

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

**Einfluss von Blutdruck induziertem und mechanischem Endothelschaden
auf die Endothelfunktion**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Maximilian Baaken

2018

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med Christian Heiß

Zweitgutachterin: Prof. Dr. med. Barbara Hoffmann

Meinen Eltern

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Originalartikel:

Roberto Sansone, Maximilian Baaken, Patrick Horn, Dominik Schuler, Ralf Westenfeld, Nicolas Amabile, Malte Kelm, Christian Heiss

„Release of endothelial microparticles in patients with arterial hypertension, hypertensive emergencies and catheter- related injury“

Artherosclerosis – published 12. April 2018, 273:67-74

I. Zusammenfassung

Die arterielle Hypertonie stellt einen zentralen Risikofaktor für das Auftreten von Arteriosklerose dar, welche im großen Maße verantwortlich ist für das Auftreten von kardiovaskulären Erkrankungen und Todesfällen. Deshalb ist ein genaues Verständnis der Auswirkungen auf das gesamte Gefäßsystem von hoher Bedeutung und Gegenstand aktueller Forschungsprojekte.

Die endotheliale Dysfunktion ist pathophysiologisch der wichtigste Faktor bei der Entstehung der Arteriosklerose. Die Rolle endothelialer Mikropartikel bei arterieller Hypertonie und endothelialer Dysfunktion ist bisher wenig beschrieben und verstanden.

Die übergeordnete Hypothese dieser Arbeit ist, dass arterielle Hypertonie über einen mechanischen Endothelschaden Einfluss auf die Endothelfunktion besitzt. Daher wurden folgende spezifischen Ziele formuliert:

(1) Charakterisierung der Gefäßfunktion und Mikropartikel auf allen Ebenen des Herzkreislaufsystems im Rahmen der arteriellen Hypertonie, sowie manifester koronarer Herzkrankheit. (2) Erfassung des Einflusses von akuter Blutdruckentgleisung auf die Endothelfunktion und Mikropartikelfreisetzung. (3) Untersuchung der Auswirkungen eines mechanischen Endothelschadens während transfemorale Kathetereingriffen auf die Mikropartikelfreisetzung und auf die Endothelfunktion der Brachialarterie. Dabei erfolgte zunächst in mehreren klinischen Studien die Erfassung der Gefäßfunktion im gesamten Herzkreislaufsystem bei Patienten mit arterieller Hypertonie, koronarer Herzerkrankung, sowie gesunden Probanden. Hier konnte eine Assoziation der arteriellen Hypertonie zur endothelialen Dysfunktion, gemessen als flussabhängige Dilatation, sowie eine gestörte kutane Mikrozirkulation aufgezeigt werden. Weiterhin konnte eine Erhöhung von endothelialen Mikropartikeln im Rahmen der arteriellen Hypertonie gezeigt werden. Hierbei bestand jederzeit eine inverse Korrelation der Mikropartikelkonzentration zur flussabhängigen Dilatation, welche sowohl bei stabiler arterieller Hypertonie, als auch im Rahmen der akuten hypertensiven Entgleisung bewiesen werden konnte. Da auch im Rahmen einer mechanischen Intervention durch eine Herzkatheteruntersuchung erhöhte Mikropartikelkonzentrationen mit einer inversen Korrelation zur Endothelfunktion gezeigt werden konnten, legen unsere Ergebnisse nahe, dass mechanischer Schaden und eine Mikropartikelerhöhung einen wesentlicher Faktor zur Entstehung einer endothelialen Dysfunktion darstellt.

Abschließend zeigen die Daten, dass arterielle Hypertonie mit einer verminderten Gefäßfunktion auf allen Ebenen des Herzkreislaufsystems einhergeht. Zusätzlich zeigen die Daten eine erhöhte Mikropartikelkonzentration im Rahmen der arteriellen Hypertonie, welche invers mit der flussvermittelten Dilatation einhergeht. Die Daten legen dabei nahe, dass dies mit mechanischen Endothelschaden und fehlender Protektion durch verminderten Wand Shear Stress assoziiert ist. Inwieweit Mikropartikel nicht nur als Marker, sondern auch als Effektor der endothelialen Dysfunktion dienen ist nicht abschließend geklärt und Gegenstand weiterer Forschung. Hier können sich weitere diagnostische und therapeutische Ansätze ergeben.

II. Summary

Arterial hypertension is a major risk factor for the occurrence of arteriosclerosis, which is largely responsible for the incidence of cardiovascular disease and death. Therefore, an accurate understanding of its effects on the entire vascular system is of great importance and is the subject of current research projects.

Endothelial dysfunction is pathophysiologically the most important factor in the development of arteriosclerosis. The role of endothelial microparticles in arterial hypertension and endothelial dysfunction is poorly described and understood.

The overall hypothesis of this work is that arterial hypertension has an effect on endothelial function through mechanical endothelial damage. Therefore, the following specific goals were formulated:

(1) Characterization of vascular function and microparticles at all levels of the cardiovascular system in the context of arterial hypertension, as well as in manifest coronary heart disease. (2) Assessment of the effect of acute hypertension on endothelial function and microparticle release. (3) Investigation of the effects of mechanical endothelial damage during transfemoral catheter intervention on microparticle release and brachial artery endothelial function.

Therefore we performed multiple clinical studies in order to identify the vascular function throughout the cardiovascular system in patients with arterial hypertension, coronary artery disease, and healthy volunteers. Here an association of the arterial hypertension to the endothelial dysfunction, measured as a flow-mediated dilation, as well as a disturbed cutaneous microcirculation could be shown. Furthermore, an increase of endothelial microparticles in the context of arterial hypertension could be shown. There was always an inverse correlation of the microparticle concentration with the flow-mediated dilation, which could be proved both, in stable arterial hypertension and in the context of acute hypertensive crisis. Since increased microparticle concentrations with an inverse correlation to endothelial function could also be demonstrated in the context of a mechanical intervention through a cardiac catheterization, our results suggest that mechanical damage and a microparticle increase is a major factor in the development of endothelial dysfunction.

In conclusion, the data show that arterial hypertension is associated with reduced vascular function at all levels of the cardiovascular system. In addition, the data show an increased microparticle concentration in the context of arterial hypertension, which is inversely associated with flow-mediated dilation. The data suggest that this is associated with mechanical endothelial damage and lack of protection due to decreased wall shear stress. Whether microparticles serve not only as markers of endothelial dysfunction but also represent an effector of endothelial dysfunction is not conclusively explained and is the subject of further research. Here further diagnostic and therapeutic approaches may result.

III. Abkürzungsverzeichnis

AIX	Augmentationsindex
AU	arbitrary units
AUC	Area under the curve
AugP	Augmentationsdruck
CD	cluster of differentiation
CI	Herzindex (Cardiac index)
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
EDRF	endothelium derived relaxing factor
FDC	relative Diameteränderung
FMD	flow mediated dilation
FVR	flow velocity reserve
FACS	fluorescence activated cell sorting
GTP	Guanosintriphosphat
HZV	Herzzeitvolumen
ICAM	intercellular adhesion molecule- 1
KHK	koronare Herzerkrankung
LDL	low density Lipoprotein
MCP-1	macrophage chemoattractant peptide
MP	Mikropartikel
MW	Mittelwert
NO	Stickstoffmonoxid
NSTEMI	Nicht-ST- Hebungsinfarkt
PFP	plättchenfreies Plasma
PP	Blutdruckamplitude (Pulse pressure)
PRP	plättchenreiches Plasma
PVW	Pulswellengeschwindigkeit
PW	Pulswelle

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Klinische Studie I (Querschnittstudie)	11
Abb. 2: Klinische Studie II (Einfluss akuter Blutdruckänderung)	12
Abb. 3: Klinische Studie III (Katheterassoziierter Gefäßschaden)	13
Abb. 4: Endotheliale Funktion in klinischer Studie I (MW ± SD)	24
Abb. 5: Endotheliale Mikropartikelfreisetzung in Studie I (ev/μl) (MW ± SD)	27
Abb. 6: Nicht endotheliale Mikropartikelfreisetzung in Studie I (ev/μl) (MW ± SD)	28
Abb. 7: Hämodynamik Studie I (MW ± SD)	30
Abb. 8: Kutane Mikrozirkulation Studie I (MW ± SD)	33
Abb.9: Erythrozytäre Verformbarkeit Studie I (MW ± SD)	36
Abb.10: FMD (%) und Mikropartikel (ev/μl) Studie II (MW ± SD)	38
Abb.11: Abbildung 11: FMD (%) und Mikropartikel (ev/μl) Studie III (MW ± SD)	39

IV. Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Einfluss der arteriellen Hypertonie auf die Endothelfunktion	1
1.2 Endotheliale Dysfunktion	2
1.3 Bedeutung der endothelialen Dysfunktion	3
1.4 Physiologie der Mikropartikel	5
1.5.Hypothese und spezifische Ziele	7
2. Material und Methoden	8
2.1. Studienkollektiv	8
2.2. Studienprotokoll	9
2.2.1 Bestimmung der Endothelfunktion mittels FMD	13
2.2.2 Untersuchung der kutanen Mikrozirkulation	15
2.2.3 Blutdruckmessungen	16
2.2.4 Pulswellenanalyse	17
2.2.5 Bestimmung der Mikropartikelkonzentration im Plasma	18
2.2.6 Statistische Analysen	21
3. Ergebnisse	22
3.1 Blutdruckassoziierter Einfluss auf die Gefäßfunktion und Mikropartikelfreisetzung	22
3.2 Einfluss von Bluthochdruck auf die kutane Mikrozirkulation	31
3.3.1 Erythrozytäre Verformbarkeit als Determinante der Mikrozirkulation	34
3.3 Effekte von akuten Blutdruckentgleisungen und mechanischen Endothelschaden auf die Gefäßfunktion	36
3.4. Assoziation von mechanischen Endothelschaden und Mikropartikelfreisetzung	40
4. Diskussion	43
4.1 Assoziation von Mikropartikeln und endothelialer Dysfunktion	43
4.2 Assoziation Hypertonie und Endotheliale Dysfunktion	45
4.3 Zusammenhang Makro- und Mikrozirkulation	48
4.4 Assoziation arterieller Hypertonie und Mikropartikel	50
4.5 Einfluss eines interventionellen Gefäßschadens auf die Gefäßfunktion	52
5. Literatur- und Quellenverzeichnis	55
6.Anhang	61

1. Einleitung

1.1 Einfluss der arteriellen Hypertonie auf die Endothelfunktion

Die arterielle Hypertonie, definiert als eine Blutdruckerhöhung über Werte von $\geq 140 / \geq 90$ mmHg, stellt in Deutschland, sowie weltweit eine der häufigsten Erkrankungen dar. So leiden laut Angaben der Gesundheitsberichterstattung des Bundes ca. 32,2% der gesamten Bundesbevölkerung unter einer bekannten arteriellen Hypertonie. Des Weiteren ist die arterielle Hypertonie ein bekannter Risikofaktor für die Entstehung der Arteriosklerose und deren kardiovaskulären Folgeerkrankungen, unter denen die koronare Herzerkrankung als häufigste Todesursache in Deutschland den höchsten Stellenwert einnimmt (1, 2).

Arteriosklerose bezeichnet eine chronische Degeneration der Arterienwände, in der es über eine Bindegewebsproliferation, sowie der Einlagerung von Cholesterin zu einer Verhärtung der Gefäßwand und progressiver Einengung des Lumens kommt. Zu Beginn der Entwicklung einer Arteriosklerose steht dabei eine Verletzung der Gefäßintima. Dies führt zur Proliferation von glatten Muskelzellen, sowie zur Einwanderung von Makrophagen. Diese nehmen in der Folge oxidiertes LDL auf und entwickeln sich zu Schaumzellen, die anschließend eine chronische Entzündungsreaktion auslösen (3). Hieraus resultiert schließlich ein bindegewebsartiger Umbauprozess mit der Entstehung von arteriosklerotischen Plaques. Diese haben prothrombotische Wirkung und führen somit zur weiteren Einengung des Lumens, welches sich in einer Minderversorgung des der Stenose nachgeschalteten Gewebes manifestieren kann. Weiterhin können Plaques auch rupturieren und durch appositionelles Thrombuswachstum akute ischämische Ereignisse auslösen.

Arterielle Hypertonie begünstigt dabei sowohl über humorale- als auch mechanische Faktoren die Entstehung einer Arteriosklerose. Eine wichtige protektive Rolle spielt dabei der laminäre Blutfluss, welcher am Endothel über Scherkräfte an der Gefäßwand pathologischen Umbauprozessen innerhalb des Gefäßes, sowie der Freisetzung von endothelialen Mikropartikeln, entgegen wirken kann (4). Unter anderem durch verminderte Scherkräfte verliert das Gefäß seine physiologische Funktion den Tonus der Gefäßwand adäquat zu modulieren und begünstigt somit wiederum die weitere Entstehung von Arteriosklerose und

arterieller Hypertonie. Diese Fehlfunktion des Gefäßendothels bezeichnet man als endotheliale Dysfunktion.

1.2 Endotheliale Dysfunktion

Das Endothel besitzt als innerste Schicht der Blutgefäße eine zentrale Bedeutung für die Homöostase des gesamten Gefäßsystems. Dabei kann es über die Modulation des Gefäßtonus großen Einfluss auf den Blutdruck und den Blutfluss nehmen. Entgegen früherer Meinungen, in denen das Endothel als eine passive Barriere für den Blutstrom angesehen wurde, weiß man heutzutage, dass das Endothel als hoch spezialisiertes Gewebe in der Lage ist, auf verschiedene chemische, physikalische oder mechanische Einflüsse durch Produktion verschiedener Botenstoffe zu reagieren. Hierdurch kann es durch antiinflammatorische-, antikoagulative- oder profibrinolytische Effekte die Homöostase des Gefäßsystems aufrechterhalten und über eine Ausschüttung von vasokonstriktorisches-, sowie vasodilatatorischen Stoffen den Gefäßtonus regulieren.

Die endotheliale Dysfunktion bezeichnet dabei die inadäquate Gefäßreaktion auf oben genannte Stimuli aufgrund eines Ungleichgewichts von relaxierenden- und vasokonstriktorisches wirkenden Stoffen. Relaxierend wirken dabei beispielsweise Prostacyclin (5), NO oder Hydrogensulfat, im Gegensatz dazu wirken Stoffe wie Thromboxan A₂ oder Endothelin-1 vasokonstriktorisches. Schon 1977 wurde Prostacyclin als ein erster vom Endothel produzierter Botenstoff identifiziert, der zur Gefäßrelaxation beiträgt (6). Bereits kurze Zeit später wurde dann ein bis dahin unbekannter Stoff entdeckt, der einen weitaus größeren Einfluss auf die Gefäßrelaxation zu haben schien. Dieser wurde deshalb zunächst als endothelium derived relaxing factor (EDRF) bezeichnet (7), aber wenig später als Stickstoffmonoxid (NO) identifiziert. Stickstoffmonoxid stellt bis heute den Schlüsselfaktor für die Gefäßrelaxation dar und ist daher großer Bestandteil heutiger Forschung.

Stickstoffmonoxid kann von Endothelzellen über die konstitutional exprimierte endotheliale NO Synthase (eNOS) selbst synthetisiert werden. Die eNOS ist neben nNOS (neuronal), iNOS (induzierbar), mtNOS (mitochondrial) eine von vier NO Synthesen im Körper. Auf molekularer Ebene kommt es über posttranslationale Veränderung, wie Phosphorylierung der eNOS, zur vermehrten

NO Produktion im Endothel. Dieses NO kann zur glatten Muskulatur der Gefäßwand diffundieren und hier an die Guanylatcyclase binden. Durch deren Aktivierung kommt es zur Produktion von cGMP und im Anschluss zur Aktivierung der Proteinkinase G. Über diese Aktivierung kommt es schließlich zu einer Senkung des intrazellulären Ca^{2+} und zur Gefäßrelaxation (8).

Eine Minderverfügbarkeit von NO stellt eines der Kerncharakteristika der endothelialen Dysfunktion dar. Weiterhin führt diese auch zu arterieller Hypertonie und treibt darüber hinaus möglicherweise die endotheliale Dysfunktion über mechanische Belastung des Endothels weiter an. Generell ist eine multifaktorielle Genese als Ursache der endothelialen Dysfunktion anzunehmen. Hier spielen viele Einflüsse eine Rolle, vor allem das Alter, sowie andere Individuum spezifische Risikofaktoren wie Hypercholesterinämie, Diabetes Mellitus, Nikotinkonsum, Homocysteinämie oder angeborene Herzfehler. Viele Autoren gehen davon aus, dass alle Risikofaktoren zu einem erhöhten oxidativen Stress führen, der sowohl zu einer Senkung der Synthese von Stickstoffmonoxid, als auch zu einer schnelleren Inaktivierung von NO führen kann (9, 10).

1.3 Bedeutung der endothelialen Dysfunktion

Die endotheliale Dysfunktion ist nach heutigem Stand der Forschung mit vielen bedeutsamen Krankheiten assoziiert und oftmals zentraler Bestandteil der Pathogenese. Es konnte gezeigt werden, dass eine endotheliale Dysfunktion der kleinen Arterien bei ca. 60% der Patienten mit Hypertonie Grad 1 vorliegt (11). Auch bei zahlreichen weiteren Erkrankungen hoher Prävalenz, wie beispielsweise Diabetes Typ I und II (12), chronischer Herzinsuffizienz (13), chronischer Niereninsuffizienz (14), koronarer Herzkrankheit (15), metabolischen Syndroms und Dyslipidämie (16) konnte eine endotheliale Dysfunktion nachgewiesen werden. Hierbei kann die endotheliale Dysfunktion zum einen eine Folge der genannten Erkrankungen darstellen, denn all diese Erkrankungen gehen mit einem erhöhten oxidativen Stress einher, der die Bioverfügbarkeit von NO nachhaltig senkt und somit eine endotheliale Dysfunktion begründen kann. Zum anderen kann die endotheliale Dysfunktion aber auch die Entstehung weiterer Folgeerkrankungen begünstigen (17). Beispielsweise resultiert aus einer verminderten Gefäßrelaxation ein erhöhter peripherer Widerstand, welcher eine

Hypertonie auslösen oder verschlechtern kann. Die größte pathophysiologische Bedeutung nimmt die endotheliale Dysfunktion aber in der Entstehung und Beschleunigung der Arteriosklerose ein (18, 19). So führt eine verminderte Bioverfügbarkeit im Rahmen einer endothelialen Dysfunktion zu einer erhöhten Expression von Adhäsionsmolekülen, wie vascular adhesion molecule1, E- und P-Selectin (20) sowie intracellular adhesion molecule 1 & monocyte chemoattractant protein 1. In Folge dessen kommt es zur verstärkten Bindung und Aktivierung von Monozyten, Lymphozyten, sowie Makrophagen, die über die Phagozytose von oxidiertem LDL einen entscheidenden Beitrag zur Entstehung der Arteriosklerose leisten (21). Einen Beitrag zu oben genannten Prozessen scheinen auch sogenannte Mikropartikel zu spielen, die im Rahmen der endothelialen Dysfunktion entstehen können und deren pathophysiologische Bedeutung noch weitestgehend unerforscht ist. Des Weiteren geht die endotheliale Dysfunktion auch mit der Produktion von anderen vasokonstriktorisches Stoffen, wie Endothelin-1, Thromboxan A2 und Prostaglandin A2 einher, die zur Entstehung von Hypertonie und Diabetes auch bei gesunden Probanden beitragen können (22).

Weiterhin kommt der endothelialen Dysfunktion auch eine prognostische Bedeutung zu. So ist die endotheliale Dysfunktion mit dem Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen, wie Herzinfarkt, Schlaganfall oder peripheren Embolien assoziiert (19, 23). Dies konnte sowohl für Patienten mit kardialer Vorerkrankungen nachgewiesen werden, als auch für Patienten ohne diese. Unterstützt wird dieser prognostische Wert auch durch die Tatsache, dass eine Behandlung der endothelialen Dysfunktion durch eine antihypertensive Medikation zu einer signifikanten Minderung der Rate kardiovaskulärer Ereignisse geführt hat. Patienten, bei denen die Initiierung der antihypertensiven Therapie auch zu einer verbesserten Endothelfunktion geführt hat, sind diejenigen, die prognostisch auch profitieren (24, 25).

Insgesamt besitzt die endotheliale Dysfunktion also eine hohe Bedeutung bei allen kardiovaskulären Erkrankungen, die in Deutschland und auch weltweit die häufigste Todesursache darstellen und könnte als zentraler Ansatzpunkt einer medikamentösen und sekundär prophylaktischen Therapie dienen.

1.4 Physiologie der Mikropartikel

Mikropartikel sind kleine, intakte Membranvesikel, die eine Größe von ca. 0,2 - 2 µm aufweisen und unterschiedlichen Ursprungs entstammen können. Dabei sind Mikropartikel endothelialer-, leukozytärer- und erythrozytärer Herkunft beschrieben, wobei erythrozytäre Mikropartikel auch kleiner sein können (ca. 0,15 µm) (26). Weiterhin sind auch Plättchenmikropartikel bekannt.

Neben Endothelzellen können auch Hepatozyten, Monozyten und Muskelzellen in den Gefäßen Mikropartikel abgeben (27). Die jeweiligen Mikropartikel unterscheiden sich dabei durch die verschiedene Ausprägung von Oberflächenmarkern und sind somit auch durch Antikörperfärbung detektierbar. Eine genaue Beschreibung der Oberflächenmarker der jeweiligen Entitäten erfolgt später im Teil „Material und Methoden“.

Es gibt zwei verschiedene Stimuli, die zu einer Freisetzung von Mikropartikel führen können: Apoptose und Zellaktivierung. Auf zellulärer Ebene laufen dabei verschiedenste Signalwege ab, die jeweils zu einer Änderung der Konformation verschiedener Membranabschnitte führen. Wichtig zu wissen ist hierfür zunächst einmal, dass sich in einer nicht aktivierten Zelle die Phospholipide in einer klaren Anordnung befinden. So befindet sich Phosphatidylcholin und Sphingomyelin auf der äußeren Membran, während Phosphatidylserin und Phosphatidyletanolamin auf der inneren Membran lokalisiert sind. Diese Anordnung wird unter anderem durch das Enzym Aminophospholipid translocase aufrechterhalten.

