

Aus der Klinik für Innere Medizin III
(Kardiologie, Angiologie und Internistische Intensivmedizin)

Direktor: Prof. Dr. med. Michael Böhm

Fachbereich Klinische Medizin

Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Zirkulierende Mikropartikel als Indikator für die Peripartale Kardiomyopathie

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2014

vorgelegt von

Viktoria Felicitas Schwarz

geb. am 11.02.1987 in Ludwigshafen/Rhein

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
1.1	Deutsche Zusammenfassung	1
1.2	Abstract.....	3
2	EINLEITUNG	4
2.1	Zur Bedeutung der Mikropartikel.....	4
2.2	Zur klinischen Bedeutung der peripartalen Kardiomyopathie.....	9
2.3	Fragestellung der Arbeit	15
3	MATERIAL UND METHODEN	16
3.1	Patientenkollektiv	16
3.1.1	Mikropartikel bei Patientinnen mit peripartaler Kardiomyopathie, gesunden postpartalen Frauen, gesunden schwangeren Frauen, gesunden nicht-schwangeren Frauen, Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie, Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit und gesunden altersäquivalenten Kontrollen	16
3.1.2	Mikropartikel bei Patientinnen mit peripartaler Kardiomyopathie mit und ohne Bromocriptin-Therapie.....	17
3.1.3	Demographische und klinische Daten	17
3.2	Ethik-Komitee.....	22
3.3	Geräte und Hilfsmittel	23
3.4	Reagenzien und Chemikalien	24
3.5	Beads.....	24
3.6	Marker-Proteine und Fluorochrom-Markierung.....	25

3.7	Verbrauchsmittel.....	26
3.8	Lösungen.....	27
3.9	Computer-Software.....	28
3.10	Statistische Auswertung.....	28
3.11	Durchflusszytometrie.....	29
	3.11.1 Funktionsweise	29
	3.11.2 Methodisches Vorgehen.....	33
	3.11.3 Stabilität der Mikropartikel.....	34
3.12	Probenaufbereitung.....	37
4	ERGEBNISSE	40
4.1	Mikropartikel bei Patientinnen mit peripartaler Kardiomyopathie, gesunden postpartalen Frauen, gesunden schwangeren Frauen, gesunden nicht-schwangeren Frauen, Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie, Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit und gesunden altersäquivalenten Kontrollen	40
	4.1.1 Endotheliale Mikropartikel (EMP)	41
	4.1.2 Thrombozytäre Mikropartikel (PMP).....	45
	4.1.3 Monozytäre Mikropartikel (MMP).....	48
	4.1.4 Leukozytäre Mikropartikel (LMP)	49
4.2	Mikropartikel bei Patientinnen mit peripartaler Kardiomyopathie mit und ohne Bromocriptin-Therapie	50
4.3	CD62E/CD31-Quotient	51
4.4	Statistikübersicht.....	52
5	DISKUSSION	56
6	METHODENKRITIK	79

7	SCHLUSSFOLGERUNG	80
8	LITERATURVERZEICHNIS	81
9	PUBLIKATION, ABSTRACTS UND PREISE	94
9.1	Publikation.....	94
9.2	Abstracts.....	94
9.3	Preise.....	94
10	DANKSAGUNG	95

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis mit thematischer Gruppierung der gebräuchlichsten Abkürzungen.

Mikropartikel

Abkürzung

EMP	endotheliale Mikropartikel
LMP	leukozytäre Mikropartikel
MMP	monozytäre Mikropartikel
MP	Mikropartikel
PMP	thrombozytäre Mikropartikel

Patientenkollektiv

Abkürzung

♀	weiblich
♂	männlich
CAD	stabile koronare Herzkrankheit
DCM	dilatative Kardiomyopathie
HCTR	gesunde Kontrollen
ICM	ischämische Kardiomyopathie
NPCTR	gesunde nicht-schwangere Frauen
PCTR	gesunde schwangere Frauen
PPCM	peripartale Kardiomyopathie
PPCM-BR	PPCM mit Bromocriptin-Behandlung
PPCM-BRCTR	PPCM ohne Bromocriptin-Behandlung
PPCTR	gesunde postpartale Frauen

Durchflusszytometrie

Abkürzung

APC	Allophycocyanin
FACS	fluorescence activated cell sorting, Durchflusszytometrie
FITC	Fluoresceinisothiocyant
PE	Phycoerythrin

Sonstige relevante Abkürzungen**Abkürzung**

ACE	Angiotensin converting enzyme
AT	Angiotensinrezeptor
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CRP	C-reaktives Protein
EF	Ejektionsfraktion
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
hs-CRP	hoch sensitives CRP
IFN	Interferon
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
mRNA	messenger RNA
NYHA	New York Heart Association
PBS	phosphate buffered saline
PGC-1 α	peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
NT-proBNP	N-terminales natriuretisches Peptid Typ B
RNA	Ribonukleinsäure
sFlt1	soluble fms-like tyrosine kinase 1
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
VEGF	vascular endothelial growth factor

1 Zusammenfassung

1.1 Deutsche Zusammenfassung

Bei der peripartalen Kardiomyopathie handelt es sich um eine potentiell lebensbedrohliche Erkrankung junger Frauen, die im letzten Monat der Schwangerschaft oder bis zu 6 Monate postpartal auftritt. Das klinische Bild präsentiert sich als Herzinsuffizienz unterschiedlichen Schweregrades. Die betroffenen Frauen sind häufiger über einen längeren Zeitraum asymptomatisch bzw. oligosymptomatisch, bis das vorliegende Krankheitsbild erkannt wird. Daraus erwächst eine große Herausforderung sowohl für Gynäkologen als auch Kardiologen, um mit geeigneten diagnostischen Methoden die notwendige frühzeitige Diagnose und konsekutiv eine Therapieeinleitung zu ermöglichen. Ein Pathomechanismus der peripartalen Kardiomyopathie, die Spaltung von Prolaktin in dessen 16-kDa Fragment, konnte in den letzten Jahren weitgehend aufgeklärt werden. Das 16-kDa Prolaktin verursacht schwere Endothelschäden, wobei dem oxidativen Stress eine wichtige ursächliche Bedeutung zukommt. Auf dieser Grundlage konnte gezeigt werden, dass mittels Bromocriptin, einem Inhibitor der Prolaktinsekretion, das Krankheitsgeschehen beeinflusst werden kann. Die Prognose der peripartalen Kardiomyopathie ist in weniger entwickelten Ländern mit einer Mortalität bis zu 50% ungünstig.

Ziel der vorliegenden Studie war es, die Bedeutung von sogenannten Mikropartikeln, die von Zellmembranen durch Zellaktivierung oder Zelluntergang freigesetzt werden, in der Diagnostik der peripartalen Kardiomyopathie zu evaluieren. Mikropartikel sind Zellmembranfragmente in einer Größe von 0,1 -1 μm und können mittels Durchflusszytometrie und adäquater Antikörpermarkierung qualitativ und quantitativ erfasst werden. Die Patienten wurden am Universitätsklinikum des Saarlandes, der Medizinischen Hochschule Hannover sowie dem Chris Hani Baragwanath Hospital in Johannesburg/Südafrika akquiriert. Die Patientinnen mit peripartaler Kardiomyopathie wurden mit gleichaltrigen gesunden postpartalen Frauen, gesunden schwangeren Frauen, gesunden nicht-schwangeren Frauen und Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie, Patienten mit stabiler koronarer Herzerkrankung sowie deren altersäquivalenten gesunden Kontrollen verglichen. Es konnte nachgewiesen werden, dass Patientinnen mit peripartaler Kardiomyopathie eine statistisch signifikant erhöhte Anzahl von Mikropartikeln im peripheren Blut aufweisen. Dies betraf sowohl die endothelialen als auch die thrombozytären Mikropartikel. Patientinnen mit manifester Herzinsuffizienz, die unter additi-

ver medikamentöser Therapie mit Bromocriptin rekompensiert werden konnten, wiesen eine signifikant erniedrigte Anzahl der Mikropartikel auf. Die Ergebnisse könnten eine Abgrenzung von Patientinnen mit peripartaler Kardiomyopathie von weiteren Formen der Herzinsuffizienz ermöglichen.

Daraus ist ersichtlich, dass sich die Bestimmung und Definition der Mikropartikel im peripheren Blut von Patientinnen mit peripartaler Kardiomyopathie als wertvoll für die Diagnose der Erkrankung erweisen kann. Weiteren Studien bleibt es vorbehalten, Aussagen zur Sensitivität und Spezifität der Methode zur Erkennung der peripartalen Kardiomyopathie zu treffen.

1.2 Abstract

Circulating microparticles as indicator of peripartum cardiomyopathy

Peripartum cardiomyopathy is a potentially life-threatening disease affecting women during the last month of pregnancy or up to 6 months postpartum. It presents itself as heart failure of varying severity. The affected women are often asymptomatic or mildly symptomatic for a longer period until the present disease is recognized. A great challenge arises for gynaecologists as well as cardiologists in order to allow for appropriate diagnostic methods with the necessary early assignment of the disease and therapeutic options. One underlying pathomechanism for the development of peripartum cardiomyopathy - the cleavage of prolactin in its 16-kDa fragment - could be widely elucidated. 16-kDa prolactin as well as oxidative stress cause severe endothelial damage. On this basis, it could be shown that the disease can be controlled by bromocriptine application, an inhibitor of prolactin secretion. There is a poor prognosis in less developed countries with mortality up to 50%.

The aim of the present study was to characterize the validity of microparticles in the diagnosis of peripartum cardiomyopathy. Microparticles are cell membrane fragments released due to processes of cell activation or cell death in a size of 0.1 - 1 μm . They can be detected in quality and quantity by flow cytometry and adequate antibody labeling. Patients were acquired at Saarland University Medical Center (Germany), Hannover Medical School (Germany) and Chris Hani Baragwanath Hospital in Johannesburg (South Africa). Patients with peripartum cardiomyopathy were suitable compared to age-matched healthy postpartum women, healthy pregnant women, healthy non-pregnant women and patients with ischemic cardiomyopathy, patients with stable coronary artery disease and their age-equivalent healthy controls. It could be determined that patients with peripartum cardiomyopathy showed a statistically significant increased number of certain microparticles in the peripheral blood. This affected both endothelial and platelet microparticles. Patients who have been treated with additional bromocriptine exhibited a significantly decreased number of the microparticles. A demarcation of patients with peripartum cardiomyopathy could be done in contrast to other forms of heart failure.

It becomes apparent that the determination and definition of microparticles in peripheral blood of patients with peripartum cardiomyopathy are valuable for the diagnosis of this disease. It is left to further studies to make statements on the sensitivity and specificity of the method for determining of microparticles.

2 Einleitung

2.1 Zur Bedeutung der Mikropartikel

Die als Mikropartikel (MP) bezeichneten Teilchen wurden 1967 erstmals durch Peter Wolf als „platelet dust“ (thrombozytärer Staub) beschrieben (Wolf, 1967). Die Größe dieser Partikel wurde mit 0,02 - 0,05 μm angegeben. Seitdem werden die Teilchen Mikropartikel genannt. Im Rahmen der molekularbiologischen Charakterisierung wurde festgestellt, dass der „platelet dust“ vorwiegend aus Phospholipiden besteht und eine positive Korrelation zur Plättchenfaktor 3-Aktivität aufweist. Die prokoagulatorischen Eigenschaften der MP wurden zu diesem Zeitpunkt im Wesentlichen definiert. Gleichwohl wurde den MP eine antigene Bedeutung zugeordnet, die den vitalen Thrombozyten entspricht. Dieser Publikation wurde in den folgenden Jahren relativ wenig Aufmerksamkeit geschenkt.

Die erste klinisch relevante Zuordnung der MP erfolgte zum Krankheitsbild der ideopathischen thrombozytopenischen Purpura (Khan *et al.*, 1975). Es folgten zahlreiche Publikationen zur Bedeutung der MP hinsichtlich der prokoagulativen Eigenschaften, der Vermittlung von inflammatorischen Prozessen sowie zur Bedeutung der Endothelschädigung (Andriantsitohaina *et al.*, 2012; Diamant *et al.*, 2004; Horstman *et al.*, 2004b; Yong *et al.*, 2012). In den letzten Jahren wurde zunehmend zur diagnostischen Wertigkeit und prognostischen Bedeutung der MP, insbesondere im Rahmen von Herz-Kreislauf-erkrankungen, berichtet. So konnte bei Patienten¹ mit koronarer Herzkrankheit eine erhöhte Anzahl an MP nachgewiesen werden (Bernal-Mizrachi *et al.*, 2003; Mallat *et al.*, 2000). In einer Subgruppenanalyse wiesen Patienten mit akutem Koronarsyndrom eine wiederum signifikant erhöhte Anzahl an MP gegenüber Patienten mit stabiler Angina pectoris auf. Ebenso konnte in einer weiteren Analyse eine Korrelation zwischen dem koronarangiographischen Befund und MP aufgezeigt werden (Bernal-Mizrachi *et al.*, 2004). Die Berücksichtigung endothelialer Progenitorzellen oder endothelial generierter MP als serologischer Marker einer bestehenden endothelialen Dysfunktion konnte eine prognostische Aussage bezüglich zukünftiger kardiovaskulärer Ereignisse stützen (Lee *et al.*, 2012; Nozaki *et al.*, 2009; Nozaki *et al.*, 2010; Sinning *et al.*, 2011; Werner *et al.*, 2005).

¹ Der Begriff „Patienten“ umfasst sowohl männliche als auch weibliche Personen.

Grundsätzlich können alle zirkulierenden Blutzellen und Endothelialzellen diese membranösen Fragmente als MP in einer Größe $< 1 \mu\text{m}$ freisetzen (Horstman *et al.*, 2004b). In der Literatur werden MP als Partikel von $0,1 - 1 \mu\text{m}$ beschrieben (Diamant *et al.*, 2004; Leroyer *et al.*, 2010). Inwieweit in der Zukunft eine Abgrenzung zwischen kleinen ($< 0,5 \mu\text{m}$) und großen ($< 1 \mu\text{m}$) MP von Bedeutung ist, kann zurzeit nicht abgeschätzt werden (Nadaud *et al.*, 2013). Die Abgrenzung gegenüber anderen im Blut zirkulierenden kleinen Partikeln wie Exosomen ($40 - 100 \text{ nm}$) und apoptotischen Körperchen (bis $4 \mu\text{m}$) erfolgt primär aufgrund der Größe der MP (Distler *et al.*, 2005; Heijnen *et al.*, 1999; Mause und Weber, 2010). Es bleibt zu beachten, dass die Größe der MP allein keine sichere Abgrenzung erlaubt. Von den Exosomen lassen sich die MP unter anderem durch spezifische Oberflächenproteine sowie eine hohe Annexin V-Bindungskapazität differenzieren (Mause und Weber, 2010). Annexin V erfasst Phosphatidylserin und ist somit ein sensitiver Marker für apoptotische Zellen bzw. deren Fragmente.

Der überwiegende Anteil der im Blut nachweisbaren MP ist thrombozytären Ursprungs, gefolgt von endothelialen, granulozytären und erythrozytären MP (Diamant *et al.*, 2004; Redman und Sargent, 2008). Signifikante Differenzen in den MP-Fractionen wurden an gesunden Kontrollgruppen und an Patienten gefunden, die von verschiedenen Erkrankungen, unter anderem mit erhöhtem thromboembolischem und kardiovaskulärem Risiko, betroffen sind (Diamant *et al.*, 2004; Nomura *et al.*, 2008; Nozaki *et al.*, 2010; Roos *et al.*, 2010; Yong *et al.*, 2012). Die Stimulation zur Bildung und Freisetzung der MP beruht auf verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen, da die Mikropartikel sowohl beim Gesunden als auch Kranken in die Regulation von pathophysiologischen bzw. biochemischen Prozessen eingreifen. Die bedeutsame pathophysiologische Wirksamkeit der thrombozytären Mikropartikel (PMP) konnte am Beispiel des Scott Syndroms eindrucksvoll nachgewiesen werden. Bei diesem Krankheitsbild haben die Thrombozyten die Fähigkeit verloren, MP zu bilden. Die zur Aktivierung führende Signalkaskade kommt nicht zur Wirkung, wodurch die Blutgerinnung beeinträchtigt wird. Dies unterstreicht die Bedeutung der MP in grundlegenden physiologischen Prozessen, wobei die Blutgerinnung Gegenstand zahlreicher Publikationen wurde (Sims *et al.*, 1989; Toti *et al.*, 1996; Weiss und Lages, 1997; Zwaal *et al.*, 2004).

