

Aus der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. Med. Malte Kelm

Endotheliale Dysfunktion, zirkulierende Mikropartikel und thromboembolische Ereignisse

bei Patienten mit Links-Herz-Unterstützungs-Systemen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Nicolas Benedikt Kramser

2021

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

Gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Herr PD Dr. med. Patrick Horn

Zweitgutachterin: Frau Prof. rer. nat. Judith Haendeler

meiner Familie

Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert [1]:

Kramser, N., et al., *Thromboembolic Events in Patients With Left Ventricular Assist Devices Are Related to Microparticle-Induced Coagulation*. *Asaio j*, 2021. **67**(1): p. 59-66.

Zusammenfassung

Die Links-Herz-Unterstützungs-Systeme (LVAD) haben sich als eine wichtige therapeutische Option bei Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz etabliert. Jedoch sind LVADs mit einer Verschlechterung der endothelialen Funktion und einer Störung der Koagulation assoziiert, was sowohl zu Blutungen als auch thromboembolischen Komplikationen (TE) führt. TEs sind eine gefürchtete Komplikation bei LVAD Patienten und treten trotz optimaler Antikoagulation in bis zu 20% der Patienten innerhalb der ersten zwölf Monate auf. Die genauen pathophysiologischen Mechanismen, die diesen TEs zu Grunde liegen, sind bislang nicht vollständig geklärt. Mikropartikel (MPs) sind Membranpartikel, die von nahezu allen Zellen in das Blut abgegeben werden. Sie werden als ein Marker einer gestörten endothelialen Integrität und einer erhöhten Koagulation betrachtet. Außerdem wurde bereits vermutet, dass sie selbst aktiv zu einer gestörten endothelialen Funktion und einer erhöhten Koagulation beitragen. Ob zirkulierende MPs zu einer gestörten endothelialen Funktion und einer erhöhten Koagulation bei LVAD Patienten beitragen, ist ungeklärt.

Die Hypothese dieser Arbeit ist, dass die LVAD Unterstützung zu einer verschlechterten endothelialen Funktion, einer erhöhten Konzentration zirkulierender MPs sowie einer verstärkten MPs induzierten Thrombin-Generierung führt, wodurch die Entstehung von TEs gefördert wird.

Es wurden prospektiv 15 Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz untersucht, bei denen eine LVAD Implantation geplant war, bezüglich des Einflusses des LVADs auf die endotheliale Funktion, die MPs Konzentration und die prokoagulatorische Aktivität der MPs. Diese Parameter wurden vor LVAD Implantation, kurz danach (Tag 14) und nach 3 Monaten untersucht. Dieselben Parameter wurden zusätzlich in 37 LVAD Patienten und 17 Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz ohne LVAD untersucht bezüglich TEs innerhalb von zwölf Monaten unter LVAD. Die endotheliale Funktion wurde mittels flussmediierter Vasodilatation (FMD) gemessen. Zirkulierende MPs wurden mittels Durchflusszytometrie anhand ihrer Oberflächenantigene analysiert. Endotheliale MPs (EMPs) können eingeteilt werden in CD 62E⁺, CD144⁺ und CD31⁺/CD41⁻ MPs. Thrombozytäre MPs (PMPs) werden als CD41⁺ and Erythrozytäre MPs (RBC-MPs) als CD235⁺ klassifiziert. Die prokoagulatorische Aktivität der MPs wurde mithilfe eines zwei-stufigen amidolytischen Assays untersucht, mit dem die MPs induzierte Thrombin-Generierung gemessen wurde.

Bei den Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz, die ein LVAD implantiert bekamen, reduzierte sich die FMD, es erhöhten sich die PMPs, RBC-MPs, CD62⁺ EMPs und die MPs induzierte Thrombin-Generierung nach LVAD Implantation und blieben auch nach drei Monaten stabil. In der Querschnittsstudie war die FMD als Marker der endothelialen Funktion erniedrigt und die Konzentrationen der zirkulierenden PMPs, EMPs und RBC-MPs sowie die MPs induzierte Thrombin-Generierung höher bei den LVAD Patienten verglichen mit der Kontrollgruppe. Die Konzentration der PMPs und die MPs induzierte Thrombin-Generierung war höher bei LVAD Patienten mit TEs verglichen mit denen ohne.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Implantation eines LVAD zu einer verschlechterten endothelialen Funktion und Integrität führt, die MPs Konzentrationen und die MPs induzierte Thrombin-Generierung erhöht und so die Entstehung von TEs gefördert werden könnten. Bei LVAD Patienten waren die Konzentration der zirkulierenden PMPs und die prokoagulatorische Aktivität der MPs mit der Entstehung von TEs assoziiert.

Summary

Continuous-flow left ventricular assist devices (LVADs) have been established as a vital therapeutic option in end stage heart failure not merely as bridge-to transplant but also as destination therapy. However, LVADs are associated with an impaired endothelial function and a dysbalance of coagulation leading to both, excessive bleeding and thromboembolic events (TE). TEs, even despite adequate anticoagulative therapy, are a feared complication in up to 20% of the patients during the first twelve months. However, the pathophysiologic mechanisms underlying these TEs in LVAD patients are not fully understood. Microparticles (MPs) are shed membrane particles budded into the circulation and considered as a marker of compromised endothelial integrity and enhanced procoagulation levels. In addition, MPs have been suggested to play an active role in the induction of endothelial dysfunction and coagulation. Whether circulating MPs contribute to impaired endothelial function and enhanced coagulation in LVAD patients is unknown.

The Hypothesis of this manuscript is, that LVAD support impairs endothelial function, increases the level of circulating MPs as well as enhances MPs induced coagulation and thereby promote thromboembolic events.

Prospectively 15 patients with end stage heart failure undergoing elective LVAD implantation were analyzed, regarding the effect of LVAD support on endothelial function and the level and procoagulative activity of circulating MPs. These parameters were assessed before LVAD implantation, post implantation (day 14) and at 3 months follow up. Additionally, the same parameters were analyzed in 37 patients with LVAD support compared to 17 patients with end stage heart failure without LVAD support as the control group in the context of TEs. Endothelial function was assessed by measuring flow mediated dilation (FMD). Circulating MPs were characterized and quantified by flow cytometry according to the expression of established surface antigens. Endothelial MPs (EMPs) subpopulations are defined as CD 62E⁺, CD144⁺ or CD31⁺/CD41⁻ MPs. Platelets Microparticle (PMPs) are defined as CD41⁺ and red blood cell MPs (RBC-MPs) as CD235⁺. MP procoagulative activity was assessed using a two-step amidolytic assay measuring MPs induced thrombin formation.

In patients with end-stage heart failure undergoing LVAD implantation FMD decreased, PMPs, RBC-MPs, CD62⁺ EMPs and MPs induced thrombin formation increased after LVAD implantation and kept stable at 3 months follow up. In the cross-sectional study the FMD as a marker of endothelial function was lower, and level of circulating PMPs, EMPs and RBC-MPs as well as MPs induced thrombin formation were higher in LVAD patients as compared to the control group. The level of circulating PMPs as well as the MPs induced thrombin formation were higher in LVAD patients with TEs as compared to those without TEs.

This research could show, that the LVAD implantation impairs the endothelial function and endothelial integrity, increases MPs concentration as well as MPs induced thrombin formation and thereby might promote thromboembolic complications. In patients with LVAD support, the level of circulating PMPs and the procoagulative activity of the MPs are associated with the occurrence of TEs.

Liste der Abkürzungen

Abb	Abbildung
ACE	Angiotensin-Converting-Enzyme
CD144	Cadherin
CD235a	Glykophorin A
CD31	Thrombozyten-Endothelzellen Adhäsionsmolekül
CD41	Plasmamembran-Glykoproteine GP IIb/IIIa
CD45	Leukocyte common antigen
CD62E	E-Selectin
CHF	Chronische Herzinsuffizienz
ECLS	Extrakorporale Life Support System
ECMO	Extrakorporale Membranoxygenierung
EKG	Elektrokardiographie
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMPs	Endotheliale MPs
FACS	Durchflusszytometrie
FMD	Flussmedierte Dilatation
FSC	Vorwärtsstreulicht
g	Erdbeschleunigung
GMP 140	Alpha-Granulat Membran Protein
HFrEF	Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion
HIT 2	Heparin-induzierter Thrombozytopenie Typ 2
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
INR	International Normalized Ratio
INTERMACS	Interagency Registry for Mechanically Assisted Circulatory Support
LDH	Laktatdehydrogenase
LMPs	Leukozytäre MPs

LVAD	Links-Herz-Unterstützungs-Systemen
M	Mittelwert
MHC	Major histocompatibility complex
MPs	Mikropartikeln
NIHSS	National Institutes of Health Stroke Scale
NO	Stickstoffmonoxid
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PMPs	Thrombozytäre MPs
PRP	Plättchenreiches Plasma
PSGL 1	Selectin P-Ligand
RBC-MPs	Erythrozytäre MPs
RNA	Ribonukleinsäuren
ROI	Region of interest
SD	Standardabweichung
SSC	Dichte
Tab	Tabelle
TF	Tissue factor
VE	Vascular endothelial

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Terminale Herzinsuffizienz.....	1
1.2	Mechanische Linksherzunterstützungssysteme	4
1.3	Komplikationen unter der LVAD Therapie.....	5
1.4	Zirkulierende Mikropartikel	9
1.5	Ziele der Arbeit	13
2	Material und Methoden.....	14
2.1	Studiendesign.....	14
2.2	Probengewinnung.....	15
2.3	Durchflusszytometrie zur Analyse der Mikropartikel.....	16
2.4	Bio-Immunoassay zur Bestimmung der prokoagulatorischen Aktivität von Mikropartikel im Blutplasma	19
2.5	Flussmedierte Vasodilation.....	20
2.6	Statistik	22
3	Ergebnisse	24
3.1	Longitudinalstudie	24
3.2	Querschnittsstudie.....	29
4	Diskussion.....	36
4.1	Die endotheliale Funktion und die Konzentration sowie prokoagulatorische Aktivität zirkulierender Mikropartikel bei Herzinsuffizienz.....	36
4.2	Die endotheliale Funktion und die Konzentration und prokoagulatorische Aktivität zirkulierender MPs nach LVAD Implantation	39

4.3	Thromboembolische Komplikationen unter LVAD	41
4.4	Schlussfolgerungen	48
5	Literaturverzeichnis.....	49
6	Danksagung	

1 Einleitung

1.1 Terminale Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz ist ein klinisches Syndrom bei dem das Herz nicht mehr in der Lage ist, den Organismus mit ausreichend Blut - und damit genügend Sauerstoff zu versorgen. Eingeteilt wird sie in die Linksherzinsuffizienz mit Rückstau des Blutes in die Lungenstrombahn und die Rechtsherzinsuffizienz mit Rückstau des Blutes in den Körperkreislauf. Eine isolierte Rechtsherzinsuffizienz ist jedoch selten, in den meisten Fällen führt eine Linksherzinsuffizienz durch den Rückstau in das rechte Herz zu einer begleitenden Rechtsherzinsuffizienz. Dies wird als Globalherzinsuffizienz bezeichnet. Die Prävalenz der Herzinsuffizienz in der westlichen Welt liegt bei 1 – 2 % und ist altersabhängig [2]. Liegt sie bei Personen unter dem 50. Lebensjahr bei nur ca. 1 %, steigt sie bei Personen über dem 70. Lebensjahr auf Werte um 10 % an [3-5]. In Deutschland stellte die Herzinsuffizienz die fünfthäufigste Todesursache mit 4 % bzw. 38.187 von 932.272 Todesfällen im Jahr 2017 dar [6]. Weltweit leiden 26 Millionen Menschen an einer Herzinsuffizienz [7]. Davon sind 5 % in dem Stadium der terminalen Herzinsuffizienz [8].

Die terminale Herzinsuffizienz ist definiert als ein Zustand der Herzinsuffizienz, der entsprechend der Therapieempfehlungen der Leitlinien [9] austherapiert ist und den Einsatz von pharmakologischer und/oder mechanischer Kreislaufunterstützung notwendig macht [10]. Die Symptome des myokardialen Vorwärts- und Rückwärtsversagens liegen hier in maximaler Ausprägung vor und gehen mit rezidivierenden Dekompensationen einher [9, 11].

Weltweit betrifft dieser Zustand ca. 1,3 Millionen Menschen, die eine 1-Jahres Mortalität von bis zu 75 % haben [12]. Während Dyspnoe für alle Stadien der Herzinsuffizienz charakteristisch ist, führt die terminale Herzinsuffizienz zu wiederholten Hospitalisierungen, kardialer Kachexie, refraktären Arrhythmien mit oder ohne Schock oder zu einer fortschreitenden renalen und hepatischen Dysfunktion und ist mit einer Intoleranz der medikamentösen Herzinsuffizienz-Therapie assoziiert [8, 13-15].

Durch den demographischen Wandel und die erhöhte Lebenserwartung, aber auch durch die erfolgreiche Akut-Therapie des Myokardinfarktes mit der potentiellen Entwicklung einer nachfolgenden Herzinsuffizienz, wird die Inzidenz der Herzinsuffizienz in den nächsten Jahren weiter ansteigen [16-18]. Die Symptomkontrolle und das Überleben der Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz wurden über die letzten 20 Jahre durch den therapeutischen Einsatz der Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)-Blockade, der Beta-Rezeptorblockade sowie der Device-Therapie verbessert [19-33]. Es lassen sich jedoch nur die frühen Stadien der Herzinsuffizienz effektiv medikamentös behandeln, bei der terminalen Herzinsuffizienz sind die Erfolgsaussichten stark limitiert [34]. Neben dem Einsatz von positiv inotropen Substanzen und Vasopressoren kommen hier die Ultrafiltration, perkutane und chirurgische kardiale Unterstützungs-Systeme sowie die Herztransplantation zum Einsatz [9].

Als beste Option, um die Überlebensrate und Lebensqualität zu verbessern, gilt die orthotope Herztransplantation. Allerdings ist ihr Anteil bei rund 4.500 Spenderherzen weltweit pro Jahr im Verhältnis zu den Transplantatbedürftigen sehr gering [35]. Es werden jährlich dreimal mehr Patienten zur Herztransplantation gelistet als letztendlich transplantiert werden [36]. Um diese Versorgungslücke zu schließen, kommt als Therapiemöglichkeit für Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz dem Einsatz von mechanischen Links-Herz-Unterstützungs-Systemen (LVAD) eine immer größere Bedeutung zu. Diese hat sich mittlerweile als führende Therapieoption neben der Herztransplantation durchgesetzt [37]. Durch die Einführung der LVADs konnte die Mortalität der Patienten auf der Warteliste signifikant reduziert und das Überleben von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz deutlich verbessert werden [30, 37-39]. Die 2 – 3 Jahres Überlebens-Rate unter LVAD Therapie ist vergleichbar mit den Patienten, die transplantiert wurden [40]. Die Therapie mit einem LVAD wird nicht nur zur Zeitüberbrückung bei der Spenderherzsuche eingesetzt (als „bridge-to-transplant“), oder bis sich das Herz erholt hat (als „bridge-to-recovery“), sondern auch als permanente Lösung ohne anschließende Herztransplantation (als „destination therapy“) verwendet [41]. Hier wird der Patient den Rest seines Lebens durch das System unterstützt. Dies findet bei Patienten die im Rahmen von Endorganschädigungen oder zu hohem Alter nicht für die

Transplantation geeignet sind Verwendung und führte zu einer besseren Lebensqualität und Prognose [41, 42].

Die Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz frühzeitig zu erfassen, die eine erweiterte Therapie wie die Herztransplantation oder die Implantation eines LVAD Systems benötigen, ist essentiell um eine optimale Versorgung zu gewährleisten [11].

Auf der anderen Seite sollte die Implantation eines LVADs auf Grund der Komplikationen auch nicht zu früh geplant werden. Eine Klassifikation zur Erfassung der terminalen Herzinsuffizienz ist die Interagency Registry for Mechanically Assisted Circulatory Support (INTERMACS). Diese Klassifikation wurde im Rahmen eines *Multicenter Registers* von LVADs gebildet [43, 44] und hilft, die Patienten anhand ihrer Hämodynamik und dem Grad der Organschädigung einzuteilen [43]. Ziel ist es, die Parameter der Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz zu sammeln und anhand dessen Therapieempfehlungen sowie Einschätzungen des perioperativen Risikos abzugeben [45]. Die Bedeutung der INTERMACS Klassifikation zur Erfassung der Mortalität und der postoperativen Komplikationen für die Implantation von LVADs konnte bereits gezeigt werden [43, 44, 46]. Die INTERMACS Klassifikation gliedert die terminale Herzinsuffizienz in 7 Stadien auf [47]:

- INTERMACS 1. Dyspnoe in Ruhe (NYHA 4); hämodynamische Instabilität trotz erhöhter Dosen Katecholamine und/oder Mechanischer Kreislaufunterstützung mit kritischer Hypoperfusion von Zielorganen
- INTERMACS 2. NYHA 4; intravenöse Gabe inotroper Substanzen mit akzeptablem Blutdruck aber rapider Verschlechterung der Nierenfunktion, Ernährungsstand oder Volumenbelastung
- INTERMACS 3. NYHA 4; hämodynamische Stabilität mit niedrigen oder mittleren Dosen inotroper Substanzen, jedoch Hypotonie, Symptomverschlechterung oder fortschreitendes Nierenversagen
- INTERMACS 4. NYHA 4; ambulante Situation; temporärer Stopp der Behandlung mit inotropen Substanzen ist möglich, die Symptome kehren jedoch wieder und der Patient ist Volumen überlastet

- INTERMACS 5. NYHA 4; ambulante Situation; keine körperliche Aktivität mehr möglich, stabiler Zustand in Ruhe, jedoch regelmäßige Flüssigkeitsretention und renale Dysfunktion
- INTERMACS 6. Dyspnoe bei leichter Belastung (NYHA 3); nur geringe Limitierung der körperlichen Bewegung und keine Volumenbelastung in Ruhe, jedoch bei leichter Aktivität schnell beeinträchtigt
- INTERMACS 7. NYHA 3; keine Volumenbelastung

Gemäß den European Society of Cardiology (ESC) *Guidelines* wird bei Patienten in der ersten Stufe die Unterstützung mit dem extrakorporalen Life Support System/der extrakorporalen Membranoxygenierung (ECLS/ECMO) empfohlen, bei Patienten in der zweiten Stufe ist der Übergang zum LVAD möglich [9]. Patienten in Stufe 3 bis 5 sollten ein LVAD bekommen, bei Stufe 6 und 7 sollte es in Erwägung gezogen werden [9].

1.2 Mechanische Linksherzunterstützungssysteme

Anders als bei Implantation eines Kunstherzens (Total Artificial Heart), bei der das Herz fast komplett entfernt und durch eine Pumpe ersetzt wird, bleibt bei einem LVAD das Herz des Patienten im Körper und soll in seinen Aktionen unterstützt werden. Die LVADs können in Systeme eingeteilt werden, die einen pulsatilen oder kontinuierlichen Fluss erzeugen. Die ersten Generationen waren pulsatile LVADs, die mit Druckluft betriebenen Blutpumpen arbeiteten. Die neueren Generationen umfassen kontinuierliche Systeme mit Axial- oder Zentrifugalpumpen, die durch einen magnetisch betriebenen Rotor Fluss erzeugen. Bei den Axialpumpen fließt das Blut zentral in Richtung der Rotor-Achse, bei den Zentrifugalpumpen wird das Blut in die Pumpenperipherie gedrückt [48]. Der Vorteil der axialen Pumpen ist, dass sie kleiner sind als die zentrifugalen Pumpen und sich so besser implantieren lassen [48]. Nachteil ist jedoch, dass sie einen größeren Sog aufbauen, wodurch der Ventrikel kollabieren kann [48].

Im Vergleich der verschiedenen LVAD Generationen untereinander, führten die neuen zu einer verbesserten Lebensqualität und Überlebensrate der Patienten [42, 49, 50]. Die pulsatilen Systeme hatten einen hohen Volumenbedarf und erschwerten aufgrund ihrer Größe die Implantation, die teilweise nur intraabdominell oder intrapleurale möglich war.

Demgegenüber erwiesen sich die kontinuierlichen Systeme überlegen. Sie sind kleiner, verlässlicher, beständiger und können mittlerweile intraperikardial implantiert werden [50, 51].

Die 30-Tage Mortalität ist von 11 % mit der alten LVAD Generation auf 4 % mit der neuen Generation gesunken [50]. Zudem erreichten 90 % der Patienten die mit der neuen LVAD Generation versorgt wurden die angestrebten Ziele wie den Zeitpunkt der Herztransplantation, Erholung des Herzmuskels oder fortgesetzte Herzunterstützung nach sechs Monaten. Im Gegensatz dazu waren es nur 80 % der Patienten, die mit älteren Generationen versorgt wurden [50]. Die kontinuierlichen LVAD Systeme wiesen im direkten Vergleich niedrigere Raten bei allen untersuchten Ereignissen auf, am häufigsten war die Blutung mit Raten von 1,44 bzw. 1,79 pro Jahr [50]. Andere Studien konnten zeigen, dass es zumindest keinen Nachteil der kontinuierlichen LVADs gegenüber den pulsatilen LVADs gibt, sodass die Vorteile der geringeren Größe und leichteren Implantierbarkeit überwiegen [52, 53].

1.3 Komplikationen unter der LVAD Therapie

Trotz der Weiterentwicklung der LVAD Technologie treten weiterhin Komplikationen auf, die sich entscheidend auf die Erfolgsaussicht der Therapie auswirken [54]. Diese umfassen unter anderem gastrointestinale Blutungen, Hämolyse, Aortenklappeninsuffizienz, thromboembolische Komplikationen und Veränderungen des Gefäßsystems [54-62]. Ursache ist unter anderem der Verlust der Pulsatilität mit Umstellung auf einen nicht-physiologischen kontinuierlichen Fluss. Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz haben bereits vor LVAD Implantation eine beeinträchtigte endotheliale Funktion [63]. Durch den Verlust der pulsatilen Strömung bei Implantation eines neueren LVAD, wird diese weiter verschlechtert [64]. So wirkt sich die Wandschubspannung, die durch einen pulsatilen Fluss gefördert wird, positiv auf die Blutgefäße aus [65, 66]. Die Wandschubspannung führt unter anderem zu einer regelmäßigen Stickstoffmonoxid (NO) Freisetzung und fördert die Proliferation [67]. Bei einer Reduzierung der Pulsatilität kommt es zu einem Zerfall der extrazellulären Matrix und einer beeinflussten vaskulären Proliferation [68]. Sowohl Frequenz als auch Amplitude des pulsatilen Flusses wirken sich auf die endothel-

vermittelte Vasodilatation und die NO Produktion aus [69, 70]. Weiterhin führt der reduzierte pulsatile Fluss zu einer geringeren Bradykinin-Rezeptor-vermittelten Vasodilatation [22] und zu einem erhöhten oxidativen Stress [71-73].

Es konnte gezeigt werden, dass sich der Wanddurchmesser der Aorta unter LVAD Therapie mit kontinuierlichem Fluss um bis zu 50 % reduzierte, einhergehend mit einer reduzierten Kontraktilität der glatten Muskulatur und einer reduzierten Sensitivität gegenüber Phenylephrin [74]. Ferner war die Inzidenz der Aortenklappeninsuffizienz bei Patienten mit kontinuierlichem Fluss doppelt so hoch wie bei Patienten mit pulsatilem Fluss [75]. Bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie, die ein LVAD implantiert bekommen haben, war die Chance, dass sich der Herzmuskel regenerierte unter pulsatilen LVADs im Vergleich zu Patienten mit kontinuierlichen LVADs dreimal höher [76, 77]. Auch ist die Inzidenz der gastrointestinalen Blutungen höher bei LVADs mit kontinuierlichem Fluss [78, 79].

