Aus der Klinik für Herzchirurgie

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. Lichtenberg

Der perioperative Verlauf der zirkulierenden extrazellulären Vesikel bei Patienten mit Aortenklappenersatz und simultaner Koronararterienbypassanlage

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heine-Heinrich-Universität Düsseldorf

Vorgelegt von

Yeo Min Lee

2023

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöckner

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Payam Akhyari

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Timo Brandenburger

Meinen Eltern

In Dankbarkeit

Zusammenfassung

Der perioperative Verlauf der zirkulierenden extrazellulären Vesikel bei Patienten mit Aortenklappenersatz und simultaner Koronararterienbypassanlage

Die kalzifizierende Aortenklappenstenose und koronare Herzkrankheit gehören in den Industrieländern zu den führenden kardiovaskulären Erkrankungen. Mehrere Forschungsgruppen haben bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen zirkulierende extrazelluläre Vesikel festgestellt. Diese subzellulären Vesikel werden von diversen Zellen bei verschiedenen Prozessen z.B. Zellverletzung, Inflammation oder Apoptose ins Blut sezerniert. Aufgrund des Potenzials zur Etablierung eines neuen Biomarkers, der die Diagnostik und das Therapiemonitoring ergänzen könnte, sind die EV im Fokus der medizinischen Forschung.

In der Literatur wird ein erhöhter zirkulierender Gehalt an extrazellulären Vesikel in Zusammenhang mit von der Stenose verursachten transvalvulärem Scherstress beschrieben. Ein perioperativer Verlauf der extrazellulären Vesikel bei einem Aortenklappenersatz ist bisher noch nicht untersucht worden. In Hinblick darauf war das Ziel der vorliegenden Studie zu untersuchen, inwieweit der Verlauf durch eine Operation verändert wird.

In dieser Studie wurden Daten von 44 Patienten mit hochgradiger Aortenklappenstenose eingeschlossen, bei denen ein operativen Aortenklappenersatzes mit simultaner Bypassoperation durchgeführt wurde. Das Blut der Patienten wurden zu vier Zeitpunkten (prä-OP, post-OP: 24h, 7d, 3m) innerhalb von drei Monaten auf extrazelluläre Vesikel untersucht. Die Vesikel wurden isoliert und mittels FACS quantifiziert. Drei Monate nach der Operation war die Anzahl der thrombozytären, erythrozytären, lymphozytären und monozytären extrazellulären Vesikel signifikant niedriger als der Initialwert. Die rückläufigen Werte könnten die Folge eines ausgeschalteten pathologischen Prozesses, also die Reduktion der systemischen Entzündung darstellen. Eine signifikante Korrelation zwischen transvalvulärer Scherkraft und Bildung der extrazellulären Vesikel zeigte sich jedoch nicht. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die genaue Ursache der Bildung dieser Vesikel bei der Aortenklappenstenose zu bestimmen.

Summary

The perioperative course of circulating extracellular vesicles in patients with aortic valve replacement and simultaneous coronary bypass operation

The calcific aortic valve stenosis and coronary heart disease are one the most common cardiovascular diseases in developed countries. Many studies have shown associations between cardiovascular diseases and circulating extracellular vesicles. These subcellular vesicles are released by various cells into the bloodstream during various processes e.g. cell injury, inflammation and apoptosis. Due to its potential as diagnostic or therapeutic means, extracellular vesicles have become an increasingly examined subject in medical research.

A study by Diehl et al. have shown increased circulating extracellular vesicles in patients with severe aortic valve stenosis, former correlated with transvalvular shear stress. As of today, the perioperative course of extracellular vesicles in patients who underwent aortic valve replacement with simultaneous bypass operation has not been described yet. The aim of this study was to analyze the operative effect on the course of extracellular vesicles.

In this thesis we assessed data of 44 patients with severe aortic valve stenosis who underwent aortic valve replacement with simultaneous coronary bypass operation. Blood samples were collected at several dates in a time frame of three months (preoperatively, postoperative follow-ups: 24h, 7d, 3m). The vesicles were isolated from blood samples and quantified through FACS.

Three months postoperatively the amount of circulating platelet-, erythrocyte-, lymphocyte- and monocyte- derived extracellular vesicles were significantly decreased compared to initial levels. This could be interpreted as reduction of systemic inflammation. However, a significant correlation between transvalvular shear stress and synthesis of extracellular vesicles has not been observed. Further examinations are needed to evaluate the cause of extracellular vesicles synthesis and the role of increased shear stress in aortic valve stenosis.

Abkürzungsverzeichnis

AS	Aortenklappenstenose
ACC/AHA	American College of Cardiology/American Heart Association
AKE	Aortenklappenersatz
ApoBD	Apoptotische Körperchen/ apoptotic bodies
CD	Cluster of differentiation
EDD	Enddiastolischer Durchmesser
EF	Ejektionsfraktion
EOA	Effektive Öffnungsfläche
ESC/EACTS	European Society of Cardiology/ European Association for Cardio-Thoracic Surgery
EuroSCORE	European System for Cardiac Operative Risk Evaluation
EV	Extrazelluläre Vesikel
FACS	Fluorescence activated cell sorting
KHK	Koronare Herzkrankheit
KÖF	Aortenklappenöffnungsfläche
LVEDD	Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser
LVESD	Linksventrikulärer endsystolischer Durchmesser
MP	Mikropartikel
NYHA	New York Heart Association
Pmean	mittlerer Druckgradient
STS Score	Society of Thoracic Surgeons Score
TAVI	Transkatheter-Aortenklappen-Implantation
Vmax	maximale Flussgeschwindigkeit

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung III

Summary IV

Abkürzungsverzeichnis V

Tabellenverzeichnis IX

Abbilungsverzeichnis X

1. Einleitung 1

1.1. Aortenklappenstenose 1

1.1.1. Epidemiologie der Aortenklappenstenose 1

1.1.2. Ätiologie und Pathophysiologie der AS 2

1.1.3. Klinik der AS 3

1.1.4. Diagnostik und Klassifikation der AS 3

1.1.5. Therapie der AS 4

1.2. Extrazelluläre Vesikel 6

1.2.1. Eigenschaften der Extrazellulären Vesikel 6

1.2.2. Formation der MP und ApoBD 7

1.2.3. Klinische Relevanz der EV 8

1.2.4. Die Rolle der zellspezifischen EV 9

1.2.5. Rolle der EV im Kontext der AS 10

1.2.6. Isolation und Quantifizierung der EV 11

1.3. Ziel der vorliegenden Studie 12

2. Material und Methode 13

2.1. Material 13

2.1.1. Verwendete Geräte 13

2.1.2. FACS-Antikörper 13

2.1.3. Isotypen 13

2.1.4. Software 14

2.1.5. Sonstiges 14

2.2. Methoden 15

2.2.1. Patientenkollektiv 15

2.2.2. Ethikvotum 16

2.2.3. Echokardiographie 16

2.2.4. Blutprobenentnahme 16

2.2.5. Isolation der EV 17

2.2.6. Quantifizierung mittels Durchflusszytometrie 17

2.2.7. Markierung der EV 18

2.2.8. Messung 19

2.2.9. Statistik 19

3. Ergebnis 20

3.1. Data collection 20

3.1.1. Patientenselektion 20

3.1.2. Baseline-Daten der Studienkohorte 21

3.1.3. Echokardiographische Daten 22

3.2. Verlauf der EV 23

3.2.1. Verlauf der blutzellenabstammenden EV 23

3.2.2. Verlauf der thrombozytären EV 25

3.2.3. Verlauf der erythrozytären EV 27

3.2.4. Verlauf der leukozytären EV 29

3.2.5. Verlauf der granulozytären EV 31

3.2.6. Verlauf der lymphozytären EV 33

3.2.7. Verlauf der monozytären EV 35

3.2.8. Relation Scherkraft und Anzahl der EV 37

4. Diskussion 38

4.1.1. Zirkulierende MP und ApoBD bei Patienten mit AKE und Bypassoperation 38

4.1.2. Verlauf der totalen MP- und ApoBD- Anzahl 39

4.1.3. EV-Verlauf der blutzellenabstammenden Zellen 40

4.1.4. Limitation und Aussicht 42

5. Literaturverzeichnis 43

6. Danksagung 48

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Untersuchungszeitpunkte 15

Tabelle 2: Antikörper zu den jeweiligen CDs 18

Tabelle 3: Oberflächenantigene 18

Tabelle 4: Baseline-Daten 21

Tabelle 5: Echokardiographische Parameter im Verlauf 22

Tabelle 6: P-Werte zu den echokardiographischen Datenverläufen 22

Tabelle 7: Relation zwischen Scherkraft und EV-Anzahl 37

Abbilungsverzeichnis

Abbildung 1: Empfehlung zur Graduierung der AS 3

Abbildung 2: Formation der MP 7

Abbildung 3: Formation der ApoBD 8

Abbildung 4: Patientenselektion 20

Abbildung 5: Verlauf der EV der Größe 100nm-1000nm 23

Abbildung 6: Verlauf der EV der Größe 1000nm-2000nm 24

Abbildung 7: Verlauf der thrombozytären MP 25

Abbildung 8: Verlauf der thrombozytären ApoBD 26

Abbildung 9: Verlauf der erythrozytären MP 27

Abbildung 10: Verlauf der erythrozytären ApoBD 28

Abbildung 11: Verlauf der leukozytären MP 29

Abbildung 12: Verlauf der leukozytären ApoBD 30

Abbildung 13: Verlauf der granulozytären MP 31

Abbildung 14: Verlauf der granulozytären ApoBD 32

Abbildung 15: Verlauf der lymphozytären MP 33

Abbildung 16: Verlauf der lymphozytären ApoBD 34

Abbildung 17: Verlauf der monozytären MP 35

Abbildung 18: Verlauf der monozytären ApoBD 36

1. Einleitung

1.1. Aortenklappenstenose

1.1.1. Epidemiologie der Aortenklappenstenose

Die Aortenklappenstenose (AS) zeichnet sich durch eine Verengung der Klappenöffnungsfläche aus. Aufgrund der chronischen Druckbelastung des linken Ventrikels während der Systole kommt es langfristig zu einer linksventrikulären Hypertrophie und letztendlich zu einer Linksherzinsuffizienz. Es werden folgende Formen unterschieden: kalzifizierende AS, die erworbene Form beispielsweise bedingt durch das rheumatische Fieber sowie die kongenitale Form. Zu den Risikofaktoren gehören ähnlich wie bei der Atherosklerose hohes Alter, arterielle Hypertonie, Dyslipidämie, Diabetes, Nikotinkonsum [1, 2].

Die AS gehört in Europa und Nordamerika zu den häufigsten primären Herzklappenerkrankungen [3]. Diese Erkrankung tritt vor allem bei dem älteren Anteil der Bevölkerung auf. Es zeigt sich eine zunehmende Prävalenz dieser Erkrankung mit dem Alter. In der populationsbasierten Studie von Eveborn et al. wurde eine Prävalenz von 0,2% in der Altersgruppe von 50-59 Jahren, 1,3% bei 60-69 Jahren, 3,9% bei 70-79 Jahren und 9,8% bei 80- 89 Jahren gezeigt werden [4]. In einer anderen populationsbasierten Studie wurde ebenfalls eine altersabhängige Prävalenz der moderaten und hochgradigen AS beschrieben, wobei jene bei 0,02% unter den 18-44-Jährigen und 2,8% unter den >75-Jährigen lag [5].

Es zeigt sich, dass unbehandelte symptomatische hochgradige AS eine hohe Mortalitätsrate von knapp 50% aufweisen und mit einer schlechten Prognose einhergehen[1]. Bei asymptomatischen Patienten mit hochgradiger AS zeigt sich keine erhöhte Mortalität [4]. Jedoch besteht ein deutlich erhöhtes Risiko einer raschen Progression der Erkrankung und Eintreten eines kardiovaskulären Ereignisses, sodass dies eine rechtzeitige Intervention erforderlich macht [6, 7].

Aufgrund des demographischen Wandels ist zukünftig eine steigende Prävalenz und Belastung der Gesellschaft zu erwarten [5].

1.1.2. Ätiologie und Pathophysiologie der AS

In den Industrieländern stehen erworbene Formen, vornehmlich aktive kalzifizierende Pathomechanismen (im englischen Raum auch bekannt als calcific aortic valve disease) als Ursache für die Entstehung von AS im Vordergrund [8]. In den Industrieländern treten rheumatisch bedingte AS aufgrund der Behandlungsmöglichkeiten selten auf [9]. In dieser Arbeit befassten wir uns lediglich mit Patienten mit erworbenen kalzifizierten AS.

Initial ist man bei der Entstehung dieses Krankheitsbildes von einem passiven degenerativen Prozess, bedingt durch das Altern, ausgegangen. Mehrere neue Studien haben jedoch beschrieben, dass es sich dabei um einen aktiv kalzifizierenden Prozess handelt, der in seiner Pathogenese atherosklerotischen Prozessen ähnelt [8]. Der Pathomechanismus ist noch nicht vollständig geklärt. Man geht von der Theorie aus, dass eine Endothelverletzung eine Einwanderung von Lipoproteinen mit folgender Oxidation begünstigt. Durch Expression von Adhäsionsmolekülen kommt zu einer weiteren Infiltration des Endothels mittels Makrophagen und T-Zellen, die proinflammatorische und profibrotische Zytokine ausschütten. Dies führt zu einer zunehmenden Verdickung und Steifheit des Klappengewebes. In der späten Phase vermutet man eine progrediente Kalzifizierung durch Beteiligung von Osteoblasten [5, 8].

Die progrediente Kalzifizierung und Versteifung der Aortenklappen führen zu einer Verkleinerung der Klappenöffnungsfläche, die einen erhöhten Nachlast und Wandspannung hervorruft. Dies stellt eine persistierende linksventrikuläre Druckbelastung dar, welche als Kompensationsmechanismus eine Hypertrophie des Myokards verursacht. Langfristig geht dies mit einer Fibrosierung des Myokards einher. Mit ausgedehnter Progredienz der Fibrosierung kommt es schließlich zu einer irreversiblen Linksherzinsuffizienz [8].