Der Mechanismus der MP-Freisetzung ist nicht vollständig aufgeklärt. Der Prozess zur Bildung der MP ist überwiegend abhängig von der Zunahme des zytosolischen Calciums als Ergebnis intrazellulärer Signalstimulation sowie der Zuführung von extrazellulärem Calcium (Horstman *et al.*, 2004b; Wiedmer *et al.*, 1990). In der ruhenden Zelle sind die Phospholipide

asymmetrisch verteilt. Neutral geladene Phospholipide, wie Phosphatidylcholin und Sphingomyelin, sind hauptsächlich in der äußeren Membranschicht angereichert. Die negativ geladenen Phospholipide, Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin, sind fast ausschließlich in der inneren Membranschicht lokalisiert (Bretscher, 1972; Hugel *et al.*, 2005). Diese spezifische asymmetrische Verteilung der Lipide innerhalb der Lipid-Doppelschicht der betroffenen Zellen wird durch verschiedene Enzyme kontrolliert und aufrechterhalten. Dies sind für Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin eine spezifische Flippase (Aminophospholipid-Translokase), eine nach innen gerichtete Pumpe (Daleke und Lyles, 2000). Das Enzym Floppase ist eine nach außen gerichtete Pumpe für Cholin- und Aminophospholipide, während das Enzym Scramblase eine unspezifische Umverteilung der Lipide innerhalb der Membran zulässt (Daleke und Lyles, 2000). Der intrazelluläre Calciumanstieg geht mit einer Veränderung des Transmembrangradienten einher und führt zusammen mit einer Zellaktivierung, auch in Form von Apoptose, zur Inhibition des Enzyms Flippase. Gleichzeitig werden die Enzyme Floppase und Scramblase aktiviert (Zwaal *et al.*, 2004). Hieraus resultiert, dass oben genanntes Gleichgewicht der asymmetrischen Membranzusammensetzung nicht länger aufrechterhalten werden kann. Es kommt zu einer Umverteilung der Phospholipide in der Zellmembran, die dazu führt, dass vermehrt Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin auf der Außenseite der Zelle zu finden sind. Dieser Oberflächenexprimierung von Phosphatidylserin folgt die MP-Freisetzung (Hugel *et al.*, 2005; Zwaal *et al.*, 2004). Vorausgehend ist im Falle der Aktivierung ein Anstieg des intrazytosolischen Calciums, wodurch verschiedene zytosolische Enzyme einschließlich Calpain, einer Cysteinproteinase, aktiviert werden. Diesem Prozess wiederum folgt die Spaltung zytoskelettaler Filamente, unter anderem Aktin (Piccin *et al.*, 2007). Im Rahmen der Apoptose ist die MP-Formierung einer anderen Signalkaskade unterworfen (VanWijk *et al.*, 2003).

Die Bildung und Freisetzung von MP sind in verschiedene physiologische Prozesse eingebunden. Im Rahmen der Apoptose, dem programmierten Zelltod, handelt es sich um einen Prozess, bei dem ineffiziente und überzählige Zellen aus dem Organismus entfernt werden. Die Apoptose ist durch die Aufhebung der Phospholipid-Asymmetrie der Plasmamembran, die Fragmentierung der DNA und die Freisetzung apoptotischer Körperchen charakterisiert (Jimenez *et al.*, 2003; Mause und Weber, 2010; VanWijk *et al.*, 2003). MP werden in der frühen Phase der Apoptose gebildet und haben einen wesentlichen Einfluss auf die interzelluläre Kommunikation abhängig von der Ursprungszelle und dem zur Formierung führenden Stimulus (Curtis *et al.*, 2009; Distler *et al.*, 2005; Mallat *et al.*, 1999; Mause und Weber, 2010).

Unabhängig von diesen physiologischen Prozessen werden MP auch unter weniger kontrollierten Bedingungen gebildet. Dies betrifft nekrotische Zellen mit Verlust der Integrität der Zellmembran sowie mechanische Destruktion mit Zellverletzung (Mause und Weber, 2010). Auch bei weiteren pathophysiologischen Zuständen wie Hypoxie und oxidativem Stress werden Aktivierungsprozesse initiiert, auf deren Grundlage die MP-Bildung erfolgt (Jeanneteau *et al.*, 2012).

Den MP werden entsprechend der Herkunft divergierende pathophysiologische Funktionen zugeordnet. Letztlich kontrolliert die Ursprungszelle die Anzahl und den Inhalt der MP und damit deren pathophysiologische Wirkungen (Burnier *et al.*, 2009; Diamant *et al.*, 2004; Distler *et al.*, 2005). Die Bildung der MP ist ein differenzierter Prozess, dessen Steuerung komplexen Prozessen unter Einbeziehung von zytosolischen Proteinen, Transmembranproteinen und Protein-Lipid-Interaktion unterliegt (Hugel *et al.*, 2005; Piccin *et al.*, 2007). Die Verteilung von Oberflächenmolekülen auf den MP ist vom Zelltypus abhängig. In der Regel ist die Antigen determinierung der MP zur Ursprungszelle äquivalent. Die thrombozytären MP exprimieren vordergründig Glykoprotein GpIb (CD42b), Thrombozyten-Endothel-Adhäsionsmoleküle wie PECAM-1 (CD31) und Aktivierungsmarker wie P-Selektin (CD62P). Endothelzellen exprimieren unter anderem CD31, CD 144 und CD62E. Die Gesamtheit der Mikropartikel sind Träger von Antigenen, Antikörpern sowie zahlreichen Transmittern (Horstman und Ahn, 1999; Horstman *et al.*, 2004b).

Die MP sind von komplexer Struktur, wobei eine Phospholipid-Doppelschicht transmembrane Proteine, Rezeptoren und zytosolische Komponenten beinhaltet bzw. umschließt. Die MP differieren in Größe und Dichte entsprechend der molekularen Zusammensetzung. In den MP können sich Enzyme, Transkriptionsfaktoren, mRNA und microRNA der Ursprungszelle sowie weitere biologisch aktive Fragmente befinden, die in den Prozess der endothelialen Funktion, der Koagulation, der Inflammation und der Angiogenese aktiv eingreifen (Dignat-George und Boulanger, 2011; Horstman *et al.*, 2004b; Hugel *et al.*, 2005; Leroyer *et al.*, 2010). So konnte gezeigt werden, dass microRNA-126 endotheliale Zellreparaturmechanismen initiieren kann (Jansen *et al.*, 2013). Insofern kommt den MP eine entscheidende Bedeutung in der Pathogenese verschiedener inflammatorischer und thrombotischer Prozesse zu. Durch die weitgehende Aufklärung der Wirkungsmechanismen der MP ist die Wissenschaft zunehmend in der Lage, fundamentale Prozesse der Endothel-assoziierten Erkrankungen aufzuklären und einer therapeutischen Intervention zuzuführen (Bernal-Mizrachi *et al.*, 2004; Biasucci *et al.*, 2012; Leroyer *et al.*, 2010; Sinning *et al.*, 2011).

Die sich im Blutkreislauf befindenden MP sind in der Lage, lokale wie auch periphere Wirkungen zu entfalten. Den MP werden in Abhängigkeit von der Ursprungszelle und dem zugrunde liegenden Stimulus verschiedene Funktionen zugeordnet (Jimenez *et al.*, 2003; Mause und Weber, 2010).

Zahlreiche Entzündungsparameter, die auch als Mediatoren wirken, sind im Serum als lösliche Substanzen definiert und bestimmt worden, obwohl diese teilweise an die Oberflächen der MP gebunden sind (u. a. P-Selektin, E-Selektin, tissue factor, von Willebrand Faktor). Durch diese differente Lokalisation kann auch die Effektivität am Zielorgan beeinflusst werden (Horstman *et al.*, 2004b).

Als Methoden zur Identifizierung der MP werden bevorzugt die Durchflusszytometrie und ELISA eingesetzt (Lacroix *et al.*, 2010; Osumi *et al.*, 2001). Mit Hilfe von Antikörpermarkierungen können die MP ihrer Ursprungszelle zugeordnet werden, wobei die quantitative Erfassung nur mittels Durchflusszytometrie möglich ist. Die Methoden zur Bestimmung von MP sind bislang weder national noch international standardisiert.

Wie bereits erwähnt, sind die MP bei zahlreichen Erkrankungen von klinischer Relevanz. So werden unter anderem der Myokardinfarkt, die koronare Herzkrankheit, der Schlaganfall, die Niereninsuffizienz und thrombembolische Ereignisse durch einen massiven Anstieg von MP begleitet, wobei zwischen der Initialisierung des Krankheitsprozesses und dem Verlauf ein signifikanter Zusammenhang beschrieben wird. In der Pathogenese oben genannter Erkrankungen sind insbesondere thrombozytäre und endotheliale MP beteiligt, indem die oben genannten Krankheitsprozesse aktiviert werden (Boulanger *et al.*, 2007; Burnier *et al.*, 2009; George, 2008; VanWijk *et al.*, 2003).

Das Ziel der vorliegenden Studie war es, die MP für die Diagnostik, den Verlauf und die Prognose differenter kardialer Erkrankungen in Form eines Biomarkers nutzbar zu machen, wobei die peripartale Kardiomyopathie im Fokus der Betrachtung lag.

2.2 Zur klinischen Bedeutung der peripartalen Kardiomyopathie

Das Auftreten einer Herzinsuffizienz in der Phase des Puerperiums ist bereits in der Mitte des 19. Jahrhundert durch Ritchie beobachtet worden (Ritchie, 1849). 1937 erfolgte eine erste Publikation unter dem Titel „Ideopathic myocardial degeneration associated with pregnancy and especially the puerperium“ (Gouley, 1937), die in der Zeitschrift „The American Journal of the Medical Sciences“ veröffentlicht wurde. Der Begriff der peripartalen Kardiomyopathie (PPCM) wurde 1961 durch Seftel und Susser geprägt (Seftel und Susser, 1961). Das Krankheitsbild der peripartalen Kardiomyopathie fand in der Folgezeit eine zunehmende Aufmerksamkeit.

Die PPCM ist ein Krankheitsbild mit einer sehr heterogenen klinischen Präsentation und differentiellen geographischen Verteilung (Bachelier-Walenta *et al.*, 2013; Capriola, 2013; Sliwa *et al.*, 2010b). Die Inzidenz der PPCM wird mit 1 : 3189 Lebendgeburten in den USA (Mielniczuk *et al.*, 2006), 1 : 1000 in Südafrika (Desai *et al.*, 1995), 1 : 299 in Haiti (Fett *et al.*, 2005b) und 1 : 100 in Zaria/Nigeria (Fillmore und Parry, 1977) angegeben. Für Europa gibt es keine exakten Zahlen. Ausgehend von einer Inzidenz der PPCM von circa 1 : 3500 bis 1 : 1400 Geburten ergibt dies eine Häufigkeit von bis zu ca. 300 Patientinnen/Jahr in Deutschland - wovon wiederum 10% von einer schweren Herzinsuffizienz betroffen sind. Es besteht die Annahme, dass eine wesentlich höhere Erkrankungsrate vorliegt (Hilfiker-Kleiner *et al.*, 2008a).

Die Diagnose der PPCM basiert auf vier anerkannten primären diagnostischen Kriterien. Das betrifft die Entwicklung einer manifesten Herzinsuffizienz im letzten Monat der Schwangerschaft bis zu sechs Monaten postpartal, die Abwesenheit einer vorbestehenden Herzerkrankung, den Ausschluss einer anderweitigen Ursache der Herzinsuffizienz sowie eine systolischen Dysfunktion mit Einschränkung der linksventrikulären Ejektionsfraktion $< 45\%$, und/oder eine systolische Verkürzungsfraktion (FS) $< 30\%$ mit oder ohne Vergrößerung des linksventrikulären enddiastolischen Durchmessers (Demakis und Rahimtoola, 1971; Pearson *et al.*, 2000). Diese Kriterien wurden durch die European Society of Cardiology Working Group on peripartum cardiomyopathy 2010 im Wesentlichen übernommen, wobei der Zeitrahmen des Auftretens der PPCM weniger scharf eingegrenzt wurde (Sliwa *et al.*, 2010b).

Die Entwicklung der PPCM beruht auf der Basis einer multifaktoriellen Ätiologie (Bachelier-Walenta *et al.*, 2013; Hilfiker-Kleiner *et al.*, 2008b). Als Risikofaktoren für die Entstehung einer PPCM werden die ethnische Zugehörigkeit zur afrikanischen Rasse (Gentry *et al.*,

2010), kardiovaskuläre Risikofaktoren, insbesondere die arterielle Hypertension (Elkayam *et al.*, 2005; Gentry *et al.*, 2010; Witlin *et al.*, 1997), Schwangerschaftstoxikose (Demakis und Rahimtoola, 1971) bzw. Präeklampsie (Elkayam *et al.*, 2005; Witlin *et al.*, 1997), Schwangerschaften im späten reproduktiven Alter (Demakis und Rahimtoola, 1971), Multiparität (Demakis und Rahimtoola, 1971; Gentry *et al.*, 2010), Mehrlingsschwangerschaften (Demakis und Rahimtoola, 1971; Elkayam *et al.*, 2005), Einsatz von Tokolytika (Elkayam *et al.*, 2005; Lampert *et al.*, 1993), Autoimmunreaktionen (Ansari *et al.*, 2002), immunmodulierende Faktoren (Midei *et al.*, 1990) und genetische Veranlagung (Meyer *et al.*, 2010; Morales *et al.*, 2010; van Spaendonck-Zwarts *et al.*, 2010) betrachtet. Im Gegensatz dazu steht die Beobachtung, dass in 24 - 37% die PPCM bei jungen Erstgraviden ohne Vorerkrankungen auftritt (Elkayam *et al.*, 2005; Fett *et al.*, 2005b). Schon sehr frühzeitig wurde das Auftreten der PPCM im Zusammenhang mit den Laktationsmechanismen und Stressfaktoren gesehen. Ebenso wurde ein negativer Einfluss einer fortgeführten Laktation auf die Prognose der PPCM beschrieben (Seftel und Susser, 1961).

Die PPCM entspricht in ihrem klinischen und echokardiographischen Bild einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM), unterscheidet sich jedoch von dieser durch eine rasche Progression der Herzinsuffizienz, die die Notwendigkeit einer Herztransplantation erfordern kann bei einer Mortalität bis zu 50% (Pearson *et al.*, 2000; Whitehead *et al.*, 2003).

Die klinische Symptomatik präsentiert sich mannigfaltig. Im Vordergrund sind eine allgemeine Abgeschlagenheit und Antriebslosigkeit, Husten, Dyspnoe in Ruhe und vor allem bei Belastung, Beinödeme, Nykturie, Herzrhythmusstörungen und thrombembolische Ereignisse (Hilfiker-Kleiner *et al.*, 2008a; Sliwa *et al.*, 2010b). Diese Kriterien entsprechen dem Erscheinungsbild der klassischen Herzinsuffizienz. Die Abgrenzung gegenüber den typischen schwangerschaftsassozierten Beschwerden infolge der physiologischen Veränderungen ist unter Umständen schwierig. Es bedarf einer besonderen Aufmerksamkeit und Kenntnis des Krankheitsbildes, um die klinische Symptomatik zuzuordnen. Die physiologischen hämodynamischen Veränderungen in der Schwangerschaft sind gekennzeichnet durch die Vermehrung des zirkulierenden Blutvolumens um 40%, eine Zunahme des Herzminutenvolumens zwischen 30 - 50%, einen Anstieg der Herzfrequenz um 10 - 20 /min, eine 10%ige Zunahme des linksventrikulären enddiastolischen Volumens und eine erhöhte Gefäßpermeabilität bei Reduzierung des onkotischen Drucks (Geva *et al.*, 1997; Hunter und Robson, 1992; Koch, 2008). Des Weiteren besteht während der Schwangerschaft sowie insbesondere postpartal eine Hyperkoagulabilität mit dem daraus resultierenden erhöhten Thromboserisiko (Heit *et*

al., 2005). Diese physiologischen Veränderungen in der Schwangerschaft bedingen in der Regel die relativ späte Zuordnung der klinischen Symptomatik zur Herzinsuffizienz. Wegweisend für die Diagnostik des vorliegenden Krankheitsbildes ist der frühzeitige Einsatz der Echokardiographie (Hibbard *et al.*, 1999; Sliwa *et al.*, 2010b).

Eine Abgrenzung gegenüber anderweitigen kardialen Erkrankungen ist im Vorfeld der Diagnose PPCM erforderlich, weil die schwangerschaftsbedingten Volumen- und Druckveränderungen im Herzkreislaufsystem präexistierende kardiale Erkrankungen demaskieren können. Dabei ist zu beachten, dass die Maxima der Druck- und Volumenbelastung um die 30. Schwangerschaftswoche auftreten (Geva *et al.*, 1997). Schwangere mit vorbestehenden kardialen Erkrankungen werden dadurch relativ früh symptomatisch im Gegensatz zu Patientinnen mit PPCM, die ab dem letzten Schwangerschaftsmonat auftritt (Elkayam *et al.*, 2005).