Die häufigsten Komplikationen sind LVAD assoziierte Blutungen [47, 80]. Mussten bei pulsatilen LVADs bis zu 50 % der Patienten aufgrund einer Blutung re-operiert werden [81, 82], konnte diese Rate durch die Verwendung kontinuierlicher Systeme auf 20 % reduziert werden [83, 84]. Neben den hämorrhagischen Komplikationen entstehen auch thromboembolische Komplikationen. Künstliche Oberflächen von Stents, Herzklappen oder mechanischen Herzunterstützungssystemen fördern die Entstehung von Thromben. Dies geschieht durch Proteinabsorption, der Adhäsion von Thrombozyten, Erythrozyten und Leukozyten, sowie der Induktion der Thrombin-Generierung und Komplement-System Aktivierung [85]. Ein gefürchtetes Ereignis ist die Pumpenthrombose, die bei ca. 10 % der Patienten innerhalb der ersten 12 Monate nach LVAD Implantation auftritt, trotz adäquater Antikoagulation [86]. Weitere Komplikationen sind arterielle Embolien außerhalb des zentralen Nervensystems, transitorische ischämische Attacken sowie der ischämische Schlaganfall [50]. Die Pumpenthrombose und der ischämische Schlaganfall stellen die schwerwiegendsten Komplikationen dar.

Allerdings sind die exakten pathophysiologischen Prozesse hinter diesen, trotz effektiver Antikoagulation auftretenden thromboembolischen Ereignissen, nicht vollständig geklärt und insbesondere die Rolle des Gefäßendothels und der Aktivierung des Gerinnungssystems unter LVAD Therapie bei diesen Komplikationen unklar. Es wurde

gezeigt, dass die Verletzung des Endothels und der Verlust bzw. die Fehlfunktion von Endothelzellen eine Schlüsselrolle bei verschiedenen thrombotischen Störungen darstellt [72]. Der Verlust der schützenden Eigenschaften des Endothels und die dadurch auch beeinträchtigte NO Bioverfügbarkeit zusammen mit der Expression von prokoagulatorischen und prothrombotischen Molekülen in der subendothelialen Matrix könnte die hämostatische Balance in Richtung Thrombose verschieben [72, 73].

Während frühere LVAD Generationen thromboembolische Raten von bis zu 30 % aufwiesen [49], liegt sie bei der neuen Generation weitaus niedriger. So konnte gezeigt werden, dass sich die Rate beim HeartMate II bei 12 – 14 % befindet [42, 50, 87]. Als Grund für die Reduktion der thromboembolischen Komplikationen wird die geringere Größe der neuen Generation angenommen, wodurch weniger Blut mit der Oberfläche des Geräts in Kontakt kommt [88]. Der Kontakt von Blut mit der LVAD Oberfläche führt zu intrinsischer Koagulopathie mit Hyperkoagulation, Fibrinolyse und Thrombozyten Aktivierung [89]. Zudem wurde im Verlauf die Hämodynamik der LVADs optimiert. Axiale Systeme wie das HeartMate III arbeiten mit einer kontrollierten, zentrifugalen Rotation mit bis zu 20-fach längeren Pausen des Blutflusses. Dies führt zu einer Reduktion der Hämolyse als auch zu einer stabilisierten Koagulation, und könnte dadurch sowohl die hämorrhagischen als auch die thromboembolischen Komplikationen reduzieren [90]. Zudem ist das HeartMate III mit einer Titanium Schicht überzogen, was die Bildung einer biologischen Barriere begünstigt und dadurch die Thrombus Entstehung weiter reduziert [91]. Unabhängig davon ist in den letzten Jahren die Rate der thromboembolischen Komplikationen angestiegen und liegt höher als zunächst angenommen, was aber vor allem durch eine nicht ausreichende Diagnosestellung in früheren Studien bedingt sein kann [92].

Die Rate an ischämischen Schlaganfällen liegt bei 10,2 % [93] und damit deutlich höher als bei Patienten mit fortgeschrittener Herzinsuffizienz ohne LVAD Unterstützung (3,5 %) [42]. Aufgrund der Anatomie finden die zerebralen Embolien nach einer Herzoperation primär in der rechten Hemisphäre statt [94-97]. Dies wird weiter verstärkt durch postoperative Infektionen, da hierdurch eine Thrombus Bildung im LVAD begünstigt wird [97].

Die Rate der Pumpenthrombosen variieren von 6 – 12 % [86, 98-100], auch hier steigen die Raten mit der Zeit an [99]. Bei der Pumpenthrombose kann der Blutein- bzw. Blutausstrom behindert oder der Propeller selbst in seinen Aktionen eingeschränkt werden. Der auslösende Thrombus bildet sich in den meisten Fällen außerhalb der Pumpe im rechten Herzohr, im linken Ventrikel oder kann aus den postoperativen Ventrikel Ablösungen entstehen [98]. Die Pumpenthrombose kann aber auch durch eine Fehlpositionierung des Einflusses oder unzureichende Gerinnungshemmung ausgelöst werden [98]. Obwohl es sich bei der Pumpenthrombose um eine schwerwiegende Komplikation handelt, ist die Diagnose nicht einfach. Grund dafür ist unter anderem, dass sowohl Ultraschall als auch radiologische Untersuchungen nicht ausreichend das Innere der Pumpe beurteilen können [101]. Deshalb wurde 2013 ein Algorithmus entwickelt, der die beste Evidenz zur Diagnosestellung aufweist und vier klinische Charakteristika beschreibt, die typisch für die Pumpenthrombose sind [102]:

- Isolierte Erhöhung der Pumpenleistung
- Isolierte Erhöhung der Laktatdehydrogenase (LDH)
- Hämolyse
- Neu aufgetretene Herzinsuffizienz Symptome

Die Untersuchung der Pumpenparameter kann wichtige Hinweise darauf geben, wo in der Pumpe die Thrombose aufgetreten ist, da die Werte dementsprechend variieren. Ist der Propeller selbst betroffen, treten regelmäßige Leistungsspitzen auf, mit reduziertem Fluss [101]. Ist die Thrombose im Ein- oder Ausfluss, finden sich sowohl eine erniedrigte Leistung als auch ein erniedrigter Fluss [101]. Es konnte gezeigt werden, dass die LDH Erhöhung die verlässlichste Laboruntersuchung zur Diagnostik der Pumpenthrombose ist [62, 92, 100]. Die Diagnose kann hiermit besser als mit echokardiographischen Befunden oder durch die Erfassung der Pumpenparameter bestätigt werden [103]. Hämolyse wurde in vielen Studien als ein frühes Warnzeichen der Pumpenthrombose gewertet und ist mit einer schlechten Prognose assoziiert, sodass die Antikoagulation angepasst oder ein Pumpenwechsel durchgeführt werden sollte [92, 104, 105]. Zur weiteren Evaluation wird die Echokardiographie eingesetzt. Die Veränderung des linksventrikulären enddiastolischen Diameters, die Öffnung der Aortenklappen sowie die Zeit der Verlangsamung des Flusses über der Mitralklappe haben sich als verlässliche Parameter zur Diagnose erwiesen [106-108].

Für die Therapie der Pumpenthrombose gibt es zwei unterschiedliche Ansätze, den medikamentösen und den chirurgischen. Der operative Pumpenaustausch ist meist die Therapie der Wahl, da die thrombolytische Therapie oft bei erhöhter Blutungsgefahr kontraindiziert ist [54]. Zudem wurden mehrere Studien mit einer mäßigen Erfolgsquote der medikamentösen Therapie veröffentlicht. In diesen lag die Mortalität bei medikamentöser Therapie bei 50 % im Vergleich zu 5 % bei der chirurgischen Therapie, die [92, 109]. Die medikamentöse Therapie ist der chirurgischen Therapie dementsprechend aktuell unterlegen. Zudem ist die Überlebensrate bei einem frühen Austausch des Pumpensystems höher als bei einem späten Austausch nach Versagen der konservativen Therapie [98, 110, 111].

Die Auswirkungen der hohen Wandschubspannung, die durch das LVAD hervorgerufen wird, sind bislang nur gering untersucht. Sie wirkt sich jedoch auf die Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten und das Endothel aus [112]. Durch den nicht-pulsatilen Fluss wird ein hoher Stress auf die Blut- und Endothelzellen ausgeübt [113-115], was zu einer vermehrten Freisetzung von zirkulierenden Mikropartikeln (MPs) führen kann [116, 117].

1.4 Zirkulierende Mikropartikel

MPs sind 0,1 – 1 µm große Membranfragmente, die von nahezu allen Zellen abgegeben werden, die eine Plasmamembran besitzen [118]. Auslöser ist unter anderem eine Zytokin-vermittelte Zell-Aktivierung, Apoptose, oxidativer Stress oder ein erhöhter Scherstress [119-122]. Die MPs werden durch Ausstülpung und Abschnürung der zytoplasmatischen Zellmembran freigesetzt [123]. Abzugrenzen sind sie von den Exosomen, welche 40 – 100 nm groß sind, und den Apoptose Körperchen, die größer als 1,5 µm messen. Alle drei werden als Mikrovesikel zusammengefasst. Aufgeteilt werden die MPs nach den Ursprungszellen. So können sie von den Endothelzellen, den Erythrozyten, den Leukozyten und von den Thrombozyten abstammen, mit unterschiedlichen zellulären und membranösen Bestandteilen und damit verschiedenen Charakteristika. Die Zusammensetzung ist sowohl von der Ursprungszelle, als auch von dem Stimulus der Freisetzung abhängig. Zirkulierende MPs sind biologische Vektoren in der systemischen

interzellulären Kommunikation [124, 125] und assoziiert mit Inflammation, Immunregulation und Koagulation [126]. Durch direkte Aktivierung von Oberflächenrezeptoren anderer Zellen werden diese beeinflusst und reguliert. Die Aktivierung wird ermöglicht durch den Transfer von Rezeptoren, Transkriptionsfaktoren, Messenger-Ribonukleinsäuren (RNA) oder nicht kodierender RNA, Zytokinen, Adhäsionsmolekülen und Proteinen [127-130].

Endotheliale Mikropartikel

Die Freisetzung von endothelialen MPs (EMPs) erfolgt *in vitro* unter anderem bei Kontakt der Endothelzellen mit Komplementfaktoren, Thrombin, Lipopolysacchariden, Autoantikörpern und Zytokinen [131, 132]. Die Protein Zusammensetzung ist stark abhängig von dem Reiz, der ihre Freisetzung auslöst und umfasst Proteine der Plasmamembran, Zytosols, des Zytoskeletts und der Mitochondrien [133]. Typische Oberflächenmarker sind das E-Selectin (CD62E) und Cadherin (CD144), spezifische endotheliale Proteine sowie das unspezifische Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül (PECAM-1 bzw. CD 31) [134]. Deshalb werden meist mehrere Marker für die Identifikation kombiniert [117]. Es konnte gezeigt werden, dass MPs die Angiogenese fördern [129], in höheren Konzentrationen jedoch anti-angiogenetisch wirken [135, 136]. Zudem können sie prothrombotisch und proinflammatorisch wirken [132, 137, 138].

Erythrozytäre Mikropartikel

Erythrozytäre MPs (RBC-MPs) werden bei Aktivierung/Apoptose der Erythrozyten im Rahmen von Alterungsprozessen, Krankheiten oder Lagerungsprozessen freigesetzt [139]. Auf ihrer Oberfläche exprimieren sie das Protein Glykophorin A (CD 235a), mit dem sie identifiziert werden können [140, 141]. Bei der Aktivierung und Apoptose kommt es zum Calcium-Einstrom, was zu einer Ablösung der Membranproteine von den Proteinen des Zytoskeletts führt, dem Spektrin und das Protein 4.1R [142-144]. Dadurch wird die Membran instabil und RBC-MPs werden freigesetzt [144]. Während der Lebensspanne eines Erythrozyten verlieren sie dadurch einen Teil ihres Hämoglobins [145]. Es wurde ursprünglich angenommen, dass die Abgabe dieser Zellbestandteile der Entsorgung von schädlichen Komponenten dient, da Erythrozyten über keine Lysosomen verfügen [146].

Eine andere Vermutung ist, dass die Freisetzung der MPs die Erkennung von geschädigten Erythrozyten fördert [147]. Es konnte gezeigt werden, dass die RBC-MPs die Gerinnung fördern. Dies beruht vor allem darauf, dass der Faktor XIIa durch negative Spannung aktiviert werden kann und der intrinsische Pfad der Gerinnungskaskade initiiert wird [148, 149]. Durch die Exprimierung von negativ geladenen Phospholipiden können die RBC-MPs so die Gerinnung fördern [150]. Sie fördern die Thrombin Entstehung sogar in Abwesenheit des *tissue factors* (TF) [150]. Zudem korrelieren sie mit der Gerinnungsaktivierung und sind zum Beispiel bei der Sichelzellerkrankung erhöht [151, 152]. Neben immunmodulierenden Effekten [153] sind sie außerdem sehr effektive NO Fänger [154] und fördern die zelluläre Adhäsion an das Endothel [155].

Leukozytäre Mikropartikel

Leukozytäre MPs (LMPs) werden von Monozyten, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten abgegeben. Ihre Zusammensetzung und dementsprechend auch ihre Oberflächenmarker variieren je nach Ursprungszelle. LMPs, die von den Monozyten abstammen, tragen CD14 auf ihrer Oberfläche [156]. Die LMPs von neutrophilen Granulozyten werden erkannt durch ihre Leukozyten-spezifischen Marker CD66b oder Lactoferrin und LMPs von Lymphozyten anhand CD4 und CD8 [157-159]. Gemeinsam ist ihnen jedoch das Oberflächenprotein CD45 (Leukocyte common antigen), eine Tyrosin-Proteinphosphatase C [160]. Diese wird in der Immunhistochemie zur Differenzierung der Leukozyten und LMPs verwendet, auch wenn zuletzt gezeigt werden konnte, dass sie sich nicht auf jedem LMP befindet [161]. Weiterhin beinhalten LMPs bioaktive Proteine wie das Interleukin 1, das CD40, die MHC I und II (major histocompatibility complex), sowie das ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1). Durch diese Proteine sind die LMPs an der Leukozyten-Aktivierung, der Endothel-Proliferation, der Neovaskularisation und Monozyten-Adhäsion sowie Migration beteiligt [162-166]. Daneben sind sie jedoch auch prokoagulatorisch wirksam durch die Exprimierung von anionischem Phosphatidylserin sowie dem TF [156, 167] und fördern durch Kollagenasen die Instabilität von Plaques [168].

Thrombozytäre Mikropartikel

Thrombozytäre MPs (PMPs) entstehen bei der Aktivierung der Thrombozyten durch Thrombin, Adenosindiphosphat, Epinephrin, Kollagen und A23187 Ionophor [169], sowie *ex vivo* bei der Aufbereitung und Lagerung von Blutprodukten für die Transfusion [170, 171]. Sie exprimieren Plasmamembran-Glykoproteine wie das GP IIb/IIIa (CD41) und das Alpha-Granulat Membran Protein (GMP 140) [172]. Außerdem transportieren sie den Plättchenaktivierenden Faktor (PAF) [173], ein Phosphorylcholin-Derivat, das für die Thrombozyten-Aggregation und die Freisetzung von Mediatoren sorgt. PMPs spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von thrombotischen Prozessen, insbesondere der Atherosklerose und sind pro-inflammatorisch [174, 175].

Mikropartikel und LVAD Patienten

MPs enthalten einen Teil der Membran und der zytoplasmatischen Proteine von den Zellen, von denen sie abgeschnürt wurden. Außerdem exprimieren sie Phospholipide wie das Phosphatidylserin, dem eine große Bedeutung bei der Initiierung und Aufrechterhaltung der Gerinnungskaskade bei einer Gefäßverletzung zukommt [167, 176]. Zusätzlich kann das Phosphatidylserin während einer Entzündung endotheliale Schäden verursachen [177, 178] und zur Gefäßproliferation beitragen [179]. Dementsprechend kann eine erhöhte Konzentration von MPs mit einer prothrombotischen Neigung einhergehen, eine Entzündung unterhalten und eine Aktivierung des Endothels bewirken [180-182]. Es konnte gezeigt werden, dass die MPs von Blutplättchen, Leukozyten und Endothelzellen bei LVAD Patienten signifikant erhöht waren [183]. Jedoch gibt es auch Studien, die keinen Anstieg der MPs nach LVAD Implantation beschreiben [113, 184]. Die Datenlage bezüglich der MPs bei LVAD Patienten und ihr Einfluss auf die thromboembolischen Komplikationen ist weiterhin unklar.

1.5 Ziele der Arbeit

Zusammengefasst sind die Ziele dieser Arbeit:

- 1) den Einfluss der LVAD Therapie bei Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz auf die Endothelfunktion sowie die Konzentration und die prokoagulatorische Aktivität der zirkulierenden MPs darzulegen, und
- 2) die Endothelfunktion und die prokoagulatorische Aktivität der MPs im Zusammenhang mit thromboembolischen Komplikationen unter LVAD Therapie zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Studiendesign

Der erste Teil der Studie war als Longitudinalstudie angelegt, um den Effekt der LVAD Implantation auf die Endothelfunktion und die Konzentration der zirkulierenden Mikropartikel zu untersuchen. Hier wurden 15 Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz vor einer geplanten LVAD Implantation eingeschlossen und postoperativ nachverfolgt. Bei den Patienten mit anstehender LVAD Implantation wurden die nachfolgend genannten Untersuchungen dreimalig durchgeführt. Der erste Messzeitpunkt war 3 Tage vor LVAD Implantation (T -3d), die zweite Messung erfolgte 2 Wochen nach der Operation (T +14d) und die letzte Messung wurde im Rahmen der Herzinsuffizienz Sprechstunde 3 Monate nach Implantation (T +3mo) durchgeführt.

Der zweite Teil der Studie war als Querschnittsstudie angelegt mit dem Ziel, die Endothelfunktion und die prokoagulatorische Aktivität der MPs im Zusammenhang mit thromboembolischen Komplikationen unter LVAD Therapie zu untersuchen.

Hierfür wurden bei den Patienten mit bereits implantierten LVAD (n=37) und bei den Patienten mit fortgeschrittener, aber noch nicht terminaler Herzinsuffizienz als Kontrollgruppe (n=17), die nachfolgend genannten Untersuchungen an einem einzigen Zeitpunkt durchgeführt.

Alle Patienten wurden über die Studie aufgeklärt und willigten der Studienteilnahme ein. Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf genehmigt (Ethiknummer: 2014082749). Den Patienten wurden Blutproben für die Versuche abgenommen. Zusätzlich wurde eine sonographische Messung der flussmedierten Dilatation (FMD) durchgeführt und Laborwerte ermittelt. Die relevanten Parameter waren das kleine Blutbild, die International Normalized Ratio (INR), das C-reaktive Protein, die Alanin-Aminotransferase, die Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, die LDH, das Gesamtcholesterin, das Low density Cholesterin, das Billirubin (gesamt), der Harnstoff, die Glomeruläre Filtrationsrate sowie das B-natriuretische Peptid.

Primärer Endpunkt was das Eintreten thromboembolischer Ereignisse über ein Jahr. Zu den Ereignissen zählten der Schlaganfall, definiert nach den WHO Kriterien [185], die Pumpenthrombose mit notwendigen Austausch des Systems, der Myokardinfarkt, definiert nach den ESC Guidelines [186] und arterielle Gefäßverschlüsse, nachgewiesen durch entsprechende Klinik und einem dopplersonographischen oder subtraktionsangiographischen Korrelat.

Weiterhin betrachtet wurden leichte und schwere Blutungen. Als schwere Blutung galt eine fatale Blutung, eine symptomatische Blutung in einem kritischen Bereich oder Organ, sowie eine Blutung, die zu einem Hämoglobin Abfall von 2 g/dl oder mehr führte, oder eine Transfusion von 2 Erythrozytenkonzentraten notwendig gemacht hat [187].

2.2 Probengewinnung

Blutabnahme:

Das Blut der Patienten wurde mithilfe einer venösen Punktionskanüle (BD Vacutainer®, Ø 0,8 mm, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA) aus der *Vena mediana cubiti* entnommen. Gesammelt wurde das Blut in 4 Citrat Röhrchen (BD Vacutainer® Citratröhrchen, 2,7 ml, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA), die jeweils bis zur Markierung gefüllt wurden. Das enthaltene Antikoagulans war das 0,109 M gepufferte Na₃-Citrat.

Blutauarbeitung:

Nach der Blutentnahme wurden die Proben binnen 2 h in ein 15 ml Greiner Röhrchen umgefüllt, verschlossen bei 300 x g (Erdbeschleunigung) und einer Temperatur von 19 °C für 15 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig entnommen und auf Eppendorf Reaktionsgefäße mit 1,5 ml Volumen verteilt. Dieser Überstand wurde erneut bei 10.000 x g und 19 °C für 5 min zentrifugiert. Anschließend konnte der zellfreie plasmatische Überstand gewonnen werden und bei -80 °C gelagert werden.

2.3 Durchflusszytometrie zur Analyse der Mikropartikel

Für die Analyse der Mikropartikel wurde das Durchflusszytometer FACSVerse™ flow cytometer (Beckton Dickinson, Heidelberg, Germany) verwendet. Die Durchflusszytometrie (FACS) wurde genutzt, um zirkulierende MPs entsprechend ihrer Oberflächenantigene in Subpopulationen zu diskriminieren und zu quantifizieren [188]. Diese Antigene können mit spezifischen immunologischen Färbetechniken markiert werden, wodurch es möglich wird die MPs in ihre Subpopulationen aufzugliedern [189]:

FACS-Analyse EMPs:

CD144 / VE-Cadherin (vascular endothelial): 130 kDa großes Glykoprotein, dass zu den Zelladhäsionsmolekülen gehört. Da es im Interzellularspalt zwischen den Endothelzellen zu finden ist, ermöglicht es deren Identifizierung. Es ist für die Kohäsion und Organisation der Zell-Zell Interaktion relevant [190].

CD62E / E-Selektin: 97-115 kDa großes Glykoprotein, gehört zu den Zelladhäsionsmolekülen und wird von Zytokin-aktivierten Endothelzellen exprimiert. Es ist ein wichtiger Bestandteil der Entzündungsreaktion und an der Leukozyten-Adhäsion am Endothel mitverantwortlich [191].

CD31 / PECAM-1 (Platelet endothelial cell adhesion molecule): 140 kDa großes Glykoprotein und Mitglied der Immunglobulin Superfamilie. Lokalisiert ist es auf der Oberfläche von Thrombozyten, T-Zellen, Monozyten, neutrophilen Granulozyten sowie in den Interzellularverbindungen der Endothelzellen. CD31 ist beteiligt an der Leukozyten-Migration, Angiogenese und der Integrin Aktivierung [192]. Um es den Endothelzellen zuzuordnen wurde die Zweifachfärbung CD31+/CD41- (PECAM/GP-IIb/IIIa) verwendet.