1.1.3. Klinik der AS

Je nach Schweregrad der Erkrankung variiert das Ausmaß der Symptome von Anzeichen einer Herzinsuffizienz, Dyspnoe, Angina pectoris, Synkope bis zum plötzlichen Herztod. In leichtgradigen Stadien bleibt die AS oft lange klinisch inapparent. Bei einer hämodynamischen Progression im Sinne einer maximalen Flussgeschwindigkeit (Vmax) ab ≥2 m/s machen sich häufig erste Symptome bemerkbar. Innerhalb von zwei Jahren war die ereignisfreie Überlebensrate bei Patienten mit einer Vmax <3,0m/s bei 75%-80%, während diese Rate bei Vmax ≥4,0 m/s bei 30%-50% geschätzt wurde [10]. Es wird beschrieben, dass bei Patienten mit asymptomatischer AS mit einer Vmax von 4,0 m/s oder mittleren transvalvulären Druckgradienten (Pmean) von 40mmHg das Auftreten eines Symptoms innerhalb von 2 bis 5 Jahren wahrscheinlich ist [10].

1.1.4. Diagnostik und Klassifikation der AS

Zur Diagnostik und Schweregradeinstufung gilt die transthorakale Echokardiographie als Goldstandard [10]. Aktuelle Leitlinien empfehlen bei Untersuchung der Patienten mit AS die Messung des Pmean, Vmax und die Aortenklappenöffnungsfläche (KÖF)[3, 10, 11]. Die folgenden Parameter Vmax von >4m/s, transvalvulärer Druckgradient >40mmHg und eine Klappenöffnungsfläche von <1cm^2 sprechen für eine hochgradige AS [3, 10].

	Aortensklerose	**Geringgradig**	**Mittelgradig**	**Hochgradig**
Max. Druckgeschwindigkeit (m/s)	≤ 2,5	2.6 - 2.9	3.0 - 4.0	> 4.0
Mittlerer Druckgradient (mmHg)	-	< 20	20 - 40	40
Aortenklappenöffnungsfläche (cm^2)	-	> 1,5	1,0 - 1,5	< 1,0
Geschwindigkeitsverhältnis	-	> 0,5	0,25 - 0,5	< 0,25

Abbildung 1: Empfehlung zur Graduierung der AS. Modifiziert nach Baumgartner[11]

1.1.5. Therapie der AS

Eine unbehandelte symptomatische AS kann innerhalb kürzester Zeit einen fatalen Lauf nehmen [12]. Ebenfalls bei asymptomatischer hochgradiger AS wurden in Studien zeitnahes Auftreten von Symptomen z.B. kardiovaskulären Ereignissen, irreparable Myokardschäden gezeigt, welches die Notwendigkeit einer rechtszeitigen Therapie verdeutlicht [6, 7, 13]. Aktuell gibt es keine medikamentöse Behandlung, die eine Erkrankung verhindert oder die Progression aufhält [3]. Der operative Aortenklappenersatz (AKE) oder die Intervention mittels Transkatheter-Aortenklappen-Implantation (TAVI) stellen die einzigen definitiven Therapiemöglichkeiten dar [3].

Hinsichtlich der operativen oder interventionellen Therapie ist es wichtig, den optimalen Zeitpunkt zu finden, angesichts des vermeidbaren Operationsrisikos bei zu frühzeitigem Eingriff sowie bei zu später Therapie das Risiko ein kardiovaskuläres Ereignis zu erleiden [14]. Die Risikoscores STS Score und EuroSCORE, welche diverse Faktoren wie u.a. Alter, Geschlecht, NYHA-Klassifikation, Dialysepflichtigkeit und kardiovaskulären Erkrankungen berücksichtigen, werden verwendet, um die perioperative Morbidität und Mortalität zu evaluieren. Die aktuellen Leitlinien der ACC/AHA und ESC/EACTS empfehlen bei einer symptomatischen hochgradigen AS mit einem niedrigen oder moderatem Operationsrisiko die Durchführung eines AKEs. Für Patienten mit einer symptomatischen hochgradigen AS, bei denen aufgrund des mittleren oder hohen Operationsrisikos eine Operation nicht empfohlen ist, kommt eine TAVI in Betracht [3, 10].

Bei dem operativen Klappenersatz werden abhängig vom Alter und dem Wunsch der Vermeidung einer lebenslangen Antikoagulation vs. mögliche Reoperation eine mechanische oder biologische Prothese eingesetzt [15]. Der Vorteil einer mechanischen Klappe ist die längere Haltbarkeit. Hierbei ist allerdings aufgrund des erhöhten Risikos einer Thromboembolie eine lebenslange Antikoagulation notwendig. Nach Einsatz einer biologischen Prothese ist eine dauerhafte Antikoagulation nicht erforderlich, jedoch ist die durchschnittliche Haltbarkeit kürzer als die einer mechanischen Klappe. Aus diesem Grund werden Bioprothesen am ehesten älteren Patienten ab einem Alter von 60-65 Jahren empfohlen [10, 15].

1.1.5.1. Simultane chirurgischer AKE und Bypass-Operation

Die koronare Herzkrankheit (KHK) gehört zu den häufigsten Krankheiten weltweit und wird definiert durch eine Manifestation der Atherosklerose an den Herzkranzgefäßen. Die häufig bestehende Konstellation der KHK und der AS stellen ein höheres kardiovaskuläres Risiko dar, sodass oftmals in gleicher Sitzung ein Aortenklappenersatz und eine Bypassoperation durchgeführt werden [3]. Dies bedeutet ein höheres Operationsrisiko für die Patienten. Jedoch wurde beschrieben, dass Patienten mit einer moderaten AS neben der indizierten Bypassoperation auch von einem AKE profitieren [3]. Bei der individuellen Evaluation der Operationsindikation sollten die hämodynamischen Parameter, Progression der Erkrankung, Klappenverkalkung, Lebenserwartung und weitere Vorerkrankungen berücksichtigt werden [3].

1.2. Extrazelluläre Vesikel

1.2.1. Eigenschaften der Extrazellulären Vesikel

Extrazelluläre Vesikel (EV) sind eine Art von Vektoren, die von diversen Zellen in die Blutzirkulation sezerniert werden und als interzelluläres Kommunikationsmittel in unterschiedlichen physiologischen und pathophysiologischen Mechanismen beteiligt sind [16, 17]. Zu den EV zählen die Exosomen, Mikropartikel (MP) sowie die apoptotischen Körperchen (ApoBD)[18]. In dieser Arbeit beschränken wir uns auf die letzteren zwei Gruppen der EV.

Die MP sind 100nm-1000nm große heterogene subzelluläre Vesikel, die aus der Zellmembran ihrer Ursprungszelle bestehen [19, 20]. Ebenfalls dem Ursprung entsprechend setzt sich der Inhalt dieser Vesikel zusammen. Sie enthalten bioaktive Moleküle u.a. Enzyme, proinflammatorische Zytokine und genetisches Material wie z.B. mRNA, die bei bestimmter Stimulation freigesetzt werden [21-23]. Zum Beispiel enthalten MP thrombozytärer Genese Moküle (GPIb GPII-IIIb, P-selectin), die bei der Koagulation beteiligt sind [24]. Auch Antigene der Ursprungszelle sind in der Membran der MP enthalten u.a. die Cluster of Differentiation (CD) [24, 25].

ApoBD sind 1-5 µm große subzelluläre Vesikel, die bei dem kontrollierten Zelltod der apoptotischen Zellen entstehen[26]. Durch die Fragmentierung der Zelle wird eine effiziente Zellentfernung und der Transport von bioaktiven Molekülen ermöglicht [27]. ApoBDs können ebenfalls RNA, miRNA, DNA, Zytokine enthalten[28-31].

1.2.2. Formation der MP und ApoBD

Bei unterschiedlichen Zelltypen wie Erythrozyten, Thrombozyten, Endothelzellen, Monozyten und Lymphozyten wurden Freisetzungen von MPs nachgewiesen [32-34]. Die Generierung dieser MP wird durch bestimmte Trigger wie beispielsweise Zellaktivierung, Hypoxie, oxidativer Stress, Scherstress und Apoptose ausgelöst [35, 36].

Im physiologischen Zustand wird eine Asymmetrie der Lipidverteilung der Doppellipidschicht durch transzelluläre Enzyme aufrechterhalten (Translocase, Flippase, Floppase, Scramblase, Calpain) [37]. In diesem Zustand liegen Phosphatidylserine, Proteine mit prothrombotischen Eigenschaften, auf der zytosolischen Seite der Doppellipidschicht. Die Verlagerung der Phosphatidylserine auf die äußere Schicht scheint die Ausschnürung der Zellmembran mit anschließender Freisetzung des MPs zu verursachen[37, 38]. Der komplexe Mechanismus hinter der Formation ist bis dato nicht vollständig geklärt. Zudem wird beschrieben, dass der Trigger die oberflächliche sowie inhaltliche Zusammensetzung der MP beeinflussen[24].

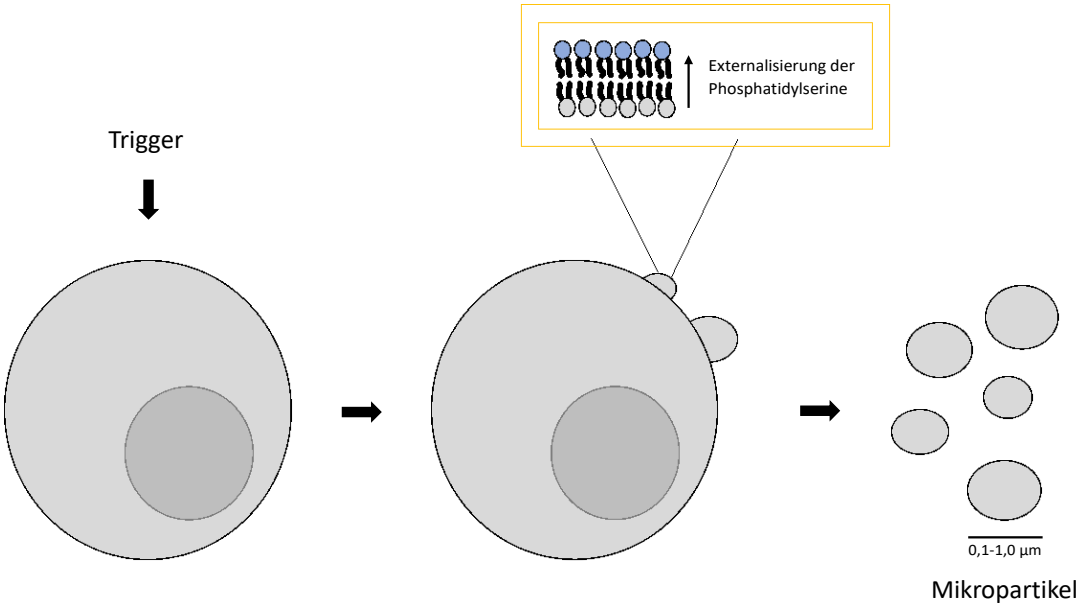

Abbildung 2: Formation der MP. Mod. nach Voukalis et al. [24]

Linksseitig ist eine Zelle dargestellt, bei der aufgrund eines Triggers wie z.B. Zellaktivierung, Hypoxie, oxidativer Stress, Scherstress und Apoptose, die Bildung von MP eingeleitet wird. Ein Teilschritt beinhaltet die Externaliserung der Phosphatidylserine der Doppellipidschicht. Letztendlich werden MP von heterogener Größe sezerniert.

Die ApoBD entstehen im Rahmen der Apoptose. Atkin et al. nannten in ihrem Review drei grundlegende Schritte, die die Formation der ApoBDs beschreiben. Zu Beginn der Apoptose wird jene durch die Bildung von Membranblebbing eingeleitet. Im zweiten Schritt gibt es drei mögliche Membranvorwölbungen „Microtubule spikes“, „Apoptopodia“ und „Beaded apoptopodia“, wobei dann im Anschluss der Fragmentierung die ApoBDs enstehen. [27]

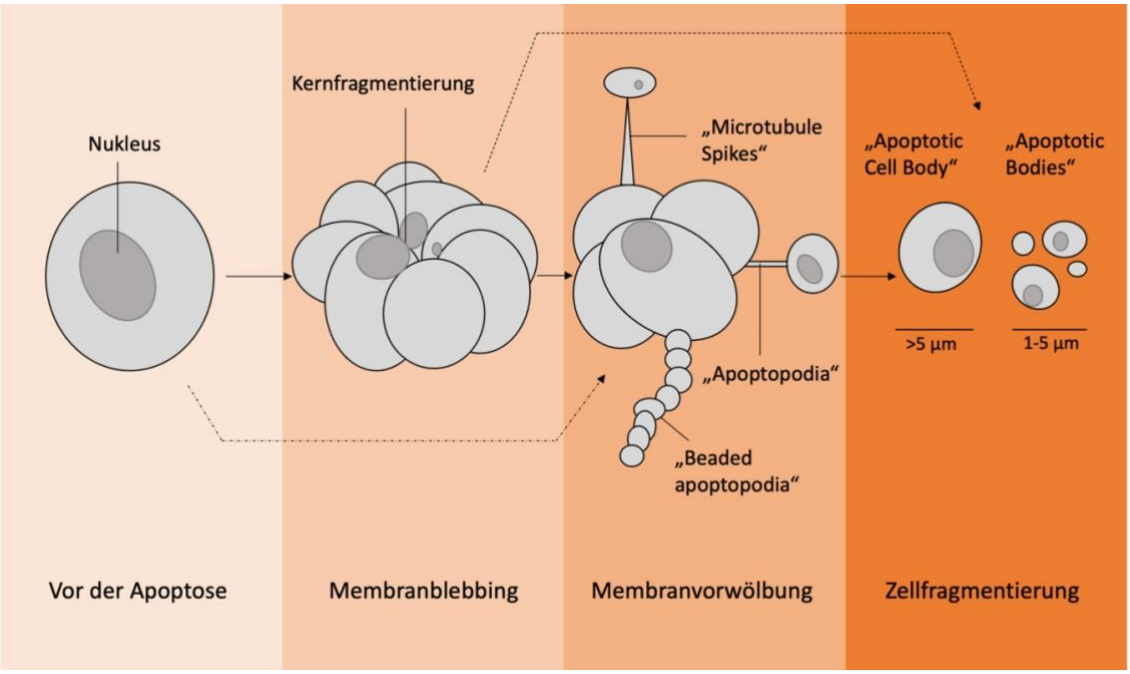

Abbildung 3: Formation der ApoBD. Modifiziert nach Atkin-Smith et al. [27]

Im Rahmen der Apoptose können verschiedene Schritte zur Bildung von ApoBD führen.