Kommt es in der Folge zur Apoptose oder zur Zellaktivierung, steigt die intrazelluläre Ca^{2+} Konzentration stark an, welches verschiedene Effekte auf die fünf für die Mikropartikelfreisetzung relevante Enzyme hat. In einem ersten Schritt werden die Enzyme Gelsolin und Calpain aktiviert. Sie verändern beide die Aktinfilamente im Zytoskelett der Zelle, indem sie vor allem Abschnitte herausschneiden und somit auch Einfluss auf die Struktur der Membran haben. Des Weiteren wird die Aminophospholipid translocase durch Ca^{2+} inhibiert, die Scramblase und die Floppase werden aktiviert. Während die Floppase nach aktuellem Stand noch nicht abschließend verstanden ist, sorgt die Scramblase für die entscheidende Endstrecke der Enzymkaskade und somit für das

entscheidende Merkmal der Mikropartikel: Sie bringt Phosphatidylserin auf die äußere Membran und sorgt somit für eine vielbeschriebene Asymmetrie der Membran (26). Dieses negativ geladene Phosphatidylserin kann durch die Annexin V Färbung nachgewiesen werden.

Eine weitere Möglichkeit der Aktivierung besteht in der Rho-Kinase. Diese kann durch apoptotische Signale aktiviert werden und in Anwesenheit von GTP die Myosin Light Chain Phosphatase aktivieren, welche dann wiederum Einfluss auf die Zytoskelett Organisation nimmt (28). Diesen Vorgang beobachtet man v.a. bei Plättchenmikropartikeln und auch bei den seltenen erythrozytären Mikropartikeln, da diese keinen Zellkern besitzen (27).

Bis zum heutigen Zeitpunkt konnte die genaue Funktion der Mikropartikel nicht abschließend geklärt werden und ist weiterhin Element aktueller Forschung. Bisher konnte gezeigt werden, dass Mikropartikel prokoagulatativ wirken. Dies ist zum einen durch direkte Effekte der Mikropartikel auf Thrombozyten begründet. So stellen Plättchenmikropartikel eine zusätzliche Quelle für Thromboxan A₂ dar und verstärken somit die Plättchenaktivierung und die Gefäßkontraktion (28). Weiterhin haben cholesterinreiche Mikropartikel den Tissue Faktor gebunden, welcher an Plättchen binden kann und diese aktiviert (26). Zum anderen haben Mikropartikel auch direkte Effekte auf die Endothelzellen, sowie deren Funktion in der Hämostase. Mikropartikel fördern die Expression von Adhäsionsmolekülen, wie z.B. ICAM-1 (intercellular adhesion molecule -1), stimulieren Monozyten und die Angiogenese. Dadurch werden Leukozyten länger am Endothel festgehalten und sorgen für zusätzliche Inflammation (26, 27, 29). Auch können Plättchenmikropartikel das Chemokin RANTES (CCL5) an Endothelzellen transferieren, welches ebenfalls Monozyten zur Migration und Adhäsion bringen kann. Es gibt dagegen aber auch andere Hypothesen, in denen Mikropartikel antiinflammatorische Effekte aufweisen können. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass neutrophile Mikropartikel den transformierenden growth factor- β 1 aus Makrophagen erhöhen und dadurch die zelluläre Aktivierung in Makrophagen herunter moduliert wird (27). Insgesamt scheint hier der Ursprung der Mikropartikel einen Einfluss auf deren Funktion zu haben. Nicht zuletzt deshalb wurden bisher nur Hypothesen zur physiologischen Funktion aller Mikropartikel

formuliert. Eine Hypothese besagt dabei, dass Mikropartikel den Ursprungszellen dazu dienen, proapoptische Proteine loszuwerden, um den endgültigen Zelltod zu vermeiden (27) oder auch eine Möglichkeit für die Zellen darstellen, Noxen aus der Zelle auszuschleusen (30). Weiterhin wird den Mikropartikeln eine physiologische Funktion im Bereich der Neovaskularisierung eingeräumt. Der Mechanismus, der dahinter vermutet wird, liegt in einem Proliferationsreiz für Endothelzellen, der durch Bindung von Mikropartikeln, insbesondere durch CD40⁺ Mikropartikeln ausgelöst wird.

1.5.Hypothese und spezifische Ziele

Die übergeordnete Hypothese dieser Arbeit ist, dass arterielle Hypertonie über einen mechanischen Endothelschaden Einfluss auf die Endothelfunktion besitzt. Daher wurden folgende spezifischen Ziele formuliert:

Ziel 1: Charakterisierung der Gefäßfunktion und Mikropartikel auf allen Ebenen des Herzkreislaufsystems im Rahmen der arteriellen Hypertonie, sowie manifester koronarer Herzkrankheit.

Ziel 2: Erfassung des Einflusses von akuter Blutdruckentgleisung auf die Endothelfunktion und Mikropartikelfreisetzung.

Ziel 3: Untersuchung der Auswirkungen eines mechanischen Endothelschadens während transfemorale Kathetereingriffen auf die Mikropartikelfreisetzung und auf die Endothelfunktion der Brachialarterie.

2. Material und Methoden

2.1. Studienkollektiv

Zur Untersuchung der oben genannten Ziele wurden insgesamt 3 klinische Studien durchgeführt. Eine **erste klinische Querschnittsstudie** diente dabei zur Charakterisierung des Endothelschadens-, sowie der Funktion in einem breiten Patientenkollektiv (n=40). Diese setzten sich auf jeweils 11 gesunden Probanden, welche als Kontrollgruppe fungierten, 8 Patienten mit manifester arterieller Hypertonie, 11 Patienten mit manifester koronarer Herzkrankheit, sowie 10 Patienten mit sowohl arterielle Hypertonie als auch koronarer Herzkrankheit im Alter von 55-75 Jahren zusammen, wobei alle Probanden männlich waren. Die Rekrutierung erfolgte dabei über die kardiologische Ambulanz des Universitätsklinikum Düsseldorf und der kardiologischen Stationen.

In einer **zweiten klinischen Studie** im Parallelgruppendesign zur Erfassung des akuten Endothelschadens wurden 24 Patienten mit hypertensiver Entgleisung, NSTEMI oder NSTEMI mit additiver hypertensiven Entgleisung eingeschlossen. Die Rekrutierung erfolgte dabei über unsere Chest Pain Unit, die in der hiesigen Notaufnahme integriert ist.

Eine **dritte klinische Studie** beschäftigte sich mit einem Katheter-induzierten Endothelschaden. Hierzu wurden fünf Patienten, welche eine elektive Herzkatheter Untersuchung durchführen ließen, eingeschlossen. Jeder Patient wurde dabei entsprechend der aktuellen klinischen Leitlinien behandelt und es bestand zu keiner Zeit ein erweiterter Bedarf diagnostischer sowie therapeutischer Maßnahmen aufgrund des Studienprotokolls. Für die durchgeführten Studien wurde von der Ethikkommission das Ethikvotum mit dem Aktenzeichen 3311 vergeben.

Alle gesunden Probanden gaben keine klinischen Symptome einer koronaren Herzkrankheit an und verneinten pektanginöse Beschwerden. Weiterhin wurden auch Nachfragen zum Vorliegen von rezidivierenden Synkopen, Palpitationen oder Claudicatio als Hinweis auf weitere manifeste kardiovaskuläre Erkrankungen verneint. Weiterhin wurden eine arterielle Hypertonie, sowie ein Diabetes mellitus ausgeschlossen und es bestand keine aktuelle medikamentöse Therapie.

Die Diagnose einer vorliegenden arteriellen Hypertonie wurde durch eine 24h Blutdruckmessung einen Tag vor Durchführung der in die Studie eingeschlossenen Untersuchungen gestellt. Dabei wurde nach den Kriterien des Jointed National Committee (22) bei Patienten mit 24h Blutdruckmessungen von >135/ 85 mmHg eine arterielle Hypertonie diagnostiziert. Sekundäre Ursachen für eine arterielle Hypertonie wie Nierenarterienstenose, Hyperaldosteronismus, Hypercortisolismus, Phäochromozytom wurden mit bildgebender Diagnostik oder laborchemisch ausgeschlossen.

Als Einschlusskriterium für Patienten mit koronarer Herzkrankheit galt eine durch eine Koronarangiographie gesicherte hämodynamisch relevante Stenose (>70%) in mindestens einem Koronargefäß.

Eingeschlossene Patienten mit einer hypertensiven Krise wiesen systolische Blutdruckwerten von >180mmHg auf, während NSTEMI Patienten laborchemisch einen erhöhten Troponin T Wert von >14 mg/dl aufwiesen, ohne dabei relevante ST- Strecken Veränderungen im EKG aufzuweisen.

Als Ausschlusskriterien für alle drei genannten Studien galten eine höhergradig eingeschränkte Pumpfunktion (Ejektionsfraktion <35%), sowie relevante Herzrhythmusstörungen und eine akute Entzündung, definiert durch eine CRP Erhöhung. Ebenfalls ausgeschlossen wurden Patienten mit Transaminasen oberhalb des 3-fachen Normwertes, Kreatinin über 1,5 mg/dl, schwerere chronisch obstruktive Lungenerkrankung, Alkohol- oder Drogenabhängigkeit, bekannte HIV-, Hepatitis B, Hepatitis C oder Lues-Infektion.

2.2. Studienprotokoll

Im Rahmen der drei klinischen Studien wurden unterschiedliche Untersuchungen durchgeführt. Allen Studien gemeinsam war die Rekrutierung der Patienten über die kardiologischen Stationen des Universitätsklinikum Düsseldorf. Alle Patienten erhielten zunächst ein Aufklärungsgespräch und gaben ihre Einwilligung zur Teilnahme an der Studie. Anschließend erfolgte eine kurze Anamnese, sowie körperliche Untersuchung.

Patienten, welche an der ersten Querschnittsstudie teilnahmen, bekamen zunächst eine 24h Blutdruckmessung, wodurch sie in die jeweiligen Subpopulationen eingeordnet werden konnten. Am Morgen des Untersuchungstages erfolgte dann eine Blutentnahme, um einerseits die klinischen Routinelaborparameter zu bestimmen, andererseits Probenmaterial für die Messung der zirkulierenden Mikropartikel und der erythrozytären Verformbarkeit zu gewinnen. Unmittelbar nach der Blutentnahme erfolgte eine Ultraschallmessung zur Endothelfunktionsmessung der Arteria brachialis (FMD= flow mediated dilation), sowie Untersuchung der kutanen Mikrozirkulation mittels Laser Doppler. Im Anschluss wurde bei allen Probanden eine Pulswellenanalyse mittels des SphygmoCor® Pulse Wave Velocity System durchgeführt, bei der die Pulswellengeschwindigkeit (PWV), Augmentationsindex (AIX) und zentraler Blutdruck gemessen wurden. PWV und AIX erlauben Rückschlüsse sowohl auf die Gefäßsteifigkeit und auch auf die Augmentation der zentralen Druckpulsquelle. Bei allen Patienten erfolgte zusätzlich bei jeder Untersuchung eine Messung des Blutdruck und Puls.

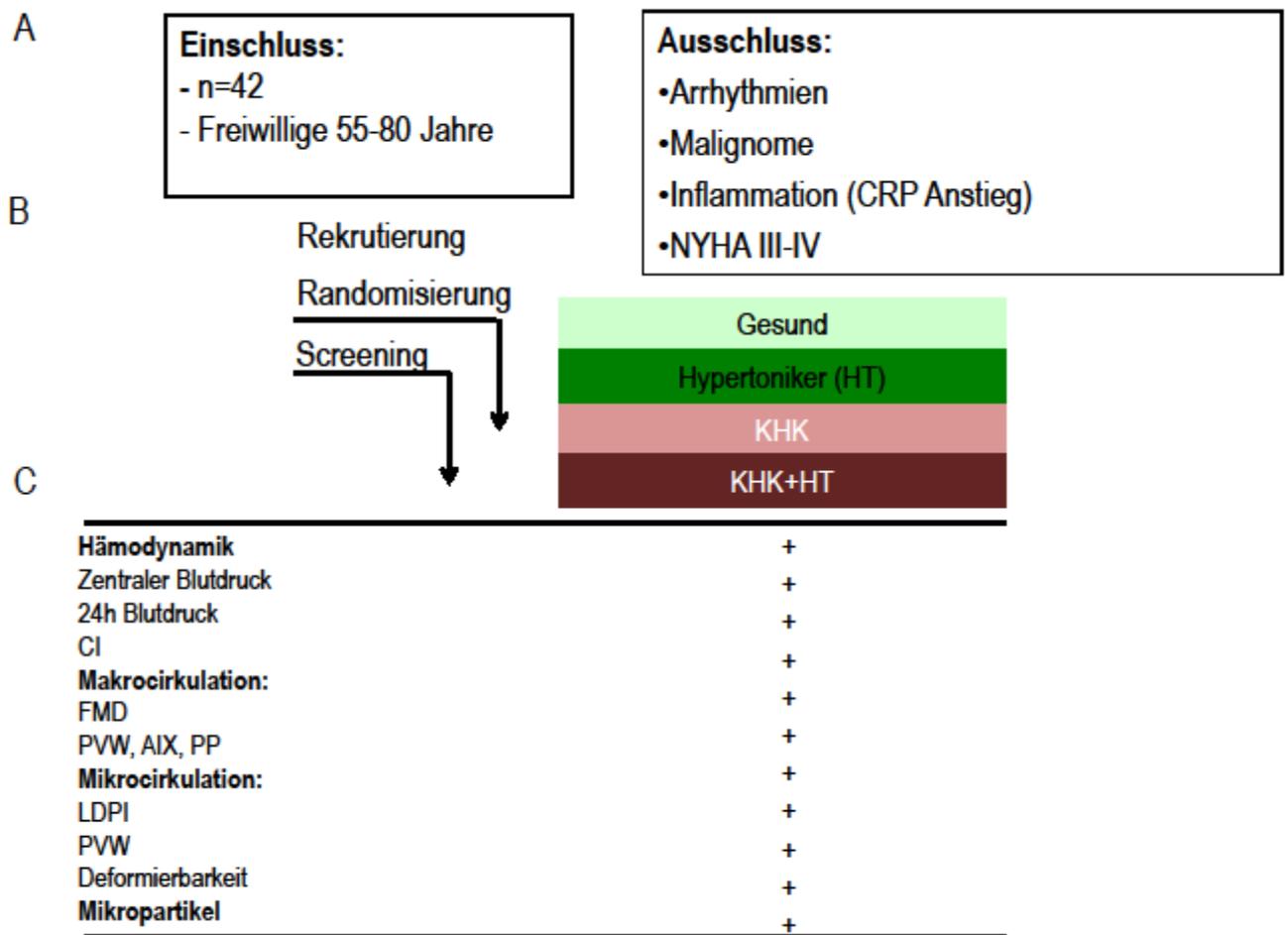


Abb. 1: Klinische Studie I (Querschnittstudie)

Schematische Darstellung des Studienprotokoll. Dargestellt sind in **A** Ein- und Ausschlusskriterien und in **B** Zeitlicher Ablauf mit Einteilung der Gruppen. **C** durchgeführte Untersuchungen

In einer zweiten klinischen Studie wurde bei Patienten mit hypertensiver Krise und NSTEMI der Einfluss akuter Blutdrucksteigerung bzw. Blutdrucksenkung auf Endothelschaden und Endothelfunktion untersucht.

Dabei erfolgten bei den Patienten zunächst zum Zeitpunkt ihrer Einlieferung eine Blutentnahme, welche zur Bestimmung der zirkulierenden Mikropartikeln diente, sowie zusätzlich eine Ultraschalluntersuchung zur Funktionsfähigkeit der Arteria brachialis (FMD). Darüber hinaus wurden Blutdruck und Puls gemessen. Dieses Protokoll wurde dann im Rahmen des Patientenaufenthaltes nach 4 Stunden, 24h, 48h und 72h später wiederholt.

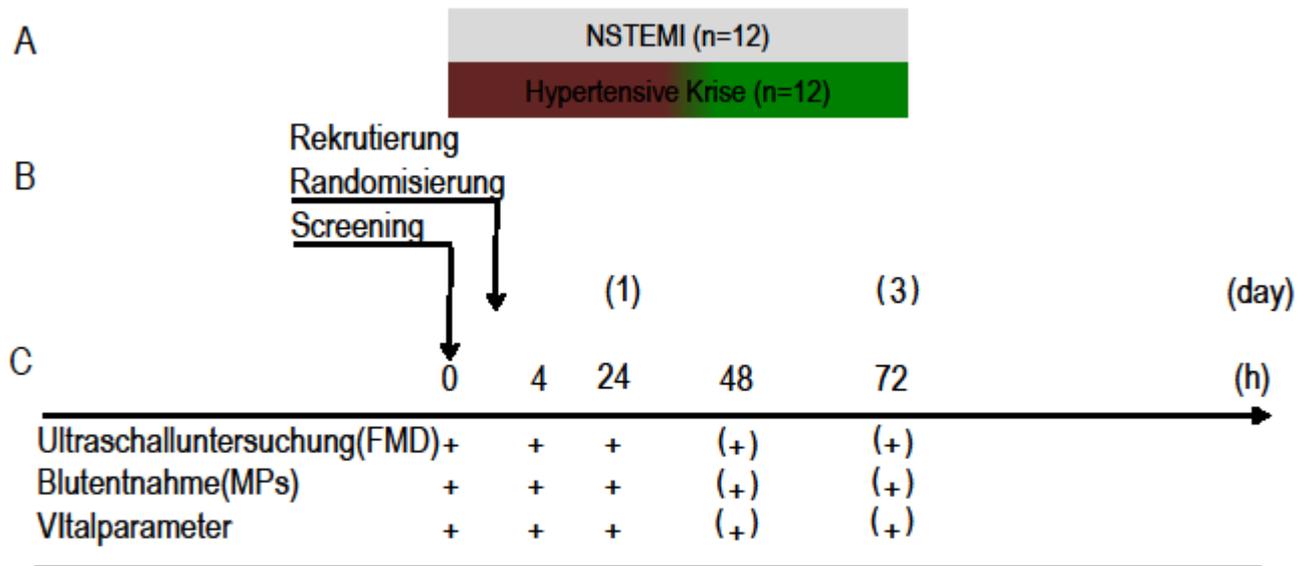


Abb. 2: Klinische Studie II (Einfluss akuter Blutdruckänderung)

Schematische Darstellung des Studienprotokolls der Studie II, welche den Einfluss akuter Blutdruckänderung untersucht. Dargestellt sind in **A** die Studiengruppen, in **B** der Zeitliche Ablauf und in **C** die durchgeführten Untersuchungen zu fixen Zeitpunkten

Eine dritte klinische Studie untersuchte den Einfluss eines durch Katheter ausgelösten Endothelschadens. Hierfür wurden fünf Patienten, welche zu einer elektiven Herzkatheter Untersuchung vorstellig wurden zu insgesamt 4 Zeitpunkten wiederum durch eine Blutentnahme und der Durchführung einer FMD untersucht. Diese Untersuchungen wurden unmittelbar vor der Katheter Untersuchung, sowie 1 h, 4 h und 24 h danach durchgeführt.

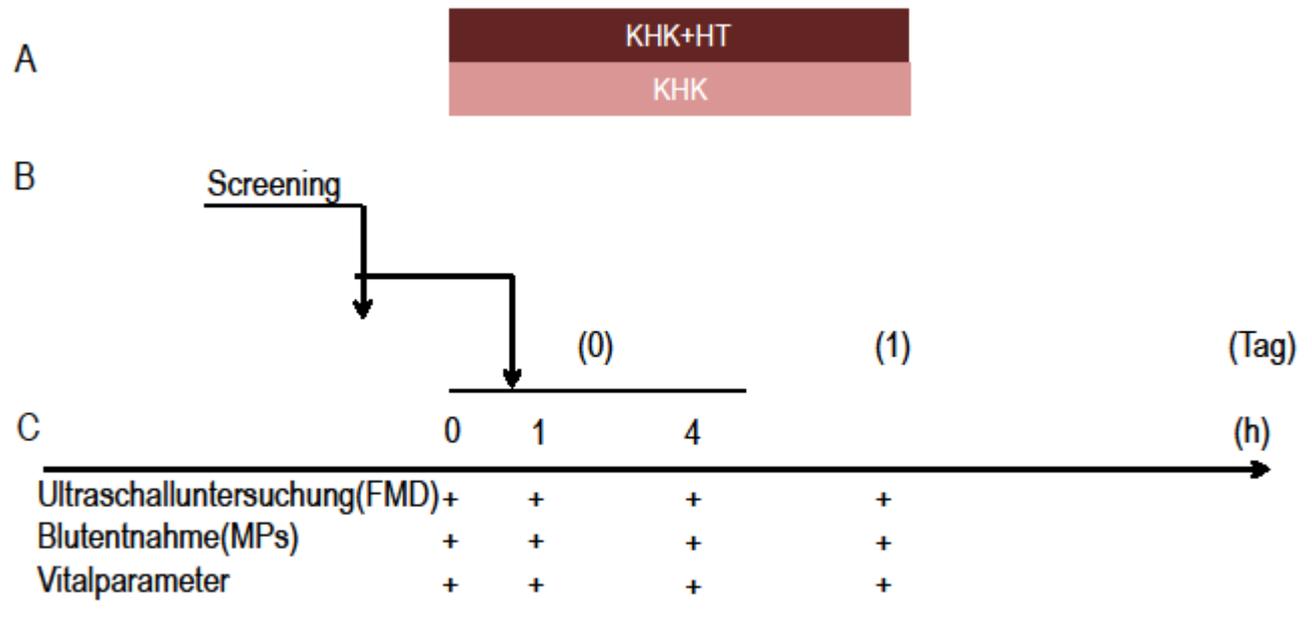


Abb. 3: Klinische Studie III (Katheterassoziierter Gefäßschaden)

Schematische Darstellung des Studienprotokolls der Studie III, welche den katheterassozierten Gefäßschaden untersucht. Dargestellt sind in **A** die Studiengruppen, in **B** der zeitliche Ablauf und in **C** die durchgeführten Untersuchungen zu fixen Zeitpunkten

2.2.1 Bestimmung der Endothelfunktion mittels FMD

Alle eingeschlossenen Studienteilnehmer unterzogen sich einer FMD Messung (flussvermittelte endothelabhängige Dilatation) zur Erfassung der Endothelfunktion. In diesem nicht-invasiven Untersuchungsverfahren wird mittels Ultraschall die Diameterzunahme der Arteria brachialis durch einen gesteigerten Blutfluss bestimmt. Dieser physiologische Effekt beruht auf einer NO vermittelten Gefäßreaktion (31).