Zum Nachweis der endothelialen Mikropartikel wurden monoklonale Antikörper gegen VE-Cadherin, E-Selektin und PECAM-1 verwendet [193, 194].

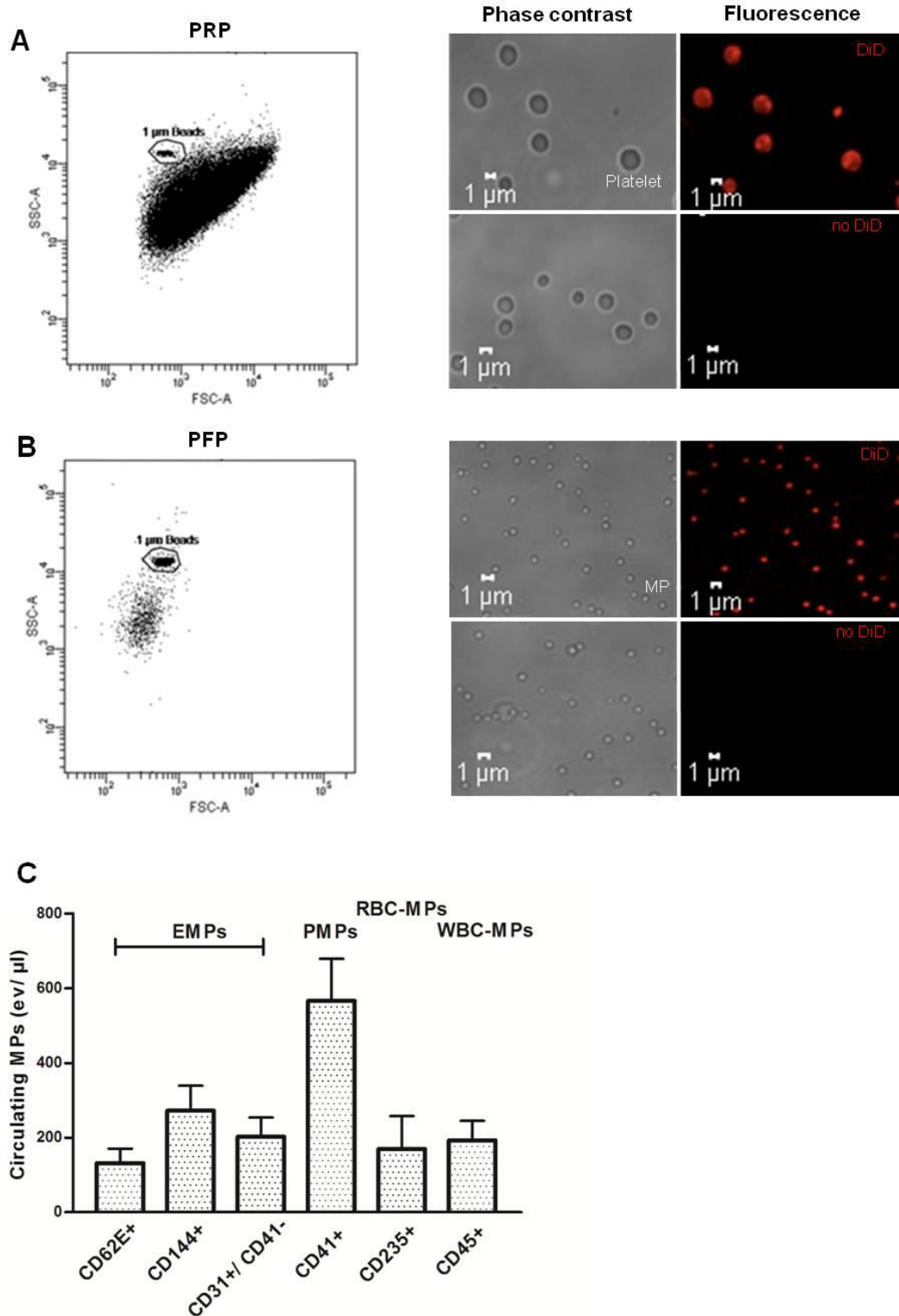


Abbildung 1: Analyse der Zusammensetzung und Morphologie der verschiedenen Fraktionen von menschlichem Plasma, erhalten durch sequentielle Zentrifugation: (A) Plättchenreiches Plasma (PRP) enthält eine dichte Population von Thrombozyten > 1 μm und von MPs < 1 μm wie durch die Durchflusszytometrie (linke Seite), Phasenkontrast oder Fluoreszenz-basierter Laserscan-Mikroskopie gezeigt wird. Die Membranen wurden mittels DiD Cell-Labeling Solution angefärbt. **(B)** Plättchenfreies Plasma (PFP) enthält nur noch MPs. **(C)** Die Subpopulationen der MPs in PFP einer gesunden Person wurden durch die Durchflusszytometrie anhand der Expression von Membranspezifischen Antigenen diskriminiert. Die Werte sind die Mittelwerte ± Standardabweichung. (Modifiziert nach Horn et al. [189])

FACS Analyse RBC-MPs:

CD235 / Glycophorin A: 16.3 kDa großes Glykoprotein in der Erythrozytenmembran. Zusammen mit Glycophorin B ist es wichtiger Bestandteil der Antigendeterminierung für Blutgruppen. Mit monoklonalen Antikörpern gegen Glycophorin A ließen sich die RBC-MPs identifizieren [140].

FACS Analyse LMPs:

CD45 / LCA (leukocyte common antigen): 200-220 kDa großes Enzym, das zu der Protein-Tyrosin Phosphatasen Familie gehört. Es kommt in den Leukozyten vor und erlaubt deren Diskriminierung [195].

FACS Analyse PMPs:

CD41 / Integrin alpha 2b: 130 kDa großes Glykoprotein und Bestandteil des GPIIb-IIIa-Fibrinogenrezeptors. Der Rezeptor kommt fast ausschließlich in Thrombozyten vor und führt nach Bindung von Fibrinogen zu deren Aktivierung [196, 197].

Probenaufarbeitung:

Die Proben wurden bis zur Verarbeitung bei -80 °C gelagert. Zur weiteren Verarbeitung wurden sie bei Raumtemperatur zum Auftauen erwärmt. Anschließend wurden die Proben durch vortexen homogenisiert. Aus den aufgetauten Proben wurden 90 µl entnommen und mit 910 µl calciumfreier, phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) vermengt, um einen Verdünnungsgrad von 1:10 zu erhalten. Nun wurden 8 FACS Röhrchen mit jeweils 100 µl des verdünnten Patientenplasmas befüllt. Anschließend wurden die Proben mit den oben genannten fluoreszierenden Antikörpern oder deren Isotypen-Kontrollen vermengt. Bei den Isotypen-Kontrollen handelt es sich um Negativkontrollen, die das Ausmaß an Hintergrundsignal des Primärantikörpers erfassen sollen. Es erfolgte eine exakt 30-minütige Inkubation im Dunkeln, anschließend wurde in jedes der 8 Röhrchen 300 µl calciumfreies PBS gegeben und die Proben gevortext. Danach wurden die Proben mittels FACSVerse™ flow cytometer analysiert.

Datenauswertung:

Nach 10.000 Ereignissen oder nach Ablauf einer Minute wurde die Messung gestoppt. Die Quantifizierung der MPs Konzentration erfolgte durch den internen Flow Sensor des FACSVerse™, der aus der Anzahl der gemessenen Ereignisse und dem durchgezogenen Volumen die absolute Konzentration ermittelte. Die untere Nachweisgrenze wurde mit Negativkontrollen (unspezifische bindende PE- und FITC-gelabelte Antikörper) bestimmt. Für die obere Nachweisgrenze wurden Standard Mikrobeads (1,0 µm) verwendet, um die MPs $\leq 1 \mu\text{m}$ als zählbares Element zu definieren. Nur die Ergebnisse innerhalb dieser Grenzen wurden mithilfe der Cell Quest Software Version 3 ausgewertet. Zusätzlich wurde durch das Vorwärtsstreulicht (FSC) festgelegt, ab wann ein Partikel gezählt werden soll um elektronisches Rauschen auszuschließen. So konnten die MPs anhand ihrer Größe (0,1 – 1,0 µm), Dichte (SSC) und ihrer Fluoreszenzintensität detektiert werden.

2.4 Bio-Immunoassay zur Bestimmung der prokoagulatorischen Aktivität von Mikropartikel im Blutplasma

Die prokoagulatorische Aktivität von MPs im Blutplasma wurde mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) bestimmt (ZYMUPHEN™ MP-Activity Set, Hyphen BioMed, Neuville-sur-Oise, France). Eine Mikro ELISA Platte, die mit Streptavidin und biotinylierten Annexin V beschichtet war, wurde hierfür mit Patientenserum und Kontrolllösungen beimpft. Zur Kalibrierung wurde eine Kalibratorlösung (gewaschenes und lysiertes Thrombozyten Konzentrat) in Kombination mit einer Verdünnungslösung (0,05% Kathon CG, Gerinnungsfaktor IIa und Xa Inhibitoren) verwendet und 100 µl hiervon in absteigenden Konzentrationen aufgetragen. Anschließend wurden je 20 µl Patientenserum oder Kontrolllösung mit je 380 µl Verdünnungslösungen vermischt und 100 µl aufgetragen.

Nachdem alle Felder befüllt waren, wurde die Platte 1 h bei exakt 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Felder dreimal gewaschen. Dafür wurden 300 µl einer Waschlösung in jedes Feld gegeben, anschließend abgezogen und wieder verworfen. Danach wurde in jedes Feld 100 µl einer Lösung aus Gerinnungsfaktor Va, Xa und lyophilisierten Calcium und anschließend 50 µl einer Lösung aus gereinigtem menschlichem Prothrombin gegeben und

für weitere 10 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend gab man 50 µl von Thrombin spezifischen, chromogenen Substraten hinzu, inkubierte für weitere 3 min bei 37 °C und beendete anschließend die Reaktion mit 2%iger Citronensäure.

Die MPs in dem Patientenserum banden sich an das Annexin V der ELISA Platte und exprimierten ihre Phospholipide. Dies ermöglichte dem Gerinnungsfaktor Va und Xa in Anwesenheit von Calcium die Umwandlung von Prothrombin in Thrombin. Die Menge der Thrombin-Generierung hing direkt von der Phospholipid Konzentration ab und wurde durch die spezifische Aktivität des Thrombin Substrats ermittelt. Durch Lichtabsorption bei 405 nm wurde die generierte Menge Thrombin anschließend erfasst und die Skalierung der prokoagulatorischen Aktivität der MPs ermöglicht.

2.5 Flussmedierte Vasodilation

Die sonographische Messung der FMD wurde erstmalig 1992 von Celermajer et al. vorgestellt [198]. Es ist ein etabliertes, nicht-invasives Verfahren zur Erfassung der Endothelfunktion mithilfe der Duplexsonographie [199, 200]. Ziel ist es hierbei, durch mehrminütige Komprimierung des Gefäßes und eine anschließende Wiedereröffnung hohe Scherkräfte zu erzielen, um eine maximale NO Freisetzung und damit eine maximale Dilatation des Gefäßes zu erreichen. Dies wird sonographisch festgehalten und diese Methode wurde hier verwendet, um zu eruieren, ob es bei LVAD Implantation zu einer Abnahme der Endothelfunktion im Verlauf kommt.

Messbedingungen:

Die Messungen wurden morgens zwischen 8:00 und 12:00 Uhr nach einer 10-stündigen Nüchternphase durchgeführt, um eine einheitliche Ausgangslage zu schaffen. Die Patienten wurden zunächst bei Raumtemperatur (21 °C) in liegender Position in einer zehn minütigen Ruhephase belassen, um endogene sympathische Stimuli zu reduzieren, die sich auf die Hämodynamik auswirken können [201].

Messvorgang:

Während der Ruhephase wurde eine 3-Kanal Elektrokardiographie (EKG) angelegt. Dies ist notwendig, um die Messungen des Durchmessers einheitlich auf der R-Zacke durchzuführen. Nun wurde eine Blutdruckmanschette (120 mm) am Oberarm platziert. Anschließend wurde die *Arteria brachialis* 3-5 cm oberhalb der *Fossa antecubitalis* mit einem Linearschallkopf des Ultraschallgerätes der Firma GE (GE, Healthcare, VIVID i, München, Deutschland) aufgesucht und longitudinal im B-Mode-Bild dargestellt. Im Idealfall präsentierte sie sich bogenförmig. Zur Bestätigung, dass es sich um ein arterielles Gefäß handelte, wurde nun eine Pulswellenaufnahme getätigt und gespeichert. Nun wurde eine Aufnahme von der *Arteria brachialis* durchgeführt, bestehend aus 100-150 B-Mode-Einzelbildern, die sogenannte Baseline. Anschließend wurde die am proximalen Oberarm angelegte Blutdruckmanschette auf 200 mmHg aufgepumpt. So komprimierte man die *Arteria brachialis* für exakt 5 min, um bei Wiedereröffnung durch die ischämische Vasodilatation eine reaktive Hyperämie herbeizuführen. Diese wurde durch eine erhöhte Flussgeschwindigkeit ausgelöst, was zu erhöhten Scherkräften auf die Gefäßwand führte [202-204]. Voraussetzung für die adäquate Messung war, dass die Position des Schallkopfs an der gleichen Stelle blieb und auch der Patient seine Lage nicht veränderte. Nachdem die Blutdruckmanschette wieder vollständig entlastet war, wurden zum Zeitpunkt 0 s, 20 s, 40 s, 60 s, 80 s, 100 s erneut Pulswellenaufnahmen und B-Mode-Bilder von der *Arteria brachialis* zur Bestimmung des Durchmessers gemacht. So konnte der maximale Durchmesser der *Arteria brachialis* nach Ischämie erfasst werden. Um die FMD zu bestimmen, wurde später der maximale Durchmesser in Relation zur Baseline gesetzt.

Auswertung:

Der Arterienradius wurde durch eine automatisierte, speziell für die FMD Messung entwickelten Software (Brachial Analyzer, Medical Imaging Applications, Iowa City, Iowa) detektiert. Betrachtet wurden hierfür die B-Mode-Bilder der Baseline sowie postischämisch bei 20 s, 40 s, 60 s, 80 s, 100 s. Die Messungen erfolgten zeitgleich zur R-Zacke, um eine Beeinflussung des Arterienradius durch die Gefäßperistaltik zu verhindern [198]. Aus der 100-150igen Einzelbilderreihe wurde zunächst ein Bild festgelegt, bei dem das charakteristische Doppellinienmuster der Gefäßwand gut erkennbar war. Hier wurde

anschließend der Bereich markiert, der gemessen werden soll und als Zielbereich (ROI) bezeichnet. Anschließend ermittelte die Software für alle 100-150 B-Mode-Bilder die Media-Adventitia-Grenze (M-Linie) und errechnete den Durchmesser des Gefäßes anhand des Abstands gegenüberliegender Punkte in der ROI (siehe Abbildung (Abb.) 2). Zusätzlich gab das Gerät die Wahrscheinlichkeit einer validen Messung an. Es wurden pro B-Mode-Bildserie drei R-Zacken betrachtet und der Mittelwert des Zeitpunktes für die Berechnung verwendet. Für die FMD Berechnung wurde immer der Baseline Wert verwendet, sowie der maximale Wert aus den Zeitpunkten 20 s, 40 s, 60 s, 80 s, 100 s. Die Formel zur Ermittlung der prozentualen FMD war: $(\text{Diameter}_{\text{max}} - \text{Diameter}_{\text{baseline}}) / \text{Diameter}_{\text{baseline}}$.

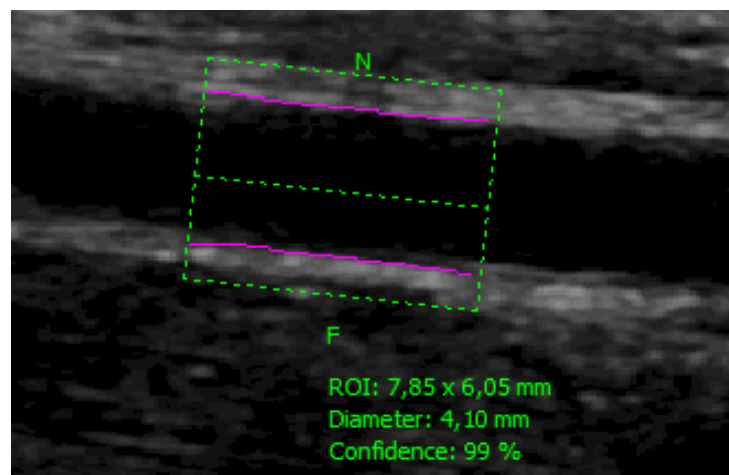


Abbildung 2: Auswertung der gemessenen flussmedierten Vasodilatation (FMD). Automatisierte Erfassung der schallkopfnahen und schallkopffernen M-Linie (Lila Markierung) in dem zuvor manuell festgelegten Zielbereich (ROI, grüne Markierung) und anschließende Diameter Berechnung.

2.6 Statistik

Die kontinuierlichen Daten werden als Mittelwert (M) \pm der Standardabweichung (SD) vom Mittelwert angegeben, die kategorialen Daten als absolute Zahlen. Der D'Agostino & Pearson Test wurde benutzt, um die Normalverteilung zu ermitteln. Kategoriale Daten wurden mit dem Chi-Quadrat-Test oder dem Fisher Test verglichen. Der Student t-Test bzw. der Wilcoxon Test wurde für die kontinuierlichen Daten verwendet. P-Werte $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant festgelegt. In der Longitudinalstudie wurden die drei Messzeitpunkte untereinander mithilfe der einfachen Varianzanalyse verglichen und

anschließend durch einen Bonferroni korrigierten Post-hoc-test überprüft. Die Variablen mit einem p-Wert $< 0,1$ in der univariaten Analyse wurden im multivariaten Model analysiert. Alle statistischen Tests wurden mit SPSS Version 24.0 (IBM, Armonk, NY, USA) und Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Longitudinalstudie

In die Longitudinalstudie wurden 15 Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz (1 Frau, 14 Männer) eingeschlossen, die ein LVAD implantiert bekamen. Sie wurden hinsichtlich ihrer endothelialen Funktion, der Konzentration der zirkulierenden MPs und der MPs induzierten Thrombin-Generierung untersucht. Diese Messungen wurden zu drei Zeitpunkten durchgeführt, vor LVAD Implantation (T1), 2 Wochen nach der Implantation (T2) und 3 Monate nach der Implantation (T3).

Die Patienten und LVAD Charakteristika werden in Tabelle (Tab.) 1 bzw. 2, die Laborparameter in Tab. 3 aufgezeigt. Von den 15 LVAD Patienten waren 8 mit einem LVAD vom Typ HeartWare und 7 mit einem HeartMate III ausgerüstet. Eine Implantation des HeartMate II erfolgte nicht in dem Longitudinalkollektiv.

Parameter	Einheit	LVAD Kollektiv
n		15
Geschlecht	[w/m]	1/14
Alter	[Jahre]	54,8 ± 9
BMI	[kg/m ²]	29 ± 4
Diabetes	[%]	20
Hypertonus	[%]	60
Dilatative Kardiomyopathie	[%]	53
Ischämische Kardiomyopathie	[%]	46
KHK	[%]	60
Vorhofflimmern	[%]	53
Arterielle Verschlüsse	[%]	6
MAP	[mmHg]	78,6 ± 19,1
NYHA	[I,II,III,IV]	0/2/6/6

Tabelle 1: Charakterisierung der Patienten. Werte als Mittelwert ± Standardabweichung. (Modifiziert nach Kramser et al. [1])

Parameter	Einheit	LVAD Kollektiv
n		15
Heart Ware	[n]	8
Heart Mate II	[n]	0
Heart Mate III	[n]	7
Pulsindex (T3)		3,27 ± 0,1
Fluss (T3)	[L/min]	4,64 ± 0,3
Umdrehungszahl (T3)	[Umdrehungen/min]	4600 ± 1429
Leistung (T3)	[watt]	4,16 ± 0,3

Tabelle 2: Pumpenparameter. Werte als Mittelwert ± Standardabweichung. (Modifiziert nach Kramser et al.

[1])

Parameter	Einheit	T1	T2	T3	P-Wert
n		15	14	12	
Geschlecht	[w/m]	1/14	1/13	0/12	
CRP	[mg/dl]	2,8 ± 3,1	12 ± 7,2	1,1 ± 1,8	0,001
BNP	[ng/L]	8332 ± 10436	2976 ± 2227	1922 ± 1425	0,144
GPT	[U/L]	90 ± 107,7	40,1 ± 26,5	26,8 ± 26,2	0,034
GOT	[U/L]	67 ± 73,2	64 ± 42,4	27,6 ± 16,2	0,131
LDH	[U/L]	286 ± 125	398 ± 169,9	231,2 ± 35,6	0,007
Gesamtcholesterin	[mg/dl]	104 ± 33	121 ± 41	147 ± 49	0,064
LDL	[mg/dl]	53 ± 26	47 ± 4	-	
Billirubin	[mg/dl]	1,72 ± 0,8	3 ± 1,6	0,9 ± 0,5	0,001
Harnstoff	[mg/dl]	77 ± 40,2	58,7 ± 36	46,6 ± 27	0,106
INR		1,5 ± 0,4	2,6 ± 0,8	2,4 ± 0,6	0,001
eGFR	[ml/min]	51,4 ± 24,4	70,3 ± 33,2	67 ± 23	0,176
Leukozyten	[*1000/μl]	9,3 ± 4,1	13,4 ± 8,4	7,8 ± 2,1	0,049
Erythrozyten	[*Mio/μl]	4,3 ± 0,7	3,5 ± 0,2	4,2 ± 0,6	0,001
Thrombozyten	[*1000/μl]	225 ± 86	185 ± 105	258 ± 79	0,157
Hämoglobin	[g/dl]	12 ± 2	10 ± 0,8	11,4 ± 1,8	0,014

Tabelle 3: Laborparameter. Werte als Mittelwert ± Standardabweichung. (Modifiziert nach Kramser et al.