1.2.3. Klinische Relevanz der EV

In den letzten Jahren vermehrten sich die Studien zu den zirkulierenden EV, da sie bei diversen pathologischen Prozessen in erhöhter Konzentration nachgewiesen wurden und somit als diagnostische oder prognostische Marker etabliert werden könnten. Die EV wurden nicht nur im Blut festgestellt, sondern auch in anderen Körperflüssigkeiten wie Speichel und Urin nachgewiesen [39-41]. Da die EV den Inhalt der Ursprungszelle enthalten, könnte dies einen Einblick in den aktuellen Krankheitszustand zulassen [16]. Während genaue Rollen dieser EV noch nicht geklärt sind, gibt es beispielsweise im Bereich der Onkologie Hinweise, dass jene bei der Tumordissemination eine Rolle spielen[16]. Es wurde ein horizontaler Gentransfer beschrieben, wobei ApoBD mit

Onkogenen (h-ras and c-myc) von den p53-negativen-Zielzellen aufgenommen wurden und sich im Anschluss ein Verlust der Zellkontakthemmung gezeigt hat[42]. Ein besseres Verständnis dieser Mechanismen und Funktionen könnte dazu beitragen, EV als Biomarker oder Therapiemittel zu etablieren oder Therapiestrategien zu optimieren [43]. Auch in der kardiovaskulären Forschung zeigt sich das Potential die EV als Biomarker einzusetzen, beispielsweise um die vaskuläre Dysfunktion bei Patienten mit Myokardinfarkt einzuschätzen [44]. Auch im operativen Bereich werden die EV viel erforscht. Beispielsweise wurde in der Studie von Nakao et al. Patienten mit nichtalkoholischer Fettlebererkrankung, bei denen eine bariatrische Operation durchgeführt wurde, das Blut vor und nach dem Gewichtsverlust auf zirkulierende EV untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass mit dem Gewichtsverlust und Rückgang der nichtalkoholischen Fettlebererkrankung auch die EV rückläufig waren [45].

1.2.4. Die Rolle der zellspezifischen EV

Die genaue Rolle und der Wirkmechanismus der EV ist derzeit noch nicht geklärt, je nach Situation und Stimulation können sie entsprechende Auswirkungen haben. Im Folgenden werden die möglichen Rollen der zellspezifischen EV in Kürze dargestellt.

Die zirkulierenden EV, die von den Thrombozyten ausgehen, machen den größten Anteil im Blut aus [46]. Sie scheinen in vielen Prozessen eine wichtige Rolle zu spielen. Die Sekretion von thrombozytären EV wird u.a. durch Scherstress verursacht [47]. Diese EV haben prokoagulatorische Eigenschaften [47]. Ein operativer Eingriff scheint ein auslösender Faktor zu sein. Die Ergebnisse von Banz et al. zeigen, dass das Blut im Rahmen einer partiellen Leberresektion intra- und unmittelbar postoperativ in einem transienten Zustand einer Hyperkoagulabilität befindet, welche durch erhöhte Anzahl an zirkulierenden thrombozytären EV und prokoagulatorische Aktivität dieser EV sowie in der Thromboelastographie reflektiert wird [48]. In einer in-vivo Untersuchung von Lopez et al. wurden den Ratten, die einer unkontrollierten Blutung ausgesetzt wurden, thrombozytäre EV transfundiert, wobei man gegenüber der Kontrollgruppe ein besseres hämostatisches Ergebnis erzielt hatte [49].

Die Arbeitsgruppe von Dymicka-Piekarska et al. untersuchte den Zusammenhang zwischen Tumorprogression und den thrombozytären EV. Hierbei wurde die Anzahl der

zirkulierenden EV bei einer Kontrollgruppe sowie Patienten mit einem kolorektalen Karzinom verglichen. Es zeigte sich ein höherer Prozentsatz an thrombozytären EV bei erkrankten Patienten als bei der Kontrollgruppe. Auffällig war der noch höhere Anteil bei den erkrankten Patienten mit Lymphknotenmetastasen gegenüber den Patienten ohne Metastasierung [50].

Die thrombozytären EV sind ebenfalls in Zusammenhang mit der Immunmodulation beschrieben worden. Sie sind u.a. bei der Entstehung der Atherosklerose und Endothelschaden in inflammatorischen Erkrankungen beteiligt [51, 52]. Zudem wurde beschrieben, dass diese EV an der Aktivierung von Endothelzellen und Leukozyten involviert sind [52, 53].

Die leukozytären EV besitzen proinflammatorische Eigenschaften. Mesri et al. beschrieben, dass Erstere eine Zytokinausschüttung durch endotheliale Zellen induzieren können, die einen Teil der endothelialen Dysregulation ausmachen und zu vaskulären Schäden führen könnte [54]. Hinweise auf eine prokoagulatorische Eigenschaft wurden beschrieben u.a. wurde in einem Versuch mit Tiermodellen von Myers et al. gezeigt, dass die Anwesenheit von leukozytären EV mit einer verstärkten Thrombosebildung assoziiert sind [55].

Auch die erythrozytären EV wurden prokoagulatorischer Aktivität assoziiert, durch eine Aktivierung von Faktor XII wurde die Bildung von Thrombin verursacht [56]. In einer in-vitro Untersuchung wurde eine proinflammatorische Wirkung der EV gezeigt, Letzteres lösten eine M1-Polarisation der Makrophagen aus, wobei dadurch eine Zytokinausschüttung provoziert werden konnte [57].

1.2.5. Rolle der EV im Kontext der AS

Die EV wurden auch in diversen kardiovaskulären Erkrankungen festgestellt, der Nachweis von erhöhtem Gehalt im Blut war mit einer chronischen Entzündung, Endothelschädigung und Thrombosebildung assoziiert [58].

Auch bei Patienten mit AS wurden erhöhte Werte festgestellt. In der Studie von Diehl et al. wurden Patienten mit hochgradiger AS auf zirkulierende EV untersucht. Im Vergleich zur Kontrollgruppe, die ähnliche Vorerkrankungen aufweist und keine AS vorliegt, wurde

eine erhöhte Anzahl der Mikropartikel festgestellt, welche eine Korrelation mit valvulärem Scherstress zeigte[59]. Sie postulierten, dass die pathologische Hämodynamik der AS zu einer erhöhten Bildung von proinflammatorischen EV führt, die eine Endothelverletzung begünstigt und somit die Aortenklappen weiter stenosieren.

Während der perioperative Verlauf der EV- Anzahl im Rahmen einer AKE noch nicht beschrieben wurde, wurde der periinterventionelle Verlauf von EV in der Studie von Horn et. al. untersucht. Hier zeigte sich die Anzahl endothelialer EV drei Monate nach der TAVI rückläufig [60]. Ein ähnlicher Befund zeigte sich in der Studie von Jung et al., wobei postinterventionell ein Rückgang der endothelialen EV nachgewiesen wurde. Dies wurde als positive Auswirkungen auf die Homöostase der endothelialen Funktion gewertet[61].

1.2.6. Isolation und Quantifizierung der EV

Es gibt verschiedene Methoden zur Untersuchung der EV. Die Durchflusszytometrie gilt als eine der gängigsten Methoden [51]. In Kombination mit Antikörpern, die mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt sind, lässt sich mit dem genannten Verfahren die Morphologie, Partikelgranularität sowie Subpopulationen isolieren und untersuchen [62]. Mangels der offiziellen Standards hinsichtlich Isolation, Charakterisierung und Quantifizierung der EV ist ein Vergleich der Ergebnisse zwischen Studien erschwert [51].

1.3. Ziel der vorliegenden Studie

Die Veröffentlichungen der letzten Jahre zeigten eine Assoziation zwischen den EV und diversen Patholgien, auch in Verbindung mit kardiovaskulären Erkrankungen. In der oben genannten Literatur wird ein Zusammenhang zwischen der Aortenklappenstenose und einer steigenden Anzahl der proinflammatorischen EV infolge der erhöhten Scherkraft beschrieben, die zur Förderung der pathologischen Prozesse führen soll.

Bisher erfolgten keine Untersuchungen über den perioperativen Verlauf der EV bei Patienten mit AKE mit simultaner Bypassoperation. Ziel der vorliegenden Studie ist es, diesen Verlauf der thrombozytären, erythrozytären und leukozytären EV darzustellen, um zu untersuchen, ob ein operativer Klappenersatz zu einer Veränderung der EV-Anzahl führt.

Die AS wird wie oben bereits beschrieben mittels einer echokardiographischen Untersuchung diagnostiziert. Die leicht- und mittelgradigen AS bleiben oft asymptomatisch. Das Vorliegen einer AS wird häufig erst im fortgeschrittenen Stadium erkannt, wobei bei Erstdiagnose bereits irreversible Linksherzschäden vorhanden sein können. Mit Informationen über den Verlauf der Anzahl und Rolle der EV bei der AS besteht das Potential, die EV als Biomarker zu etablieren, welche eine frühzeitige Diagnose begünstigen könnten. Letzteres könnte dazu führen, dass man die Patienten regelmäßig echokardiographisch untersucht und eine operative Therapie einleitet, bevor schwerwiegende irreversible Herzschäden entstehen.

2. Material und Methode

2.1. Material

2.1.1. Verwendete Geräte

FACSVerse	BD Biosciences, US
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf AG, Hamburg DE

2.1.2. FACS-Antikörper

APC CD41 anti-human CD41 (clone HIP8, platelet marker)	Biolegend, San Diego, USA
PE anti-human CD235a (clone HI264, erythrocyte marker)	Biolegend, San Diego, USA
PerCP/Cy5.5 anti-human CD45 (clone HI30, leukocyte marker)	Biolegend, San Diego, USA
FITC anti-human CD66b (clone G10FS, granulocyte marker)	Biolegend, San Diego, USA
APC anti-human CD3 (clone UCHT1, lymphocyte marker)	Biolegend, San Diego, USA
FITC anti-human CD11b (clone ICRF44, monocyte marker)	Biolegend, San Diego, USA

2.1.3. Isotypen

FITC mouse IgM (RMM-1)	Biolegend, San Diego, USA
FITC mouse IgG1 (clone MOPC-21)	Biolegend, San Diego, USA
PE mouse IgG1 (clone RMG1-1)	Biolegend, San Diego, USA
PE mouse IgG2a (clone RMG2a-62)	Biolegend, San Diego, USA
APC mouse IgG1 (clone RMG1-1)	Biolegend, San Diego, USA

PerCP/Cy5.5 mouse IgG2a (clone MOPC-173)	Biolegend, San Diego, USA

2.1.4. Software

FlowJo V10 software	BD Biosciences, Europe

2.1.5. Sonstiges

Sterile Membranfilter	Fisher Scientific, ON, Canada
Kalibrierungsbeads	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

2.2. Methoden

2.2.1. Patientenkollektiv

Die Datenerhebung der prospektiven klinisch-experimentellen Studie begann im Juni 2015 und wurde im September 2016 abgeschlossen. Über diesen Zeitraum wurden insgesamt 204 Patienten mit hochgradiger AS eingeschlossen. Wir definierten primäre und sekundäre Ausschlusskriterien. Zu den primären Ausschlusskriterien gehörten: Höhergradiges Klappenvitium (>II°) anderer Klappen als der Aortenklappe, Z.n. Myokardinfarkt innerhalb der letzten 30 Tage, peripher arterielle Verschlusskrankheit (>Stadium IIb nach Fontaine) und schwere Einschränkung der linksventrikulären Funktion (Ejektionsfraktion < 30%). Zu den sekundären Ausschlusskriterien gehören aktive maligne Erkrankung, thromboembolische Ereignisse innerhalb der letzten sechs Monate, Autoimmunerkrankung, Entzündungsprozesse und Dialyse.

Zudem wurden Patienten, die nach Einschluss abweichend von der ursprünglich geplanten AKE und etwaige Bypass-OP einen anderweitigen Eingriff, z.B. an der Aorta erhalten haben, ausgeschlossen. Ebenfalls exkludiert wurden Patienten, die im Rahmen der AKE eine mechanische Herzklappenprothese erhalten haben.

In dieser Arbeit wurden nur Daten von Patienten einbezogen, die im Rahmen des operativen AKEs zusätzlich einen Bypass erhalten haben. Von allen Patienten erhielten wir die Einwilligung zur Studienteilnahme. Die Patienten wurden zu vier Zeitpunkten innerhalb eines Zeitraums von drei Monaten untersucht.

Tabelle 1: Untersuchungszeitpunkte

U1	Nach der stationären Aufnahme
U2	24h postoperativ
U3	7d postoperativ
U4	3m postoperativ

In diesem Zeitraum wurden Daten zur Operation, Laborparameter, Echokardiographien erhoben. Unvollständige klinische und echokardiographische Daten wurden von Daten von den jeweiligen behandelnden kardiologischen Praxen ergänzt.

2.2.2. Ethikvotum

Zur Durchführung der Studie erhielten wir von der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf die Genehmigung (Studiennummer 3881) und das Einverständnis der Patienten zur Verwendung der erhobenen Daten.

2.2.3. Echokardiographie

Prä- und postoperativ wurden echokardiographische Daten erhoben. Zu den Zeitpunkten U1, U3 und U4 wurden mittels GE Vivid S5 oder S6 transthorakale Echokardiographien nach aktuellen Leitlinien der European Society of Cardiology durch Fachärzte der Abteilung für Herzchirurgie, UKD durchgeführt.