Da die FMD durch verschiedene Faktoren, wie Ernährung, körperliche Aktivität, Alkohol, Nahrung oder Kaffee (32, 33) akut beeinflusst werden kann, erfolgten alle Untersuchungen bei nüchternen Probanden bzw. Patienten nach mindestens 12 stündiger Nahrungskarenz und 15 minütiger Akklimatisation im ruhigen abgedunkelten Untersuchungsraum. Die Untersuchungen wurden in einem standardisierten, klimatisierten Raum mit einer Raumtemperatur von 23°C

durchführt. Während der Untersuchungen wurden externe Stimuli wie Radio und Gespräche im Hintergrund vermieden. Alle untersuchten Frauen befanden sich in einem postmenopausalem Alter. Weiterhin wurden Manipulationen am Untersuchungsarm vermieden. Messungen des arteriellen Blutdruckes und der Herzfrequenz sowie die Blutentnahme wurden am kontralateralen Arm durchgeführt.

Die Bestimmung des Gefäßdurchmessers der Arteria brachialis erfolgte in Ruhe knapp proximal der Ellenbeuge anhand eines Längsschnitt. Dieser wurde mit einem 8 MHz Schallkopf (linear-array transducer) des Ultraschallgerätes der Firma GE (GE, Healthcare VIVID i, München, Deutschland) erstellt und diente als Ausgangswert für spätere Untersuchungen. Die Vermessungen erfolgten EKG-gesteuert am Ende der R-Zacke in der Diastole. Daraufhin erfolgte eine Stauung des Unterarmes mittels Blutdruckmanschette (200 mmHg) ca. 2 cm distal der Ellenbeuge für 5 Minuten, um den Blutfluss zu unterbrechen. Die Wahl der Position der Blutdruckmanschette distal der zu untersuchenden Stelle ist von besonderer Bedeutung, da sich nur hier im Gegensatz zu einer proximalen Position die Gefäßantwort durch die Gabe von NO Blockern komplett blockieren lässt (34). Aus der, durch die Stauung induzierten Hypoxie, resultiert in den nachgeschalteten Widerstandsgefäßen eine ischämische Vasodilatation, sowie eine reaktive Flussteigerung in den Leitungsarterien (Arteria brachialis). Dies geht einher mit einer gesteigerten Schubspannung, welche über Veränderungen im Zytoskelett, bzw. der Glykokalix der Endothelzelle zu einer Aktivierung der NO Synthase führt (35). Als Folge dessen zeigt sich eine Vasodilatation der Arteria brachialis. Nach Ablauf der fünf minütigen Stauung erfolgte eine Deflation, sowie Messungen des Gefäßdurchmessers zu den Zeitpunkten 0, 20, 40, 60 und 80 Sekunden danach. Die flussvermittelte Dilatation erreichte dabei ihren Maximalwert bei ca. 60 Sekunden. Das erhobene Bildmaterial wird mittels eines Datenträgers auf den Auswertecomputer transferiert und mittels Software halbautomatisch sowie verblindet analysiert (*Brachial Analyzer, Medical Image Application*, Iowa City, Iowa, USA).

Hierbei erfolgte zunächst die Festlegung der *Region of interest*, eine manuelle Markierung des zu untersuchenden Gefäßabschnittes. Nach Kalibrierung des Systems anhand von festgelegten Maßstäben erfolgte die automatische Detektion

des Gefäßlumens, welches durch farbige Markierungen zwischen Media und Endothel des Gefäßes abgegrenzt und manuell auf die Übereinstimmung des Ultraschallbildes überprüft wurde. Anschließend wurde anhand der R-Zacken des parallel zum Ultraschallbild abgeleiteten EKGs der diastolische Durchmesser des Gefäßes durch Mittelung von 150-300 Messpunkten bestimmt. Die FMD stellte dabei das Verhältnis zwischen dem basalen Gefäßdurchmesser in Ruhe und der maximalen Dilatation nach 5 minütiger Unterarmischämie dar, welche in der Regel 60 Sekunden nach Deflation erreicht wurde.

Zusätzlich zur Bestimmung der FMD wurde parallel die Fließgeschwindigkeit in der Gefäßmitte der Arteria brachialis im PW Doppler Modus ermittelt, um die genaue Schubspannung quantifizieren zu können. Die Messungen erfolgten in einem Winkel von ≤ 60 Grad. Dies ist von besonderer Bedeutung, um gleichzeitig aussagekräftige Ultraschallbilder und mittels Doppler Gleichung die korrekte Fließgeschwindigkeit zu bestimmen (36, 37). Alle Messungen erfolgten analog zu den Zeitpunkten der FMD Messungen. Die Fließgeschwindigkeitsreserve (FVR = *Flow velocity reserve*) errechnete sich als Quotient aus dem maximalen Fluss und dem basalen Fluss.

GTN (Glyzeroltrinitrat-vermittelte Vasodilatation) - Prinzipiell kann einer verminderten FMD neben einer reduzierten NO Synthese des Endothels auch ein vermindertes Ansprechen der glatten Gefäßmuskulatur auf NO oder ein vermehrter NO Abbau zu Grunde liegen. Um die endothelunabhängige Vasodilatation zu bestimmen, erhielten die Probanden eine Nitrozerbeißkapsel mit 400 μg Glyceroltrinitrat, (Nitrolingual mite Pohl Boskamp KG, Hohenlockstedt, Deutschland). Die maximale Dilatation wurde nach 4 Minuten bestimmt.

2.2.2 Untersuchung der kutanen Mikrozirkulation

Es ist bekannt, dass Störungen bzw. Schäden des Endothels in der Mikrozirkulation zu signifikanter endothelialer Dysfunktion in vorgeschalteten Leitungsarterien führen können und somit als Prädiktor für kardiovaskuläre Ereignisse fungieren (38).

Als ein bedeutender qualitativer Marker der endothelialen Mikrozirkulation wurde bei den Studienteilnehmern der Blutfluss der Haut mittels *Laser Doppler Perfusion*

Imager bestimmt. Diese Methode beruht auf dem Dopplerprinzip und ermöglicht die berührungsfreie Messung der Durchblutung in zweidimensionalen Hautarealen. Hierzu wird ein monochromatisches Licht (RED 632,8 nm) auf einen Hautbezirk eingestrahlt, welches frequenzspezifisch reflektiert wird. Der Blutfluss in ca. 1 - 1,5mm Tiefe der Dermis bzw. die detektierte Oberflächenbewegung ist dabei verantwortlich für die proportionale Frequenzverschiebung, aus welcher der Flusswert errechnet und in einer Farbskala kodiert werden kann. Die Ausrichtung des Lasers erfolgte immer in einem Abstand von 18 cm auf ein 8 x 8 cm großes beugerseitiges Hautareal knapp distal der Ellenbeuge. Um verfälschende Bewegungen des Probanden zu verhindern wurde der untersuchte Arm des liegenden Patienten in einem Luftkissen fixiert. Alle Untersuchungen wurden in einem ruhigen, abgedunkelten und konstant bei 23°C klimatisierten Raum durchgeführt und beinhalteten für den Patienten eine fünf minütige Ruhephase vor dem Start der Messungen.

In den folgenden Messungen wurde in einer ersten Phase für 3 Minuten der basale Hautfluss bestimmt. Dieser errechnete sich aus dem arithmetischen Mittel von 60 Einzelmessungen während dieser Zeit. Anschließend erfolgte in einer zweiten Phase durch Anlegen einer Blutdruckmanschette (200 mmHg) eine fünf minütige Stauung des Oberarms, sowie eine damit verbundene Ischämie des zu untersuchenden Hautareals. Hierbei erreichen die Messwerte allerdings niemals den Nullpunkt, welches in der brownschen Molekularbewegung des Interstitiums begründet liegt (39). Nach Lösen der Stauung wurde in einer dritten Phase analog zur ersten Phase für 3 Minuten die reaktive Hyperämie des Hautbezirkes untersucht. Hierbei erfolgte mittels Excel die statistische Auswertung der max. Perfusion, der Zeitspanne bis zur max. Perfusion, der Amplitude (*Max Perfusion-Baseline*) sowie der AUC (*Area under curve*).

2.2.3 Blutdruckmessungen

Zur Messung der 24 h Blutdruckwerte wurde ein mobiles, automatisches System (Tonoport V®, GE, Deutschland) verwendet. Die Blutdruckmanschette wurde, wie nach Herstellerangaben beschrieben, 4 cm medial oberhalb der Ellenbeuge am nicht dominanten Arm über der Arteria brachialis angelegt. Hier wurde darauf geachtet, dass die Manschette ohne Druck dem Arm fest anlag. Das Gerät wurde

für die Tageswerte 6:00-22:00 Uhr auf 4 Messungen pro Stunde und nachts auf 2 Messungen pro Stunde eingestellt. Die aufgezeichneten Daten wurden dann mittels CardioSoft/Case System ® ausgewertet, um als 24h Gesamtblutdruck, sowie als Tages- und Nachtmittelwerte dargestellt werden zu können.

2.2.4 Pulswellenanalyse

Eine wichtige Untersuchung zur vollständigen Charakterisierung der Mikro-, sowie Makrozirkulation unserer Probanden stellt die Pulswellenanalyse mittels *SphygmoCor® Pulse Wave Velocity System* dar. Die Bestimmung der Pulswellengeschwindigkeit (*Puls Wave Velocity, PWV*) basiert auf der Ausbreitungsgeschwindigkeit der Druckwelle, welche sich durch die systolische Herzkontraktion entlang des Gefäßbaumes ausbreitet. Die PWV steht dabei in einer inversen Beziehung zur Dehnbarkeit der Arterien und lässt sich durch die Bramwell–Hill Gleichung beschreiben: $PWV = \sqrt{1/D\rho}$, wobei D die Dehnbarkeit [$D = (\Delta V/V)/\Delta P$], V das Volumen, P den Druck und ρ die Dichte des Blutes (ca. 1,06) darstellen. Somit kann sie als ein direktes Maß der arteriellen Gefäßsteifigkeit angesehen werden.

Zur Bestimmung der Pulswellengeschwindigkeit wird an zwei festgelegten Messpunkten die Druckpulswelle bestimmt, während gleichzeitig ein EKG abgeleitet wird. Aus dem Verhältnis des Abstandes der beiden Punkte (ΔD) bzw. der zurückgelegten Strecke und dem zeitlichen Abstand zwischen den Fußpunkten der jeweiligen Druckwellen (Δt) lässt sich die Geschwindigkeit ($\Delta D/\Delta t$) errechnen. Dies ist deshalb wichtig, da der Fußpunkt einer jeden Druckpulswelle nicht durch eventuelle reflektorische Wellen beeinträchtigt ist und deshalb die wahre Geschwindigkeit angibt. Das EKG dient dabei als Referenzpunkt für beide Messungen.

Als Messpunkte wurden die Arteria carotis, sowie die Arteria femoralis festgelegt. Zur Bestimmung der von der Pulswelle zurückgelegten Strecke wurden die Abstände der jeweiligen Messpunkte vom Manubrium sterni gemessen und die Strecke bis zum Messpunkt der A. carotis von der der A. femoralis subtrahiert. Hierdurch wird die gleichzeitige Ausbreitung der Pulswelle nach dem Abgang der A. carotis von der Aorta nach kranial sowie kaudal berücksichtigt. Diese Methode

weist die geringsten Unterschiede zur invasiven Messung der Wegstrecke auf (40).

Alle Messungen entsprachen den aktuellen wissenschaftlichen Empfehlungen zur Bestimmung der PWV (41). So fanden alle Untersuchungen in einem ruhigen Raum mit stabiler Temperatur statt, die Probanden erfuhren eine Ruhephase von ca. 10 Min vor Messung. Kaffee, sowie Zigaretten Konsum wurde vermieden und es wurde möglichst die gleichseitige A. carotis und A. femoralis verwendet. Zudem wurden aus mind. 3 verschiedenen Messungen der Mittelwert gebildet.

Zusätzlich zur Bestimmung der PWV wurde mittels SphygmoCor® der zentrale aortale Blutdruck, welcher stärker mit kardiovaskulären Ereignissen assoziiert ist als der peripher gemessene Blutdruck (42), sowie der Augmentationsdruck (AugP) bzw. Augmentationsindex (Alx) ermittelt. Der Augmentationsdruck bezeichnet die durch die reflektorische Welle verursachte Drucksteigerung nach dem Inflektionspunkt bis zum max. systolischen Druck in der Aorta. Der Augmentationsindex gibt den Anteil des Augmentationsdrucks am gesamten Pulsdruck wieder. Zur Erfassung dieser Werte diente die rechte A. radialis der Probanden.

2.2.5 Bestimmung der Mikropartikelkonzentration im Plasma

Mikropartikel sind kleine, intakte Membranvesikel von einer Größe bis 1 µm und können von verschiedenen Zellen, wie Endothelzellen, Leukozyten oder Erythrozyten entstammen (26). Sie unterscheiden sich durch die Ausprägung von Oberflächenmarker ihrer Ursprungszelle und werden bei Apoptose oder Zellaktivierung in die Blutbahn abgegeben (43). Mikropartikel sind sowohl im Blutplasma gesunder Probanden nachweisbar, können aber auch mit der Entstehung von endothelialer Dysfunktion (30) oder mit dem Auftreten verschiedener kardiovaskulärer Risikofaktoren assoziiert sein (44, 45).

Blutentnahme und Verarbeitung

Allen in die Studie eingeschlossenen Probanden wurden durch eine venöse Punktion ca. 6ml Citrat Blut aus der Ellenbeuge entnommen. Durch einen ersten Zentrifugationsschritt des Vollblutes bei 300g für 15 Min (Raumtemperatur) wurde

zunächst plättchenreiches Plasma (PRP) gewonnen. Anschließend konnten 2 unmittelbar aufeinander folgende Zentrifugationen des Plasmas bei 10000g für jeweils 5 Min (RT) plättchenfreies Plasma (PFP) herstellen. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben bei -80°C eingefroren.

Charakterisierung der MP Subklassifikationen mittels FACS

Nach dem Auftauen der Proben erfolgte die Klassifikation der MPs durch ihre Oberflächenmarker. Das PFP wurde mittels Calcium freiem PBS 1:10 verdünnt und 100µl des PFP in 12 verschiedenen FACS Röhrchen mit fluoreszierenden Oberflächenantikörpern versehen. Dabei wurden endotheliale MPs durch die Oberflächenmarker CD31⁺/CD41⁻, CD144⁺, sowie CD62e⁺ (46), Plättchenmikropartikel durch CD31⁺/41⁺ (47), leukozytäre Mikropartikel durch CD45⁺ und erythrozytäre Mikropartikel durch CD235⁺ definiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten erfolgte die Zugabe von 200 µl PBS, sowie *flow-count calibrator beads* (20 µl). Im direkten Anschluss folgte die Messung mittels FACS.

FACS (fluorescence activated cell sorting) Messungen

Die Analyse und Quantifizierung der Mikropartikel erfolgte durch die Durchflusszytometrie. In diesem Verfahren werden Zellen in einem schnellen Fluss an einem Laserstrahl vorbei geleitet. Abhängig von der Oberflächenbeschaffenheit, Größe sowie Granularität der Zellen werden die eintreffenden Laserstrahlen nach vorne und zur Seite gestreut (*Forward bzw. side scattered light*) und durch verschiedene Spiegel auf einen Detektor projiziert (48). Dieser setzt das eintreffende Lichtsignal in einen zu messenden Strom um. Zusätzlich absorbieren die mit fluoreszierenden Antikörpern beladenen Zellen Energie der eintreffenden Laserstrahlen verschiedener Längenwellen und emittieren diese in Form von Photonen (48). Auch dies wird detektiert und in ein elektrisches Signal umgesetzt, welches proportional zur Anzahl der fluoreszierenden Zellen ist und sich graphisch darstellen lässt.

Für die Gesamtheit der Messungen wurde das BD FACSVerse™ (Beckton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) Durchflusszytometer verwendet. Zu Beginn der Messungen erfolgte zunächst eine Kalibrierung der aktuellen Lasereinstellungen mittels Kalibrierungsbeads. In einer ersten folgenden Messung

wurden Standard *Mikrobeads* (1 μm) verwendet, um MP als Zellen $\leq 1 \mu\text{m}$ Durchmesser definieren zu können.

Anschließend wurden alle mit den oben genannten Oberflächenmarker versehenen Proben in der Durchflusszytometrie analysiert. Um einen Einfluss der verwendeten fluoreszierenden Farben des jeweiligen Oberflächenantigens auf das übermittelte Signal auszuschließen, wurden für jede Farbe eine Isotyp Kontrolle durchgeführt. So konnten durch Subtraktion des gemessenen Signals (Hintergrundrauschen) vom Signal des jeweiligen Oberflächenantigens dieser Farbe falsch hohe Werte vermieden werden. Eine Quantifizierung der MP Anzahl erfolgte durch *flow-count calibrator beads* (20 μL) in jeder Probe.

Verwendete Materialien

Zur Bestimmung der endothelialen MPs wurde ein PE (R-phycoerythrin) gefärbter Anti-Human CD62e Antikörper der Firma BD Pharmingen, eine PE gefärbter Anti-CD144 Antikörper der Firma Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland), sowie ein PE gefärbter *Mouse Anti Human* CD31 Antikörper (BD Pharmingen) verwendet. Durch den Einsatz der aufgeführten Antikörper konnten verschiedene Oberflächenmoleküle der EMPs gebunden werden. So reagiert der CD62e Antikörper mit dem 97 – 115 kDa Glycoprotein, E-selectin (ELAM-1), welches vermutlich an der Interaktion der neutrophilen Granulozyten mit Endothelzellen beteiligt ist und nur von aktivierten Endothelzellen exprimiert wird (49), während der CD144 Antikörper das Adhäsionsmolekül VE-Cadherin bindet (50). Über den CD31 Antikörper wurde das Glycoprotein Gp IIa, auch bekannt als PECAM-1, gebunden (51).

Der PE konjugierte Anti CD45 Antikörper der Firma Beckman Coulter diente zur Definition der leukozytären Mikropartikel. Außerdem kam ein FITC (Fluoreszierendes isothiocyanite) gefärbter Anti CD235 Antikörper (Beckman Coulter) zur Anwendung. Dieser Antikörper richtet sich gegen das Glycophorin A, welches vor allem auf Proerythroblasten vorhanden ist. Zur Bestimmung der Plättchenmikropartikel wurde der PE-Cy 5 *Mouse Anti Human* CD41a Antikörper (BD Pharmingen) benutzt. PE-Cy5 ist ein zweifaches Fluorochrom bestehend aus R-phycoerythrin (PE) und Cyanine Cy5. CD 41 ist ein Oberflächenmolekül,

welches typischerweise auf Plättchen oder Megakaryozyten ausgeprägt ist und als Rezeptor für Fibrinogen, vWF oder Fibronectin dient (52).

Für unsere Isotyp- Kontrollen wurden Pe-Cy 5 Mouse IgG1 Isotype Control (BD Pharmingen), sowie die beiden von der Firma Beckman Coulter hergestellten IgG1- FITC und IgG1-PE verwendet.

2.2.6 Statistische Analysen

Alle Werte werde als Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD) angegeben. Vergleiche zwischen zwei Gruppen wurden mittels zweiseitigen Studenten T-Test für nicht verbundene Gruppen durchgeführt. Wenn mehr als 2 Gruppen verglichen wurden, erfolgte eine Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem Post hoc Test (Bonferroni). Das Signifikanzniveau wurde mit 0,05 festgelegt.

3. Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse meiner Arbeit dargestellt. Hierbei erfolgte die Durchführung aller Experimente und klinischer Studien durch mich nach Erlernen der jeweiligen Methoden. Hierzu zählen alle im Bereich „Material und Methoden“ aufgelistete Methoden.

3.1 Blutdruckassoziierter Einfluss auf die Gefäßfunktion und Mikropartikelfreisetzung

Das erste Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Endothelfunktion bei Bluthochdruck-, sowie KHK Patienten zu charakterisieren. In einem ersten Schritt wurden dafür zunächst die Routineparameter in einer laborchemischen Untersuchung für die einzelnen Gruppen aufgelistet. Signifikante Unterschiede ergaben sich dabei natürlicherweise in systolischen (Gesund: 123 ± 6 mmHg vs. HT: 136 ± 19 mmHg, $p < 0,001$; KHK: 126 ± 9 mmHg vs. HT+KHK: 151 ± 11 mmHg, $p < 0,001$) und diastolischen Blutdruckwerten (Gesund: 77 ± 4 mmHg vs. HT: 85 ± 11 mmHg, $p < 0,001$; KHK: 76 ± 5 mmHg vs. HT+ KHK: 93 ± 7 mmHg, $p < 0,001$) sowie im Rauchverhalten der unterschiedlichen Gruppen. Auch zeigte sich eine signifikante Cholesterinerhöhung in der Gruppe der Hypertoniker (s.Tab1).

Tabelle 1: Charakterisierung Studienkollektiv Studie I (MW \pm SD)

	Gesund	HT	KHK	KHK+ art. Hyp	P Wert
	MW \pm SD	MW \pm SD	MW \pm SD	MW \pm SD	ANOVA
n [männlich]	11	8	11	10	
Alter[Jahre]	59 \pm 7	59 \pm 3	60 \pm 5	60 \pm 6	n.s
BMI[kg/m²]	26 \pm 4	28 \pm 3	28 \pm 3	31 \pm 4	n.s
Creatinin [mg/dl]	1 \pm 0,1	0,9 \pm 0,1	0,9 \pm 0,1	0,9 \pm 0,1	n.s
CRP [mg/dl]	0,32 \pm 0,6	0,3 \pm 0	0,47 \pm 0,44	0,33 \pm 0,3	n.s.
CAD[1,2,3]	0	0	2 \pm 1	2 \pm 1	n.s
HF [beats/min]	66 \pm 14	64 \pm 8	72 \pm 7	63 \pm 8	n.s
Systolischer Blutdruck, mmHg	123 \pm 6,7	136 \pm 19	126 \pm 8,8	151 \pm 10,7	0.0001
Diastolischer Blutdruck, mmHg	77 \pm 4	85 \pm 11	76,5 \pm 5,3	93 \pm 7,5	0.0001
Ex Raucher	45 \pm	75%	82 %	70 %	0.0001
Aktuelle Raucher	0 \pm	20%	20 %	20 %	0.0001
Packyears	16 \pm 20	12 \pm 11	40 \pm 34	31 \pm 35	n.s.
HbA1c [%]	5,3 \pm 0,3	5,5 \pm 0,2	5,6 \pm 0,5	5,6 \pm 0,5	n.s
Nüchternglucose [mg/dl]	99 \pm 6	103 \pm 12,0	102 \pm 10,0	104 \pm 14,0	n.s
Cholesterin [mg/dl]	216 \pm 38	225 \pm 50	176 \pm 39	169 \pm 43	0,013
LDL [mg/dl]	144 \pm 33	154 \pm 38	130 \pm 34	121 \pm 41	n.s.
HDL [mg/dl]	58 \pm 14	60 \pm 32	42 \pm 14	46 \pm 21	n.s.
Beta-Blocker	0 %	20 %	90 %	90 %	
Statin	0 %	0 %	80 %	82 %	
ACEI/ARB	0 %	80%	100 %	100 %	
Diuretikum	0 %	35%	30 %	40 %	
Aspirin	0%	0%	100%	100%	
Kalcium-Antagonist	0%	38%	10%	0%	

Erklärung: n.s.= nicht signifikant

Im Rahmen der Charakterisierung der Endothelfunktion wurden in dieser Arbeit die Effekte des Bluthochdruckes bzw. der KHK auf die Makrozirkulation untersucht. Hierfür wurde die Regenerationsfähigkeit der Arteria brachialis auf eine erhöhte Schubspannung (*Shear Stress*) mittels *Flow mediated dilation* gemessen. Diese Untersuchung wurde an allen 40 Patienten durchgeführt.