[1])

Effekt der LVAD Implantation auf die endotheliale Funktion:

Die FMD verschlechterte sich von $3,5 \pm 0,4$ % vor LVAD Implantation auf $2,3 \pm 0,3$ % nach LVAD Implantation (T1 vs. T2; $p=0,013$) und auf $2,5 \pm 0,2$ % 3 Monate nach Implantation (T1 vs. T3; $p=0,023$). Es zeigte sich kein Unterschied im Mittelwert zwischen den Ergebnissen kurz (T2) nach LVAD Implantation und 3 Monate (T3) danach ($p=0,656$) (Abb. 3). [1]

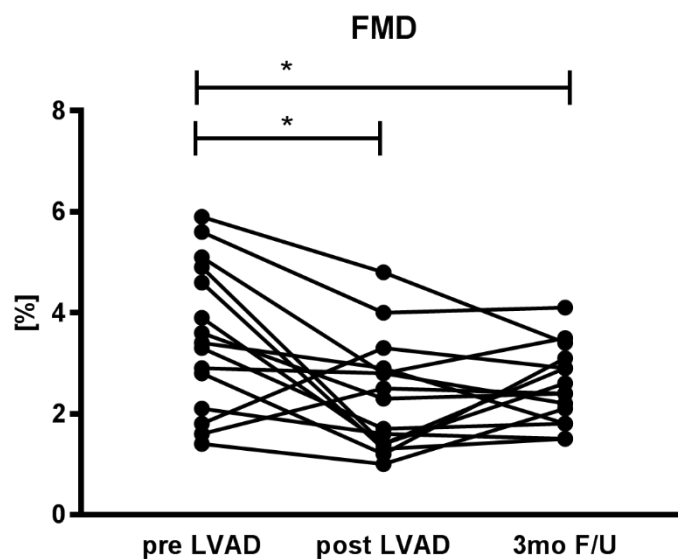


Abbildung 3: Vergleich der flussvermittelten Vasodilatation (FMD) vor der Linksherzunterstützungssystem (LVAD) Implantation (pre LVAD) sowie zwei Wochen (post LVAD) und drei Monate (3mo F/U) danach: Die FMD beschreibt die Endothelfunktion und wird mit dem transbrachialen Ultraschall gemessen. Es zeigte sich eine Verschlechterung der FMD sowohl drei Tage und drei Monate nach der Implantation; *= $p < 0,05$. (Kramser et al. [1])

Einfluss des LVAD auf die Konzentration zirkulierender Mikropartikel:

Die Konzentration der PMPs ($CD41^+$ MPs) erhöhte sich von 164 ± 39 / μ l vor LVAD Implantation auf 411 ± 104 / μ l nach der Implantation (T1 vs. T2; $p=0,017$) und 452 ± 105 / μ l nach 3 Monaten (T1 vs. T3; $p=0,008$). Es zeigte sich kein Unterschied im Mittelwert zwischen den Ergebnissen kurz (T2) nach LVAD Implantation und drei Monate (T3) danach ($p=0,0589$) (Abb. 4A). [1]

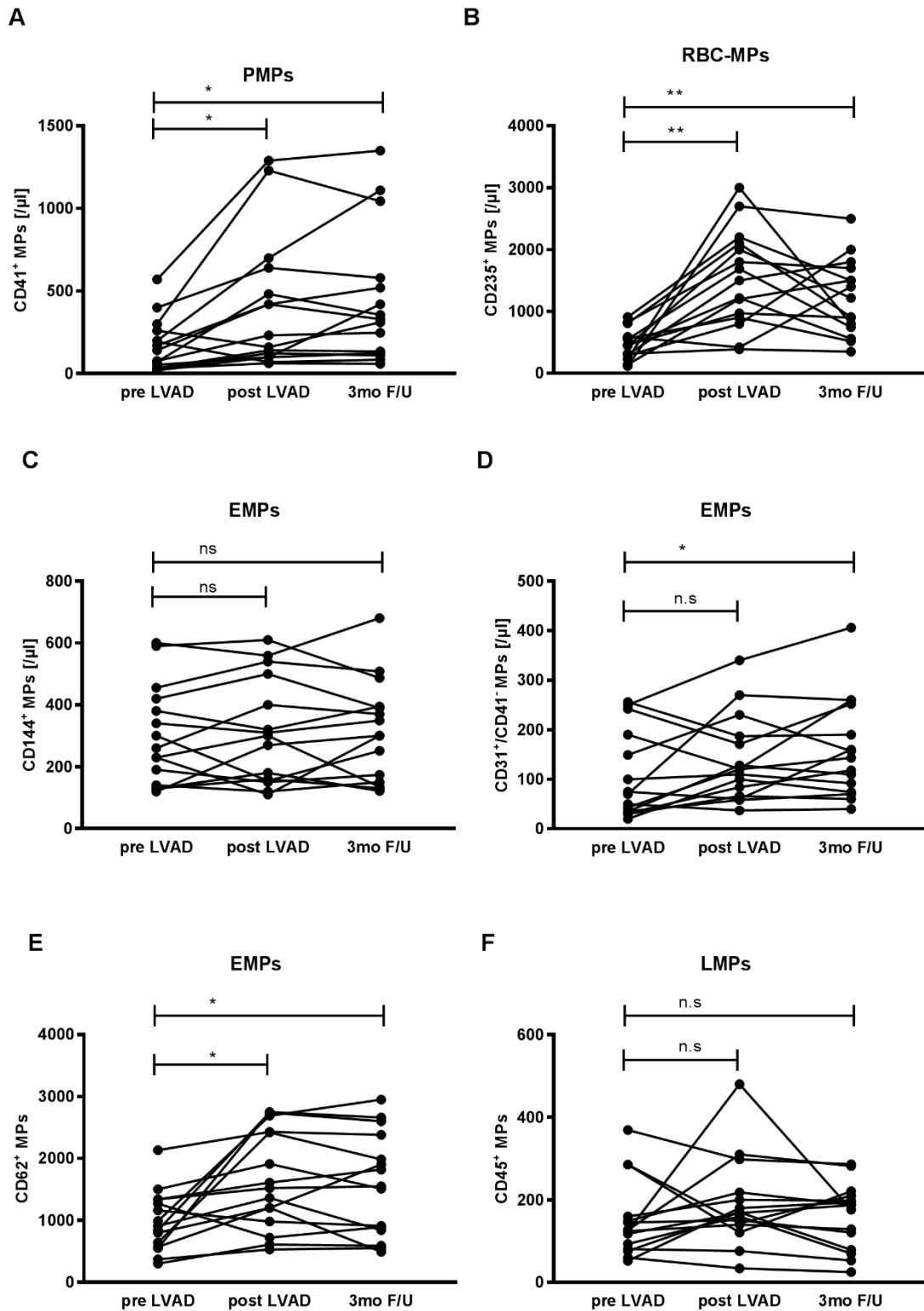


Abbildung 4: Vergleich der Konzentration der Mikropartikel (MPs) Subpopulationen vor der Linksherzunterstützungssystem (LVAD) Implantation (pre LVAD) sowie zwei Wochen (post LVAD) und drei Monate (3mo F/U) danach: Bestimmung der MPs Konzentration durch Fluoreszenz-basierter Durchflusszytometrie. (A) CD41 + PMPs (B) CD235+ RBC-MPs (C) CD144+ EMPs (D) CD31+ EMPs (E) CD62+ EMPs (F) CD45+ LMPs; *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$. (Modifiziert nach Kramser et al. [1])

Die Konzentration der CD31⁺ EMPs erhöhte sich von 105 ± 23 / μ l vor LVAD Implantation auf 139 ± 22 / μ l nach der Implantation (T1 vs. T2; $p=0,023$) und 160 ± 26 / μ l nach 3 Monaten (T1 vs. T3; $p=0,017$). Es zeigte sich kein Unterschied im Mittelwert zwischen den Ergebnissen kurz (T2) nach LVAD Implantation und 3 Monate (T3) danach ($p=0,3420$) (Abb. 4D). [1]

Die Konzentration der CD62⁺ EMPs erhöhte sich von 981 ± 126 / μ l vor LVAD Implantation auf 1.645 ± 206 / μ l nach der Implantation (T1 vs. T2; $p=0,019$) und 1.575 ± 216 / μ l nach 3 Monaten (T1 vs. T3; $p=0,039$). Es zeigte sich kein Unterschied im Mittelwert der Ergebnisse kurz (T2) nach LVAD Implantation und 3 Monate (T3) danach ($p=0,726$) (Abb. 4E). [1]

Die Konzentration der CD144⁺ EMPs veränderte sich nicht mit LVAD Implantation. Vor LVAD Implantation betrug die Konzentration 301 ± 41 / μ l, 312 ± 45 / μ l nach der Implantation (T1 vs. T2; $p=0,874$) und 316 ± 42 / μ l nach 3 Monaten (T1 vs. T3; $p=0,725$) (Abb. 4C). [1]

Die Konzentration der RBC-MP (CD235⁺MPs) erhöhte sich von 467 ± 63 / μ l vor LVAD Implantation auf 1.526 ± 202 / μ l nach der Implantation (T1 vs. T2; $p=0,001$) und 1.227 ± 159 / μ l nach 3 Monaten (T1 vs. T3; $p=0,003$). Es zeigte sich kein Unterschied im Mittelwert zwischen den Ergebnissen kurz (T2) nach LVAD Implantation und 3 Monate (T3) danach ($p=0,386$) (Abb. 4B).

Die Konzentration der CD45⁺ LMPs veränderte sich nicht mit LVAD Implantation. Vor LVAD Implantation betrug die Konzentration 150 ± 24 / μ l, 190 ± 28 / μ l nach der Implantation (T1 vs. T2; $p=0,463$) und 161 ± 20 / μ l nach 3 Monaten (T1 vs. T3; $p=0,815$) (Abb. 4F).

Effekt der LVAD Implantation auf die Mikropartikel induzierte Thrombin-Generierung:

Es zeigte sich eine Zunahme der prokoagulatorischen Aktivität der zirkulierenden MPs im Sinne einer gesteigerten Thrombin-Generierung vor und nach LVAD Implantation. Die MPs induzierte Thrombin-Generierung erhöhte sich von $15,4 \pm 1,9$ nM (nach 10-minütiger Reaktionszeit) vor Implantation auf $33,9 \pm 5,7$ nM (nach 10-minütiger Reaktionszeit, T1 vs. T2; $p=0,017$) nach Implantation und auf $30,1 \pm 4,7$ nM (nach 10-minütiger Reaktionszeit, T1

vs. T3; $p=0,017$) nach 3 Monaten. Es zeigte sich kein Unterschied im Mittelwert zwischen den Ergebnissen kurz (T2) nach LVAD Implantation und 3 Monaten (T3) danach ($p=0,426$) (Abb. 5). [1]

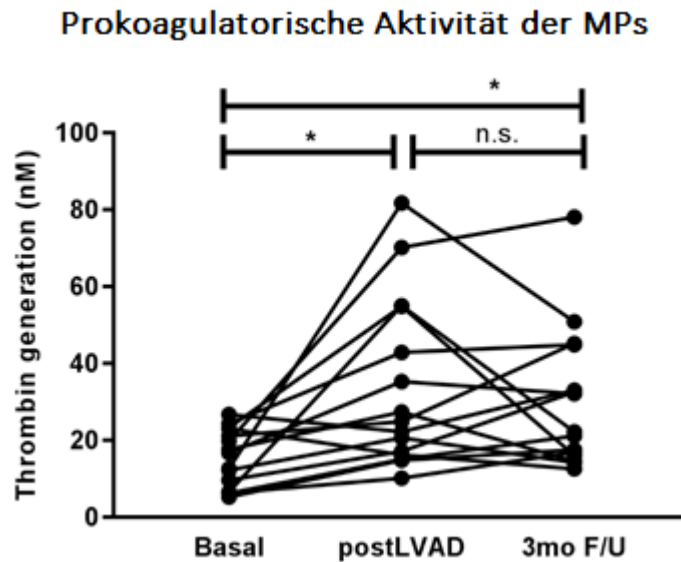


Abbildung 5: Vergleich der prokoagulatorischen Aktivität der Mikropartikel (MPs) vor der Linksherzunterstützungssystem (LVAD) Implantation (pre LVAD) sowie zwei Wochen (post LVAD) und drei Monate (3mo F/U) danach: Bestimmung der prokoagulatorischen Aktivität durch die MPs induzierte Thrombin-Generierung im Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA); * = $p < 0,05$. (Kramser et al. [1])

3.2 Querschnittsstudie

In der Querschnittsstudie wurden 54 Patienten eingeschlossen. Es wurde der Zusammenhang zwischen thromboembolischen Ereignissen, der Endothel Funktion, der Konzentration der MPs, und der MPs induzierten Thrombin-Generierung untersucht.

Die 37 Patienten (35 Männer, 2 Frauen) mit LVAD wurden unterteilt in Patienten mit thromboembolischen Komplikationen (LVAD (+)events) innerhalb von 12 Monaten LVAD Therapie und LVAD Patienten ohne thromboembolische Komplikationen (LVAD (-)events). Von den 37 Patienten waren 24 mit einem HeartWare, 5 mit einen HeartMate II und 8 mit einem HeartMate III versorgt. Insgesamt wurden 8 thromboembolische Komplikationen bei 7 verschiedenen Patienten dokumentiert. Das Kontrollkollektiv setzte sich aus 17 Personen (1 Frau, 16 Männer) mit chronischer Herzinsuffizienz zusammen (CHF).

Die Patienten und LVAD Charakteristika werden in Tab. 4 bzw. 5, die thromboembolischen Komplikationen in Tab. 6 aufgezeigt.

Parameter	Einheit	Kontrollgruppe	LVAD Patienten	P-Wert
N		17	37	
Geschlecht	[w/m]	1/16	2/35	
Alter	[Jahre]	61,6 ± 13,7	59,1 ± 10,3	0,46
BMI	[kg/m ²]	29,9 ± 7,5	28 ± 5,6	0,359
Diabetes	[%]	47	32	
Hypertonus	[%]	65	43	
Dilatative Kardiomyopathie	[%]	47	43	
Ischämische Kardiomyopathie	[%]	35	54	
KHK	[%]	65	68	
Vorhofflimmern	[%]	41	38	
Arterielle Verschlüsse	[%]	12	11	
MAP	[mmHg]	86,3 ± 14	88 ± 12,4	0,682
NYHA	[I,II,III,IV]	2/3/9/3	20/6/5/1	
CRP	[mg/dl]	4,9 ± 5,2	1,6 ± 2,8	0,003
BNP	[ng/L]	6228 ± 7108	1564 ± 1226	0,001
GPT	[U/L]	53,9 ± 81,9	32,2 ± 49	0,23
GOT	[U/L]	69,9 ± 91,2	40,5 ± 62	0,171
LDH	[U/L]	304,6 ± 273	290 ± 176,7	0,814
Gesamtcholesterin	[mg/dl]	144 ± 49	161 ± 50	0,287
LDL	[mg/dl]	80,7 ± 52,8	82,7 ± 62,2	0,961
Bilirubin	[mg/dl]	1,1 ± 0,5	0,9 ± 0,9	0,411
Harnstoff	[mg/dl]	37,9 ± 14	48,4 ± 24,8	0,11
INR		1,3 ± 0,4	2,4 ± 0,5	0,001
eGFR	[ml/min]	80,1 ± 22,3	64,2 ± 22,2	0,018
Leukozyten	[*1000/μl]	9,3 ± 2,2	7,6 ± 2	0,007
Erythrozyten	[*Mio/μl]	4,4 ± 0,3	4,2 ± 0,6	0,2
Thrombozyten	[*1000/μl]	189,3 ± 69,2	242,2 ± 83,4	0,027
Hämoglobin	[g/dl]	13 ± 1,6	11,8 ± 1,8	0,023

Tabelle 4: Charakterisierung der Patienten. Werte als Mittelwert ± Standardabweichung. (Modifiziert nach Kramser et al. [1])

Parameter	Einheit	Kontrollgruppe	LVAD Patienten	P-Wert
N		17	37	
Heart Ware	[n]	0	24	
Heart Mate II	[n]	0	5	
Heart Mate III	[n]	0	8	
Pulsindex		0	3,9 ± 0,9	
Fluss	[L/min]	0	4,7 ± 0,8	
Umdrehungszahl	[Umdrehungen/min]	0	5050 ± 3049,5	
Leistung	[watt]	0	3,9 ± 0,7	

Tabelle 5: Pumpenparameter. Werte als Mittelwert ± Standardabweichung. (Modifiziert nach Kramser et al. [1])

Parameter	Einheit	Kontrollgruppe	LVAD Patienten	P-Wert
n		17	37	
Große Blutung	[%]	12	32	
Kleine Blutung	[%]	0	32	
Schlaganfall	[%]	24	21	
Myokardinfarkt	[%]	0	8	
Arterieller Verschluss	[%]	6	8	

Tabelle 6: Komplikationen. Werte als Mittelwert ± Standardabweichung. (Modifiziert nach Kramser et al. [1])

Thromboembolische Ereignisse:

Es wurden 8 thromboembolische Ereignisse bei 7 verschiedenen Patienten dokumentiert (18,9%). Davon waren 6 Patienten mit einem LVAD vom HeartWare Typ versorgt, einer mit einem HeartMate III. Die Ereignisse wurden über einen Zeitraum von 1 Jahr nach Implantation erfasst. 5 Patienten erlitten einen ischämischen Schlaganfall, wovon sich 3 unmittelbar nach der LVAD Implantation ereigneten. Alle zeigten im Verlauf eine gute Rekonvaleszenz ohne bleibende Defizite. Ein weiterer Patient erlitt einen ischämischen Schlaganfall 1 Jahr nach LVAD Implantation mit einem Verschluss der rechten *Arteria cerebri media*. Mittels Aspirationsthrömbektomie konnte eine erfolgreiche mechanische Rekanalisation erreicht werden. Dieser Patient verzeichnete auch einen arteriellen Verschluss in der *Arteria tibialis* nach LVAD Implantation bei Heparin-induzierter

Thrombozytopenie Typ 2 (HIT 2). Der Verschluss konnte mit Umstellung der Antikoagulation auf Argatroban erfolgreich kontrolliert werden. Eine Pumpenthrombose wurde bei einem Patienten dokumentiert, die einen Aggregatwechsel erforderte. [1]

Endotheliale Funktion im Zusammenhang mit den thromboembolischen Ereignissen bei LVAD Patienten:

Im Vergleich zu Herzinsuffizienz Patienten ohne LVAD ($3,6 \pm 0,4$ %) war die FMD als Marker der Endothelfunktion bei LVAD Patienten erniedrigt; $2,0 \pm 0,4$ % bei LVAD Patienten ohne thromboembolische Ereignisse und $2,7 \pm 0,2$ % bei LVAD Patienten mit Ereignis, (LVAD (+)events vs. CHF; $p=0,005$, LVAD (-)events vs. CHF; $p=0,025$).

Zwischen LVAD Patienten mit thromboembolischen Ereignissen und LVAD Patienten ohne Ereignisse gab es keinen Unterschied in der FMD ($p=0,311$) (Abb. 6). [1]

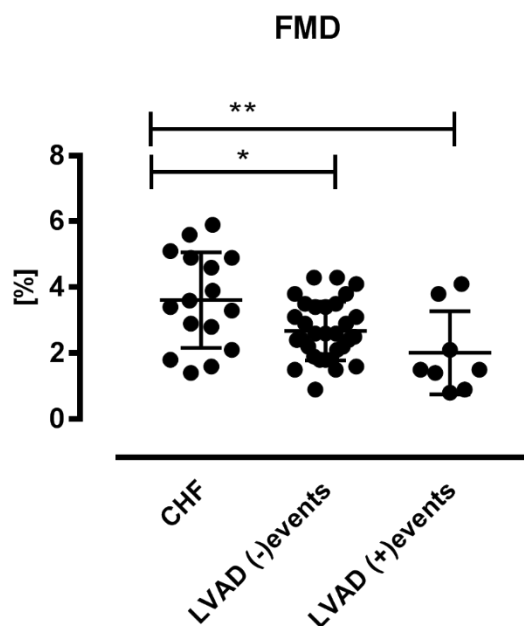


Abbildung 6: Vergleich der flussvermittelten Vasodilatation (FMD) zwischen Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz (CHF) ohne Linksherzunterstützungssystem (LVAD) sowie LVAD Patienten mit (LVAD(+))events) und ohne Ereignisse (LVAD(-)events): Die FMD beschreibt die Endothelfunktion und wird mit dem transbrachialen Ultraschall gemessen. Es zeigte sich eine schlechtere FMD bei den LVAD Patienten mit Ereignissen als auch bei denen ohne im Vergleich zu den Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$. (Kramser et al. [1])

Zirkulierende Mikropartikel und thromboembolische Ereignisse bei LVAD Patienten:

Die Konzentration der PMPs war bei LVAD-Patienten mit thromboembolischen Ereignissen (655 ± 169 / μ l) höher im Vergleich zu LVAD-Patienten ohne thromboembolische Ereignisse (362 ± 33 / μ l, LVAD (+)events vs. LVAD (-)events; $p=0,006$) sowie Herzinsuffizienz-Patienten ohne LVAD (191 ± 39 / μ l, LVAD (+)events vs. CHF; $p=0,001$) (Abb. 7A) [1].

Es gab keinen Unterschied in der Konzentration der CD144⁺ EMPs bei LVAD Patienten mit thromboembolischen Ereignissen (362 ± 80 / μ l) und LVAD Patienten ohne thromboembolische Ereignisse (355 ± 49 / μ l, LVAD (+)events vs. LVAD (-)events; $p=0,997$) oder Patienten mit Herzinsuffizienz ohne LVAD (303 ± 48 / μ l, LVAD (+)events vs. CHF; $p=0,806$) (Abb. 7B) [1].

Die Konzentration der CD45⁺ LMPs unterschied sich nicht bei LVAD-Patienten mit thromboembolischen Ereignissen (220 ± 40 / μ l) im Vergleich zu LVAD-Patienten ohne thromboembolische Ereignisse (162 ± 18 / μ l, LVAD (+)events vs. LVAD (-)events; $p=0,353$), als auch zu Patienten mit Herzinsuffizienz ohne LVAD (156 ± 25 / μ l, LVAD (+)events vs. CHF $p=0,330$ bzw. LVAD (-)events vs. CHF; $p=0,977$) (Abb. 7F).

