Schlaganfällen oder terminaler Niereninsuffizienz, ist eine erhöhte Konzentration an EMPs mit einem erhöhten Risiko für schwere kardiovaskuläre Ereignisse assoziiert [83-85].

EMPs sind nicht nur Marker für eine endotheliale Schädigung und eine gestörte Integrität, sondern besitzen auch funktionale Eigenschaften. Die EMPs tragen auf ihrer Oberfläche eine Reihe von bioaktiven Substanzen, Rezeptoren und Adhäsionsmolekülen und enthalten in ihrem intravesikulären Kompartiment große Mengen an Zytokinen, Signalproteinen und messenger Ribonukleinsäure-(mRNA)-, sowie Desoxyribonukleinsäure-(DNA)-Fragmente [86, 87]. Zirkulierende EMPs fungieren als biologische Vektoren in der systemischen interzellulären Kommunikation [88]. EMPs sind in der Lage, mRNAs, Proteine oder Zellorganellen auf Zielzellen zu übertragen und können hierdurch möglicherweise das Überleben und die Proliferation von Endothelzellen fördern [89, 90]. Eine der am besten untersuchten Eigenschaften von EMPs ist ihr pro-koagulatorischer Effekt. MPs sind über die Externalisierung von Phosphatidylserin und über die Expression von *Tissue factor* in der Lage, die Koagulation zu initiieren und nehmen somit Einfluss auf die Endothelfunktion [91-93].

1.4 Therapie der hochgradigen Aortenklappenstenose

Der aktuelle Goldstandard bei der Behandlung der hochgradigen, symptomatischen AKS ist der konventionelle Aortenklappenersatz (AKE) (Evidenzgrad IB). Bei diesem herzchirurgischen Verfahren wird unter Vollnarkose das Sternum partiell oder vollständig median gespalten. Unter Einsatz der Herz-Lungen-Maschine wird die degenerativ veränderte Klappe am kardioplegisch stillgelegten Herzen exzidiert und durch eine mechanische oder biologische Klappe ersetzt. In Abwesenheit schwerer Begleiterkrankungen beträgt die perioperative Mortalität des isolierten AKEs ≈1–3% bei den unter 70-Jährigen und ≈4–8% bei den älteren Patienten [94-96]. Durch den konventionellen Klappenersatz verbessert sich sowohl die Symptomatik als auch das Langzeitüberleben des Patienten signifikant [97, 98]. In der klinischen Praxis steigt jedoch die Zahl der Patienten mit hochgradiger symptomatischer AKS, die aufgrund ihres fortgeschrittenen Alters (>75 Lebensjahre), einer linksventrikulären Dysfunktion sowie multipler, schwerer Begleiterkrankungen als Hochrisikopatienten eingestuft und aufgrund ihres individuellen perioperativen Mortalitätsrisikos als ungeeignet für einen offenen herzchirurgischen Eingriff betrachtet werden. Laut den Ergebnissen des *Euro Heart Survey*) wird bei schätzungsweise 30-60% der Patienten, die gemäß geltender Richtlinien eine

Operationsindikation aufweisen, der Eingriff an der Aortenklappe wegen eines zu hohen Operationsrisikos nicht durchgeführt [2].

Für dieses als inoperabel oder mit einem hohen perioperativen Mortalitätsrisiko eingestufte Patientenkollektiv ist die Transkatheter-Aortenklappen-Implantation (TAVI) ein neues kathetergestütztes Verfahren, bei dem eine biologische, in einem Stent montierte Klappe über einen transapikalen oder einen transfemoralen Zugangsweg bis ins Herz eingeführt wird und in die erkrankte native Aortenklappe implantiert wird. Dieser minimal-invasive Eingriff wird am schlagenden Herzen ohne Einsatz der Herz-Lungen-Maschine vorgenommen und kann in Lokalanästhesie erfolgen. Seit Ersteinführung durch Alain Cribier im Jahre 2002 [99] etablierte sich das Verfahren weltweit und zeigte kontinuierlich steigende Implantationszahlen. Im Zeitraum von 2007 bis 2014 stieg allein in Deutschland die Anzahl der durchgeführten TAVI-Prozeduren von 157 auf 48.353 [100].

Welches Therapieverfahren letztlich für den individuellen Patienten zum Einsatz kommt (AKE versus TAVI) wird in einem interdisziplinär besetzten *Heart-Team* aus Kardiochirurgen und Kardiologen entschieden.

Die bisherigen Studiendaten zur TAVI belegen die Sicherheit des Verfahrens. Durch die steigenden Patientenzahlen, die rasante technische Entwicklung mit Miniaturisierung und Repositionierbarkeit der Klappenprothesen sowie die zunehmende Erfahrung der TAVI-Operateure lässt sich ein deutlicher Rückgang der perioperativen Mortalität von 10,4% im Jahr 2008 auf 4,2% im Jahr 2014 verzeichnen [100]. Die Ein-Jahres-Überlebensrate nach einer TAVI-Prozedur hängt von der Schwere der Begleiterkrankungen ab und schwankt zwischen 70 und 80% [19, 101, 102]. Die meisten Überlebenden zeigen eine signifikante Verbesserung der Gesundheit sowie Lebensqualität. Im Jahre 2010 und 2011 wurden erstmalig zwei prospektiv randomisierte Studien zur Bewertung des Nutzens der TAVI publiziert (*PARTNER-Trial*) [19, 101]. In einer dieser Studien (Kohorte A) wurde bei Patienten mit sehr hohem Operationsrisiko (*Society of Thoracic Surgery*-(STS)-Risikoscore >10%) die Katheter-gestützte AKE mit dem konventionellen herzchirurgischen Eingriff verglichen. Anhand der Ergebnisse der PARTNER-A-Studie zeigte sich, dass TAVI bezogen auf das Ein-Jahres-Überleben dem konventionellen Verfahren nicht unterlegen ist (Ein-Jahres-Mortalität TAVI 24,2 % versus Offene Operation 26,8%) [101]. Auch nach zwei Jahren zeigte sich keine signifikant erhöhte Mortalität unter

der TAVI-Kohorte (Zwei-Jahres-Mortalität TAVI 33.9% % versus Offene Operation 35.0%) [103]. Eine zweite randomisierte Studie (Kohorte B) umfasste inoperable Patienten, die mit einer TAVI oder mit einer rein konservativen Standardtherapie (medikamentös oder Ballonvalvuloplastie) behandelt wurden. Bezüglich des primären Endpunktes ''Tod jeglicher Ursache nach einem Jahr'' zeigte sich TAVI gegenüber einer konservativen Behandlung (TAVI 30,7% versus Standardtherapie 50,7%) als überlegen [19]. Auch nach zwei Jahren wurden in der TAVI-Kohorte höhere Überlebensraten beschrieben verglichen zu der Standardtherapie-Gruppe (Zwei-Jahres-Mortalität TAVI 43,3% versus Standardtherapie 68,0%) [20]. Eine kürzlich veröffentlichte Studie bei Patienten, die laut Studienprotokoll einer Hochrisikogruppe angehörten (STS-Risikoscore ≥15%), nach Randomisierung mit einem mittleren STS-Risikoscore von 7,5% nur ein mittleres Risiko besaßen, zeigte erstmals eine signifikante Überlegenheit der TAVI gegenüber dem konventionellen AKE im Hinblick auf das Ein-Jahres-Überleben (TAVI 14,2% *versus* Standardtherapie 19,1%) [104].

Langzeitergebnisse für die TAVI liegen aufgrund der Neuheit des Verfahrens jedoch noch nicht vor. Deshalb besteht zum gegenwärtigen Zeitpunkt ein Konsens internationaler kardiologischer und herzchirurgischer Fachgesellschaften, dass diese Methode vorerst nur bei Patienten mit hohem Operationsrisiko oder Inoperabilität und unter interdisziplinärer Indikationsstellung eingesetzt werden soll [95, 105].

1.5 Fragestellung dieser Arbeit

Die AKS führt nicht nur zu einem erhöhten WSS und einer endothelialen Adaptation auf Höhe der Stenose [53], sondern beeinflusst auch distal der Stenose das Endothel peripherer Arterien. Das vaskuläre Endothel ist verschiedenen mechanischen Kräften wie dem Blutdruck und dem WSS ausgesetzt, die wiederum Auswirkungen auf den Gefäßtonus [31, 106] und die FMD [36, 37] haben. Die AKS verändert die systemische Hämodynamik durch ein reduziertes Schlagvolumen und einer beeinträchtigten pulsatilen Strömung. Bei Patienten mit einer AKS findet sich stromabwärts in den peripheren Arterien ein verringerter WSS [54], eine verminderte FMD als Zeichen einer endothelialen Dysfunktion [55, 56] und eine erhöhte Konzentration an zirkulierenden EMPs [82]. EMPs sind Membranvesikel mit einem

Durchmesser von unter einem Mikrometer, die als zirkulierende Marker für eine beeinträchtigte endotheliale Integrität betrachtet werden [59, 60].

Bislang war unbekannt, ob bei Patienten mit AKS die endotheliale Funktion als direkte Konsequenz des arteriosklerotischen Prozesses selbst beeinträchtigt ist, aufgrund veränderter mechanischer Kräfte (wie dem verminderten WSS distal der Stenose), oder ob dies sekundär durch andere Faktoren jenseits physikalischer Druckeffekte begünstigt wird.

In der vorliegenden Studie stellten wir die Hypothese auf, dass die veränderte Hämodynamik zumindest teilweise für die endotheliale Dysfunktion bei Patienten mit AKS verantwortlich ist. Das Ziel der Studie war es, zu untersuchen, ob sich durch die Therapie einer hochgradigen AKS mittels TAVI der periphere arterielle WSS erhöht, die endotheliale Dysfunktion verbessert und die Konzentration zirkulierender EMPs als Marker einer beeinträchtigten endothelialen Integrität reduziert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Studienkollektiv

In diese prospektive Beobachtungsstudie wurden von September 2011 bis Dezember 2013 insgesamt 70 Patienten des Universitätsklinikums Düsseldorf mit symptomatischer hochgradiger degenerativer AKS eingeschlossen, bei denen eine TAVI geplant war. Eine hochgradige AKS wurde nach den Richtlinien der *European Society of Cardiology* und der *European Association for Cardio-Thoracic Surgery* definiert [95]. Gemäß dem aus Kardiochirurgen und Kardiologen bestehenden, interdisziplinären *Heart-Team* wurde bei diesen Patienten aufgrund des hohen Alters, schwerer Begleiterkrankungen sowie Gebrechlichkeit *(Frailty)* die Indikation zur TAVI gestellt (siehe Kapitel 1.4).

Von den ursprünglich 70 der in die Studie aufgenommen Patienten wurden neun Patienten ausgeschlossen (fünf Patienten erhielten via Minithorakotomie einen transapikalen Zugang und bei vier Patienten erfolgte lediglich eine Ballonvalvuloplastie). 61 Patienten erhielten eine transfemoralen TAVI, davon verstarben vier Personen und eine Person konnte aufgrund eines Krankenhausaufenthalts nicht bei der Drei-Monats-Nachuntersuchung erscheinen, so dass letztlich 56 Patienten in die vorliegende Studie eingeschlossen werden konnten (siehe Abb. 2).

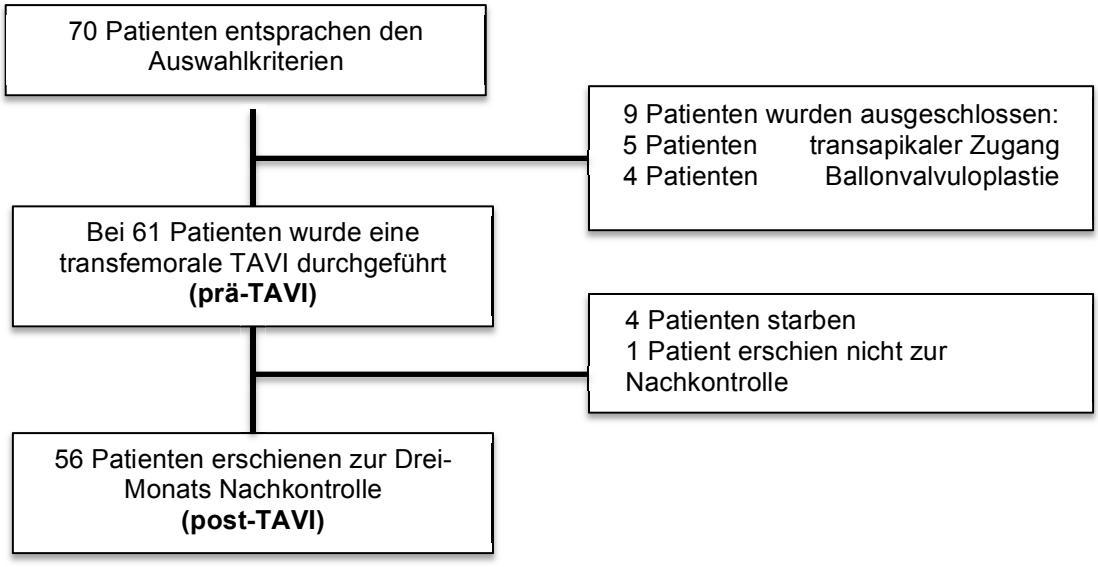


Abb. 2: Fluss der Teilnehmer während der Studienphasen

Die Auswahl des optimalen Zugangswegs und der richtigen Prothesengröße erfolgte auf der Basis der Ergebnisse aus der Diagnostik im Rahmen der Vorbereitung für den geplanten Eingriff (Computertomografie (CT) von Thorax, Abdomen und Becken sowie Echokardiografie) unter Berücksichtigung der anatomischen Verhältnisse der Aorta und der peripheren Gefäße. Der transvalvuläre Druckgradient, die Spitzen-Strömungsgeschwindigkeit und die Klappenöffnungsfläche wurden durch transthorakale bzw. transösophageale Echokardiographie sowie Herzkatheter ermittelt. Die verschiedenen physikomechanischen Eigenschaften, die einen Einfluss auf die Endothelzellen ausüben, wurden zum Zeitpunkt der Diagnose der AKS (prä-TAVI-Intervention) und drei Monate nach der TAVI-Prozedur (post-TAVI-Intervention) gemessen. Die Messungen beinhalteten die Ermittlung des WSS, der Blutdruckamplitude und der arteriellen Steifigkeit (FDC). Indizes der endothelialen Funktion und Integrität wurden durch die FMD und Plasmaspiegel zirkulierender EMPs erfasst und ebenfalls sowohl Prä- als auch drei Monate post-TAVI gemessen.

Als Vergleichskohorte dienten Patienten, bei denen echokardiographisch eine AKS ausgeschlossen werden konnte. Die Kohorte setzte sich aus einer Gruppe 20 freiwilliger Patienten im Alter zwischen 77-91 Jahre zusammen. Die Rekrutierung der Kontroll-Gruppe erfolgte ebenfalls über die kardiologischen Stationen des Universitätsklinikums Düsseldorf.

Allgemeine Ausschlusskriterien waren eine akute Entzündung (definiert durch eine Erhöhung des C-reaktiven Proteins (CRP)), Stufe 5 einer chronischen Nierenerkrankung und eine aktive maligne Erkrankung innerhalb des letzten Jahres. In Übereinstimmung mit den Regeln des Universitätsklinikum Düsseldorfs wurden alle Teilnehmer der Studie umfassend aufgeklärt. Eine schriftliche Einwilligung für die Untersuchungen und Auswertungen sowie Veröffentlichungen der Studienergebnisse wurde eingeholt.

Diese Studie wurde gemäß den Richtlinien, die in der *Declaration of Helsinki* niedergelegt sind, ausgeführt. Des weiteren wurden alle Verfahren mit menschlichen Probanden bzw. Proben von von der Ethikkomission der Universität Düsseldorf genehmigt (Studiennummer 4299). Die Studie wurde unter *Clinicaltrials.gov* : NCT01993485 registriert.

2.2 Eingriffstechnik der TAVI

In der vorliegenden Studie wurden ausschließlich Patienten mit transfemoraler Aortenklappenimplantation eingeschlossen, weshalb im Folgenden genauer auf diese Methode eingegangen wird.

Für den transfemoralen kathetergestützten Ersatz der Aortenklappe, verwendeten wir das *CoreValve Revalving*-System (*Medtronic, Irvine, CA, USA*). Bei dieser selbstexpandierenden Prothese war eine dreitaschige Schweineperikardklappe in einem kelchförmigen Nitinolstent eingenäht, dessen distales, breiteres Ende eine zusätzliche Verankerung in der Aorta ascendens ermöglichte (siehe Abb. 3). Aufgrund der temperaturabhängigen Eigenschaften des Nitinols, entfaltete sich die Prothese unter dem Einfluss der Körpertemperatur von selbst, so dass die Notwendigkeit einer Ballondilatation hierbei entfiel. Durch das Gitternetz der Prothese wurde die Koronarperfusion nicht beeinträchtigt. Die Prothese wurde über einen 18-French großen Einführungskatheter transfemoral appliziert.

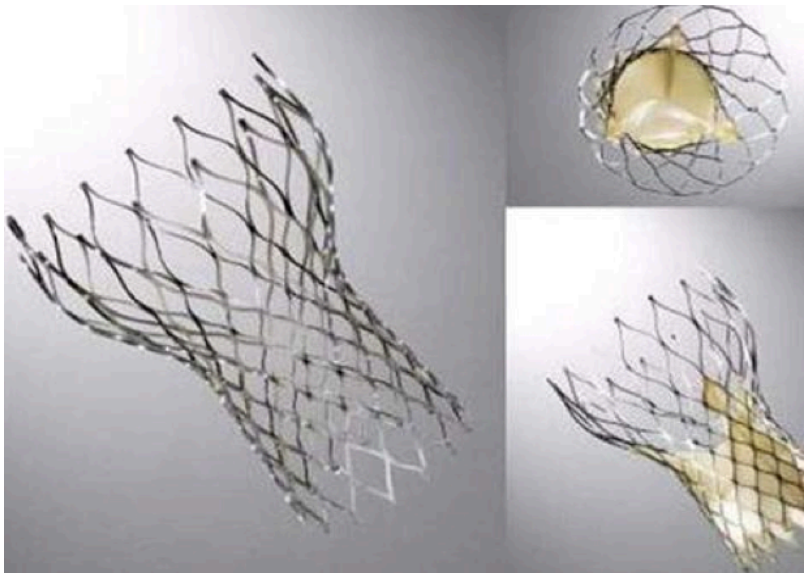


Abb.3: Medtronic CoreValve-Prothese aus porcinem Perikard; Das *CoreValve-Revalving*-System, bestand aus einer drei-taschigen Schweineperikardklappe, die in einem selbstexpandierenden Nitinolstent eingenäht war; Quelle: www.medtronic.com/corevalve.

Die TAVI-Prozeduren wurden in unserem Herzkatheter-Labor durchgeführt. Ein herzchirurgisches *Back-up* war im Falle auftretender Komplikationen jederzeit gewährleistet. Die Aortenklappen-Implantationen erfolgten in der transfemoralen Technik über eine perkutane Punktion der *Arteria (Art.) femoralis* fast ausschließlich unter lokaler Betäubung. Parallel hierzu wurde über einen venösen Katheter eine passagere Schrittmachersonde im rechten Ventrikel platziert. Vor der Prothesenimplantation wurde die stenosierte Aortenklappe zunächst durch eine Ballonvalvuloplastie aufgedehnt. Dieser Vorgang erfolgte unter rechtsventrikulärer tachykarder Schrittmacherstimulation bei einer Herzfrequenz von 180-220 Schläge pro Minute (bpm), dem sogenannten *''rapid pacing''*. Durch das *''rapid pacing''* wurde der transvalvuläre Blutfluss minimiert und somit eine stabile Position des Ballons ermöglicht. In einem nächsten Schritt wurde der Katheter mit der zusammengefalteten Klappenprothese retrograd transarteriell eingeführt und unter fluoroskopischer Kontrolle bis in die Aortenring-Position vorgeschoben. Die endgültige Position der Prothese wurde unter Röntgendurchleuchtung anhand von wiederholten Kontrastmittelinjektionen sowie mittels TEE festgelegt. Nach Freisetzung des Klappensystems expandierte die Core-Valve-Prothese am schlagenden Herzen aufgrund der phyisikalischen Eigenschaften des Nitinols von selbst. Die native Aortenklappe verblieb hierbei in-situ und wurde anders als bei der konventionellen herzchirurgischen Operation nicht entfernt. Die abschließende Kontrolle der korrekten Position und Funktion der implantierten Klappe erfolgte mittels TEE bzw. Aortographie. Bei Nachweis einer relevanten paravalvulären Insuffizienz konnte das Prothesensystem repositioniert oder nachdilatiert werden. Nach erfolgreichem Ergebnis wurde das komplette System entfernt, die Punktionsstelle verschlossen und der Patient zur weiteren Überwachung auf unsere kardiologische Intensivstation verlegt.

2.3 Blutentnahme und Herstellung von plättchenfreiem Plasma

Durch eine venöse Punktion der Kubitalvene auf Höhe der Ellenbeuge mit einer *Butterfly*-Kanüle der Grösse 21 G wurden ca. 6ml Citratblut entnommen. Nach der Blutentnahme wurden alle Proben innerhalb von 2 h weiterverarbeitet. Infolge der ersten Zentrifugation des Vollblutes bei 300 g über 15 min bei Raumtemperatur (RT) erhielt man Blutplättchen-reiches Plasma (PRP). Darauffolgend wurde Blutplättchen-freies Plasma (PFP) durch zwei aufeinanderfolgende Zentrifugationen des

erhaltenen Überstandes bei 10000 g für 5 min bei RT hergestellt. PFP, gewonnen durch diese sequentiellen Zentrifugationen, enthielt Mikropartikel aber keine Blutplättchen, was anhand durchflusszytometrischer Verfahren und Fluoreszenz-basierter Laser-Scanning-Mikroskopie gezeigt werden konnte (siehe Abb.4) [69]. In einem letzten Schritt wurden die Proben bis zur weiteren Verarbeitung in 1,5 ml große Eppendorf-Gefäße bei -80 Grad Celsius eingefroren und gelagert.