In den letzten Jahren konnten verschiedene Pathomechanismen der PPCM entdeckt und weitgehend aufgeklärt werden. Es besteht Übereinstimmung, dass eine systemische angiogenetische Imbalance zur Entwicklung der PPCM führt oder zumindest beiträgt (Patten *et al.*, 2012). In experimentellen Studien und Tiermodellen konnte nachgewiesen werden, dass sowohl PGC-1 α , ein wichtiger Regulator der Angiogenese, sFlt1 und 16-kDa Prolaktin als Suppressor von VEGF, STAT3 als Schutzfaktor gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies als auch AT₁-Autoantikörper in den molekularen Prozess der Angiogenese eingreifen (Clapp *et al.*, 1993; Hilfiker-Kleiner *et al.*, 2007a; Patten *et al.*, 2012; Wallukat *et al.*, 1999). AT₁-Autoantikörper, die durch aktivierte Lymphozyten auf der Grundlage inflammatorischer Stimuli gebildet werden, greifen in den Prozess der sFlt1-Bildung im Sinne einer Erhöhung direkt ein (LaMarca, 2010). Die Folge ist wiederum die Erhöhung des anti-angiogenetischen Potentials sowie die Vasokonstriktion kleiner Gefäße (Yang *et al.*, 2013). PGC-1 α induziert die Expression und Sekretion pro-angiogenetischer Faktoren, vor allem von VEGF. PGC-1 α hat als Transkriptionsfaktor auch einen bedeutenden Einfluss auf metabolische Prozesse in verschiedenen Geweben, insbesondere im Herz. sFlt1 supprimiert VEGF und wirkt somit anti-angiogenetisch. Schwangere, die mit einer Präeklampsie behaftet sind (Prävalenz 3 - 5% (VanWijk *et al.*, 2000)) weisen wesentlich höhere sFlt1-Werte im Blut auf (Patten *et al.*, 2012). Das Protein STAT3 reguliert die mitochondriale Superoxiddismutase (MnSOD) und schützt das Herz vor reaktiven Sauerstoffspezies und resultierendem oxidativen Stress (Hilfiker-Kleiner *et al.*, 2007a; Negoro *et al.*, 2001). Eine eingeschränkte Funktion von STAT3 führt zur Freisetzung der Protease Cathepsin D aus den Lysosomen, die das normale Stillhormon 23-kDa Prolaktin in das biologisch aktive, anti-angiogene, pro-apoptotische und

pro-inflammatorische 16-kDa Prolaktin spaltet (Baldocchi *et al.*, 1993; Clapp *et al.*, 1993; Corbacho *et al.*, 2002; Hilfiker-Kleiner *et al.*, 2008b). Der Pathomechanismus der Initialisierung des Spaltungsprozesses von 23-kDa Prolaktin zu 16-kDa Prolaktin ist weiterhin nicht umfassend definiert. Übereinstimmend wird berichtet, dass die Cathepsin D-Aktivität eine entscheidende Rolle in der Formierung von 16-kDa Prolaktin spielt (Corbacho *et al.*, 2002; Hilfiker-Kleiner *et al.*, 2007a; Lkhider *et al.*, 2004). Der präzise Mechanismus der Wirkung von 16-kDa Prolaktin kann bisher nicht erklärt werden. 16-kDa Prolaktin wirkt spezifisch auf die Endothelzellen in Form der Reduzierung der Zellproliferation und -migration, blockiert den Progress der Zellzyklen und induziert eine endotheliale Apoptose (Tabruyn *et al.*, 2005; Tabruyn *et al.*, 2003), wobei der microRNA-146a eine Schlüsselfunktion zugeschrieben wird, deren Expression wiederum durch 16-kDa Prolaktin induziert wird (Halkein *et al.*, 2013). Die microRNA besteht aus kurzen, nicht-kodierenden 19 - 24 Nukleotiden langen RNA-Einzelsträngen, die eine posttranskriptionelle Modulation der Zielgenexpression bewirken. Es konnte nachgewiesen werden, dass microRNA-146a die metabolische Aktivität der Kardiomyozyten reduziert (Halkein *et al.*, 2013).

Da Prolaktin vor allem während der Schwangerschaft und Stillzeit von der Neurohypophyse freigesetzt wird, sind die peri- und postpartale Phase besonders prädisponiert für die Formierung von 16-kDa Prolaktin (Martin *et al.*, 1980). Das N-terminale 16-kDa Prolaktin beeinträchtigt die Mikrozirkulation im Myokardgewebe, wirkt als Vasokonstriktor und erniedrigt die metabolische Aktivität und die Kontraktionsfähigkeit der Kardiomyozyten. Daraus folgt eine deutlich eingeschränkte Pumpfunktion des Herzens mit den klinischen Zeichen einer PPCM (Corbacho *et al.*, 2002; Hilfiker-Kleiner *et al.*, 2007a).

Ausgehend von den beschriebenen Pathomechanismen konnte unter anderem gezeigt werden, dass Bromocriptin in seiner Eigenschaft als Dopamin-D2-Agonist die Ausschüttung von Prolaktin inhibiert und somit die pathogenetischen Folgeschritte in der Ausbildung der PPCM teilweise zu unterbrechen vermag (Hilfiker-Kleiner *et al.*, 2007a; Hilfiker-Kleiner *et al.*, 2007b; Jahns *et al.*, 2008; Sliwa *et al.*, 2010a).

Die Differenzierung zwischen PPCM, DCM, einer Myokarditis-assoziierten Herzinsuffizienz und anderen Formen der manifesten Herzinsuffizienz ist in dem beschriebenen Zeitfenster von fundamentaler Bedeutung, da die frühzeitige Diagnosestellung und Therapieeinleitung für die Prognose des Krankheitsbildes entscheidend sind (Felker *et al.*, 2000b).

Die therapeutischen Ansatzpunkte bei der manifesten Herzinsuffizienz sind unabhängig von der Ätiologie im Wesentlichen identisch. Das Medikamentenspektrum umfasst unter Beach-

tung der Kontraindikationen Diuretika (Schleifendiuretika), Betaadrenorezeptorenblocker, Angiotensin-Modulatoren (ACE-Hemmer, AT₁-Rezeptorantagonisten), Vasodilatoren (Hydralazin, Nitrate), Aldosteronantagonisten sowie Herzglykoside. Gegebenenfalls kann der Einsatz von Antiarrhythmika und Antikoagulantien erforderlich werden (Blauwet und Cooper, 2011; Stewart, 2012).

Die diagnostische Zuordnung zur PPCM wird auch dadurch definiert, dass ein Therapieerfolg bei additiver Gabe von Bromocriptin, einem Inhibitor der Prolaktinsekretion, gesehen werden kann. In einer Pilotstudie bei Patientinnen mit PPCM konnte nachgewiesen werden, dass unter Bromocriptin-Therapie die 6-Monats-Mortalitätsrate von 40% auf 10% reduziert werden konnte (Sliwa *et al.*, 2010a). Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass diese Therapie für die Langzeitprognose von Patientinnen mit PPCM bedeutsam ist (Hilfiker-Kleiner *et al.*, 2007a). In Tiermodellen konnte an PGC-1 α Knockout-Mäusen gezeigt werden, dass durch die Gabe von VEGF und Bromocriptin in allen Fällen eine Ausheilung der induzierten PPCM erreicht wurde (Patten *et al.*, 2012).

Die PPCM ist eine Ausschlussdiagnose, da keine wirklich definierten Kriterien zur Abgrenzung insbesondere gegenüber DCM und anderen Formen der Herzinsuffizienz zur Verfügung stehen. Lediglich das beschriebene Zeitfenster ist ein wichtiger Hinweis, dass es sich um eine PPCM handeln kann (Sliwa *et al.*, 2010b).

Die PPCM zeigt eine Spontanheilungsrate in Abhängigkeit vom Schweregrad der Kardiomyopathie und kann im Einzelfall zur vollständigen Reversibilität geführt werden (Sliwa *et al.*, 2006a).

Die Aussagen zur Mortalität bei der PPCM sind abhängig vom eingeschlossenen Patientenkollektiv und Beobachtungszeitraum und divergieren entsprechend in den verschiedenen Studien zwischen 0 - 50% (Amos *et al.*, 2006; Brar *et al.*, 2007; Duran *et al.*, 2008; Elkayam *et al.*, 2005; Felker *et al.*, 2000a; Fett *et al.*, 2005b; Mielniczuk *et al.*, 2006; Sliwa *et al.*, 2010b; Whitehead *et al.*, 2003; Witlin *et al.*, 1997). Die Prognose für PPCM-Patientinnen ist abhängig von der Normalisierung der Größe und Funktion des linken Ventrikels (Biteker *et al.*, 2012; Demakis und Rahimtoola, 1971; Demakis *et al.*, 1971; Sliwa *et al.*, 2006b). In einer Studie zeigten 13 von 27 Frauen mit PPCM eine persistierende eingeschränkte linksventrikuläre Funktion. In dieser Gruppe lag die Mortalitätsrate bei 85% innerhalb von 5 Jahren. Dem gegenüber standen keine kardial zu assoziierenden Todesfälle bei den Patientinnen, deren Herzgröße sich im Beobachtungszeitraum von durchschnittlich 10,7 Jahren normalisierte (Demakis *et al.*, 1971). In einer prospektiven Studie in Südafrika mit 100 Patientinnen ver-

starben 15% und nur 23% erreichten eine normale linksventrikuläre Funktion nach einer sechsmonatigen Behandlung (Sliwa *et al.*, 2006b).

Die vollständige kardiale Erholung ist nicht auf 6 - 12 Monate limitiert, so dass Spätheilungen durchaus auftreten können (Biteker *et al.*, 2012; Fett *et al.*, 2005b; Sliwa *et al.*, 2006a). Dies hat insbesondere für wiederholte Schwangerschaften Bedeutung, da es bei zahlreichen Patientinnen zum erneuten Auftreten der PPCM kommt, wobei diese Patientinnen eine wesentlich schlechtere Prognose erfahren (Demakis *et al.*, 1971; Elkayam *et al.*, 2001; Witlin *et al.*, 1997). Entscheidend für die Prognose ist die linksventrikuläre Ejektionsfraktion vor Beginn der Schwangerschaft (Demakis *et al.*, 1971; Sliwa *et al.*, 2006a; Sutton *et al.*, 1991).

2.3 Fragestellung der Arbeit

Wegen der großen Bedeutung des Krankheitsbildes der peripartalen Kardiomyopathie (PPCM) ist die frühzeitige Erkennung von entscheidender Bedeutung für junge Mütter und deren Familien aufgrund des oft schweren Verlaufes mit Herzinsuffizienz und Todesfolge.

Der kürzlich identifizierte Mechanismus eines 16-kDa Prolaktinspaltproduktes eröffnete die Hypothese, dass durch den verursachten endothelialen Schaden endotheliale Mikropartikel (MP) einen diagnostischen Zugang zur PPCM über die Bestimmung und Quantifizierung der MP ermöglichen.

Ziel der vorliegenden Studie war die Bestimmung und Quantifizierung von MP inklusive deren zellspezifischer Charakterisierung, um die Bedeutung der MP als Biomarker für die Beurteilung der PPCM definieren zu können (Walenta *et al.*, 2012). Insbesondere war die Fragestellung darauf gerichtet, ob ein spezifisches MP-Profil für die PPCM existiert und eine sichere Abgrenzung zu gesunden postpartalen Frauen, gesunden schwangeren Frauen, gesunden nicht-schwangeren Frauen, Patienten mit dilatativer oder ischämischer Kardiomyopathie, Patienten mit koronarer Herzkrankheit und einer entsprechenden altersäquivalenten herzgesunden Population erlaubt.

3 Material und Methoden

3.1 Patientenkollektiv

3.1.1 Mikropartikel bei Patientinnen mit peripartaler Kardiomyopathie, gesunden postpartalen Frauen, gesunden schwangeren Frauen, gesunden nicht-schwangeren Frauen, Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie, Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit und gesunden altersäquivalenten Kontrollen

Patienten wurden durch eine Kooperation an verschiedenen Klinikstandorten in die Studie eingeschlossen.

Patientinnen mit peripartaler Kardiomyopathie (PPCM) sowie alterskorrelierte gesunde postpartale Frauen (PPCTR) wurden an der Medizinischen Hochschule Hannover eingeschlossen (Tabelle 3-1). Die Patientinnen mit PPCM befanden sich zum Zeitpunkt der Aufnahme im NYHA-Stadium III oder IV und wurden entsprechend den Leitlinien behandelt (McMurray et al., 2012). Die Blutentnahme bei PPCTR erfolgte < 72 h nach Entbindung.

Ebenso eingeschlossen wurden alterskorrelierte gesunde schwangere Frauen, die zum Zeitpunkt der Blutentnahme das dritte Trimenon erreicht hatten (PCTR) und gesunde nicht-schwangere Frauen (NPCTR). Patienten mit symptomatischer ischämischer Kardiomyopathie (ICM) und den klinischen Zeichen der kardialen Dekompensation wurden ebenso wie Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit (CAD) alterskorrelierten gesunden Kontrollen (HCTR) gegenübergestellt. Die vorgenannten Gruppen wurden am Universitätsklinikum des Saarlandes in Homburg in die Studie aufgenommen (Tabelle 3-1).

Tabelle 3-1. Patientenkollektiv 1 / 2

Abkürzung	Patientengruppe	Anzahl
PPCM	peripartale Kardiomyopathie ♀	n=24
PPCTR	gesunde postpartale Frauen ♀	n=18
PCTR	gesunde schwangere Frauen ♀	n=18
NPCTR	gesunde nicht-schwangere Frauen ♀	n=19
ICM	ischämische Kardiomyopathie ♀♂	n=17
CAD	stabile koronare Herzkrankheit ♀♂	n=20
HCTR	gesunde Kontrollen ♀♂	n=22

3.1.2 Mikropartikel bei Patientinnen mit peripartaler Kardiomyopathie mit und ohne Bromocriptin-Therapie

Darüber hinaus bestand die Möglichkeit, Blutplasma von Patientinnen mit PPCM und divergierenden Therapieoptionen vergleichend zu untersuchen. Hierbei handelte es sich um die identische Patientinnenpopulation, deren Ergebnisse bereits veröffentlicht wurden (Sliwa *et al.*, 2010a). Alle Patientinnen dieser Studie wurden im Chris Hani Baragwanath Hospital, Johannesburg, Südafrika, eingeschlossen. Die Patientinnen wurden binnen 24 h nach Erstdiagnose in die Studie eingeschlossen und mittels Computer-Randomisation auf die beiden Studiengruppen aufgeteilt. Alle Patientinnen erhielten die gleiche Herzinsuffizienz-Therapie in Form von Furosemid und Enalapril. Die Dosierung wurde dem klinischen Bild angepasst. In der Phase der Besserung wurde zusätzlich Carvedilol eingesetzt. Die 10 Patientinnen, die für die Standardtherapie randomisiert wurden (PPCM-BRCTR), erhielten vorstehend genannte Therapie. Die andere Studiengruppe erhielt zusätzlich zur vorgenannten Medikation Bromocriptin (PPCM-BR) (Tabelle 3-2). Dies wurde zunächst zweimal täglich zu je 2,5 mg über 2 Wochen verabreicht, anschließend 2,5 mg täglich für weitere 6 Wochen.

Tabelle 3-2. Patientenkollektiv 2 / 2

Abkürzung	Patientengruppe	Anzahl
PPCM-BR	PPCM mit Bromocriptin-Behandlung ♀	n=10
PPCM-BRCTR	PPCM ohne Bromocriptin-Behandlung ♀	n=10

3.1.3 Demographische und klinische Daten

Nach vorheriger schriftlicher Einwilligung der Patienten zur Aufnahme in die Studie wurde je ca. 10 ml peripher-venöses Blut bei allen 158 eingeschlossenen Patienten asserviert. Die demographischen sowie klinischen Daten der Studienpatienten sind aus der Tabelle 3-3 bis Tabelle 3-6 zu ersehen.