Hierbei konnte ein signifikanter Unterschied in der FMD aller 4 Subpopulationen aufgezeigt werden. (Gesund: 6,2 \pm 0,7%; HT: 5,1 \pm 0,3%, $p=0,010$, KHK: 4,2 \pm 0,9%, $p<0,001$, HT+ KHK: 2,9 \pm 0,9%, $p<0,001$). Der basale Durchmesser aller 4 Gruppen zeigte keinerlei Unterschiede. Somit ist auch hier der negative Einfluss des Bluthochdruckes auf die Endothelfunktion deutlich zu erkennen, denn die FMD sowohl von Hypertonikern gegenüber Gesunden, als auch von hypertensiven

KHK Patienten gegenüber KHK Patienten ohne Bluthochdruck ist signifikant vermindert. Damit scheint die arterielle Hypertonie den größten Einfluss auf die Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion zu haben und additiv die Gefäßfunktion bei Patienten mit Arteriosklerose zu verschlechtern.

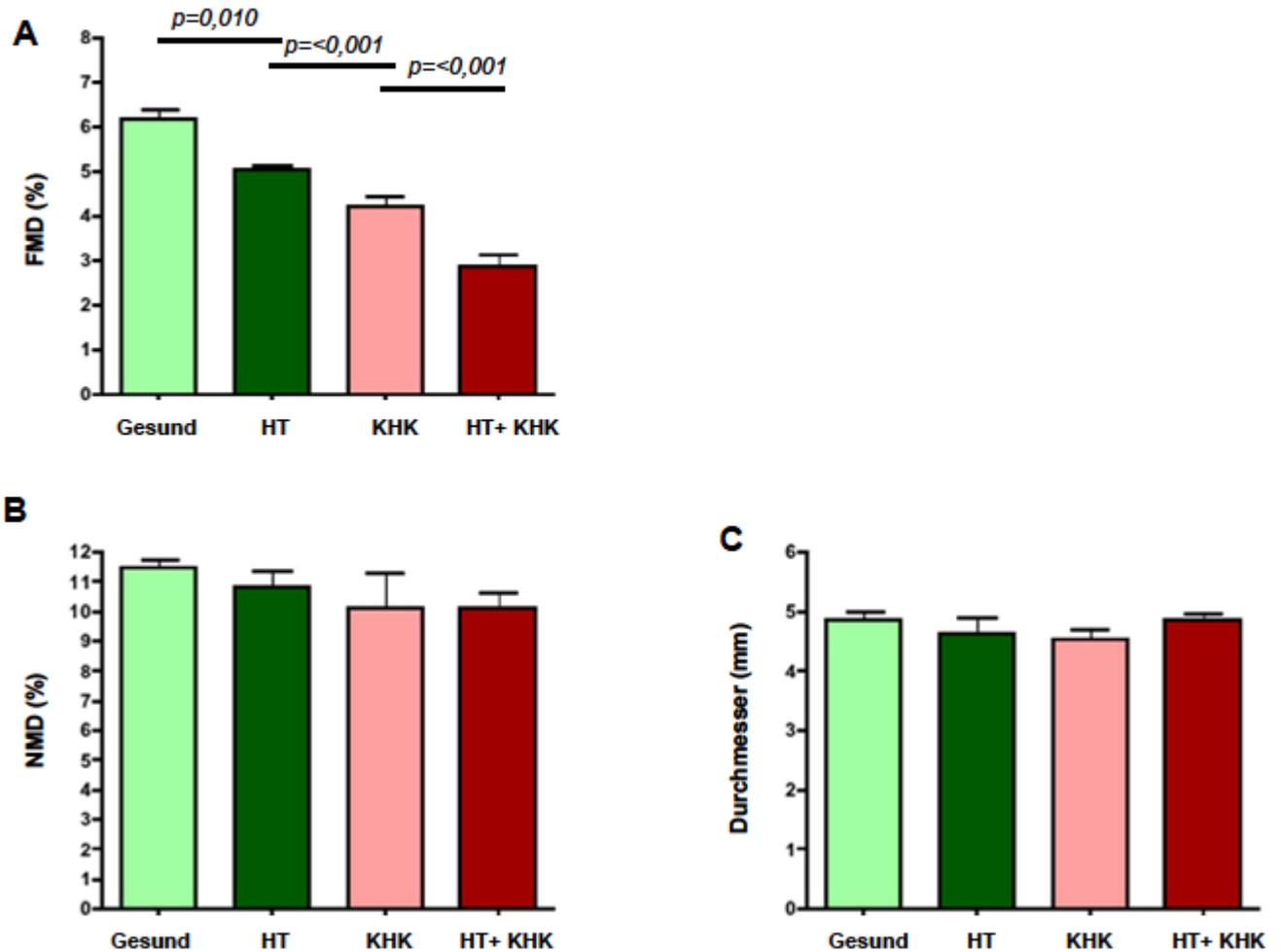


Abb. 4: Endotheliale Funktion in klinischer Studie I (MW ± SD)

A Flow mediated dilation, **B** Nitroglycerin mediated dilation, **C** arterielle Gefäßdurchmesser der A. brachialis vor Stauung. Nach 5 minütiger Stauung erfolgte die Messung der FMD an der A. brachialis durch eine Ultraschallsonde. Zusätzlich erfolgte eine Messung der Dilatation nach Gabe von Nitroglycerin, welches die arterielle Gefäßantwort blockiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler. Signifikanzniveau: $p < 0,05$

Des Weiteren konnte in einer zusätzlichen Versuchsreihe eine signifikante Erhöhung der Mikropartikel verschiedener Entitäten bei Patienten mit arterieller Hypertonie im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe festgestellt werden. Diese signifikante Erhöhung zeigte sich vor allem bei endothelialen Mikropartikeln ($CD31^+/41^-$: Gesund: 268 ± 200 ev/ μ l vs. HT: 721 ± 523 ev/ μ l, $p = 0,001$; $CD144^+$:

Gesund: 247 ± 135 ev/ μ l vs. HT: 374 ± 112 ev/ μ l, $p=0,01$; CD62e⁺: 821 ± 280 ev/ μ l vs. HT: 1292 ± 363 ev/ μ l, $p=0,001$), begleitend zur verschlechterten FMD der Hypertonie Patienten gegenüber der gesunden Kontrollgruppe (Gesund: $6.2 \pm 0.7\%$ vs. HT: $5.1 \pm 0.3\%$, $p= 0,010$). Diese Daten legen also eine Assoziation der arteriellen Hypertonie zu einer erhöhten Mikropartikelfreisetzung nahe.

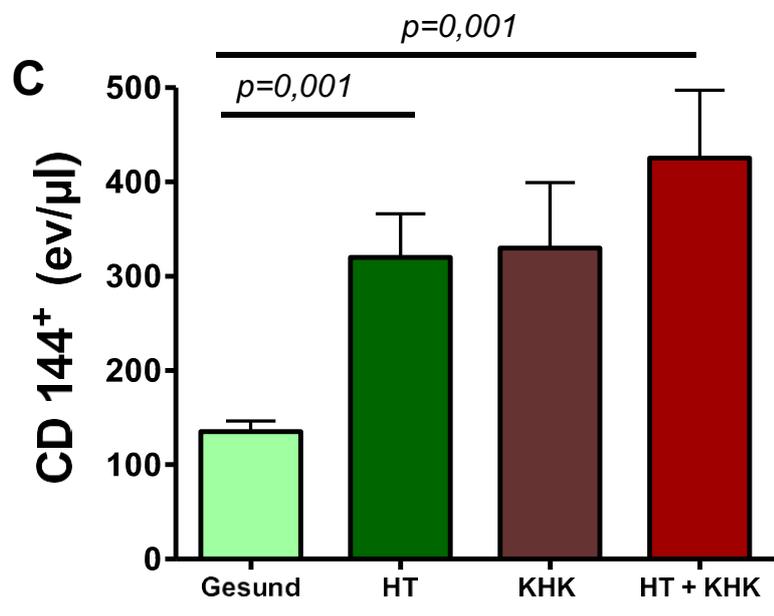
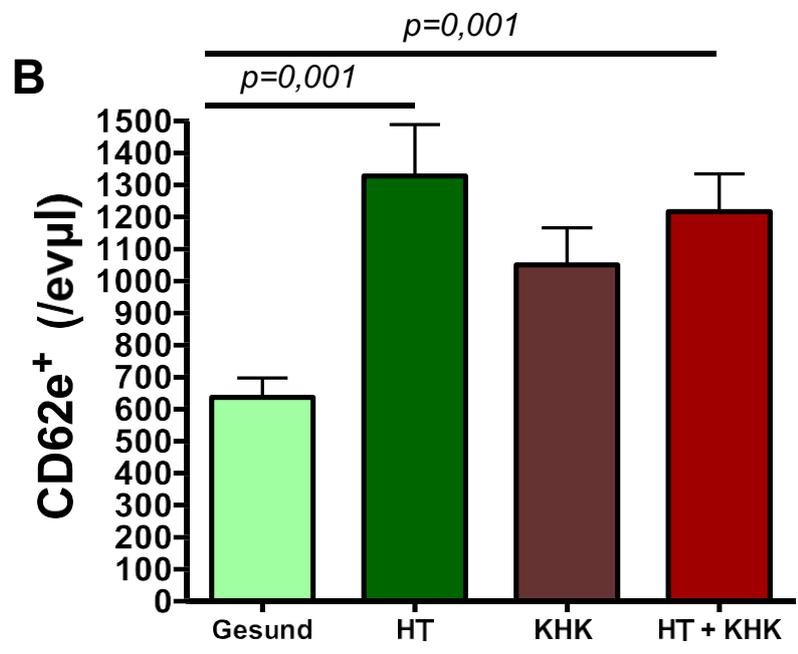
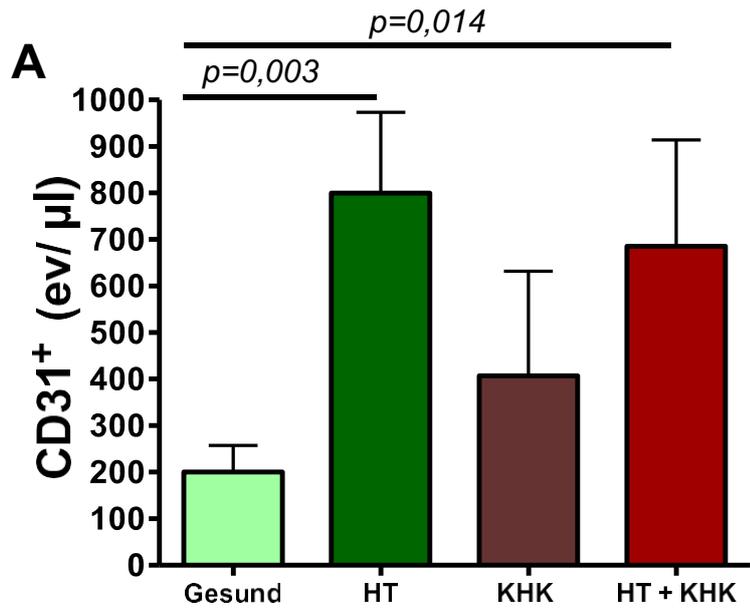


Abb. 5: Endotheliale Mikropartikelfreisetzung in Studie I (ev/ μ l) (MW \pm SD)

Anstieg der endothelialen Mikropartikel bei Arterieller Hypertonie. Dargestellt sind in **A** CD31⁺ Mikropartikel, **B** CD62e⁺ Mikropartikel, **C** CD144⁺ Mikropartikel, welche jeweils endothelialen Ursprungs sind. Abgebildet sind die Mittelwerte, Signifikanzwert und Standardfehler.

Weiterhin wurde deutlich, dass Patienten mit einer stabilen KHK erhöhte Mikropartikel aller Entitäten aufwiesen (Endotheliale- (CD62⁺, CD144⁺, CD31⁺/41⁻), Plättchen- (CD31⁺/41⁺), leukozytäre- (CD45⁺), sowie erythrozytäre Mikropartikel (CD235⁺)), diese aber bei zusätzlichem Vorliegen einer Hypertonie noch höhere Werte annahmen bei weiterhin verminderter FMD (KHK: 4.2 \pm 0.9% vs. HT + KHK: 2.9 \pm 0.9%, $p < 0,001$). Dies deutet auf einen besonderen Einfluss der Hypertonie auf die Mikropartikelkonzentration im Blut hin.

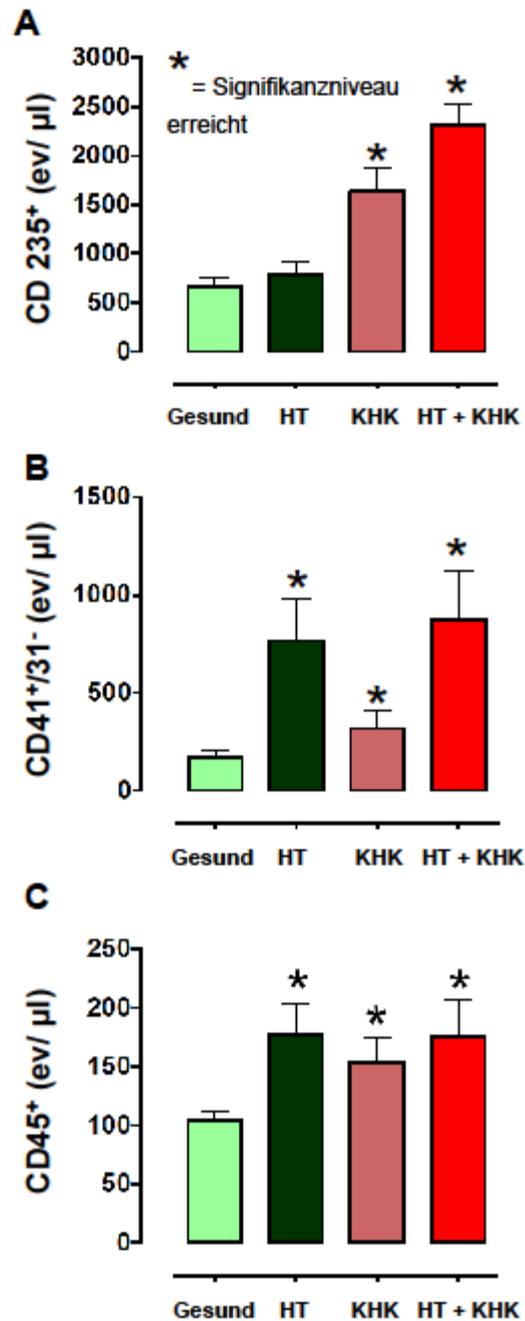


Abb. 6: Nicht endotheliale Mikropartikelfreisetzung in Studie I (ev/μl) (MW ± SD)

Anstieg der nicht endothelialen Mikropartikel bei arterieller Hypertonie. Dargestellt sind in **A** CD235⁺ Mikropartikel (erythrozytäre Mikropartikel), **B** CD31⁺/ CD41⁻ Mikropartikel (Plättchen Mikropartikel), **C** CD45⁺ Mikropartikel (leukozytäre Mikropartikel). Abgebildet sind Mittelwerte und Standardfehler. Signifikanzniveau: $p < 0,05$

Insgesamt konnte eine univariante inverse Korrelation zwischen allen endothelialen Mikropartikeln und der FMD nachgewiesen werden mit der stärksten Korrelation zwischen CD144⁺ und FMD ($r=-0,62$ $p=0,001$), sodass ein Zusammenhang zwischen der verminderten Endothelfunktion und der blutdruckassoziierten Mikropartikelfreisetzung zu bestehen scheint.

In einer weiteren Versuchsreihe, welche den Einfluss von Hypertonie auf die Makrozirkulation untersuchen sollte, wurde im Rahmen dieser Arbeit die arterielle Steifigkeit/ Compliance, sowie die mittlere Pulswellengeschwindigkeit bei allen 40 Patienten mittels des bereits oben beschriebenen *SphygmoCor® Pulse Wave Velocity System* bestimmt.

Die Ergebnisse zeigten, dass Hypertonie Patienten eine signifikant höhere Pulswellengeschwindigkeit aufwiesen im Vergleich zur Kontrollgruppe (HT: $9,6 \pm 1,2$ m/s; Gesund: $7,7 \pm 1,0$ m/s, $p<0,001$). Das gleiche Bild zeigte sich auch im Vergleich der KHK Patienten mit und ohne Hypertonie. Hier wiesen die KHK Patienten mit zusätzlicher arterieller Hypertonie einen signifikant höheren Wert in der Pulswellengeschwindigkeit auf, als KHK Patienten ohne Hypertonie (KHK $7,8 \pm 1,0$ m/s; HT+ KHK $9,9 \pm 1,0$ m/s, $p<0,010$). Die Pulswellengeschwindigkeiten der Kontrollgruppe und der KHK Gruppe unterschieden sich nicht. (Gesund: $7,7 \pm 1,0$ m/s; KHK: $7,8 \pm 1,0$ m/s, $p=0,223$).

Die Ergebnisse zur Messung der arteriellen Gefäßsteifigkeit zeigten dagegen auch einen Einfluss der Hypertonie auf die Makrozirkulation. Als Maß für die Gefäßsteifigkeit, bzw. dessen Compliance wurde in dieser Studie der Augmentationsindex (AIX) verwendet. Der Augmentationsindex ist das Verhältnis des späten Anteils des systolischen Druckes, der durch die reflektierte Druckwelle moduliert wird (AG), zum Pulsdruck (PP). Dieser, durch das Gerät berechnete Augmentations-Index ändert sich, wenn die Steifigkeit der arteriellen Gefäßwand zunimmt.

Hier zeigte sich, dass Hypertonie- und KHK Patienten einen signifikant höheren AIX aufwiesen, als Probanden in der Kontrollgruppe (Gesund: $18,3 \pm 8,0\%$, HT: $23,3 \pm 6,6\%$, $p=0,015$ und KHK: $23,4 \pm 5,9\%$, HT+ KHK: $27,7 \pm 6,5\%$ $p=0,015$). Dabei unterschieden sich KHK Patienten mit und ohne Hypertonie, auch hier

erhöhte sich der Augmentationsindex durch die Hypertonie additiv. Die Ergebnisse deuten also auf einen Einfluss der KHK und der Hypertonie auf die Gefäßsteifigkeit hin. Insgesamt zeigen unsere Ergebnisse, dass Hypertoniker eine schlechtere endothelabhängige Dilatation aufweisen, sowie eine erhöhte Gefäßsteifigkeit und Mikropartikelkonzentration festgestellt werden konnte.

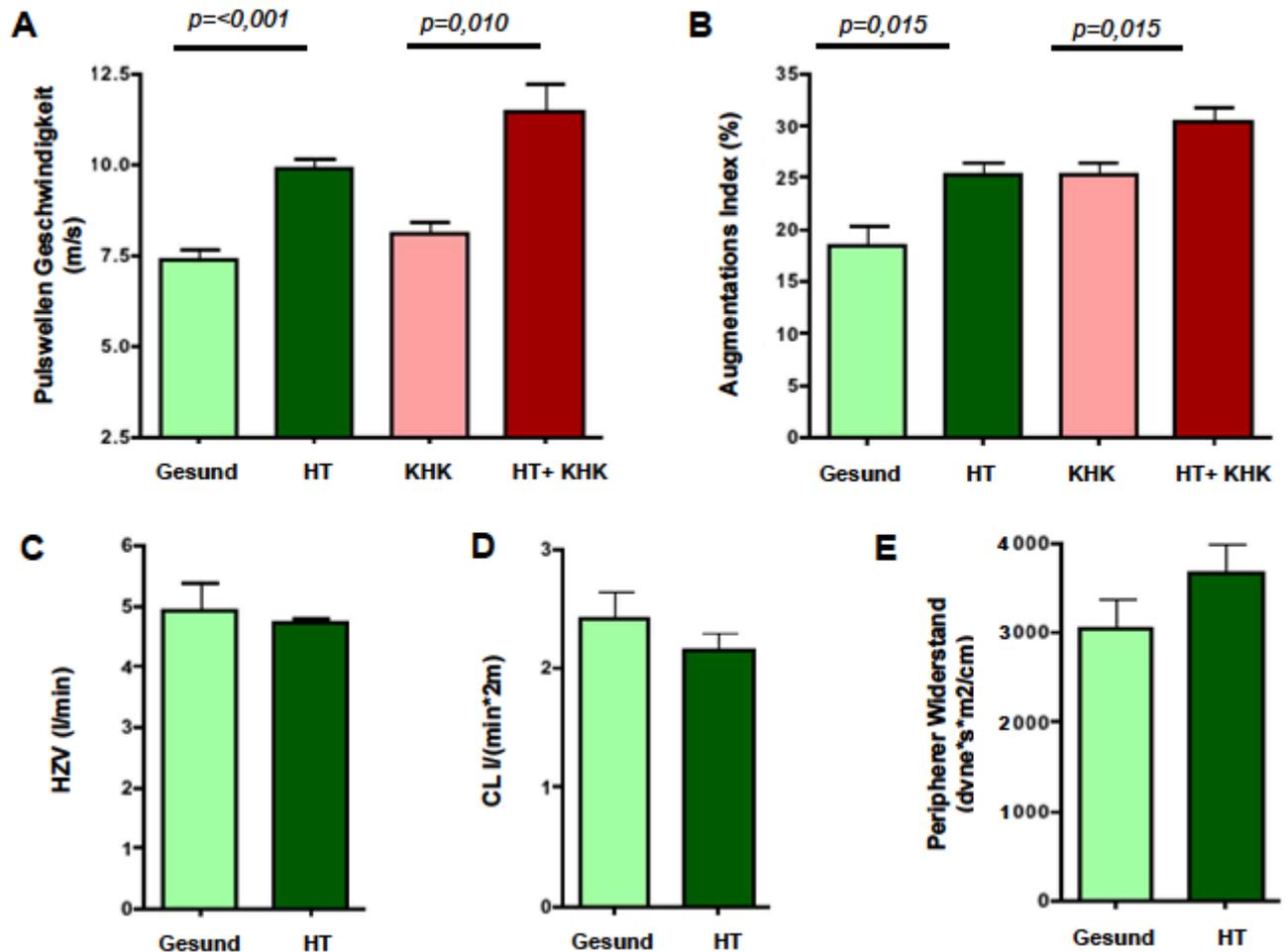


Abb. 7: Häodynamik Studie I (MW \pm SD)

Erhöhte Gefäßsteifigkeit bei arterieller Hypertonie. Dargestellt ist in **A** die Pulswellengeschwindigkeit, sowie in **B** der Augmentationsindex (AIX). Hier zeigt sich ein Anstieg in den Gruppen der Hypertoniker. Dargestellt sind zusätzlich in **C** das Herzzeitvolumen (HZV), in **D** der Herzindex und in **E** der periphere Widerstand. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardfehler. Signifikanzniveau: $p < 0,05$

3.2 Einfluss von Bluthochdruck auf die kutane Mikrozirkulation

Es wurde als zentrales Ziel dieser Arbeit definiert, eine komplette Charakterisierung der Endothelfunktion auf allen Ebenen des Herzkreislaufsystems bei gesunden Probanden, sowie Patienten mit arterieller Hypertonie sowie koronarer Herzkrankheit im Rahmen der Studie 1 zu erstellen. Hierzu erfolgte im bereits oben genannten Patientenkollektiv auch eine Untersuchung der Mikrozirkulation.