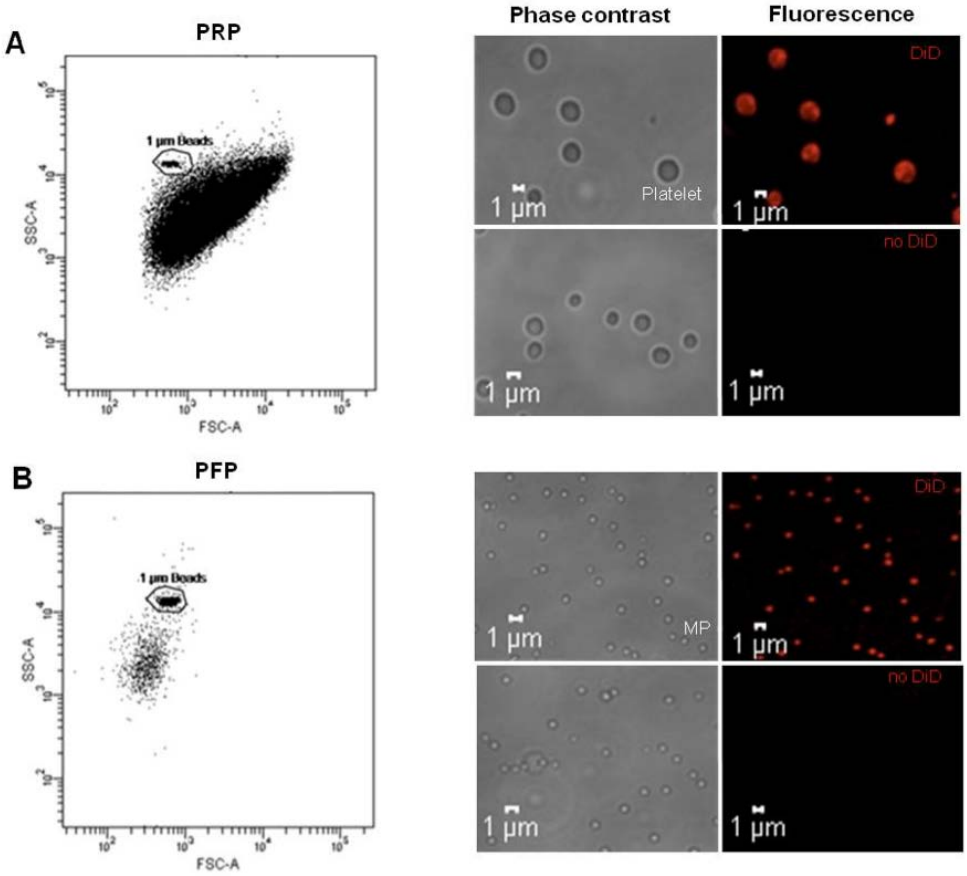


Abb. 4: Analyse der Zusammensetzung und Morphologie der durch sequentielle Zentrifugation erhaltenen verschiedenen Fraktionen von menschlichem Plasma: (A) PRP enthält eine dichte Population bestehend aus Thrombozyten mit einer Grösse > 1 µm und aus MPs mit einer Grösse <1 µm, wie durch die Durchflusszytometrie (linkes Panel), Phasenkontrast oder Fluoreszenz-basierter Laser-Scanning-Mikroskopie (mittleres und rechtes Panel) gezeigt wird. Die Membranen wurden mittels *DiD Cell-Labeling Solution* angefärbt. (B) PFP enthält nur MPs. (Modifiziert nach Horn et al. [69])

2.4 Durchflusszytometrie (FACS)

Zirkulierende MPs wurden mittels FACS-Analyse quantifiziert und anhand ihrer Oberflächenantigene entsprechend ihrer Subpopulation diskriminiert [107].

Es wurde das Durchflusszytometer *Canto II flow cytometer* (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) verwendet.

Verwendete Antigene

Mikropartikel präsentieren auf ihrer Oberfläche verschiedene Bestandteile der Ursprungszelle [108]. Diese können mittels spezifischer immunologischer Färbetechniken markiert und somit ihren verschiedenen Subpopulationen zugeordnet werden [69] :

FACS-Analyse Endothelialer-MP (EMP)

CD144: CD144 - auch als VE-Cadherin *(vascular endothelial)* bezeichnet - ist ein 130 kDa großes Glykoprotein, das zur Cadherin-Familie der Zelladhäsionsmoleküle gehört. Es ist innerhalb des Interzellulärspaltes aneinandergrenzender Endothelzellen lokalisiert, wo es bei der Kohäsion und Organisation der Zell-Zell-Interaktion eine Rolle spielt [109].

CD 62E: CD 62E ist ein 97-115 kDa großes Glykoprotein E-Selektin, auch bekannt als *endothelial-leukocyte-adhesion molecule-1* (ELAM-1). E-Selectin wird von aktivierten entzündeten Endothelzellen gebildet. Es ist beteiligt an der Adhäsion von neutrophilen Granulozyten am Endothel und spielt somit bei der inflammatorischen Reaktion eine Rolle [110].

CD31: *Platelet endothelial cell adhesion molecule-1* (PECAM-1), ist ein 140 kDa grosses Glykoprotein. Das Protein ist ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie und ist an der Leukozyten-Migration, Angiogenese und Integrin-Aktivierung beteiligt [111]. Es ist auf der Oberfläche von Thrombozyten, T-Zellen, Monozyten, Neutrophilen Granulozyten und Endothelzellverbindungen lokalisiert. Eine eindeutige Endothelzell-Zuordnung der MPs gelang mithilfe der Zweifachfärbung von CD31 und CD41 (PECAM/GP-IIb/IIIa, siehe unten). MPs endothelialen Ursprungs waren CD31+/CD41-. Monoklonale Antikörper gegen E-Selectin, VE-Cadherin und PECAM-1 wurden folglich zum Nachweis von endothelialen Mikropartikeln benutzt. [76], [112]

FACS-Analyse Thrombozytärer-MP

CD41: Dieser fluorochrom-konjugierte Antikörper dient dem Nachweis des GPIIb-IIIa- Fibrinogenrezeptors (GP-IIb/IIIa), durch Bindung an dessen β3- Kette. Der Rezeptor kommt fast ausschließlich auf Thrombozyten vor und führt über Bindung von Fibrinogen zu dessen Aktivierung.

Charakterisierung der MP-Subpopulationen mittels FACS

Das gefrorene PFP der Patienten (siehe Kapitel 2.3) wurde bei Raumtemperatur aufgetaut und mit dem Vortex homogen vermischt. Anschließend wurden 100 µl des PFP abpipettiert und mit 900 µl Kalzium-freiem *Phosphate-buffered saline* (PBS) verdünnt. 100 µl dieser Lösung wurden dann jeweils in acht verschiedene FACS-Röhrchen mit den Fluoreszenz-markierten Antikörpern (AK) oder deren jeweilige Isotypen-Kontrolle vermengt. Somit ergaben sich für unsere Untersuchungen pro zu messender Studienperson acht Probenansätze. Hierbei wurden die MP-Subpopulationen anhand ihrer Oberflächenmarker wie folgt definiert: CD144+, CD31+/CD41-, sowie CD62+ als endotheliale MPs und CD31-/CD41+ als Plättchen-MPs [76, 109-113].

Isotypen-Kontrollen sind Negativkontrollen, die das Ausmaß an Hintergrundsignal des Primär-AK aufzeigen. Für jeden verwendeten AK wurde ein entsprechender Kontroll-AK eingesetzt. Zur Kontrolle der Phycoerythrin-(PE)-markierten-AK wurde der Isotyp IgG1-Mouse-PE verwendet (A07796, Beckman Coulter). Die Überprüfung des CD41-PC5-AKs erfolgte mit dem Isotyp IgG1-Mouse-PC5-AK (A07798, Beckman Coulter). Die für die Isotypen-Kontrolle gemessenen Werte wurden von den mit den spezifischen AK erhaltenen Werten subtrahiert. Die Ansätze wurden 30 min. bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde 200 µl PBS in jedes der acht FACS-Röhrchen zugefügt. Zur Veranschaulichung sind die verwendeten AK-Kombinationen in der nachfolgenden Tabelle 1 aufgelistet.

Antikörper (-kombination)	Messung von
3 µl Microbeads (64040; Polysciences, Inc.)	Größenkalibrierung
20 µl flow-count calibrator beads (7548035; Beckman Coulter)	Quantifizierung der MP Konzentration
10 µl CD144-PE (A07481, BD Biosciences)	EMP
10 µl CD62 E-PE (551145, BD Biosciences)	EMP
10 µl CD41-PC5 + 10 µl CD31-PE (6607116, BD Biosciences); (IM2409, BD Biosciences)	EMP / PMP
10 µl IgG1-Mouse-PE (A07796; Beckman Coulter)	Isotypen-Kontrolle
10 µl IgG1-Mouse-PC5-AK +10 µl IgG1-Mouse-PE (A07798; Beckman Coulter); (A07796; Beckman Coulter)	Isotypen-Kontrolle

Tabelle 1: Antikörperfärbungen zur FACS-Messung

Die so aufbereiteten Proben wurden mit dem Durchflusszytometer *Canto II flow cytometer* (Beckton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) gemessen und ausgewertet Standard Mikrobeads (1,0 µm) wurden verwendet, um MPs als *Events* mit einem Durchmesser ≤ 1 µm definieren zu können. Die Konzentration der MPs wurde mit *Flow-count calibrator beads* (20 ul) quantifiziert. Anschließend wurden alle AK-markierten Proben in der FACS-Analyse analysiert**.** Die Probenanalyse wurde nach Ablauf von einer Minute bzw. nach der Zählung von 10.000 Ereignissen bei mittlerer Durchflussgeschwindigkeit (60 µl/min) gestoppt. Das FACS-Gerät wurde wie vom Hersteller empfohlen nach jeder Messung für 5 min mit den Spüllösungen FACS-*Safe* und FACS-*Rinse* gespült .

Datenauswertung

Zur Bestimmung der unteren Nachweisgrenze wurden Negativkontrollen mit unspezifisch bindenden PE- bzw. Fluorescein isothiocyanate-(FITC)-gelabelte AK

verwendet. Als obere Nachweisgrenze wurden Eichpartikel zur Größenkalibrierung verwendet, Standard *Mikrobeads* mit einer Größe von 1,0 µm, um MP mit einem Durchmesser ≤ 1 µm definieren zu können. Bei allen folgenden Fluoreszenzdarstellungen wurden ausschließlich Ereignisse dieses Analysefensters angezeigt und mittels der *Cell Quest Software Version* 3 ausgewertet (siehe G1-Bereich in Abb. 5). Weiterhin wurde ein Schwellenwertparameter über das Vorwärtsstreulicht (*forward scatter,* FSC) definiert, der festlegt, ab welcher Signalstärke ein Partikel gemessen werden soll. Erst beim Überschreiten dieser Signalgrenze wurden die Daten der Zellen aufgezeichnet, um elektronisches Rauschen direkt aus der Messung auszuschließen. Die MPs wurden so anhand ihrer Größe (0,1–1,0 µm über das FSC), ihrer Dichte (über das Seitwärtsstreulicht, *side scatter,* SSC) und ihrer Fluoreszenzintensität detektiert und den verschiedenen Subpopulationen zugeordnet.

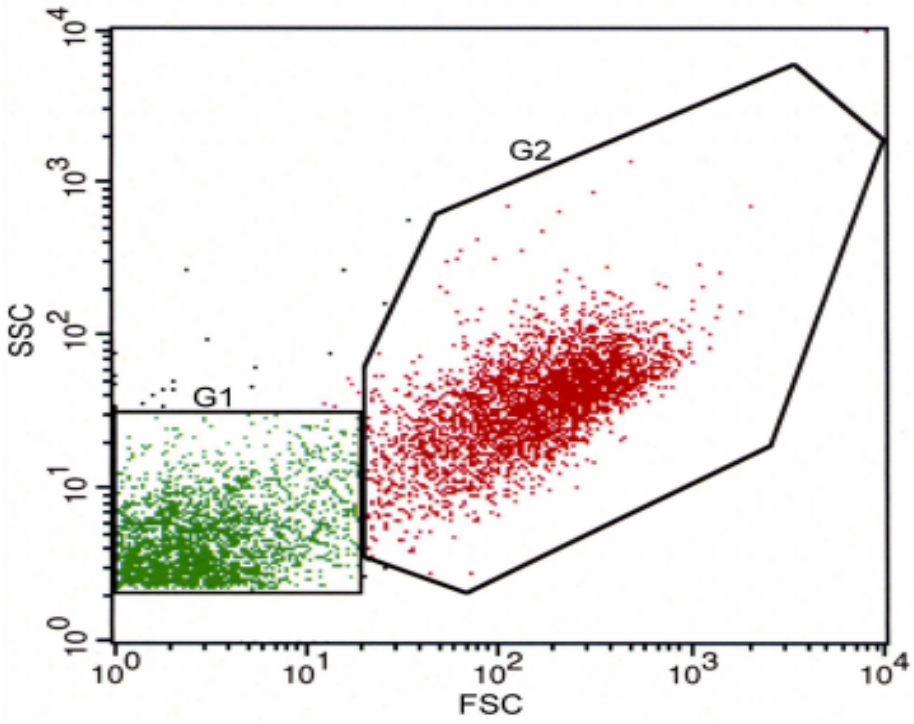


Abb. 5: Grafische Darstellung eines FSC-SSC-Dot Plots mit Mikropartikel- und Thrombozyten-Gates; (G1) Mikropartikel mit einer Größe zwischen 0,1-1,0 µm (Gate wurde durch vorausgegangene Messungen von Eichpartikeln definiert); (G2) Thrombozyten

2.5 Bestimmung der Gefäßfunktion mittels etablierter Ultraschall-diagnostik: Flow-mediated vasodilatation (FMD)

Ein etabliertes nicht-invasives Verfahren zur Erfassung der Endothelfunktion ist die Dopplersonografische Quantifizierung der FMD der *Art. brachialis* [114-116]. Diese Untersuchungsmethode basiert auf einer gesteigerten scherkraftinduzierten endothelialen NO-Freisetzung. Zunächst wurde in der vorliegenden Arbeit am liegenden Patienten über eine hochauflösende Ultraschall-Untersuchung der Ruhedurchmesser der Brachialarterie ca. 5 cm proximal der Ellenbeuge in longitudinaler Darstellung ermittelt. Darauffolgend wurde durch eine Insufflation einer am proximalen Unterarm angelegten Blutdruckmanschette auf suprasystolische Drücke (200-250 mmHg) vorübergehend eine Ischämie der peripheren Gefäße erzeugt. Nach fünfminütiger Stauung wurde durch Entlüftung der Manschette eine reaktive Hyperämie verursacht, welche in erhöhten auf das Endothel wirkenden Scherkräften resultierte. Dieser Stimulus führte zu einer endothelialen NO-Sekretion mit konsekutiver Vasodilatation der Art. brachialis [117, 118]. Die vasomotorische Funktion des Endothels wurde durch das Ausmaß der maximalen flussvermittelten prozentualen Zunahme des Gefäßdurchmessers während reaktiver Hyperämie in Relation zum Ruhedurchmesser quantifiziert. Bei einer Verminderung der vasodilatatorischen Kapazität bestand der Verdacht auf ein Vorliegen einer endothelialen Dysfunktion. Die Messung der FMD stellte somit eine praktische klinische und nicht-invasive Methode zur Evaluierung der Endothelfunktion dar. Die Endothelfunktionsmessungen wurden in den Funktionsbereichen der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Kardiologie und Angiologie, Uniklinik Düsseldorf durchgeführt.

Messbedingungen:

Zur Standardisierung der Ausgangsbedingungen wurden alle Endothel-Funktionsmessungen morgens zwischen 8:00 und 10:00 Uhr nach einer mindestens 10 -stündigen Nüchternphase durchgeführt [119]. Am Untersuchungstag sollten die Probanden keinen übermäßigen Sport treiben [116]. Zur Reduktion potentieller endogener sympathischer Stimuli mit hämodynamischen Auswirkungen fanden die Messungen in einem ruhigen, abgedunkelten Raum mit konstanter Raumtemperatur (21±1°C) nach einer zehnminütigen Ruhephase in liegender Position statt [120].

Untersuchungsablauf

Für die enddiastolische, R-Zacken getriggerte Auswertung der Messungen wurde ein EKG kontinuierlich abgeleitet. Anschließend wurde am proximalen Unterarm des Messarmes eine konventionelle Blutdruckmanschette (120mm) angelegt. Für die dopplersonografische Darstellung der *Art. brachialis* befand sich der Proband in Rückenlage, mit leicht abduziertem und ausgestrecktem Messarm. Die *Art. brachialis* wurde mittels hochauflösendem 8 MHz Linearschallkopf des Ultraschallgerätes (VIVID i, GE *Healthcare*, München, Deutschland) ca. 5 cm oberhalb der Ellenbeuge longitudinal im B-Mode-Bild abgebildet.

Um diese Position während der ganzen Untersuchung beibehalten zu können, wurde die Haut des Patienten markiert. Weder der Schallkopf noch die Geräteeinstellungen wurden während der gesamten Untersuchung verändert. Bei optimaler Einstellung des Bildes wurde schließlich eine 5 –Sekunden (s) lange digitale Sequenz, bestehend aus 100-150 B-Mode-Einzelbildern, aufgenommen und digital gespeichert. Über diese Bildschleife wurde der Ausgangsdurchmesser der *Art. brachialis (baseline diameter, d_{BL})* bestimmt. Parallel dazu wurde mittels Pulswellen-Doppler die Fließgeschwindigkeit unter Ruhebedingungen gemessen. Anschließend wurde die am proximalen Unterarm angelegte Blutdruckmanschette für 5 min auf suprasystolische Drücke (200-250 mmHg) insuffliert. Hierdurch wurde die *Art. brachialis* komprimiert und dadurch eine Ischämie des Armes erzeugt. Nach Entlüftung der Blutdruckmanschette kam es aufgrund einer ischämischen Vasodilatation der Widerstandsgefäße im Endstromgebiet zu einer Steigerung der Fließgeschwindigkeit im Bereich der der *Art. brachialis* (reaktive Hyperämie)**.** Diese induzierte gesteigerte Fließgeschwindigkeit resultierte in einer Zunahme der auf die Gefäßwand wirkenden Scherkräfte und konsekutiven NO-vermittelten Dilatation des Gefäßes [40, 117, 118]. Die FMD erreicht mit einer Latenz von ca. 40-80s nach Reperfusion ihr Maximum [121]. Aus diesem Grund wurden jeweils 20s/ 40s/ 60s und 80 s nach Deflation der Manschette, bei identischer Einstellung des B-Mode-Bildes wie bei der Ausgangsuntersuchung, erneut 5 s dauernde Bildsequenzen aufgenommen. Anhand dieser Bildschleifen konnte der maximale Durchmesser der *Art. brachialis* nach der Ischämie und Reperfusion *(maximum diameter, d_{MAX})* ermittelt werden. Zudem wurden unmittelbar nach Lösung der Stauung, sowie 20s-/40s-/60s-/80s-postischämisch, dopplersonographisch die Fließgeschwindigkeiten

während der reaktiven Hyperämie gemessen. Die Bewertung der endothel-unabhängigen Vasodilatation über die externe Gabe von Nitroglycerin wurde aufgrund des erhöhten Risikos für eine schwere Hypotonie bei den Patienten mit einer kritischen AKS sicherheitshalber nicht durchgeführt.

Auswertung der Endothelfunktionsmessungen

Zur Vermessung des Arteriendurchmessers wurden wie bereits zuvor beschrieben jeweils eine Bildschleife zum Zeitpunkt vor der Stauung sowie 20s-/40s-/60s-/80s-postischämisch aufgenommen und digital gespeichert. Über das parallel aufgezeichnete, kontinuierliche EKG erfolgte eine R-Zacken getriggerte Vermessung des Arteriendiameters. Mittels einer speziell für die FMD-Messung entwickelten und unabhängig validierten Software (*Vascular Research Tools 5 Brachial Analyzer; Medical Imaging Application, Iowa, USA*) wurden die digitalen Sequenzen an einem herkömmlichen Computer offline ausgewertet [122, 123]. Die semi-automatische Bestimmung des Gefäßdurchmessers mittels der *Brachial Analyzer Software* läuft in verschiedenen Schritten ab: Zunächst wählt der Untersucher manuell ein Einzelbild mit eindeutig erkennbarer Gefäßwand (charakteristisches Doppellinienmuster) aus, bei dem er einen ca.3 cm langen Abschnitt des Gefäßes als *region of interes*t (ROI) markiert. Diese *region of interest* bezieht sich dann auf jedes der folgenden 100-150 B-Mode-Bildern. Danach detektiert der *Brachial Analyzer* automatisch über die ganze Bildsequenz die Media-Adventitia-Grenze (M-Linie) sowohl an der schallkopfnahen als auch an der schallkopffernen Gefäßwand und ermittelt aus dem Abstand zweier gegenüberliegender Punkte bei rechtwinklig aufgenommenem Gefäß dessen Durchmesser (siehe Abb.6). Der Untersucher kann an dieser Stelle manuell korrigierend eingreifen, falls der Durchmesser fälschlicherweise zu groß bzw. zu klein bestimmt wurde.

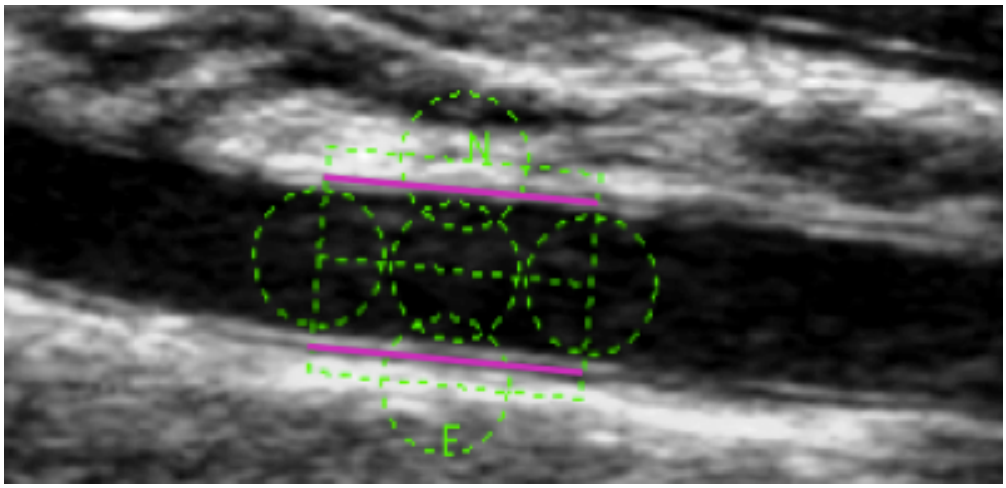


Abb. 6: Manuelle Festlegung der *region of interest* (ROI, grüne Markierung) mit automatischer Erkennung der schallkopfnahen und schallkopffernen M-Linie (lila Markierung) mittels der *Brachial Analyzer Software*

Aus dem Mittelwert der ermittelten Abstände ergibt sich der Durchmesser des Gefäßes zum jeweiligen Zeitpunkt (basal, 20 s, 40 s, 60 s, 80 s). Der höchste gemessene postischämische Wert entspricht dem absoluten maximalen FMD-Wert *(maximum diameter,* d_{MAX}*).* Die prozentuale FMD wurde schließlich aus dem Verhältnis zwischen der maximalen postischämischen Zunahme des Gefäßdurchmessers der *Art. brachialis* (d_{MAX} -d_{BL}*)* und dem Ruhedurchmesser (d_{BL}) bestimmt:

$$FMD(\%)=d_{MAX} - d_{BL} / d_{BL} \times 100$$

Dopplersonographische Messung der Fließgeschwindigkeit

Die Messung der Fließgeschwindigkeit erfolgte mittels gepulstem Doppler-Modus. Da im Zentrum des Gefäßes die Strömungsgeschwindigkeit am höchsten ist, wurde der Messpunkt stets in die Gefäßmitte der *Art. brachialis* gelegt. Grundsätzlich erfolgten alle Messungen bei einem Doppler-Winkel von <60°, da dieser Winkel in der Literatur als äußerste Grenze für quantitative Flussmessungen erachtet wird [116]. Durch manuelles Verschieben einer Hilfslinie parallel zur Arterienwand konnte der Winkel zwischen Gefäßachse und Dopplerstrahl bestimmt werden.