Tabelle 3-3. Klinische und echokardiographische Charakteristika der Patientinnen mit peripartaler Kardiomyopathie, gesunden postpartalen Frauen, gesunden schwangeren Frauen, gesunden nicht-schwangeren Frauen, Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie, Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit und gesunden altersäquivalenten Kontrollen

	PPCM (n=24)	PPCTR (n=18)	PCTR (n=18)	NPCTR (n=19)	ICM (n=17)	CAD (n=20)	HCTR (n=22)
Klinische Parameter							
Alter (Jahre) ± SD	33 ± 7	30 ± 7	31 ± 6	30 ± 7	71 ± 8	71 ± 8	71 ± 8
Geschlecht (♂ : ♀)	0 : 24	0 : 18	0 : 18	0 : 19	10 : 7	12 : 8	12 : 10
Echokardiographische Parameter							
LVEDD (mm)	n.d.	n.d.	41 ± 6	42 ± 4	60 ± 3	50 ± 6	53 ± 5
LVESD (mm)	n.d.	n.d.	26 ± 4	27 ± 3	46 ± 2	32 ± 9	37 ± 4
IVSD (mm)	n.d.	n.d.	11 ± 2	11 ± 1	13 ± 2	16 ± 3	15 ± 2
IVDD (mm)	n.d.	n.d.	9 ± 1	9 ± 1	11 ± 1	13 ± 2	11 ± 1
LVPWD (mm)	n.d.	n.d.	10 ± 1	10 ± 1	10 ± 1	12 ± 1	11 ± 2
LVPS (mm)	n.d.	n.d.	12 ± 1	12 ± 1	15 ± 2	16 ± 5	12 ± 5
FS (%)	13 ± 5	n.d.	35 ± 4	35 ± 4	23 ± 3	31 ± 3	38 ± 7
LVEF (%)	26 ± 12	n.d.	n.d.	n.d.	40 ± 6	74 ± 12	83 ± 9
Mitralklappenregurgitation (n)							
Grad I	6	n.d.	1	1	6	4	3
Grad II	13	n.d.	0	0	4	2	2
Grad III	5	n.d.	0	0	2	0	0
Grad IV	0	n.d.	0	0	0	0	0

±-Werte bezeichnen die Standardabweichung; n, Anzahl; n.d., keine Daten; LVEDD, linksventrikulärer enddiastolischer Diameter; LVESD, linksventrikulärer endsystolischer Diameter; IVSD, interventrikulärer endsystolischer Diameter; IVDD, interventrikulärer enddiastolischer Diameter; LVPWD, linksventrikuläre diastolische Hinterwanddicke; LVPS, linksventrikuläre systolische Hinterwanddicke; FS, Verkürzungsfraktion; LVEF, linksventrikuläre Ejektionsfraktion; PPCM, peripartale Kardiomyopathie; PPCTR, gesunde postpartale Frauen; PCTR, gesunde schwangere Frauen; NPCTR, gesunde nicht-schwangere Frauen; ICM, ischämische Kardiomyopathie; CAD, stabile koronare Herzkrankheit; HCTR, gesunde Kontrollen.

Tabelle 3-4. Laborchemische Charakteristika der Patientinnen mit peripartaler Kardiomyopathie, gesunden postpartalen Frauen, gesunden schwangeren Frauen, gesunden nicht-schwangeren Frauen, Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie, Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit und gesunden altersäquivalenten Kontrollen

	PPCM (n=24)	PPCTR (n=18)	PCTR (n=18)	NPCTR (n=19)	ICM (n=17)	CAD (n=20)	HCTR (n=22)
Laborparameter							
CK (U/L)	283 ± 420	0 ± 0	0 ± 0	110 ± 14	46 ± 19	73 ± 6	79 ± 5
CK-MB (U/L)	30 ± 10	0 ± 0	0 ± 0	< 14	14 ± 2	15 ± 2	< 14
ASAT (U/L)	120 ± 284	0 ± 0	0 ± 0	11 ± 5	56 ± 61	40 ± 21	22 ± 9
ALAT (U/L)	104 ± 178	0 ± 0	0 ± 0	20 ± 5	28 ± 10	43 ± 23	17 ± 5
LDH (U/L)	501 ± 453	0 ± 0	0 ± 0	120 ± 45	251 ± 31	193 ± 35	193 ± 62
Kreatinin (mg/dl)	1,12 ± 0,81	0 ± 0	0 ± 0	1 ± 0	3 ± 5	1 ± 0	1 ± 0
Troponin (ng/ml)	0,6 ± 1,0	< 0,01	< 0,01	< 0,01	1,2 ± 0,06	< 0,01	< 0,01
NT-proBNP (pg/ml)	5860 ± 6274	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	12769 ± 420	0 ± 0	1077 ± 769
CRP (mg/dl)	46 ± 72	0 ± 0	0 ± 0	4 ± 1	2 ± 19	3 ± 2	4 ± 2
Fibrinogen (mg/dl)	199 ± 2	0 ± 0	0 ± 0	42 ± 15	519 ± 17	364 ± 34	471 ± 14

±-Werte bezeichnen die Standardabweichung; n, Anzahl; CK, Kreatinkinase; CK-MB, Kreatinkinase vom Myokardtyp; ASAT, Aspartat-Transaminase; ALAT, Alanin-Transaminase; LDH, Laktatdehydrogenase; NT-pro-BNP, N-terminales natriuretisches Peptid Typ B; CRP, C-reaktives Protein; PPCM, peripartale Kardiomyopathie; PPCTR, gesunde postpartale Frauen; PCTR, gesunde schwangere Frauen; NPCTR, gesunde nicht-schwangere Frauen; ICM, ischämische Kardiomyopathie; CAD, stabile koronare Herzkrankheit; HCTR, gesunde Kontrollen.

Tabelle 3-5. Klinische und echokardiographische Charakteristika der Patientinnen mit peripartaler Kardiomyopathie

	PPCM-BR (n=10)	PPCM-BRCTR (n=10)
Klinische Parameter		
Alter (Jahre) ± SD	24 ± 6	28 ± 10
Geschlecht (♂ ♀)	0 : 10	0 : 10
Echokardiographische Parameter		
LVEDD (mm)	55 ± 10	59 ± 5
LVESD (mm)	46 ± 9	52 ± 6
IVSD (mm)	n.d.	n.d.
IVDD (mm)	n.d.	n.d.
LVPWD (mm)	n.d.	n.d.
LVPS (mm)	n.d.	n.d.
FS (%)	n.d.	n.d.
LVEF (%)	27 ± 8	26 ± 8
Mitralklappen- regurgitation (n)		
Grad I	1	2
Grad II	7	7
Grad III	2	1
Grad IV	0	0

±-Werte bezeichnen die Standardabweichung; n, Anzahl; n.d., keine Daten; LVEDD, linksventrikulärer enddiastolischer Diameter; LVESD, linksventrikulärer endsystolischer Diameter; IVSD, interventrikulärer endsystolischer Diameter; IVDD, interventrikulärer enddiastolischer Diameter; LVPWD, linksventrikuläre diastolische Hinterwanddicke; LVPS, linksventrikuläre systolische Hinterwanddicke; FS, Verkürzungsfraktion; LVEF, linksventrikuläre Ejektionsfraktion; PPCM-BRCTR, peripartale Kardiomyopathie unter Standard-Herzinsuffizienztherapie; PPCM-BR, additive Bromocriptin-Therapie.

Tabelle 3-6. Laborchemische Charakteristika der Patientinnen mit peripartaler Kardiomyopathie

	PPCM-BR (n=10)	PPCM-BRCTR (n=10)
Laborparameter		
CK (U/L)	n.d.	n.d.
CK-MB (U/L)	n.d.	n.d.
ASAT (U/L)	31 ± 12	50 ± 27
ALAT (U/L)	44 ± 56	57 ± 27
LDH (U/L)	n.d.	n.d.
Kreatinin (mg/dl)	0,7 ± 1,0	0,6 ± 1,1
Troponin (ng/ml)	0,8 ± 1,0	0,7 ± 0,6
NT-proBNP (pg/ml)	10310 ± 16986	8992 ± 10644
CRP (mg/dl)	22 ± 37	18 ± 20
Fibrinogen (mg/dl)	n.d.	n.d.
Prolaktin (µg/L)	51 ± 71	56 ± 50

±-Werte bezeichnen die Standardabweichung; n, Anzahl; n.d., keine Daten; CK, Kreatinkinase; CK-MB, Kreatinkinase vom Myokardtyp; ASAT, Aspartat-Transaminase; ALAT, Alanin-Transaminase; LDH, Laktatdehydrogenase; NT-pro-BNP, N-terminales natriuretisches Peptid Typ B; CRP, C-reaktives Protein; PPCM-BRCTR, peripartale Kardiomyopathie unter Standard-Herzinsuffizienztherapie; PPCM-BR, additive Bromocriptin-Therapie.

3.2 Ethik-Komitee

Ein positives Votum des zuständigen Ethik-Komitees war vor Studienbeginn vorliegend. Der Eintrag wurde als „Homburger Herzinsuffizienzregister 122/09“ registriert.

3.3 Geräte und Hilfsmittel

Tabelle 3-7. Geräte und Hilfsmittel

Bezeichnung	Hersteller
Autoklav Tuttnauer Systec 3850 EL	Tuttnauer Europe B.V. , Breda, Niederlande
Computer inklusive Zubehör Power Mac G4 Laptop Sony VAIO	Apple, Kalifornien (USA) Sony Europe Limited, Berlin
Durchflusszytometer BD FACSCalibur™	BD Biosciences, Heidelberg
Eismaschine	ZIEGRA Eismaschinen GmbH, Isernhagen
Gefrierschränke -20°C, Liebherr Profi Line -80°C, Thermo Scientific HERAFreeze	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riss Heraeus Holding GmbH, Hanau
Kühlschrank Liebherr Economy	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riss
Magnetrührer RCT	Jahnke & Kunkel GmbH & Co. KG, IKA® Labortechnik, Staufen im Breisgau
pH-mV-Meter, pH 526	WTW, Weilheim
Pipetten Eppendorf Research® 0,5-10 µl 10-100 µl 100-1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Vortex VF2	Jahnke & Kunkel GmbH & Co. KG, IKA® Labortechnik, Staufen im Breisgau
Waagen Acculab ALC-Series 0.0001 g Analytical Balances VICON, VIC-Series 0.01 g Precision Balances	Sartorius AG, Göttingen Sartorius AG, Göttingen
Wärmeschrank Heraeus® Function line	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (USA)
Zentrifugen Megafuge 1.0 Megafuge 1.0R Sigma Laborzentrifuge 1K15	Heraeus instruments GmbH, Osterode am Harz Thermo Electron Corporation, Osterode am Harz SIGMA Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz

3.4 Reagenzien und Chemikalien

Tabelle 3-8. Reagenzien und Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Calciumchloriddihydrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
di-Natriumphosphat (Na_2HPO_4)	Merck KGaA, Darmstadt
Flächendesinfektionsmittel antisept®	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt
Kaliumchlorid zur Analyse EMSURE® (KCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat zur Analyse EMSURE® ISO (KH_2PO_4)	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumhydroxid (KOH)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure, HEPES analytical grade	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck KGaA, Darmstadt
Wasser vollentsalzt und destilliert (Aqua dest.)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen

3.5 Beads

Tabelle 3-9. Beads

Bezeichnung	Hersteller
Latex Beads, mean particle size 3,0µm	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
BD Calibrite™ BD Calibrite 3 Beads BD Calibrite APC Beads	BD Biosciences, Heidelberg

3.6 Marker-Proteine und Fluorochrom-Markierung

Tabelle 3-10. Marker-Proteine und Fluorochrom-Markierung

Marker-Protein	Erfasster Zelltypus	Spezies	Bezugsquelle
CD144 ≙ VE-Cadherin (vascular endothelial cadherin)	spezifisch für Endothelzellen (Adhäsionsmolekül)	Kaninchen	Acris Antibodies, Herford
CD62E ≙ E-Selektin, endothelial leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1)	spezifisch für aktivierte Endothelzellen	Maus	R&D Systems, Minneapolis (USA)
CD31 ≙ platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1)	insbesondere endotheliale Zellen, auch Thrombozyten, Monozyten und Granulozyten	Maus	BD Biosciences, Heidelberg
CD42b ≙ GP-Ib alpha	Thrombozyten und Megakaryozyten	Maus	BD Biosciences, Heidelberg
CD62P ≙ P-Selektin, platelet activation-dependent granule, external membrane protein (PADGEM)	aktivierte Thrombozyten	Maus	BD Biosciences, Heidelberg
CD45 ≙ Leucocyte Common Antigen	Leukozyten	Maus	BD Biosciences, Heidelberg
CD14	insbesondere Monozyten, auch interfollikuläre Makrophagen, retikuläre dendritische Zellen und Langerhans-Zellen	Maus	BD Biosciences, Heidelberg
Annexin V	erfasst Phosphatidylserin, ein sensitiver Marker für apoptotische Zellen	rekombinant	BD Biosciences, Heidelberg

Tabelle 3-11. Fluorochrom-Markierung

Fluorochrom	Marker-Protein
FITC (Fluoresceinisothiocyanat)	CD62E, CD14, CD62P, CD144
PE (Phycoerythrin)	CD31, CD42b, CD45
APC (Allophycocyanin)	Annexin V

3.7 Verbrauchsmittel

Tabelle 3-12. Verbrauchsmittel

Bezeichnung	Hersteller
BD FACST TM BD FACS Flow Sheath Fluid	BD Biosciences, Heidelberg
BD FACST TM BD FACS Clean Solution BD FACS Rinse Solution	BD Biosciences, Heidelberg
BD Falcon TM Conical Tubes Screw Caps, 50 ml Conical Tubes, 15 ml Round-Bottom Tube, 5 ml	BD Biosciences, Heidelberg
Einmalspritzen Injekt [®] , 20 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Eis	Aus eigener Produktion
Eppendorf Safe-Lock Gefäße TM , 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Handschuhe Peha-soft [®] , satin, S-M-L	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Meßkolben, 50 ml, 100 ml	VWR International GmbH, Darmstadt
Parafilm "M" [®] Laboratory Wrapping Film	Pechiney Plastic Packaging, Chicago (USA)
Pipettenspitzen 10 µl 100 µl, 1000 µl	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Präzisionswischtücher KIMTECH Science	Kimberly Clark GmbH, Koblenz
Rotilabo [®] -Spritzenfilter, CME, 0,22 µm	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
safePICO Aspirator	Radiometer GmbH, Willich
Safety-Multifly [®] -Set, „Butterfly“	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht
Serologische Pipetten, 10 ml	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht
S-Monovette [®] Kalium-EDTA Natrium-Citrat Plasma bzw. Plasma-Gel (Lithium-Heparin) Serum bzw. Serum-Gel	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht
Softasept [®] N, Hautdesinfektion	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
steriCLIN [®] , Klebeband	Vereinigte Papierwarenfabriken GmbH, Feuchtwangen
Transferpipetten, 3 ml	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht

3.8 Lösungen

Tabelle 3-13. Lösungen

Lösung	Zusammensetzung	
	Substanz	Menge
Binding Buffer 10fach konzentriert		
	Hepes	1,19 g
	Aqua dest.	35 ml
	pH 7,4 mit NaOH einstellen	
	NaCl	4,091 g
	CaCl ₂ * 2 H ₂ O	0,183 g
	Aqua dest.	auf 50 ml auffüllen
	steril filtrieren, Aufbewahrung bei 4°C.	
Phosphate buffered saline (PBS), 1fach konzentriert		
	NaCl	8,0 g
	KCl	0,2 g
	KH ₂ PO ₄	0,24 g
	Na ₂ HPO ₄	1,44 g
	Aqua dest.	900 ml
	pH 7.2 mit KOH einstellen, auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen, anschließend autoklavieren, Aufbewahrung bei Raumtemperatur.	

3.9 Computer-Software

Tabelle 3-14. Computer-Software

Bezeichnung	Anbieter
Cellquest™ Pro 3.5	BD Biosciences, Heidelberg
Klinikinformationssystem SAP R/3 IS-H/i.s.h.med	SAP Deutschland AG & Co. KG, Walldorf
Microsoft® Office Excel 2003	Microsoft Corporation, Redmond, Washington (USA)
Microsoft® Office PowerPoint® 2003	Microsoft Corporation, Redmond, Washington (USA)
Microsoft® Office Word 2003	Microsoft Corporation, Redmond, Washington (USA)
Microsoft® Windows 7, Paint	Microsoft Corporation, Redmond, Washington (USA)
SigmaPlot 10.0	Systat Software Inc. (SSI), San José, Kalifornien (USA)
SigmaStat 3.5	Systat Software Inc. (SSI), San José, Kalifornien (USA)

3.10 Statistische Auswertung

Die angegebenen Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Kontinuierliche Variablen wurden auf Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov-Test und vergleichend mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (two-way-ANOVA [=analysis of variance]) getestet, gefolgt von einem paarweisen Bonferroni Post-Hoc-Test. Die Varianzhomogenität wurde mittels Levene Test überprüft. Statistische Signifikanz wurde für $p < 0,05$ angenommen. Annahmen von Normalverteilung und Varianzhomogenität wurden von der Statistiksoftware SigmaStat geprüft. Die Normalverteilung der Parameter (NT-proBNP, CRP) wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test geprüft. Beide Parameter zeigten Normalverteilung, weshalb diese als Mittelwert \pm SD angegeben wurden. Statistische Analysen wurden unter Verwendung der Software SigmaStat, Version 3.5 durchgeführt. Alle Datenanalysen wurden verblindet durchgeführt.