Als eine erste Determinante der Endothelfunktion wurde zunächst die kutane Perfusion untersucht. Alle 40 Patienten der verschiedenen Subpopulationen wurden einer Laserdoppleruntersuchung unterzogen, in der, wie bereits oben beschrieben, durch einen Laser und einer Wärmedetektion die Hautdurchblutung im rechten Unterarm gemessen wurde. Dabei ließen sich für Baseline Perfusion, max. Perfusion sowie Amplitude und Baseline-gemittelte Perfusion nach Stauung (AUC) folgende Ergebnisse festhalten: Die Perfusion wird dabei in Perfusion units (PU) angegeben, welche eine willkürliche Einheit darstellt.

So zeigten sich signifikante Unterschiede in der max. Perfusion zwischen der gesunden Kontrollgruppe und Hypertonie Patienten (Gesund: $217,4 \pm 72$ PU; HT: $157,3 \pm 50,4$ PU, $p=0,033$), allerdings nicht zwischen KHK Patienten ohne Bluthochdruck gegenüber KHK Patienten mit Bluthochdruck. (KHK: $115,4 \pm 19,3$ PU ; HT+ KHK: $107,9 \pm 45,6$ PU, $p=0,425$). Ein ähnliches Bild bot sich in der Baseline gemittelten Perfusion nach Stauung (AUC). Diese Angaben erfolgen ohne Einheiten, da es sich hier um ein Verhältnis handelt. Auch hier zeigten sich signifikante Unterschiede jeweils zwischen gesunden Probanden und Hypertonie Patienten (Gesund: 2.355 ± 518 ; HT: 1.739 ± 596 , $p=<0,001$), sowie zwischen KHK Patienten ohne Bluthochdruck und KHK Patienten mit Bluthochdruck (KHK: 1.628 ± 448 ; HT+ KHK: 1.316 ± 437 , $p=0,044$). Des Weiteren zeigten KHK Patienten sowohl in der Baseline Durchblutung, der Amplitude als auch in der max. Amplitude signifikant niedrigere Werte als Hypertonie Patienten, welches vermuten lässt, dass das alleinige Vorliegen einer KHK alleine zu einer Mikrozirkulationsstörung führt. Eine offensichtliche Ausnahme stellt dabei die AUC da. Diese ist aber Baseline gemittelt und nimmt aufgrund der erniedrigten Baseline der KHK Patienten falsch hohe Werte an, wodurch hier falsche Korrelationen

angenommen werden können. Weiterhin deuten die Ergebnisse auf einen Zusammenhang zwischen arterieller Hypertonie und einer gestörten Mikrozirkulation hin, denn es besteht in allen untersuchten Parametern sowohl ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit Bluthochdruck und gesunden Probanden, als auch zwischen KHK Patienten mit und ohne Bluthochdruck. Insgesamt zeigen die Ergebnisse eine klare Korrelation der beiden Krankheitsbilder, arterielle Hypertonie, sowie KHK mit einer Mikrozirkulationsstörung, wobei die arterielle Hypertonie diese anscheinend auch additiv beeinflussen kann. In Zusammenschau mit den bereits oben genannten Ergebnissen der Makrozirkulation unterstreicht die arterielle Hypertonie auch hier wieder seine Rolle als größten Risikofaktor zur Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion.

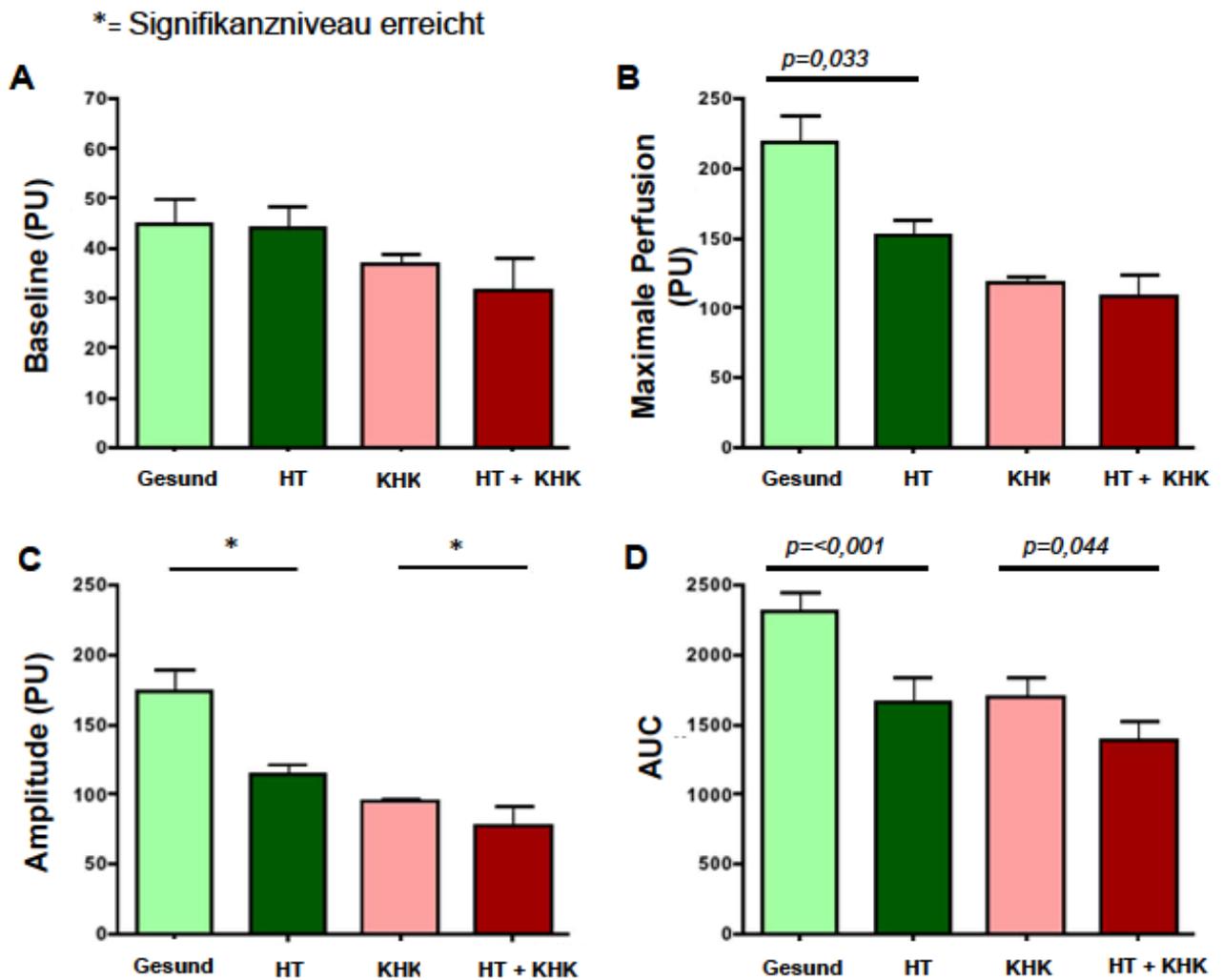


Abb. 8: Kutane Mikrozirkulation Studie I (MW ± SD)

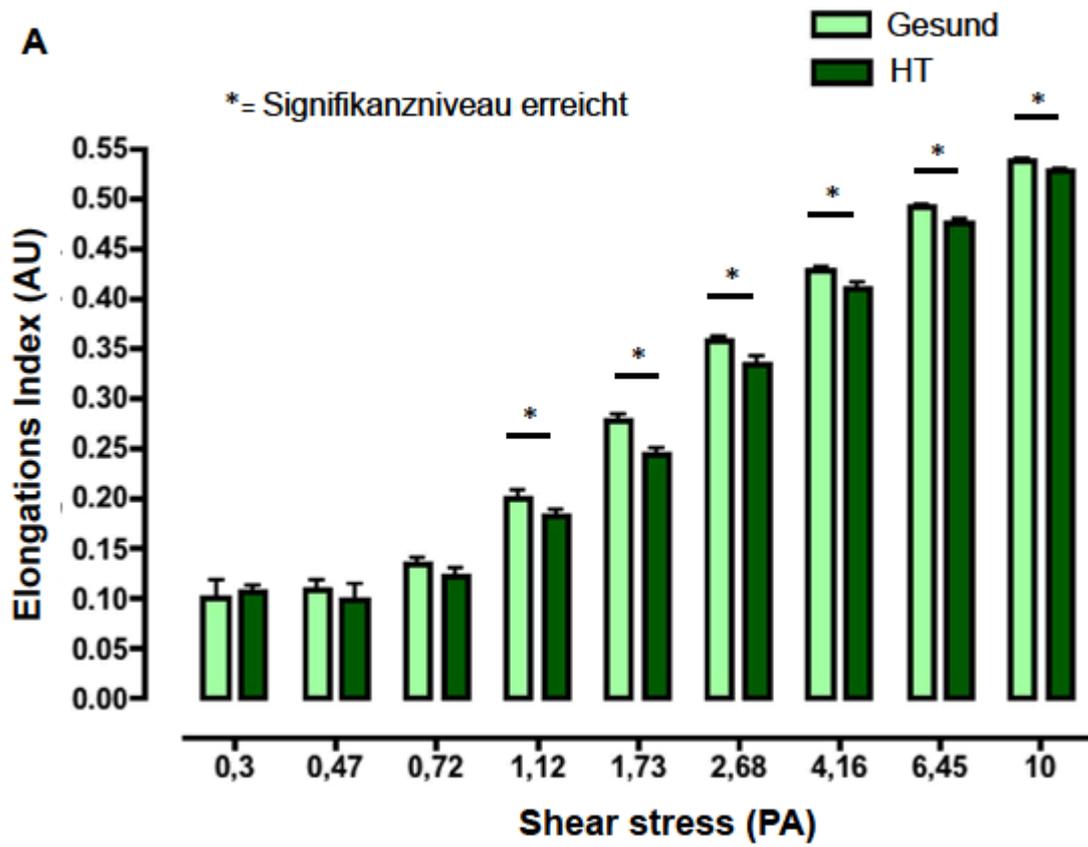
Untersuchung der kutanen Mikrozirkulation. Dargestellt ist in **A** die durchschnittliche Hautperfusion der Gruppen in Ruhe (Baseline) in PU (Perfusion Units), sowie in **B** die maximale Perfusion im gleichen Hautbezirk nach 5 minütiger Stauung. Zusätzlich dargestellt ist in **C** die Amplitude zwischen basaler Durchblutung und maximaler Perfusion, sowie in **D** die Area under curve (AUC) während der 3 minütigen reaktiven Hyperämie nach Stauung. Es zeigt sich in allen Untersuchungen eine verminderte Durchblutung bei arterieller Hypertonie. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardfehler. *= $p < 0,05$, Signifikanzniveau: $p < 0,05$

3.3.1 Erythrozytäre Verformbarkeit als Determinante der Mikrozirkulation

Zusätzlich wurde im Zuge dieser Studie auch noch die Rheologie der Erythrozyten als weiteren Einflussfaktor auf die Mikrozirkulation in denselben Patientengruppen untersucht. Hierbei wurde, wie bereits oben beschrieben, heparinisiertes Vollblut verschiedenen Schubspannungen ausgesetzt und mittels eines Lasers die mittlere erythrozytäre Verformbarkeit gemessen.

Auch hier zeigten sich wieder signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen der Gesunden und Hypertoniker, sowie auch zwischen KHK Patienten mit und ohne Bluthochdruck. So unterschieden sich die jeweiligen Elongationsindices signifikant zwischen Gesunden und Hypertonikern bei sechs verschiedenen Schubspannungen. Die Angabe erfolgte in *arbitrary units* (AU). Der Mittelwert der Elongationsindices bei einer als Standard festgelegten Schubspannung von 2,68 Pa (Pascal) betrug bei Gesunden $0,35 \pm 0,01$ AU gegenüber $0,33 \pm 0,02$ AU, $p=0,022$ bei HT Patienten. Auch in den Gruppen KHK und HT + KHK unterschieden sich die Elongationsindices signifikant in 4 verschiedenen Schubspannungen bei den Referenzwerten. (KHK: $0,35 \pm 0,02$ AU vs. HT+ KHK: $0,33 \pm 0,01$ AU, $p=0,038$)

Es besteht also eine Korrelation zwischen manifester arterieller Hypertonie und KHK mit einer verminderten erythrozytären Verformbarkeit als eine Determinante der Mikrozirkulation. In wieweit allerdings die Verformbarkeit eine Ursache oder Folge der verminderten Mikrozirkulation darstellt bleibt dabei ungeklärt.



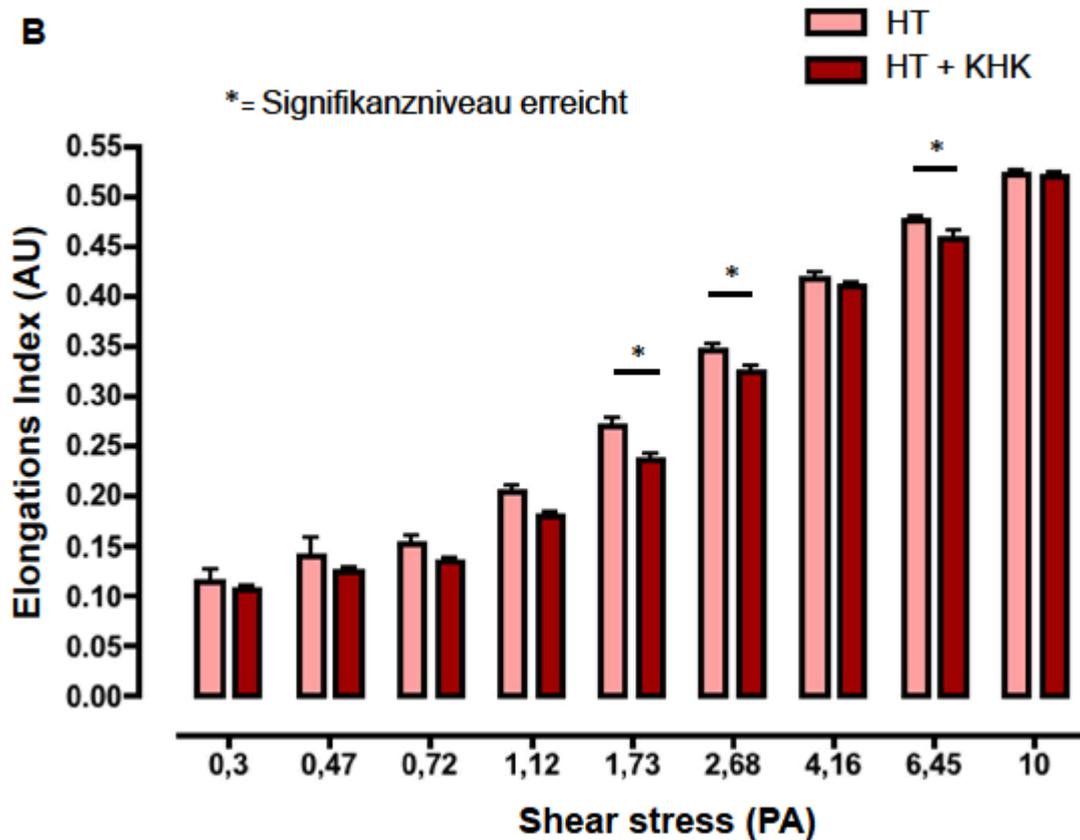


Abb.9: Erythrozytäre Verformbarkeit Studie I (MW \pm SD)

Dargestellt ist die Verformbarkeit der Erythrozyten in den verschiedenen Gruppen bei verschiedenen Shear Stress in PA (pascal) In **A** sind die Verformbarkeiten der gesunden Gruppe, sowie der Gruppe der art. Hypertonie in arbitrary units (AU) dargestellt, in **B** sind die Verformbarkeiten der Gruppe der KHK und der KHK mit art. Hypertonie dargestellt. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardfehler. *= $p < 0,05$, Signifikanzniveau: $p < 0,05$

3.3 Effekte von akuten Blutdruckentgleisungen und mechanischen Endothelschaden auf die Gefäßfunktion

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand darin, die akuten kurzfristigen Effekte der arteriellen Hypertonie auf die Endothelfunktion zu erfassen. Unsere bisherigen Ergebnisse zeigten eine Korrelation zwischen arterieller Hypertonie und einer verminderten Endothelfunktion, sowie erhöhten Gefäßsteifigkeit und Mikropartikelfreisetzung. Um diese Korrelation weiter zu stützen und zu eruieren, ob diese Effekte wirklich auf einer arteriellen Hypertonie beruhen, untersuchten wir die Effekte von akuten Blutdruckentgleisungen. Hierfür wurden zwölf hypertensiv

entgleiste Patienten bei Aufnahme im Rahmen der Studie II untersucht, sowie zu einem zweiten Zeitpunkt 4h nach Aufnahme. Zu diesem Zeitpunkt konnte aufgrund des therapeutischen Einsatzes von Urapidil von normotensiven Blutdruckwerten ausgegangen werden.

Auch hier wurde die Endothelfunktion wiederholt mittels FMD Untersuchung ermittelt, sowie die Mikropartikelkonzentration bestimmt.

Auch hier konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einer hypertensiven Entgleisung zum Zeitpunkt der Aufnahme eine verminderte FMD ($2.6 \pm 0.7\%$) aufwiesen, diese sich aber nach Erreichen von normotonen Blutdruckwerten signifikant ($3.8 \pm 1,3\%$, $p=0.001$) verbesserte.

Begleitend zur Verbesserung der FMD konnte auch wiederum eine signifikante Verminderung der endothelialen, sowie erythrozytären Mikropartikel beobachtet werden, sodass auch hier von einer inversen Korrelation zwischen FMD und endothelialen Mikropartikel ausgegangen werden kann. ($CD31^+/41^-$: 230 ± 249 ev/ μ l vs. 150 ± 141 ev/ μ l, $p=0,041$; $CD62e^+$: 1839 ± 1807 ev/ μ l vs. 1214 ± 1604 ev/ μ l, $p=0,001$; $CD144^+$: 243 ± 39 ev/ μ l vs. 189 ± 42 ev/ μ l, $p=0,003$). Die Zahl der Plättchen-, sowie leukozytären Mikropartikel blieb dabei weitestgehend unverändert. Diese Ergebnisse bestätigen unsere bisherigen Erkenntnisse aus Studie I.