Berechnung des Scherstresses (WSS) in der A. brachialis

Der WSS ist der wesentliche Stimulus für die FMD. Die Bild- und Strömungsanalysen wurden *offline* anhand der aufgezeichneten Bildschleifen durchgeführt und mittels eines automatisierten Systems (*Vascular Research Tools 5 Brachial Analyzer; Medical Imaging Applikation, Iowa, USA*) ausgewertet (s. o). Alle Durchmesserbestimmungen wurden bei Diastole berechnet und die Strömungsgeschwindigkeit entsprach der mittleren winkelkorrigierten Doppler-Strömungsgeschwindigkeit. Der Blutfluss (V) wurde berechnet als Geschwindigkeit × $\pi \times r^2$ [36]. Der hyperämische Blutfluss nach Okklusion des Unterarms erhöht den WSS in der Art. brachialis und dieser Anstieg des WSS stellt den entscheidenden Reiz für die FMD. Der WSS wurde zu zwei Messzeitpunkten ermittelt: 1) unter Ruhebedingungen als basaler-WSS *(baseline-WSS)* und 2) nach Induktion der reaktiven Hyperämie als die durchschnittliche Zunahme des WSS von dem *baseline-WSS* zu WSS-Spitzen *(peak-WSS).* Beide Werte wurden mit folgender Formel berechnet: 8 x μ x V / Durchmesser, wobei die Blutviskosität (μ) konstant als 0.035 dyne x s/cm2 angenommen wurde [124]. Der Anstieg des WSSs (Delta-WSS=ΔWSS) errechnete sich aus der Differenz des maximalen WSS-Wertes nach induzierter Hyperämie (*A. brachialis peak-WSS*) und dem basalen WSS-Ausgangswertes (*A. brachialis baseline-WSS)*.

Beurteilung der lokalen Gefäßsteifigkeit anhand der FDC

Die FDC stellt eine nicht-invasive duplexsonographische Quantifizierung der vaskulären *Compliance* dar. Das Prinzip dieses Untersuchungsverfahrens basiert auf der systolisch-diastolischen Diameteränderung des Gefäßes während eines Herzzyklus. Für die Bestimmung wurde der Diameter der *Art. brachialis* unter den bei der FMD-Messung beschriebenen Einstellungen (siehe Kap. 2.5) kontinuierlich dopplersonografisch über fünf Herzzyklen aufgenommen. Die FDC wurde unter Verwendung eines semi-automatischen Analyse Systems (*Brachial Analyzer, Medical Imaging*-Anwendungen, *Iowa City, IA, USA*) der Differenz zwischen dem maximalen systolischen Durchmessers (Ds) und des minimalen diastolischen Durchmessers (Dd) in Bezug auf den minimalen diastolischen Durchmesser berechnet: FDC= Ds – Dd / Dd. Als Eckpunkte der Diametermessungen diente, wie bei der FMD-Bestimmung, die schallkopfnahe und schallkopfferne Media-Adventitia-Grenze [52].

2.6 Messung koronarer und valvulärer Kalzifizierung anhand etablierter Score Systeme mittels Mehrschicht-Computertomografie (MSCT)

Die nicht-invasive bildgebende Darstellung des Herzens mittels MSCT dient der Detektion von kalzifizierten Plaques zur Quantifizierung der koronaren- und valvulären Kalklast. Die kardiale MSCT-Untersuchung wurde bei allen Patienten vor der TAVI-Prozedur am hiesigen Institut für Diagnostische Radiologie, gemäß den standardisierten Empfehlungen zur CT – Bilddatenakquisition durchgeführt [125, 126]. Die CT-Daten wurden unter Verwendung eines 128-Zeilen-Single-Source-CT-Scanners (*SOMATOM Volume Zoom, Siemens Healthcare,* Forchheim, Deutschland) mit einer hohen zeitlichen Auflösung von 150 ms und einer Kollimation von 128 × 0,6 mm erfasst. Die Nativ-Messungen zur Beurteilung der koronaren- und valvulären Kalklast wurden mit einer Röhrenspannung von 100-120 kV, einem Pitchfaktor von 0,2 und einer *Gantry*-Rotationszeit von 0,3 s durchgeführt. Um weitgehend bewegungsfreie dreidimensionale Datensätze zu akquirieren, erfolgte die Untersuchung des gesamten Herzens EKG-getriggert innerhalb weniger Sekunden während einer einzigen Atemanhaltephase. Die axialen Bilder wurden mit einer Schichtdicke von 3,0 mm rekonstruiert. Die einzelnen koronaren Segmente und die Aortenklappe wurden durch erfahrene Radiologen jeweils separat unter Verwendung einer speziellen Software (*Syngo Calcium Scoring®, Siemens Healthcare*, Deutschland), auf kalzifizierte Läsionen analysiert. Hierbei erfolgte die Auswertung der akquirierten Bilddaten nach der Agatston-Methode [127]. Eine Kalzifikation wird hierbei definiert als mindestens zwei benachbarte Pixel, die im CT eine Dichte >130 Hounsfields Units (HU) aufweisen. Mittels eines speziellen Computerprogramms wurden die entsprechenden Areale manuell markiert und so die Dichte und Fläche der kalzifizierten Läsion bestimmt. In Abhängigkeit von der maximalen CT-Dichte der Pixel wurde die Größe der Läsion (in mm^2) mit einem Wichtungsfaktor multipliziert:

Faktor 1 für eine kalzifizierte Läsion mit einer Dichte von 130 - 199 HU
Faktor 2 für eine kalzifizierte Läsion mit einer Dichte von 200 - 299 HU
Faktor 3 für eine kalzifizierte Läsion mit einer Dichte von 300 - 399 HU
Faktor 4 für eine kalzifizierte Läsion mit einer Dichte über 400 HU

Der Gesamtkalzium-*Score* wurde aus der Summe der Einzelergebnisse aller in den vier Hauptgefäßen (linke Hauptstamm (engl. *left main*, LM), *Ramus circumflexus* (RCX), *Ramus interventricularis anterior* (engl. *left anterior descending*, LAD), rechte Koronararterie (RCA)) nachgewiesenen Kalzifikationen gebildet. Die erhobenen Daten wurden abschließend auf das institutionelle *Picture Archiving and Communication System* (IDS 7 Version 15, Sectra, Linköping, Schweden) übertragen und gespeichert.

Die nachfolgende Abbildung (Abb. 7) zeigt exemplarisch die MSCT-Aufnahme eines Herzens mit Nachweis von Koronarkalk in allen drei Koronargefäßen.

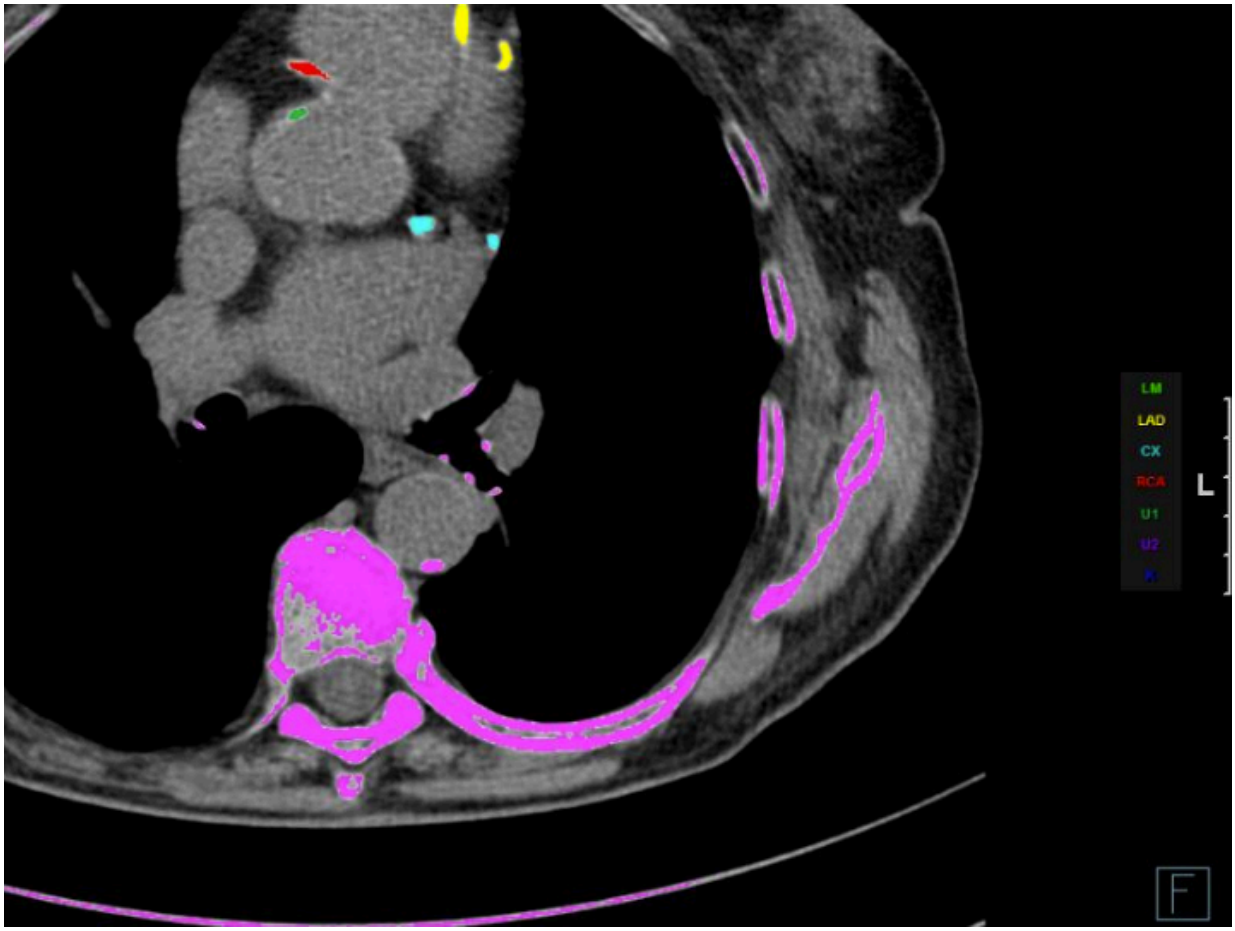


Abb.7 Exemplarische MSCT Kalkmessung: Nachweis von Koronarkalk innerhalb der linken Koronararterie (grüne Markierung), des Ramus interventricularis anterior (gelbe Markierung), des Ramus circumflexus (blaue Markierung) und der rechten Koronararterie (rote Markierung); Knochenkalk (lila Marikierung)

2.7 Statistische Analyse der Messergebnisse

Deskriptive statistische Daten wurden in Text und Tabellen als Mittelwert ± Standardabweichung (SD) angegeben. Die Patientencharakteristika wurden unter Verwendung des *paired t-tests* analysiert. Zur Prüfung der Streuung der Normalverteilung der hämodynamischen Parameter sowie der FMD-Werte wurde der *D'Agostino & Pearson omnibus normality test* durchgeführt. Die Wirkung der Intervention auf die hämodynamischen Parameter wurde mittels des *Student t-tests* statistisch ausgewertet. Zur Analyse der Wirkung der Intervention auf die EMP-Konzentration wurde der *Wilcoxon matched pairs test* verwendet. Die Korrelation der hämodynamischen Parameter wurde mittels des *Pearson-Koeffizienten* ermittelt, die Korrelation von EMPs wurde mittels des *Spearman-Koeffizienten* ausgewertet. P-Werte <0.05 wurden als statistisch signifikant betrachtet. Das multivariate Regressionsmodell wurde verwendet, um den Einfluss mehrerer Parameter auf die FMD zu bestimmen. Die Variablen für das lineare Regressionsmodell wurden basierend auf einfachen Korrelationsanalysen ausgewählt. Alle statistischen Tests wurden mit SPSS 21.0 (IBM) und Prism durchgeführt 5.0 (Graph Pad).

3. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der TAVI auf die endotheliale Funktion untersucht. Dazu wurden physikomechanische Eigenschaften, die die Endothelfunktion modulieren, wie der brachiale WSS, die Blutdruckamplitude und die arterielle Steifigkeit, vor und nach der TAVI bestimmt.

3.1 Charakterisierung der endothelialen Funktion bei Patienten mit hochgradiger AKS im Vergleich zu Patienten ohne AKS

Um die Werte der endothelialen Funktion sowie zirkulierender MPs der Patienten mit hochgradiger AKS ((+)AKS) einordnen zu können, wurden diese (prä-TAVI) mit denen von 20 Patienten ohne AKS ((-)AKS) verglichen. Die erhobenen Daten hinsichtlich Patientencharakteristika, Laborparameter und Medikation sind in Tabelle 2 vergleichend aufgeführt.

Patientencharakteristika: Das Durchschnittsalter zwischen den einzelnen Gruppen zeigte in der statistischen Auswertung keinen Unterschied: bei den Patienten mit AKS lag das Durchschnittsalter bei 84±6 Jahren und bei der Kontrollgruppe ohne AKS bei 80,9 ± 4 Jahren (p=0,249). Die Geschlechterverteilung zeigte in beiden Gruppen keine wesentliche Abweichung (Anzahl Männer zu Frauen: (+)AKS: 25 zu 31 versus (-)AKS:12 zu 8; p=0,244). Der mittlere *Euroscore* bei den Patienten mit AKS war höher (22±10) als bei der Kontrollgruppe (6,4±2,7; p<0,001). Bezüglich der kardiovaskulären Risikofaktoren *Body Mass Index* (BMI), Diabetes, Hypertonie, Hyperlipidämie, Rauchen, sowie KHK und PAVK zeigten sich keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen.

Laborparameter: Im Blutbild waren jene Zelltypen interessant, deren MP durchflusszytometrisch gemessen wurden oder Einfluss auf die MP-Sekretion haben. Bei der Thrombozyten- und Leukozytenkonzentration zeigten sich keine Differenzen zwischen beiden Studiengruppen (Thrombozyten: (+)AKS: 217±48 / µl versus (-)AKS: 241 ± 129 / µl p=0,253; Leukozyten: (+)AKS: 7,8±2,7 / µl versus (-)AKS: 9,1± 6,4 / µl p=0,130).

Die Erythrozytenkonzentration (p=0,015) und der Hämatokrit-Wert waren in der Kontrollgruppe höher (p<0,001). Bei den laborchemischen Befunden gab es bezüglich der HDL- und LDL-Konzentration im Plasma keinen Unterschied zwischen den Patienten mit AKS und der Kontrollgruppe. Hinsichtlich der gemessenen glomerulären Filtrationsrate (GFR) und der CRP-Konzentration im Blut wiesen die untersuchten Gruppen keinen Unterschied auf. Bei den Patienten mit AKS war die Glukosekonzentration im Blut im Vergleich zur Kontrollgruppe höher (Glukose: (+)AKS: 144±28 mg/dl versus (-)AKS: 103,6 ± 16 mg/dl; p=0,008). Das Gesamt-Cholesterin war hingegen bei der Kontrollgruppe höher als bei AKS-Patienten (Cholesterin: (+)AKS: 175±52 mg/dl versus (-)AKS: 218 ± 31,6 mg/dl; p=0,017).

Medikation: Bei der Medikation mit Acetylsalicylsäure (ASS) und/oder Clopidogrel zeigten sich insgesamt keine Unterschiede zwischen Patienten mit AKS und Kontrollpatienten (ASS: (+)AKS:95% versus (-)AKS: 80% p=0,111; Clopidogrel: (+)AKS:64% versus (-)AKS: 55% p=0,562). Ebenso im Hinblick auf andere kardiovaskuläre Medikamente, wie Statine, Beta Blocker, *Angiotensin-converting-enzyme*-(ACE)-Inhibitoren oder Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-1-(AT1)-Antagonisten bestanden zwischen beiden Kollektiven keine Unterschiede. Bezüglich der Einnahme von Cumarinen ((+)AKS:5% versus (-)AKS: 8%; p=0,952) und Nitraten ((+)AKS:2% versus (-)AKS: 5%; p=0,448) zeigten sich in beiden Gruppen keine Unterschiede.

	(+)AKS Prä-TAVI	(-)AKS	P-Wert
Patientencharakteristika			
Geschlecht (männlich/weiblich)	56 (25/31)	20 (12/8)	0,244
Alter (Jahre)	84±6	80,9±4	0,249
EURO Score	22±10	6,4±2,7	**< 0.001***
Body mass index (kg/m^2)	26,1±4,4	27,8±3,76	0,468
Diabetes (%)	28	20	0,455
Bluthochdruck (%)	92	90	0,858
Hyperlipidämie (%)	88	75	0,281
Früherer Raucher (%)	28	30	0,786
KHK (%)	75	65	0,938
PAVK (%)	35	25	0,468
Karotisstenose (%)	22	20	0,895
Laborparameter			
GFR MDRD Formel (ml/min)	47±26	59 ±24,4	0,747
Glukose (mg/dl)	144±28	103,6 ± 16	**0,008***
Gesamt-Cholesterin (mg/dl)	175±52	218 ± 31,6	**0,017***
High-density lipoprotein (mg/dl)	54±18	49,4 ± 8,7	0,503
Low-density lipoprotein (mg/dl)	142±51	160 ± 27,1	0,357
CRP (mg/dl)	0,8±1,2	0,8 ± 0,9	0,624
Leukozyten (1000 per µl)	7,8±2,7	9,1± 6,4	0,129
Erythrozyten (1x10^6 per µl)	4,1±0,6	4,4 ± 0,6	**0,015***
Thrombozyten (x1000 per µl)	217±48	241 ± 129	0,253
Hämatokrit (%)	33±4,3	39,5±3,7	**<0,001***
Medikation			
Cumarin (%)	5	8	0,952
Aspirin (%)	95	80	0,111
Clopidogrel (%)	64	55	0,562
ACE-Inhibitor/ AT1-Antagonisten (%)	60	55	0,764
Beta Blocker (%)	84	80	0,694
Nitrat (%)	2	5	0,448
Statin (%)	90	80	0,298

Tabelle 2: Vergleich grundlegender Patientencharakteristika, Medikation und Laborparameter zwischen den Patienten mit AKS prä-TAVI-Intervention ((+)AKS) und der Kontrollgruppe ((-)AKS); Alle Daten sind angegeben als Mittelwert± SD; *=Signifikanter Unterschied der Mittelwerte mit p<0,05.

Beeinträchtigte Endothelfunktion und erhöhte Konzentration an EMPs bei Patienten mit hochgradiger AKS

Bei den Patienten mit AKS zeigte sich im Vergleich zu den Patienten ohne AKS eine schlechtere FMD als Marker der gestörten Endothelfunktion (3±0,5 % versus 4,2±0,3 %, p<0,01). (siehe Abb. 8). Der basale Durchmesser der *Art. brachialis* in der Gruppe mit AKS betrug 4,5±0,6 mm. In der Kontrollgruppe ohne AKS betrug der Diameter 4,7±0,5 mm 4,5±0,6 mm (p=0,298).

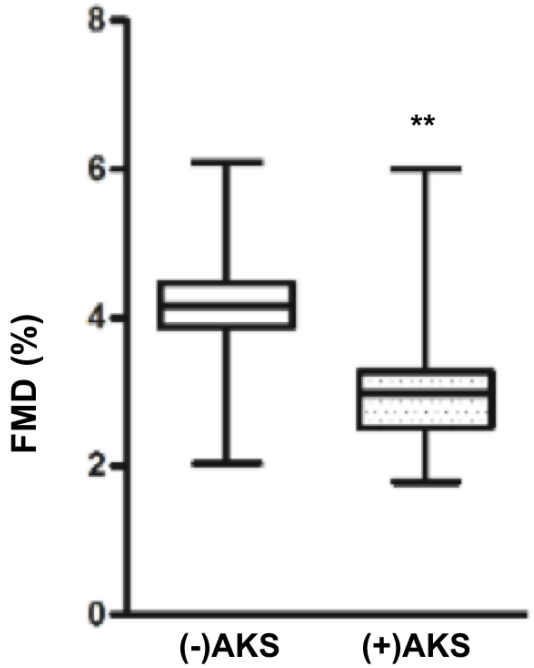


Abb. 8: **Vergleich der Endothel-abhängigen Dilatation (FMD (%)) zwischen Probanden ohne AKS ((-)AKS) und Probanden mit AKS ((+)AKS).** Die FMD als Marker der Endothelfunktion wird mittels Ultraschall als Endothel-abhängigen Dilatation gemessen. Patienten mit AKS haben eine schlechtere Endothel-abhängige Dilatation als Patienten ohne AKS; **=p<0,01

Bei den Patienten mit AKS wurde eine höhere Konzentration endothelialer $CD31^{+}/CD41^{-}$ -MPs (258 ± 143 /µl) gemessen im Vergleich zu Patienten ohne AKS (179 ± 152 /µl) (p=0,002) (siehe Abb.9a). Auch die Konzentration der $CD\ 62E^{+}$ -EMPs und der $CD144^{+}$-EMPs lag bei den AKS-Patienten gegenüber der Kontrollgruppe tendenziell höher (keine signifikanten Unterschiede) (CD62E: (+)AKS: 1218 ± 786/µl versus (-)AKS: 883± 857 /µl p=0,076 ; CD144: (+)AKS: 349 ±

281 /µl versus (-)AKS: 250 ± 178 /µl p=0,124) (siehe Abb. 9 b/c). Die Ergebnisse sind in Abbildung 9 vergleichend aufgeführt.