3.11 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um eine Methode zur Analyse von Einzelzellen bzw. Einzelpartikeln in Suspensionen auf der Grundlage ihrer Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften.

In der vorliegenden Dissertation wird die Durchflusszytometrie wiederholt als FACS bezeichnet. FACS steht für „fluorescence activated cell sorting“, ist jedoch eine geschützte Handelsmarke des Geräteherstellers Becton Dickinson. Während bei der herkömmlichen Durchflusszytometrie lediglich die Zelleigenschaften analysiert werden, können beim FACS darüber hinaus die Zellen anhand ihrer Eigenschaften sortiert und gegebenenfalls auch wiedergewonnen werden. Die im Rahmen dieser Versuchsreihe durchgeführten Messungen erfolgten an einem BD FACSCalibur™ in seiner Eigenschaft als Durchflusszytometer.

3.11.1 Funktionsweise

Das Durchflusszytometer besteht aus einem System zur Probeneingabe, dem optischen System mit Lichtquellen und Detektorsystem sowie einer Computer-basierten Datenverarbeitung.

Das Funktionsprinzip der FACS-Analyse basiert auf der zeitgleichen Messung der Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften von Zellsuspensionen, die zusätzlich mit ein oder mehreren Fluorochromen versetzt sein können. Es wird ermöglicht, Bestandteile einer Suspension entsprechend ihrer Größe, Granularität und Fluoreszenzeigenschaften zu erfassen.

Die zu analysierende Suspension wird beim Ansaugen aus dem Probenröhrchen in die Messeinheit von einer laminar strömenden Trägerflüssigkeit, wie beispielsweise BD FACS Flow Sheath Fluid, erfasst. Durch den Fluss der Trägerflüssigkeit vereinzeln die Zellen und werden auf diese Weise perlschnurartig an einem Laser vorbeigeführt. Dieses in Abbildung 3-1 dargestellte Prinzip wird als hydrodynamische Fokussierung bezeichnet.

Der Überdruck, mit dem die Flüssigkeit durch die Stahlkapillare eingesaugt wird, kann zwischen einer niedrigen (12 $\mu\text{L}/\text{min}$), mittleren (35 $\mu\text{L}/\text{min}$) und hohen Geschwindigkeit (60 $\mu\text{L}/\text{min}$) reguliert werden. Um eine möglichst scharfe Trennung der MP im schnellen Flüssigkeitsstrom zu erreichen, wurde für die Messung der Mikropartikel eine niedrige Durchflussgeschwindigkeit gewählt.

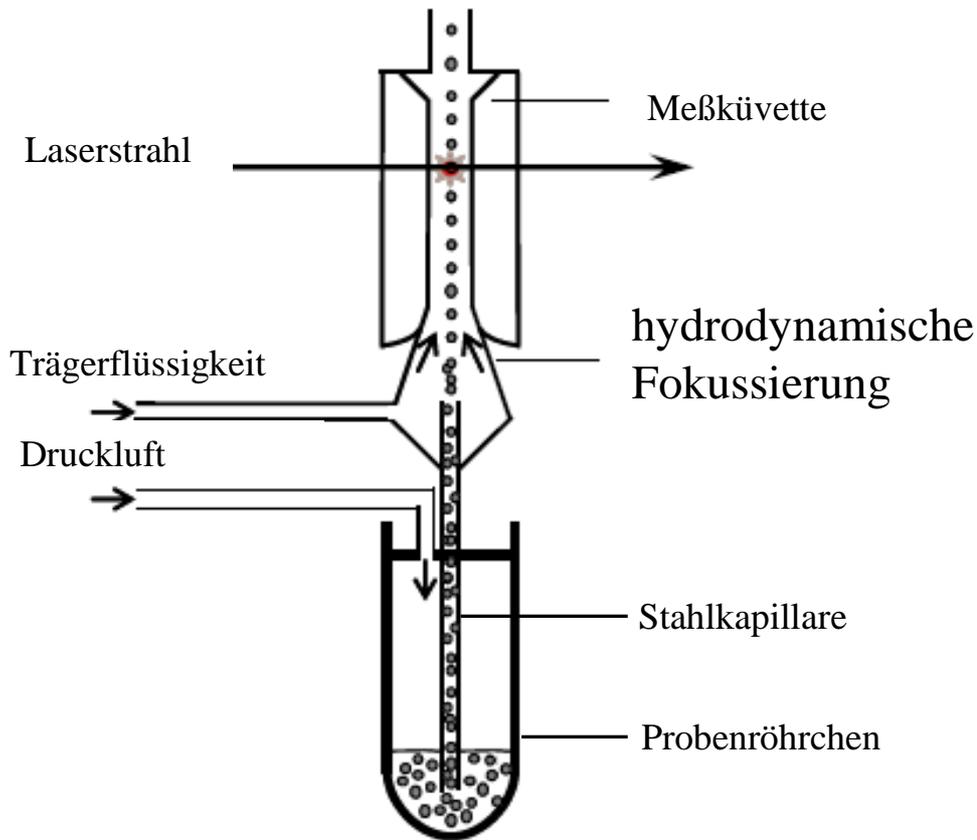


Abbildung 3-1. Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung

Durch den Fluss der Trägerflüssigkeit vereinzeln die aus dem Probenröhrchen angesaugten Zellen und werden auf diese Weise perlschnurartig an einem Laser vorbeigeführt.

Modifiziert nach Köppler (Köppler, 2005)

Als Lichtquelle dienen ein blauer Argon-Ionen-Laser (Emissionswellenlänge $\lambda = 488 \text{ nm}$) sowie der in diesem Versuchsaufbau ebenfalls verwendete rote Diodenlaser (Emissionswellenlänge $\lambda = 635 \text{ nm}$). Der ausgehende Lichtstrahl wird durch Linsen gebündelt und fokussiert. Die Messung der Lichtstreuung wird durch die Richtungsänderung des anregenden Lichtes ermöglicht - abhängig von Zellgröße, Membranstruktur und intrazellulären Bestandteilen. Das BD FACSCalibur™ hat zwei Streulicht-Detektoren und unterscheidet hierbei zwischen Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht. Vorwärtsstreulicht (FSC = forward scatter) entspricht dem einfallenden Lichtstrahl in einem Winkel von $0 - 10^\circ$; der Winkel korreliert positiv mit der Größe des untersuchten Partikels. Seitwärtsstreulicht (SSC = side scatter) wird im 90° - Winkel des einfallenden Lichtstrahls detektiert; der Winkel korreliert positiv mit der Granularität des untersuchten Partikels.

Im gleichen Analyseverfahren können parallel weitere Partikeleigenschaften mittels Fluoreszenzmessung erfasst werden. Hierzu muss die entsprechende Suspension zuvor mittels Fluor-

reszenzfarbstoffen angefärbt worden sein. Diese werden proteinvermittelt an spezifische Oberflächenmoleküle des korrespondierenden Partikels gebunden. Eine Korrelation mehrerer Partikeleigenschaften ist durch simultane Erfassung von Fluoreszenzcharakteristika bei divergierenden Fluorochromen möglich. Das BD FACSCalibur™ hat vier Fluoreszenz-Detektoren und unterscheidet zwischen grünen, gelben, orangenen und roten Regionen im Farbspektrum (Abbildung 3-2).

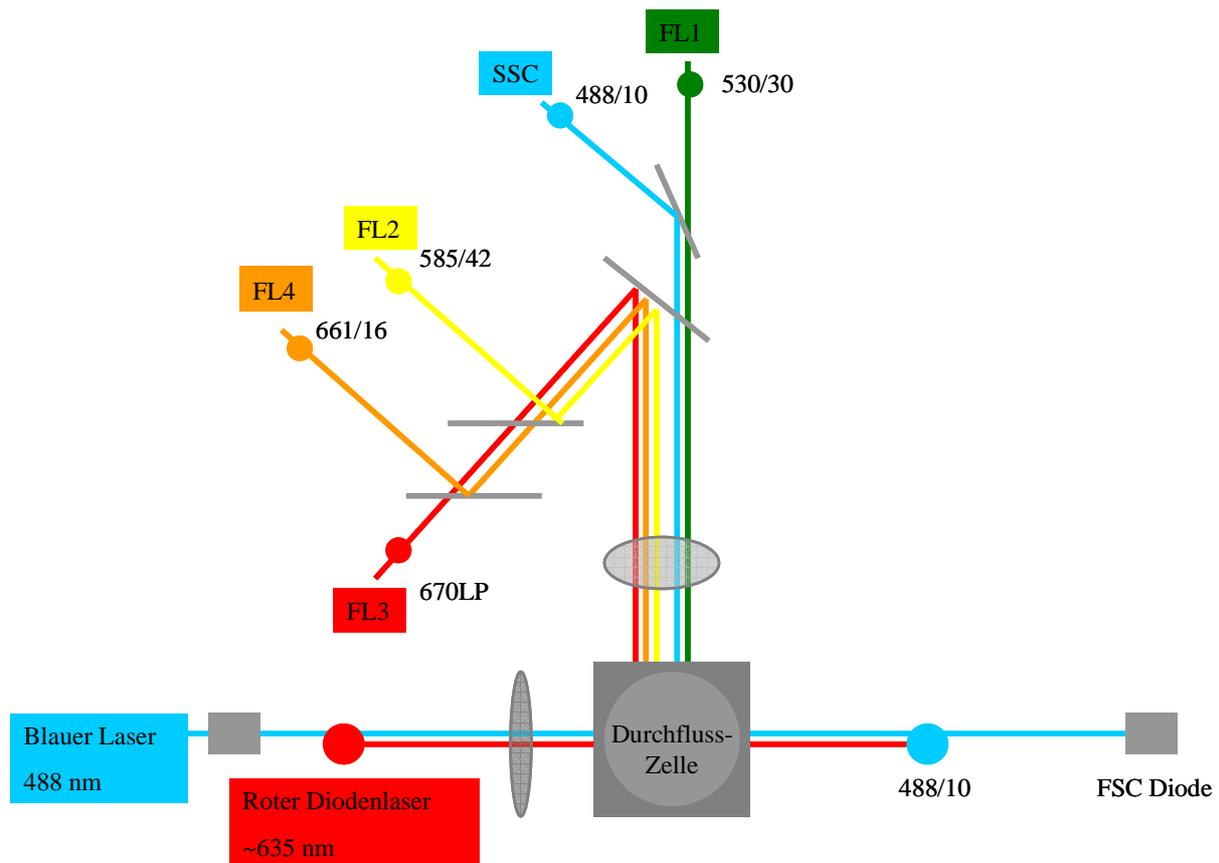


Abbildung 3-2. Prinzip der Durchflusszytometrie

Als Lichtquelle dienen ein blauer Argon-Ionen-Laser (Emissionswellenlänge $\lambda=488\text{nm}$) sowie ein roter Diodenlaser ($\lambda=635\text{ nm}$). Der ausgehende Lichtstrahl wird durch Linsen gebündelt und fokussiert. Detektion des Vorwärtsstreulichts (FSC) erfolgt über FSC-Diode, des Seitwärtsstreulichts mittels SSC-Detektor. Fluoreszenzen werden mittels der Detektoren für Fluoreszenzen (FL) erfasst. FL1 erfasst FITC-Fluoreszenzen (Bandbreitenfilter 530 nm), FL2 PE/PI -Fluoreszenzen (Bandbreitenfilter 585 nm) und FL3 PerCP-Fluoreszenzen (Bandbreitenfilter $> 670\text{ nm}$) des blauen Lasers. FL4 erfasst APC-Fluoreszenzen (Bandbreitenfilter 661 nm), zugrunde liegt der rote Laser.

Nach BD Biosciences, Heidelberg

Fluoreszenzfarbstoffe überschneiden sich in kleineren Bereichen (Abbildung 3-3). Diese Partikel erscheinen im Punktwolkendiagramm später doppelt positiv. Um diese Überschneidung zu korrigieren, muss bei jeder Messung eine sogenannte Kompensation erfolgen. Diese er-

laubt die Korrektur der spektralen Überlappung für jeden Fluoreszenzkanal. Die Kompensation wird immer dann erforderlich, sobald mehr als eine Fluoreszenz simultan gemessen werden soll. Mittels einer negativen Kontrolle (ungefärbte Probe) kann die Autofluoreszenz der Suspension berücksichtigt werden; im Folgenden wird dies als Isotypenkontrolle bezeichnet.

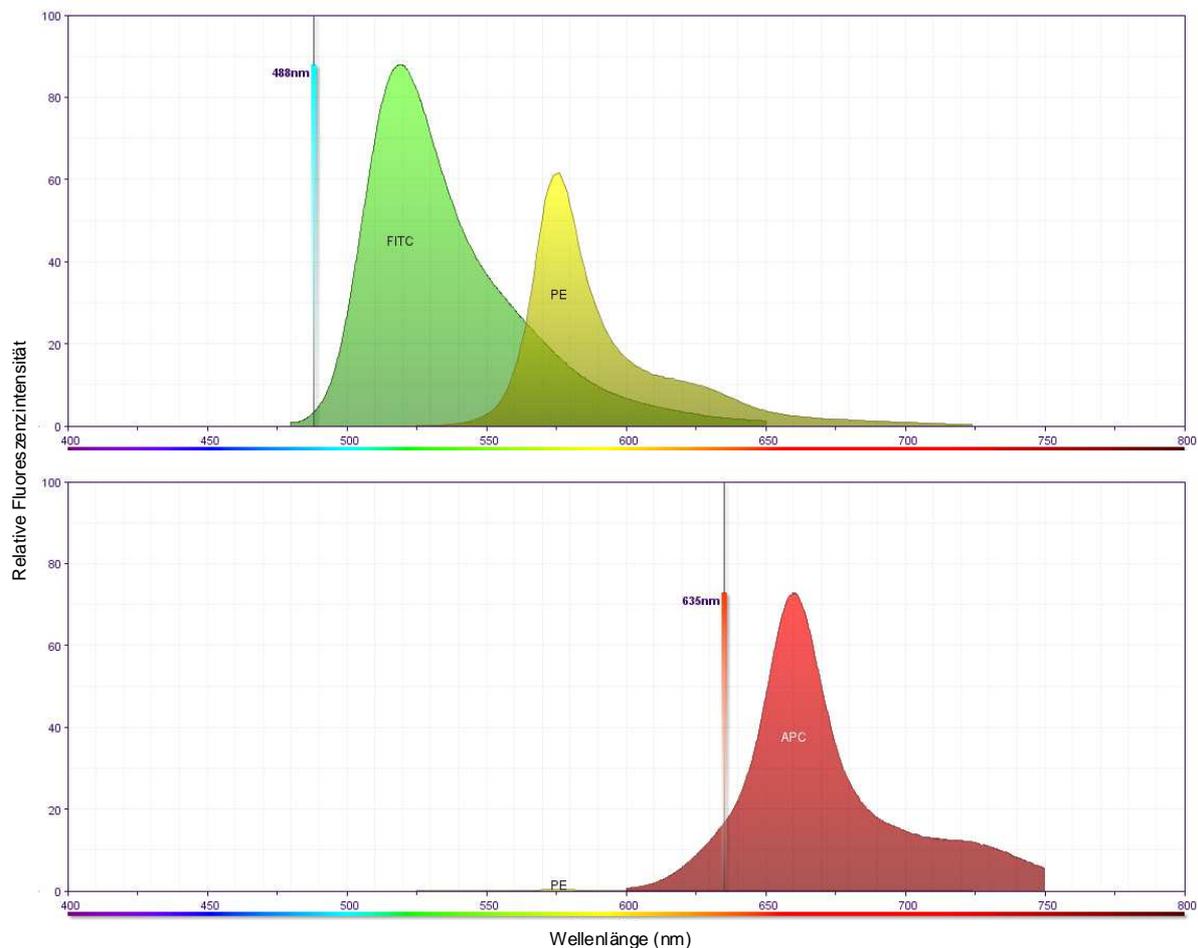


Abbildung 3-3. Laserexzitation und Fluoreszenzemission der Fluorochrome FITC, PE, APC
 Nach BD Biosciences, Heidelberg

Die optischen Signale, die von den im Laserstrahl befindlichen Partikeln reflektiert werden, werden von einem System aus Spiegeln und Filtern entsprechend ihrer Wellenlänge erfasst und mittels Photomultiplier in elektrische Signale umgewandelt. Die Signalverstärkung kann linear oder logarithmisch erfolgen. Die logarithmische Verstärkung ist geeignet zur Erfassung schwacher Impulsqualität und somit insbesondere für Streulicht von besonders kleinen Partikeln, wie den Mikropartikeln (MP). Über die entsprechende Software (CellQuest™ Pro 3.5) können die elektrischen Signale digital erfasst, graphisch dargestellt und ausgewertet werden. Die Ausgabe der Daten erfolgt in Form eines Punktwolkendiagramms, in dem die Vorwärts-

streuung gegen die Seitwärtsstreuung aufgetragen ist oder in Form eines Histogrammes der Fluoreszenzintensität (, B).