Es gab keinen Unterschied in der Konzentration der CD31⁺/41⁻ EMPs bei LVAD-Patienten mit thromboembolischen Ereignissen (204 ± 37 / μ l) im Vergleich zu LVAD-Patienten ohne thromboembolische Ereignisse (145 ± 21 / μ l, LVAD (+)events vs. LVAD (-)events; $p=0,301$). In beiden Gruppen war die Konzentration der CD31⁺/41⁻ EMPs höher verglichen mit den Patienten mit Herzinsuffizienz ohne LVAD (67 ± 13 / μ l, LVAD (+)events vs. CHF; $p=0,006$ bzw. LVAD (-)events vs. CHF; $p=0,028$) (Abb. 7C). [1]

Die Konzentration der CD62⁺ EMPs unterschied sich nicht bei LVAD Patienten mit thromboembolischen Ereignissen (1.856 ± 350 / μ l) im Vergleich zu LVAD Patienten ohne thromboembolische Ereignisse (1.578 ± 239 / μ l, LVAD (+)events vs. LVAD (-)events $p=0,799$). In beiden Gruppen war die Konzentration der CD62⁺ EMPs höher verglichen mit den Patienten mit Herzinsuffizienz ohne LVAD (727 ± 97 / μ l, LVAD (+)events vs. CHF; $p=0,0494$ bzw. LVAD (-)events vs. CHF; $p=0,0297$) (Abb. 7D). [1]

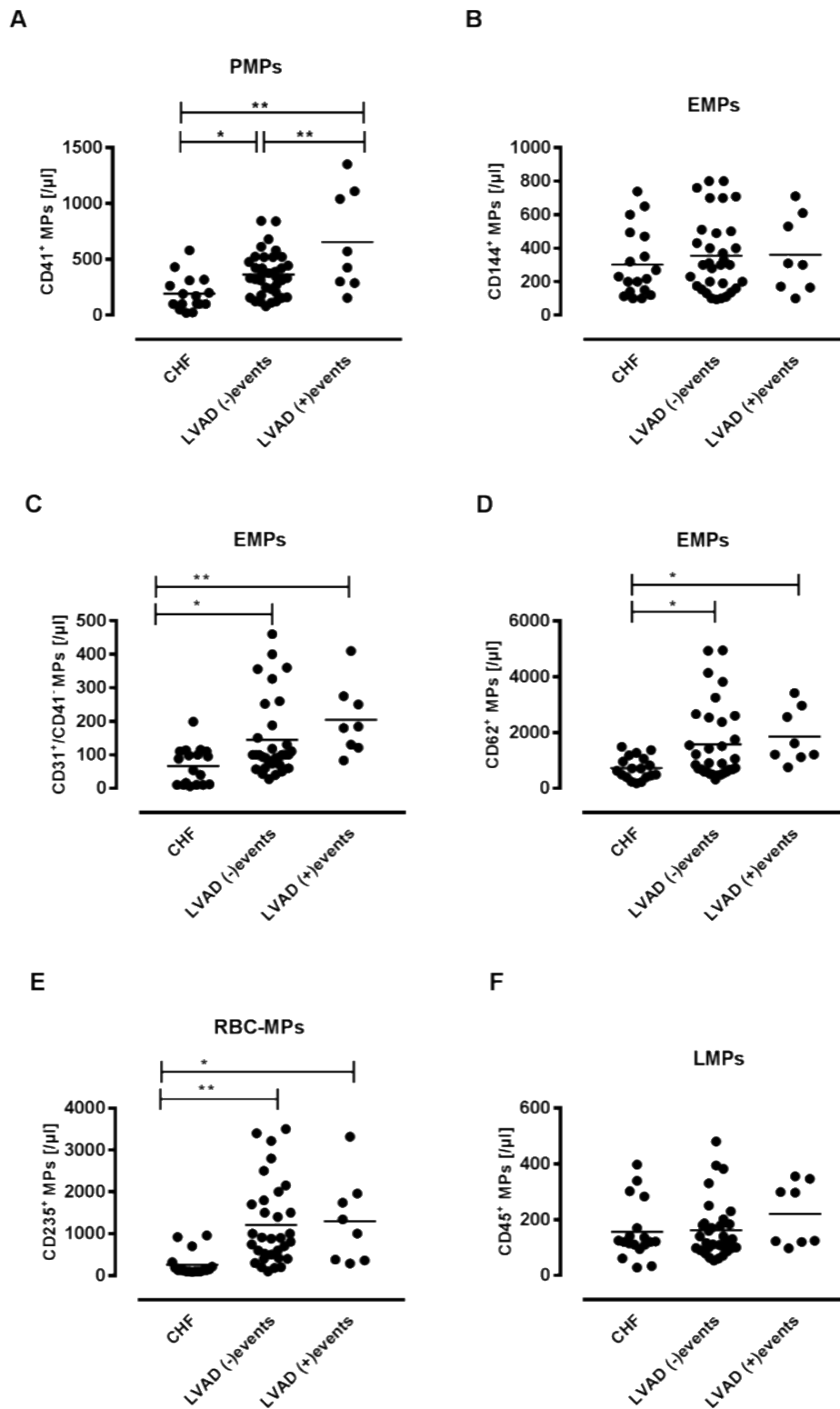


Abbildung 7: Vergleich der Konzentration der Mikropartikel (MPs) Subpopulationen zwischen Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz (CHF) ohne Linksherzunterstützungssystem (LVAD) sowie LVAD Patienten mit (LVAD(+)-events) und ohne Ereignisse (LVAD(-)-events): Bestimmung der MPs-Konzentration durch Fluoreszenz-basierter Durchflusszytometrie. (A) CD41 + PMPs (B) CD144+ EMPs (C) CD31+ EMPs (D) CD62+ EMPs (E) CD235+ RBC-MPs (F) CD45+ LMPs; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$. (Modifiziert nach Kramser et al. [1])

Es gab keinen Unterschied in der Konzentration der RBC-MPs (CD235⁺ MPs) bei LVAD Patienten mit thromboembolischen Ereignissen ($1.299 \pm 367 /\mu\text{l}$) und LVAD Patienten ohne thromboembolische Ereignisse ($1.214 \pm 175 /\mu\text{l}$, LVAD (+)events vs. LVAD (-)events; $p=0,965$). In beiden Gruppen war die Konzentration der CD235⁺ MPs höher verglichen mit den Patienten mit Herzinsuffizienz ohne LVAD ($259 \pm 67 /\mu\text{l}$, LVAD (+)events vs. CHF $p=0,015$ bzw. LVAD (-)events vs. CHF; $p=0,001$) (Abb. 7E).

Mikropartikel induzierte Thrombin-Generierung im Zusammenhang mit den thromboembolischen Ereignissen bei LVAD Patienten:

Die MPs induzierte Thrombin-Generierung war ($55,6 \pm 8,1$ nM nach 10-minütiger Reaktionszeit) bei den LVAD-Patienten mit thromboembolischen Ereignissen höher, als bei den LVAD-Patienten ohne thromboembolische Ereignisse ($30,1 \pm 3,7$ nM, LVAD (+)events vs. LVAD (-)events; $p=0,0042$) und den Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz ohne LVAD ($16,7 \pm 3,4$ nM, LVAD (+)events vs. CHF; $p=0,001$) (Abb. 8) [1].

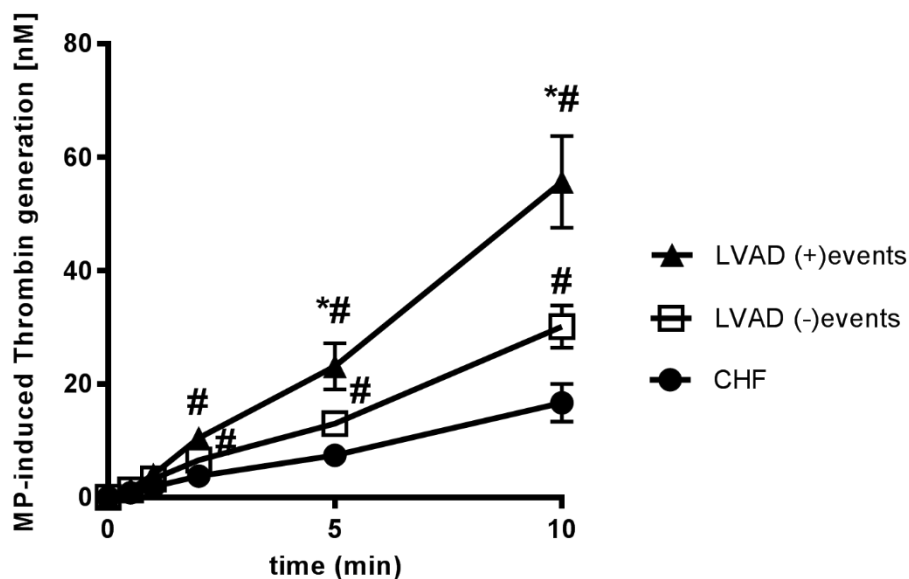


Abbildung 8: Vergleich der prokoagulatorischen Aktivität der Mikropartikel zwischen Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz (CHF) ohne Linksherzunterstützungssystem (LVAD) sowie LVAD Patienten mit (LVAD(+))events) und ohne Ereignisse (LVAD(-)events): Bestimmung der prokoagulatorischen Aktivität durch die MPs induzierte Thrombin-Generierung im 10-minütigen Zeitintervall mithilfe eines Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). Diese war bei Patienten mit LVAD und Ereignis höher als bei LVAD Patienten ohne Ereignis und Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz; * = $p < 0,05$. (Kramser et al. [1])

4 Diskussion

In der vorliegenden Doktorarbeit wurde bei Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz der Einfluss der LVAD Therapie auf die Endothelfunktion sowie die Konzentration und die prokoagulatorische Aktivität der zirkulierenden MPs untersucht. Zudem wurde die Endothelfunktion und die prokoagulatorische Aktivität der MPs im Zusammenhang mit thromboembolischen Komplikationen unter LVAD Therapie untersucht.

Die wesentlichen Ergebnisse dieser Studie sind:

- Bei Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz verschlechtert sich nach LVAD Implantation die endotheliale Funktion, einhergehend mit einer erhöhten Konzentration und erhöhten prokoagulatorischen Aktivität zirkulierender MPs [1].
- Das Auftreten thromboembolischer Komplikationen bei Patienten mit LVAD Unterstützung war mit der erhöhten Konzentration der PMPs und der erhöhten prokoagulatorischen Aktivität der MPs assoziiert [1].

4.1 Die endotheliale Funktion und die Konzentration sowie prokoagulatorische Aktivität zirkulierender Mikropartikel bei Herzinsuffizienz

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich bei Patienten mit Herzinsuffizienz eine verminderte endotheliale Funktion und eine erhöhte Konzentration zirkulierender MPs. Der Mittelwert der FMD als Marker der endothelialen Funktion betrug 3,6 % und lag damit unter dem Normbereich von 6 – 10 % [200]. Die hier gezeigten Ergebnisse bestätigen damit frühere Studien, die ebenfalls erniedrigte FMD Werte bei Herzinsuffizienzpatienten zeigten [205-207]. Meyer et al. konnten zudem nachweisen, dass die FMD mit dem Schweregrad der Herzinsuffizienz weiter abnimmt. Das Ausmaß der endothelialen Dysfunktion korreliert mit dem Schweregrad der Herzinsuffizienz und der funktionellen Kapazität [205]. Im terminalen Stadium betragen die FMD Werte < 5 % [205], dies entspricht auch dem Patientenkollektiv dieser Arbeit. In der Studie von Witman et al. wurde die FMD bei Patienten nach Herztransplantation und bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion (HFREF) untersucht. Auch dort konnte eine FMD von ca. 4,5 %

bei den Patienten mit HFrEF gemessen werden [207].

Als ein wesentlicher Mechanismus der endothelialen Dysfunktion bei Patienten mit Herzinsuffizienz wird eine reduzierte intravaskuläre Bioverfügbarkeit von NO diskutiert [208-210]. Bei Patienten mit Herzinsuffizienz reduziert sich der periphere Blutfluss und die Wandschubspannung, als Stimulus der NO Synthese, nimmt ab. Im Gegensatz dazu erhöht sich die Aktivität des Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE), der oxidative Stress und die Endothelin Produktion [211, 212]. Der prolongiert reduzierte periphere Blutfluss und die erhöhte ACE Aktivität resultieren in einer reduzierten Synthese und Freisetzung von NO [205, 213, 214]. Der erhöhte oxidative Stress führt durch Bildung freier Radikale zu einer Inaktivierung des bioverfügbaren NOs [213]. Zusätzlich verstärkt die erhöhte Endothelinkonzentration den vaskulären Muskeltonus und vermindert die NO-vermittelte Vasodilation [205, 213, 214].

Eine verminderte Endothelfunktion, gemessen mittels der FMD, korreliert mit einer erhöhten Konzentration zirkulierender MPs [215-219]. Der Zusammenhang zeigte sich bei unterschiedlichen Krankheiten wie der koronaren Herzerkrankung [218], langjähriger Adipositas [215], Diabetes mellitus Typ 2 [219], ischämischer Kardiomyopathie mit reduzierter linksventrikulärer Funktion [217] oder der terminalen Niereninsuffizienz [220]. In jeder dieser Studien konnte eine Korrelation zwischen der Verschlechterung der endothelialen Funktion mit Reduktion der FMD und gleichzeitiger Erhöhung der MPs gezeigt werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch bei Patienten mit Herzinsuffizienz eine Verschlechterung der endothelialen Funktion mit einer erhöhten Konzentration zirkulierender MPs assoziiert ist [1]. Die Verschlechterung der endothelialen Funktion basiert auf einem Verlust oder Schädigung der Endothelzellen [221]. Dies führt zu einer Aktivierung oder Apoptose der betroffenen Endothelzellen, wodurch wiederum vermehrt MPs freigesetzt werden [222, 223]. Desto schlechter die endotheliale Funktion, desto mehr MPs zirkulieren im Blutplasma [224]. Zudem konnte auch gezeigt werden, dass die EMPs durch eine Verringerung der NO Produktion und Erhöhung des oxidativen Stresses die endotheliale Funktion weiter verschlechtern [225, 226]. *In vivo* wurde die Aorta

im Mausmodell unterschiedlich hohen Konzentrationen von EMPs zugeführt, es zeigte sich eine Abnahme der NO Produktion mit steigender EMPs Konzentration [225]. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass bei einer Beimpfung der Endothelzellen mit EMPs eine vermehrte Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (Superoxide) erfolgte [226]. Ein Grund dafür könnte die Entkopplung der endothelialen NO Synthase sein, was zu einer vermehrten Produktion von Superoxiden anstelle von NO führen kann [132, 227-230]. Eine Abnahme der endothelialen Funktion führt dementsprechend zu einer Zunahme der EMPs, eine Zunahme der EMPs wiederum zu einer weiteren Abnahme der endothelialen Funktion. Der genaue Mechanismus der MPs Generierung durch Endothelzellen ist jedoch bislang *in vivo* nicht vollständig geklärt. Das aktuelle Verständnis über die Bildung von MPs beruht auf *in vitro* Experimenten mit isolierten oder kultivierten Zellreihen. Dort konnte gezeigt werden, dass sowohl durch Zell Aktivierung als auch Apoptose MPs freigesetzt werden [119-122]. Dies wird verursacht durch eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration, was zu einer reduzierten Lipidmembran Asymmetrie und einer Reorganisation von Zytoskelett-Proteinen führt [231].

Ein Vergleich der absoluten MPs Konzentrationen zwischen den einzelnen Studien ist nur eingeschränkt möglich. Es gibt keine standardisierten Protokolle wie die Proben aufgearbeitet werden sollen, bevor sie auf MPs untersucht werden. So wurden die Proben bei Esposito et al. zunächst bei 160 x g für 10 min zentrifugiert und anschließend für weitere 10 min bei 1.000 x g zentrifugiert, bevor sie zur weiteren Bearbeitung tiefgefroren wurden [215]. Bei Amabile et al. wurden die Proben zunächst mit 20.500 x g für 45 min zentrifugiert, anschließend die Proben mit Markern versetzt und gewaschen, bevor eine erneute Zentrifugation bei 20.500 x g für 45 min erfolgte [220]. Dey-Hazra et al. untersuchten in ihrer Studie den Einfluss von unterschiedlichen Zentrifugationsprotokollen auf die Konzentration der MPs [232]. Es wurden drei verschiedene Protokolle untersucht und anschließend die gemessenen MPs Konzentrationen verglichen. Es zeigte sich, dass bei einer initial langsameren Zentrifugation deutlich erhöhte PMPs Konzentrationen dokumentiert werden konnten. Dies könnte durch ein erhöhtes Maß an Störfaktoren durch verbliebene Zellrückstände (Hintergrund Rauschen) bedingt sein [232]. Diese Ergebnisse werden unterstützt durch eine Studie von Shah et al., bei der sich bei geringeren Zentrifugalkräften im Vergleich zu Protokollen mit höheren Einstellungen ebenfalls eine

erhöhte PMPs Konzentration dokumentieren ließ [233]. Allerdings kann es bei einer schnellen primären Zentrifugation durch die entstehenden Scherkräfte zu einer *in vitro* Mikrovesikulation von Leukozyten und Erythrozyten kommen, bevor diese von der Suspension entfernt werden können [234]. Dies wiederum würde zu erhöhten LMPs und RBC-MPs führen. Die Einführung eines einheitlichen Protokolls gestaltet sich dementsprechend als sehr schwierig. Je nach Fragestellung sollten daher geeignete Verfahren gewählt werden. Zudem wird die Quantität der MPs nicht nur von der Probenaufarbeitung beeinflusst, sondern auch von der Auswertung. Bei der Verwendung verschiedener FACS Geräte können bei der Analyse identisch aufgearbeiteter Proben unterschiedliche Ergebnisse dokumentiert werden. Dies beruht unter anderem auf verschiedenen Messverfahren sowie auf der geräteabhängigen, unterschiedlichen Diskriminierung mit variierenden Hintergrundsignalen [235]. Aus diesen Gründen liegen in unterschiedlichen Zentren unterschiedliche Messbedingungen vor und ein Vergleich der absoluten MPs Konzentrationen ist nur innerhalb eines Zentrums sinnvoll. Durch eine weitere Standardisierung der Prozesse und Eliminierung der Störfaktoren könnte ein Vergleich zwischen den Zentren in Zukunft ermöglicht werden.

4.2 Die endotheliale Funktion und die Konzentration und prokoagulatorische Aktivität zirkulierender MPs nach LVAD Implantation

Nach der Implantation eines LVADs bei Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz verschlechterte sich in der vorliegenden Arbeit in den longitudinal nachverfolgten Patienten die Endothelfunktion noch weiter und die Konzentration von EMPs, PMPs und RBC-MPs war im Vergleich zu dem Zeitpunkt vor LVAD Implantation höher [1]. Diese Ergebnisse ergänzen zuvor durchgeführte Querschnittstudien. Witman et al. untersuchten Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz sowie Patienten mit LVAD bezüglich ihrer Gefäßfunktion. Sowohl der Pulsatilitätsindex als auch die FMD, als Marker einer erniedrigten Endothelfunktion, zeigten sich bei den LVAD Patienten erniedrigt im Vergleich zu den Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz ohne LVAD [236]. Eine höhere Konzentration von EMPs bei LVAD Patienten im Vergleich zu Kontrollpatienten konnten Diehl et al. zeigen [183]. Sansone et al. bestätigten beide Studien und zeigten sowohl eine Abnahme der Endothelfunktion, als auch eine höhere Konzentration der EMPs bei LVAD

Patienten [237].

Im Gegensatz dazu zeigte sich in anderen Studien kein Anstieg der zirkulierenden MPs nach der LVAD Implantation [113, 238]. Allerdings wurden in der letztgenannten Studie die MPs nicht mittels FACS Analyse diskriminiert und quantifiziert, sondern mit einem ELISA Test. Diese Messmethode kann zu einer Limitierung der Sensitivität, bezüglich Veränderungen der einzelnen MP Subpopulationen, beitragen. In der Studie von Ivak et al. erfolgte generell keine Differenzierung der MPs in Subpopulationen [238]. Dies könnte dazu geführt haben, dass der Anstieg einzelner Subpopulationen maskiert worden ist.

Die Ursache der Verschlechterung der Endothelfunktion nach LVAD Implantation basierte vermutlich auf dem Verlust der pulsatilem Strömung und der LVAD assoziierten Hämolyse. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Studien zeigten, dass der pulsatile Blutstrom essentiell für die vaskuläre Homöostase ist [239-241]. Die pulsatile Wandschubspannung und die damit verbundene zyklische Belastung fördert die Proliferation, Migration und Regulation des Endothels, wodurch dessen Funktion gewährleistet wird [241, 242]. Eine verminderte bzw. veränderte Pulsatilität kann die endotheliale Zell Regulation stören [69, 243-245] und dadurch die Apoptose, Angiogenese, Atherosklerose, das Gefäßremodeling und den Blutdruck beeinflussen [241]. Turbulente Strömung und lokale Wandschubspannung führen zu einer Aktivierung von Endothelzellen und induzieren einen prä-atherosklerotischen Zustand mit verschlechterter NO Bildung und Bioverfügbarkeit, was beides die endotheliale Dysfunktion begünstigt [246]. Diese Veränderungen der Hämodynamik, ausgelöst durch die LVAD Unterstützung, könnten einen Stimulus für die Endothel- und andere Blutzellen (Thrombozyten, Leukozyten, Erythrozyten) darstellen, vermehrt MPs in das Blut abzugeben [1].

Die erhöhte Konzentration der EMPs nach LVAD Implantation in der vorliegenden Arbeit kann als Marker der verschlechterten endothelialen Funktion betrachtet werden und ihre Freisetzung durch Endothel Aktivierung oder Apoptose erklärt werden [247]. Außerdem zeigt sich, dass die EMPs nicht nur ein Marker der verschlechterten Endothelfunktion sind, sondern sie selbst auch aktiv beeinflussen können. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durchgeführte Studien zeigten eine Verschlechterung der Endothelfunktion durch isolierte

EMPs, die durch Beeinflussung des L-Arginin-NO Pfads eine Verminderung der NO Bioverfügbarkeit bewirkten [225, 226]. Eine Schlussfolgerung dieser Beobachtung ist, dass die erhöhte Konzentration der EMPs nicht nur einen Marker für die verschlechterte Endothelfunktion darstellt, sondern sie auch selbst aggravieren kann. Weiterhin kann es durch die LVAD-vermittelte Hämolyse zum Abbau von freiem NO kommen, was zu einer weiteren Verringerung der NO Bioverfügbarkeit führt und die endotheliale Funktion verschlechtert [114]. Bereits kleine Mengen von freiem Hämoglobin können die NO Produktion komplett unterdrücken und dadurch zu einer endothelialen Dysfunktion beitragen [248].

Die erhöhte PMPs Konzentration kann durch eine verstärkte Thrombozyten-Aktivierung erklärt werden, die wiederum durch die erhöhte Wandschubspannung unter kontinuierlichen LVAD Systemen bedingt ist [249, 250]. Bisher wurde bereits diskutiert, dass die erhöhte PMPs Konzentration als Marker der vermehrten Thrombozyten Aktivierung und als prognostisches Mittel für thromboembolische Komplikationen verwendet werden kann [183]. Auch in dieser Studie war bei den Patienten mit thromboembolischen Komplikationen die Konzentration an PMPs erhöht [1]. MPs exprimieren Phospholipide, denen eine große Bedeutung bei der Initiierung und Aufrechterhaltung der Gerinnungskaskade zukommt [167, 176]. In dieser Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass MPs nicht nur Marker der erhöhten thrombozytären Aktivität sind, sondern *in vitro* auch zu einer erhöhten Thrombin-Generierung führten, also eigenes thrombogenes Potential besitzen [1].