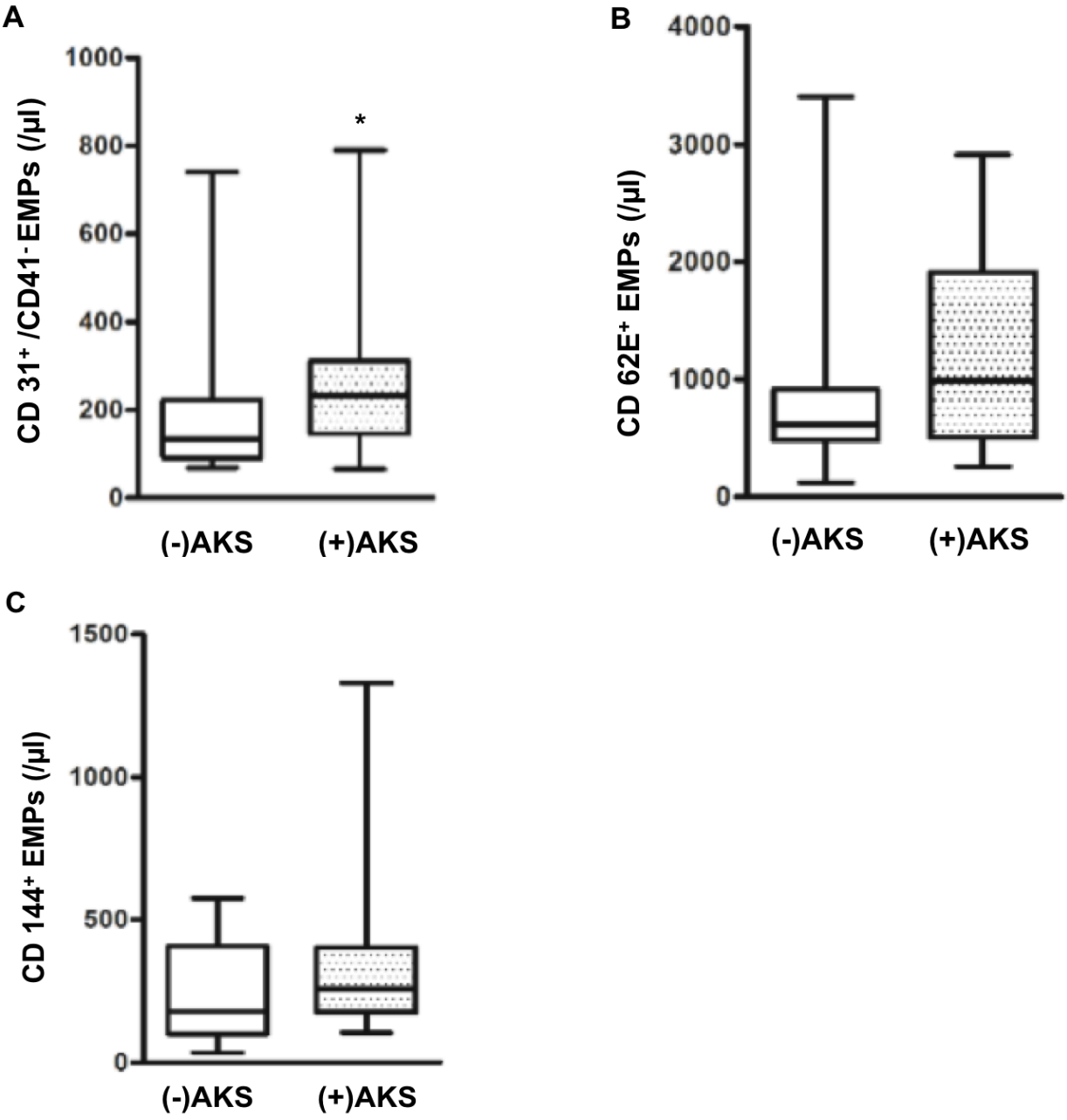


Abb 9: Vergleich der Konzentrationen der verschiedenen EMP-Subpopulationen in der Kontroll-Gruppe ((-)AKS) und in der AKS-Gruppe ((+)AKS) (A) $CD31^+/CD41^-$-MPs **(B)** $CD62E^+$-MPs und **(C)** $CD144^+$-MPs *= p<0,05

Zusammengefasst zeigte sich bei den Patienten mit AKS eine schlechtere Endothelfunktion (FMD) sowie eine erhöhte Konzentrationen von EMPs im Vergleich zu Patienten ohne AKS.

3.2. Determinanten der FMD bei Patienten mit AKS

Um die Determinanten der FMD bei Patienten mit AKS zu definieren, wurde die potentielle Assoziation der FMD prä-TAVI mit den physikomechanischen Parametern WSS, Blutdruckamplitude und arterieller Steifigkeit (FDC) sowie mit den kardiovaskulären Risikofaktoren Alter, CRP, systolischer Blutdruck oder Cholesterin mittels einer univariaten Korrelationsanalyse untersucht (Tabelle 3). Bei Patienten mit AKS korrelierten die Blutdruckamplitude (r_P=-0,297 p=0,043) und der Anstieg des WSS (ΔWSS) (r_P=0,486 p=0,001) positiv mit der FMD. Zwischen den FMD-Werten und den $CD31^+/CD41^-$-EMPs (r_P=-0,491, p=0,001) bzw. $CD62E^+$-EMPs (r_P=-0,293, p=0,028) bestand eine inverse Korrelation.

	FMD prä-TAVI	
	r_P	p Wert
ΔWSS	0,486	**0,001***
Blutdruckamplitude	-0,297	**0,043***
FDC	-0,201	0,138
Alter	0,375	0,054
CRP	-0,134	0,324
Systolischer Blutdruck	-0,265	0,072
Cholesterin	0,138	0,360
$CD31^+/CD41^-$ EMPs	-0,491	**0,001***
$CD144^+$ EMPs	-0,182	0,179
$CD62E^+$ EMPs	-0,293	**0,028***

Tabelle 3: **Univariate Korrelationsanalyse zwischen der FMD prä-TAVI und verschiedenen physikochemischen Parametern/kardiovaskulären Risikofaktoren**
r_p= Pearson-Korrelationskoeffizient; *=Signifikant

Um den unabhängigen Einfluss der physikomechanischen (Tabelle 4) und kardiovaskulären Risikofaktoren (Tabelle 5) auf die FMD bei Patienten mit AKS (prä-TAVI) zu bestimmen, wurde eine multivariate Regressionsanalyse verwendet. Bei Einschluss der physikomechanischen Parameter erreichte nur ΔWSS als unabhängiger Prädiktor für die FMD das Signifikanzniveau bei Patienten mit AKS (vor TAVI) (95% CI: 0,623 bis 1,616, p = 0,001). Das Bestimmtheitsmaß R^2 betrug in diesem Modell 0,371. Das heißt der Anstieg des WSS erklärte 37,1% der Gesamtvarianz der FMD in diesem Modell (Tabelle 4).

	FMD prä-TAVI	
	Regressionskoeffizient β	**p Wert**
ΔWSS	1,119	**0,001***
Blutdruckamplitude	-0,007	0,601
FDC	-5,363	0,567
Bestimmtheitsmaß R^2	0,371	

Tabelle 4: Multivariate Regressionsanalye: Einfluss der physikomechanischen Eigenschaften auf die FMD; *=Signifikant

Beim Einschluss der kardiovaskulären Risikofaktoren Alter, systolischer Blutdruck, Cholesterinspiegel, Diabetes sowie CRP erreichte nur der Diabetes als unabhängiger Prädiktor für die FMD das Signifikanzniveau bei Patienten mit AKS vor TAVI (p=0,002). Das korrigierte Bestimmtheitsmaß R^2 betrug in diesem Modell 0,299. Das heißt der Diabetes erklärte 29,9% der Gesamtvarianz der FMD in diesem Modell (Tabelle 5).

	FMD prä-TAVI		
	Regressionskoeffizient β	**p Wert**	
Alter	-0.44	0,051	
Systolische Blutdruck	-0,003	0,717	
Cholesterin	0,003	0,319	
Diabetes	-1,058	**0,002***	**+**
CRP	0,009	0,925	
Bestimmtheitsmaß R^2	0,299		

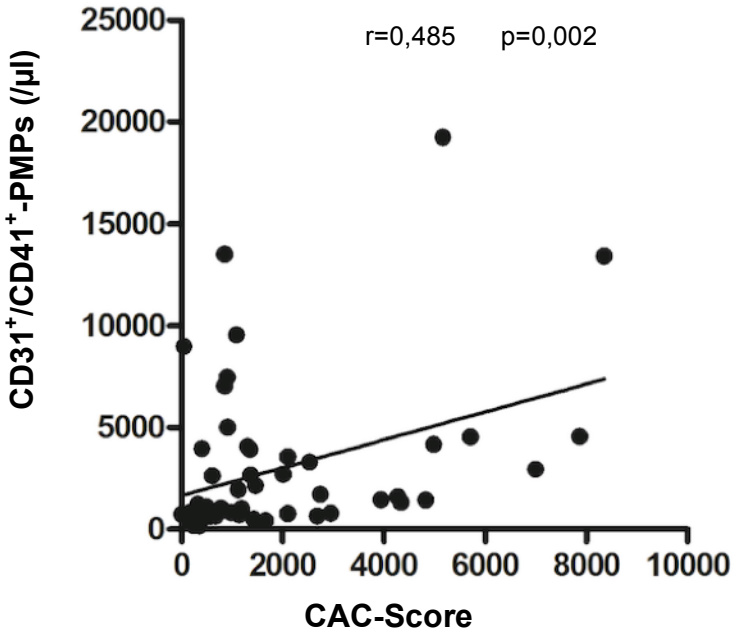
Tabelle 5: Multivariate Regressionsanalye: Einfluss der kardiovaskulären Risikofaktoren auf die FMD; *=Signifikant

Zusammengefasst war der brachiale WSS neben dem Diabetes ein unabhängiger Prädiktor für die FMD.

3.3. Die Konzentration zirkulierender MPs korreliert positiv mit dem Grad der koronaren Kalzifizierung bei Patienten mit hochgradiger AKS

Um den Zusammenhang zwischen der vaskulären (*coronary artery calcification* = CAC, Agatston-Score) bzw. valvulären (*aortic valve calcification* = AVC) Verkalkung und den zirkulierenden MPs zu untersuchen, wurde der mittels CT gemessenen Verkalkungs-Score mit der Konzentration zirkulierender MPs verglichen. Hierbei zeigte sich, dass der Grad der vaskulären Kalzifizierung (CAC-Score) positiv mit der Konzentration der thrombozytären Mikropartikel (PMPs) (r_S =0,485, p=0,002) (siehe Abb. 10a) sowie mit der Konzentration der EMPs (r_S =0,36, p=0,007) im Plasma korrelierte (siehe Abb. 10b).

A



B

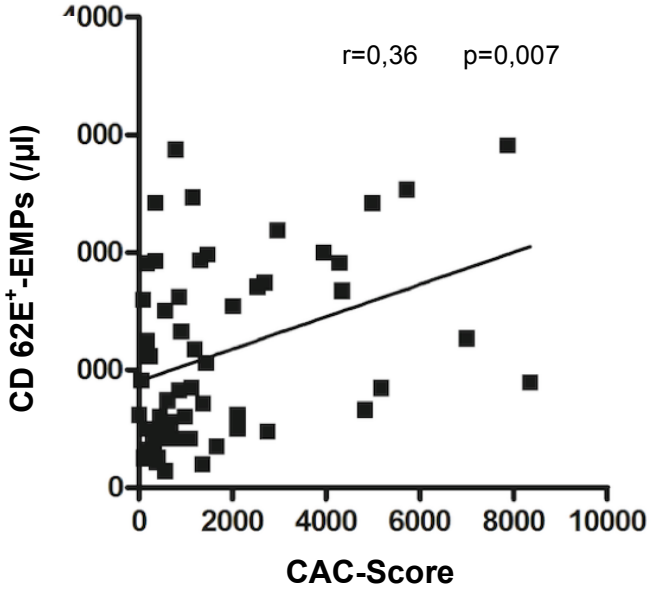


Abb 10: Korrelation der koronaren Kalklast (quantifiziert anhand des CAC-Scores) mit (A) der Konzentration CD31$^+$/CD41$^+$-PMPs und (B) der Konzentration CD62E$^+$-EMPs. In beiden Fällen zeigte sich eine positive lineare Korrelation; r_S=Spearman-Korrelationskoeffizient; p<0,05=Signifikant

In einer multivariaten Regressionsanalyse mit CD62$^+$-EMPs, CD41$^+$-PMPs, GFR, Alter, und Cholesterin als potentiellen Einflussfaktoren erwiesen sich CD41$^+$-PMPs und die GFR als unabhängige Prädiktoren für die Schwere der CAC (95% CI: 0,061 bis 0,328, p = 0,001 und CI:10,797 bis 55,747) bei den AKS-Patienten (prä-TAVI) (siehe Tabelle 6).

	CAC-Score	
	Regressionskoeffizient r	**p -Wert**
CD41$^+$ PMPs	0.194	**0.005***
CD62E$^+$ EMPs	0.309	0.243
Alter	-21	0.511
Cholesterin	3.1	0.538
GFR	33	**0.005***
Bestimmtheitsmaß R^2	0.604	

Tabelle 6: Multivariate Regressionsanalye; Effektoren der CAC bei AKS-Patienten (prä-TAVI
*=signifikant

Während der CAC-Score und die Konzentration zirkulierender MPs miteinander korrelierten, gab es keine Korrelation zwischen dem Ausmaß der CAC und der AVC, sowie zwischen der Anzahl der MPs und dem Ausmaß der AVC. Um die unabhängigen Einflussfaktoren auf die AVC zu analysieren, wurde eine multivariate Regressionsanalyse mit CAC, FMD, $CD41^+$-PMPs, $CD62E^+$ -EMPs, $CD31^+/CD41^-$-EMPs, $CD144^+$-EMPs durchgeführt. Keiner der untersuchten Parameter erreichte dabei das Signifikanzniveau (siehe Tabelle 7).

	AVC-Score	
	Regressionskoeffizient r	**p -Wert**
CAC	0.172	0.357
FMD	-0.064	0.668
$CD41^+$ PMPs	0.053	0.698
$CD62E^+$ EMPs	0.208	0.578
$CD31^+/CD41^-$ EMPs	0.085	0.533
$CD144^+$ EMPs	-0.174	0.203

Tabelle 7: Multivariate Regressionsanalye; Effektoren der AVC bei AKS-Patienten (prä-TAVI
*=signifikant

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse von 3.3, dass bei Patienten mit AKS die Konzentration zirkulierender MP mit dem Grad der vaskulären Kalzifizierung, aber nicht der valvulären Kalzifizierung korrelierten.

3.4 Verbesserte Endothelfunktion und erniedrigte Konzentration an zirkulierenden EMPs nach TAVI

Die TAVI-Prozedur wurden bei allen Patienten erfolgreich durchgeführt und führte zu einer Reduktion des mittleren transvalvulären Druckgradienten(*dPmean*) von 42 ± 18 mmHg prä- TAVI auf 7 ± 4 mmHg post-TAVI ($p<0,0001$) und der mittleren transvalvulären Spitzengeschwindigkeit (*Vmax*) von 4,1 ± 0,8 m/s auf 1,7 ± 0,4 m/s ($p<0,0001$). Die dopplersonographisch in der *Art. brachialis* gemessene Flussgeschwindigkeit erhöhte sich von 0,46 ± 12 m/s prä-TAVI auf 0,53 ± 0,11 m/s post-TAVI ($p=0,018$). Zudem stiegen sowohl der basale WSS von 2,3 ± 0,8 s^{-1} prä-TAVI auf 2,5 ±0,8 s^{-1} ($p=0,0179$), als auch der *peak*-WSS von 2,8 ± 0,9 s^{-1} prä-TAVI auf 3,3 ± 1,0 s^{-1} post-TAVI ($p=<0,0001$) an.

Innerhalb des Studienzeitraumes wurden bei den Patienten keine signifikanten Veränderungen des Blutdrucks und der Herzfrequenz, sowie laborchemischer Parameter festgestellt. Alle individuell verordneten Medikamente blieben während der ganzen Zeitspanne unverändert (siehe Tabelle 8). Hiervon ausgenommen war Clopidogrel, das bei all jenen Studienteilnehmern nach TAVI-Prozedur hinzugefügt worden ist, insofern dieses Medikament nicht schon zuvor verordnet wurde. 64% der Patienten erhielten bereits vor der TAVI Intervention aufgrund einer zuvor erfolgten Koronarangioplastie eine kombinierte duale Thrombozytenaggregationshemmung. Die nachfolgende Tabelle 8 führt die ermittelten klinischen Parameter der Patienten prä- zu post-TAVI vergleichend auf.

	Prä-TAVI	Post-TAVI	P-Wert
Gradienten über der Aortenklappe			
dPmean (mmHg)	42±18	7±4	**<0,001***
dPmax (mmHg)	68±25	15±7	**<0,001***
Vmax (m/s)	4,1±0,8	1,7±0,4	**<0,001***
Physiologische Parameter			
Herzfrequenz (/min)	70 ± 9	75±8	0,451
Systolischer arterieller Druck (mmHg)	143 ± 16	137 ± 16	0,734
Diastolischer arterieller Druck (mmHg)	68 ±13	67 ± 10	0,522
Vaskuläre Parameter			
Art. brachialis baseline-Flussgeschwindigkeit (m/s)	0,37 ± 0,09	0,39 ± 0,08	0,152
Art. brachialis peak-Flussgeschwindigkeit (m/s)	0,46 ± 12	0,53 ± 0,11	**0,018***
Art. brachialis baseline-Durchmesser (mm)	4,5 ± 0,6	4,4 ± 0,7	0,226
Art. brachialis baseline-WSS (s^{-1})	2,3 ± 0,8	2,5 ±0,8	**0,018***
Art. brachialis peak-WSS (s^{-1})	2,8 ± 0,9	3,3 ± 1,0	**<0,001***
Laborparameter			
GFR MDRD Formel (ml/min)	47±26	52±27	0,151
Glukose (mg/dl)	144±28	155±40	0,105
Gesamt-Cholesterin (mg/dl)	175±52	190±61	0,897
High-density lipoprotein (mg/dl)	54±18	55±15	0,541
Low-density lipoprotein (mg/dl)	142±51	155±13	0,645
CRP (mg/dl)	0,8±1,2	0,6±1,4	0,184
Leukozyten (1000 per µl)	7,8±2,7	7,4±2,4	0,182
Erythrozyten ($1x10^6$ per µl)	4,1±0,6	4,2±0,7	0,373
Thrombozyten (x1000 per µl)	217±48	200±52	0,112
Hämatokrit (%)	33±4,3	34,6±3,8	0,052

Tabelle 8: Vergleich valvulärer, vaskulärer und klinischer Befunde prä- und post-TAVI; Alle Daten sind angegeben als Mittelwert± SD; *= Signifikant

Erhöhter WSS und verbesserte FMD post-TAVI

In der *Art. brachialis*, erhöhte sich der basale WSS *(Art. brachialis baseline-WSS)* von 2,3 ± 0,8 s^{-1} prä-TAVI auf bis zu 2,5 ± 0,8 s^{-1} bei der drei Monats-*Follow-up*-Untersuchung post-TAVI (p = 0,0179) (Abb. 11A). Ebenso stieg der ∆-WSS (maximaler Anstieg des WSS unter der Hyperämie der FMD-Messung), der den wesentlichen hämodynamischen Stimulus für die FMD darstellt, von 0,5 ± 0,5 s^{-1} prä-TAVI auf bis zu 0,7 ± 0,4 s^{-1} post-TAVI an (Abb. 11B).

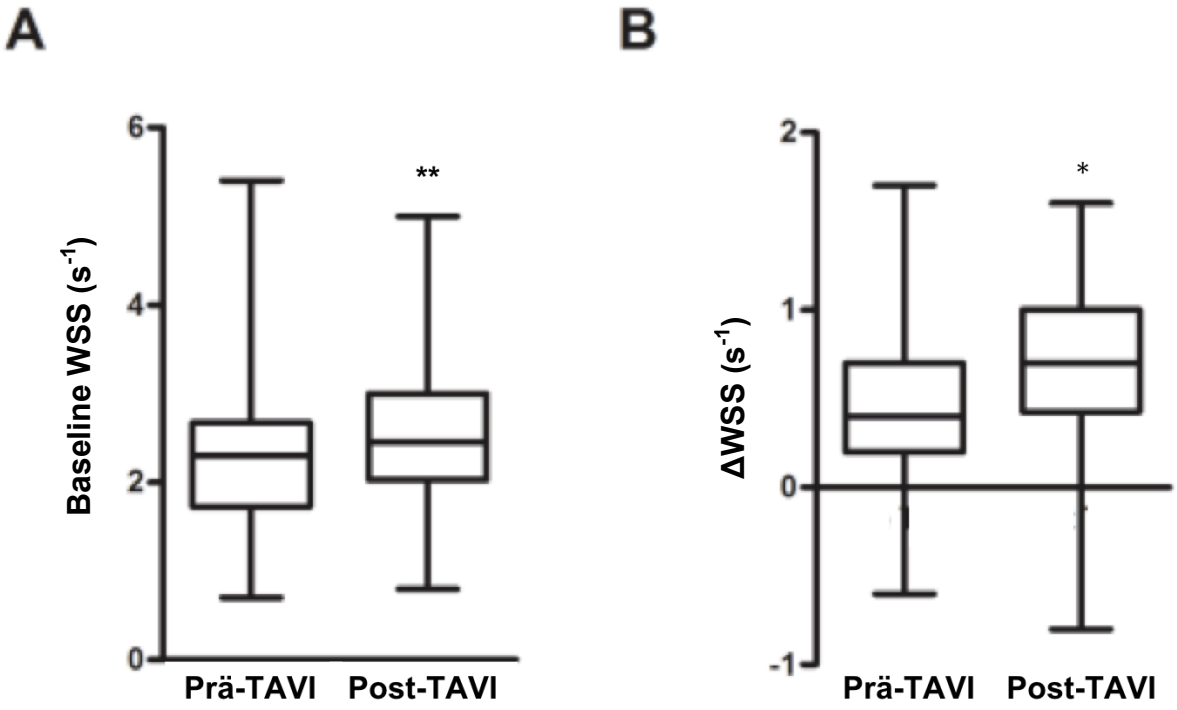


Abb. 11: Veränderungen des WSS: prä-TAVI versus post-TAV: (A) Der basale Ausgangswert des WSS in der Art. brachialis (Baseline WSS) und **(B)** die Differenz aus dem maximalen Anstieg des WSS-Wertes nach induzierter Hyperämie und dem basalen WSS-Ausgangswertes (ΔWSS); *=p<0,05; **=p<0,01

Die gemessene FMD in der *Art, brachialis* stieg von 3,2 ± 0,9% prä- TAVI auf bis zu 3,6 ± 0,8% post-TAVI an (p = 0,01) (Abb. 12A). Die Änderungen des ∆-WSS post-TAVI korrelierten positiv mit den Änderungen der FMD post-TAVI (r_S = 0,36, p = 0,006) (Abb. 12B).