Zur täglichen Ein- und Ausschaltoutine sind die Hinweise des Herstellers zu beachten. Eine Kalibrierung des FACSCalibur™ mit CaliBRITE™ beads ist täglich vorgesehen.

3.11.2 Methodisches Vorgehen

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Grundeinstellungen des FACS-Gerätes wurden laborintern in Vorversuchen entwickelt, modifiziert und verifiziert. Im Verlauf der dieser Studie wurden sie nicht verändert.

Die unspezifische Bindung von Antikörpern kann in den erfolgten Analysen mit < 7% aller Mikropartikel angegeben werden. Endotheliale Mikropartikel (EMP) wurden in folgende Subpopulationen unterteilt: CD31⁺CD144⁺AnnexinV⁻, CD31⁺CD144⁺AnnexinV⁻, CD31⁺CD42b⁻AnnexinV⁺ und CD62E⁺-Mikropartikel. CD31 und CD144 gelten beide als endotheliale Oberflächenmarker; CD144 gilt jedoch als der endothelspezifischere, CD31 wird zusätzlich auch von Thrombozyten exprimiert. Daher wurde die Kombination aus CD31⁺ und CD144⁺ als höchst spezifisch bezüglich EMP angesehen. Die Expression konstitutiver Oberflächenmarker, wie CD31, ist während apoptotischer Prozesse erhöht. Induzierbare Oberflächenmarker, wie CD62E, sind dahingegen während aktivierter Prozesse erhöht (Jimenez et al., 2003). Um genauer zwischen aktivierten und apoptotischen Prozessen differenzieren zu können, wurde der Quotient von CD62E und CD31 berechnet (Jimenez et al., 2003; Tramontano et al., 2010; Yong et al., 2012). Die Bindung von Annexin V und Mikropartikeln wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Einerseits gilt Annexin V als ubiquitäres Marker-Protein der MP (Dey-Hazra et al., 2010), andererseits wird berichtet, dass lediglich ein kleiner Anteil an Mikropartikeln tatsächlich Annexin V bindet und als Marker von vorwiegend apoptotischen MP gilt (Horstman et al., 2004b; Jimenez et al., 2003). Daher erfolgte eine Analyse zweier verschiedener Subpopulationen: CD31⁺CD144⁺AnnexinV⁻ und CD31⁺CD144⁺AnnexinV⁻ endothelialer MP. Thrombozytäre Mikropartikel (PMP) wurden als CD42b⁺AnnexinV⁻ oder CD62P⁺AnnexinV⁻ Population identifiziert. CD42b ist als konstitutiver Marker kennzeichnend für apoptotische PMP, CD62P als induzierbarer Marker kennzeichnend für aktivierte PMP. Mikropartikel leukozytären Ursprungs (LMP) wurden mittels CD45 verifiziert, monozytäre Mikropartikel (MMP) mittels CD14. Die Werte wurden als erfasste Ereignisse angegeben.

Als Größenreferenzwert für die Mikropartikel wurden definierte Latexpartikel (CAL) einer durchschnittlichen Größe von 3 μm detektiert. Bis Abschluss des Analyse-Vorganges wurden stets 26.000 dieser Ereignisse erfasst. Latexpartikel und Mikropartikel wurden mittels Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht, wie vorhergehend in Abbildung 3-3 beschrieben, erfasst.

Mikropartikel wurden als detektierte Partikel von 0,1 -1 μm Größe definiert und im R1-Fenster (upper left) nach zusätzlicher Fluoreszenzmarkierung erfasst (A). Die Konzentration der Mikropartikel wurde im direkten Vergleich mit den detektierten Latexpartikeln ermittelt. Ereignisse außerhalb der R1- und R2-Fenster stellen das Hintergrundrauschen dar und wurden in der weiteren Analyse herausgefiltert. In der vorliegenden Versuchsanordnung wurde festgelegt, dass mindestens 500.000 Gesamtpartikel der untersuchten Suspension erfasst werden müssen. Unabhängig von der gemessenen Gesamtzahl der Partikel, die über dem hier definierten Referenzwert lagen, wurde jede Berechnung auf den Referenzwert bezogen. In Abbildung 3-4 sind exemplarische Punktwolkendiagramme (A, C, D) sowie ein Histogramm der Fluoreszenzintensität (B) dargestellt, die im Rahmen der FACS-Analyse ausgegeben wurden.

3.11.3 Stabilität der Mikropartikel

In laborinternen FACS-Analysen zeigte sich eine stabile absolute Zellzahl / 500.000 Gesamt-ereignisse sowohl von endothelialen als auch thrombozytären und monozytären Mikropartikeln nach wiederholten Gefrier- und Auftauprozessen ($p < 0,05$) (Abbildung 3-5).

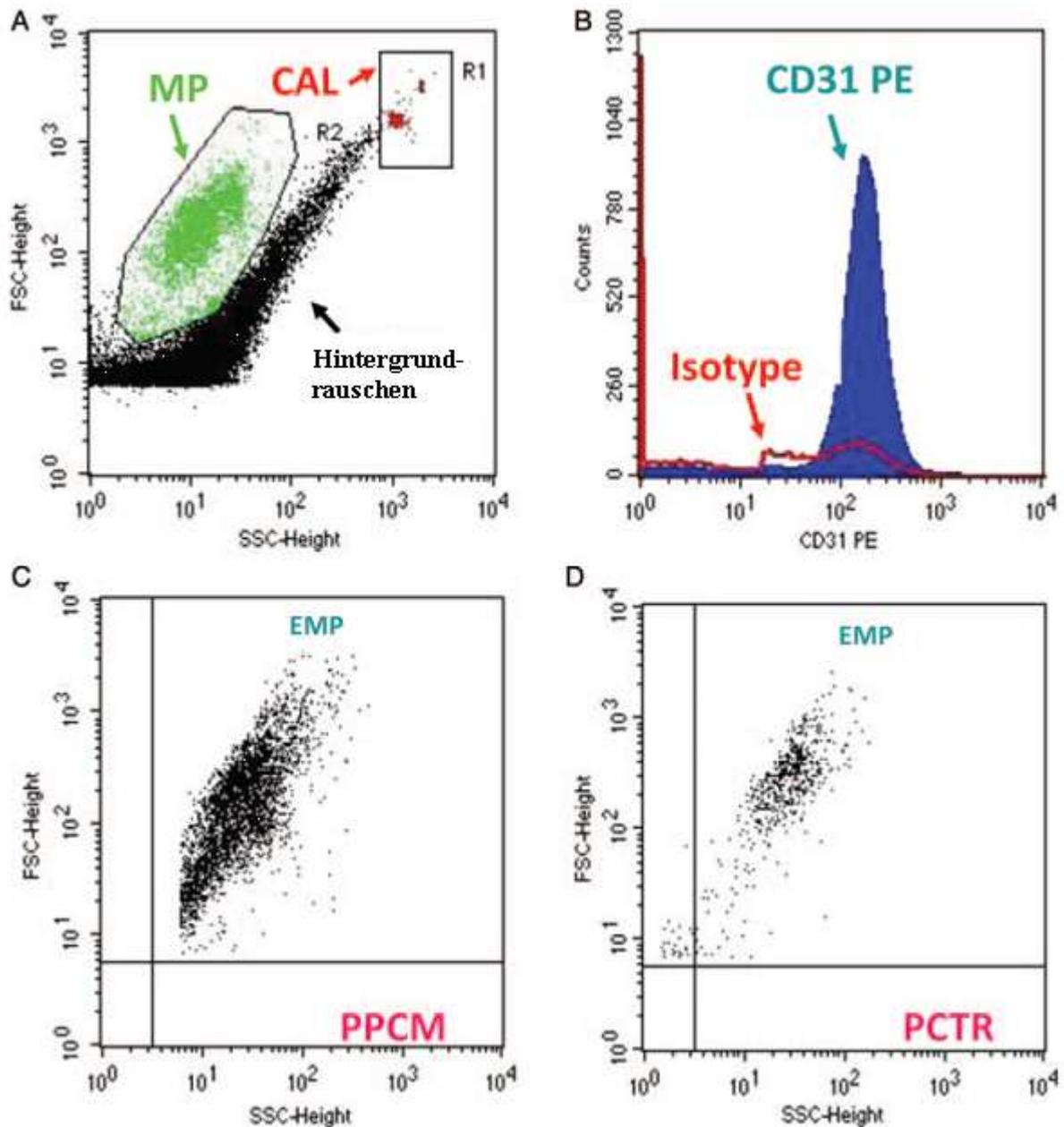


Abbildung 3-4. (A, C, D) Repräsentative FACS Punktwolkendiagramme. (B) Histogramm der Fluoreszenzintensität

(A, C, D) Mikropartikel wurden aus EDTA-Plasma isoliert und mittels Durchflusszytometrie wie vorstehend beschrieben analysiert. Mikropartikel (MP) (grüne Punkte) und Kalibrationspartikel (CAL, calibration beads) (rote Punkte, je 3 μm) wurden im Vorwärts- und Seitwärtsstreulichtverfahren (FSC bzw. SSC) detektiert (CAL in R1, MP planimetrisch nacherfasst in R2) und logarithmisch aufgetragen. MP sind definiert als Ereignisse einer Größe von 0,1 -1 μm , dargestellt im Bereich R2 (upper left).

(B) Histogramm der Fluoreszenzintensität einer untersuchten Suspension. Die Eigenfluoreszenz der Isotypenkontrolle (Isotype) sowie die CD31⁺ PE-Fluoreszenz eines Probanden sind dargestellt.

(C und D) Repräsentative Punktwolkendiagramme von CD31⁺Annexin⁺ endothelialen MP im Plasma einer Patientin mit peripartaler Kardiomyopathie (PPCM) (C) sowie vergleichend einer gesunden Schwangeren (PCTR) (D).

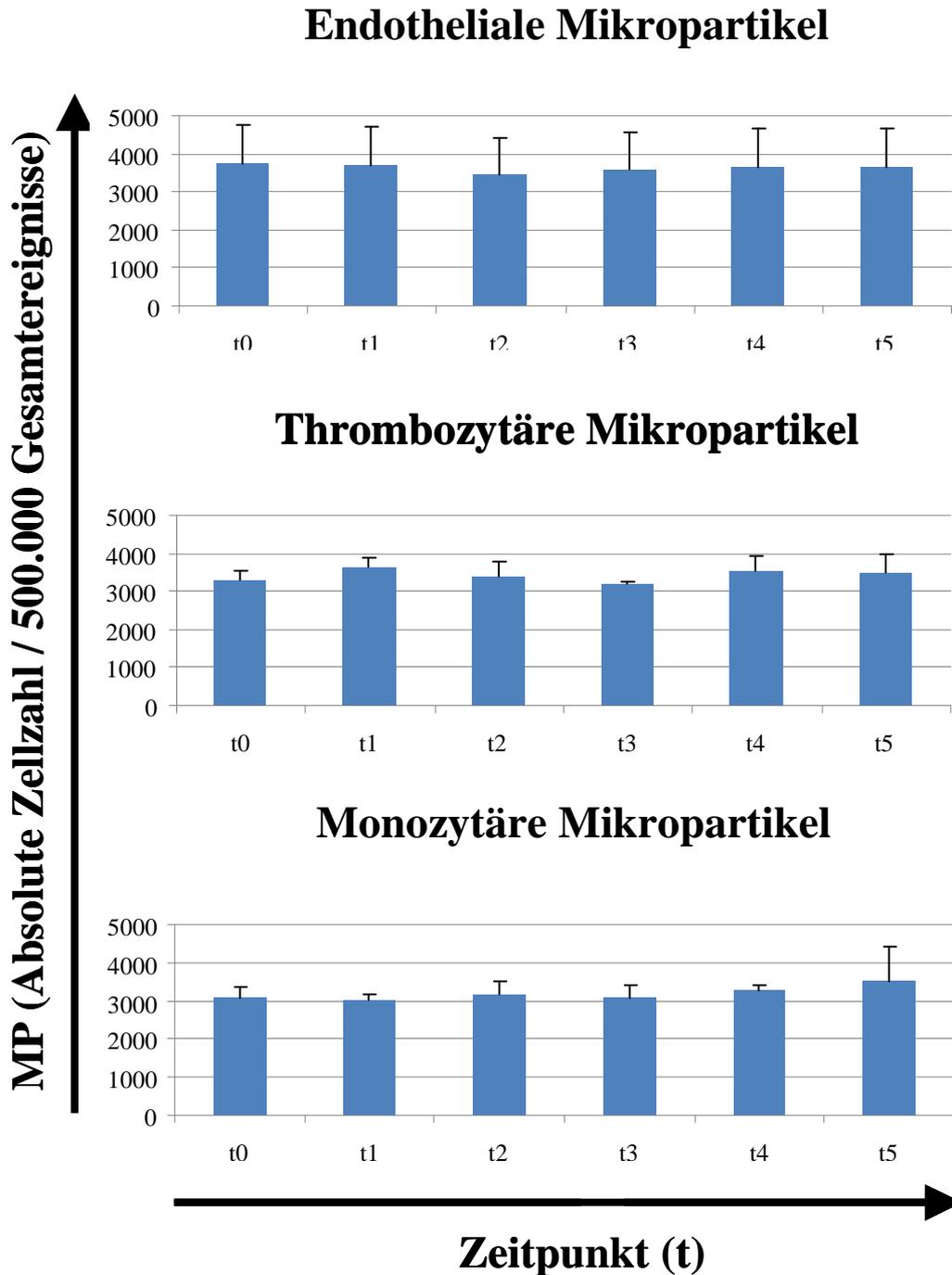


Abbildung 3-5. Stabile Anzahl an Mikropartikeln während Gefrier- und Auftauprozessen
 Laborinterne FACS-Analysen (unveröffentlicht) zeigten eine stabile absolute Zellzahl / 500.000 Gesamtergebnisse sowohl von endothelialen als auch thrombozytären und monozytären Mikropartikeln (MP) nach wiederholten Gefrier- und Auftauprozessen ($p < 0,05$). Zeitpunkte (t) vor (t0), nach ein (t1), zwei (t2), drei (t3), vier (t4) bzw. fünf (t5) Gefrier- und Auftauzyklen.

3.12 Probenaufbereitung

Alle klinikintern gewonnenen Blutproben wurden nach identischem Protokoll im Labor der Klinik für Innere Medizin III des Universitätsklinikum des Saarlandes, aufbereitet, um prä-analytischen Abweichungen vorzubeugen. Die darauf folgende Analyse mittels FACS basierte auf dem eigens entwickelten Protokoll.

EDTA-Vollblut (5 - 10 ml) wurde nach Blutentnahme innerhalb 30 min bei 2.400 rpm für 15 min zentrifugiert, um plättchenreiches Plasma zu gewinnen. Danach wurde die Probe erneut bei 13.000 g für 2 min bei 4 °C zentrifugiert, um plättchenarmes Plasma zu erhalten. Im Anschluss wurden die Proben fraktioniert bei -20 °C für eine Woche eingefroren und anschließend bei -80 °C bis zur Analyse aufbewahrt.

Am Analysetag erfolgte langsames Auftauen des plättchenarmen Plasmas auf Eis. In jedes Rundbodenröhrchen, nachfolgend Tube genannt, wurden 25 µl plättchenarmes Plasma pipettiert. Anschließend folgte die Zugabe von je zwei verschiedenen Antikörpern (je PE und FITC), je 2 µl Menge in Tube 2-4. Tube 1 blieb als Isotypenkontrolle frei von Antikörpern (Tabelle 3-15). Eine gute Durchmischung wurde mittels vortexen erreicht.