Zusammengefasst führt die Implantation eines LVADs bei Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz zu einer verschlechterten endothelialen Funktion und Integrität, als auch zu einer erhöhten Freisetzung von prokoagulatorischen, zirkulierenden MPs. Beide Faktoren könnten die hämostatische Balance in Richtung Thrombose verschieben. [1]

4.3 Thromboembolische Komplikationen unter LVAD

In dieser Studie ereigneten sich bei 37 LVAD Patienten 7 thromboembolische Komplikationen in einem Zeitraum von einem Jahr nach Studieneinschluss. Dies entspricht

18,9 % thromboembolischen Komplikationen [1]. Davon waren 5 ischämische Schlaganfälle, eine Pumpenthrombose und 1 peripherer arterieller Verschluss. Dies entspricht der Studienlage. In der Studie von Starling et al. wurden 169 Patienten mit Heart Mate II aus dem INTERMACS Register bezüglich Komplikationen und Überlebensrate untersucht. Dort wurden 13,9 % thromboembolische Komplikationen dokumentiert [50]. Jedoch wurden dort nicht alle Ursachen der Komplikationen erfasst, ob eine ischämische oder andere Genese vorliegt. Dies betrifft den Gerätaustausch und den Schlaganfall, weshalb die Gesamtrate der thromboembolischen Komplikationen als noch höher angenommen werden kann. In der Studie von Slaughter et al. wurden 12 % thromboembolische Komplikationen bei 133 Patienten mit kontinuierlichem LVAD beschrieben [42]. Die thromboembolischen Komplikationen beschränken sich jedoch hier auf ischämische Schlaganfälle sowie Pumpenthrombose. Periphere Gefäßverschlüsse oder Myokardinfarkte wurden nicht dokumentiert. Zudem erfolgte auch hier ein Austausch von 12 LVADs (9 %), deren Ursache nicht näher dargestellt wurde. Ein möglicher Grund für die erniedrigte Rate an thromboembolischen Komplikationen ist eine gröbere Diskriminierung. Es wurden nicht nur gezielt thromboembolische -, sondern die Gesamtkomplikationen untersucht. Dabei könnten nicht alle thromboembolischen Komplikationen erfasst worden seien. Die Rate der thromboembolischen Komplikationen kann somit auch hier als höher vermutet werden. Zudem konnte Starling et al. in einer Analyse von Pumpenthrombosen von 2004 bis 2013 zeigen, dass es im zeitlichen Verlauf zu einem deutlichen Anstieg der Pumpenthrombosen kam [92]. Eine klare Kausalität konnte nicht gefunden werden, sodass die Möglichkeit besteht, dass in den frühen Studien solche Komplikationen nicht hinreichend erfasst wurden. Zudem sind häufig auch nur einzelne thromboembolische Komplikationen und nicht die Gesamtheit erfasst worden, sodass die Gesamtrate als höher angenommen werden kann. Bei der Diskriminierung der thromboembolischen Komplikationen der vorliegenden Arbeit bildeten die ischämischen Schlaganfälle mit 13 % den größten Anteil. Die Zahl stellt sich höher dar, als in früheren Studien wie die von Harvey et al., in der nur 10,2 % beschrieben wurden [93]. Jedoch wurden dort nur LVADs vom Typ Heart Mate II verwendet, in dieser Arbeit hauptsächlich das LVAD vom Typ Heart Ware. In der ENDURANCE Studie von Milano et al., in der die Auswirkungen des Blutdrucks auf die Inzidenz von Schlaganfällen bei Patienten mit HeartWare untersucht wurde, konnte eine Rate von 13% dokumentiert werden [251]. In der MOMENTUM 3 Studie von Heatley et al.,

in der das HeartMate III mit dem HeartMate II bezüglich der Inzidenz von Komplikationen verglichen wird, wurden die Raten des ischämischen Schlaganfalls mit 12 % beschrieben [252]. Zudem zeigte der direkte Vergleich von HeartWare und Heart Mate II in der ENDURANCE Studie höhere Raten des ischämischen Schlaganfalls beim HeartWare [251]. Dadurch könnten auch die höheren Raten des ischämischen Schlaganfalls bei der vorliegenden Arbeit im Vergleich zu Harvey et al. erklärt werden, da überwiegend HeartWare Geräte eingeschlossen wurden [251]. Die Rate der Pumpenthrombose betrug in dieser Arbeit 2,7 %. Dies ist verhältnismäßig niedrig im Vergleich zu den beschriebenen 6 – 12 % [86, 98-100]. Allerdings waren dies wesentlich größer ausgelegte Studien mit längerem Untersuchungszeitraum als zwölf Monate, was die höher dokumentierten Ereignisse erklären kann. Zudem lag der Anteil des Heart Mate III in dieser Studie bei über 20%. Bereits andere neue Studien zeigten einen niedrigeren Anteil von Pumpenthrombosen bei diesem LVAD, bei Hanke et al. wo ausschließlich das Heart Mate III implantiert wurde, zeigte sich keine einzige Pumpenthrombose [253].

Das Heart Mate III ist das modernste LVAD Model das in dieser Studie verwendet wurde. Durch kontrollierte, zentrifugale Rotation sind bis zu 20-fach längere Pausen des Blutflusses möglich. Dies könnte sowohl zu einer Reduktion der Hämolyse als auch zu einer stabilisierten Koagulation beitragen und dadurch die Komplikationen reduzieren [90]. Bisherige Studienergebnisse stützen diese Annahme. So konnte in der MOMENTUM III Studie der primäre Endpunkt, LVAD Therapie ohne limitierenden Schlaganfall (National Institutes of Health Stroke Scale [NIHSS] > 5) oder Reoperation zur Entfernung oder Austauschs des Systems, häufiger bei den Patienten mit Heart Mate III als mit Heart Mate II erreicht werden (79,5 % vs. 60,2 %) [254]. Dies wurde vor allem durch geringere Reoperation aufgrund Fehlfunktionen oder Pumpenthrombosen des LVADs erreicht [254]. Dies bestätigt sich durch die Studien von Zimpfer et al. sowie Hanke et al. und Krabatsch et al. [253, 255, 256]. Sowohl nach 30 Tagen als auch nach zwölf Monaten wurde dort keine einzige Pumpenthrombose dokumentiert. Eine deutliche Reduktion des Schlaganfalls konnte bislang nicht dokumentiert werden [254, 256], jedoch gibt es einen Trend das zumindest Schlaganfälle mit einem NIHSS < 5 eine geringere Inzidenz aufweisen [254]. Bei der Auswertung wurden jedoch die ischämischen als auch hämorrhagischen Schlaganfälle zusammen analysiert, eine Differenzierung bei der Auswertung erfolgte nicht.

Zusammengefasst lässt sich aktuell zwar noch kein Vorteil in der Reduktion der gesamten Komplikationen dokumentieren [257], jedoch wurde eine Verbesserung der Lebensqualität und eine Reduktion der Pumpenthrombose und damit potentiell lebensgefährdenden Reoperationen erreicht [255, 256, 258]. Ob es nicht nur eine Reduktion der Pumpenthrombose, sondern der gesamten thromboembolischen Komplikationen ermöglicht, werden weitere Studien zeigen.

Trotz der überwiegenden Übereinstimmung der Komplikationsraten dieser Arbeit mit vorrausgegangenen Studien und der Möglichkeit eines Gesamtbildes durch den Einschluss verschiedener LVAD Systeme, ist dies jedoch auch eine entscheidende Limitation der vorliegenden Arbeit. Durch den Einschluss drei verschiedener LVAD Systeme lässt sich keine spezielle Aussage über die Ereignissraten eines einzelnen Gerätes tätigen. Dafür ist die Fallzahl der vorliegenden Arbeit mit $n=37$ zu gering. Zudem kann auch der Einschluss des HeartMate III zu der sehr niedrigen Rate an Pumpenthrombosen in dieser Arbeit geführt haben. Eine Analyse der Pumpenparameter der drei unterschiedlichen Systeme ist im Hinblick auf die thromboembolischen Komplikation schwierig. Auch kann sich die MPs Freisetzung zwischen den verschiedenen LVAD Systemen durch unterschiedlich stark ausgeprägte Scherkräfte und Hämolyse unterscheiden.

Die genaue Pathophysiologie der thromboembolischen Ereignisse ist bislang nicht hinreichend geklärt. Allerdings bildet unabhängig von der LVAD Therapie die Verletzung des Endothels und der anschließend eintretende Verlust und/oder die Dysfunktion der Endothelzellen ein Schlüsselereignis in vielen verschiedenen Typen von thrombotischen Störungen [72]. Der Verlust der schützenden Eigenschaften des Endothels zusammen mit der Expression von prokoagulatorischen und prothrombotischen Molekülen in der subendothelialen Matrix sowie der verschlechterten NO Bioverfügbarkeit könnten, wie oben bereits dargelegt, die hämostatische Balance im Gefäßsystem in Richtung Thrombose verschieben [72, 73]. Die Expression des interzellulären Adhäsionsmolekül E-Selektin und des TF auf den zirkulierenden Endothelzellen erhöhte sich postoperativ und blieb, nur mäßig verringert, auch 180 Tage nach LVAD Implantation auf diesem Niveau [89]. Parallel dazu erhöhten sich bei den Patienten nach LVAD Implantation die Prothrombin-fragmente, D-Dimere, Thrombin sowie Antithrombin, als Zeichen einer gesteigerten Koagulation [89,

259]. Zudem könnte die erhöhte Konzentration der PMPs nach LVAD Implantation in der vorliegenden Arbeit erklärt werden durch die Auswirkungen der mechanischen Kräfte die auf die Thrombozyten einwirken und sie während der Passage durch das LVAD aktivieren [89].

In der Studie von Pitha et al. wurden ebenfalls Patienten mit LVAD vor Implantation und drei Monate nach Operation auf EMPs und thromboembolische Komplikationen untersucht [184]. Hier konnte kein Anstieg der EMPs nach Implantation und kein Zusammenhang zu thromboembolischen Komplikationen dokumentiert werden. Allerdings war die Fallzahl in der Studie mit zehn Patienten gering, es wurden dementsprechend auch nur zwei thromboembolische Komplikationen dokumentiert. Außerdem wurden nur die EMPs untersucht, die lediglich einen positiven Trend nach Implantation aufwiesen. Dies könnte darin begründet sein, dass diese nicht in Subpopulationen klassifiziert wurden. In der vorliegenden Studie konnte nicht nur gezeigt werden, dass die Konzentration der zirkulierenden MPs nach LVAD Implantation ansteigt, sondern auch die prokoagulatorische Aktivität der zirkulierenden Mikropartikel, gemessen an der Thrombin-Generierung, zunimmt [1].

In der Studie von Diehl et al. konnte eine Verdreifachung der PMPs nach LVAD Implantation nachgewiesen werden, jedoch wurden die PMPs hier nur als Zeichen einer verstärkten Thrombozyten Aktivierung gemessen [183]. Damit sind sie hier lediglich mit einer verstärkten Koagulation assoziiert, ohne deren eigenen prokoagulatorischen Auswirkungen zu untersuchen. Zudem wurden hier keine thromboembolischen Komplikationen der Patienten erfasst. Dagegen zeigte sich in der Studie von Nascimbene et al., dass Patienten, die unter LVAD Therapie Komplikationen erlitten, eine erhöhte Konzentration der zirkulierenden MPs aufweisen, im Vergleich zu Patienten ohne Komplikationen [112]. Allerdings wurde in dieser Studie der Fokus nicht allein auf thromboembolische Komplikationen gelegt, sondern unter den Komplikationen Rythmusereignisse, hämorrhagische und thromboembolische Ereignisse zusammengefasst [260]. Eine neue Studie von McClane et al. untersuchte die Patienten mit LVAD sowohl auf hämorrhagische und thromboembolische Komplikationen [261]. Es konnte bei der Analyse der MPs ein Anstieg der PMPs bei den Patienten mit LVAD dokumentiert werden, im

Gegensatz zu der Kontrollgruppe ohne LVAD. Außerdem konnte hier ein Anstieg des MPs assoziierten TF sowie eine erhöhte Aktivität der MPs vor thromboembolischen Komplikationen gezeigt werden, wodurch sich die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen lassen.

Es ist denkbar, dass die MPs nicht nur Prädiktor für thromboembolische Komplikationen sind, sondern selbst an der Entstehung beteiligt sind. MPs haben prokoagulatorische Eigenschaften, da ihre Oberflächenmembran für viele Komponenten der Gerinnungskaskade eine Vernetzungsmöglichkeit bietet. Diese prokoagulatorische Aktivität wird zudem verstärkt durch anionische Phospholipide, insbesondere von Phosphatidylserin dessen Oberfläche die Assoziation von Gerinnungsfaktoren und dem prokoagulatorischen Protein TF unterstützt, wodurch die Zellen der Gerinnungskaskade hauptsächlich aktiviert werden [167, 176]. Es konnte bereits *in vitro* gezeigt werden, dass MPs die Bildung von Thromben gezielt verstärken [117, 262, 263].

Bei der Untersuchung von venösen Thromboembolien bei Tumorerkrankungen zeigte sich, dass MPs mit der erhöhten Koagulation assoziiert sind [264]. Die Tumorzellen weisen auf ihrer Oberfläche ein deutlich erhöhtes Maß an TF auf [265, 266]. Wie auch unsere Blutzellen geben die Tumorzellen MPs in das Blut ab [267]. So gelangt der TF, gebunden an die MPs, in unser Blut und bildet dort TF/Factor VIIa Komplexe und kann dadurch die Gerinnungskaskade aktivieren [267, 268]. Es konnte auch ein ungebundener, löslicher TF im Plasma nachgewiesen werden [269], allerdings wird nur durch die gebundene Form prokoagulatorische Aktivität ausgeübt [270]. Die Konzentration TF tragender MPs war bei Tumorpatienten mit venösen Thromboembolien höher, als bei Tumorpatienten ohne venöse Thromboembolien [271]. Dies bestätigt den Verdacht, dass auch bei den Patienten in der vorliegenden Arbeit die MPs an den thromboembolischen Komplikationen beteiligt sind, leider erfolgte wie bereits dargelegt jedoch keine Kontrolle der MPs während der thromboembolischen Komplikationen. Es macht jedoch die Möglichkeit sehr wahrscheinlich, dass sich auch dort eine erhöhte MPs Konzentration hätte nachweisen lassen. Bei den Studien über Tumor assoziierte venöse Thromboembolien in Tierversuchen wurde gezeigt, dass die Tumor-MPs eine Thrombusbildung über den TF oder Phosphatidylserin fördern [272-275]. In der Studie von Davila et al., die die prokoagulatorische Aktivität bei einem Pankreaskarzinom untersuchte, konnte gezeigt

werden, dass die erhöhte prokoagulatorische Aktivität MPs assoziiert war. Diese war von dem an MPs gebundenen TF und Phosphatidylserin abhängig und konnte durch die Verabreichung von anti-TF oder Annexin V aufgehoben werden [276]. Diese Ergebnisse konnten von Lima et al. bestätigt werden, indem sie MPs mit Annexin V inkubierten und anschließend eine verringerte prokoagulatorische Aktivität nachweisen konnten [277]. Diese Ergebnisse werden weiter unterstützt durch Thomas et al. In deren Tumorstudie wurden sowohl von endogen als auch exogen gebildeten Pankreas- und Lungenkrebs MPs TF und Selectin P-Ligand (PSGL 1) exprimiert [278]. Es konnte mittels intravitale Echtzeitmikroskopie nachgewiesen werden, dass die MPs an die aktivierten Thrombozyten in einer Gefäßverletzung durch das PSGL-1 binden und anschließend die Thrombus Entstehung durch die Freisetzung des gebundenen TF fördern [278]. Dem gegenüber steht eine Studie von Wang et al., bei der die Entstehung der venösen Thromboembolien bei Pankreastumoren untersucht wurde [274]. Es konnte in nur einer von fünf verschiedenen Pankreaskrebs Zelllinien zirkulierende, TF tragende MPs nachgewiesen werden [274]. Wang et al. vermuteten daher, dass der TF von dem Tumor selbst freigesetzt wird und zu den erhöhten Raten an venösen Thromboembolien geführt hat. Allerdings wurde in dieser Studie ein Xenograft Model mit immunsupprimierten Mäusen benutzt, was zu einer Abschwächung der Immunreaktion der Mäuse auf den Tumor gewirkt hat, wodurch die Progression des Tumors verändert sein könnte. Es konnte nämlich auch gezeigt werden, dass PMPs bei der Metastasierung und Ausbreitung von Tumorzellen beteiligt sind [272]. Gegebenenfalls führt ein supprimiertes Immunsystem zu einer geringeren Bildung der MPs für diesen Zweck und dadurch auch zu einer verringerten MPs bedingten Thrombose. Zudem betreffen die Ergebnisse von Wang et al. nur die venösen Thromboembolien bei Tumorzellen. Es konnte jedoch in den bereits genannten Studien die aktive Förderung der Thrombusbildung durch MPs in Mausmodellen nachgewiesen werden. Es ist daher unerheblich, ob die erhöhten Raten an venösen Thromboembolien bei Tumorzellen durch an MPs gebundenen TF oder von den Tumorzellen selbst freigesetzten TF ausgelöst werden. Das MPs das Potential haben eine Entstehung von Thromben zu fördern, konnte wiederholt dokumentiert werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die thromboembolischen Komplikationen unter LVAD Therapie mit der Konzentration der PMPs und mit der MPs induzierten Thrombinbildung assoziiert sind [1]. Ob jedoch die PMPs vor oder nach einer thromboembolischen Komplikation freigesetzt werden und inwiefern die erhöhte prokoagulatorische Aktivität der MPs zu den thromboembolischen Komplikationen beiträgt, muss in weiteren Studien geklärt werden.

4.4 Schlussfolgerungen

Bei Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz führt die Implantation eines LVADs zu einer verschlechterten endothelialen Funktion und zu einer erhöhten Konzentration von zirkulierenden MPs mit einer erhöhten prokoagulatorischen Aktivität [1].

Das Eintreten von thromboembolischen Komplikationen während der LVAD Therapie war assoziiert mit erhöhten Konzentrationen der PMPs und einer erhöhten prokoagulatorischen Aktivität der MPs. Diese Parameter könnten in der Zukunft als eine wichtige Grundlage zur Risikostratifizierung von Hochrisiko Patienten verwendet werden, im Sinne einer frühen Transplantation und einer individualisierten antikoagulatorischen Therapie unter LVAD. [1]

Es sind weitere und größer angelegte Studien notwendig, um den direkten Effekt der erhöhten zirkulierenden MPs für die Pathogenese der LVAD-assoziierten thromboembolischen Komplikationen zu untersuchen.

5 Literaturverzeichnis

1. Kramser, N., et al., *Thromboembolic Events in Patients With Left Ventricular Assist Devices Are Related to Microparticle-Induced Coagulation*. *Asaio j*, 2021. **67**(1): p. 59-66.
2. Mosterd, A. and A.W. Hoes, *Clinical epidemiology of heart failure*. *Heart*, 2007. **93**(9): p. 1137-46.
3. Redfield, M.M., et al., *Burden of systolic and diastolic ventricular dysfunction in the community: appreciating the scope of the heart failure epidemic*. *Jama*, 2003. **289**(2): p. 194-202.
4. Bleumink, G.S., et al., *Quantifying the heart failure epidemic: prevalence, incidence rate, lifetime risk and prognosis of heart failure The Rotterdam Study*. *Eur Heart J*, 2004. **25**(18): p. 1614-9.
5. Ceia, F., et al., *Prevalence of chronic heart failure in Southwestern Europe: the EPICA study*. *Eur J Heart Fail*, 2002. **4**(4): p. 531-9.
6. (Destatis), S.B., *Todesursachen in Deutschland*. 12, 2017. **4**: p. 51.
7. Ambrosy, A.P., et al., *The global health and economic burden of hospitalizations for heart failure: lessons learned from hospitalized heart failure registries*. *J Am Coll Cardiol*, 2014. **63**(12): p. 1123-1133.
8. Abouezzeddine, O.F. and M.M. Redfield, *Who has advanced heart failure?: definition and epidemiology*. *Congest Heart Fail*, 2011. **17**(4): p. 160-8.
9. Ponikowski, P., et al., *2016 ESC Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure*. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*, 2016. **69**(12): p. 1167.
10. Raake, P.W.J., et al., *Terminal Heart Failure*. *Aktuelle Kardiologie*. 2012, New York: Georg Thieme Verlag.
11. Fang, J.C., et al., *Advanced (stage D) heart failure: a statement from the Heart Failure Society of America Guidelines Committee*. *J Card Fail*, 2015. **21**(6): p. 519-34.
12. Rose, E.A., et al., *Long-term use of a left ventricular assist device for end-stage heart failure*. *N Engl J Med*, 2001. **345**(20): p. 1435-43.
13. Habal, M.V. and A.R. Garan, *Long-term management of end-stage heart failure*. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, 2017. **31**(2): p. 153-166.
14. Yancy, C.W., et al., *2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines*. *J Am Coll Cardiol*, 2013. **62**(16): p. e147-239.
15. Stewart, G.C. and M.M. Givertz, *Mechanical circulatory support for advanced heart failure: patients and technology in evolution*. *Circulation*, 2012. **125**(10): p. 1304-15.
16. Neumann, T., et al., *Heart failure: the commonest reason for hospital admission in Germany: medical and economic perspectives*. *Dtsch Arztebl Int*, 2009. **106**(16): p. 269-75.
17. Ezekowitz, J.A., et al., *Trends in heart failure care: has the incident diagnosis of heart failure shifted from the hospital to the emergency department and outpatient clinics?* *Eur J Heart Fail*, 2011. **13**(2): p. 142-7.
18. Jones, N.R., et al., *Survival of patients with chronic heart failure in the community: a systematic review and meta-analysis protocol*. *Syst Rev*, 2018. **7**(1): p. 151.

19. Kjekshus, J., K. Swedberg, and S. Snapinn, *Effects of enalapril on long-term mortality in severe congestive heart failure. CONSENSUS Trial Group*. Am J Cardiol, 1992. **69**(1): p. 103-7.
20. Yusuf, S., et al., *Effect of enalapril on mortality and the development of heart failure in asymptomatic patients with reduced left ventricular ejection fractions*. N Engl J Med, 1992. **327**(10): p. 685-91.
21. Garg, R. and S. Yusuf, *Overview of randomized trials of angiotensin-converting enzyme inhibitors on mortality and morbidity in patients with heart failure. Collaborative Group on ACE Inhibitor Trials*. Jama, 1995. **273**(18): p. 1450-6.
22. Packer, M., et al., *Effect of carvedilol on the morbidity of patients with severe chronic heart failure: results of the carvedilol prospective randomized cumulative survival (COPERNICUS) study*. Circulation, 2002. **106**(17): p. 2194-9.
23. Yusuf, S., et al., *Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fractions and congestive heart failure*. N Engl J Med, 1991. **325**(5): p. 293-302.
24. Tepper, D., *Frontiers in congestive heart failure: Effect of Metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in Congestive Heart Failure (MERIT-HF)*. Congest Heart Fail, 1999. **5**(4): p. 184-185.
25. *The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS-II): a randomised trial*. Lancet, 1999. **353**(9146): p. 9-13.
26. Flather, M.D., et al., *Randomized trial to determine the effect of nebivolol on mortality and cardiovascular hospital admission in elderly patients with heart failure (SENIORS)*. Eur Heart J, 2005. **26**(3): p. 215-25.
27. Pitt, B., et al., *The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators*. N Engl J Med, 1999. **341**(10): p. 709-17.
28. Zannad, F., et al., *Eplerenone in patients with systolic heart failure and mild symptoms*. N Engl J Med, 2011. **364**(1): p. 11-21.
29. Packer, M., et al., *Comparative effects of low and high doses of the angiotensin-converting enzyme inhibitor, lisinopril, on morbidity and mortality in chronic heart failure. ATLAS Study Group*. Circulation, 1999. **100**(23): p. 2312-8.
30. Trivedi, J.R., et al., *Survival on the heart transplant waiting list: impact of continuous flow left ventricular assist device as bridge to transplant*. Ann Thorac Surg, 2014. **98**(3): p. 830-4.
31. Cleland, J.G., et al., *An individual patient meta-analysis of five randomized trials assessing the effects of cardiac resynchronization therapy on morbidity and mortality in patients with symptomatic heart failure*. Eur Heart J, 2013. **34**(46): p. 3547-56.
32. Theuns, D.A., et al., *Effectiveness of prophylactic implantation of cardioverter-defibrillators without cardiac resynchronization therapy in patients with ischaemic or non-ischaemic heart disease: a systematic review and meta-analysis*. Europace, 2010. **12**(11): p. 1564-70.
33. Cook, N.R. and P.M. Ridker, *Advances in measuring the effect of individual predictors of cardiovascular risk: the role of reclassification measures*. Ann Intern Med, 2009. **150**(11): p. 795-802.
34. Rogers, J.G., et al., *Chronic mechanical circulatory support for inotrope-dependent heart failure patients who are not transplant candidates: results of the INTrEPID Trial*. J Am Coll Cardiol, 2007. **50**(8): p. 741-7.