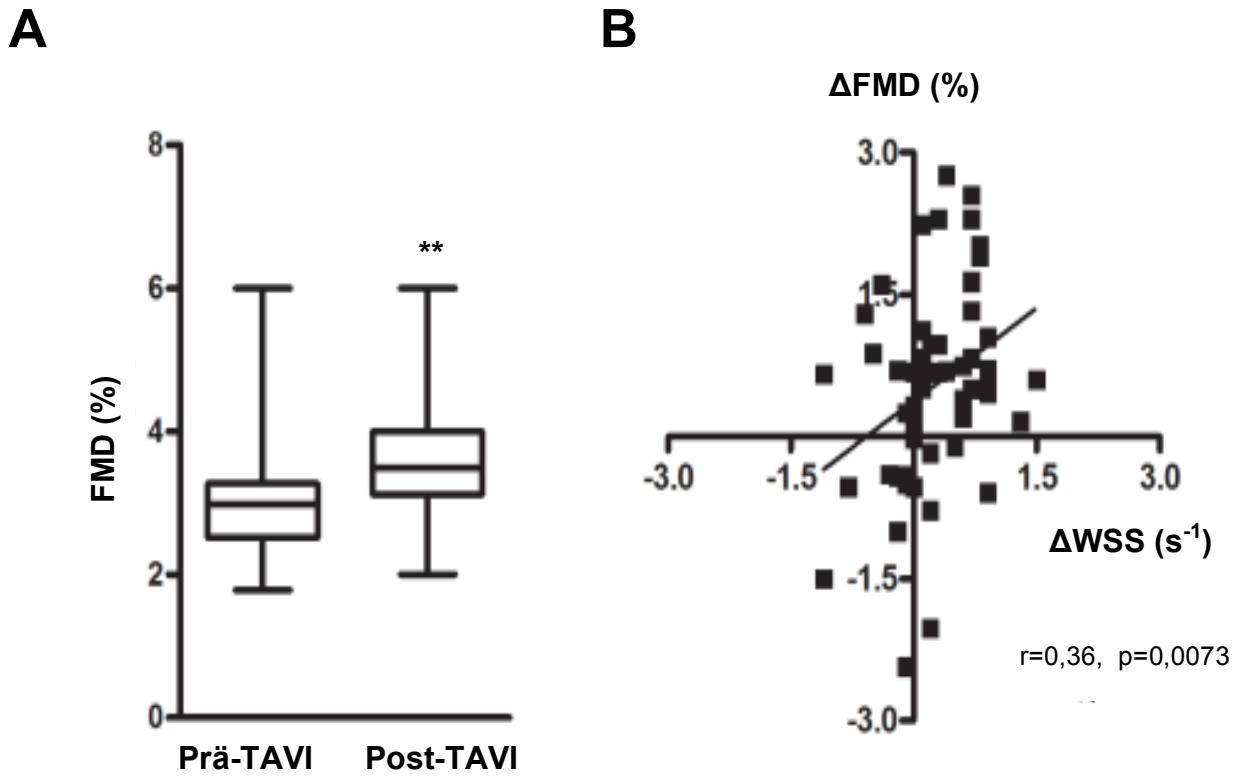


Abb. 12: FMD der AKS-Patienten im Studienverlauf ; (A) Die FMD stieg post-TAVI im Vergleich zu prä-TAVI an **(B)** die Zunahme des ∆-WSSs von der *baseline* prä- zu post-TAVI korrelierte linear mit dem Anstieg der FMD prä- zu post-TAVI; r_S=Korrelationskoeffizient; **=p<0,01

Zusätzlich wurden die physikomechanischen Eigenschaften Blutdruckamplitude und arterielle Steifigkeit (FDC) als mögliche Einflussfaktoren auf die Endothelfunktion charakterisiert. Bei der *Follow-up*-Untersuchung drei Monate post-TAVI zeigten sich keine Unterschiede in der Blutdruckamplitude zu den prä-TAVI-Werten (prä-TAVI: 66 ± 9 mmHg versus post-TAVI: 69 ± 10 mmHg; p = 0,151) (Abb. 13A). Zudem gab es keinen Unterschied bei den FDC-Werten zwischen prä- (0,023 ± 0,015) und post-TAVI (0,022 ± 0,015; p = 0,578) (Abb. 13B).

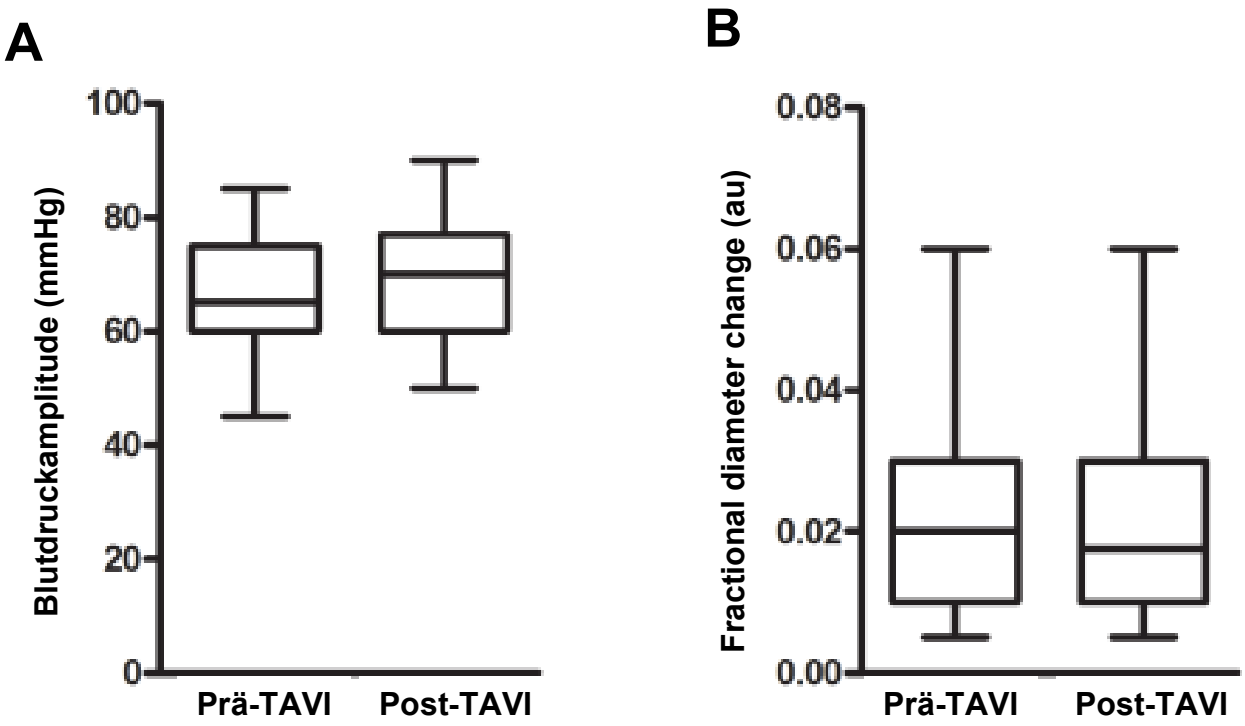


Abb. 13: Veränderungen (prä-TAVI/post-TAVI) der (A) Blutdruckamplitude und (B) der arteriellen Steifigkeit (Fractional diameter change)

Die Konzentration zirkulierender EMPs verringerte sich post-TAVI und korrelierte invers mit der FMD

Während des dreimonatigen Beobachtungszeitraumes nach erfolgreicher TAVI-Prozedur kam es zu einer Abnahme der Konzentration zirkulierender $CD31^+/CD41^-$ EMPs von 258±143 /µl MPs prä-TAVI auf 216±130 /µl Mikropartikeln post-TAVI (p=0,036) (Abb. 15A). Dies entsprach einer Reduktion der EMPs um 16,3 % vom Ausgangwert. Auch die Konzentration der $CD\ 144^+$ -EMPs verringerte sich um 21,2% von 349±281 /µl prä-TAVI auf 275±295 /µl post-TAVI (p=0,001) (Abb. 15C). Die Konzentration der $CD62E^+$-EMPs sank um 21,2% von 1218±786/µl prä-TAVI auf 960±660 /µl post-TAVI (p=0,026) (Abb. 15E). Die Abbildung 15 stellt die Veränderungen in der Konzentration EMPs nach erfolgter TAVI-Therapie im Vergleich zu den Ergebnissen vor TAVI dar.

Um zu testen, ob die Reduktion der MPs primär durch eine veränderte Freisetzung von EMPs aus Endothelzellen bedingt ist oder ob auch andere nicht-endotheliale MP

Populationen beeinflusst werden, wurde die Konzentration zirkulierender $CD41^+$-PMPs bestimmt. Die Konzentration der $CD41^+$-PMPs unterschied sich nicht zu den beiden Messzeitpunkten: 2807 ± 3465 / ul prä-TAVI versus 2887 ± 3340 / ul post-TAVI (p = 0,883) (siehe Abb.14).

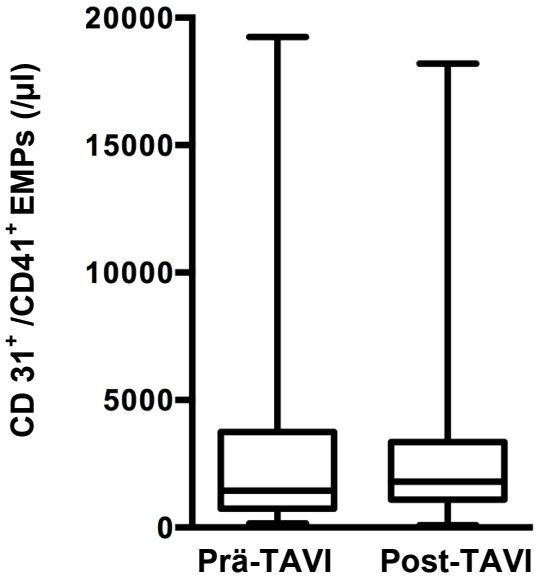
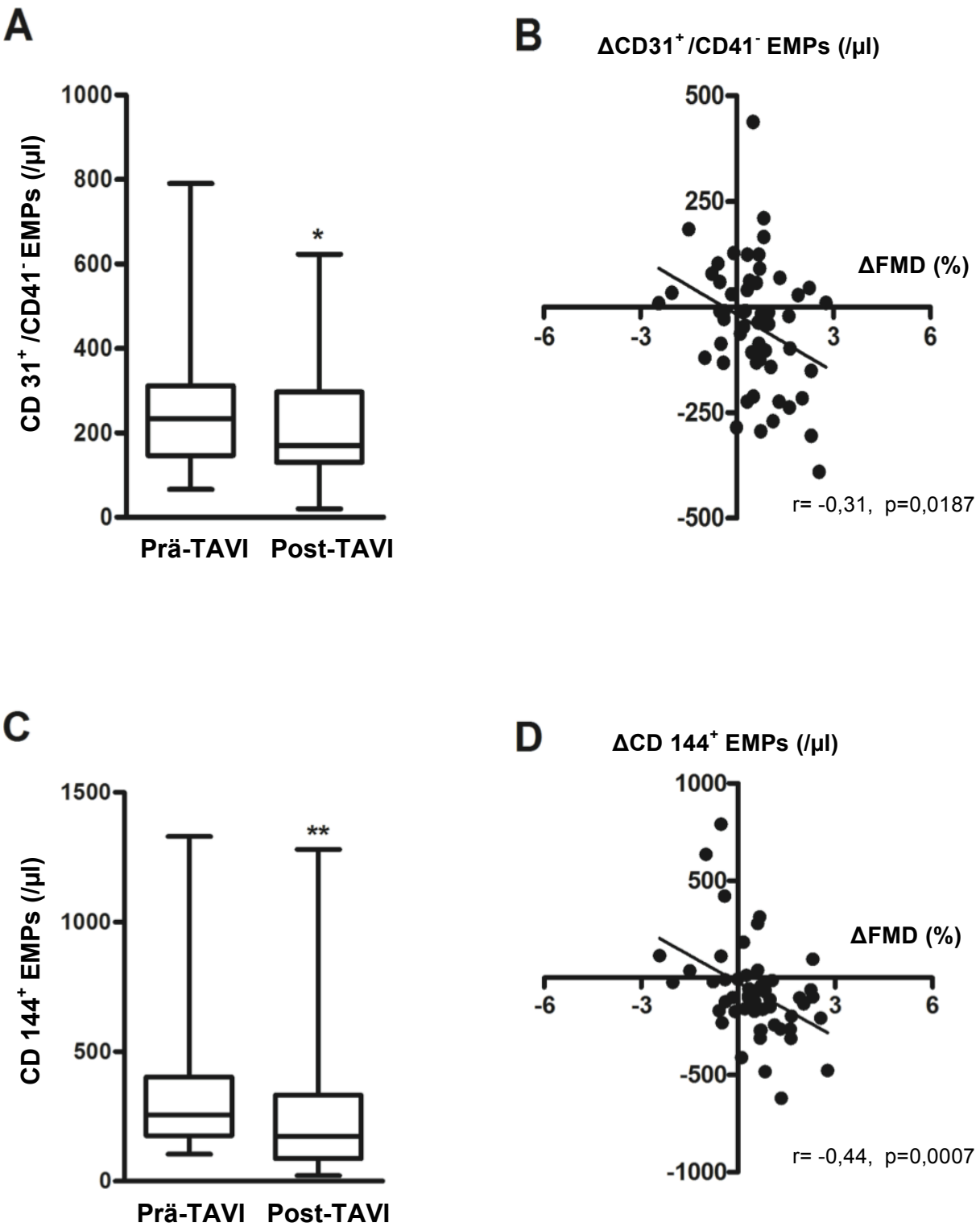


Abb. 14: Vergleich der Plasma-Konzentrationen CD31+/CD41+-PMPs prä- versus post-TAVI

Um eine potentielle Assoziation zwischen der Veränderung der endothelialen Funktion und der Konzentration zirkulierender EMPs zu demonstrieren, wurden eine Korrelationsanalyse der FMD-Veränderung prä- zu post-TAVI (ΔFMD) und der Veränderungen der einzelnen EMP-Subpopulationen prä- zu post-TAVI (ΔEMP) durchgeführt. Beide Delta-Werte errechneten sich jeweils aus der Differenz der entsprechenden post-TAVI-Daten minus der prä-TAVI-Daten. Es zeigte sich eine lineare inverse Korrelation zwischen ΔFMD und ΔEMP: ΔFMD mit $\Delta CD31^+$/ 41^--EMPs (r_S = -0,31, p = 0,0187) (Abb. 15B), ΔFMD mit $\Delta CD144^+$-EMPs (r_S = -0,44, p = 0,0007) (Abb. 15D) und ΔFMD mit $\Delta CD62E^+$-EMPs (r_S = -0,36, p = 0,0058) (Abb. 15F).


A
CD 31+ /CD41- EMPs (/µl)
1000
800
600
400
200
0
*
Prä-TAVI
Post-TAVI
B
ΔCD31+ /CD41- EMPs (/µl)
500
250
-250
-500
-6
-3
3
6
ΔFMD (%)
r= -0,31, p=0,0187
C
CD 144+ EMPs (/µl)
1500
1000
500
0
**
Prä-TAVI
Post-TAVI
D
ΔCD 144+ EMPs (/µl)
1000
500
-500
-1000
-6
-3
3
6
ΔFMD (%)
r= -0,44, p=0,0007

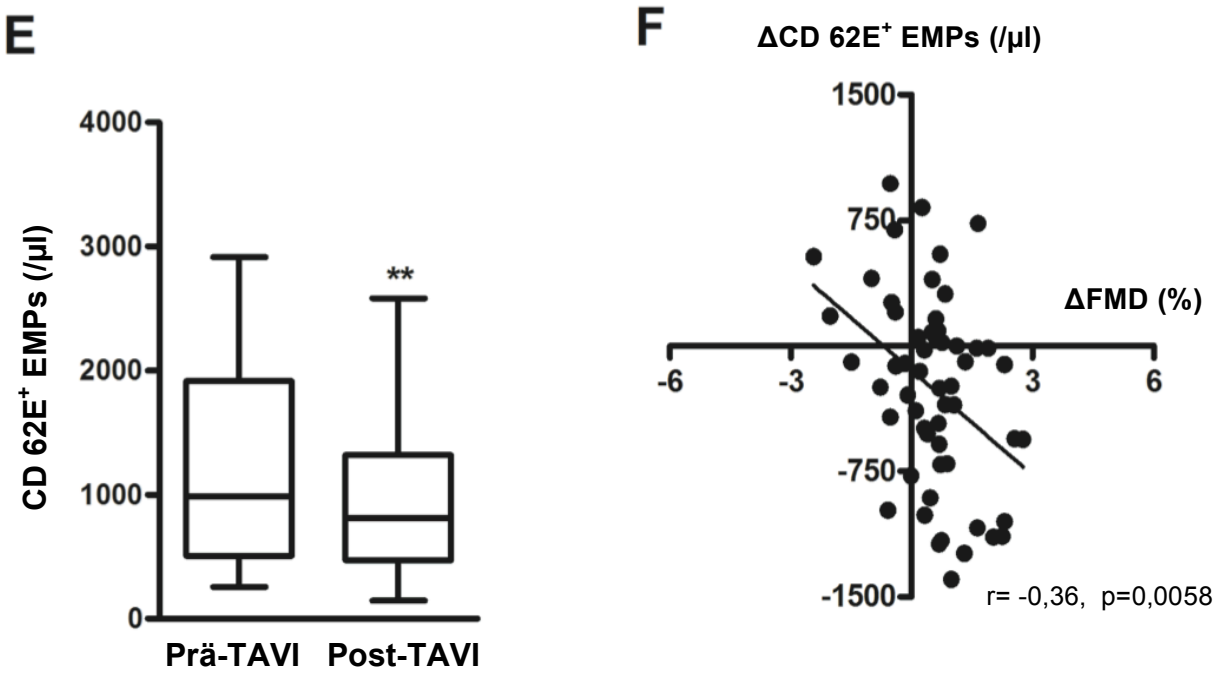


Abb. 15: Abnahme der EMP-Konzentration von prä- nach post-TAVI (A, C, E) und Korrelation der Abnahme zum FMD-Anstieg (B, D, F); In der drei Monats-Follow-up Kontrolle post-TAVI sank die Konzentration der EMPs ab, verglichen zu jenen Messdaten prä-TAVI. Die verschiedenen EMP-Subpopulationen wurden als **(A)** $CD31^+/CD41^-$, **(C)** $CD144^+$ und **(E)** $CD62E^+$ -MPs gemessen. Der Anstieg der FMD prä- zu post-TAVI (ΔFMD) korreliert invers mit der Abnahme der **(B)** $\Delta CD31^+/CD41^-$, **(D)** $\Delta CD144^+$ **(F)** und $\Delta CD62E^+$-EMP Subpopulationen prä- zu post-TAVI; r_S =Korrelationskoeffizient; * =p<0,05, ** =p <0,01

Zusammengefasst wurden drei Monate post-TAVI eine Erhöhung des brachialen WSS und eine verbesserte FMD als Marker für die Endothelfunktion im Vergleich zu prä-TAVI gemessen. Die Konzentration zirkulierender EMPs als Marker einer gestörten vaskulären Integrität verringerte sich post-TAVI. Zwischen ΔFMD und ΔEMP bestand eine inverse Korrelation.

4. Diskussion

Bei Patienten mit einer AKS findet sich distal der Stenose in den peripheren Arterien ein verringerter WSS [54], eine verminderte FMD als Zeichen einer endothelialen Dysfunktion [55, 56] und eine erhöhte Konzentration an zirkulierenden EMPs [82]. Bislang war unbekannt, ob bei Patienten mit AKS die endotheliale Funktion als direkte Konsequenz des arteriosklerotischen Prozesses aufgrund veränderter mechanischer Kräfte (wie dem verminderten WSS distal der Stenose [54]), beeinträchtigt ist, oder ob diese Dysfunktion sekundär durch andere Faktoren jenseits hämodynamischer Druckeffekte begünstigt wird.

In der vorliegenden Doktorarbeit sollte die Hypothese überprüft werden, ob die Aufhebung der AKS mittels TAVI zu einer Verbesserung der endothelialen Funktion und endothelialen Integrität führt.

Die wesentlichen Ergebnisse der vorliegenden Doktorarbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Patienten mit hochgradiger AKS zeigten eine beeinträchtigte endotheliale Funktion sowie eine erhöhte Konzentration an EMPs als Marker einer beeinträchtigten endothelialen Integrität.
2. Bei Patienten mit einer hochgradigen AKS war der brachiale WSS neben dem Diabetes ein unabhängiger Einflussfaktor für die FMD.
3. Die Konzentration zirkulierender MPs korrelierte positiv mit dem Grad der koronaren Kalzifizierung bei Patienten mit hochgradiger AKS.
4. Nach Aufhebung der Stenose mittels TAVI erhöhte sich der brachiale WSS, verbesserte sich die FMD und verringerte sich die Konzentration an EMPs drei Monate nach der Intervention.

Im Folgenden soll zunächst auf die Methoden zur Bestimmung der endothelialen Funktion und Integrität eingegangen werden. Anschließend werden die Ergebnisse der beiden Messzeitpunkte (prä-TAVI, post-TAVI) diskutiert. Dann folgt die Analyse der klinischen Bedeutung der hämodynamischen Veränderungen nach Aufhebung

der Stenose im Hinblick auf die Gefäßfunktion und Integrität. Im letzten Abschnitt werden die Limitationen der vorliegenden Studie diskutiert.

4.1 Evaluation der Methoden zur Messung der endothelialen Funktion und Integrität

Bewertung der Charakterisierung der endothelialen Funktion mittels FMD

Die nicht-invasive dopplersonographische Messung der scherkraftvermittelten prozentualen Zunahme des Gefäßdurchmessers der *Art. brachialis* während einer reaktiven Hyperämie gilt derzeit als Goldstandard für die Beurteilung der endothelialen Funktion [115, 116]. Die endothelabhängige FMD beschreibt die vasodilatorische Reaktion eines Gefäßes, ausgelöst durch einen gesteigerten, Blutfluss-assoziierten WSS. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass in Patienten mit hochgradiger AKS der WSS eine unabhängige Determinante der FMD darstellt.

Obgleich die Messgröße als „flussvermittelte Dilatation“ bezeichnet wird, handelt es sich bei dem Stimulus für die FMD um den WSS [128]. Im Gegensatz zu der Reibungskraft, dem WSS, beschreibt der Fluss ein Blutvolumen, das innerhalb einer gewissen Zeitspanne ein Gefäß an einer bestimmten Stelle passiert (Fluss = Geschwindigkeit × π × r^2) [36]. In Gefäßen mit gleichem Durchmesser korrelieren Erhöhungen im Fluss und WSS gut miteinander. Variiert der Durchmesser, ändert sich bei gleichbleibendem Fluss der WSS und damit auch die Intensität des Stimulus für die FMD [36]. Dies wurde in einer Studie durch Pyke et al. beobachtet, als sie reaktive Hyperämie-Tests an einer Gruppe von jungen, gesunden Probanden mit unterschiedlichen basalen Durchmessern (~3-5 mm) durchführten. Hierbei zeigte sich keine Korrelation zwischen dem *peak*-WSS und dem *peak*-Fluss [129]. Der *peak*-WSS verhielt sich umgekehrt proportional zum basalen Diameter, während der *peak*-Fluss direkt proportional zu dem Ausgangsdurchmesser war [129]. Kleinere Gefäße zeigen daher einen größeren WSS, aber einen kleineren Fluss im Vergleich zu größeren Gefäßen. Auch die FMD-Antwort ist aufgrund des größeren WSS-Reizes in kleineren Gefäßen größer. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit der WSS und nicht der Fluss als Stimulus für die FMD betrachtet.