2.2.4. Blutprobenentnahme

Zur Untersuchung der MP wurden den Patienten Blut abgenommen. Um die Veränderung der Anzahl im Verlauf beobachten zu können, wurden insgesamt an vier Zeitpunkten (U1-U4) Blut abgenommen. Unsere Arbeitsgruppe verwendete eine festgelegte Abnahmetechnik, um Proben vergleichen zu können, die bei möglichst identischen Bedingungen gewonnen wurden.

Nach Anlegen der Staubinde am Oberarm des Patienten wurde 20s lang gestaut. Ein Butterfly mit der Nadelgröße 21G wurde in die Vene eingeführt. Anschließend wurde die Staubinde gelöst und nach 30s wieder angelegt. Nach dem Abwarten von weiteren 10s wurden die Probenröhrchen mit Blut befüllt, wobei die ersten 2ml Blut verworfen wurden. Zum Schluss wurde die Staubinde gelöst.

Die Probenentnahme (U2), die nach der Operation erfolgte, wurde über eine Schleuse abgenommen. Hier wurden zunächst 10ml Blut aspiriert und verworfen. Dabei durfte das Blut nicht über den Kanal entnommen werden, welcher Heparin in den Blutkreislauf des Patienten überführte. Daraufhin wurden die Blutröhrchen gefüllt.

2.2.5. Isolation der EV

Die EDTA-Röhrchen mit Vollblut wurden nach Entnahme bei 1700 x g für 15min bei 4 °C zentrifugiert. Der entstandene Überstand mit plate-rich-plasma wird nochmals bei 3000 x g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Nun wurde das resultierende platelet-poor-plasma aus einem Mikroreaktionsgefäß auf jeweils zwei Mikroreaktionsgefäßen mit je ca. 500 µl verteilt und das Pellet wurde verworfen. Es erfolgte erneut eine Zentrifugation der Reaktionsgefäße bei 20 000 x g für 30 min bei 4 °C. Es resultierte eine Absenkung von Partikeln, die eine Größe von 500 nm überschritten. Schließlich wurde die Isolation der EV mit der Extraktion des Überstands exklusive des 50 µl Restüberstands und die Pellets abgeschlossen. Anschließend wurden die Proben zur weiteren Bearbeitung auf Eis gelagert oder für spätere Verwendungen bei –80 °C eingefroren.

2.2.6. Quantifizierung mittels Durchflusszytometrie

2.2.6.1. Prinzip

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, das Informationen über quantitative und strukturelle Eigenschaften von Partikeln ermittelt. In der Messkammer oder Flusszelle werden die zu untersuchenden Partikeln mithilfe eines Flüssigkeitsmantels in einen Zellstrom gebündelt, sodass in Folge jeweils eine Zelle vom Laser erfasst wird. Anhand der entstehenden Vorwärts- und Seitwärtslichtstreuungen (Foward Scatter FSC und Side Scatter SSC), die von Sensoren erfasst werden, werden die Größe und die Komplexität der Zelle bestimmt. Vereinfacht gilt, je größer das FSC ist, desto größer ist die Zelle. Ähnliches gilt für SSC, das sich proportional zu der Granularität des Zytoplasmas verhält. Die fluoreszenzgestützte Analyse (Fluorescence activated cell sorting, FACS) ist eine erweiterte Form der Durchflusszytometrie, wobei bestimmte Merkmale der Zellen z.B. Antigene oder Rezeptoren, direkt oder indirekt mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert werden. Durch das Auftreffen von Laserstrahlen werden diese Farbstoffe angeregt Photonen zu emittieren. Mittels der entstehenden Signalstärke der Helligkeit erkennt man die Anzahl der markierten Strukturen.

In unserem Experiment wurde dieses Verfahren verwendet, um diverse Oberflächenproteine von EV zu markieren und zu detektieren. Denn es macht neben der

quantitativen Bestimmung ebenso eine Darstellung der Subpopulationen möglich.

2.2.7. Markierung der EV

Zur Färbung der EV wurden verschiedene Antikörper mit gekoppeltem Fluoreszenzfarbstoff in die bereits genannten Proben pipettiert und mit 50 µl PBS-Lösung vermischt. Im Anschluss erfolgte eine 30-minütige Inkubation unter lichtgeschützten Bedingungen. Von den Färbungen, die in der Tabelle 2 dargestellt werden, wurden jeweils 2,5 µl verwendet.

Tabelle 2: Antikörper zu den jeweiligen CDs

Oberflächenantigene	**Fluorochrom Antikörper**
CD41	APC
CD66b	FITC
CD235a	PE
CD3	APC
CD11b	FITC
CD45	Pe/Cy7

Tabelle 3: Oberflächenantigene

CD3	Lymphozyten
CD11b	Leukozyten (Neutrophile, Monozyt, T-Zelle, Granulozyt, Makrophagen)
CD41	Thrombozyten
CD45	Lymphozyten
CD66b	Leukozyten (Neutrophile)
CD235a	Erythrozyten

2.2.8. Messung

In der weiteren Vorbereitung wurden die Proben mit 250 µl BD Lyse Lösung (1x) verdünnt. Alle bisher verwendeten Lösungen wurden mit einer 0.1 µm-Filtermembran dreimal sterilfiltriert.

Die Quantifizierung erfolgte mittels fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie und BD FACSDiva^{TM} Software. Es wurden mindestens 1.000.000 Events pro Probe gemessen.

Die gewonnenen Daten wurden mittels FlowJo V10 Software analysiert. Zur Definierung der Gating-Fenster wurden größenkalibrierte Beads der Größe 0,5 µm, 1 µm und 2 µm verwendet. Die Grenze zur Identifizierung der MP wurde als 0,5 µm bis 1 µm festgelegt, wobei die ApoBD-Grenze bei 1 µm bis 2 µm lag.

2.2.9. Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mittels GraphPad Prism Software 6. Zur Verlaufsdarstellung der MP und ApoBD wurden scatter plots verwendet, die statistische Analyse wurde mittels one-way ANOVA mit Tukey Test durchgeführt.

Signifikante Ergebnisse wurden je nach p-Wert mit *(< 0,05), **(< 0,01), ***(< 0,001) oder **** (<0,0001) markiert.

3. Ergebnis

3.1. Data collection

3.1.1. Patientenselektion

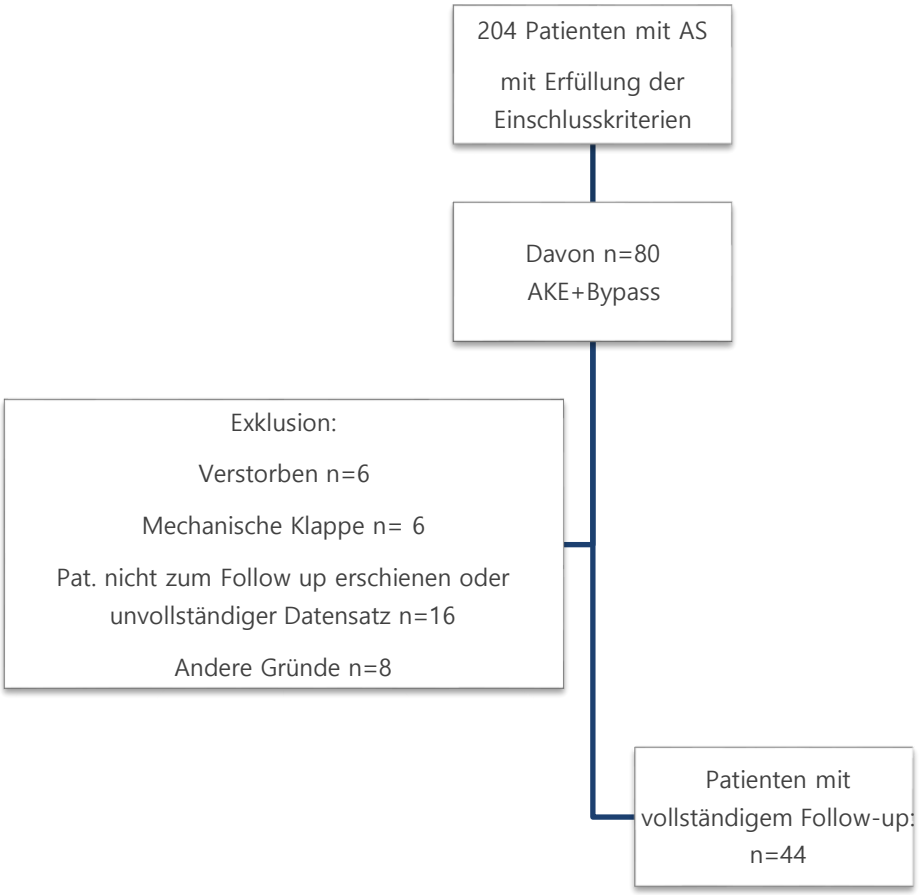

Abbildung 4: Patientenselektion

Über den Zeitraum von Juni 2015 bis September 2016 wurden insgesamt 204 Patienten mit AS nach Berücksichtigung der primären und sekundären Ausschlusskriterien in die Studie eingeschlossen. Davon haben 80 Patienten einen operativen AKE mit simultaner Bypassoperation erhalten. Im Nachhinein wurden sechs Patienten aufgrund des Einsatzes einer mechanischen Klappe ausgeschlossen. Von eingeschlossenen Patienten sind sechs Personen verstorben. Weitere Daten von 16 Patienten wurden aufgrund von unvollständigem Datensatz nicht zur Auswertung berücksichtigt. Acht Patienten wurden aus sonstigen Gründen ausgeschlossen. Letztendlich wurden Daten von n=44 ausgewertet.

3.1.2. Baseline-Daten der Studienkohorte

Die klinischen Daten der Studienkohorte sind in der Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 4: Baseline-Daten

	Mittelwert ± SD oder n (%)
Alter (Jahre)	73,8 ± 6,3
Männlich	32 (73)
BMI (kg/m^2)	28,0 ± 4,6
NYHA Klassifikation	
I	3 (7)
II	13 (30)
III	25 (57)
IV	3 (7)
Kardiale Dekompensation	5(11)
Synkope	2 (5)
Hämorrhagie	0 (0)
KHK	43 (98)
Arterielle Hypertonie	39 (89)
Pulmonale Hypertension	9 (20)
Diabetes mellitus Typ 2	13 (30)
Herzrhythmusstörung	13 (30)
Dyslipidämie	21 (48)
Lebererkrankung	2 (5)
Lungenerkrankung	6 (14)
GFR	
< 30 mL/min	0 (0)
30 – 60 mL/min	15 (33)
> 60 mL/min	30 (67)
STS PROM Score	1,98 ± 0,71
ES II	3,28 ± 2

In dieser Studie betrug das durchschnittliche Alter 73,8 ± 6,3 Jahre und 73% der Patienten waren männlich. Die häufigsten Vorerkrankung waren KHK, arterielle Hypertonie und Dyslipidämie.

3.1.3. Echokardiographische Daten

Zu drei Zeitpunkten U1, U3 und U4 wurden echokardiographische Daten erhoben.

Tabelle 5: Echokardiographische Parameter im Verlauf

	U1	U3	U4
EF [%]	56,7 ± 8,6	57,0 ± 6,9	58,5 ± 7,7
LVEDD [mm]	49,0 ± 4,7	48,6 ± 4,4	49,4 ± 4,0
LVESD [mm]	34,0 ± 6,9	34,1 ± 5,8	32,5 ± 6,9
EDD Septum [mm]	13,5 ± 1,5	13,0 ± 2,2	12,9 ± 1,2
EDD Vorderwand [mm]	11,6 ± 1,2	11,1 ± 1,5	10,9 ± 1,1
EDD Hinterwand [mm]	10,9 ± 1,0	10,7 ± 1,4	10,4 ± 0,9
EOA [qcm]	0,8 ± 0,2	2,0 ± 0,3	1,9 ± 0,2
maximaler Gradient [mmHg]	61,6 ± 16,8	17,2 ± 6,2	17,7 ± 6,0
mittlerer Gradient [mmHg]	36,1 ± 10,5	9,7 ± 3,0	9,4 ± 3,2
Vmax [m/s]	3,9 ± 0,6	2,0 ± 0,4	2,1 ± 0,3
Scherstress (Vmax/EF)	0,07 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,02

Tabelle 6: P-Werte zu den echokardiographischen Datenverläufen

	U1 zu U3	U1 zu U4	U3 zu U4
EF [%]	0,84	0,15	0,11
LVEDD [mm]	0,62	0,79	0,41
LVESD [mm]	0,98	0,22	0,1
EDD Septum [mm]	0,26	0,14	0,94
EDD Vorderwand [mm]	**0,05**	**0,003**	0,64
EDD Hinterwand [mm]	0,44	**0,01**	0,43
EOA [qcm]	**0,002**	**0,004**	0,21
maximaler Gradient [mmHg]	**< 0,0001**	**< 0,0001**	0,85
mittlerer Gradient [mmHg]	**< 0,0001**	**< 0,0001**	0,9
Vmax [m/s]	**< 0,0001**	**< 0,0001**	0,8
Scherstress (Vmax/EF)	**< 0,0001**	**< 0,0001**	1,0

Wie erwartet, zeigt sich nach dem operativen Klappenersatz eine signifikante Zunahme der effektiven Öffnungsfläche sowie Abnahme der maximalen Gradienten, mittleren Gradienten, maximalen Flussgeschwindigkeit und des Scherstresses.

3.2. Verlauf der EV

3.2.1. Verlauf der blutzellenabstammenden EV

In der Abbildung ist der Verlauf der blutzellenabstammenden EV der Größen 100nm-1000nm über drei Monate dargestellt.