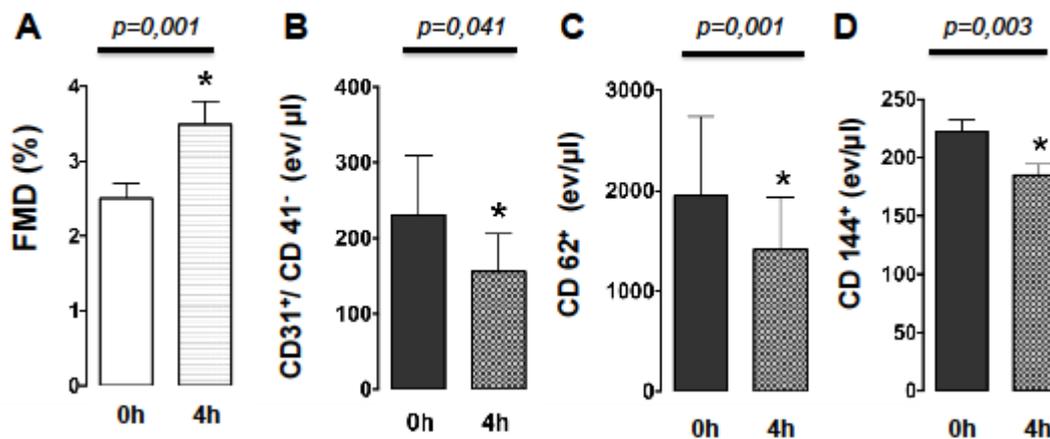


Abb.10: FMD (%) und Mikropartikel (ev/μl) Studie II (MW ± SD)

Dargestellt sind die Effekte einer akuten Blutdruckentgleisung auf die FMD (flow mediated dilation), sowie auf die endotheliale Mikropartikelkonzentration zum Zeitpunkt 0h und nach Normalisierung des Blutdruckes durch Uradipil nach 4h. In **A** zeigt sich eine verbesserte FMD nach 4h, in **B, C, D** zeigen sich signifikante Abfälle der endothelialen Mikropartikelkonzentration nach 4h. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardfehler. Signifikanzniveau: $p < 0,05$, $* = p < 0,05$

Des Weiteren konnte im Rahmen dieser Arbeit neben den Effekten der akuten Gefäßschädigung durch hypertensive Blutdruckwerte auch die Auswirkungen eines katheterinduzierten Gefäßschadens auf die Endothelfunktion gezeigt werden. Hierzu erfolgte bei 5 KHK Patienten in Studie III, die sich einer diagnostischen Koronarangiographie unterzogen, eine Messung der FMD, sowie der zirkulierende Mikropartikel zu vier verschiedenen Zeitpunkten. Hierbei wurde zunächst ein Ausgangswert vor der Intervention bestimmt, Messungen gleicher Vorgehensweise erfolgten eine, vier und 24 Stunden nach Koronarangiographie. Hier konnten signifikant niedrigere Werte der FMD direkt nach Koronarangiographie beobachtet werden, die sich nach 24 Stunden wieder langsam erhöhten (0h: $4,8 \pm 0,6\%$, 1h: $2,7 \pm 0,6\%$, $p < 0,001$) und (0h: $4,8 \pm 0,6\%$ vs. 24h: $3,8 \pm 0,5\%$ $p < 0,01$). Wiederum invers hierzu verhielten sich die endothelialen Mikropartikel. (CD144⁺: 262 ± 76 ev/ μl ,1h 489 ± 87 ev/ μl , $p < 0,01$; 24h: 322 ± 81 ev/μl $p = n.s.$ vs. basalem Wert) (CD62⁺: 0h: 991 ± 56 ev/μl , 1h 985 ± 45 ev/μl , $p = n.s.$; 24h: 1670 ± 99 ev/ μl , $p < 0,001$ vs. basalem Wert). Für die CD31⁺/41⁻ zeigte sich zu der der 1h Wert und der 24h Wert nicht signifikant

verändert. (CD31⁺/41⁻ 0h: 222 ± 86 ev/ µl ,1h 234 ± 102 ev/ µl, 24h: 252 ± 85 ev/µl, *p*=*n.s*)

Die Koronarangiographie erfolgte dabei durch einen Zugang über die Leiste, die FMD Messung erfolgte dagegen an der rechten Arteria brachialis. Diese Daten zeigen, dass ein mechanischer Endothelschaden eine Assoziation zu einer verminderten Endothelfunktion und erhöhten Mikropartikelfreisetzung aufweist und decken sich mit unseren Daten aus Studie I und II. und bekräftigen die zentrale Hypothese unserer Arbeit, dass arterielle Hypertonie zu einem mechanischen Endothelschaden führt.

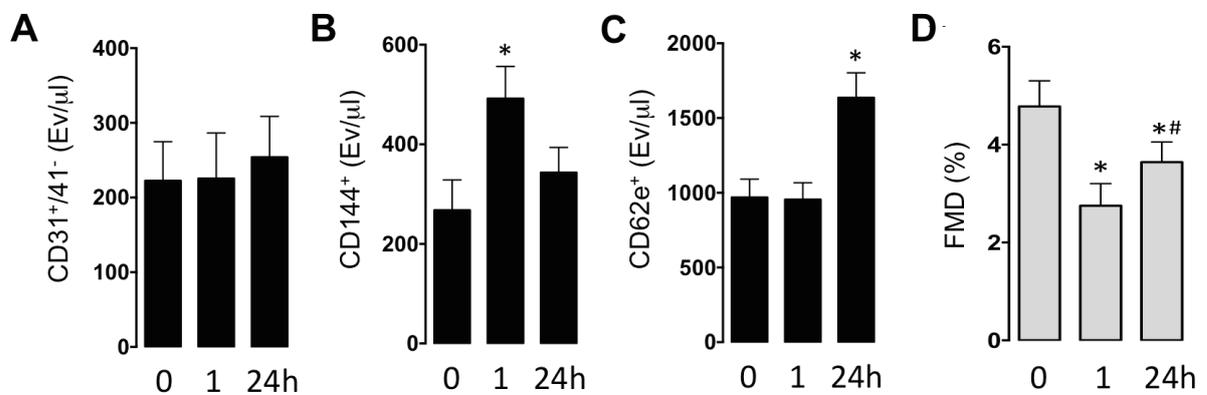


Abb.11: Abbildung 11: FMD (%) und Mikropartikel (ev/µl) Studie III (MW ± SD)

Dargestellt sind die Effekte einer akuten Katheterintervention auf die FMD (flow mediated dilation), sowie auf die endotheliale Mikropartikelkonzentration. Es erfolgte jeweils eine Messung vor Katheterintervention (0h), sowie eine Stunde (1h) und 24 Stunden (24h) nach Katheterintervention. In **A** zeigt sich kein Anstieg der CD31⁺/41⁻ Mikropartikel. In **B** steigen die CD 144⁺ schnell nach Intervention an, in **C** erfolgt ein Anstieg für CD62e⁺ erst verzögert. In **D** zeigt sich zunächst ein Abfall der FMD nach Intervention, sowie ein Anstieg im Verlauf. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardfehler. *=*p*<0,05, Signifikanzniveau: *p*<0,05, #= Signifikanzniveau vs. basalen Wert erreicht

Tabelle 2: Charakteristika Studie II+ III (MW± SD)

	Hypertensive Krise			Katheter	P Wert
	MW	±	SD	MW ± SD	ANOVA
n [männlich/weiblich]	12 (8m/4w)			5 (5m/0w)	
Alter [Jahre]	68,5	±	10,3	60 ± 16	n.s
BMI[kg/m²]	26	±	4	30,2 ± 5,2	n.s
Creatinin [mg/dl]	1	±	0,18	0,65 ± 0,2	n.s
CRP [mg/dl]	0,6	±	0,05	0,3 ± 0	n.s.
HF [Schläge/min]	87,4	±	9,3	68 ± 8	n.s
systolischer Blutdruck, mmHg	182,7	±	23,4	129,4 ± 23	0.0001
diastolischer Blutdruck, mmHg	94,3	±	17,7	78 ± 11	0.0001
Aktuelle Raucher	5			3	0.0001
Packyears	10,8	±	13,9	17 ± 11	n.s.
Nüchternglucose [mg/dl]	133,4	±	33	±	n.s
GOT [U/l]	27	±	5	36,5 ± 12	n.s.
GPT [U/l]	21,7	±	9,1	42,2 ± 23,4	n.s.
HB [g/dl]	13,8	±	1,5	42,2 ± 23,4	
MCV [fl]	89,3	±	4,3	89,6 ± 2,3	
MCH [pg]	30	±	1,2	30 ± 0,4	

Erklärung: n.s.= nicht signifikant

3.4. Assoziation von mechanischen Endothelschaden und Mikropartikelfreisetzung

Unsere bisherigen Ergebnisse zeigten den Einfluss der arteriellen Hypertonie auf die Mikro- und Makrozirkulation mit einem klaren negativen Effekt auf Gefäßsteifigkeit und Gefäßfunktion. Ähnliche Ergebnisse konnten wir durch eine Katheterintervention als mechanischen Gefäßschaden aufzeigen, so dass wir annehmen, dass arterielle Hypertonie über einen mechanischen Gefäßschaden zu den genannten funktionellen Einschränkungen führt.

Des Weiteren konnte in allen Studien gezeigt werden, dass arterielle Hypertonie, sowie eine Katheterintervention zu einer Erhöhung der endothelialen

Mikropartikelkonzentration und Verschlechterung der Gefäßfunktion führt. Die unten stehende Tabelle zeigt diese Korrelation nochmals deutlich.

So gehen erhöhte Blutdruckwerte mit signifikant erhöhten endothelialen Mikropartikelkonzentrationen einher, sowie auch mit einer erhöhten Pulswellengeschwindigkeit. Die Korrelationen legen nahe, dass erhöhte Blutdruckwerte über eine vermehrte Steifigkeit und sukzessiver vermehrter Augmentation mit der Freisetzung der endothelialen Mikropartikel assoziiert ist ($p=0,013, 0,003, 0,002$).

Auch korrelieren, wie bereits mehrfach beschrieben, endotheliale Mikropartikel invers mit der FMD ($p=0,044, 0,001, 0,0001$).

Interessanterweise korreliert die Freisetzung von CD31⁺/41⁻ Mikropartikel invers mit dem *Wall shear stress* (WSS), (Pearson $r=-0,407, p=0,008$), was darauf hinweist, dass ein reduzierter niedriger WSS die Freisetzung dieser Mikropartikelpopulation triggert. Dies zeigt einen akuten Einfluss von veränderten Fließeigenschaften und damit einhergehenden veränderten mechanischen Kräften im Sinne einer verminderten Schubspannung auf das Gefäßsystem und die Mikropartikelfreisetzung. Interessanterweise ist dies nur bei einer Gattung der endothelialen Mikropartikel zu erkennen. Dagegen zeigen die CD 144⁺ Mikropartikel eine inverse Korrelation zur FDC, welche als Maß für die Compliance der Gefäße angesehen wird ($r=-0,629, p=0,001$). Die Compliance sinkt im Rahmen von chronischen mechanischen Prozessen, so dass ein mechanischer Gefäßschaden als Ursache der Mikropartikelfreisetzung angenommen werden kann. Ungeklärt ist hier allerdings erneut, warum sich dies auf eine Entität der endothelialen Mikropartikel beschränkt.

Darüber hinaus führt eine eingeschränkte Mikrozirkulation, hier abgebildet durch eine LDPI_{max} und AUC, zu einer vermehrten Freisetzung von CD62e⁺ und CD144⁺ Mikropartikel. ($r=0,542, p<0,001; r=-0,366, p=0,024$ bzw. $r=-0,591, p=0,0001; r=-0,462, p=0,004$).

Letztlich konvergieren allerdings die Einflüsse der Mikro- und Makrostrombahn auf die Endothelfunktion, sodass wir hier Korrelationen zwischen der eingeschränkten Endothelfunktion und allen endothelialen Mikropartikelpopulationen sehen.

Tabelle 3: Univariate Korrelation der Mikropartikel (Pearson Korrelation)

	CD31+ CD41-		CD62+		CD144+	
	r	p	r	P	r	P
n=41						
Alter (J)	0,159	0,322	-0,125	0,437	0,261	0,099
BMI (kg/m ²)	0,26	0,036	0,233	0,142	0,263	0,096
Kreatinin (mg/dl)	-0,252	0,112	-0,419	0,006	-0,091	0,572
Harnstoff (mg/dl)	0,026	0,875	-0,43	0,006	-0,125	0,447
Cholesterin (mg/dl)	-0,016	0,924	0,003	0,983	-0,143	0,38
LDL (mg/dl)	-0,025	0,889	0,096	0,597	-0,11	0,542
HDL (mg/dl)	0,016	0,93	0,113	0,532	-0,169	0,347
Triglyceride (mg/dl)	0,083	0,622	0,17	0,307	0,254	0,123
Nüchtern glucose (mg/dl)	-0,044	-0,045	-0,048	0,764	-0,006	0,971
HbA1c (%)	0,327	0,037	0,123	0,444	0,123	0,442
CRP (mg/dl)	0,253	0,341	0,131	0,212	0,231	0,421
Leukozyten *(1000/ul)	0,148	0,355	0,109	0,499	0,411	0,008
Hb (mg/dl)	0,235	0,139	-0,01	0,948	0,133	0,408
Systolischer Blutdruck (mmHg)	0,531	<0,001	0,327	0,037	0,323	0,04
Diastolischer Blutdruck (mmHg)	0,312	0,047	0,354	0,023	0,084	0,601
24 h syst. Blutdruck (mmHg)	0,497	0,002	0,439	0,006	0,383	0,018
24 h diast. Blutdruck (mmHg)	0,238	0,162	0,534	0,001	0,049	0,775
Zentraler syst. Blutdruck (mmHg)	0,525	<0,001	0,324	0,045	0,37	0,02
Zentraler diast. Blutdruck (mmHg)	0,255	0,117	0,272	0,093	-0,042	0,801
Blutdruckamplitude (PP)	0,501	0,001	0,189	0,25	0,456	0,004
LDPI baseline (PU)	0,212	0,201	-0,02	-0,239	-0,151	0,364
LDPI max (PU)	-0,137	0,411	0,542	<0,001	-0,366	0,024
AUC	-0,146	0,381	-0,591	0,0001	-0,462	0,004
AIX	0,296	0,06	0,336	0,034	0,636	0,0001
PWV (m/s)	0,396	0,013	0,465	0,003	0,477	0,002
Durchmesser Arterie (mm)	0,571	<0,001	0,218	0,171	0,237	0,136
FMD (%)	-0,316	0,044	-0,499	0,001	-0,62	0,0001
FDc (%)	-0,302	0,055	-0,291	0,65	-0,629	0,001
WSS	-0,407	0,008	-0,052	0,748	-0,062	0,699
maximal WSS	-0,518	0,001	-0,174	0,278	-0,293	0,063
RBC deformability	0,371	0,02	-0,189	n.s.	-0,2	n.s.

Erklärung: r= Korrelationskoeffizient nach Pearson, p= Signifikanzwert

4. Diskussion

4.1 Assoziation von Mikropartikeln und endothelialer Dysfunktion

Die Frage nach einer Korrelation von Mikropartikeln und endothelialer Dysfunktion ist bis heute ein wichtiger Gegenstand der Forschung. Hierfür wurden viele Krankheitsbilder untersucht und der Frage nachgegangen, ob Mikropartikel Marker oder Effektor der endothelialen Dysfunktion darstellen. Diese Frage konnte bis heute noch nicht abschließend geklärt werden. Unsere Ergebnisse zeigten klar eine inverse Korrelation zwischen der Mikropartikelkonzentration und der FMD als Maß für die Endothelfunktion.

Schon Werner et al. konnten 2006 zeigen, dass endotheliale Mikropartikel mit der endothelialen Dysfunktion bei Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt positiv korrelierten. Dabei wurde die endotheliale Dysfunktion an einer koronaren Gefäßrelaxation nach Injektion von Acetylcholin während einer Koronarangiographie gemessen. Eine ähnliche inverse Korrelation zwischen der Menge der endothelialen Mikropartikel, sowie der Endothelfunktion bei KHK, konnte auch für die FMD Messung dargelegt werden (26). Passend zu diesem ergaben weitere Untersuchungen, dass endotheliale CD144⁺ Mikropartikel invers mit dem brachialen Shear Stress korrelierten, welcher als zentrales Element der FMD Messung gilt. Auch dadurch kann eine Korrelation zur Endothelialen Dysfunktion gezeigt werden (4). In früheren Publikationen konnte schon gezeigt werden, dass niedriger Wand Shear Stress, welcher z.B. bei hohen Blutdruckwerten zu beobachten ist, die FMD und Gefäßsteifigkeit verschlechtert, wodurch eine negative Korrelation zwischen endothelialen Mikropartikeln und Shear Stress, sowie eine positive Korrelation zwischen Blutdruck und endothelialen Mikropartikeln besteht. Interessanterweise ist dies nie bei Plättchenmikropartikeln beobachtet worden. Auch fehlen Daten von leukozytären oder erythrozytären Mikropartikeln. Amabile et al. konnten im Rahmen der Frammingham Studie zeigen, dass Mikropartikel mit kardiovaskulären Risikofaktoren assoziiert sind (53) und als Marker der endothelialen Dysfunktion dienen können.

Andere Studien geben dagegen Hinweise darauf, dass Mikropartikel über eine Minderung der Bioverfügbarkeit von NO auch als Effektor der endothelialen Dysfunktion fungieren können. Passend hierzu zeigten Mausversuche, in denen Mäusen Mikropartikel von Patienten mit metabolischem Syndrom gespritzt worden

waren, eine deutliche Verschlechterung der Acetylcholin vermittelten Gefäßrelaxation (54). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Mikropartikel die Aktivität der eNOS über eine Bindung an die Phosphatidylinositol-3-kinase, sowie extrazelluläre Signalwege signifikant mindern können (55). Auch können endotheliale Mikropartikel die Ser1179- eNOS phosphorylase vermindern (27). Zusätzlich wirken Mikropartikel aktivierend auf neutrophile Granulozyten (56) und können damit zusätzlich zu der bereits beschriebenen Fähigkeit zur Ausbildung von Adhäsionsmolekülen einen proinflammatorischen Effekt ausüben. In Folge dieser Prozesse werden freie Radikale freigesetzt, die von Stickstoffmonoxid abgefangen werden, welches dann nicht mehr zur Gefäßrelaxation zur Verfügung steht. Dieser nachgewiesene negative Effekt von Mikropartikeln auf die endotheliale Funktion (eNOS und ROS) wurde bereits in vielen Krankheitsbildern, wie z.B. Arteriosklerose, Diabetes, Rauchen, Metabolisches Syndrom, akuter Myokardinfarkt, Schlafapnoe, Präeklampsie, pulmonaler Hypertonie beschrieben. Einige wenige andere Publikationen berichten dagegen über einen positiven Effekt von Mikropartikel auf die Endothelfunktion. So beschrieben Agouni et. al. einen positiven Effekt von T-Zell Mikropartikeln, als Träger von Mikro RNA und Sonic hedgehog, auf die Endothelzellen und deren NO Produktion (57). Auch andere Untersuchungen zeigten, dass Mikropartikel von gesunden Probanden keinen negativen Effekt auf die Expression der eNOS Synthase aufwiesen (58). Auch in unseren Ergebnissen konnte eine klare inverse Korrelation der Mikropartikelkonzentration mit der Endothelfunktion, gemessen durch FMD, festgestellt werden. Diese Korrelation bestand sowohl in akuten, wie auch in chronischen Krankheitsbildern. Zudem konnten unsere Ergebnisse auch Veränderungen der endothelialen Funktion und der Mikropartikelkonzentration im Verlauf von wenigen Stunden zeigen, wobei hier auch immer eine inverse Korrelation vorlag. Diese Dynamik über wenige Stunden und Tage deutet darauf hin, dass Mikropartikel in der Lage sind einen Progress der endothelialen Dysfunktion zu begünstigen oder ihn sogar kausal zu begründen.

4.2 Assoziation Hypertonie und Endotheliale Dysfunktion

Die Ergebnisse unserer Arbeit zeigten eine klare Assoziation von arterieller Hypertonie und endothelialer Dysfunktion gemessen durch Flow mediated dilation. Diese Methode beruht auf einer Messung einer durch NO vermittelte Gefäßdilatation nach Stauung. Es zeigte sich eine klar verminderte FMD bei Hypertonie Patienten. Die Frage nach Ursache und Wirkung dieser Korrelation ist dabei nicht klar zu beantworten und bis heute Bestandteil wichtiger Untersuchungen.

In der Ätiologie der arteriellen Hypertonie lassen sich generell zwei verschiedene Formen der Hypertonie unterscheiden. Zum einen die primäre arterielle Hypertonie, auch essenzielle arterielle Hypertonie genannt, welche mit ca. 95% die häufigste Form der Hypertonie darstellt und zum anderen die sekundäre arterielle Hypertonie, der verschiedene Krankheitsbilder, wie beispielsweise das Cushing Syndrom, Conn Syndrom, Phäochromozytom oder die Hyperthyreose ursächlich zu Grunde liegen. Insgesamt gibt es pathogenetisch eine große Anzahl an Faktoren, die zu einer verminderten Bioverfügbarkeit von NO führen können und somit eine endotheliale Dysfunktion bedingen können. Zunächst spielen Alter und Geschlecht eine Rolle. Alter kann über eine Aktivierung der Proteinkinase G und über andere Tyrosinkinase zur inhibierenden Phosphorylierung der eNOS führen, weiterhin können Östrogene das Ageing und endotheliale Dysfunktion durch Erhöhung von NO und Erniedrigung von reaktiven Sauerstoffspezies reduzieren (59). Aus diesem Grund wurden im Rahmen unserer Studie zur Charakterisierung der Endothelfunktion ausschließlich Alters gematchte männliche Probanden verwendet. Auch andere Einflüsse, wie Genetik, Komorbiditäten, Diabetes Mellitus Typ 2 und damit verbundenen hohen Glukosespiegeln, Dyslipidämie, oder metabolischen Syndrom führen über Inflammation, ROS und glykosylierten Proteinen (AGEs) zu strukturellen Gefäßveränderungen (60) und einer Minderung von Stickstoffmonoxid.

Des Weiteren führt die arterielle Hypertonie an sich zu einem chronisch inflammatorischen Reiz am Endothel, der zum einen wieder über die Produktion von ROS zur Minderung von NO führt, andererseits zu einer Hochregulation des sympathischen autonomen Nervensystem führt und somit auch eine

Gefäßkonstriktion bedingen kann. Unter diesem chronischen Einfluss des sympathischen Systems ist eine NO vermittelte Gefäßdilataion deutlich erschwert. Zusätzlich entsteht durch die ständige Druckbelastung im Zuge der arteriellen Hypertonie ein Gefäßschaden, dem ständige Reparaturprozesse, sowie strukturelle Gefäßveränderungen folgen. Mit diesen strukturellen Gefäßveränderungen geht auch eine Änderung des Shear stress einher. Hierdurch kann es zur Freisetzung von endothelialen Mikropartikeln kommen, die wiederum ebenfalls Einfluss auf die endotheliale Funktion nehmen können (61). Es ist bekannt, dass es im Rahmen der arteriellen Hypertonie vermehrt zu einer turbulenten Strömung innerhalb des Gefäßes kommen kann. Hierdurch geht ein protektiver Effekt der laminaren Strömung und des laminaren Shear Stress auf die Gefäßfunktion verloren, denn laminärer Shear Stress führt über verschiedene Signalkaskaden zur Vasodilatation. So stimuliert es die NO Freisetzung in Endothelzellen (62, 63), nimmt Einfluss auf die NO Produktion durch Hochregulierung der NOS exprimierenden Gene, sowie auf die Aktivierung von Protein Kinasen, die einen stimulierenden Einfluss auf die endotheliale NO Synthase haben (64).

Auch die Expression anderer Vasodilatoren, wie Prostacyclin oder das Natriuretische Peptid werden durch laminaren Shear Stress verstärkt (65), sowie vasokonstriktorisches Faktoren, wie Endothelin-1, ACE, supprimiert (66). Durch den Verlust dieses laminaren Shear Stress in einer turbulenten Strömung sinkt also die NO Bioverfügbarkeit, das zentrale Element der endothelialen Funktion.