Das Ausmaß einer FMD-Reaktion spiegelt nicht nur die Funktionsfähigkeit des Endothels wider, sondern hängt auch von der Stärke des einwirkenden Stimulus ab [124, 129]. Die Höhe des einwirkenden Stimulus während einer reaktiven Hyperämie, wird wiederum von verschiedenen Faktoren (Okklusionsdauer, Ausgangsdurchmesser, Positionierung der Blutdruckmannschette) beeinflusst und kann sich signifikant zwischen Individuen bzw. Gruppen unterscheiden. Wenn also eine niedrige FMD-Reaktion beobachtet wird, ist es wichtig zu wissen, ob dies das Ergebnis eines niedrig einwirkenden WSS-Stimulus ist, oder ob sich dahinter tatsächlich eine endotheliale Dysfunktion verbirgt. Daher ist es essentiell, die Höhe des einwirkenden Stimulus bei der Interpretation der FMD zu berücksichtigen. Um eine Reaktion von Gefäßen mit verschiedenen Durchmessern auf unterschiedliche Stimuli besser vergleichen zu können, wird empfohlen die FMD-Reaktion zu normalisieren, indem man die prozentuale *peak*-FMD-Antwort durch die Höhe des individuell einwirkenden Stimulus während der reaktiven Hyperämie dividiert [36, 130].

Eine Normierung wird weiter dadurch erschwert, dass bislang der exakte Stimulus für die FMD-Reaktion noch nicht genau definiert ist. Es hat sich gezeigt, dass sowohl der *peak*-WSS als auch die Dauer des WSS-Stimulus während reaktiver Hyperämie entscheidende Faktoren sind, für die Ausbildung der *peak*-FMD Reaktion [131, 132]. Der in der Literatur am häufigsten angewandte und anerkannte Stimulus für die Quantifizierung der FMD ist der *peak*-WSS [116]. Dieses Vorgehen wird durch die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung gestützt. Wir konnten zeigen, dass sich in der *Art. brachialis* sowohl der basale-WSS, als auch ΔWSS innerhalb des Beobachtungszeitraums erhöhten und positiv linear mit der Differenz aus dem maximalen Anstieg der FMD prä- zu post-TAVI korrelierten. Zudem erwies sich von den in dieser Studie untersuchten physikomechanischen Eigenschaften der ΔWSS als einziger als ein unabhängiger, signifikanter Einflussfaktor für die FMD (siehe Tabelle 4).

Dagegen zeigten Pyke et al., dass das Integral des WSS (*Area under the curve= AUC*) im Vergleich zum *peak*-WSS ein besserer Prädiktor für die FMD darstellt [130]. Hieraus folgerten die Autoren, dass die Bestimmung der AUC während einer reaktiven Hyperämie, die beste Methode zur Quantifizierung des Hauptstimulus für die Normalisierung der FMD-Reaktion sei [130]. Kritisch an dieser Studie zu werten ist, dass das untersuchte Patientenkollektiv aus einer kleinen Gruppe junger

gesunder Erwachsener bestand. Thijssen et. al belegten, dass die Korrelation zwischen der FMD und dem auslösenden WSS-AUC-Stimulus altersabhängig ist und sich nur dann eignet, wenn man junge Erwachsene untersucht [37]. Bei Kindern oder Älteren zeigte sich keine Korrelation zwischen der Höhe der FMD und dem auslösenden WSS-AUC-Stimulus. Diese Beobachtungen legen nahe, dass der Vergleich unterschiedlicher Gruppen, wie z.B. solche mit und ohne kardiovaskulären Erkrankungen oder Risikofaktoren, zu einem jeweils unterschiedlichem Verhältnis zwischen der FMD-Antwort und dem auslösenden WSS-AUC-Stimulus führen könnte. Zusammenfassend lässt sich aus den Befunden schließen, dass es für das Ausmaß der FMD-Antwort in verschiedenen Patientenkollektiven unterschiedliche Prädiktoren gibt. Wir konnten zeigen, dass bei Patienten mit hochgradiger AKS der *peak*-WSS der entscheidende Stimulus für die Ausbildung der FMD-Reaktion ist.

Bewertung der Charakterisierung der endothelialen Integrität anhand der Messung von EMP

Eine länger andauernde Exposition gegenüber kardiovaskulären Risikofaktoren führt beim vaskulären Endothel zur Ausprägung eines proinflammatorischen Phänotyps mit konsekutiver Seneszenz und Apoptose der Zellen [57]. Als Folge dessen wird nicht nur das Endothel dysfunktional sondern auch die endotheliale Integrität wird unterbrochen, sodass Endothelzellen oder Teile dieser Zellen in die Blutbahn gelöst werden [58]. Die bevorzugte Methode in unserem Labor zum Nachweis einer solchen Endothelzell-Aktivierung bzw. –Schädigung ist die durchflusszytometrische Messung zirkulierender EMPs aus einer Blutprobe.

Trotz der Entwicklung zahlreicher neuer Methoden zur Identifizierung und Charakterisierung der EMPs innerhalb der letzten Jahre [133, 134], fehlen derzeit standardisierte Verfahren zur Klassifizierung und Quantifizierung von MPs. Folglich existieren in der Literatur große Unterschiede in den Versuchsprotokollen zur Aufreinigung der MPs, welche die Vergleichbarkeit der Ergebnissen zwischen den verschiedenen Laboren limitiert [135]. Die Art der Antikoagulation, die Zentrifugationsgeschwindigkeit und die Lagerungstemperatur der Plasmaproben zeigen eine konfundierende Wirkung auf die MP-Quantifizierung [136, 137]. Daher wurde in der vorliegenden Studie auf eine Konstanthaltung dieser Faktoren in allen

Versuchsansätzen geachtet. Eine weitere Schwierigkeit ergab sich aus der möglichen Verwendung einer Vielzahl Endothel-spezifischer Oberflächen-AK mit unterschiedlicher klinischer Bedeutung zur Charakterisierung der EMPs [138]. Jimenez et al. demonstrierten, dass das Expressionsprofil der Oberflächenproteine bei den EMPs vom jeweiligem Stimulus abhängt. Bei apoptotischen Endothelzellen dominieren $CD31^+$-EMPs, bei aktivierten Endothelzellen dagegen $CD62E^+$-EMPs[139].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konzentrierten wir uns auf die Messung dreier EMP-Subpopulationen, welche in der Literatur häufig verwendet wurden: $CD62E^+$-$CD144^+$- und $CD31^+/CD41^-$-EMPs. Im Gegensatz zu den beiden Endothel-spezifischen Markern CD62E (E-Selectin) und CD144 (VE-Cadherin) wird CD31 (PECAM-1) auch auf der Oberfläche von Thrombozyten exprimiert [60]. Die Expression von CD41 (GP-IIb/IIIa) ist dagegen Thrombozyten-spezifisch [140]. Auf diese Weise konnten wir durch eine CD31/CD41-Doppelfärbung mit einer FACS-Messung zwischen endothelialen-MPs ($CD31^+/CD41^-$) und thrombozytären-MPs ($CD31^+/CD41^+$) diskriminieren [140].

4.2 Endotheliale Funktion und Integrität bei Patienten mit AKS und bei Patienten ohne AKS

In der vorliegenden Arbeit zeigten die Patienten mit einer hochgradigen AKS eine schlechtere Gefäßfunktion und eine erhöhte Konzentration an EMPs im Vergleich zu Patienten ohne AKS. Die Patienten der beiden Versuchsgruppen unterschieden sich lediglich durch die stenosierte Herzklappe und waren in Bezug auf ihr Risikoprofil, ihr Alter und ihre Begleitmedikation vergleichbar (siehe Tabelle 2). Poggianti et al. zeigten, dass Patienten bereits bei einer Frühform der AKS, nämlich sklerosierter Aortenklappe (=abnorm verdickte und kalzifizierte Aortenklappe bei fehlendem transvalvulären Druckgradienten [24]), über eine reduzierte FMD verfügten, was auf die Präsenz einer endothelialen Dysfunktion bei solchen Patienten hinweist [55]. Die graduell fortschreitende Obstruktion der Aortenklappe führt zu schwerwiegenden Veränderungen der Hämodynamik und hat demzufolge auch Einfluss auf die endotheliale Funktion im peripheren vaskulären System. Im Bereich der valvulären Stenose findet sich aufgrund der verminderten Lumenfläche ein erhöhter WSS (siehe

Formel 2 zur Berechnung des WSS) [32]. Distal der Stenose ist das Endothel einem gestörten Fluss und einem oszillierenden WSS ausgesetzt [32]. Folglich findet sich bei Patienten mit einer AKS in den peripheren Arterien ein verringerter WSS [54].

Diehl et al. konnten nachweisen, dass bei Patienten mit hochgradiger AKS die Gesamtzahl an EMPs, im Vergleich zu einer Kontrollgruppe, signifikant erhöht war [82]. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen zeigten auch in der vorliegenden Studie Patienten mit einer hochgradigen AKS im Vergleich zu Patienten ohne AKS eine erhöhte Konzentration an EMPs, sowie eine schlechtere FMD als Marker der gestörten Endothelfunktion. Aber nicht für alle Subpopulationen konnten signifikante Unterschiede gefunden werden Während sich eine signifikant erhöhte Konzentrationen von $CD31^{+}/CD41^{-}$-EMPs nachweisen ließ, zeigte sich bei den CD $62E^{+}$-EMPs und $CD144^{+}$-EMPs eine tendenziell zwar höhere Konzentration im Vergleich zu den Kontrollprobanden, der Unterschied erreichte in beiden Fällen jedoch keine statistische Signifikanz. Für diese Befunde könnten verschiedene Gründe ursächlich sein. Die Anzahl der Patienten ohne Stenose (n=20) war im Vergleich zu Patienten mit AKS (n=56) deutlich kleiner, wodurch geringere Unterschiede in den einzelnen EMP-Subpopulationen eher als statistisch nicht signifikant gewertet werden. Ein größerer Unterschied bei den $CD31^{+}$-EMPs könnte aber auch dadurch erklärt werden, dass die Beeinträchtigung der endothelialen Integrität bei Patienten mit AKS primär durch die endotheliale Apoptose, welche durch die Überexpression des CD31-Oberflächenantigens charakterisiert ist [139], verursacht wurde. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die CD31/CD41-Zweifachfärbung zu falsch hohen Ergebnissen der EMPs geführt hat. So konnten Koga et al. belegen, dass sich unter den als durchflusszytometrisch $CD31^{+}/CD41^{-}$ MPs klassifizierten Zellen fälschlich auch thrombozytäre-MPs ($CD31^{+}/CD41^{+}$) befanden [73]. Daher bedarf es weiterer Untersuchungen und einer größeren Studienpopulation, um diese kausalen Zusammenhänge näher zu erläutern.

Interessanterweise zeigten die AKS-Patienten im Vergleich zu den Kontrollpatienten einen deutlich niedrigeren Hämatokrit (Hkt). Jacobson et al. beobachteten bei AKS-Patienten mit einem transvalvulären Druckgradienten >50 mmHg eine verstärkte intravaskuläre Hämolyse [141]. Ursache der Erythrozyten-Degradation sind möglicherweise erhöhte Scherkräfte und turbulente Strömungen, die infolge der stenosierten Klappe entstehen. Unter diesen Bedingungen könnte es zu einer

verstärkten Disruption der Erythrozytenmembran kommen. Zudem wird bei Patienten mit AKS ein gehäuftes Vorkommen von okkulten gastrointestinalen Blutungen aus fehlgebildeten Blutgefäßen (Angiodysplasien) des Zökums und Colon ascendens beobachtet. Dieses Krankheitsbild wird als Heyde-Syndrom bezeichnet. Der ursächliche Zusammenhang für das gemeinsame Vorkommen einer AKS und okkulten Blutungen aus Angiodysplasien ist bislang nicht geklärt. Vermutet wird eine Regulationsstörung der Blutgerinnung mit einer Verringerung der Aktivität des Von-Willebrand-Faktors (VWF). Der VWF ist ein multimeres Glykoprotein, das eine wichtige Funktion in der Hämostase erfüllt. In Gebieten mit erhöhten Scherkräften, wie z.B am Ort eines endothelialen Schadens, kommt es zur Überführung des VWF in seine eigentlich hämostaseologisch wirksame Form; die VWF-Multimere entfalten sich zu einer strangförmigen Struktur, die die Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation an das vaskuläre Subendothel ermöglicht [142]. Nach dieser Scherkraft-induzierten Konformationsänderung werden die VWF-Multimere durch die Metalloprotease ADAMTS13 (*a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, member 13*) in kleinere Einheiten gespalten, welche wiederum durch andere Peptidasen weiter abgebaut werden [143]. Möglicherweise bewirken die hohen Scherkräfte, denen der VWF bei der Passage durch die stenosierte Aortenklappe ausgesetzt ist, einen verstärkten Abbau bevorzugt der hochmolekularen Multimere durch ADAMTS13 [144]. Die Folge ist eine verminderte Aktivität des VWFs in der Peripherie, wodurch relevante Blutungen aus präformierten Angiodysplasien entstehen können [145]. Diese Hypothese wird dadurch bekräftigt, daß bei Patienten mit hochgradiger AKS präoperativ geringere Mengen an VWF-Multimeren gemessen wurden, als bei Patienten, die sich einer Bybassoperation unterzogen [146]. Damit könnte möglicherweise die niedrige Erythrozyten-Konzentration bzw. der niedrige Hämatokrit bei den AKS-Patienten der vorliegenden Studie durch eine Hämolyse und okkulte intestinale Mikro-Blutungen erklärt werden.

Zusammengefasst zeigte sich in der vorliegenden Studie bei den AKS-Patienten im Vergleich zu Patienten ohne AKS eine schlechtere Endothelfunktion (FMD) sowie erhöhte EMP-Konzentrationen**.**

4.3 MPs als zirkulierende Marker der vaskulären Kalzifizierung

In der vorliegenden Arbeit korrelierte die CAC mit der Konzentration zirkulierender PMPs und EMPs. Histopathologische Studien an Autopsie-Herzen zeigen eine enge Korrelation zwischen dem Ausmaß koronarer Verkalkungen und dem Stenosierungsgrad atherosklerotisch veränderter Herzkranzgefäße [147, 148]. Zudem konnte belegt werden, dass der Agatston-Score eine von den klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren, wie dem Cholesterin- oder CRP-Wert, unabhängige prognostische Aussagekraft besitzt [149-151]. Das *"Calcium-Scoring"* wird als *Screening*-Methode zur individuellen Risikoabschätzung für zukünftige kardiovaskuläre Ereignisse wie Stenosen, Myokardinfarkt oder plötzlichen Herztod genutzt [152-154] und dient daher der genaueren Therapiestrategieplanung bei asymptomatischen Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren [155, 156].

In vorherigen Untersuchungen wurde bereits gezeigt, dass die Konzentration an zirkulierenden MPs bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen, verglichen mit gesunden Probanden, deutlich erhöht ist [59, 83, 157]. Eine erhöhte Konzentration an $CD144^+$-EMPs bei Typ-2-Diabetikern mit koronaren nicht-verkalkten Plaques im Vergleich zu Patienten ohne solchen Plaques deutet auf einen Zusammenhang zwischen der Konzentration zirkulierender MPs und dem Schweregrad des atherosklerotischen Prozesses hin [158]. Eine positive Korrelation zwischen dem Schweregrad der CAC und der Konzentration an $CD62E^+$-EMPs wurde auch bei postmenopausalen Frauen nachgewiesen [159]. In der vorliegenden Studie wurde zum ersten Mal gezeigt, dass die Konzentrationen von PMPs und von $CD62E^+$-EMPs bei Patienten mit fortgeschrittener Atherosklerose und AKS linear mit der Schwere der CAC korrelieren. In diesem Kontext sollte die Rolle der Leukozyten-MPs in zukünftigen Studien genauer untersucht werden. Diese von aktivierten Monozyten und atherosklerotischen Plaques freigesetzte MP-Subpopulation könnte möglicherweise zu einer atherosklerotischen Inflammation und Plaque-Progression beitragen [160].

4.4 MPs und valvuläre Kalzifizierung

Zwischen der Konzentration an MPs und dem Grad der AVC bestand bei den AKS-Patienten der vorliegenden Dissertation keine Korrelation. Die Oberfläche des Koronarbaums ist um einige Größenordnungen größer als die Oberfläche der Aortenklappe. Da die MPs von Oberflächen abgegeben werden, könnte ein möglicher Zusammenhang zwischen der AVC und MPs bereits durch eine milde koexistierende KHK verdeckt werden. Möglicherweise ist die Oberfläche der Aortenklappe zu klein, um einen messbaren Einfluss auf die Konzentration zirkulierender MPs zu haben. Weiter könnte die fehlende Assoziation zwischen MPs und AVC aber auch ein Ausdruck einer unterschiedlichen Pathogenese der koronaren und valvulären Kalzifizierung sein. Obwohl die Degeneration der Aortenklappe und die Genese der Arteriosklerose viele Gemeinsamkeiten aufweisen [25, 161], ist die AVC nicht mit einer ''Arteriosklerose der Klappe'' gleichzusetzen [162]. Beispielsweise konnte eine lipidsenkende Therapie mittels einem Statin in zwei großen randomisierten klinischen Studien an Patienten mit fortgeschrittener AVC (SALTIRE (*Scottish Aortic Stenosis and Lipid Lowering Trial, Impact on Regression*) [163] und SEAS (*Simvastatin and Ezetimibe in Aortic Stenosis*) [164]) die Progression der AVC nicht verlangsamen.

In der vorliegenden Arbeit konnten wir auch keine Korrelation zwischen der CAC und der AVC bei AKS-Patienten nachweisen. Unsere Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit früheren Arbeiten, die zeigten, dass es zwischen dem Schweregrad der AVC und der CAC keinen Zusammenhang gibt [165, 166]. Henein et al. haben erst kürzlich beweisen können, dass allein das Ausmaß der Aortenwurzel-Verkalkung und nicht der Klappen-Verkalkung mit dem CAC-Score bei Patienten mit hochgradiger AKS korreliert [167]. Diese Beobachtungen führten die Autoren auf den ähnlichen histologischen Aufbau der beiden Gefäße und dem davon abweichenden Gewebe der Herzklappen zurück. Das Fehlen einer Beziehung zwischen der koronaren- und Aortenklappen-Verkalkung deutet damit auf unterschiedliche pathosphysiologische Mechanismen bei den beiden Erkrankungen hin.

Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Daten, dass die Bestimmung zirkulierender MPs als Marker der individuellen koronaren, aber nicht valvulären

Kalklast, genutzt werden kann. Es bedarf jedoch weiterer Studien, um diesen Marker beim *Screening* oder zur Risikostratifizierung im klinischen Alltag einsetzen zu können.

4.5 Effekt der TAVI auf die endotheliale Funktion

In dieser Studie wurde nachgewiesen, dass sich durch die Beseitigung der AKS post-TAVI der brachiale WSS erhöht und sich die FMD im Vergleich zur Situation prä-TAVI verbessert.

Irace et al. demonstrierten, dass Patienten mit AKS einen geringeren WSS in den peripheren Arterien aufweisen (gemessen in der *Art. carotis communis*) im Vergleich zu Patienten ohne stenosierte Aortenklappe. Durch Aufhebung der Stenose mittels konventionellem AKE wurde die Strömungsgeschwindigkeit des Blutes und damit auch der *baseline*-WSS erhöht [54].

Im Gegensatz zu den vorliegenden Resultaten zeigten Chenevard et al. in einer kleinen Studie mit 15 AKS-Patienten, dass sich nach einem konventionellen AKE, die endotheliale Funktion, gemessen mittels FMD, nicht verbesserte [168]. Die in unserer Studie eingeschlossenen Patienten unterscheiden sich jedoch von dieser Studie, aufgrund deren höheren Alters und der höheren Anzahl an kardiovaskulären Risikofaktoren ebenso wie schweren Begleiterkrankungen. Unsere Probanden hatten steifere und verstärkt kalzifizierte Arterien, sodass sich anders als bei den Patienten der Studie von Chenard et al. der Gefäßdurchmesser nach Aufhebung der AKS nicht wesentlich veränderte. Obwohl der Durchmesser der *Art. brachialis* in unserer Studie unverändert blieb, führte der Anstieg der Spitzenflussgeschwindigkeit zu einem erhöhten, auf die Gefäßwand wirkenden WSS, der den wesentlichen Stimulus für die FMD darstellt [116]. Darüber hinaus waren die Patienten in der vorliegenden Studie aufgrund der Komorbiditäten und aufgrund der hochgradigen Verengung der Aortenklappe prä-TAVI in ihrer täglichen körperlichen Belastung eigeschränkter als jüngere Patienten, die mit einem konventionellen AKE behandelt wurden. Diese Überlegungen würden auch erklären, warum der Effekt der Wiederherstellung der körperlichen Leistungsfähigkeit auf die endotheliale Funktion nach Aufhebung der Stenose bei unseren Patienten ausgeprägter sein könnte.

Ein weiterer Risikofaktor, der für das Vorhandensein einer endothelialen Dysfunktion bei degenerativer AKS verantwortlich sein könnte, stellt die systemische Inflammation dar [169]. Es wurde gezeigt, dass ansteigende Plasmaspiegel an CRP invers mit der FMD bei Patienten mit AKS korrelierten [168]. Dieser Zusammenhang kann mit einer durch die Entzündung bedingten, verminderten Expression der endothelialen NO-Synthase und einer daraus folgenden verringerten biologischen NO-Bioverfügbarkeit erklärt werden. Eine solche Kausalkette wurde in ähnlicher Weise bei der Atherogenese beschrieben [27]. In der vorliegenden Studie wurden jedoch keine Veränderungen der CRP-Plasmaspiegel nach Aufhebung der AKS durch die TAVI festgestellt. Des Weiteren bestand keine Korrelation zwischen der CRP-Konzentration und der FMD.

In der vorliegenden Studie veränderten sich weder der basale Ruhedurchmesser der *Art. brachialis* noch die Blutdruckamplitude oder die FDC (Maß für die arterielle Steifigkeit peripherer Arterien) nach der TAVI. In einer Studie von Nemes et al. blieb nach dem operativen Ersatz der Aortenklappe die Blutdruckamplitude zwar ebenfalls gleich, allerdings verbesserte sich die aortale Dehnbarkeit *(Aortic compliance)* [170]. Dieser Effekt der verbesserten aortalen Dehnbarkeit war jedoch noch nicht nach einem *Kurzzeit-Follow-up* von 1–6 Monaten, sondern erst nach einem *Langzeit-Follow-up* von 12 Monaten messbar [170]. Daher war möglicherweise der Beobachtungszeitraum von drei Monaten in der vorliegenden Studie zu kurz, um einen Effekt der TAVI auf die arterielle Steifigkeit zu detektieren.