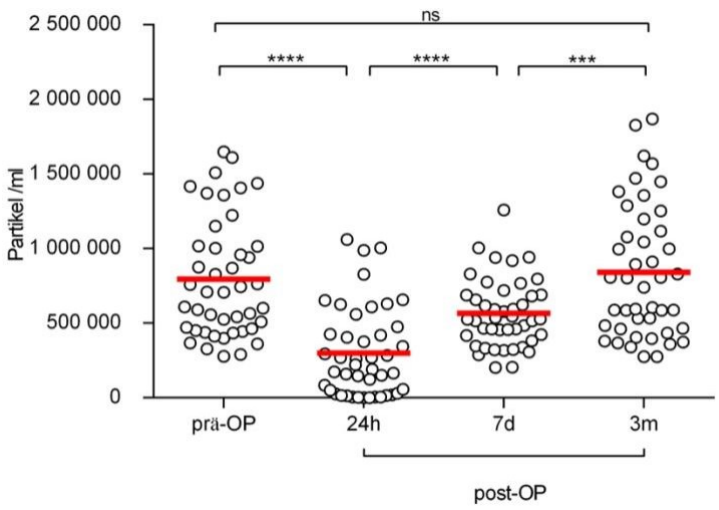

Abbildung 5: Verlauf der EV der Größe 100nm-1000nm

Die x-Achse bildet den zeitlichen Verlauf ab, hierbei sind vier Zeitpunkte abgebildet, die jeweils den präoperativen sowie 24h, 7d und 3m postoperative Zeitpunkte repräsentieren. Die y-Achse stellt die durchschnittliche Anzahl an MP pro 1ml Plasma dar.

Es ist ein deutliche Rückläufigkeit der MP-Anzahl 24h nach dem operativen Eingriff zu erkennen (p=< 0.0001). In der Phase zwischen dem ersten und dem siebten postoperativen Tag lässt sich eine Erholung der Anzahl beobachten (p=<0.0001). Im Zeitraum vom siebten Tag bis drei Monate nach der Operation ist eine weitere Zunahme der MP zu erkennen (p=0.0002). Insgesamt ist der Verlauf nach initialem postoperativem Rückgang mit einer Zunahme gekennzeichnet, sodass die durchschnittliche Anzahl nach drei Monaten das präoperative Level übersteigt (p= 0.9144).

In der folgenden Abbildung ist der Verlauf der gesamten ApoBDs der Größe 1000nm-2000nm über drei Monate dargestellt.

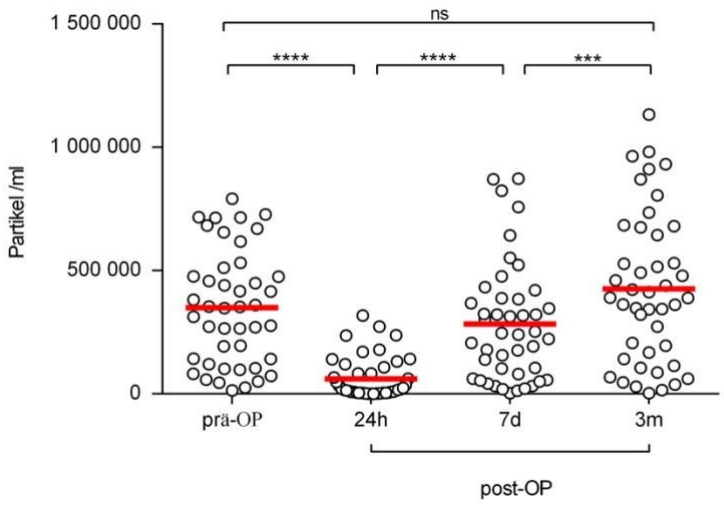

Abbildung 6: Verlauf der EV der Größe 1000nm-2000nm

Die x-Achse bildet den zeitlichen Verlauf ab, hierbei sind vier Zeitpunkte abgebildet, die jeweils den präoperativen sowie 24h, 7d und 3m postoperative Zeitpunkte repräsentieren. Die y-Achse stellt die durchschnittliche Anzahl an ApoBD pro 1ml Plasma dar.

Die durchschnittliche Anzahl der ApoBDs sank bis zum Zeitpunkt 24h-postoperativ signifikant ab (p=< 0.0001). Zum siebten Tagen zeigte sich ein positiver Trend (p= < 0.0001). Dieser Trend setzt sich vom siebten Tag bis zum dritten Monat nach der Operation weiter fort (p=0.0009). Nach drei Monaten zeigte sich eine höhere durchschnittliche Anzahl im Vergleich zum Ausgangspunkt, der postoperative Anstieg zwischen den Zeitpunkten prä-OP und 3m ist jedoch nicht signifikant (p=0.0898).

Im Vergleich der beiden Verläufe zeigte sich eine größere Anzahl zu Gunsten der MPs.

3.2.2. Verlauf der thrombozytären EV

In dieser Abbildung ist der Verlauf der thrombozytären MP mit dem Oberflächenmarker CD41 zu erkennen. Es sind MP der Größe 100nm-1000nm dargestellt.

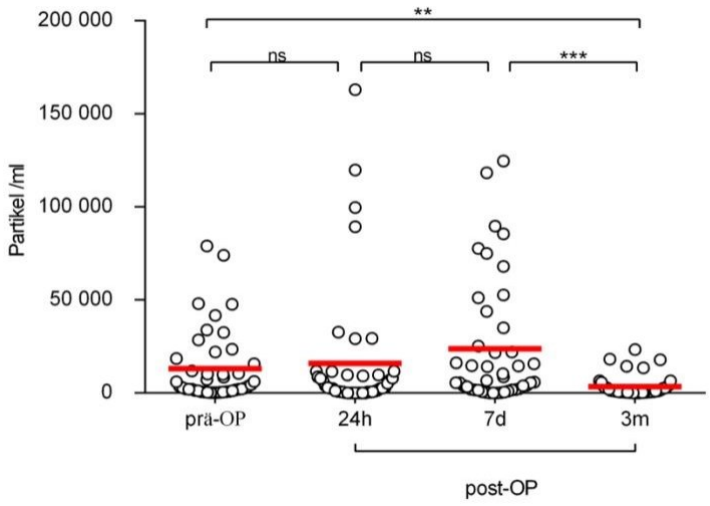

Abbildung 7: Verlauf der thrombozytären MP

Die x-Achse bildet den zeitlichen Verlauf ab, hierbei sind vier Zeitpunkte abgebildet, die jeweils den präoperativen sowie 24h, 7d und 3m postoperative Zeitpunkte repräsentieren. Die y-Achse stellt die durchschnittliche Anzahl an MP pro 1ml Plasma dar.

Im postoperativen Verlauf zeigte sich eine Zunahme der thrombozytären MP, die bis zum siebten Tag anhielt. Die positiven Trends vom präoperativen Zeitpunkt bis zum ersten postoperativen Tag sowie vom ersten postoperativen bis zum siebten postoperativen Tag waren jeweils nicht signifikant.

Die durchschnittliche Anzahl nahm im Zeitraum vom siebten Tag bis drei Monate nach OP signifikant ab (p= 0.0008). Es zeigte sich nach initialem Anstieg ein deutlicher Rückgang der MPs im Zeitraum vom präoperativen Zeitpunkt bis drei Monate nach OP, der präoperative Wert wurde am Ende signifikant unterschritten (p= 0.0044).

In dieser Abbildung ist der Verlauf der thrombozytären ApoBD mit dem Oberflächenmarker CD41 zu erkennen. Es sind Partikel mit der Größe 1000-2000nm dargestellt.

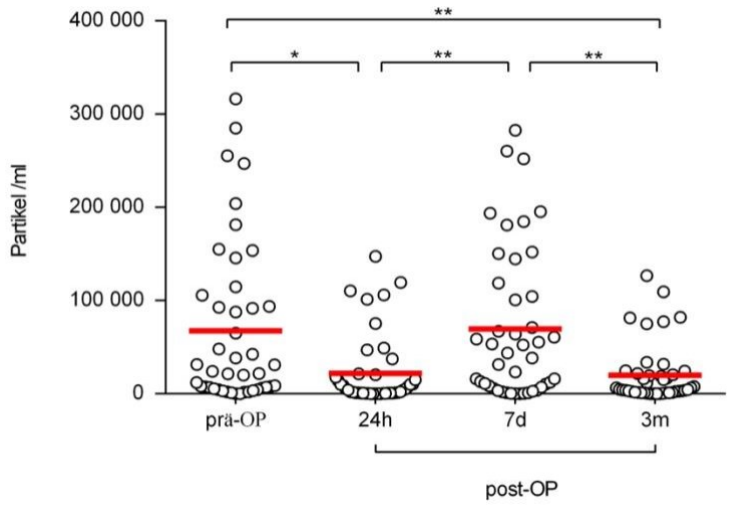

Abbildung 8: Verlauf der thrombozytären ApoBD

Die x-Achse bildet den zeitlichen Verlauf ab, hierbei sind vier Zeitpunkte abgebildet, die jeweils den präoperativen sowie 24h, 7d und 3m postoperative Zeitpunkte repräsentieren. Die y-Achse stellt die durchschnittliche Anzahl an ApoBD pro 1ml Plasma dar.

Zwischen den Zeitpunkten prä-OP und 24h postoperativ zeigte sich eine signifikante Rückläufigkeit der ApoBD- Anzahl (p= 0.0270). Im Zeitraum 24h bis 7d ist ein Anstieg zu beobachten (p= 0.0016). Anschließend folgte eine erneute Abnahme zwischen den Zeitpunkten 7d und 3m (p= 0.0020). Es zeigte sich ein abnehmender Trend zwischen den Zeitpunkten prä-OP und 3m (p= 0.0032). Der Wert vom dritten postoperativen Monat war kleiner als der präoperative Wert.

3.2.3. Verlauf der erythrozytären EV

In den folgenden Abbildungen ist der Verlauf der erythrozytären MP mit dem Oberflächenmarker CD235a der Größen 100nm-1000nm über drei Monate dargestellt.

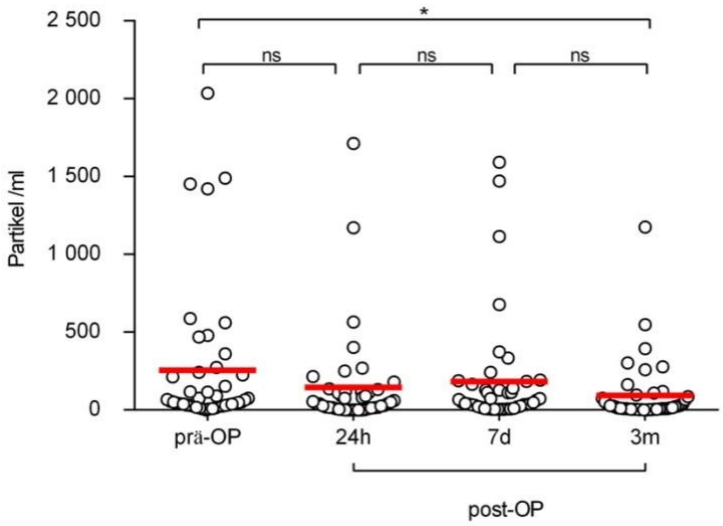

Abbildung 9: Verlauf der erythrozytären MP

Die x-Achse bildet den zeitlichen Verlauf ab, hierbei sind vier Zeitpunkte abgebildet, die jeweils den präoperativen sowie 24h, 7d und 3m postoperative Zeitpunkte repräsentieren. Die y-Achse stellt die durchschnittliche Anzahl an MP pro 1ml Plasma dar.

Die durchschnittliche MP-Anzahl sank 24h nach dem operativen Eingriff ab (p= 0.3773). Im Zeitraum bis zum siebten postoperativen Tag stieg diese Anzahl diskret an (p=0.9037). Zwischen dem siebten Tag und dritten Monat nach der Operation sank die Anzahl ab (p=0.4303), sodass das durchschnittliche Level den präoperativen Wert signifikant unterschritt (p= 0.0319).

In dieser Abbildung ist der Verlauf der erythrozytären ApoBD mit dem Oberflächenmarker CD235a der Größen 1000-2000nm über drei Monate dargestellt.

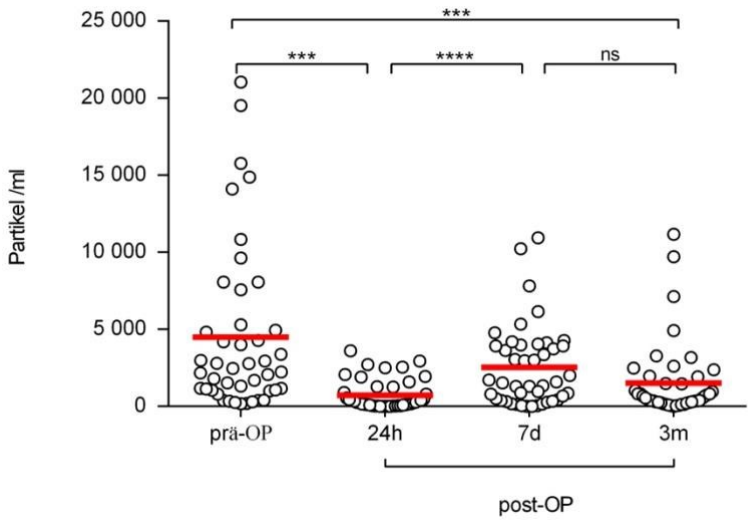

Abbildung 10: Verlauf der erythrozytären ApoBD

Die x-Achse bildet den zeitlichen Verlauf ab, hierbei sind vier Zeitpunkte abgebildet, die jeweils den präoperativen sowie 24h, 7d und 3m postoperative Zeitpunkte repräsentieren. Die y-Achse stellt die durchschnittliche Anzahl an ApoBD pro 1ml Plasma dar.

Am ersten postoperativen Tag ist eine signifikante Rückläufigkeit der durchschnittlichen Anzahl der ApoBDs zu erkennen (p=0.0002). Im Anschluss zeigte sich bis zum siebten postoperativen Tag ein signifikantes Wachstum der ApoBD-Anzahl (p=<0.0001). Im Zeitraum vom 7d und 3m kam es zu einer Abnahme der ApoBD-Anzahl. Die Anzahl an Partikeln war nach drei Monaten signifikant niedriger als der initiale Wert (p= 0.0006).

3.2.4. Verlauf der leukozytären EV

In den folgenden Abbildungen ist der Verlauf der leukozytären MP mit dem Oberflächenmarker CD45 der Größen 100nm-1000nm über drei Monate dargestellt.