35. Cook, J.A., et al., *The total artificial heart*. J Thorac Dis, 2015. **7**(12): p. 2172-80.
36. Rahmel, A., *Eurotransplant International Foundation Annual Report 2013*. 2013: Leiden, Netherlands.
37. Kirklin, J.K., et al., *Sixth INTERMACS annual report: a 10,000-patient database*. J Heart Lung Transplant, 2014. **33**(6): p. 555-64.
38. Urban, M., et al., *The impact of angiotensin II type 1 receptor antibodies on post-heart transplantation outcome in Heart Mate II bridged recipients*. Interact Cardiovasc Thorac Surg, 2016. **22**(3): p. 292-7.
39. Clarke, A., et al., *Cost-effectiveness of left ventricular assist devices (LVADs) for patients with advanced heart failure: analysis of the British NHS bridge to transplant (BTT) program*. Int J Cardiol, 2014. **171**(3): p. 338-45.
40. Riebandt, J., et al., *Preoperative patient optimization using extracorporeal life support improves outcomes of INTERMACS Level I patients receiving a permanent ventricular assist device*. Eur J Cardiothorac Surg, 2014. **46**(3): p. 486-92; discussion 492.
41. Daneshmand, M.A., et al., *Left ventricular assist device destination therapy versus extended criteria cardiac transplant*. Ann Thorac Surg, 2010. **89**(4): p. 1205-9; discussion 1210.
42. Slaughter, M.S., et al., *Advanced heart failure treated with continuous-flow left ventricular assist device*. N Engl J Med, 2009. **361**(23): p. 2241-51.
43. Stevenson, L.W., et al., *INTERMACS profiles of advanced heart failure: the current picture*. J Heart Lung Transplant, 2009. **28**(6): p. 535-41.
44. Holman, W.L., et al., *INTERMACS: interval analysis of registry data*. J Am Coll Surg, 2009. **208**(5): p. 755-61; discussion 761-2.
45. Barge-Caballero, E., et al., *Usefulness of the INTERMACS Scale for predicting outcomes after urgent heart transplantation*. Rev Esp Cardiol, 2011. **64**(3): p. 193-200.
46. Alba, A.C., et al., *Usefulness of the INTERMACS scale to predict outcomes after mechanical assist device implantation*. J Heart Lung Transplant, 2009. **28**(8): p. 827-33.
47. Kirklin, J.K., et al., *Seventh INTERMACS annual report: 15,000 patients and counting*. J Heart Lung Transplant, 2015. **34**(12): p. 1495-504.
48. Fukamachi K, S.N., *Smaller, Safer, Totally Implantable LVADs: Fact or Fantasy?* ACC Current, 2005. **14**(8): p. 40-42.
49. John, R., et al., *Low thromboembolic risk for patients with the Heartmate II left ventricular assist device*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2008. **136**(5): p. 1318-23.
50. Starling, R.C., et al., *Results of the post-U.S. Food and Drug Administration-approval study with a continuous flow left ventricular assist device as a bridge to heart transplantation: a prospective study using the INTERMACS (Interagency Registry for Mechanically Assisted Circulatory Support)*. J Am Coll Cardiol, 2011. **57**(19): p. 1890-8.
51. Pühler T, E.S., Morshuis M, Gummert J, *Neuentwicklungen der Herzunterstützungssysteme – Möglichkeiten und Grenzen*. Kardiologie up2date. Vol. 11. 2015: Georg Thieme Verlag.
52. Garatti, A., et al., *Clinical outcome and bridge to transplant rate of left ventricular assist device recipient patients: comparison between continuous-flow and pulsatile-flow devices*. Eur J Cardiothorac Surg, 2008. **34**(2): p. 275-80; discussion 280.

53. Kamdar, F., et al., *Effects of centrifugal, axial, and pulsatile left ventricular assist device support on end-organ function in heart failure patients*. J Heart Lung Transplant, 2009. **28**(4): p. 352-9.
54. Eckman, P.M. and R. John, *Bleeding and thrombosis in patients with continuous-flow ventricular assist devices*. Circulation, 2012. **125**(24): p. 3038-47.
55. Letsou, G.V., et al., *Gastrointestinal bleeding from arteriovenous malformations in patients supported by the Jarvik 2000 axial-flow left ventricular assist device*. J Heart Lung Transplant, 2005. **24**(1): p. 105-9.
56. Crow, S., et al., *Acquired von Willebrand syndrome in continuous-flow ventricular assist device recipients*. Ann Thorac Surg, 2010. **90**(4): p. 1263-9; discussion 1269.
57. Cowger, J., et al., *The development of aortic insufficiency in left ventricular assist device-supported patients*. Circ Heart Fail, 2010. **3**(6): p. 668-74.
58. Soleimani, B., et al., *Development of aortic insufficiency in patients supported with continuous flow left ventricular assist devices*. Asaio j, 2012. **58**(4): p. 326-9.
59. Aggarwal, A., et al., *The development of aortic insufficiency in continuous-flow left ventricular assist device-supported patients*. Ann Thorac Surg, 2013. **95**(2): p. 493-8.
60. Muthiah, K., et al., *Thrombolysis for suspected intrapump thrombosis in patients with continuous flow centrifugal left ventricular assist device*. Artif Organs, 2013. **37**(3): p. 313-8.
61. Bhamidipati, C.M., et al., *Early thrombus in a HeartMate II left ventricular assist device: a potential cause of hemolysis and diagnostic dilemma*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2010. **140**(1): p. e7-8.
62. Shah, P., et al., *Diagnosis of hemolysis and device thrombosis with lactate dehydrogenase during left ventricular assist device support*. J Heart Lung Transplant, 2014. **33**(1): p. 102-4.
63. Chan, S.Y., et al., *The prognostic importance of endothelial dysfunction and carotid atheroma burden in patients with coronary artery disease*. J Am Coll Cardiol, 2003. **42**(6): p. 1037-43.
64. Amir, O., et al., *Peripheral vascular reactivity in patients with pulsatile vs axial flow left ventricular assist device support*. J Heart Lung Transplant, 2006. **25**(4): p. 391-4.
65. Davies, P.F., *Flow-mediated endothelial mechanotransduction*. Physiol Rev, 1995. **75**(3): p. 519-60.
66. Traub, O. and B.C. Berk, *Laminar shear stress: mechanisms by which endothelial cells transduce an atheroprotective force*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998. **18**(5): p. 677-85.
67. Ignarro, L.J., et al., *Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(24): p. 9265-9.
68. Gambillara, V., et al., *Effects of reduced cyclic stretch on vascular smooth muscle cell function of pig carotids perfused ex vivo*. Am J Hypertens, 2008. **21**(4): p. 425-31.
69. Hutcheson, I.R. and T.M. Griffith, *Release of endothelium-derived relaxing factor is modulated both by frequency and amplitude of pulsatile flow*. Am J Physiol, 1991. **261**(1 Pt 2): p. H257-62.
70. Nakano, T., et al., *Impacts of pulsatile systemic circulation on endothelium-derived nitric oxide release in anesthetized dogs*. Ann Thorac Surg, 2001. **72**(1): p. 156-62.
71. Thacher, T., et al., *Reduced cyclic stretch, endothelial dysfunction, and oxidative stress: an ex vivo model*. Cardiovasc Pathol, 2010. **19**(4): p. e91-8.

72. Wu, K.K. and P. Thiagarajan, *Role of endothelium in thrombosis and hemostasis*. *Annu Rev Med*, 1996. **47**: p. 315-31.
73. Brunner, H., et al., *Endothelial function and dysfunction. Part II: Association with cardiovascular risk factors and diseases. A statement by the Working Group on Endothelins and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension*. *J Hypertens*, 2005. **23**(2): p. 233-46.
74. Nishinaka, T., et al., *Change in vasoconstrictive function during prolonged nonpulsatile left heart bypass*. *Artif Organs*, 2001. **25**(5): p. 371-5.
75. Pak, S.W., et al., *Prevalence of de novo aortic insufficiency during long-term support with left ventricular assist devices*. *J Heart Lung Transplant*, 2010. **29**(10): p. 1172-6.
76. Krabatsch, T., et al., *Is bridge to recovery more likely with pulsatile left ventricular assist devices than with nonpulsatile-flow systems?* *Ann Thorac Surg*, 2011. **91**(5): p. 1335-40.
77. Kato, T.S., et al., *Effects of continuous-flow versus pulsatile-flow left ventricular assist devices on myocardial unloading and remodeling*. *Circ Heart Fail*, 2011. **4**(5): p. 546-53.
78. Crow, S., et al., *Gastrointestinal bleeding rates in recipients of nonpulsatile and pulsatile left ventricular assist devices*. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2009. **137**(1): p. 208-15.
79. Stern, D.R., et al., *Increased incidence of gastrointestinal bleeding following implantation of the HeartMate II LVAD*. *J Card Surg*, 2010. **25**(3): p. 352-6.
80. Lahpor, J., et al., *European results with a continuous-flow ventricular assist device for advanced heart-failure patients*. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2010. **37**(2): p. 357-61.
81. Kasirajan, V., et al., *Clinical experience with long-term use of implantable left ventricular assist devices: indications, implantation, and outcomes*. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*, 2000. **12**(3): p. 229-37.
82. Morgan, J.A., et al., *Bridging to transplant with the HeartMate left ventricular assist device: The Columbia Presbyterian 12-year experience*. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2004. **127**(5): p. 1309-16.
83. John, R., et al., *Lessons learned from experience with over 100 consecutive HeartMate II left ventricular assist devices*. *Ann Thorac Surg*, 2011. **92**(5): p. 1593-9; discussion 1599-600.
84. Schaffer, J.M., et al., *Bleeding complications and blood product utilization with left ventricular assist device implantation*. *Ann Thorac Surg*, 2011. **91**(3): p. 740-7; discussion 747-9.
85. Jaffer, I.H., et al., *Medical device-induced thrombosis: what causes it and how can we prevent it?* *J Thromb Haemost*, 2015. **13 Suppl 1**: p. S72-81.
86. Rame, J.E., P. Atluri, and M.A. Acker, *Unexpected abrupt increase in left ventricular assist device thrombosis*. *N Engl J Med*, 2014. **370**(15): p. 1466-7.
87. Miller, L.W., et al., *Use of a continuous-flow device in patients awaiting heart transplantation*. *N Engl J Med*, 2007. **357**(9): p. 885-96.
88. Slaughter, M.S., et al., *Post-operative heparin may not be required for transitioning patients with a HeartMate II left ventricular assist system to long-term warfarin therapy*. *J Heart Lung Transplant*, 2010. **29**(6): p. 616-24.
89. John, R., et al., *Activation of endothelial and coagulation systems in left ventricular assist device recipients*. *Ann Thorac Surg*, 2009. **88**(4): p. 1171-9.

90. Schmitto, J.D., et al., *First implantation in man of a new magnetically levitated left ventricular assist device (HeartMate III)*. J Heart Lung Transplant, 2015. **34**(6): p. 858-60.
91. Rose, E.A., et al., *Artificial circulatory support with textured interior surfaces. A counterintuitive approach to minimizing thromboembolism*. Circulation, 1994. **90**(5 Pt 2): p. li87-91.
92. Starling, R.C., et al., *Unexpected abrupt increase in left ventricular assist device thrombosis*. N Engl J Med, 2014. **370**(1): p. 33-40.
93. Harvey, L., et al., *Stroke After Left Ventricular Assist Device Implantation: Outcomes in the Continuous-Flow Era*. Ann Thorac Surg, 2015. **100**(2): p. 535-41.
94. Hedberg, M., et al., *Cerebrovascular accidents after cardiac surgery: an analysis of CT scans in relation to clinical symptoms*. Scand Cardiovasc J, 2005. **39**(5): p. 299-305.
95. Korn-Lubetzki, I., et al., *Strokes after cardiac surgery: mostly right hemispheric ischemic with mild residual damage*. J Neurol, 2007. **254**(12): p. 1708-13.
96. Bokeriia, L.A., et al., *Asymmetric cerebral embolic load and postoperative cognitive dysfunction in cardiac surgery*. Cerebrovasc Dis, 2007. **23**(1): p. 50-6.
97. Kato, T.S., et al., *Asymmetric pattern of cerebrovascular lesions in patients after left ventricular assist device implantation*. Stroke, 2012. **43**(3): p. 872-4.
98. Najjar, S.S., et al., *An analysis of pump thrombus events in patients in the HeartWare ADVANCE bridge to transplant and continued access protocol trial*. J Heart Lung Transplant, 2014. **33**(1): p. 23-34.
99. Kirklin, J.K., et al., *Interagency Registry for Mechanically Assisted Circulatory Support (INTERMACS) analysis of pump thrombosis in the HeartMate II left ventricular assist device*. J Heart Lung Transplant, 2014. **33**(1): p. 12-22.
100. Uriel, N., et al., *Device thrombosis in HeartMate II continuous-flow left ventricular assist devices: a multifactorial phenomenon*. J Heart Lung Transplant, 2014. **33**(1): p. 51-9.
101. Blitz, A., *Pump thrombosis-A riddle wrapped in a mystery inside an enigma*. Ann Cardiothorac Surg, 2014. **3**(5): p. 450-71.
102. Goldstein, D.J., et al., *Algorithm for the diagnosis and management of suspected pump thrombus*. J Heart Lung Transplant, 2013. **32**(7): p. 667-70.
103. Bartoli, C.R., et al., *Hematologic markers better predict left ventricular assist device thrombosis than echocardiographic or pump parameters*. Thorac Cardiovasc Surg, 2014. **62**(5): p. 414-8.
104. Ravichandran, A.K., et al., *Hemolysis in left ventricular assist device: a retrospective analysis of outcomes*. J Heart Lung Transplant, 2014. **33**(1): p. 44-50.
105. Cowger, J.A., et al., *Hemolysis: a harbinger of adverse outcome after left ventricular assist device implant*. J Heart Lung Transplant, 2014. **33**(1): p. 35-43.
106. Estep, J.D., et al., *A simplified echocardiographic technique for detecting continuous-flow left ventricular assist device malfunction due to pump thrombosis*. J Heart Lung Transplant, 2014. **33**(6): p. 575-86.
107. Uriel, N., et al., *Development of a novel echocardiography ramp test for speed optimization and diagnosis of device thrombosis in continuous-flow left ventricular assist devices: the Columbia ramp study*. J Am Coll Cardiol, 2012. **60**(18): p. 1764-75.

108. Kato, T.S., et al., *Value of serial echo-guided ramp studies in a patient with suspicion of device thrombosis after left ventricular assist device implantation*. Echocardiography, 2014. **31**(1): p. E5-9.
109. Moazami, N., et al., *Lessons learned from the first fully magnetically levitated centrifugal LVAD trial in the United States: the DuraHeart trial*. Ann Thorac Surg, 2014. **98**(2): p. 541-7.
110. Schlendorf, K., et al., *Thrombolytic therapy for thrombosis of continuous flow ventricular assist devices*. J Card Fail, 2014. **20**(2): p. 91-7.
111. Tellor, B.R., et al., *The use of eptifibatide for suspected pump thrombus or thrombosis in patients with left ventricular assist devices*. J Heart Lung Transplant, 2014. **33**(1): p. 94-101.
112. Nascimbene, A., et al., *Association between cell-derived microparticles and adverse events in patients with nonpulsatile left ventricular assist devices*. J Heart Lung Transplant, 2014. **33**(5): p. 470-7.
113. Ivak, P., et al., *Endothelial dysfunction expressed as endothelial microparticles in patients with end-stage heart failure*. Physiol Res, 2014. **63 Suppl 3**: p. S369-73.
114. Heilmann, C., et al., *Haemolysis in patients with ventricular assist devices: major differences between systems*. Eur J Cardiothorac Surg, 2009. **36**(3): p. 580-4.
115. Loebe, M., et al., *Inflammatory response after implantation of a left ventricular assist device: comparison between the axial flow MicroMed DeBakey VAD and the pulsatile Novacor device*. Asaio j, 2001. **47**(3): p. 272-4.
116. Loyer, X., et al., *Microvesicles as cell-cell messengers in cardiovascular diseases*. Circ Res, 2014. **114**(2): p. 345-53.
117. Dignat-George, F. and C.M. Boulanger, *The many faces of endothelial microparticles*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. **31**(1): p. 27-33.
118. Bevers, E.M., et al., *Generation of prothrombin-converting activity and the exposure of phosphatidylserine at the outer surface of platelets*. Eur J Biochem, 1982. **122**(2): p. 429-36.
119. Beaudoin, A.R. and G. Grondin, *Shedding of vesicular material from the cell surface of eukaryotic cells: different cellular phenomena*. Biochim Biophys Acta, 1991. **1071**(3): p. 203-19.
120. Hugel, B., et al., *Membrane microparticles: two sides of the coin*. Physiology (Bethesda), 2005. **20**: p. 22-7.
121. Freyssinet, J.M., et al., *Apoptosis in vascular disease*. Thromb Haemost, 1999. **82**(2): p. 727-35.
122. VanWijk, M.J., et al., *Microparticles in cardiovascular diseases*. Cardiovasc Res, 2003. **59**(2): p. 277-87.
123. Viera, A.J., M. Mooberry, and N.S. Key, *Microparticles in cardiovascular disease pathophysiology and outcomes*. J Am Soc Hypertens, 2012. **6**(4): p. 243-52.
124. Hargett, L.A. and N.N. Bauer, *On the origin of microparticles: From "platelet dust" to mediators of intercellular communication*. Pulm Circ, 2013. **3**(2): p. 329-40.
125. Sluijter, J.P., et al., *Microvesicles and exosomes for intracardiac communication*. Cardiovasc Res, 2014. **102**(2): p. 302-11.
126. Goubran, H.A., et al., *Platelet microparticle: a sensitive physiological "fine tuning" balancing factor in health and disease*. Transfus Apher Sci, 2015. **52**(1): p. 12-8.
127. Mause, S.F. and C. Weber, *Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange*. Circ Res, 2010. **107**(9): p. 1047-57.

128. Hunter, M.P., et al., *Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles*. PLoS One, 2008. **3**(11): p. e3694.
129. Deregibus, M.C., et al., *Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA*. Blood, 2007. **110**(7): p. 2440-8.
130. Soleti, R., et al., *Microparticles harboring Sonic Hedgehog promote angiogenesis through the upregulation of adhesion proteins and proangiogenic factors*. Carcinogenesis, 2009. **30**(4): p. 580-8.
131. Hamilton, K.K., et al., *Complement proteins C5b-9 induce vesiculation of the endothelial plasma membrane and expose catalytic surface for assembly of the prothrombinase enzyme complex*. J Biol Chem, 1990. **265**(7): p. 3809-14.
132. Combes, V., et al., *In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant*. J Clin Invest, 1999. **104**(1): p. 93-102.
133. Peterson, D.B., et al., *Comparative proteomic analysis of PAI-1 and TNF-alpha-derived endothelial microparticles*. Proteomics, 2008. **8**(12): p. 2430-46.
134. Chironi, G.N., et al., *Endothelial microparticles in diseases*. Cell Tissue Res, 2009. **335**(1): p. 143-51.
135. Perez-Casal, M., et al., *Microparticle-associated endothelial protein C receptor and the induction of cytoprotective and anti-inflammatory effects*. Haematologica, 2009. **94**(3): p. 387-94.
136. Lacroix, R., et al., *Activation of plasminogen into plasmin at the surface of endothelial microparticles: a mechanism that modulates angiogenic properties of endothelial progenitor cells in vitro*. Blood, 2007. **110**(7): p. 2432-9.
137. Abid Hussein, M.N., et al., *Phospholipid composition of in vitro endothelial microparticles and their in vivo thrombogenic properties*. Thromb Res, 2008. **121**(6): p. 865-71.
138. Curtis, A.M., et al., *p38 mitogen-activated protein kinase targets the production of proinflammatory endothelial microparticles*. J Thromb Haemost, 2009. **7**(4): p. 701-9.
139. Greenwalt, T.J., *The how and why of exocytic vesicles*. Transfusion, 2006. **46**(1): p. 143-52.
140. Xiong, Z., et al., *Red blood cell microparticles show altered inflammatory chemokine binding and release ligand upon interaction with platelets*. Transfusion, 2011. **51**(3): p. 610-21.
141. Rubin, O., et al., *Microparticles in stored red blood cells: an approach using flow cytometry and proteomic tools*. Vox Sang, 2008. **95**(4): p. 288-97.
142. An, X., et al., *Phosphatidylserine binding sites in erythroid spectrin: location and implications for membrane stability*. Biochemistry, 2004. **43**(2): p. 310-5.
143. Manno, S., Y. Takakuwa, and N. Mohandas, *Identification of a functional role for lipid asymmetry in biological membranes: Phosphatidylserine-skeletal protein interactions modulate membrane stability*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(4): p. 1943-8.
144. Prudent, M., et al., *Differences between calcium-stimulated and storage-induced erythrocyte-derived microvesicles*. Transfus Apher Sci, 2015. **53**(2): p. 153-8.
145. Liu, C., et al., *Mechanism of faster NO scavenging by older stored red blood cells*. Redox Biol, 2014. **2**: p. 211-9.

146. Bosman, G.J., et al., *Erythrocyte ageing in vivo and in vitro: structural aspects and implications for transfusion*. Transfus Med, 2008. **18**(6): p. 335-47.
147. Stewart, A., et al., *The application of a new quantitative assay for the monitoring of integrin-associated protein CD47 on red blood cells during storage and comparison with the expression of CD47 and phosphatidylserine with flow cytometry*. Transfusion, 2005. **45**(9): p. 1496-503.
148. Sperling, C., et al., *Blood coagulation on biomaterials requires the combination of distinct activation processes*. Biomaterials, 2009. **30**(27): p. 4447-56.
149. Yau, J.W., et al., *Selective depletion of factor XI or factor XII with antisense oligonucleotides attenuates catheter thrombosis in rabbits*. Blood, 2014. **123**(13): p. 2102-7.
150. Rubin, O., et al., *Red blood cell-derived microparticles isolated from blood units initiate and propagate thrombin generation*. Transfusion, 2013. **53**(8): p. 1744-54.
151. van Beers, E.J., et al., *Circulating erythrocyte-derived microparticles are associated with coagulation activation in sickle cell disease*. Haematologica, 2009. **94**(11): p. 1513-9.
152. Westerman, M., et al., *Microvesicles in haemoglobinopathies offer insights into mechanisms of hypercoagulability, haemolysis and the effects of therapy*. Br J Haematol, 2008. **142**(1): p. 126-35.
153. Danesh, A., et al., *Exosomes from red blood cell units bind to monocytes and induce proinflammatory cytokines, boosting T-cell responses in vitro*. Blood, 2014. **123**(5): p. 687-96.
154. Donadee, C., et al., *Nitric oxide scavenging by red blood cell microparticles and cell-free hemoglobin as a mechanism for the red cell storage lesion*. Circulation, 2011. **124**(4): p. 465-76.
155. Awojodu, A.O., et al., *Acid sphingomyelinase is activated in sickle cell erythrocytes and contributes to inflammatory microparticle generation in SCD*. Blood, 2014. **124**(12): p. 1941-50.
156. Leroyer, A.S., et al., *Cellular origins and thrombogenic activity of microparticles isolated from human atherosclerotic plaques*. J Am Coll Cardiol, 2007. **49**(7): p. 772-7.
157. Armstrong, M.J., J. Storch, and N. Dainiak, *Structurally distinct plasma membrane regions give rise to extracellular membrane vesicles in normal and transformed lymphocytes*. Biochim Biophys Acta, 1988. **946**(1): p. 106-12.
158. Aupeix, K., et al., *The significance of shed membrane particles during programmed cell death in vitro, and in vivo, in HIV-1 infection*. J Clin Invest, 1997. **99**(7): p. 1546-54.
159. Martin, S., et al., *Shed membrane particles from T lymphocytes impair endothelial function and regulate endothelial protein expression*. Circulation, 2004. **109**(13): p. 1653-9.
160. Thomas, M.L., *The leukocyte common antigen family*. Annu Rev Immunol, 1989. **7**: p. 339-69.
161. Macey, M.G., N. Enniks, and S. Bevan, *Flow cytometric analysis of microparticle phenotype and their role in thrombin generation*. Cytometry B Clin Cytom, 2011. **80**(1): p. 57-63.
162. Wang, J.G., et al., *Monocytic microparticles activate endothelial cells in an IL-1beta-dependent manner*. Blood, 2011. **118**(8): p. 2366-74.