Tabelle 3-15. Marker-Proteine in Tube 1-5

Tube	Plättchenarmes Plasma	Marker-Protein
1	25 µl Plasma	- -
2	25 µl Plasma	2 µl CD144 FITC 2 µl CD31 PE
3	25 µl Plasma	2 µl CD62E FITC 2 µl CD31 PE
4	25 µl Plasma	2 µl CD14 FITC 2 µl CD45 PE
5	25 µl Plasma	2 µl CD62P FITC 2 µl CD42b PE

Es folgte die Inkubation im Dunkeln für 60 min bei 4 °C. Nach Ablauf der ersten Inkubationszeit wurden je 25 µl Binding Buffer sowie je 2,5 µl Annexin V APC zugegeben mit einer Inkubationszeit von 15 min bei Raumtemperatur. Auch hier blieb Tube 1 ohne Proteinzusatz (Tabelle 3-16). Eine gute Durchmischung wurde mittels vortexen erreicht.

Tabelle 3-16. Marker-Proteine in Tube 1-5 plus Binding Buffer und Annexin V

Tube	Plättchenarmes Plasma	Marker-Protein	Binding Buffer	Marker-Protein
1	25 µl Plasma	- -	25 µl	-
2	25 µl Plasma	2 µl CD144 FITC 2 µl CD31 PE	25 µl	2,5 µl Annexin V APC
3	25 µl Plasma	2 µl CD62E FITC 2 µl CD31 PE	25 µl	2,5 µl Annexin V APC
4	25 µl Plasma	2 µl CD14 FITC 2 µl CD45 PE	25 µl	2,5 µl Annexin V APC
5	25 µl Plasma	2 µl CD62P FITC 2 µl CD42b PE	25 µl	2,5 µl Annexin V APC

Unmittelbar vor der Messung wurden jedem Tube 300 µl Binding Buffer sowie 4 µl Latex Beads zugegeben (Tabelle 3-17). Letztere wurden vorab mittels PBS im Verhältnis 1 : 95 verdünnt. Eine gute Durchmischung wurde mittels vortexen erreicht.

Tabelle 3-17. Marker-Proteine in Tube 1-5 plus Binding Buffer und Annexin V plus Binding Buffer und Latex Beads

Tube	Plättchenarmes Plasma	Marker-Protein	Binding Buffer	Marker-Protein	Binding Buffer	Latex Beads
1	25 µl Plasma	- -	25 µl	-	300 µl	4 µl Beads
2	25 µl Plasma	2 µl CD144 FITC 2 µl CD31 PE	25 µl	2,5 µl Annexin V APC	300 µl	4 µl Beads
3	25 µl Plasma	2 µl CD62E FITC 2 µl CD31 PE	25 µl	2,5 µl Annexin V APC	300 µl	4 µl Beads
4	25 µl Plasma	2 µl CD14 FITC 2 µl CD45 PE	25 µl	2,5 µl Annexin V APC	300 µl	4 µl Beads
5	25 µl Plasma	2 µl CD62P FITC 2 µl CD42b PE	25 µl	2,5 µl Annexin V APC	300 µl	4 µl Beads

Jeder Versuchsansatz (Tube1-5) wurde binnen 60 min nach Fertigstellung der FACS-Analyse zugeführt. Die Auswertung der erhobenen Datensätze erfolgte zu einem beliebigen späteren Zeitpunkt.

Einschränkung

Bei den aus Südafrika erhaltenen Proben (PPCM-BR, PPCM-BRCTR) stand Blutplasma in geringerer Menge ($< 125 \mu\text{l}$) zur Verfügung. Dem zur Verfügung stehenden Plasma wurden die übrigen Zusätze in gleichbleibendem Verhältnis zugegeben. Bei allen Proben musste mangels einer ausreichenden Menge an Plasma auf die Messung von MMP und LMP (Tube 4) verzichtet werden.

4 Ergebnisse

Die Ausgangsdaten der 158 Studienpatienten sind in Tabelle 3-3 bis Tabelle 3-6 dargestellt.

Es wurde die Patientengruppe der PPCM den nachstehend in Tabelle 4-1 aufgeführten Gruppen gegenübergestellt. Die Kontrollgruppen hatten nachweislich eine normale linksventrikuläre Ejektionsfraktion und normale linksventrikuläre Diameter.

Tabelle 4-1. Patientenkollektiv 1 / 2

Abkürzung	Patientengruppe
PPCM	peripartale Kardiomyopathie ♀
PPCTR	gesunde postpartale Frauen ♀
PCTR	gesunde schwangere Frauen ♀
NPCTR	gesunde nicht-schwangere Frauen ♀
ICM	ischämische Kardiomyopathie ♀♂
CAD	stabile koronare Herzkrankheit ♀♂
HCTR	gesunde Kontrollen ♀♂

Die Patientinnengruppe der PPCM mit additiver Bromocriptin-Therapie wurde der Gruppe ohne zusätzliche Bromocriptin-Therapie gegenübergestellt (Tabelle 4-2).

Tabelle 4-2. Patientenkollektiv 2 / 2

Abkürzung	Patientengruppe
PPCM-BR	PPCM mit Bromocriptin-Behandlung ♀
PPCM-BRCTR	PPCM ohne Bromocriptin-Behandlung ♀

FACS-Analysen konnten wie vorstehend beschrieben an allen 158 Blutproben durchgeführt werden.

4.1 Mikropartikel bei Patientinnen mit peripartaler Kardiomyopathie, gesunden postpartalen Frauen, gesunden schwangeren Frauen, gesunden nicht-schwangeren Frauen, Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie, Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit und gesunden altersäquivalenten Kontrollen

Mikropartikel (MP) endothelialen, thrombozytären und monozytären Ursprungs waren bei Patienten mit PPCM signifikant erhöht im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Studiengruppen.

4.1.1 Endotheliale Mikropartikel (EMP)

Die absolute Anzahl der EMP (CD144⁺) ist bei Patientinnen mit PPCM signifikant erhöht gegenüber PPCTR, PCTR, NPCTR, HCTR und Patienten mit ICM oder CAD ($p < 0,001$). In der Schwangerschaft (PCTR) erreichen die EMP ein Niveau, das dem von ICM und CAD entspricht. Dem gegenüber ist die Anzahl der EMP in PPCTR, PCTR und den HCTR signifikant erniedrigt (Abbildung 4-1).

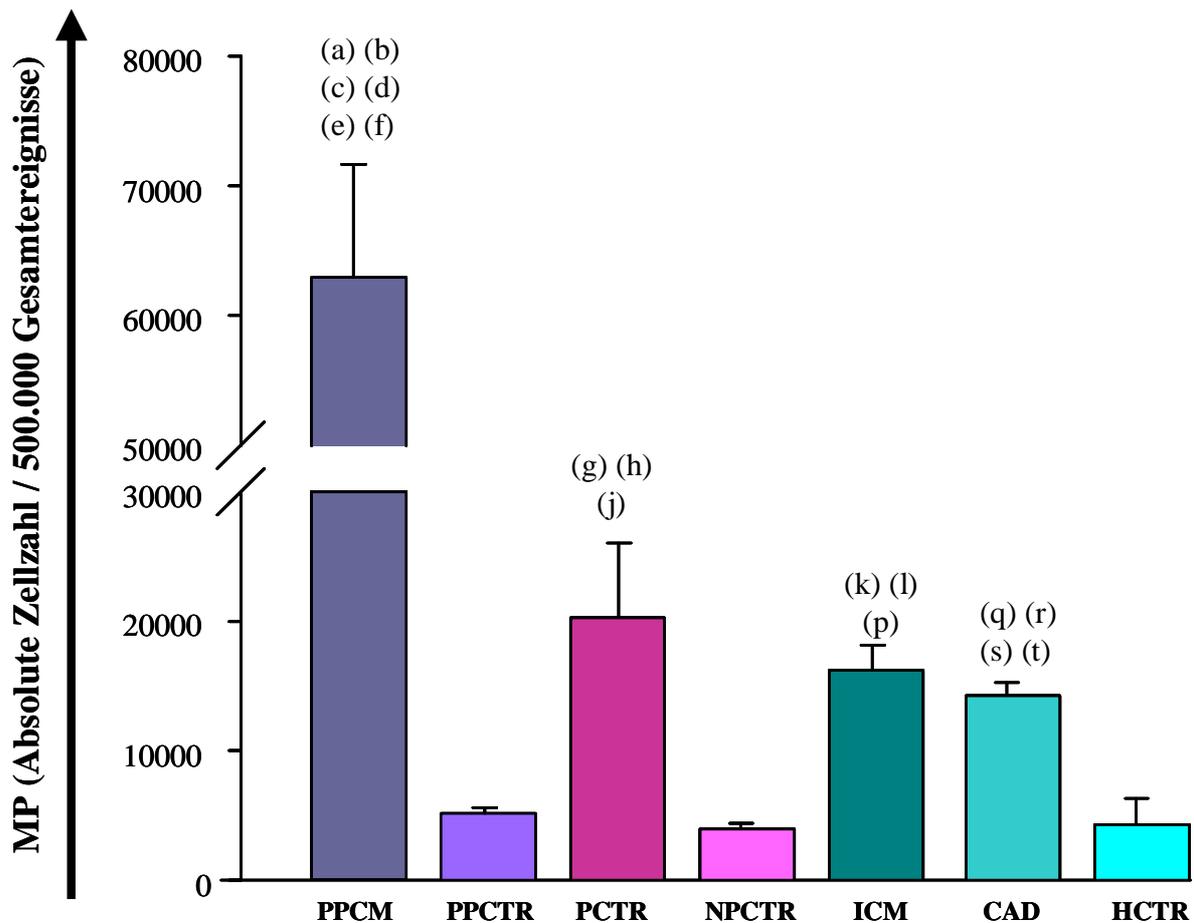


Abbildung 4-1. Endotheliale Mikropartikel (MP) bei Patientinnen mit peripartaler Kardiomyopathie (PPCM). Der PPCM gegenübergestellt sind altersäquivalente gesunde postpartale Frauen (PPCTR), gesunde schwangere Frauen (PCTR), gesunde nicht-schwangere Frauen (NPCTR), Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie (ICM), Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit (CAD) und deren altersäquivalente gesunde Kontrollen (HCTR).

Endotheliale MP waren bei Patientinnen mit PPCM signifikant erhöht gegenüber PPCTR, PCTR, NPCTR, ICM, CAD und HCTR. EMP bei PCTR waren signifikant erhöht verglichen mit PPCTR, NPCTR und HCTR. EMP-Level unterschieden sich nicht bei ICM und CAD, waren aber signifikant erhöht gegenüber PPCTR, NPCTR und HCTR.

Signifikanz $p < 0,05$: (a) PPCM vs. PPCTR, (b) PPCM vs. PCTR, (c) PPCM vs. NPCTR, (d) PPCM vs. ICM, (e) PPCM vs. CAD, (f) PPCM vs. HCTR, (g) PCTR vs. PPCTR, (h) PCTR vs. NPCTR, (j) PCTR vs. HCTR, (k) ICM vs. PPCM, (l) ICM vs. PPCTR, (p) ICM vs. PCTR, (q) CAD vs. PPCTR, (r) CAD vs. PCTR, (s) CAD vs. NPCTR, (t) CAD vs. HCTR.

Eine Subpopulation der EMP, sowohl positiv für CD144 als auch CD31, zeigte ebenfalls eine signifikante Erhöhung der EMP bei Patientinnen mit PPCM, jedoch bei relativ erniedrigter absoluter Zellzahl pro 500.000 Gesamtereignisse.

Aktivierte EMP (CD62⁺) waren bei Patientinnen mit PPCM signifikant erhöht gegenüber allen anderen untersuchten Gruppen ($p < 0,001$). PCTR zeigten ein der ICM ähnliches Niveau. Sowohl PCTR als auch ICM waren signifikant erhöht gegenüber PPCTR, NPCTR, CAD und NPCTR. CAD zeigte sich signifikant erhöht im Vergleich zu PPCTR, NPCTR und HCTR (Abbildung 4-2).

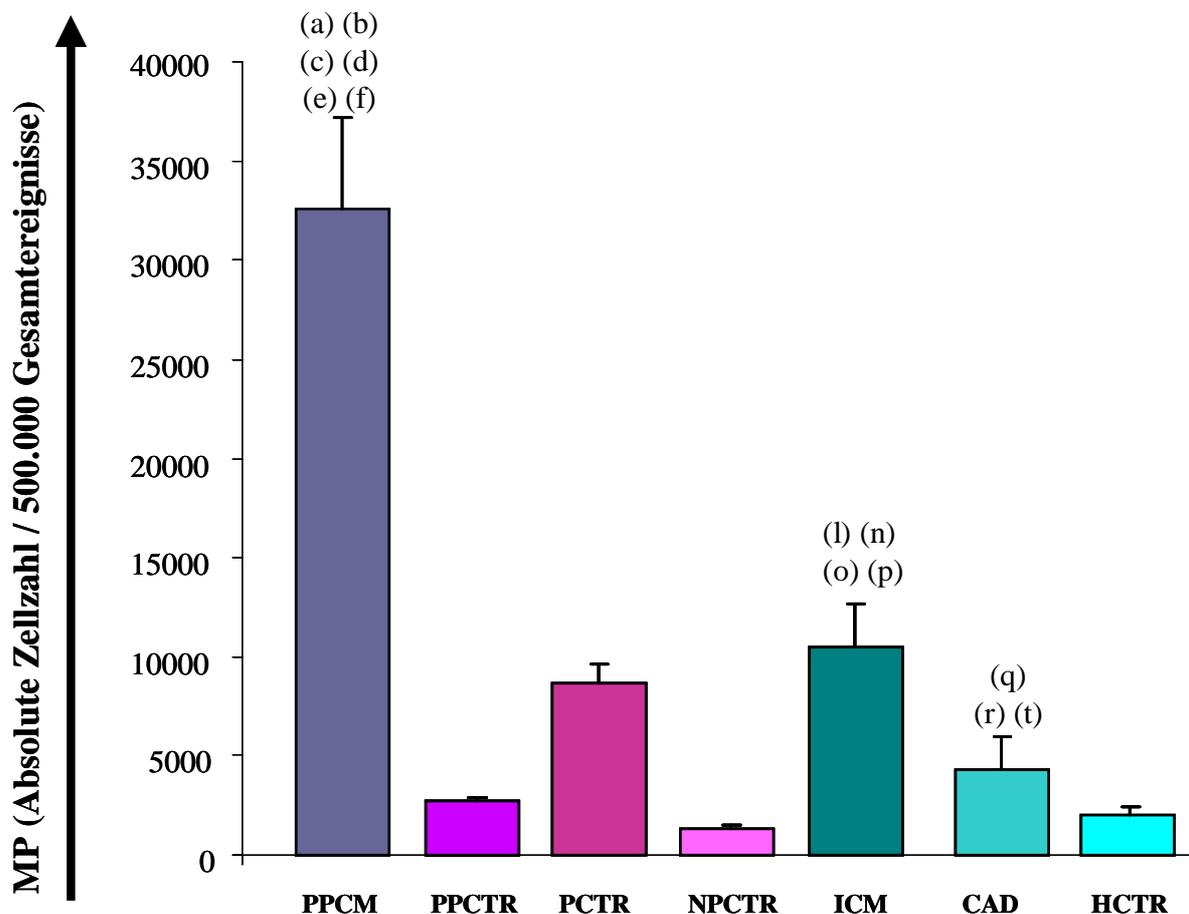


Abbildung 4-2. Aktivierte endotheliale Mikropartikel (MP) bei Patientinnen mit peripartaler Kardiomyopathie (PPCM). Der PPCM gegenübergestellt sind altersäquivalente gesunde postpartale Frauen (PPCTR), gesunde schwangere Frauen (PCTR), gesunde nicht-schwangere Frauen (NPCTR), Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie (ICM), Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit (CAD) und deren altersäquivalente gesunde Kontrollen (HCTR).

Aktivierte endotheliale MP waren bei Patientinnen mit PPCM signifikant erhöht gegenüber PPCTR, PCTR, NPCTR, ICM, CAD und HCTR. ICM zeigten sich signifikant erhöht im Vergleich zu PPCTR, NPCTR, CAD und HCTR. MP bei CAD waren signifikant erhöht gegenüber PPCTR, NPCTR und HCTR.

Signifikanz $p < 0,05$: (a) PPCM vs. PPCTR, (b) PPCM vs. PCTR, (c) PPCM vs. NPCTR, (d) PPCM vs. ICM, (e) PPCM vs. CAD, (f) PPCM vs. HCTR, (l) ICM vs. PPCTR, (n) ICM vs. NPCTR, (o) ICM vs. CAD, (p) ICM vs. PCTR, (q) CAD vs. PPCTR, (r) CAD vs. PCTR, (t) CAD vs. HCTR.