Einen weiteren bedeutenden Einfluss auf die NO Bioverfügbarkeit nimmt das im Rahmen der arteriellen Hypertonie oftmals erhöhte Angiotensin ein. Angiotensin erhöht die NADPH Oxidase und aktiviert die COX, wodurch es wiederum zu einer Erhöhung der ROS kommt (67).

Obwohl in einigen Versuchen an Ratten auch eine Erhöhung von Stickstoffmonoxid im Rahmen einer spontanen arteriellen Hypertonie festgestellt worden ist (68) und auch eine NO unabhängige endotheliale Dysfunktion nachgewiesen werden (69) konnte, ist also davon auszugehen, dass im Rahmen der arteriellen Hypertonie eine verminderte Verfügbarkeit von Stickstoffmonoxid vorliegt und die endotheliale Dysfunktion als sekundär anzusehen ist.

Es gibt in der heutigen Literatur aber auch Hinweise darauf, dass die endotheliale Dysfunktion auch ursächlich auf die Entstehung einer arteriellen Hypertonie wirken kann. So konnte hoher Blutdruck auch durch NO Inhibition (70, 71) mittels L-NAME in Tieren induziert werden. Auch erhöht ein NO Defizit, wie es im Rahmen der endothelialen Dysfunktion vorliegt, die Ausschüttung von vasokonstriktorisches Faktoren wie Endothelin-1 (72) und erhöht damit den peripheren Widerstand. Weiterhin führt ein NO Defizit zur Veränderung/*Remodelling* des Gefäßbettes (73), sowie über eine Expression der Cyclooxygenase zur Erhöhung von ROS und damit wieder zu NO Verfügbarkeitsminderung (74). Insgesamt ist aber aufgrund der großen Anzahl an Einflussfaktoren auf die Endothelfunktion und der oftmals multifaktoriellen Genese der arteriellen Hypertonie die endotheliale Dysfunktion als Folge der Hypertonie zu bewerten. In unseren Ergebnissen zeigte sich auch eine Verschlechterung der Gefäßfunktion durch die arterielle Hypertonie unabhängig von anderen Komorbiditäten. Es ist aber durchaus davon auszugehen, dass die endotheliale Dysfunktion den Progress einer Hypertonie begünstigen und verstärken kann.

4.3 Zusammenhang Makro- und Mikrozirkulation

In unseren Studien konnten wir neben den Effekten von arterieller Hypertonie auf die endotheliale Dysfunktion auch andere Auswirkungen auf die Makro- und Mikrozirkulation herausstellen. So konnte gezeigt werden, dass es unter dem Einfluss von KHK und arterieller Hypertonie zu einer erhöhten Pulswellengeschwindigkeit, sowie Gefäßsteifigkeit kommt und zusätzlich die Durchblutung in den Kapillaren der Mikrozirkulation herabgesetzt ist. Dies wurde im Rahmen unserer Studie durch eine Laserdoppler Untersuchung der Haut erfasst.

Es ist bekannt, dass Gefäßsteifigkeit als eigener Prädiktor für arterielle Hypertonie (75) fungieren kann. Dabei sind die Gründe für eine erhöhte Gefäßsteifigkeit, sowie Pulswellengeschwindigkeit vielschichtig. Ähnlich zu den Einflüssen auf den Stickstoffmonoxidstoffwechsel spielen auch hier strukturelle Gefäßveränderungen im Rahmen von Komorbiditäten und metabolischen Prozessen eine Rolle. Des Weiteren nehmen aber auch andere hämodynamische Faktoren eine wichtige Rolle in der Entwicklung einer zunehmenden Gefäßsteifigkeit ein. Nach dem Gesetz des französischen Wissenschaftlers LaPlace ist die Wandspannung eines Gefäßes oder Hohlorgans direkt abhängig vom transmuralen Druck, sowie vom Radius des Gefäßes und der Wanddicke. ($K = P \cdot r / (2 \cdot d)$) Da eine konstante Wandspannung für eine laminäre Strömung und konstanten Shear stress essentiell ist, muss das Gefäß auf einen erhöhten transmuralen Druck, welcher bei arterieller Hypertonie vorliegt, reagieren. Die Antwort des Gefäßes ist dabei abhängig von der myogenen Kontraktionsfähigkeit des Gefäßes. Dieser ist invers korreliert mit dem Durchmesser der Arterien (76) und führt dazu, dass kleinere Arteriolen die Wandspannung durch eine Kontraktion senken, während größere Arterien die Wandspannung über eine Mediahypertrophie regulieren. Die durch diese Kompensationsmaßnahmen entstehenden Veränderungen des Lumen und der Wanddicke führen zu einem erhöhten peripheren Widerstand und einer Flussbeschleunigung, dienen aber auch dem Schutze der kleinen Kapillaren in der Mikrozirkulation vor Schäden infolge eines zu hohen Druckes. Durch die Kontraktion der kleineren Arteriolen kommt es allerdings auch zu einer Blutflussminderung im nachgeschalteten Gebiet. Dies kann schließlich zur Unterversorgung in den nachgeschalteten Kapillaren führen und damit Zelluntergang, Mikropartikel Freisetzung und Verkleinerung des Gefäßquerschnitt

begünstigen (61). Dies geschieht vorwiegend dadurch, dass nicht durchblutete Kapillaren keinen Shear Stress mehr aufrecht erhalten können und damit über eine verminderte NO Produktion zu Zell Apoptose und Gefäßrarifizierung führen (77). Diese mikrovaskuläre Veränderungen haben also Konsequenzen für die Gewebe Perfusion, den Metabolismus, die Anfälligkeit für Ischämie, den peripheren Widerstand und den Blutdruck. Das Maß der Hautdurchblutung ist dabei ein guter Marker für mikrovaskuläre Funktion und Widerstand (78) und wurde auch im Rahmen unserer Studie bestimmt. Durch die hier beschriebenen Prozesse besteht also ein erster Zusammenhang zwischen unseren Ergebnissen zur Untersuchung der Mikro- und Makrozirkulation und erklärt einen ersten Zusammenhang.

Aber auch Veränderungen in der Mikrozirkulation können für Veränderungen in den vorgeschalteten Arterien und in der Makrozirkulation sorgen. Einen entscheidenden Einfluss nehmen dabei Veränderungen in der Mikrozirkulation auf die Pulswellen Reflexion und die Überlagerung der einzelnen Wellen. Normalerweise ist die Pulswelle zweiphasig mit einer früher systolischen- und einer diastolischen Welle. Liegen, wie oben bereits beschrieben, strukturelle Änderungen im Bereich der Mikrozirkulation vor, beispielsweise eine Gefäßrarifizierung in der Peripherie, werden die Wellen verstärkt reflektiert und es kommt zu einer Überlagerung der Wellen (79). Damit erhöht sich vor allem der systolische Blutdruck und es kommt zu einer Zunahme der Pulswellengeschwindigkeit bzw. einer weiteren Zunahme der Gefäßsteifigkeit (80). Makro- und Mikrozirkulation bedingen sich gegenseitig (81). Wir konnten im Kontext dieser Arbeit zeigen, dass die arterielle Hypertonie mit einer reduzierten mikrozirkulatorischen Funktion assoziiert ist. Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass die Verformbarkeit der Erythrozyten durch arterielle Hypertonie geschädigt wird und somit die mikrozirkulatorischen Veränderungen bedingen können. Diese Veränderungen wirken sich auch auf die Makrozirkulation aus und zeigen die Folgen von druckinduziertem Endothelschäden.

4.4 Assoziation arterieller Hypertonie und Mikropartikel

In unserer Arbeit konnten wir verschiedene Einflüsse von arterieller Hypertonie auf die Gefäßfunktion nachweisen. Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einer arteriellen Hypertonie eine verminderte Gefäßfunktion aufweisen, eine erhöhte Pulswellengeschwindigkeit und Gefäßsteifigkeit besitzen und über erhöhte Mikropartikelspiegel verfügen. Hypertoniker und Patienten mit einer KHK und arterieller Hypertonie wiesen dabei vor allem erhöhte endotheliale Mikropartikel, sowie Plättchenmikropartikel auf. Schon Preston et al. konnten zeigen, dass endotheliale Mikropartikel mit erhöhten systolischen und diastolischen Blutdruck Werten positiv korrelierten (82). Auch andere Publikationen konnten hier eine Korrelation beweisen (83, 84). Des Weiteren konnte durch Wang et al. auch eine Korrelation von endothelialen Mikropartikel und einer gesteigerten Pulswellengeschwindigkeit aufgezeigt werden (85). Auch diesen Zusammenhang zeigen unsere Ergebnisse. Einen kausalen Ansatz hierzu könnten auch wiederum Veränderungen der Hämodynamik im Zuge der arteriellen Hypertonie liefern. So verursacht der Verlust von laminären Shear Stress eine Aktivierung der RhoKinase und ERK1/2, eine Zytoskelettänderung und in der Folge eine Mikropartikelfreisetzung (61). Weiterhin inhibieren laminäre Strömung und laminärer Shear Stress die endotheliale Proliferation (86) und die Rate an Apoptosen. Diese stellen, wie bereits im Teil „Einleitung“ beschrieben, den wesentlichen Reiz zur Mikropartikelfreisetzung dar. Auch kommt es über eine Hochregulation der Superoxidismutase (87) zur Senkung der reaktiven Sauerstoffspezies und damit zur Senkung der Mikropartikelfreisetzung. Turbulente Strömung erhöht dagegen die Apoptose Rate (88). Einen weiteren Grund für die erhöhten endothelialen Mikropartikelspiegel bei arterieller Hypertonie stellen der chronische inflammatorische Reiz, sowie der druckinduzierte Endothelschaden dar.

Unsere Versuche zeigten aber auch einen Anstieg der Plättchenmikropartikel im Rahmen der arteriellen Hypertonie. Dieser Zusammenhang von Plättchenmikropartikeln und arterieller Hypertonie ist bisher kaum beschrieben, könnte aber eine zusätzliche Erklärung für das vermehrte Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen bei arterieller Hypertonie darstellen. Wie bereits oben beschrieben können Plättchenmikropartikel, Derivate von Thrombozyten, als zusätzliche Quelle von Thromboxan A₂ und des Tissue Faktors dienen und somit

andere Plättchen binden und aktivieren. Auch exprimieren diese P-Selectin zur Bindung weiterer Thrombozyten und können über einen Glykolipid Liganden leukozytäre Mikropartikel binden(27). Diese können also sowohl Thrombosen und Embolien, aber auch eine Plaque Entstehung und Progression begünstigen.

Eine Theorie zur Entstehung dieser prothrombotischen Plättchenmikropartikel liefern derweil Cordazello et al. Diese beschreiben eine durch Angiotensin II, ein zentraler Botenstoff der arteriellen Hypertonie, induzierte Freisetzung von prothrombotischen Mikropartikel (89). Auch Yang et al. konnten eine vermehrte Freisetzung endothelialer Mikropartikel durch Angiotensin II nachweisen und diese durch einen p38 Inhibitor medikamentös senken (90).

Insgesamt lässt sich festhalten, dass sowohl endotheliale, als auch Plättchenmikropartikel im Rahmen der arteriellen Hypertonie erhöht sind und somit als prognostischer Marker dienen können. Des Weiteren sollten sie durch ihre nachgewiesene Wirkung auch als therapeutisches Ziel aktueller Behandlungen dienen. Unsere Ergebnisse zeigen diese Assoziation zwischen Mikropartikeln und arterieller Hypertonie deutlich und belegen zusätzlich eine verminderte Gefäßfunktion im Rahmen dieses Zusammenhangs.

Im Rahmen unserer Studie konnten wir auch den akuten Einfluss der arteriellen Hypertonie im Rahmen der hypertensiven Entgleisung untersuchen. Hier zeigten sich, wie bereits auch von Preston et al. beschrieben, hohe Mikropartikelkonzentrationen. Zusätzlich konnten wir aber auch durch eine Senkung des Blutdruckes mittels Uradipil eine hiermit eingehende Verminderung der endothelialen Mikropartikelkonzentration aufdecken. Dieser direkte medikamentöse Einfluss auf die Mikropartikelkonzentration ist in der Literatur bisher wenig beschrieben. Nomura et al. konnten eine Senkung der Mikropartikelkonzentration durch eine Behandlung mittels Valsartan nachweisen, allerdings gelang dies nur bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ II (91). Ähnliche Ergebnisse konnten durch Georgescu et al. präsentiert werden, die einen positiven Effekt von Irbesartan auf endotheliale-, leukozytäre- und Plättchenmikropartikel in Hamstern nachweisen konnten (92). Des Weiteren konnte auch eine signifikante Minderung der endothelialen- und Plättchenmikropartikelspiegel durch Spironolaktone bei hypertensiven Ratten nachgewiesen werden (93). Alle diese medikamentösen Interventionen beziehen

sich auf das Renin- Angiotensin-Aldosteron System und senken den mechanischen Schaden am Endothel, verbessern die strukturelle Integrität durch Erhöhung von endothelialen Vorläuferzellen und wirken dem prothrombotischen und proinflammatorischen Effekt von Angiotensin II entgegen. Die meisten dieser Versuche wurden allerdings über einen längeren Zeitraum *in vitro* durchgeführt. Die Ergebnisse unserer Arbeit legen aber auch einen kurzfristigen medikamentösen Effekt auf die Mikropartikelkonzentration *in vivo* nahe, der Ansatzpunkt nachfolgender Forschungsprojekte sein könnte.

4.5 Einfluss eines interventionellen Gefäßschadens auf die Gefäßfunktion

In einer weiteren Untersuchungsreihe haben wir den Einfluss einer Katheterintervention auf die Endothelfunktion untersucht. Dieser Versuchsarm sollte den Einfluss einer akuten Gefäßverletzung auf die Mikropartikelkonzentration und die Gefäßfunktion darstellen. Hierzu wurden fünf Probanden, die sich einer diagnostischen Herzkatheter Untersuchung unterzogen in die Studie eingeschlossen und zu verschiedenen Zeitpunkten die Mikropartikel Spiegel, sowie die Gefäßfunktion mittels FMD untersucht. Die Ergebnisse zeigten dabei einen signifikanten Anstieg der endothelialen Mikropartikelkonzentration, eine- bzw. vier Stunden nach Koronarangiographie, sowie einen leichten Abfall der Konzentrationen nach 24 Stunden. Die Plättchenmikropartikel konnten nur eine Stunde nach Intervention einen signifikanten Anstieg verzeichnen und fielen schnell auf das Ausgangsniveau ab. Des Weiteren gingen auch hier erhöhte endotheliale Mikropartikel Spiegel mit einer verminderten FMD einher.

Die Untersuchung des Einflusses einer Koronarangiographie auf die endotheliale Mikropartikelkonzentration ist ein bisher wenig untersuchtes Feld. Vorangegangene Forschungsprojekte beschränkten sich bei Untersuchungen zum Gefäßschaden durch eine Koronarangiographie auf die Analyse ganzer zirkulierender endothelialen Zellen (CEC). So konnten Sbarbati et al. 1991 erstmals eine 3-4 fache Erhöhung der zirkulierenden endothelialen Zellen im peripheren Blut nach einer diagnostischen Koronarangiographie ohne Intervention nachweisen (94). Dinat-George et al. bewiesen 1992 sogar eine 13- fache Erhöhung der zirkulierenden endothelialen Zellen nach einer Koronarangiographie

mit Intervention (95). In 2 verschiedenen Studien zeigten Boos et al. 2007 lediglich einen Anstieg der zirkulierenden endothelialen Zellen nach einer Koronarangiographie mit Intervention, während dieser Anstieg bei einer rein diagnostischen Koronarangiographie ohne Intervention ausblieb (96, 97) und begründeten dies durch den Einsatz kleinerer Sonden, sowie einer anderen Technik zur Detektion der zirkulierenden endothelialen Zellen. Alle diese Studien untersuchten dabei keine Mikropartikelkonzentrationen, sowie keinen zeitlichen dynamischen Verlauf der endothelialen Zellen nach Intervention. Des Weiteren lieferten sie keinen Bezug zur endothelialen Funktion. Unsere Daten zeigen einen Anstieg der endothelialen Mikropartikel nach Koronarangiographie ohne Intervention und geben somit Hinweise auf einen endothelialen Gefäßschaden. Dies muss aber nicht zwangsläufig im Widerspruch zu Boos Daten stehen, vielmehr könnte die Untersuchung der endothelialen Mikropartikel eine sensitivere Messung des Gefäßschadens darstellen. Weiterhin können auch hier Unterschiede in den Untersuchungsbedingungen der Koronarangiographie vorliegen. Einen zeitlichen Verlauf der zirkulierenden endothelialen Zellen nach einer Koronarangiographie mit Intervention untersuchten Bonello et al. 2006. Diese untersuchten die zirkulierenden endothelialen Zellen 6-, 24-, 48- und 168 Stunden nach der Koronarangiographie und stellten einen Anstieg der Zellen in den ersten 6 Stunden nach der Koronarangiographie fest, sowie einen deutlichen Abfall der Konzentrationen innerhalb von 24 bis 48 Stunden nach Koronarangiographie. Nach 7 Tagen erreichten die Werte wieder das Ausgangsniveau (98). Diese Daten decken sich weitestgehend mit unseren Messungen der Mikropartikelkonzentration, denn auch wir konnten einen signifikanten Anstieg der Mikropartikelkonzentrationen 4 Stunden nach Koronarangiographie, sowie einen leichten Abfall der Konzentrationen innerhalb von 24 Stunden nachweisen. Dieser Effekt stellt sicherlich eine Folge von direktem Endothelschaden durch den Katheter, sowie von nachfolgenden Reparaturprozessen dar. Unsere Daten zeigen aber weiterhin auch einen Anstieg der Mikropartikelkonzentrationen, sowie einen Abfall der FMD nur 1 Stunde nach Koronarangiographie. Eine Erklärung dieses Phänomens liefern dabei die Daten von Bann et al., die einen frühen Anstieg der freien Sauerstoffradikale nach Koronarangiographie feststellten und einen endothelialen Schaden hieraus innerhalb der ersten Stunde nach Intervention nachweisen konnten (99). Diese

freien Sauerstoffradikale sind in der Lage weitere Apoptosen und Inflammation auszulösen und somit die Mikropartikelsynthese zu stimulieren, welches eine Erklärung für die im Verlauf weiter steigende endotheliale Mikropartikel Spiegel sein könnte. Wie bereits beschrieben sind endotheliale Mikropartikel in der Lage die Ausprägung von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen zu erhöhen und somit nach erfolgter Koronarangiographie eine Restenosierung und weitere Inflammation zu fördern. Einen Hinweis auf diesen Zusammenhang liefern dabei die Daten von Kilickap et. al, die eine erhöhte Konzentration des Adhäsionsmolekül E- Selectin nach einer Koronarangiographie nachweisen konnten. Diese Erhöhung des E-Selectin zeigte sich aber nur bei Patienten mit einer späteren Restenosierung (100). Auch unsere Daten zeigen eine Erhöhung der CD62+ Mikropartikel, die wie bereits im Teil „Material und Methoden“ beschrieben, auch E- Selectin Moleküle tragen und somit einen Beitrag zur Restenosierung nach einer Herzkatheter Untersuchung beitragen könnten. Allerdings gibt unsere Studie dabei keine Auskunft darüber, ob diese CD62+ endothelialen Mikropartikel aus den Koronarien stammen, oder beispielsweise schon bei Punktion der Leiste freigesetzt worden sind. Auch ist die Stichprobe mit 5 Probanden nicht groß genug, um hier genaue Rückschlüsse zu ziehen.

Im Gegensatz zu endothelialen Mikropartikel ist der Einfluss einer Koronarangiographie auf die Plättchenmikropartikelkonzentration gut untersucht. So konnten schon mehrere Studien (101-103) eine Erhöhung der Plättchenmikropartikel Spiegel bis zu 48 Stunden nach einer Koronarangiographie nachweisen. Auch konnte in diesen Studien eine erhöhte Konzentration des Adhäsionsmolekül P-Selectin festgestellt werden, dessen Werte aber immer nach 24 Stunden auf das Ausgangsniveau abfielen. Weiterhin konnten die Konzentrationen der Plättchenmikropartikel durch die Gabe des Glykoprotein-GPIIb/IIIa-Rezeptor Blocker Abciximab gesenkt werden (103). Insgesamt lässt sich also auch hier vermuten, dass Plättchenmikropartikel zur Rethrombosierung und Restenosierung nach einer Koronarangiographie beitragen können. Unsere Daten präsentieren dagegen nur einen leichten Anstieg der Plättchenmikropartikel eine Stunde nach Koronarangiographie und fallen in der Folge wieder auf das Ausgangsniveau ab. Dies könnte darin begründet liegen, dass wir ausschließlich periphere venöse Blutproben entnommen haben, während oben genannten Studien Proben aus dem Sinus coronarius entnommen haben.

Insgesamt zeigen unsere Daten also eine Erhöhung der endothelialen Mikropartikelkonzentrationen nach Koronarangiographie, sowie eine damit einhergehende verschlechterte Gefäßfunktion. In Zusammenschau der aktuellen Literatur können Mikropartikel als sensitives Maß für eine Gefäßschädigung über Stunden und Tage dienen und eventuell über Veränderungen am Endothel zu kardiovaskulären Ereignissen beitragen.

5. Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Su TC, Jeng JS, Chien KL, Sung FC, Hsu HC, Lee YT. Hypertension status is the major determinant of carotid atherosclerosis: a community-based study in Taiwan. *Stroke*. 2001;32(10):2265-71.
2. Kannel WB. Blood pressure as a cardiovascular risk factor: prevention and treatment. *JAMA*. 1996;275(20):1571-6.
3. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med*. 1989;320(14):915-24.
4. Boulanger CM, Amabile N, Guerin AP, Pannier B, Leroyer AS, Mallat CN, et al. In vivo shear stress determines circulating levels of endothelial microparticles in end-stage renal disease. *Hypertension*. 2007;49(4):902-8.
5. Bunting S, Gryglewski R, Moncada S, Vane JR. Arterial walls generate from prostaglandin endoperoxides a substance (prostaglandin X) which relaxes strips of mesenteric and coeliac arteries and inhibits platelet aggregation. *Prostaglandins*. 1976;12(6):897-913.
6. Weksler BB, Marcus AJ, Jaffe EA. Synthesis of prostaglandin I₂ (prostacyclin) by cultured human and bovine endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74(9):3922-6.
7. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980;288(5789):373-6.
8. Forstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*. 2012;33(7):829-37, 37a-37d.
9. Lee R, Channon KM, Antoniades C. Therapeutic strategies targeting endothelial function in humans: clinical implications. *Curr Vasc Pharmacol*. 2012;10(1):77-93.
10. Guzik TJ, Mussa S, Gastaldi D, Sadowski J, Ratnatunga C, Pillai R, et al. Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*. 2002;105(14):1656-62.
11. Park JB, Schiffrin EL. Small artery remodeling is the most prevalent (earliest?) form of target organ damage in mild essential hypertension. *J Hypertens*. 2001;19(5):921-30.
12. Rizzoni D, Porteri E, Guelfi D, Muiesan ML, Valentini U, Cimino A, et al. Structural alterations in subcutaneous small arteries of normotensive and hypertensive patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation*. 2001;103(9):1238-44.
13. Landmesser U, Spiekermann S, Dikalov S, Tatge H, Wilke R, Kohler C, et al. Vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure: role of xanthine-oxidase and extracellular superoxide dismutase. *Circulation*. 2002;106(24):3073-8.
14. Bolton CH, Downs LG, Victory JG, Dwight JF, Tomson CR, Mackness MI, et al. Endothelial dysfunction in chronic renal failure: roles of lipoprotein oxidation and pro-inflammatory cytokines. *Nephrol Dial Transplant*. 2001;16(6):1189-97.

15. Monnink SH, van Haelst PL, van Boven AJ, Stroes ES, Tio RA, Plokker TW, et al. Endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease: a comparison of three frequently reported tests. *J Investig Med*. 2002;50(1):19-24.
16. Engler MM, Engler MB, Malloy MJ, Chiu EY, Schloetter MC, Paul SM, et al. Antioxidant vitamins C and E improve endothelial function in children with hyperlipidemia: Endothelial Assessment of Risk from Lipids in Youth (EARLY) Trial. *Circulation*. 2003;108(9):1059-63.
17. Taddei S, Virdis A, Mattei P, Ghiadoni L, Sudano I, Salvetti A. Defective L-arginine-nitric oxide pathway in offspring of essential hypertensive patients. *Circulation*. 1996;94(6):1298-303.
18. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet*. 1992;340(8828):1111-5.
19. Suwaidi JA, Hamasaki S, Higano ST, Nishimura RA, Holmes DR, Jr., Lerman A. Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation*. 2000;101(9):948-54.
20. Chakrabarti S, Blair P, Freedman JE. CD40-40L signaling in vascular inflammation. *J Biol Chem*. 2007;282(25):18307-17.
21. Khan BV, Harrison DG, Olbrych MT, Alexander RW, Medford RM. Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(17):9114-9.
22. Rossi R, Chiurlia E, Nuzzo A, Cioni E, Origliani G, Modena MG. Flow-mediated vasodilation and the risk of developing hypertension in healthy postmenopausal women. *J Am Coll Cardiol*. 2004;44(8):1636-40.
23. Halcox JP, Schenke WH, Zalos G, Mincemoyer R, Prasad A, Waclawiw MA, et al. Prognostic value of coronary vascular endothelial dysfunction. *Circulation*. 2002;106(6):653-8.
24. Modena MG, Bonetti L, Coppi F, Bursi F, Rossi R. Prognostic role of reversible endothelial dysfunction in hypertensive postmenopausal women. *J Am Coll Cardiol*. 2002;40(3):505-10.
25. Sanchez-Recalde A, Galeote G, Moreno R, Dobarro D, Gomez-Rubin MC, Calvo L, et al. Long-term prognostic value of endothelial dysfunction in patients with chest pain and angiographically normal coronary arteries. *Rev Port Cardiol*. 2009;28(7-8):785-91.
26. Boulanger CM, Amabile N, Tedgui A. Circulating microparticles: a potential prognostic marker for atherosclerotic vascular disease. *Hypertension*. 2006;48(2):180-6.
27. Rautou PE, Vion AC, Amabile N, Chironi G, Simon A, Tedgui A, et al. Microparticles, vascular function, and atherothrombosis. *Circ Res*. 2011;109(5):593-606.
28. Piccin A, Murphy WG, Smith OP. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev*. 2007;21(3):157-71.
29. Bernal-Mizrachi L, Jy W, Fierro C, Macdonough R, Velazques HA, Purow J, et al. Endothelial microparticles correlate with high-risk angiographic lesions in acute coronary syndromes. *Int J Cardiol*. 2004;97(3):439-46.
30. Werner N, Wassmann S, Ahlers P, Kosiol S, Nickenig G. Circulating CD31+/annexin V+ apoptotic microparticles correlate with coronary endothelial function in patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(1):112-6.
31. Joannides R, Haefeli WE, Linder L, Richard V, Bakkali EH, Thuillez C, et al. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation*. 1995;91(5):1314-9.
32. Dawson EA, Whyte GP, Black MA, Jones H, Hopkins N, Oxborough D, et al. Changes in vascular and cardiac function after prolonged strenuous exercise in humans. *J Appl Physiol* (1985). 2008;105(5):1562-8.
33. Hijmering ML, de Lange DW, Lorscheid A, Kraaijenhagen RJ, van de Wiel A. Binge drinking causes endothelial dysfunction, which is not prevented by wine polyphenols: a small trial in healthy volunteers. *Neth J Med*. 2007;65(1):29-35.

34. Doshi SN, Naka KK, Payne N, Jones CJ, Ashton M, Lewis MJ, et al. Flow-mediated dilatation following wrist and upper arm occlusion in humans: the contribution of nitric oxide. *Clin Sci (Lond)*. 2001;101(6):629-35.
35. Markos F, Ruane O'Hora T, Noble MI. What is the mechanism of flow-mediated arterial dilatation. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2013;40(8):489-94.
36. Kremkau F. *Diagnostic Ultrasound: Principles and Instruments*. Elsevier Saunders. 2002.
37. Olesen SP, Clapham DE, Davies PF. Haemodynamic shear stress activates a K⁺ current in vascular endothelial cells. *Nature*. 1988;331(6152):168-70.
38. Liao D, Wong TY, Klein R, Jones D, Hubbard L, Sharrett AR. Relationship between carotid artery stiffness and retinal arteriolar narrowing in healthy middle-aged persons. *Stroke*. 2004;35(4):837-42.
39. Kernick DP, Tooke JE, Shore AC. The biological zero signal in laser Doppler fluximetry - origins and practical implications. *Pflugers Arch*. 1999;437(4):624-31.
40. Weber T, Ammer M, Rammer M, Adji A, O'Rourke MF, Wassertheurer S, et al. Noninvasive determination of carotid-femoral pulse wave velocity depends critically on assessment of travel distance: a comparison with invasive measurement. *J Hypertens*. 2009;27(8):1624-30.
41. Van Bortel LM, Laurent S, Boutouyrie P, Chowienczyk P, Cruickshank JK, De Backer T, et al. Expert consensus document on the measurement of aortic stiffness in daily practice using carotid-femoral pulse wave velocity. *J Hypertens*. 2012;30(3):445-8.
42. Roman MJ, Devereux RB, Kizer JR, Lee ET, Galloway JM, Ali T, et al. Central pressure more strongly relates to vascular disease and outcome than does brachial pressure: the Strong Heart Study. *Hypertension*. 2007;50(1):197-203.
43. Amabile N, Rautou PE, Tedgui A, Boulanger CM. Microparticles: key protagonists in cardiovascular disorders. *Semin Thromb Hemost*. 2010;36(8):907-16.
44. Heiss C, Amabile N, Lee AC, Real WM, Schick SF, Lao D, et al. Brief secondhand smoke exposure depresses endothelial progenitor cells activity and endothelial function: sustained vascular injury and blunted nitric oxide production. *J Am Coll Cardiol*. 2008;51(18):1760-71.
45. Tushuizen ME, Nieuwland R, Rustemeijer C, Hensgens BE, Sturk A, Heine RJ, et al. Elevated endothelial microparticles following consecutive meals are associated with vascular endothelial dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2007;30(3):728-30.
46. Mutin M, Dignat-George F, Sampol J. Immunologic phenotype of cultured endothelial cells: quantitative analysis of cell surface molecules. *Tissue Antigens*. 1997;50(5):449-58.
47. von Ahnen N, Ehrlich B, Scott CS, Riggert J, Oellerich M. Cryoglobulins interfere with platelet counts by optical and impedance methods but not with the CD61 immunoplatelet count. *Clin Chem*. 2001;47(10):1858-60.
48. Becton DaC. *Introduction to Flow Cytometry, Manual Part Number: 11-11032-01*. 2000.
49. Bevilacqua MP, Stengelin S, Gimbrone MA, Jr., Seed B. Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science*. 1989;243(4895):1160-5.
50. Takeichi M. Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Annu Rev Biochem*. 1990;59:237-52.
51. Vaporciyan AA, DeLisser HM, Yan HC, Mendiguren, II, Thom SR, Jones ML, et al. Involvement of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 in neutrophil recruitment in vivo. *Science*. 1993;262(5139):1580-2.
52. Schlossmann SF BL, Gilks W et al. *Leukocyte typing V: white cell differentiation antigens* Oxford University Press. 1995.
53. Amabile N, Cheng S, Renard JM, Larson MG, Ghorbani A, McCabe E, et al. Association of circulating endothelial microparticles with cardiometabolic risk factors in the Framingham Heart Study. *Eur Heart J*. 2014;35(42):2972-9.
54. Agouni A, Lagrue-Lak-Hal AH, Ducluzeau PH, Mostefai HA, Draunet-Busson C, Leftheriotis G, et al. Endothelial dysfunction caused by circulating microparticles from patients with metabolic syndrome. *Am J Pathol*. 2008;173(4):1210-9.

55. Mostefai HA, Agouni A, Carusio N, Mastronardi ML, Heymes C, Henrion D, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase and xanthine oxidase regulate nitric oxide and reactive oxygen species productions by apoptotic lymphocyte microparticles in endothelial cells. *J Immunol.* 2008;180(7):5028-35.
56. Pluskota E, Woody NM, Szpak D, Ballantyne CM, Soloviev DA, Simon DI, et al. Expression, activation, and function of integrin alphaMbeta2 (Mac-1) on neutrophil-derived microparticles. *Blood.* 2008;112(6):2327-35.
57. Agouni A, Mostefai HA, Porro C, Carusio N, Favre J, Richard V, et al. Sonic hedgehog carried by microparticles corrects endothelial injury through nitric oxide release. *FASEB J.* 2007;21(11):2735-41.
58. Boulanger CM, Scoazec A, Ebrahimian T, Henry P, Mathieu E, Tedgui A, et al. Circulating microparticles from patients with myocardial infarction cause endothelial dysfunction. *Circulation.* 2001;104(22):2649-52.
59. Miller AA, De Silva TM, Jackman KA, Sobey CG. Effect of gender and sex hormones on vascular oxidative stress. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2007;34(10):1037-43.
60. Levy BI, Schiffrin EL, Mourad JJ, Agostini D, Vicaut E, Safar ME, et al. Impaired tissue perfusion: a pathology common to hypertension, obesity, and diabetes mellitus. *Circulation.* 2008;118(9):968-76.
61. Vion AC, Ramkhalawon B, Loyer X, Chironi G, Devue C, Loirand G, et al. Shear stress regulates endothelial microparticle release. *Circ Res.* 2013;112(10):1323-33.
62. Korenaga R, Ando J, Tsuboi H, Yang W, Sakuma I, Toyo-oka T, et al. Laminar flow stimulates ATP- and shear stress-dependent nitric oxide production in cultured bovine endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;198(1):213-9.
63. Ohno M, Gibbons GH, Dzau VJ, Cooke JP. Shear stress elevates endothelial cGMP. Role of a potassium channel and G protein coupling. *Circulation.* 1993;88(1):193-7.
64. Boo YC, Jo H. Flow-dependent regulation of endothelial nitric oxide synthase: role of protein kinases. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003;285(3):C499-508.
65. Chun TH, Itoh H, Ogawa Y, Tamura N, Takaya K, Igaki T, et al. Shear stress augments expression of C-type natriuretic peptide and adrenomedullin. *Hypertension.* 1997;29(6):1296-302.
66. Rieder MJ, Carmona R, Krieger JE, Pritchard KA, Jr., Greene AS. Suppression of angiotensin-converting enzyme expression and activity by shear stress. *Circ Res.* 1997;80(3):312-9.
67. Gongora MC, Qin Z, Laude K, Kim HW, McCann L, Folz JR, et al. Role of extracellular superoxide dismutase in hypertension. *Hypertension.* 2006;48(3):473-81.
68. Nava E, Noll G, Luscher TF. Increased activity of constitutive nitric oxide synthase in cardiac endothelium in spontaneous hypertension. *Circulation.* 1995;91(9):2310-3.
69. Puzserova A, Kopincova J, Slezak P, Balis P, Bernatova I. Endothelial dysfunction in femoral artery of the hypertensive rats is nitric oxide independent. *Physiol Res.* 2013;62(6):615-29.
70. Dananberg J, Sider RS, Grekin RJ. Sustained hypertension induced by orally administered nitro-L-arginine. *Hypertension.* 1993;21(3):359-63.
71. Ribeiro MO, Antunes E, de Nucci G, Lovisollo SM, Zatz R. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. *Hypertension.* 1992;20(3):298-303.
72. Qu C, Leung SW, Vanhoutte PM, Man RY. Chronic inhibition of nitric-oxide synthase potentiates endothelium-dependent contractions in the rat aorta by augmenting the expression of cyclooxygenase-2. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010;334(2):373-80.
73. Van de Voorde J, Vanheel B, Leusen I. Depressed endothelium-dependent relaxation in hypertension: relation to increased blood pressure and reversibility. *Pflugers Arch.* 1988;411(5):500-4.
74. Ungvari Z, Csiszar A, Kaminski PM, Wolin MS, Koller A. Chronic high pressure-induced arterial oxidative stress: involvement of protein kinase C-dependent NAD(P)H oxidase and local renin-angiotensin system. *Am J Pathol.* 2004;165(1):219-26.

75. Liao D, Arnett DK, Tyroler HA, Riley WA, Chambless LE, Szklo M, et al. Arterial stiffness and the development of hypertension. The ARIC study. *Hypertension*. 1999;34(2):201-6.
76. Allen SP, Wade SS, Prewitt RL. Myogenic tone attenuates pressure-induced gene expression in isolated small arteries. *Hypertension*. 1997;30(2 Pt 1):203-8.
77. Tian S, Bai Y, Yang L, Wang X, Wu Y, Jia J, et al. Shear stress inhibits apoptosis of ischemic brain microvascular endothelial cells. *Int J Mol Sci*. 2013;14(1):1412-27.
78. Rizzoni D, Palombo C, Porteri E, Muiesan ML, Kozakova M, La Canna G, et al. Relationships between coronary flow vasodilator capacity and small artery remodelling in hypertensive patients. *J Hypertens*. 2003;21(3):625-31.
79. Safar ME, Rizzoni D, Blacher J, Muiesan ML, Agabiti-Rosei E. Macro and microvasculature in hypertension: therapeutic aspects. *J Hum Hypertens*. 2008;22(9):590-5.
80. Muiesan ML, Salvetti M, Rizzoni D, Paini A, Agabiti-Rosei C, Aggiusti C, et al. Pulsatile hemodynamics and microcirculation: evidence for a close relationship in hypertensive patients. *Hypertension*. 2013;61(1):130-6.
81. Safar ME, Levy BI, Struijker-Boudier H. Current perspectives on arterial stiffness and pulse pressure in hypertension and cardiovascular diseases. *Circulation*. 2003;107(22):2864-9.
82. Preston RA, Jy W, Jimenez JJ, Mauro LM, Horstman LL, Valle M, et al. Effects of severe hypertension on endothelial and platelet microparticles. *Hypertension*. 2003;41(2):211-7.
83. Amabile N, Guerin AP, Leroyer A, Mallat Z, Nguyen C, Boddaert J, et al. Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16(11):3381-8.
84. Marques FK, Campos FM, Sousa LP, Teixeira-Carvalho A, Dusse LM, Gomes KB. Association of microparticles and preeclampsia. *Mol Biol Rep*. 2013;40(7):4553-9.
85. Wang JM, Su C, Wang Y, Huang YJ, Yang Z, Chen L, et al. Elevated circulating endothelial microparticles and brachial-ankle pulse wave velocity in well-controlled hypertensive patients. *J Hum Hypertens*. 2009;23(5):307-15.
86. Akimoto S, Mitsumata M, Sasaguri T, Yoshida Y. Laminar shear stress inhibits vascular endothelial cell proliferation by inducing cyclin-dependent kinase inhibitor p21(Sdi1/Cip1/Waf1). *Circ Res*. 2000;86(2):185-90.
87. Kaiser D, Freyberg MA, Friedl P. Lack of hemodynamic forces triggers apoptosis in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;231(3):586-90.
88. Freyberg MA, Kaiser D, Graf R, Buttenbender J, Friedl P. Proatherogenic flow conditions initiate endothelial apoptosis via thrombospondin-1 and the integrin-associated protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;286(1):141-9.
89. Cordazzo C, Neri T, Petrini S, Lombardi S, Balia C, Cianchetti S, et al. Angiotensin II induces the generation of procoagulant microparticles by human mononuclear cells via an angiotensin type 2 receptor-mediated pathway. *Thromb Res*. 2013;131(4):e168-74.
90. Yang S, Zhong Q, Qiu Z, Chen X, Chen F, Mustafa K, et al. Angiotensin II receptor type 1 autoantibodies promote endothelial microparticles formation through activating p38 MAPK pathway. *J Hypertens*. 2014;32(4):762-70.
91. Nomura S, Shouzu A, Omoto S, Nishikawa M, Fukuhara S, Iwasaka T. Effect of valsartan on monocyte/endothelial cell activation markers and adiponectin in hypertensive patients with type 2 diabetes mellitus. *Thromb Res*. 2006;117(4):385-92.
92. Georgescu A, Alexandru N, Andrei E, Titorencu I, Dragan E, Tarziu C, et al. Circulating microparticles and endothelial progenitor cells in atherosclerosis: pharmacological effects of irbesartan. *J Thromb Haemost*. 2012;10(4):680-91.
93. Lopez Andres N, Tesse A, Regnault V, Louis H, Cattan V, Thornton SN, et al. Increased microparticle production and impaired microvascular endothelial function in aldosterone-salt-treated rats: protective effects of polyphenols. *PLoS One*. 2012;7(7):e39235.
94. Sbarbati R, de Boer M, Marzilli M, Scarlattini M, Rossi G, van Mourik JA. Immunologic detection of endothelial cells in human whole blood. *Blood*. 1991;77(4):764-9.

95. George F, Brisson C, Poncelet P, Laurent JC, Massot O, Arnoux D, et al. Rapid isolation of human endothelial cells from whole blood using S-Endo1 monoclonal antibody coupled to immuno-magnetic beads: demonstration of endothelial injury after angioplasty. *Thromb Haemost.* 1992;67(1):147-53.
96. Boos CJ, Jaumdally RJ, MacFadyen RJ, Varma C, Lip GY. Circulating endothelial cells and von Willebrand factor as indices of endothelial damage/dysfunction in coronary artery disease: a comparison of central vs. peripheral levels and effects of coronary angioplasty. *J Thromb Haemost.* 2007;5(3):630-2.
97. Boos CJ, Balakrishnan B, Jessani S, Blann AD, Lip GY. Effects of percutaneous coronary intervention on peripheral venous blood circulating endothelial cells and plasma indices of endothelial damage/dysfunction. *Chest.* 2007;132(6):1920-6.
98. Bonello L, Basire A, Sabatier F, Paganelli F, Dignat-George F. Endothelial injury induced by coronary angioplasty triggers mobilization of endothelial progenitor cells in patients with stable coronary artery disease. *J Thromb Haemost.* 2006;4(5):979-81.
99. Blann A, Midgley H, Burrows G, Maxwell S, Utting S, Davies M, et al. Free radicals, antioxidants, and endothelial cell damage after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Coron Artery Dis.* 1993;4(10):905-10.
100. Kilickap M, Tutar E, Aydintug O, Pamir G, Erol C, Tutkak H, et al. Increase in soluble E-selectin level after PTCA and stent implantation: a potential marker of restenosis. *Int J Cardiol.* 2004;93(1):13-8.
101. Inoue T, Hikichi Y, Morooka T, Yoshida K, Fujimatsu D, Komoda H, et al. Comparison of changes in circulating platelet-derived microparticles and platelet surface P-selectin expression after coronary stent implantation. *Platelets.* 2006;17(6):416-20.
102. Vidal C, Spaulding C, Picard F, Schaison F, Melle J, Weber S, et al. Flow cytometry detection of platelet procoagulation activity and microparticles in patients with unstable angina treated by percutaneous coronary angioplasty and stent implantation. *Thromb Haemost.* 2001;86(3):784-90.
103. Morel O, Hugel B, Jesel L, Mallat Z, Lanza F, Douchet MP, et al. Circulating procoagulant microparticles and soluble GPV in myocardial infarction treated by primary percutaneous transluminal coronary angioplasty. A possible role for GPIIb-IIIa antagonists. *J Thromb Haemost.* 2004;2(7):1118-26.

6. Anhang

7. Danksagung

An erster Stelle möchte ich hier Herrn Prof. Dr. Christian Heiss für seine hervorragende Betreuung danken. Er konnte mir in hohem Maße gute wissenschaftliche Praxis vermitteln und lehrte mich vor allem wissenschaftliches Denken und Handeln. Dabei imponierte mir vor allem seine hohe wissenschaftliche Kompetenz und Vielschichtigkeit.

Des Weiteren möchte ich Herrn Dr. Roberto Sansone für seine kompetente Hilfe und Fürsorge danken. Er war bereit mit hohem zeitlichen Aufwand auch seine Freizeit zu opfern. Er prägte einen wesentlichen Teil meiner wissenschaftlicher Ausbildung und verbreitete stets Zuversicht und Optimismus, welches meine Motivation deutlich an hob.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. Patrick Horn, welcher mir im kardiologischen Labor Grund- und Fachkenntnisse vermittelte. Auch er war bereit mit großem Aufwand mir mit Rat und Tat zur Seite zu stehen. Von seiner fachlichen Kompetenz konnte ich viel lernen.

Ein großes Dankeschön bin ich aber meinen Eltern und Familie schuldig, welche mich zu jeder Zeit unterstützten und mir vor allem moralisch zur Seite standen. Für den familiären Beistand, der mir zeitlebens zur Seite steht bin ich unendlich dankbar.