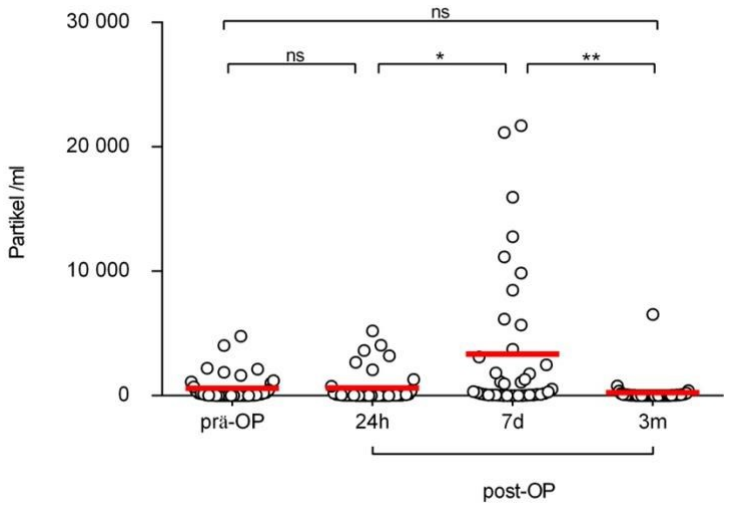

Abbildung 11: Verlauf der leukozytären MP

Die x-Achse bildet den zeitlichen Verlauf ab, hierbei sind vier Zeitpunkte abgebildet, die jeweils den präoperativen sowie 24h, 7d und 3m postoperative Zeitpunkte repräsentieren. Die y-Achse stellt die durchschnittliche Anzahl an MP pro 1ml Plasma dar

Am ersten postoperativen Tag zeigte sich im Vergleich zum präoperativen Wert eine Erhöhung des MP-Anzahls (p=0.9956). Dieser Trend setzte sich bis zum siebten postoperativen Tag fort (p=0.0241). Vom letzteren Zeitpunkt bis drei Monate postoperativ sank die Anzahl der Mikropartikel signifikant unter dem durchschnittlichen Ausgangswert.

In dieser Abbildung ist der Verlauf der leukozytären ApoBD mit dem Oberflächenmarker CD45 der Größen 1000-2000nm über drei Monate dargestellt.

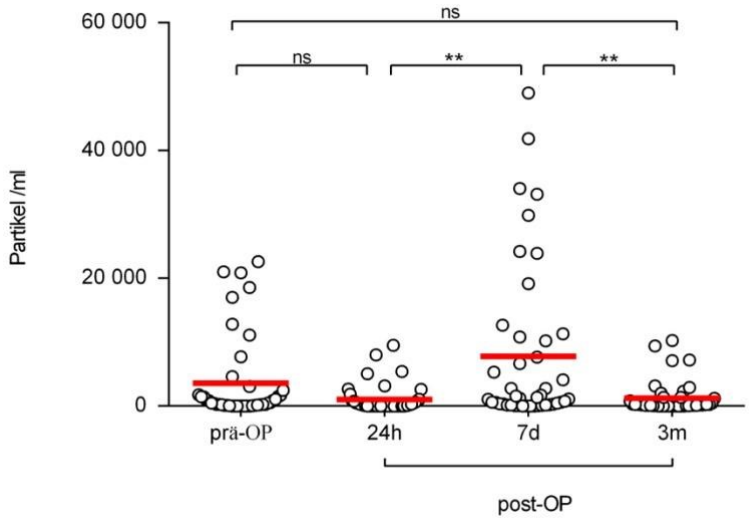

Abbildung 12: Verlauf der leukozytären ApoBD

Die x-Achse bildet den zeitlichen Verlauf ab, hierbei sind vier Zeitpunkte abgebildet, die jeweils den präoperativen sowie 24h, 7d und 3m postoperative Zeitpunkte repräsentieren. Die y-Achse stellt die durchschnittliche Anzahl an ApoBD pro 1ml Plasma dar.

Im Vergleich zum präoperativen Wert war die durchschnittliche Partikelanzahl bei 24h geringer (p=0.0727). Zum Zeitpunkt 7d zeigte sich ein signifikanter Anstieg der o.g. Partikelanzahl (p=0.0057). Im Zeitraum vom 7d bis 3m fand sich eine signifikante Rückläufigkeit der ApoBD. Insgesamt zeigte sich im präoperativen bis 3m postoperativen Zeitintervall eine sinkende Tendenz der durchschnittlichen ApoBD-Anzahl, sodass zum Zeitpunkt 3m eine geringere Anzahl im Vergleich zum initialen Wert gemessen wurde (p=0.9959).

3.2.5. Verlauf der granulozytären EV

In den folgenden Abbildungen ist der Verlauf der granulozytären MP mit dem Oberflächenmarker CD66b der Größen 100nm-1000nm über drei Monate dargestellt.

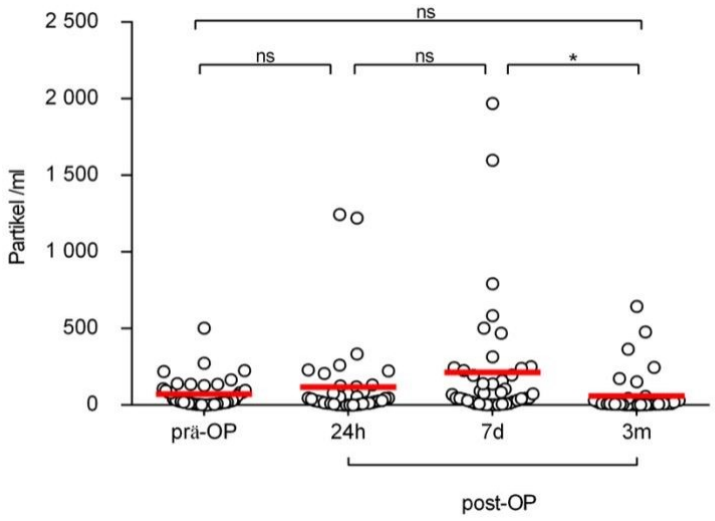

Abbildung 13: Verlauf der granulozytären MP

Die x-Achse bildet den zeitlichen Verlauf ab, hierbei sind vier Zeitpunkte abgebildet, die jeweils den präoperativen sowie 24h, 7d und 3m postoperative Zeitpunkte repräsentieren. Die y-Achse stellt die durchschnittliche Anzahl an MP pro 1ml Plasma dar.

Zum Zeitpunkt 24h postoperativ zeigte sich der durchschnittliche Partikelwert im Vergleich zum präoperativen Wert minimal erhöht (p=0.8395). Der positive Trend setzte sich bis zum siebten postoperativen Tag fort (p=0.3092). Zum Zeitpunkt 3m-postoperativ zeigte sich in Bezug auf den vorherigen Wert eine signifikante Abnahme der durchschnittlichen Partikelanzahl (p= 0.0297). Insgesamt waren die Werte an den 24h- und 7d- postoperativen Zeitpunkten größer im Vergleich zum präoperativen Wert, die MP-Anzahl zum Zeitpunkt 3m war kleiner als der Ausgangswert (p=0.9959).

In dieser Abbildung ist der Verlauf der granulozytären ApoBD mit dem Oberflächenmarker CD66b der Größen 1000-2000nm über drei Monate dargestellt.

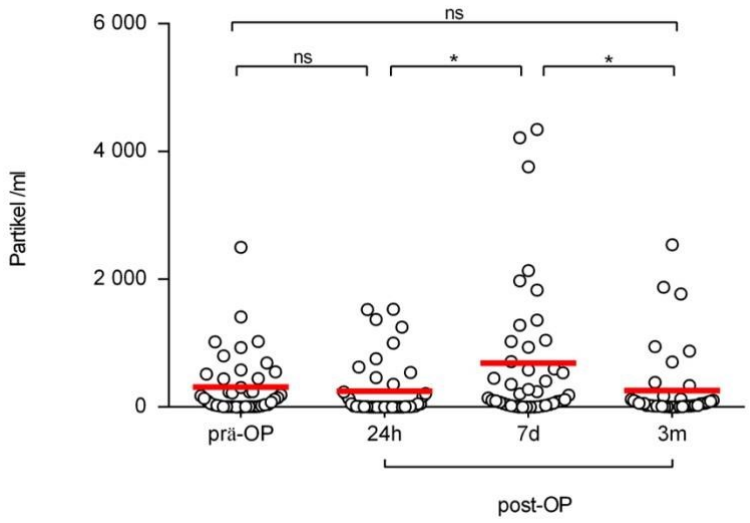

Abbildung 14: Verlauf der granulozytären ApoBD

Die x-Achse bildet den zeitlichen Verlauf ab, hierbei sind vier Zeitpunkte abgebildet, die jeweils den präoperativen sowie 24h, 7d und 3m postoperative Zeitpunkte repräsentieren. Die y-Achse stellt die durchschnittliche Anzahl an ApoBD pro 1ml Plasma dar.

Die durchschnittliche ApoBD-Anzahl war zum Zeitpunkt 24h geringer als der Ausgangswert (p=0.9733). Zum Zeitpunkt 7d übertraf die Anzahl den zeitlich vorherigen Wert signifikant (p=0.0216). Der ApoBD-Gehalt war im dritten postoperativen Monat geringer im Vergleich zum Ausgangswert (p=0.9807). Insgesamt zeigt sich über die drei Monate eine negative Entwicklungstendenz, am siebten postoperativen Tag war die durchschnittliche Anzahl größer als der Ausgangswert (p=0.0679).

3.2.6. Verlauf der lymphozytären EV

In den folgenden Abbildungen ist der Verlauf der lymphozytären MP mit dem Oberflächenmarker CD3 der Größen 100nm-1000nm über drei Monate dargestellt.

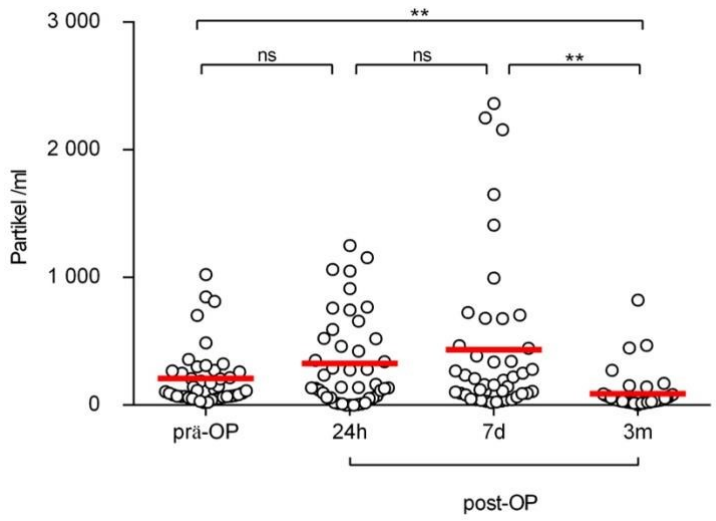

Abbildung 15: Verlauf der lymphozytären MP

Die x-Achse bildet den zeitlichen Verlauf ab, hierbei sind vier Zeitpunkte abgebildet, die jeweils den präoperativen sowie 24h, 7d und 3m postoperative Zeitpunkte repräsentieren. Die y-Achse stellt die durchschnittliche Anzahl an MP pro 1ml Plasma dar.

Die durchschnittliche Anzahl der EV stieg vom präoperativen Zeitpunkt bis sieben Tage nach der Operation stetig an. Vom siebten postoperativen Tag bis drei Monate postoperativ sank der durchschnittliche Wert signifikant. Insgesamt war die durchschnittliche Anzahl über die drei Monate signifikant rückläufig.

In dieser Abbildung ist der Verlauf der lymphozytären ApoBD mit dem Oberflächenmarker CD3 der Größen 1000-2000nm über drei Monate dargestellt.

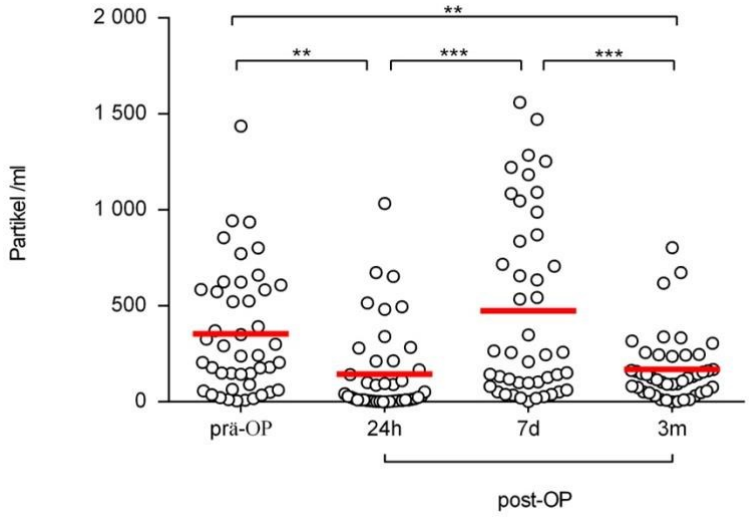

Abbildung 16: Verlauf der lymphozytären ApoBD

Die x-Achse bildet den zeitlichen Verlauf ab, hierbei sind vier Zeitpunkte abgebildet, die jeweils den präoperativen sowie 24h, 7d und 3m postoperative Zeitpunkte repräsentieren. Die y-Achse stellt die durchschnittliche Anzahl an ApoBD pro 1ml Plasma dar.

Vom präoperativen Zeitpunkt bis zum ersten postoperativen Tag war die durchschnittliche Anzahl der ApoBD signifikant rückläufig. Im Anschluss stieg diese Anzahl im Zeitraum vom ersten bis zum siebten postoperativen Tag signifikant. Drei Monate nach der Operation sank die Anzahl erneut. Die durchschnittliche Anzahl der ApoBD war zum Zeitpunkt drei Monate postoperativ signifikant geringer als der durchschnittliche Ausgangswert.

3.2.7. Verlauf der monozytären EV

In den folgenden Abbildungen ist der Verlauf der monozytären MP mit dem Oberflächenmarker CD11b der Größen 100nm-1000nm über drei Monate dargestellt.