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Studie erstmalig gezeigt, dass bei älteren Patienten mit einer hochgradigen AKS der WSS ein unabhängiger Prädiktor für die FMD ist und dass sich sowohl der WSS als auch die FMD nach TAVI signifikant verbesserten.

4.6 Effekt der TAVI auf die endotheliale Integrität

In der vorliegenden Studie reduzierte sich drei Monate post-TAVI parallel zu der Verbesserung der Endothelfunktion auch die Konzentration zirkulierender EMPs.

Der aktuelle Wissensstand über die Freisetzung von MPs basiert hauptsächlich auf *in-vitro* Experimenten an isolierten und kultivierten Zellen. In diesen Versuchen wurde die bei einer Zellaktvierung oder Apoptose ausgelöste Sekretion von MPs

vorwiegend über eine Erhöhung der intrazellulären Kalzium-Konzentration, den Verlust der Membran-Lipid-Asymmetrie und über eine Reorganisation von Zytoskelett-Proteinen vermittelt [60]. Die genauen pathophysiologischen Mechanismen, die *in-vivo* zur Bildung von MPs aus endothelialen Zellen führen, sind zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch weitestgehend ungeklärt.

Ein niedriger WSS fördert die Apoptose von Endothelzellen, während die Aufrechterhaltung eines physiologischen laminären WSS das Überleben und die Seneszenz von endothelialen Zellen unterstützt [33]. Vion et al demonstrierten *in-vitro*, dass ein anhaltender, Arteriosklerose-fördernder niedriger WSS die EMP-Freisetzung über die Aktivierung Rho-assoziierter und Mitogen-aktivierter Protein-Kinase-Signalwegen stimuliert. Dagegen limitierte ein atheroprotektiver physiologisch hoher WSS die EMP-Sekretion über eine NO-abhängige Regulation der *ATP-binding cassette transporter*-(ABCA1)-Expression und zytoskelettalen Reorganisation, [171]. Zudem zeigte eine Studie von Boulanger et al. an Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz, dass die Höhe des WSSs invers mit der Konzentration an EMP korrelierte. Dieser Zusammenhang war unabhängig vom Alter und Blutdruck [81]. Übereinstimmend mit dieser Assoziation zwischen WSS und der Konzentration an $CD31^+/CD41^-$-EMPs und $CD144^+$-EMPs korrelierte in unserer Studie *in-vivo* der brachiale *baseline-WSS* invers mit der Gesamtkonzentration an $CD144^+$-EMPs [81]. Um zu testen, ob die beobachteten Effekte speziell im Zusammenhang mit EMPs stehen, erweiterten wir unsere Messungen zusätzlich auf die Bestimmung der Konzentration zirkulierender PMPs. Hierbei zeigte sich, dass die Gesamt-Konzentration der PMPs nicht wesentlich durch das TAVI-Verfahren beeinflusst wurde. Der WSS ist bei Patienten mit AKS reduziert [54] und zudem wiesen Diehl et al. bei Patienten mit hochgradig stenosierter Aortenklappe erhöhte Konzentrationen an zirkulierenden EMPs nach [82]. Mit dieser Studie konnten wir zeigen, dass sich nach Aufhebung der Stenose mittels TAVI-Prozedur, die endotheliale Funktion verbesserte, während simultan der brachiale WSS anstieg und die Konzentration an zirkulierenden EMPs, als Marker einer beeinträchtigten endothelialen Integrität, abnahm. Diese Befunde deuten darauf hin, dass die Erhöhung des WSS nach TAVI protektiv auf die Endothelzellen *in-vivo* einwirkt und so die endotheliale Sekretion von EMPs verringert.

EMPs sind nicht nur Marker einer gestörten endothelialen Integrität und Dysfunktion, sondern können auch selbst über die Modulation des NO-Stoffwechselweges die endotheliale Funktion beeinträchtigen [172, 173]. Sowohl *in-vivo* als auch *in-vitro* generierte isolierte EMPs beeinträchtigen nach Inkubation mit Ratten-Aortaringen *ex vivo* über einer Verringerung der endogenen NO-Produktion die endotheliale Funktion [75, 174]. In diesem Kontext scheint der oxidative Stress eine entscheidende Rolle zu spielen. Brodsky et al. konnten nachweisen, dass EMPs zu einer gesteigerten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) führen [174]. Durch die Reaktion des Sauerstoffradikals Superoxid-Anion (O_2^-) mit NO entsteht Peroxynitrit ($ONOO^-$), das wiederum zu einer Entkopplung der eNOS führt und somit die endogene NO-Bioverfügbarkeit reduziert [175, 176]. Weiterhin demonstrierten Horn et al., dass MPs eine funktionell aktive eNOS exprimieren und dadurch selbst NO freisetzen können. Hierbei zeigte sich, dass aus Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen und nachgewiesener endothelialer Dysfunktion generierte MPs im Vergleich zu MPs gesunder Individuen, eine verminderte Expression und Aktivität der eNOS aufwiesen [69]. Basierend auf diesen Erkenntnissen könnte die verringerte Konzentration an EMPs im Blutkreislauf, wie sie in der vorliegenden Studie post-TAVI gemessen wurde, auch zu einer Verbesserung der endothelialen Funktion beigetragen haben.

4.7 Limitationen der Studie

Die Studie ist durch das Fehlen einer unbehandelten Kontrollkohorte mit AKS-Patienten, die nicht mit einem TAVI-Verfahren behandelt wurden, limitiert. Eine solche Kontrollkohorte ist, angesichts der Tatsache, dass Patienten mit symptomatischer hochgradiger AKS eine kürzere Lebenserwartung aufweisen, und dass das TAVI-Verfahren, in Bezug auf die Verringerung der Morbidität und Mortalität, einer optimalen Standardtherapie (medikamentös oder Ballonvalvuloplastie) eindeutig überlegen ist [20], nicht verfügbar. Daher wurden praktisch alle Patienten in unserer Klinik mit symptomatischer hochgradiger AKS und dem gleichzeitigen Vorliegen schwerer Begleiterkrankungen, entsprechend der interdisziplinären Indikationsstellung des Düsseldorfer *Heart-Teams*, mit dem TAVI-Verfahren therapiert. Ebenso wurden jene Patienten, welche für eine TAVI-Prozedur abgelehnt wurden, nicht in unserer Studie eingeschlossen, da diese Patienten aufgrund

schwererer Begleiterkrankungen und/oder dem Vorhandensein eines malignen Tumors nicht mit unserer Kohorte übereinstimmten.

Die medikamentöse Therapie mit ACE- Inhibitoren [177], Statinen [178], Nitraten und Beta-Blocker [179] kann die FMD beeinflussen. Diese Medikationen wurden jedoch bei den Studienteilnehmern während des gesamten Beobachtungszeitraumes nicht verändert.. Ein potentieller Einfluss auf die FMD oder Konzentration zirkulierender EMPs, bedingt durch individuelle Änderungen in der thrombozyten-aggregationshemmenden Therapie, kann in dieser Studie aber nicht ausgeschlossen werden. Die Standard-Therapie in unserer Klinik nach TAVI bestand zunächst aus einer kombinierten dualen Thrombozyten-Aggregationshemmung mittels ASS plus Clopidogrel für drei Monate, gefolgt von einer lebenslangen ASS-Monotherapie. 64% der Patienten der vorliegenden Untersuchung erhielten aufgrund einer zuvor erfolgten perkutanen Koronarangioplastie bereits prä-TAVI ASS plus Clopidogrel. Daher wurde bei lediglich 36% der Studienteilnehmer die thrombozytenaggregationshemmende Therapie umgestellt. In früheren Studien wurde gezeigt, dass die einmalige Gabe von Clopidogrel als akute Wirkung *in-vitro* zu einer reduzierten Bildung von EMPs führt [180], *in vivo* die FMD verbessert [181] und *in-vivo* die Konzentration an zirkulierenden EMPs reduziert [182]. Die Langzeiteinnahme von Clopidogrel (30 Tage) hatte hingegen keinen Einfluss auf die FMD- oder EMP-Daten *in-vivo* [183, 184]. Aus diesem Grund vermuten wir, dass die in der vorliegenden Studie detektierten Änderungen in der endothelialen Funktion und der EMP-Generierung nicht auf Veränderungen der thrombozyten-aggregationshemmenden Therapie zurückzuführen sind.

5 Klinische Schlussfolgerung

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass der interventionelle Ersatz der Aortenklappe mit einer verbesserten endothelialen Funktion und Integrität einhergeht. Die Zunahme der FMD und die reduzierte Konzentration zirkulierender EMPs drei Monate nach dem TAVI-Eingriff charakterisieren die positiven Auswirkungen dieses Verfahrens auf die systemische vaskuläre Funktion bei Patienten mit hochgradiger AKS. Zukünftige prospektive Langzeitstudien mit größeren Patientenkohorten sind erforderlich, um eine potentielle prognostische Aussagekraft der präexistierenden endothelialen Dysfunktion bei AKS und deren Verbesserungspotential durch TAVI, zu untersuchen. In der klinischen Praxis könnte die Beurteilung der endothelialen Funktion vor und nach TAVI in Zukunft zu einer genaueren Risikostratifizierung der Patienten beitragen.

Die Bedeutung der MPs in der Pathophysiologie kardiovaskulärer Erkrankungen wird immer offenkundiger. Daher ist davon auszugehen, dass MP-Konzentrationsdaten sowohl als Marker als auch als Therapieziel zunehmend in den Fokus der Wissenschaft rücken werden. Der Zusammenhang zwischen der hier beschriebenen erhöhten EMP-Konzentration im Blut bei Patienten mit hochgradiger AKS und dessen Einfluss auf die Pathogenese und Progression der AKS, lässt sich anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht zweifelsfrei belegen. Um eine potentiell aktive Rolle der MPs in diesem Szenario zu untersuchen, sind weitere prospektive Studien erforderlich, in denen die MP-Gesamtkonzentration und die Interaktion der MPs mit anderen Zellen im Hinblick auf eine mögliche Korrelation mit der Progression und dem Schweregrad der AKS analysiert wird. Darüber hinaus könnte das Verständnis der erhöhten MP-Konzentrationen und dem Fortschreiten einer AKS, ein neues Interessengebiet für die Therapie der AKS eröffnen. Gegebenenfalls könnten durch gezielte Interventionen, die die MP-Freisetzung aus den Mutterzellen inhibieren und/oder die Interaktion von MP mit anderen Zellen reduzieren, neue Behandlungsstrategien zur Verlangsamung des Krankheitsfortschritts entwickelt werden. Zukünftige *in-vivo* und *in-vitro* Studien müssen zeigen, in wie weit eine therapeutische Modulation der unterschiedlichen MP-Subtypen zu einer Verbesserung der klinischen Befunde führen kann.

6. Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Mendis, S., et al., *Global atlas on cardiovascular disease prevention and control*. 2011, Geneva: World Health Organization in collaboration with the World Heart Federation and the World Stroke Organization. vi, 155 p.
2. Iung, B., et al., *A prospective survey of patients with valvular heart disease in Europe: The Euro Heart Survey on Valvular Heart Disease.* Eur Heart J, 2003. **24**(13): p. 1231-43.
3. Supino, P.G., et al., *The epidemiology of valvular heart disease: a growing public health problem.* Heart Fail Clin, 2006. **2**(4): p. 379-93.
4. Nkomo, V.T., et al., *Burden of valvular heart diseases: a population-based study.* Lancet, 2006. **368**(9540): p. 1005-11.
5. Olszowska, M., *Pathogenesis and pathophysiology of aortic valve stenosis in adults.* Pol Arch Med Wewn, 2011. **121**(11): p. 409-13.
6. Faggiano, P., et al., *Progression of valvular aortic stenosis in adults: literature review and clinical implications.* Am Heart J, 1996. **132**(2 Pt 1): p. 408-17.
7. Carabello, B.A. and W.J. Paulus, *Aortic stenosis.* Lancet, 2009. **373**(9667): p. 956-66.
8. Grossman, W., D. Jones, and L.P. McLaurin, *Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle.* J Clin Invest, 1975. **56**(1): p. 56-64.
9. Hein, S., et al., *Progression from compensated hypertrophy to failure in the pressure-overloaded human heart: structural deterioration and compensatory mechanisms.* Circulation, 2003. **107**(7): p. 984-91.
10. Gould, K.L. and B.A. Carabello, *Why angina in aortic stenosis with normal coronary arteriograms?* Circulation, 2003. **107**(25): p. 3121-3.
11. Nakano, K., et al., *Abnormal subendocardial blood flow in pressure overload hypertrophy is associated with pacing-induced subendocardial dysfunction.* Circ Res, 1989. **65**(6): p. 1555-64.
12. Marcus, M.L., et al., *Decreased coronary reserve: a mechanism for angina pectoris in patients with aortic stenosis and normal coronary arteries.* N Engl J Med, 1982. **307**(22): p. 1362-6.
13. Richards, A.M., et al., *Syncope in aortic valvular stenosis.* Lancet, 1984. **2**(8412): p. 1113-6.
14. Herold, G., *Innere Medizin*. 2013, Köln.
15. Pellikka, P.A., et al., *Outcome of 622 adults with asymptomatic, hemodynamically significant aortic stenosis during prolonged follow-up.* Circulation, 2005. **111**(24): p. 3290-5.
16. Rosenhek, R., et al., *Natural history of very severe aortic stenosis.* Circulation, 2010. **121**(1): p. 151-6.
17. Ross, J., Jr. and E. Braunwald, *Aortic stenosis.* Circulation, 1968. **38**(1 Suppl): p. 61-7.
18. Spaccarotella, C., A. Mongiardo, and C. Indolfi, *Pathophysiology of aortic stenosis and approach to treatment with percutaneous valve implantation.* Circ J, 2011. **75**(1): p. 11-19.
19. Leon, M.B., et al., *Transcatheter aortic-valve implantation for aortic stenosis in patients who cannot undergo surgery.* N Engl J Med, 2010. **363**(17): p. 1597-607.

20. Makkar, R.R., et al., *Transcatheter aortic-valve replacement for inoperable severe aortic stenosis.* N Engl J Med, 2012. **366**(18): p. 1696-704.
21. Vahanian, A., et al., *Guidelines on the management of valvular heart disease: The Task Force on the Management of Valvular Heart Disease of the European Society of Cardiology.* Eur Heart J, 2007. **28**(2): p. 230-68.
22. Dweck, M.R., N.A. Boon, and D.E. Newby, *Calcific aortic stenosis: a disease of the valve and the myocardium.* J Am Coll Cardiol, 2012. **60**(19): p. 1854-63.
23. Rajamannan, N.M., et al., *Calcific aortic valve disease: not simply a degenerative process: A review and agenda for research from the National Heart and Lung and Blood Institute Aortic Stenosis Working Group. Executive summary: Calcific aortic valve disease-2011 update.* Circulation, 2011. **124**(16): p. 1783-91.
24. Faggiano, P., et al., *Epidemiology and cardiovascular risk factors of aortic stenosis.* Cardiovasc Ultrasound, 2006. **4**: p. 27.
25. Stewart, B.F., et al., *Clinical factors associated with calcific aortic valve disease. Cardiovascular Health Study.* J Am Coll Cardiol, 1997. **29**(3): p. 630-4.
26. Briand, M., et al., *Metabolic syndrome negatively influences disease progression and prognosis in aortic stenosis.* J Am Coll Cardiol, 2006. **47**(11): p. 2229-36.
27. Otto, C.M., et al., *Characterization of the early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies.* Circulation, 1994. **90**(2): p. 844-53.
28. O'Brien, K.D., et al., *Apolipoproteins B, (a), and E accumulate in the morphologically early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1996. **16**(4): p. 523-32.
29. Olsson, M., et al., *Accumulation of T lymphocytes and expression of interleukin-2 receptors in nonrheumatic stenotic aortic valves.* J Am Coll Cardiol, 1994. **23**(5): p. 1162-70.
30. Wierzbicki, A. and C. Shetty, *Aortic stenosis: an atherosclerotic disease?* J Heart Valve Dis, 1999. **8**(4): p. 416-23.
31. Davies, P.F. and S.C. Tripathi, *Mechanical stress mechanisms and the cell. An endothelial paradigm.* Circ Res, 1993. **72**(2): p. 239-45.
32. Kwak, B.R., et al., *Biomechanical factors in atherosclerosis: mechanisms and clinical implications.* Eur Heart J, 2014. **35**(43): p. 3013-20, 3020a-3020d.
33. Tricot, O., et al., *Relation between endothelial cell apoptosis and blood flow direction in human atherosclerotic plaques.* Circulation, 2000. **101**(21): p. 2450-3.
34. Li, Y.S., J.H. Haga, and S. Chien, *Molecular basis of the effects of shear stress on vascular endothelial cells.* J Biomech, 2005. **38**(10): p. 1949-71.
35. Yamawaki, H., et al., *Fluid shear stress inhibits vascular inflammation by decreasing thioredoxin-interacting protein in endothelial cells.* J Clin Invest, 2005. **115**(3): p. 733-8.
36. Pyke, K.E. and M.E. Tschakovsky, *The relationship between shear stress and flow-mediated dilatation: implications for the assessment of endothelial function.* J Physiol, 2005. **568**(Pt 2): p. 357-69.
37. Thijssen, D.H., et al., *Does arterial shear explain the magnitude of flow-mediated dilation?: a comparison between young and older humans.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009. **296**(1): p. H57-64.
38. Moncada, S., R.M. Palmer, and E.A. Higgs, *Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology.* Pharmacol Rev, 1991. **43**(2): p. 109-42.
39. Verma, S., M.R. Buchanan, and T.J. Anderson, *Endothelial function testing as a biomarker of vascular disease.* Circulation, 2003. **108**(17): p. 2054-9.

40. Corson, M.A., et al., *Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress.* Circ Res, 1996. **79**(5): p. 984-91.
41. Ziegler, T., et al., *Nitric oxide synthase expression in endothelial cells exposed to mechanical forces.* Hypertension, 1998. **32**(2): p. 351-5.
42. Malek, A.M., S.L. Alper, and S. Izumo, *Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis.* JAMA, 1999. **282**(21): p. 2035-42.
43. Mendelsohn, M.E., et al., *Inhibition of fibrinogen binding to human platelets by S-nitroso-N-acetylcysteine.* J Biol Chem, 1990. **265**(31): p. 19028-34.
44. Garg, U.C. and A. Hassid, *Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells.* J Clin Invest, 1989. **83**(5): p. 1774-7.
45. Li, H. and U. Forstermann, *Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease.* J Pathol, 2000. **190**(3): p. 244-54.
46. Goligorsky, M.S., et al., *A pivotal role of nitric oxide in endothelial cell dysfunction.* Acta Physiol Scand, 2000. **168**(1): p. 33-40.
47. Niu, X.F., C.W. Smith, and P. Kubes, *Intracellular oxidative stress induced by nitric oxide synthesis inhibition increases endothelial cell adhesion to neutrophils.* Circ Res, 1994. **74**(6): p. 1133-40.
48. Cai, H. and D.G. Harrison, *Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress.* Circ Res, 2000. **87**(10): p. 840-4.
49. Manganaro, A., et al., *Endothelial Dysfunction in Patients With Coronary Artery Disease: Insights From a Flow-Mediated Dilation Study.* Clin Appl Thromb Hemost, 2014. **20**(6): p. 583-588.
50. Brunner, H., et al., *Endothelial function and dysfunction. Part II: Association with cardiovascular risk factors and diseases. A statement by the Working Group on Endothelins and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension.* J Hypertens, 2005. **23**(2): p. 233-46.
51. Munzel, T., et al., *Pathophysiology, diagnosis and prognostic implications of endothelial dysfunction.* Ann Med, 2008. **40**(3): p. 180-96.
52. Keymel, S., et al., *Characterization of macro-and microvascular function and structure in patients with type 2 diabetes mellitus.* Am J Cardiovasc Dis, 2011. **1**(1): p. 68-75.
53. Zand, T., et al., *Endothelial adaptations in aortic stenosis. Correlation with flow parameters.* Am J Pathol, 1988. **133**(2): p. 407-18.
54. Irace, C., et al., *Arterial remodeling of the common carotid artery after aortic valve replacement in patients with aortic stenosis.* Stroke, 2002. **33**(10): p. 2446-50.
55. Poggianti, E., et al., *Aortic valve sclerosis is associated with systemic endothelial dysfunction.* J Am Coll Cardiol, 2003. **41**(1): p. 136-41.
56. Schumm, J., et al., *In patients with aortic stenosis increased flow-mediated dilation is independently associated with higher peak jet velocity and lower asymmetric dimethylarginine levels.* Am Heart J, 2011. **161**(5): p. 893-9.
57. Ross, R., *The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s.* Nature, 1993. **362**(6423): p. 801-9.
58. Woywodt, A., et al., *Circulating endothelial cells: life, death, detachment and repair of the endothelial cell layer.* Nephrol Dial Transplant, 2002. **17**(10): p. 1728-30.
59. Rautou, P.E., et al., *Microparticles, vascular function, and atherothrombosis.* Circ Res, 2011. **109**(5): p. 593-606.
60. Dignat-George, F. and C.M. Boulanger, *The many faces of endothelial microparticles.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. **31**(1): p. 27-33.