163. Wang, J.G., E. Aikawa, and M. Aikawa, *Leukocyte-derived microparticles as proinflammatory mediators in atherosclerosis*. *J Am Coll Cardiol*, 2013. **62**(16): p. 1442-5.
164. Leroyer, A.S., et al., *CD40 ligand+ microparticles from human atherosclerotic plaques stimulate endothelial proliferation and angiogenesis a potential mechanism for intraplaque neovascularization*. *J Am Coll Cardiol*, 2008. **52**(16): p. 1302-11.
165. Mayr, M., et al., *Proteomics, metabolomics, and immunomics on microparticles derived from human atherosclerotic plaques*. *Circ Cardiovasc Genet*, 2009. **2**(4): p. 379-88.
166. Rautou, P.E., et al., *Microparticles from human atherosclerotic plaques promote endothelial ICAM-1-dependent monocyte adhesion and transendothelial migration*. *Circ Res*, 2011. **108**(3): p. 335-43.
167. Mallat, Z., et al., *Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity*. *Circulation*, 1999. **99**(3): p. 348-53.
168. Canault, M., et al., *Microparticles of human atherosclerotic plaques enhance the shedding of the tumor necrosis factor-alpha converting enzyme/ADAM17 substrates, tumor necrosis factor and tumor necrosis factor receptor-1*. *Am J Pathol*, 2007. **171**(5): p. 1713-23.
169. Horstman, L.L. and Y.S. Ahn, *Platelet microparticles: a wide-angle perspective*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 1999. **30**(2): p. 111-42.
170. Bode, A.P., et al., *Vesiculation of platelets during in vitro aging*. *Blood*, 1991. **77**(4): p. 887-95.
171. Burnouf, T., et al., *An overview of the role of microparticles/microvesicles in blood components: Are they clinically beneficial or harmful?* *Transfus Apher Sci*, 2015. **53**(2): p. 137-45.
172. Wiedmer, T., et al., *Role of calcium and calpain in complement-induced vesiculation of the platelet plasma membrane and in the exposure of the platelet factor Va receptor*. *Biochemistry*, 1990. **29**(3): p. 623-32.
173. Iwamoto, S., et al., *The release mechanism of platelet-activating factor during shear-stress induced platelet aggregation*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997. **239**(1): p. 101-5.
174. Tan, K.T. and G.Y. Lip, *The potential role of platelet microparticles in atherosclerosis*. *Thromb Haemost*, 2005. **94**(3): p. 488-92.
175. Solum, N.O., *Procoagulant expression in platelets and defects leading to clinical disorders*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999. **19**(12): p. 2841-6.
176. Sinauridze, E.I., et al., *Platelet microparticle membranes have 50- to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets*. *Thromb Haemost*, 2007. **97**(3): p. 425-34.
177. Nomura, S., et al., *High-shear-stress-induced activation of platelets and microparticles enhances expression of cell adhesion molecules in THP-1 and endothelial cells*. *Atherosclerosis*, 2001. **158**(2): p. 277-87.
178. Amabile, N., et al., *Cellular microparticles in the pathogenesis of pulmonary hypertension*. *Eur Respir J*, 2013. **42**(1): p. 272-9.
179. Hayon, Y., et al., *Platelet microparticles induce angiogenesis and neurogenesis after cerebral ischemia*. *Curr Neurovasc Res*, 2012. **9**(3): p. 185-92.

180. Gambim, M.H., et al., *Platelet-derived exosomes induce endothelial cell apoptosis through peroxynitrite generation: experimental evidence for a novel mechanism of septic vascular dysfunction*. Crit Care, 2007. **11**(5): p. R107.
181. Manly, D.A., et al., *Increased microparticle tissue factor activity in cancer patients with Venous Thromboembolism*. Thromb Res, 2010. **125**(6): p. 511-2.
182. Kang, P., et al., *Circulating platelet-derived microparticles and endothelium-derived microparticles may be a potential cause of microthrombosis in patients with osteonecrosis of the femoral head*. Thromb Res, 2008. **123**(2): p. 367-73.
183. Diehl, P., et al., *Enhanced microparticles in ventricular assist device patients predict platelet, leukocyte and endothelial cell activation*. Interact Cardiovasc Thorac Surg, 2010. **11**(2): p. 133-7.
184. Pitha, J., et al., *The impact of left ventricle assist device on circulating endothelial microparticles - pilot study*. Neuro Endocrinol Lett, 2012. **33 Suppl 2**: p. 68-72.
185. Hatano, S., *Experience from a multicentre stroke register: a preliminary report*. Bull World Health Organ, 1976. **54**(5): p. 541-53.
186. Thygesen, K., et al., *Third universal definition of myocardial infarction*. Glob Heart, 2012. **7**(4): p. 275-95.
187. Schulman, S. and C. Kearon, *Definition of major bleeding in clinical investigations of antihemostatic medicinal products in non-surgical patients*. J Thromb Haemost, 2005. **3**(4): p. 692-4.
188. Becton, D.a.C., *Introduction to Flow Cytometry, Manual Part Number: 11-11032-01*. 2000.
189. Horn, P., et al., *Circulating microparticles carry a functional endothelial nitric oxide synthase that is decreased in patients with endothelial dysfunction*. J Am Heart Assoc, 2012. **2**(1): p. e003764.
190. Takeichi, M., *Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion*. Annu Rev Biochem, 1990. **59**: p. 237-52.
191. Collins, T., et al., *Structure and chromosomal location of the gene for endothelial-leukocyte adhesion molecule 1*. J Biol Chem, 1991. **266**(4): p. 2466-73.
192. Jackson, D.E., *The unfolding tale of PECAM-1*. FEBS Lett, 2003. **540**(1-3): p. 7-14.
193. Amabile, N., et al., *Predictive value of circulating endothelial microparticles for cardiovascular mortality in end-stage renal failure: a pilot study*. Nephrol Dial Transplant, 2012. **27**(5): p. 1873-80.
194. Bernal-Mizrachi, L., et al., *High levels of circulating endothelial microparticles in patients with acute coronary syndromes*. Am Heart J, 2003. **145**(6): p. 962-70.
195. He, Z., Y. Tang, and C. Qin, *Increased circulating leukocyte-derived microparticles in ischemic cerebrovascular disease*. Thromb Res, 2017. **154**: p. 19-25.
196. Vickers, J.D., *Binding of polymerizing fibrin to integrin alpha(IIb)beta(3) on chymotrypsin-treated rabbit platelets decreases phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and increases cytoskeletal actin*. Platelets, 1999. **10**(4): p. 228-37.
197. Duperray, A., et al., *Biosynthesis and assembly of platelet GPIIb-IIIa in human megakaryocytes: evidence that assembly between pro-GPIIb and GPIIIa is a prerequisite for expression of the complex on the cell surface*. Blood, 1989. **74**(5): p. 1603-11.
198. Celermajer, D.S., et al., *Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis*. Lancet, 1992. **340**(8828): p. 1111-5.
199. Peretz, A., et al., *Flow mediated dilation of the brachial artery: an investigation of methods requiring further standardization*. BMC Cardiovasc Disord, 2007. **7**: p. 11.

200. Corretti, M.C., et al., *Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force*. J Am Coll Cardiol, 2002. **39**(2): p. 257-65.
201. Ghiadoni, L., et al., *Mental stress induces transient endothelial dysfunction in humans*. Circulation, 2000. **102**(20): p. 2473-8.
202. Corson, M.A., et al., *Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress*. Circ Res, 1996. **79**(5): p. 984-91.
203. Joannides, R., et al., *Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo*. Circulation, 1995. **91**(5): p. 1314-9.
204. Heiss, C., 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): p. 1760-71.
205. Meyer, B., et al., *Flow-mediated vasodilation predicts outcome in patients with chronic heart failure: comparison with B-type natriuretic peptide*. J Am Coll Cardiol, 2005. **46**(6): p. 1011-8.
206. Balmain, B.N., et al., *Folic acid supplementation improves vascular endothelial function, yet not skin blood flow during exercise in the heat, in patients with heart failure*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2018. **315**(4): p. R810-r819.
207. Witman, M.A., et al., *Vascular function and the role of oxidative stress in heart failure, heart transplant, and beyond*. Hypertension, 2012. **60**(3): p. 659-68.
208. Hornig, B., et al., *Vitamin C improves endothelial function of conduit arteries in patients with chronic heart failure*. Circulation, 1998. **97**(4): p. 363-8.
209. Kubo, S.H., et al., *Endothelium-dependent vasodilation is attenuated in patients with heart failure*. Circulation, 1991. **84**(4): p. 1589-96.
210. Katz, S.D., et al., *Decreased activity of the L-arginine-nitric oxide metabolic pathway in patients with congestive heart failure*. Circulation, 1999. **99**(16): p. 2113-7.
211. Berger, R., et al., *Effects of endothelin a receptor blockade on endothelial function in patients with chronic heart failure*. Circulation, 2001. **103**(7): p. 981-6.
212. Fang, Z.Y. and T.H. Marwick, *Vascular dysfunction and heart failure: epiphenomenon or etiologic agent?* Am Heart J, 2002. **143**(3): p. 383-90.
213. Drexler, H. and B. Hornig, *Endothelial dysfunction in human disease*. J Mol Cell Cardiol, 1999. **31**(1): p. 51-60.
214. Kiowski, W., et al., *Endothelial control of vascular tone in chronic heart failure*. J Cardiovasc Pharmacol, 1998. **32 Suppl 3**: p. S67-73.
215. Esposito, K., et al., *Endothelial microparticles correlate with endothelial dysfunction in obese women*. J Clin Endocrinol Metab, 2006. **91**(9): p. 3676-9.
216. Horn, P., et al., *Improved endothelial function and decreased levels of endothelium-derived microparticles after transcatheter aortic valve implantation*. EuroIntervention, 2015. **10**(12): p. 1456-63.
217. Bulut, D., et al., *Circulating endothelial microparticles correlate inversely with endothelial function in patients with ischemic left ventricular dysfunction*. J Card Fail, 2008. **14**(4): p. 336-40.
218. Horn, P., et al., *Dietary flavanol intervention lowers the levels of endothelial microparticles in coronary artery disease patients*. Br J Nutr, 2014. **111**(7): p. 1245-52.

219. Feng, B., et al., *Circulating level of microparticles and their correlation with arterial elasticity and endothelium-dependent dilation in patients with type 2 diabetes mellitus*. *Atherosclerosis*, 2010. **208**(1): p. 264-9.
220. Amabile, N., et al., *Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure*. *J Am Soc Nephrol*, 2005. **16**(11): p. 3381-8.
221. Libby, P., *Inflammation in atherosclerosis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012. **32**(9): p. 2045-51.
222. Martinez, M.C., et al., *Shed membrane microparticles from circulating and vascular cells in regulating vascular function*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005. **288**(3): p. H1004-9.
223. Burnier, L., et al., *Cell-derived microparticles in haemostasis and vascular medicine*. *Thromb Haemost*, 2009. **101**(3): p. 439-51.
224. Werner, N., et al., *Circulating CD31+/annexin V+ apoptotic microparticles correlate with coronary endothelial function in patients with coronary artery disease*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. **26**(1): p. 112-6.
225. Boulanger, C.M., et al., *Circulating microparticles from patients with myocardial infarction cause endothelial dysfunction*. *Circulation*, 2001. **104**(22): p. 2649-52.
226. Brodsky, S.V., et al., *Endothelium-derived microparticles impair endothelial function in vitro*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004. **286**(5): p. H1910-5.
227. Cai, H. and D.G. Harrison, *Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress*. *Circ Res*, 2000. **87**(10): p. 840-4.
228. Goligorsky, M.S., J. Chen, and S. Brodsky, *Workshop: endothelial cell dysfunction leading to diabetic nephropathy : focus on nitric oxide*. *Hypertension*, 2001. **37**(2 Pt 2): p. 744-8.
229. Jimenez, J.J., et al., *Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis*. *Thromb Res*, 2003. **109**(4): p. 175-80.
230. Vasquez-Vivar, J., et al., *Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(16): p. 9220-5.
231. Skeppholm, M., et al., *Platelet-derived microparticles during and after acute coronary syndrome*. *Thromb Haemost*, 2012. **107**(6): p. 1122-9.
232. Dey-Hazra, E., et al., *Detection of circulating microparticles by flow cytometry: influence of centrifugation, filtration of buffer, and freezing*. *Vasc Health Risk Manag*, 2010. **6**: p. 1125-33.
233. Shah, M.D., et al., *Flow cytometric measurement of microparticles: pitfalls and protocol modifications*. *Platelets*, 2008. **19**(5): p. 365-72.
234. Fukuda, S. and G.W. Schmid-Schonbein, *Centrifugation attenuates the fluid shear response of circulating leukocytes*. *J Leukoc Biol*, 2002. **72**(1): p. 133-9.
235. Lawrie, A.S., et al., *Microparticle sizing by dynamic light scattering in fresh-frozen plasma*. *Vox Sang*, 2009. **96**(3): p. 206-12.
236. Witman, M.A., et al., *Further Peripheral Vascular Dysfunction in Heart Failure Patients With a Continuous-Flow Left Ventricular Assist Device: The Role of Pulsatility*. *JACC Heart Fail*, 2015. **3**(9): p. 703-11.
237. Sansone, R., et al., *Macrovascular and microvascular function after implantation of left ventricular assist devices in end-stage heart failure: Role of microparticles*. *J Heart Lung Transplant*, 2015. **34**(7): p. 921-32.

238. Ivak, P., et al., *Biphasic response in number of stem cells and endothelial progenitor cells after left ventricular assist device implantation: A 6month follow-up*. Int J Cardiol, 2016. **218**: p. 98-103.
239. Ali, M.H. and P.T. Schumacker, *Endothelial responses to mechanical stress: where is the mechanosensor?* Crit Care Med, 2002. **30**(5 Suppl): p. S198-206.
240. Davies, P.F., et al., *Spatial relationships in early signaling events of flow-mediated endothelial mechanotransduction*. Annu Rev Physiol, 1997. **59**: p. 527-49.
241. Soucy, K.G., et al., *Rotary pumps and diminished pulsatility: do we need a pulse?* Asaio j, 2013. **59**(4): p. 355-66.
242. Liu, X.M., K.J. Peyton, and W. Durante, *Physiological cyclic strain promotes endothelial cell survival via the induction of heme oxygenase-1*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2013. **304**(12): p. H1634-43.
243. Dimmeler, S., et al., *Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation*. Nature, 1999. **399**(6736): p. 601-5.
244. Busse, R. and I. Fleming, *Pulsatile stretch and shear stress: physical stimuli determining the production of endothelium-derived relaxing factors*. J Vasc Res, 1998. **35**(2): p. 73-84.
245. Nakata, M., et al., *Augmentative effect of pulsatility on the wall shear stress in tube flow*. Artif Organs, 1999. **23**(8): p. 727-31.
246. Blackman, B.R., G. Garcia-Cardena, and M.A. Gimbrone, Jr., *A new in vitro model to evaluate differential responses of endothelial cells to simulated arterial shear stress waveforms*. J Biomech Eng, 2002. **124**(4): p. 397-407.
247. Ridger, V.C., et al., *Microvesicles in vascular homeostasis and diseases*. Thromb Haemost, 2017. **117**(7): p. 1296-1316.
248. Wang, X., et al., *Biological activity of nitric oxide in the plasmatic compartment*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(31): p. 11477-82.
249. Dewald, O., et al., *Platelet morphology in patients with mechanical circulatory support*. Eur J Cardiothorac Surg, 1997. **12**(4): p. 634-41.
250. Baker, L.C., et al., *Flow cytometric assays to detect platelet activation and aggregation in device-implanted calves*. J Biomed Mater Res, 1998. **41**(2): p. 312-21.
251. Milano, C.A., et al., *HVAD: The ENDURANCE Supplemental Trial*. JACC Heart Fail, 2018. **6**(9): p. 792-802.
252. Heatley, G., et al., *Clinical trial design and rationale of the Multicenter Study of MagLev Technology in Patients Undergoing Mechanical Circulatory Support Therapy With HeartMate 3 (MOMENTUM 3) investigational device exemption clinical study protocol*. J Heart Lung Transplant, 2016. **35**(4): p. 528-36.
253. Hanke, J.S., et al., *One-year outcomes with the HeartMate 3 left ventricular assist device*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2018. **156**(2): p. 662-669.
254. Mehra, M.R., et al., *Healthcare Resource Use and Cost Implications in the MOMENTUM 3 Long-Term Outcome Study*. Circulation, 2018. **138**(18): p. 1923-1934.
255. Zimpfer, D., et al., *Multicentre clinical trial experience with the HeartMate 3 left ventricular assist device: 30-day outcomes*. Eur J Cardiothorac Surg, 2016. **50**(3): p. 548-54.
256. Krabatsch, T., et al., *Heartmate 3 fully magnetically levitated left ventricular assist device for the treatment of advanced heart failure -1 year results from the Ce mark trial*. J Cardiothorac Surg, 2017. **12**(1): p. 23.

257. Cavarretta, E., et al., *A network meta-analysis of randomized trials and observational studies on left ventricular assist devices in adult patients with end-stage heart failure*. Eur J Cardiothorac Surg, 2019. **55**(3): p. 461-467.
258. Shah, S.R., et al., *Using left ventricular assist devices in advanced heart failure patients*. J Community Hosp Intern Med Perspect, 2018. **8**(6): p. 357-359.
259. Livingston, E.R., et al., *Increased activation of the coagulation and fibrinolytic systems leads to hemorrhagic complications during left ventricular assist implantation*. Circulation, 1996. **94**(9 Suppl): p. li227-34.
260. Shah, K.B. and M.C. Kontos, *Microparticles and left ventricular assist device complications: a causal association?* J Heart Lung Transplant, 2014. **33**(5): p. 468-9.
261. McClane, N., et al., *Identification of Novel Hemostatic Biomarkers of Adverse Clinical Events in Patients Implanted With a Continuous-Flow Left Ventricular Assist Device*. Clin Appl Thromb Hemost, 2018. **24**(6): p. 965-972.
262. Mause, S.F., *Platelet microparticles: reinforcing the hegemony of platelets in atherothrombosis*. Thromb Haemost, 2013. **109**(1): p. 5-6.
263. Lacroix, R. and F. Dignat-George, *Microparticles as a circulating source of procoagulant and fibrinolytic activities in the circulation*. Thromb Res, 2012. **129** Suppl 2: p. S27-9.
264. Mezouar, S., et al., *Involvement of platelet-derived microparticles in tumor progression and thrombosis*. Semin Oncol, 2014. **41**(3): p. 346-58.
265. Callander, N.S., N. Varki, and L.V. Rao, *Immunohistochemical identification of tissue factor in solid tumors*. Cancer, 1992. **70**(5): p. 1194-201.
266. Mueller, B.M., et al., *Expression of tissue factor by melanoma cells promotes efficient hematogenous metastasis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(24): p. 11832-6.
267. Khorana, A.A., et al., *Plasma tissue factor may be predictive of venous thromboembolism in pancreatic cancer*. J Thromb Haemost, 2008. **6**(11): p. 1983-5.
268. Ruf, W., et al., *Diverse functions of protease receptor tissue factor in inflammation and metastasis*. Immunol Res, 2000. **21**(2-3): p. 289-92.
269. Bogdanov, V.Y., et al., *Alternatively spliced human tissue factor: a circulating, soluble, thrombogenic protein*. Nat Med, 2003. **9**(4): p. 458-62.
270. Mege, D., et al., *Microparticles and cancer thrombosis in animal models*. Thromb Res, 2016. **140** Suppl 1: p. S21-6.
271. Campello, E., et al., *Endothelial, platelet, and tissue factor-bearing microparticles in cancer patients with and without venous thromboembolism*. Thromb Res, 2011. **127**(5): p. 473-7.
272. Janowska-Wieczorek, A., et al., *Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer*. Int J Cancer, 2005. **113**(5): p. 752-60.
273. Yu, J.L., et al., *Oncogenic events regulate tissue factor expression in colorectal cancer cells: implications for tumor progression and angiogenesis*. Blood, 2005. **105**(4): p. 1734-41.
274. Wang, J.G., et al., *Tumor-derived tissue factor activates coagulation and enhances thrombosis in a mouse xenograft model of human pancreatic cancer*. Blood, 2012. **119**(23): p. 5543-52.
275. Mezouar, S., et al., *Inhibition of platelet activation prevents the P-selectin and integrin-dependent accumulation of cancer cell microparticles and reduces tumor growth and metastasis in vivo*. Int J Cancer, 2015. **136**(2): p. 462-75.

276. Davila, M., et al., *Tissue factor-bearing microparticles derived from tumor cells: impact on coagulation activation*. J Thromb Haemost, 2008. **6**(9): p. 1517-24.
277. Lima, L.G., et al., *Tumor-derived microvesicles modulate the establishment of metastatic melanoma in a phosphatidylserine-dependent manner*. Cancer Lett, 2009. **283**(2): p. 168-75.
278. Thomas, G.M., et al., *Cancer cell-derived microparticles bearing P-selectin glycoprotein ligand 1 accelerate thrombus formation in vivo*. J Exp Med, 2009. **206**(9): p. 1913-27.

6 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Malte Kelm danke ich für die Möglichkeit klinisch und experimentell wissenschaftlich zu Arbeiten.

Herrn Dr. med. R. Westenfeld danke ich für das entgegenbrachte Vertrauen mit der Aufnahme in die Arbeitsgruppe und Betreuung mit einem wissenschaftlichen Projekt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. P. Horn für die Überlassung des Themas, die exzellente Betreuung während der Arbeit und der Möglichkeit von Ihm zu lernen, was meine klinische und experimentelle Denkweise maßgeblich geprägt hat. Seine beständige Bereitschaft auf Fragen und Probleme konstruktiv einzugehen beeindruckten mich immer wieder und ermöglichten dieses Projekt.

Mein Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe des kardiologischen Labors insbesondere Frau Prof. Dr. rer. nat. M. Cortese-Krott, Herrn Prof. Dr. rer. nat. N. Gerdes, Anita Meissner, Lilian Vornholz und Aysel Ayhan.

Herrn Dr. T. Weber für die Unterstützung bei der Erlernung des Gefäß-Ultraschall.

Abschließend möchte ich mich besonderes bei meiner Familie bedanken, die mich während der gesamten Zeit unermüdlich unterstützt hat und nie den Glauben an mich verloren hat. Ihr widme ich, in nicht in Worte zu fassender Dankbarkeit, dieses Werk.