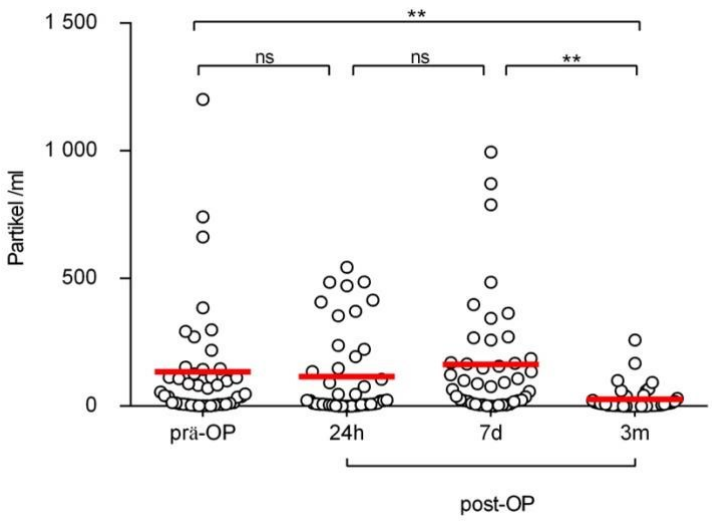

Abbildung 17: Verlauf der monozytären MP

Die x-Achse bildet den zeitlichen Verlauf ab, hierbei sind vier Zeitpunkte abgebildet, die jeweils den präoperativen sowie 24h, 7d und 3m postoperative Zeitpunkte repräsentieren. Die y-Achse stellt die durchschnittliche Anzahl an MP pro 1ml Plasma dar.

Der durchschnittliche Wert am ersten postoperativen Tag ist minimal geringer als der Ausgangswert. Am ersten bis zum siebten postoperativen Tag stieg die Anzahl wenig an. Im Zeitraum vom siebten postoperativen Tag bis zum dritten postoperativen Monat war die durchschnittliche Anzahl an MPs rückläufig. Die durchschnittliche Anzahl an MP am dritten postoperativen Monat war signifikant größer als der Ausgangswert.

In dieser Abbildung ist der Verlauf der monozytären ApoBD mit dem Oberflächenmarker CD11 der Größen 1000-2000nm über drei Monate dargestellt.

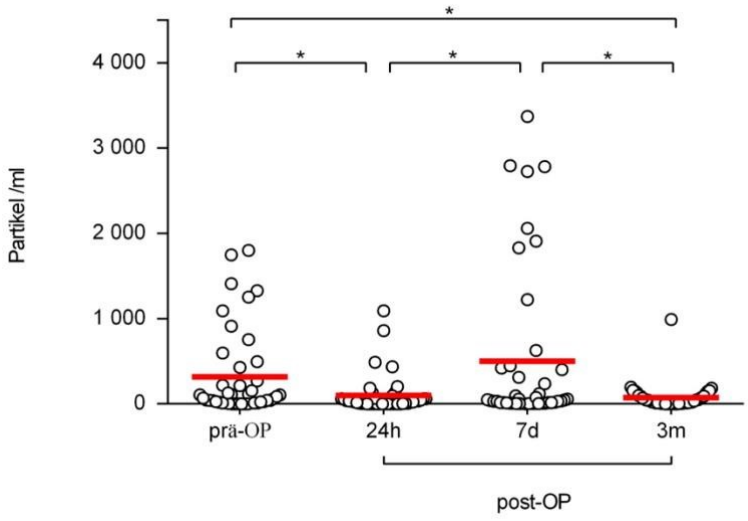

Abbildung 18: Verlauf der monozytären ApoBD

Die x-Achse bildet den zeitlichen Verlauf ab, hierbei sind vier Zeitpunkte abgebildet, die jeweils den präoperativen sowie 24h, 7d und 3m postoperative Zeitpunkte repräsentieren. Die y-Achse stellt die durchschnittliche Anzahl an ApoBD pro 1ml Plasma dar.

Am ersten postoperativen Tag war die durchschnittliche Anzahl an ApoBD geringer als der Ausgangswert. Die durchschnittliche Anzahl war am siebten postoperativen Tag signifikant größer als am ersten postoperativen Tag. Im Zeitraum vom siebten postoperativen Tag bis zum dritten postoperativen Monat sank die durchschnittliche Anzahl signifikant. Die durchschnittliche Anzahl drei Monate nach der Operation war ebenfalls signifikant kleiner als der Ausgangswert.

3.2.8. Relation Scherkraft und Anzahl der EV

Tabelle 7: Relation zwischen Scherkraft und EV-Anzahl

MP	p-Wert	r	R^2	ApoBD	p-Wert	r	R^2
Gesamt	0,6512	-0,07276	0,005294	Gesamt	0,8355	0,03223	0,001039
CD41+	0,7147	-0,0567	0,003215	CD41+	0,3122	-0,1559	0,02431
CD235+	0,9249	-0,01463	0,0002139	CD235+	0,401	-0,1298	0,01685
CD45+	0,9379	0,01239	0,0001536	CD45+	0,822	-0,03491	0,001219
CD3+	0,1428	-0,2245	0,05042	CD3+	0,2502	-0,1771	0,03136
CD66+	0,8137	-0,03702	0,00137	CD66+	0,0547	-0,2951	0,08709
CD11b+	0,7725	0,04485	0,002012	CD11b+	0,708	-0,05808	0,003373

In dieser Tabelle ist die transvalvuläre Scherkraft (V_{max}/ EF) mit der Anzahl der EV zum Zeitpunkt U1 in Verhältnis gesetzt.

Wir haben die Scherkraft und die Anzahl der EV in Verhältnis gesetzt, um darzustellen, ob die Scherkraft, die bei der Aortenklappenstenose erhöht ist, diese Anzahl beeinflusst. Zum Zeitpunkt U1 zeigt sich kein statistisch signifikanter Unterschied in der Relation zwischen der Scherkraft und der EV-Anzahl.

4. Diskussion

4.1.1. Zirkulierende MP und ApoBD bei Patienten mit AKE und Bypassoperation

In den letzten Jahrzehnten nahm das Interesse an EV aufgrund ihrer möglichen Beteiligung an diversen Pathophysiologien und somit potenziellen Einsatzmöglichkeiten als Diagnostik- und Therapiemittel zu. Nicht nur im kardiovaskulären Bereich, sondern auch in anderen Bereichen zeigen sich interessante Entwicklungen.

In einer Studie von Diehl et al. wurden Patienten mit hochgradiger AS auf zirkulierende MP untersucht. Im Vergleich zur Kontrollgruppe, die ähnliche Vorerkrankungen aufweist und keine AS vorliegt, wurde eine erhöhte Anzahl der MP festgestellt, welche eine Korrelation mit valvulärem Scherstress zeigte.

Soweit beurteilbar gibt es bis dato keine Studie, die den perioperativen Verlauf der EV bei AKE und simultaner Bypassoperation beschreibt. Wir haben in dieser Studie erstmalig diesen Verlauf mittels FACS dargestellt. Es zeigte sich in den MP und ApoBD-Verläufen thrombozytärer, erythrozytärer, monozytärer und lymphozytärer Genese ein signifikanter Rückgang drei Monate nach dem operativen Eingriff. Auch in Hinblick auf das Studienergebnis von Diehl et al. haben wir diese Verläufe den erhobenen hämodynamischen Daten gegenübergestellt, hier zeigte sich keine Korrelation zwischen der EV-Anzahl und valvulärer Scherkraft. Unsere Ergebnisse könnten ein Hinweis dafür sein, dass mit der operativen Entfernung der AS weitere inflammatorische Prozesse unterbunden werden und somit die Synthese von EV reduziert wird. Da sowohl in dieser Studie als auch in der Studie von Diehl et al. vergleichsweise eine geringe Anzahl von Patienten untersucht wurde, bleibt die Relevanz der Strömungsturbulenzen, die durch die Stenose verursacht werden, ungeklärt.

Implementierung von einheitlichen Standards in der Methodik sowie weitere Untersuchungen sind notwendig, um die Rolle der EV bei AS zu klären.

4.1.2. Verlauf der totalen MP- und ApoBD- Anzahl

Am ersten postoperativen Tag ist die Anzahl der zirkulierenden EVs sowohl beim Gesamt-MP und Gesamt-ApoBD signifikant niedriger als der prä-OP und der 7d post-OP-Wert. Durch die Operation verursachten Trigger wie z.B. Gewebeverletzung, Koagulation und Scherstress ist eine Erhöhung der EV zu erwarten [36]. Das vorliegende Ergebnis ist möglicherweise mit der Studie von van den Goor et al. zu erklären. In dieser Studie wurde mehr als 97% der thrombozytären und erythrozytären EVs der 13 untersuchten Patienten durch das Cell-Saver-System im Rahmen der extrakorporalen Zirkulation entfernt [63]. Ebenfalls denkbar ist eine perioperative Verdünnung der EV-Konzentration im Blut mittels Volumensubstitutionen.

Der signifikante steigende Verlauf um den 24h-post-OP bis zum 7d-postoperativen Zeitraum ist möglicherweise als postoperativer Genesungsprozess zu interpretieren. EV sind in mehreren Studien mit Angiogenese, Geweberegeneration bzw. -synthese assoziiert worden. In einer in-vitro- Studie von Yu et al. wurde gezeigt, dass der Transport von anti-apoptischen Molekülen durch EV an ischämischen Zellen zu einer kardioprotektiven Wirkung führen könnte [64]. Eine andere in-vitro-Studie zeigte, dass EV mit dem Transfer von proangiogener miRNA zu gesteigerter Endothelproliferation und Gefäßformation führen kann [65]. Die zweite mögliche Erklärung ist eine inflammatorische Reaktion auf Bluttransfusionen [51].

Der positive Trend setzt sich bis zum 3m-post-OP Zeitpunkt signifikant fort und übertrifft den Ausgangwert. In mehreren Studien wurden EV mit pathologischen Mechanismen aber auch mit physiologischen Funktionen wie Hämostase oder Angiogenese assoziiert [66]. Eine weitere Funktion, die die EV erfüllen, ist die interzelluläre Kommunikation [17]. Die Erholung der Werte, die drei Monate postoperativ gemessen wurden, könnte den Wiederaufbau dieses Kommunikationssystems bedeuten.

Hinsichtlich der klinischen Anwendung ist möglicherweise die Betrachtung des Verlaufs der gesamten EV für die klinische Anwendung nicht sinnvoll, aufgrund der unterschiedlichen Funktionen der zellspezifischen EV, die teilweise gegensätzliche Wirkungen z.B. Prokoagulation und Antikoagulation bewirken.

4.1.3. EV-Verlauf der blutzellenabstammenden Zellen

Die Verläufe der thrombozytären, erythrozytären, lymphozytären und monozytären EV sind ähnlich, außer den granulozytären und leukozytären (CD 45+) Verläufen erreichen erstere Daten statistische Signifikanz. Die Gemeinsamkeit dieser Verläufe ist, dass die Werte im dritten postoperativen Monat kleiner sind als die präoperativen Werte. Mutmaßlich ist dies zurückzuführen auf den Einsatz des Aortenklappenersatzes mit Einhergehen von normalisierten hämodynamischen Werten. In der zuvor erwähnten Studie von Diehl et al. wurde eine positive Korrelation zwischen der zirkulierenden thrombozytären MP-Anzahl und valvulärem Scherstress bei Patienten mit hochgradigen AS gezeigt. Generell ist Scherstress als Trigger für die Formation der EV bekannt. In unserer Untersuchung zeigte sich wider Erwarten keine Korrelation zwischen den genannten Parametern. Möglich ist, dass die Probandenanzahl in dieser Studie zu klein gewesen sein könnte. Vor dem Hintergrund, dass der Einfluss des Scherstresses auf die Anzahl der EV bereits in in-vivo und in-vitro gezeigt wurden, sind weitere Untersuchungen mit mehr Probanden notwendig, um aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen.

Es gibt erhebliche Einschränkungen bei der klinischen Einordnung sowie Wertung der vorliegenden Ergebnisse, da u.a. die genauen Funktionen der EV nicht bekannt sind und Referenzwerte nicht festgelegt sind. Auffällig ist jedoch die Tatsache, dass die Verläufe der thrombozytären, erythrozytären und leukozytären EV unter der operativen Entfernung der stenosierenden Aortenklappen regredient waren. Diehl et al. beschrieben nicht nur die positive Korrelation zwischen Scherstress und EV-Anzahl. Sie postulierten zudem, dass eine Sekretionskaskade von thrombozytären, endothelialen und monozytären EV einen systemischen proinflammatorischen Zustand verursachen und im Endeffekt eine endotheliale Schädigung begünstigen. Dies könnte im Rückschluss heißen, dass rückläufige Werte zum Zeitpunkt 3m-postOP für einen „entzündungsfreieren“ Zustand stehen.

Wie bereits im vorherigen Kapitel genannt, vermuten wir hinter dem Anstieg der Verläufe um den 7d-postOP-Zeitpunkt einen postoperativen Genesungsprozess und eine Reaktion auf mögliche Transfusionen. Diese Theorie wird unterstützt durch folgende Studien. Die

Arbeitsgruppe von Jung et al. untersuchte den Verlauf der endothel- und thrombozytenabstammenden EV. Man hat im unmittelbaren postinterventionellen Zeitraum nach einer TAVI keinen EV-Anstieg darstellen können [61]. Ähnliche Ergebnisse zeigte eine andere Arbeitsgruppe, die den Verlauf der thrombozytären, endothelialen und leukozytären EV untersucht hatte. Hier wurden am fünften postinterventionellen Tag keine erhöhten EV-Anzahl festgestellt. [67]. Dies legt unterstützt die Theorie, dass die EV-Formation durch postoperative Genesungsprozesse und Transfusionen verursacht sein könnte.