61. Amabile, N., et al., *Microparticles: key protagonists in cardiovascular disorders.* Semin Thromb Hemost, 2010. **36**(8): p. 907-16.
62. Burnier, L., et al., *Cell-derived microparticles in haemostasis and vascular medicine.* Thromb Haemost, 2009. **101**(3): p. 439-51.
63. VanWijk, M.J., et al., *Microparticles in cardiovascular diseases.* Cardiovasc Res, 2003. **59**(2): p. 277-87.
64. Reininger, A.J., et al., *Mechanism of platelet adhesion to von Willebrand factor and microparticle formation under high shear stress.* Blood, 2006. **107**(9): p. 3537-45.
65. Piccin, A., W.G. Murphy, and O.P. Smith, *Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications.* Blood Rev, 2007. **21**(3): p. 157-71.
66. Zwaal, R.F. and A.J. Schroit, *Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells.* Blood, 1997. **89**(4): p. 1121-32.
67. Horstman, L.L., et al., *New horizons in the analysis of circulating cell-derived microparticles.* Keio J Med, 2004. **53**(4): p. 210-30.
68. Hugel, B., et al., *Membrane microparticles: two sides of the coin.* Physiology (Bethesda), 2005. **20**: p. 22-7.
69. Horn, P., et al., *Circulating microparticles carry a functional endothelial nitric oxide synthase that is decreased in patients with endothelial dysfunction.* J Am Heart Assoc, 2013. **2**(1): p. e003764.
70. Berckmans, R.J., et al., *Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation.* Thromb Haemost, 2001. **85**(4): p. 639-46.
71. Diamant, M., et al., *Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease?* Eur J Clin Invest, 2004. **34**(6): p. 392-401.
72. Nomura, S., Y. Ozaki, and Y. Ikeda, *Function and role of microparticles in various clinical settings.* Thromb Res, 2008. **123**(1): p. 8-23.
73. Koga, H., et al., *Elevated levels of VE-cadherin-positive endothelial microparticles in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease.* J Am Coll Cardiol, 2005. **45**(10): p. 1622-30.
74. Preston, R.A., et al., *Effects of severe hypertension on endothelial and platelet microparticles.* Hypertension, 2003. **41**(2): p. 211-7.
75. Boulanger, C.M., et al., *Circulating microparticles from patients with myocardial infarction cause endothelial dysfunction.* Circulation, 2001. **104**(22): p. 2649-52.
76. Amabile, N., et al., *Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure.* J Am Soc Nephrol, 2005. **16**(11): p. 3381-8.
77. Feng, B., et al., *Circulating level of microparticles and their correlation with arterial elasticity and endothelium-dependent dilation in patients with type 2 diabetes mellitus.* Atherosclerosis, 2010. **208**(1): p. 264-9.
78. Bulut, D., et al., *Circulating endothelial microparticles correlate inversely with endothelial function in patients with ischemic left ventricular dysfunction.* J Card Fail, 2008. **14**(4): p. 336-40.
79. Esposito, K., et al., *Endothelial microparticles correlate with endothelial dysfunction in obese women.* J Clin Endocrinol Metab, 2006. **91**(9): p. 3676-9.
80. Dimmeler, S., et al., *Shear stress inhibits apoptosis of human endothelial cells.* FEBS Lett, 1996. **399**(1-2): p. 71-4.
81. Boulanger, C.M., et al., *In vivo shear stress determines circulating levels of endothelial microparticles in end-stage renal disease.* Hypertension, 2007. **49**(4): p. 902-8.
82. Diehl, P., et al., *Increased levels of circulating microparticles in patients with severe aortic valve stenosis.* Thromb Haemost, 2008. **99**(4): p. 711-9.

83. Sinning, J.M., et al., *Circulating CD31+/Annexin V+ microparticles correlate with cardiovascular outcomes.* Eur Heart J, 2011. **32**(16): p. 2034-41.
84. Lee, S.T., et al., *Circulating CD62E+ microparticles and cardiovascular outcomes.* PLoS One, 2012. **7**(4): p. e35713.
85. Amabile, N., et al., *Predictive value of circulating endothelial microparticles for cardiovascular mortality in end-stage renal failure: a pilot study.* Nephrol Dial Transplant, 2012. **27**(5): p. 1873-80.
86. Mause, S.F. and C. Weber, *Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange.* Circ Res, 2010. **107**(9): p. 1047-57.
87. Hunter, M.P., et al., *Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles.* PLoS One, 2008. **3**(11): p. e3694.
88. Hargett, L.A. and N.N. Bauer, *On the origin of microparticles: From "platelet dust" to mediators of intercellular communication.* Pulm Circ, 2013. **3**(2): p. 329-40.
89. Deregibus, M.C., et al., *Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA.* Blood, 2007. **110**(7): p. 2440-8.
90. Soleti, R., et al., *Microparticles harboring Sonic Hedgehog promote angiogenesis through the upregulation of adhesion proteins and proangiogenic factors.* Carcinogenesis, 2009. **30**(4): p. 580-8.
91. Morel, O., et al., *Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation?* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(12): p. 2594-604.
92. Combes, V., et al., *In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant.* J Clin Invest, 1999. **104**(1): p. 93-102.
93. Abid Hussein, M.N., et al., *Phospholipid composition of in vitro endothelial microparticles and their in vivo thrombogenic properties.* Thromb Res, 2008. **121**(6): p. 865-71.
94. Bridgewater, B., et al., *The 4th European Association for Cardio-Thoracic Surgery adult cardiac surgery database report.* Interact Cardiovasc Thorac Surg, 2011. **12**(1): p. 4-5.
95. Vahanian, A., et al., *Guidelines on the management of valvular heart disease (version 2012): the Joint Task Force on the Management of Valvular Heart Disease of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS).* Eur J Cardiothorac Surg, 2012. **42**(4): p. S1-44.
96. O'Brien, S.M., et al., *The Society of Thoracic Surgeons 2008 cardiac surgery risk models: part 2--isolated valve surgery.* Ann Thorac Surg, 2009. **88**(1 Suppl): p. S23-42.
97. Brennan, J.M., et al., *Long-term survival after aortic valve replacement among high-risk elderly patients in the United States: insights from the Society of Thoracic Surgeons Adult Cardiac Surgery Database, 1991 to 2007.* Circulation, 2012. **126**(13): p. 1621-9.
98. Kvidal, P., et al., *Observed and relative survival after aortic valve replacement.* J Am Coll Cardiol, 2000. **35**(3): p. 747-56.
99. Cribier, A., et al., *Percutaneous transcatheter implantation of an aortic valve prosthesis for calcific aortic stenosis: first human case description.* Circulation, 2002. **106**(24): p. 3006-8.
100. Eggebrecht, H. and R.H. Mehta, *Transcatheter aortic valve implantation (TAVI) in Germany 2008-2014: on its way to standard therapy for aortic valve stenosis in the elderly?* EuroIntervention, 2015. **11**(5).

101. Smith, C.R., et al., *Transcatheter versus surgical aortic-valve replacement in high-risk patients.* N Engl J Med, 2011. **364**(23): p. 2187-98.
102. Thomas, M., et al., *One-year outcomes of cohort 1 in the Edwards SAPIEN Aortic Bioprosthesis European Outcome (SOURCE) registry: the European registry of transcatheter aortic valve implantation using the Edwards SAPIEN valve.* Circulation, 2011. **124**(4): p. 425-33.
103. Kodali, S.K., et al., *Two-year outcomes after transcatheter or surgical aortic-valve replacement.* N Engl J Med, 2012. **366**(18): p. 1686-95.
104. Adams, D.H., et al., *Transcatheter aortic-valve replacement with a self-expanding prosthesis.* N Engl J Med, 2014. **370**(19): p. 1790-8.
105. Doebler, K., K. Boukamp, and E.D. Mayer, *Indication and structures and management of transcatheter aortic valve implantation: a review of the literature.* Thorac Cardiovasc Surg, 2012. **60**(5): p. 309-18.
106. Gimbrone, M.A., Jr., et al., *Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis.* Ann N Y Acad Sci, 2000. **902**: p. 230-9; discussion 239-40.
107. Becton, D.a.C., *Introduction to Flow Cytometry, Manual Part Number: 11-11032-01* 2000.
108. Boulanger, C.M., N. Amabile, and A. Tedgui, *Circulating microparticles: a potential prognostic marker for atherosclerotic vascular disease.* Hypertension, 2006. **48**(2): p. 180-6.
109. Takeichi, M., *Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion.* Annu Rev Biochem, 1990. **59**: p. 237-52.
110. Collins, T., et al., *Structure and chromosomal location of the gene for endothelial-leukocyte adhesion molecule 1.* J Biol Chem, 1991. **266**(4): p. 2466-73.
111. Jackson, D.E., *The unfolding tale of PECAM-1.* FEBS Lett, 2003. **540**(1-3): p. 7-14.
112. Bernal-Mizrachi, L., et al., *High levels of circulating endothelial microparticles in patients with acute coronary syndromes.* Am Heart J, 2003. **145**(6): p. 962-70.
113. Poppema, S., et al., *CD45 (leucocyte common antigen) expression in T and B lymphocyte subsets.* Leuk Lymphoma, 1996. **20**(3-4): p. 217-22.
114. Peretz, A., et al., *Flow mediated dilation of the brachial artery: an investigation of methods requiring further standardization.* BMC Cardiovasc Disord, 2007. **7**: p. 11.
115. Corretti, M.C., et al., *Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force.* J Am Coll Cardiol, 2002. **39**(2): p. 257-65.
116. Harris, R.A., et al., *Ultrasound assessment of flow-mediated dilation.* Hypertension, 2010. **55**(5): p. 1075-85.
117. Green, D., *Point: Flow-mediated dilation does reflect nitric oxide-mediated endothelial function.* J Appl Physiol (1985), 2005. **99**(3): p. 1233-4; discussion 1237-8.
118. Joannides, R., et al., *Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo.* Circulation, 1995. **91**(5): p. 1314-9.
119. Padilla, J., et al., *The effect of acute exercise on endothelial function following a high-fat meal.* Eur J Appl Physiol, 2006. **98**(3): p. 256-62.
120. Ghiadoni, L., et al., *Mental stress induces transient endothelial dysfunction in humans.* Circulation, 2000. **102**(20): p. 2473-8.
121. Black, M.A., et al., *Importance of measuring the time course of flow-mediated dilatation in humans.* Hypertension, 2008. **51**(2): p. 203-10.
122. Mancini, G.B., et al., *Validation of an automated method for assessing brachial artery endothelial dysfunction.* Can J Cardiol, 2002. **18**(3): p. 259-62.

123. Preik, M., et al., *Automated ultrasonic measurement of human arteries for the determination of endothelial function.* Ultraschall Med, 2000. **21**(5): p. 195-8.
124. Mitchell, G.F., et al., *Local shear stress and brachial artery flow-mediated dilation: the Framingham Heart Study.* Hypertension, 2004. **44**(2): p. 134-9.
125. Becker, C.R., et al., *[Initial experiences with multi-slice detector spiral CT in diagnosis of arteriosclerosis of coronary vessels].* Radiologe, 2000. **40**(2): p. 118-22.
126. Ohnesorge, B., et al., *Cardiac imaging by means of electrocardiographically gated multisection spiral CT: initial experience.* Radiology, 2000. **217**(2): p. 564-71.
127. Agatston, A.S., et al., *Quantification of coronary artery calcium using ultrafast computed tomography.* J Am Coll Cardiol, 1990. **15**(4): p. 827-32.
128. Melkumyants, A.M., S.A. Balashov, and V.M. Khayutin, *Endothelium dependent control of arterial diameter by blood viscosity.* Cardiovasc Res, 1989. **23**(9): p. 741-7.
129. Pyke, K.E., E.M. Dwyer, and M.E. Tschakovsky, *Impact of controlling shear rate on flow-mediated dilation responses in the brachial artery of humans.* J Appl Physiol (1985), 2004. **97**(2): p. 499-508.
130. Pyke, K.E. and M.E. Tschakovsky, *Peak vs. total reactive hyperemia: which determines the magnitude of flow-mediated dilation?* J Appl Physiol (1985), 2007. **102**(4): p. 1510-9.
131. Joannides, R., et al., *Evaluation of the determinants of flow-mediated radial artery vasodilatation in humans.* Clin Exp Hypertens, 1997. **19**(5-6): p. 813-26.
132. Leeson, P., et al., *Non-invasive measurement of endothelial function: effect on brachial artery dilatation of graded endothelial dependent and independent stimuli.* Heart, 1997. **78**(1): p. 22-7.
133. Yuana, Y., et al., *Atomic force microscopy: a novel approach to the detection of nanosized blood microparticles.* J Thromb Haemost, 2010. **8**(2): p. 315-23.
134. Orozco, A.F. and D.E. Lewis, *Flow cytometric analysis of circulating microparticles in plasma.* Cytometry A, 2010. **77**(6): p. 502-14.
135. Jy, W., et al., *Measuring circulating cell-derived microparticles.* J Thromb Haemost, 2004. **2**(10): p. 1842-51.
136. van Ierssel, S.H., et al., *Flow cytometric detection of endothelial microparticles (EMP): effects of centrifugation and storage alter with the phenotype studied.* Thromb Res, 2010. **125**(4): p. 332-9.
137. Shah, M.D., et al., *Flow cytometric measurement of microparticles: pitfalls and protocol modifications.* Platelets, 2008. **19**(5): p. 365-72.
138. Barteneva, N.S., et al., *Circulating microparticles: square the circle.* BMC Cell Biol, 2013. **14**: p. 23.
139. Jimenez, J.J., et al., *Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis.* Thromb Res, 2003. **109**(4): p. 175-80.
140. Nadaud, S., et al., *Small platelet microparticle levels are increased in pulmonary arterial hypertension.* Eur J Clin Invest, 2013. **43**(1): p. 64-71.
141. Jacobson, R.J., C.E. Rath, and J.K. Perloff, *Intravascular haemolysis and thrombocytopenia in left ventricular outflow obstruction.* Br Heart J, 1973. **35**(8): p. 849-54.
142. Siedlecki, C.A., et al., *Shear-dependent changes in the three-dimensional structure of human von Willebrand factor.* Blood, 1996. **88**(8): p. 2939-50.
143. Levy, G.G., D.G. Motto, and D. Ginsburg, *ADAMTS13 turns 3.* Blood, 2005. **106**(1): p. 11-7.

144. Sadler, J.E., *Aortic stenosis, von Willebrand factor, and bleeding.* N Engl J Med, 2003. **349**(4): p. 323-5.
145. Warkentin, T.E., J.C. Moore, and D.G. Morgan, *Aortic stenosis and bleeding gastrointestinal angiodysplasia: is acquired von Willebrand's disease the link?* Lancet, 1992. **340**(8810): p. 35-7.
146. Weinstein, M., et al., *Changes in von Willebrand factor during cardiac surgery: effect of desmopressin acetate.* Blood, 1988. **71**(6): p. 1648-55.
147. Sangiorgi, G., et al., *Arterial calcification and not lumen stenosis is highly correlated with atherosclerotic plaque burden in humans: a histologic study of 723 coronary artery segments using nondecalcifying methodology.* J Am Coll Cardiol, 1998. **31**(1): p. 126-33.
148. Rumberger, J.A., et al., *Coronary artery calcium area by electron-beam computed tomography and coronary atherosclerotic plaque area. A histopathologic correlative study.* Circulation, 1995. **92**(8): p. 2157-62.
149. Arad, Y., et al., *Coronary calcification, coronary disease risk factors, C-reactive protein, and atherosclerotic cardiovascular disease events: the St. Francis Heart Study.* J Am Coll Cardiol, 2005. **46**(1): p. 158-65.
150. Shaw, L.J., et al., *Prognostic value of cardiac risk factors and coronary artery calcium screening for all-cause mortality.* Radiology, 2003. **228**(3): p. 826-33.
151. Taylor, A.J., et al., *Do conventional risk factors predict subclinical coronary artery disease? Results from the Prospective Army Coronary Calcium Project.* Am Heart J, 2001. **141**(3): p. 463-8.
152. O'Malley, P.G., et al., *Prognostic value of coronary electron-beam computed tomography for coronary heart disease events in asymptomatic populations.* Am J Cardiol, 2000. **85**(8): p. 945-8.
153. Arad, Y., et al., *Prediction of coronary events with electron beam computed tomography.* J Am Coll Cardiol, 2000. **36**(4): p. 1253-60.
154. Mohlenkamp, S., et al., *Prognostic value of extensive coronary calcium quantities in symptomatic males--a 5-year follow-up study.* Eur Heart J, 2003. **24**(9): p. 845-54.
155. Nasir, K., et al., *Coronary artery calcium in relation to initiation and continuation of cardiovascular preventive medications: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA).* Circ Cardiovasc Qual Outcomes, 2010. **3**(3): p. 228-35.
156. Youssef, G. and M.J. Budoff, *Coronary artery calcium scoring, what is answered and what questions remain.* Cardiovasc Diagn Ther, 2012. **2**(2): p. 94-105.
157. Amabile, N., et al., *Association of circulating endothelial microparticles with cardiometabolic risk factors in the Framingham Heart Study.* Eur Heart J, 2014. **35**(42): p. 2972-9.
158. Bernard, S., et al., *Increased levels of endothelial microparticles CD144 (VE-Cadherin) positives in type 2 diabetic patients with coronary noncalcified plaques evaluated by multidetector computed tomography (MDCT).* Atherosclerosis, 2009. **203**(2): p. 429-35.
159. Jayachandran, M., et al., *Characterization of blood borne microparticles as markers of premature coronary calcification in newly menopausal women.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. **295**(3): p. H931-H938.
160. Wang, J.G., E. Aikawa, and M. Aikawa, *Leukocyte-derived microparticles as proinflammatory mediators in atherosclerosis.* J Am Coll Cardiol, 2013. **62**(16): p. 1442-5.
161. Mohler, E.R., et al., *Development and progression of aortic valve stenosis: atherosclerosis risk factors--a causal relationship? A clinical morphologic study.* Clin Cardiol, 1991. **14**(12): p. 995-9.

162. Owens, D.S. and C.M. Otto, *Is it time for a new paradigm in calcific aortic valve disease?* JACC Cardiovasc Imaging, 2009. **2**(8): p. 928-30.
163. Cowell, S.J., et al., *A randomized trial of intensive lipid-lowering therapy in calcific aortic stenosis.* N Engl J Med, 2005. **352**(23): p. 2389-97.
164. Rossebo, A.B., et al., *Intensive lipid lowering with simvastatin and ezetimibe in aortic stenosis.* N Engl J Med, 2008. **359**(13): p. 1343-56.
165. Mohler, E.R., 3rd, et al., *Aortic valve calcium content does not predict aortic valve area.* J Heart Valve Dis, 2006. **15**(3): p. 322-8.
166. Koos, R., et al., *Aortic valve calcification as a marker for aortic stenosis severity: assessment on 16-MDCT.* AJR Am J Roentgenol, 2004. **183**(6): p. 1813-8.
167. Henein, M., et al., *Aortic root, not valve, calcification correlates with coronary artery calcification in patients with severe aortic stenosis: A two-center study.* Atherosclerosis, 2015. **243**(2): p. 631-7.
168. Chenevard, R., et al., *Persistent endothelial dysfunction in calcified aortic stenosis beyond valve replacement surgery.* Heart, 2006. **92**(12): p. 1862-3.
169. Galante, A., et al., *C-reactive protein is increased in patients with degenerative aortic valvular stenosis.* J Am Coll Cardiol, 2001. **38**(4): p. 1078-82.
170. Nemes, A., et al., *Aortic valve replacement for aortic stenosis is associated with improved aortic distensibility at long-term follow-up.* Am Heart J, 2007. **153**(1): p. 147-51.
171. Vion, A.C., et al., *Shear stress regulates endothelial microparticle release.* Circ Res, 2013. **112**(10): p. 1323-33.
172. Horstman, L.L., et al., *Endothelial microparticles as markers of endothelial dysfunction.* Front Biosci, 2004. **9**: p. 1118-35.
173. Werner, N., et al., *Circulating CD31+/annexin V+ apoptotic microparticles correlate with coronary endothelial function in patients with coronary artery disease.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(1): p. 112-6.
174. Brodsky, S.V., et al., *Endothelium-derived microparticles impair endothelial function in vitro.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **286**(5): p. H1910-5.
175. Laursen, J.B., et al., *Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin.* Circulation, 2001. **103**(9): p. 1282-8.
176. Beckman, J.S. and W.H. Koppenol, *Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly.* Am J Physiol, 1996. **271**(5 Pt 1): p. C1424-37.
177. Shahin, Y., et al., *Angiotensin converting enzyme inhibitors effect on endothelial dysfunction: a meta-analysis of randomised controlled trials.* Atherosclerosis, 2011. **216**(1): p. 7-16.
178. Zhang, L., et al., *Meta-analysis of the effects of statin therapy on endothelial function in patients with diabetes mellitus.* Atherosclerosis, 2012. **223**(1): p. 78-85.
179. Pasini, A.F., et al., *Nebivolol treatment reduces serum levels of asymmetric dimethylarginine and improves endothelial dysfunction in essential hypertensive patients.* Am J Hypertens, 2008. **21**(11): p. 1251-7.
180. Ryu, J.H. and S.J. Kim, *Clopidogrel effectively suppresses endothelial microparticle generation induced by indoxyl sulfate via inhibition of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway.* Blood Purif, 2011. **32**(3): p. 186-94.
181. Warnholtz, A., et al., *A single loading dose of clopidogrel causes dose-dependent improvement of endothelial dysfunction in patients with stable coronary artery disease: results of a double-blind, randomized study.* Atherosclerosis, 2008. **196**(2): p. 689-95.

182. Hamilos, M., et al., *Relationship between peripheral arterial reactive hyperemia and residual platelet reactivity after 600 mg clopidogrel.* J Thromb Thrombolysis, 2011. **32**(1): p. 64-71.
183. Franca, C.N., et al., *Endothelial progenitor cell mobilization and platelet microparticle release are influenced by clopidogrel plasma levels in stable coronary artery disease.* Circ J, 2012. **76**(3): p. 729-36.
184. Ostad, M.A., et al., *Lack of evidence for pleiotropic effects of clopidogrel on endothelial function and inflammation in patients with stable coronary artery disease: results of the double-blind, randomized CASSANDRA study.* Clin Res Cardiol, 2011. **100**(1): p. 29-36.

Danksagung

Ich danke Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Malte Kelm, Direktor der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie des Universitätsklinikum Düsseldorf, für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit selbstständiges wissenschaftliches Arbeiten zu erlernen.

Mein besonderer Dank gilt meinem Arbeitsgruppenleiter und Betreuer, Herrn Privatdozent Dr. med. Ralf Westenfeld. Vor allem möchte ich mich für seine uneingeschränkten Bemühungen und seine Hilfe bei theoretischen und praktischen Problemen bedanken. Seine Begeisterung für die Forschung und sein wissenschaftliches Arbeiten werden mir immer Vorbild sein.

Herrn Dr. med. Patrick Horn möchte ich für die hervorragende Betreuung danken. Seine ständige Diskussionsbereitschaft und konstruktive Kritik bei der Planung und Durchführung der Experimente sowie Korrektur der vorliegenden Arbeit haben meine Arbeit sowie Denkweise sehr geprägt. Er war mir ein freundschaftlicher und kompetenter Ansprechpartner und stand mir jederzeit bei der Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit hilfreich zur Seite.

Ebenso danke ich Herrn Privatdozent Dr. med. Christian Buchbender für seine gutachterliche Tätigkeit und die Teilhabe an der Promotionskommission.

Ein weiterer Dank geht an Herrn Privatdozent Dr. med. Amin Polzin für die Teilhabe an der Promotionskommission.

Bei allen Mitarbeitern des kardiologischen Labors möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

Nicht genug danken kann ich meiner Großmutter, meinen Eltern, meinen Geschwistern, meinen verstorbenen Großeltern und Großvater, denn ihre liebevolle Unterstützung hat mir mein Studium, diese Promotion und vieles mehr erst ermöglicht. Ihnen ist diese Arbeit in Liebe und Dankbarkeit gewidmet.

Eidesstaatliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Daniel William Stern