4.1.4. Limitation und Aussicht

Mit dieser Studie haben wir gezeigt, dass die EV- Verläufe sich nach dem operativen Eingriff geändert haben. Die rückläufigen Werte bei den zellspezifischen EV drei Monate nach der Operation könnten ein Hinweis sein, dass dies einen Rückgang der systemischen Entzündung bedeuten könnte. Da jedoch in dieser Studie keine Kontrollgruppe untersucht wurde und Referenzwerte nicht etabliert sind, lässt sich keine Aussage über die klinische Signifikanz machen.

In der vorliegenden Studie wurde keine Korrelation zwischen der Scherkraft und EV-Anzahl festgestellt. Allerdings wurden in einer anderen Studie widersprüchliche Ergebnisse gezeigt. Daher sind weitere Untersuchung z.B. mit einer größeren Fallzahl sowie einheitliche Isolations- und Quantifizierungsmethoden notwendig, um ein aussagekräftiges Ergebnis zu erhalten.

Zur Charakterisierung und Quantifizierung eignet sich die Analyse mittels FACS. Jedoch sind Aussagen über die Funktion der EV allein mit dieser Methode nicht möglich. Daher könnte die zusätzliche Analyse des EV-Inhalts bei der Erklärung der funktionellen Rolle hilfreich sein.

In dieser Arbeit wurde nur ein Teil der ApoBD erfasst, da wir uns nur auf den Größenbereich 1-2 um beschränkt haben.

Trotz der vielen durchgeführten Studien gibt es noch keine etablierten Diagnostikmarker und Therapiemittel, die aktuell in der Klinik eine Anwendung findet. Aspekte, die den Datenvergleich der diversen Studienergebnisse und Etablierung von Referenzwerten erschweren, sind beispielsweise mangelnde Standards in der Präanalytik und Analytik sowie eine nicht einheitliche Nomenklatur. In den letzten Jahren zeigten sich zunehmende Maßnahmen zur Vereinheitlichung der Untersuchungsmethoden und der Definitionen.

Weitere Studien mit Verlängerung der Beobachtungsperiode wären interessant, um zu untersuchen, ob der rückgängige Verlauf der EV auf einem niedrigen Niveau bleibt oder ob ein protrahierter Zeitraum gebraucht wird, bis sich die Anzahl der EV dem präoperativen Niveau angleicht.

5. Literaturverzeichnis

1. Yan, A.T., et al., *Association Between Cardiovascular Risk Factors and Aortic Stenosis: The CANHEART Aortic Stenosis Study.* J Am Coll Cardiol, 2017. **69**(12): p. 1523-1532.
2. Stewart, B.F., et al., *Clinical factors associated with calcific aortic valve disease. Cardiovascular Health Study.* J Am Coll Cardiol, 1997. **29**(3): p. 630-4.
3. Vahanian, A., et al., *2021 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease.* Eur J Cardiothorac Surg, 2021.
4. Eveborn, G.W., et al., *The evolving epidemiology of valvular aortic stenosis. the Tromso study.* Heart, 2013. **99**(6): p. 396-400.
5. Thaden, J.J., V.T. Nkomo, and M. Enriquez-Sarano, *The global burden of aortic stenosis.* Prog Cardiovasc Dis, 2014. **56**(6): p. 565-71.
6. Rosenhek, R., et al., *Natural history of very severe aortic stenosis.* Circulation, 2010. **121**(1): p. 151-6.
7. Pellikka, P.A., et al., *Outcome of 622 adults with asymptomatic, hemodynamically significant aortic stenosis during prolonged follow-up.* Circulation, 2005. **111**(24): p. 3290-5.
8. Dweck, M.R., N.A. Boon, and D.E. Newby, *Calcific aortic stenosis: a disease of the valve and the myocardium.* J Am Coll Cardiol, 2012. **60**(19): p. 1854-63.
9. Otto, C.M. and B. Prendergast, *Aortic-valve stenosis--from patients at risk to severe valve obstruction.* N Engl J Med, 2014. **371**(8): p. 744-56.
10. Otto, C.M., et al., *2020 ACC/AHA Guideline for the Management of Patients With Valvular Heart Disease: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Joint Committee on Clinical Practice Guidelines.* Circulation, 2021. **143**(5): p. e72-e227.
11. Baumgartner, H.C., et al., *Recommendations on the echocardiographic assessment of aortic valve stenosis: a focused update from the European Association of Cardiovascular Imaging and the American Society of Echocardiography.* Eur Heart J Cardiovasc Imaging, 2017. **18**(3): p. 254-275.
12. Bates, E.R., *Treatment options in severe aortic stenosis.* Circulation, 2011. **124**(3): p. 355-9.
13. Otto, C.M., et al., *Prospective study of asymptomatic valvular aortic stenosis. Clinical, echocardiographic, and exercise predictors of outcome.* Circulation, 1997. **95**(9): p. 2262-70.

14. Everett, R.J., et al., *Timing of intervention in aortic stenosis: a review of current and future strategies.* Heart, 2018. **104**(24): p. 2067-2076.
15. Rahimtoola, S.H., *Choice of prosthetic heart valve in adults an update.* J Am Coll Cardiol, 2010. **55**(22): p. 2413-26.
16. Urabe, F., et al., *Extracellular vesicles as biomarkers and therapeutic targets for cancer.* Am J Physiol Cell Physiol, 2020. **318**(1): p. C29-C39.
17. 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.
18. Yanez-Mo, M., et al., *Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions.* Journal of Extracellular Vesicles, 2015. **4**.
19. Sims, P.J., et al., *Complement proteins C5b-9 cause release of membrane vesicles from the platelet surface that are enriched in the membrane receptor for coagulation factor Va and express prothrombinase activity.* J Biol Chem, 1988. **263**(34): p. 18205-12.
20. Cocucci, E., G. Racchetti, and J. Meldolesi, *Shedding microvesicles: artefacts no more.* Trends Cell Biol, 2009. **19**(2): p. 43-51.
21. Ratajczak, J., et al., *Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery.* Leukemia, 2006. **20**(5): p. 847-56.
22. Thery, C., M. Ostrowski, and E. Segura, *Membrane vesicles as conveyors of immune responses.* Nature Reviews Immunology, 2009. **9**(8): p. 581-593.
23. Millimaggi, D., et al., *Osteoblast-conditioned media stimulate membrane vesicle shedding in prostate cancer cells.* Int J Oncol, 2006. **28**(4): p. 909-14.
24. Voukalis, C., E. Shantsila, and G.Y.H. Lip, *Microparticles and cardiovascular diseases.* Ann Med, 2019. **51**(3-4): p. 193-223.
25. 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.
26. Atkin-Smith, G.K., et al., *A novel mechanism of generating extracellular vesicles during apoptosis via a beads-on-a-string membrane structure.* Nat Commun, 2015. **6**: p. 7439.
27. Atkin-Smith, G.K. and I.K.H. Poon, *Disassembly of the Dying: Mechanisms and Functions.* Trends Cell Biol, 2017. **27**(2): p. 151-162.
28. Halicka, H.D., E. Bedner, and Z. Darzynkiewicz, *Segregation of RNA*

and separate packaging of DNA and RNA in apoptotic bodies during apoptosis. Exp Cell Res, 2000. **260**(2): p. 248-56.
29. Zernecke, A., et al., *Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection.* Sci Signal, 2009. **2**(100): p. ra81.
30. Holmgren, L., et al., *Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies.* Blood, 1999. **93**(11): p. 3956-63.
31. Berda-Haddad, Y., et al., *Sterile inflammation of endothelial cell-derived apoptotic bodies is mediated by interleukin-1alpha.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(51): p. 20684-9.
32. 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.
33. Satta, N., et al., *Monocyte vesiculation is a possible mechanism for dissemination of membrane-associated procoagulant activities and adhesion molecules after stimulation by lipopolysaccharide.* J Immunol, 1994. **153**(7): p. 3245-55.
34. 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.
35. Ratajczak, J., et al., *Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication.* Leukemia, 2006. **20**(9): p. 1487-95.
36. Horstman, L.L., et al., *New horizons in the analysis of circulating cell-derived microparticles.* Keio J Med, 2004. **53**(4): p. 210-30.
37. Al-Nedawi, K., B. Meehan, and J. Rak, *Microvesicles: messengers and mediators of tumor progression.* Cell Cycle, 2009. **8**(13): p. 2014-8.
38. Minciacchi, V.R., M.R. Freeman, and D. Di Vizio, *Extracellular vesicles in cancer: exosomes, microvesicles and the emerging role of large oncosomes.* Semin Cell Dev Biol, 2015. **40**: p. 41-51.
39. Palanisamy, V., et al., *Nanostructural and transcriptomic analyses of human saliva derived exosomes.* PLoS One, 2010. **5**(1): p. e8577.
40. Pisitkun, T., R.F. Shen, and M.A. Knepper, *Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(36): p. 13368-73.
41. Lytvyn, Y., et al., *Assessment of urinary microparticles in normotensive patients with type 1 diabetes.* Diabetologia, 2017. **60**(3): p. 581-584.
42. Bergsmedh, A., et al., *Horizontal transfer of oncogenes by uptake of*

apoptotic bodies. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(11): p. 6407-11.
43. Urabe, F., et al., *Extracellular vesicles: Toward a clinical application in urological cancer treatment.* Int J Urol, 2018. **25**(6): p. 533-543.
44. Jung, C., et al., *Circulating endothelial and platelet derived microparticles reflect the size of myocardium at risk in patients with ST-elevation myocardial infarction.* Atherosclerosis, 2012. **221**(1): p. 226-31.
45. Nakao, Y., et al., *Circulating extracellular vesicles are a biomarker for NAFLD resolution and response to weight loss surgery.* Nanomedicine, 2021. **36**: p. 102430.
46. Horstman, L.L. and Y.S. Ahn, *Platelet microparticles: a wide-angle perspective.* Crit Rev Oncol Hematol, 1999. **30**(2): p. 111-42.
47. Miyazaki, Y., et al., *High shear stress can initiate both platelet aggregation and shedding of procoagulant containing microparticles.* Blood, 1996. **88**(9): p. 3456-64.
48. Banz, Y., et al., *Endothelial- and Platelet-Derived Microparticles Are Generated During Liver Resection in Humans.* J Invest Surg, 2016. **29**(1): p. 20-31.
49. Lopez, E., et al., *Platelet-derived- Extracellular Vesicles Promote Hemostasis and Prevent the Development of Hemorrhagic Shock.* Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 17676.
50. Dymicka-Piekarska, V., et al., *Platelet-Derived Microparticles in Patients with Colorectal Cancer.* Journal of Cancer Therapy, 2012. **03**(06): p. 898-901.
51. Herring, J.M., M.A. McMichael, and S.A. Smith, *Microparticles in health and disease.* J Vet Intern Med, 2013. **27**(5): p. 1020-33.
52. 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.
53. Barry, O.P., et al., *Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles.* J Clin Invest, 1998. **102**(1): p. 136-44.
54. Mesri, M. and D.C. Altieri, *Leukocyte microparticles stimulate endothelial cell cytokine release and tissue factor induction in a JNK1 signaling pathway.* J Biol Chem, 1999. **274**(33): p. 23111-8.
55. Myers, D.D., et al., *P-selectin and leukocyte microparticles are associated with venous thrombogenesis.* J Vasc Surg, 2003. **38**(5): p. 1075-89.
56. Van Der Meijden, P.E., et al., *Platelet- and erythrocyte-derived microparticles trigger thrombin generation via factor XIIa.* J Thromb

Haemost, 2012. **10**(7): p. 1355-62.
57. Gao, Y., et al., *Erythrocyte-derived extracellular vesicles aggravate inflammation by promoting the proinflammatory macrophage phenotype through TLR4-MyD88-NF-kappaB-MAPK pathway.* J Leukoc Biol, 2022. **112**(4): p. 693-706.
58. Shantsila, E., P.W. Kamphuisen, and G.Y. Lip, *Circulating microparticles in cardiovascular disease: implications for atherogenesis and atherothrombosis.* J Thromb Haemost, 2010. **8**(11): p. 2358-68.
59. Diehl, P., et al., *Increased levels of circulating microparticles in patients with severe aortic valve stenosis.* Thromb Haemost, 2008. **99**(4): p. 711-9.
60. 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.
61. Jung, C., et al., *Microparticles in patients undergoing transcatheter aortic valve implantation (TAVI).* Heart Vessels, 2017. **32**(4): p. 458-466.
62. Adan, A., et al., *Flow cytometry: basic principles and applications.* Crit Rev Biotechnol, 2017. **37**(2): p. 163-176.
63. van den Goor, J.M., et al., *Cell Saver device efficiently removes cell-derived microparticles during cardiac surgery.* J Thorac Cardiovasc Surg, 2007. **134**(3): p. 798-9.
64. Yu, B., et al., *Cardiomyocyte protection by GATA-4 gene engineered mesenchymal stem cells is partially mediated by translocation of miR-221 in microvesicles.* PLoS One, 2013. **8**(8): p. e73304.
65. Cantaluppi, V., et al., *Microvesicles derived from endothelial progenitor cells enhance neoangiogenesis of human pancreatic islets.* Cell Transplant, 2012. **21**(6): p. 1305-20.
66. Morel, O., et al., *Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation?* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(12): p. 2594-604.
67. Marchini, J.F., et al., *Endothelial, platelet, and macrophage microparticle levels do not change acutely following transcatheter aortic valve replacement.* J Negat Results Biomed, 2016. **15**: p. 7.

6. Danksagung

Ich möchte mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Payam Akhyari für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Hilfestellungen und die kritischen Anregungen herzlichst bedanken.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. rer. nat. Andreas Weber für die Betreuung sowie die Unterstützung im Labor.

Außerdem möchte ich Herrn Dr. med. Philipp Rellecke und Herrn Prof. Dr. med. Stephan Sixt sowie den herzchirurgischen Operateuren für die Zusammenarbeit danken.

Ebenfalls danke ich Frau Dr. med. Letizia Cardone, Frau Lauren Lageveen und Frau Dr. med. Shining Liu, die beim HURRICANE-Projekt mitgewirkt haben, für die großartige Freundschaft und Motivation.

Ich bedanke mich bei meiner Familie, insbesondere meinen Eltern für ihre unermüdliche Unterstützung sowie Förderung während meiner Ausbildung.