Im Gegensatz dazu zeigten sich apoptotische EMP ($CD31^+AnnexinV^+$) bei Patientinnen mit PPCM und bei PCTR ($p = 0,437$) erhöht verglichen mit PPCTR ($p < 0,001$), NPCTR ($p < 0,001$) und HCTR ($p < 0,001$). EMP waren bei PPCM des Weiteren auch gegenüber ICM ($p = 0,031$) und CAD ($p < 0,034$) erhöht, die sich wiederum signifikant erhöht im Vergleich zu PPCTR, NPCTR und HCTR erwiesen. Apoptotische und aktivierte EMP zeigten sich bei PCTR ähnlich (Abbildung 4-3).

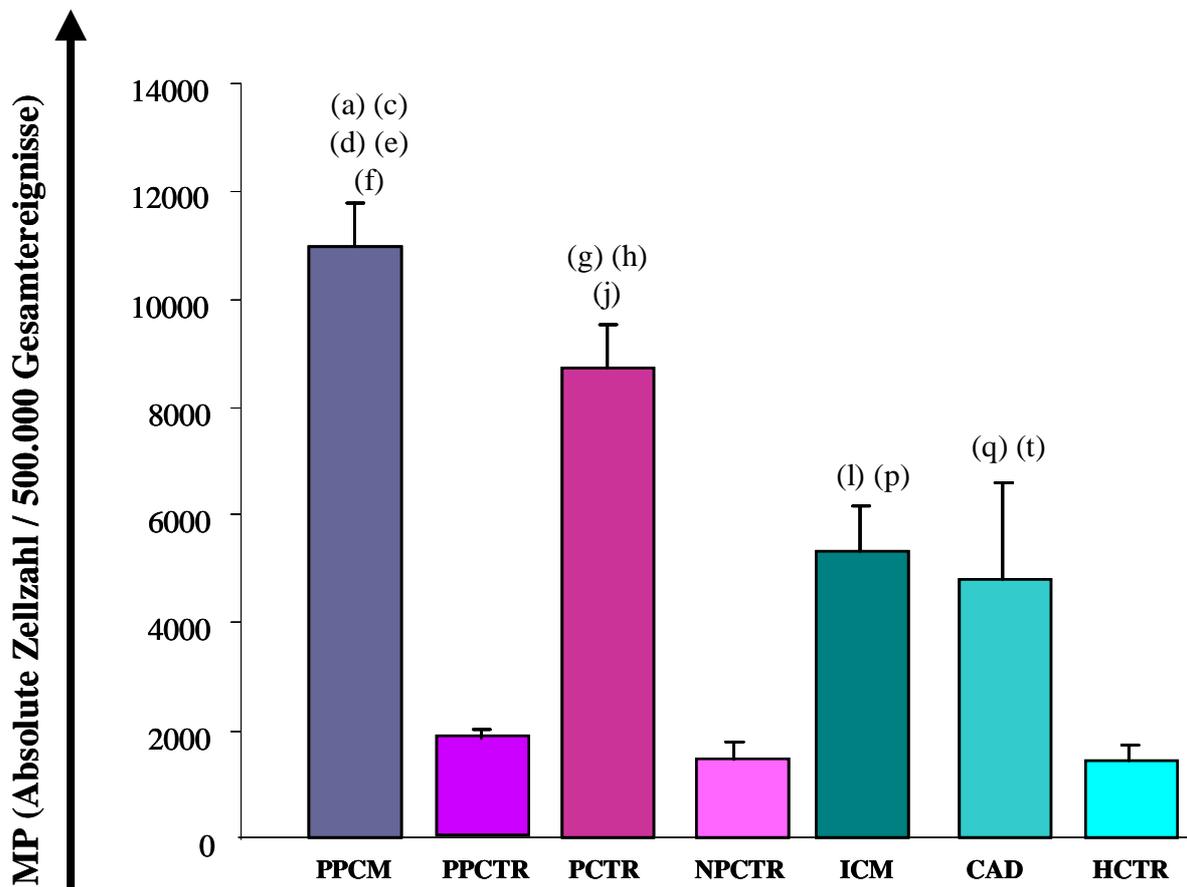


Abbildung 4-3. Apoptotische endotheliale Mikropartikel (MP) bei Patientinnen mit peripartaler Kardiomyopathie (PPCM). Der PPCM gegenübergestellt sind altersäquivalente gesunde postpartale Frauen (PPCTR), gesunde schwangere Frauen (PCTR), gesunde nicht-schwangere Frauen (NPCTR), Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie (ICM), Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit (CAD) und deren altersäquivalente gesunde Kontrollen (HCTR).

Apoptotische endotheliale MP waren bei Patientinnen mit PPCM signifikant erhöht gegenüber PPCTR, NPCTR, ICM, CAD und HCTR. Bei PCTR zeigte sich eine signifikante Erhöhung gegenüber PPCTR, NPCTR und NPCTR. ICM und CAD zeigten ein vergleichbares Niveau und eine signifikante Erhöhung gegenüber PPCTR und HCTR.

Signifikanz $p < 0,05$: (a) PPCM vs. PPCTR, (c) PPCM vs. NPCTR, (d) PPCM vs. ICM, (e) PPCM vs. CAD, (f) PPCM vs. HCTR, (g) PCTR vs. PPCTR, (h) PCTR vs. NPCTR, (j) PCTR vs. HCTR, (l) ICM vs. PPCTR, (p) ICM vs. PCTR, (q) CAD vs. PPCTR (t) CAD vs. HCTR.

Hieraus ergibt sich, dass die Erhöhung der EMP bei Patientinnen mit PPCM am ehesten auf eine Erhöhung der aktivierten EMP zurückzuführen ist. Das betrifft das CD62E/CD31-Verhältnis. Auf diesen Quotienten wird nachstehend eingegangen.

Eine weitere Subpopulation der EMP ($CD31^+CD144^+AnnexinV^-$) zeigte keine Veränderung in der Häufigkeit des Auftretens.

4.1.2 Thrombozytäre Mikropartikel (PMP)

Die thrombozytären Mikropartikel ($CD62P^+CD42b^+AnnexinV^+$) sind bei Patientinnen mit PPCM im Vergleich zu allen anderen Gruppen (PPCM, PPCTR, PCTR, NPCTR, HCTR, CAD, ICM) signifikant erhöht ($p < 0,001$) (Abbildung 4-4).

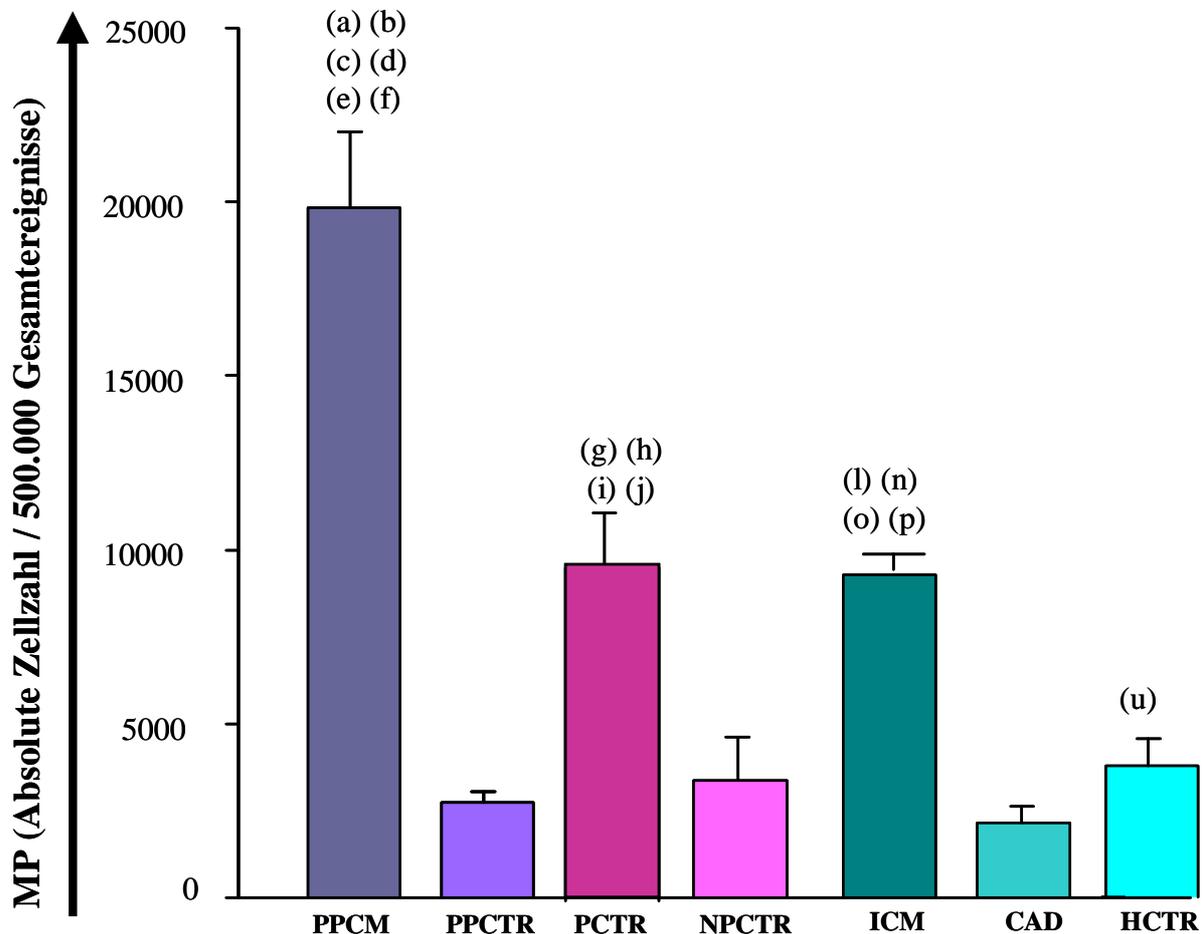


Abbildung 4-4. Thrombozytäre Mikropartikel (MP) bei Patientinnen mit peripartaler Kardiomyopathie (PPCM). Der PPCM gegenübergestellt sind altersäquivalente gesunde postpartale Frauen (PPCTR), gesunde schwangere Frauen (PCTR), gesunde nicht-schwangere Frauen (NPCTR), Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie (ICM), Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit (CAD) und deren altersäquivalente gesunde Kontrollen (HCTR).

Thrombozytäre MP waren bei Patientinnen mit PPCM signifikant erhöht gegenüber PPCTR, PCTR, NPCTR, ICM, CAD und HCTR. Bei PCTR und ICM zeigte sich eine signifikante Erhöhung gegenüber PPCTR, NPCTR, CAD und HCTR. HCTR waren signifikant erhöht im Vergleich zu PCTR.

Signifikanz $p < 0,05$: (a) PPCM vs. PPCTR, (b) PPCM vs. PCTR, (c) PPCM vs. NPCTR, (d) PPCM vs. ICM, (e) PPCM vs. CAD, (f) PPCM vs. HCTR, (g) PCTR vs. PPCTR, (h) PCTR vs. NPCTR, (i) PCTR vs. CAD, (j) PCTR vs. HCTR, (l) ICM vs. PPCTR, (n) ICM vs. NPCTR, (o) ICM vs. CAD, (p) ICM vs. PCTR, (u) HCTR vs. PCTR.

Aktiviert PMP waren in den PPCM signifikant erhöht verglichen mit PPCTR ($p < 0,001$), PCTR ($p < 0,016$), NPCTR ($p < 0,001$), ICM ($p < 0,001$), CAD ($p < 0,001$) und HCTR ($p < 0,001$) (Abbildung 4-5).

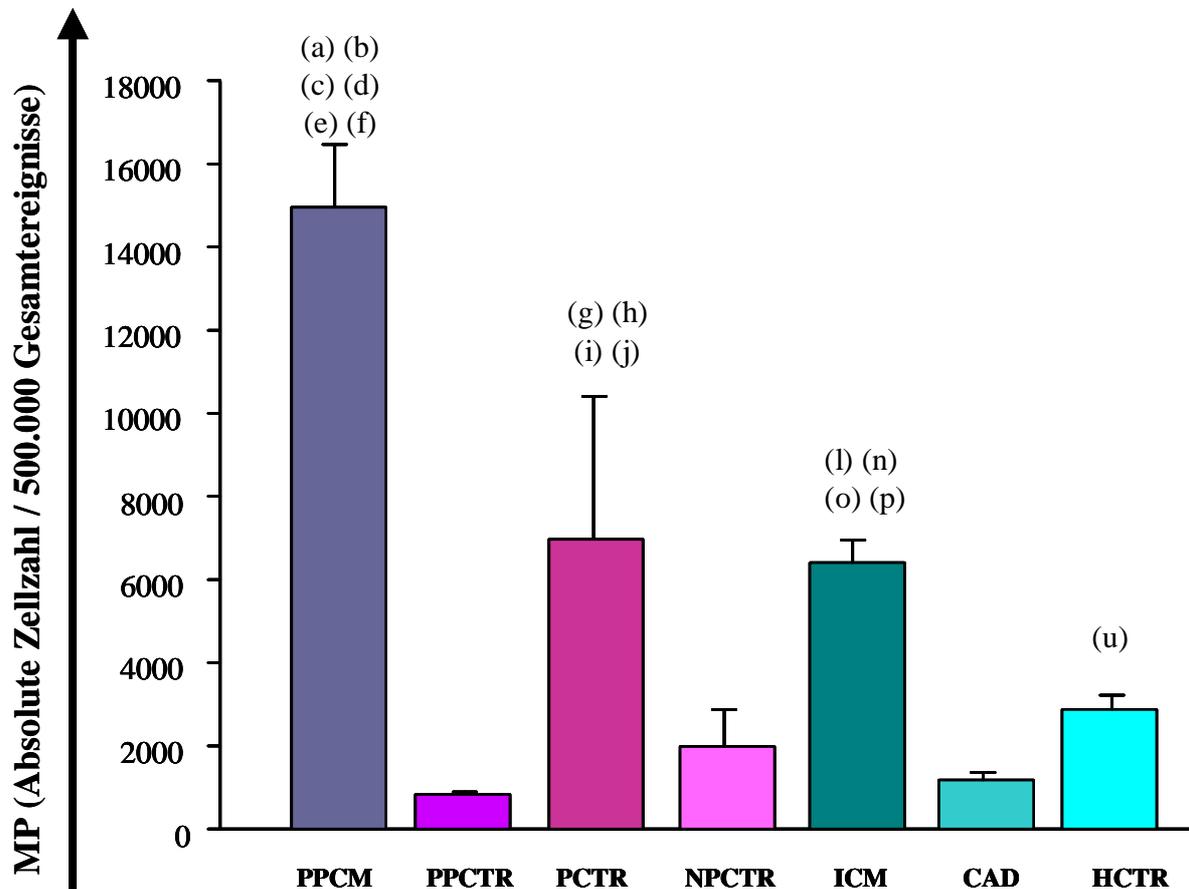


Abbildung 4-5. Aktiviert thrombozytäre Mikropartikel (MP) bei Patientinnen mit peripartaler Kardiomyopathie (PPCM). Der PPCM gegenübergestellt sind altersäquivalente gesunde postpartale Frauen (PPCTR), gesunde schwangere Frauen (PCTR), gesunde nicht-schwangere Frauen (NPCTR), Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie (ICM), Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit (CAD) und deren altersäquivalente gesunde Kontrollen (HCTR).

Aktiviert thrombozytäre MP waren bei Patientinnen mit PPCM signifikant erhöht gegenüber PPCTR, PCTR, NPCTR, ICM, CAD und HCTR. Bei PCTR und ICM zeigte sich eine signifikante Erhöhung gegenüber PPCTR, NPCTR, CAD und HCTR. HCTR waren signifikant erhöht im Vergleich zu PCTR.

Signifikanz $p < 0,05$: (a) PPCM vs. PPCTR, (b) PPCM vs. PCTR, (c) PPCM vs. NPCTR, (d) PPCM vs. ICM, (e) PPCM vs. CAD, (f) PPCM vs. HCTR, (g) PCTR vs. PPCTR, (h) PCTR vs. NPCTR, (i) PCTR vs. CAD, (j) PCTR vs. HCTR, (l) ICM vs. PPCTR, (n) ICM vs. NPCTR, (o) ICM vs. CAD, (p) ICM vs. PCTR, (u) HCTR vs. PCTR.

Apoptotische PMP waren bei Patientinnen mit PPCM signifikant erhöht im Vergleich mit PPCTR ($p = 0,003$), mit PCTR ($p = 0,004$), mit NPCTR ($p < 0,001$), ICM ($p < 0,015$) und CAD ($p = 0,003$). Apoptotische PMP waren in PPCM nicht signifikant erhöht im Vergleich mit HCTR ($p = 0,430$). PCTR und ICM erreichen einen ähnlich signifikanten Level gegenüber den PPCTR, NPCTR, CAD und HCTR (Abbildung 4-6).

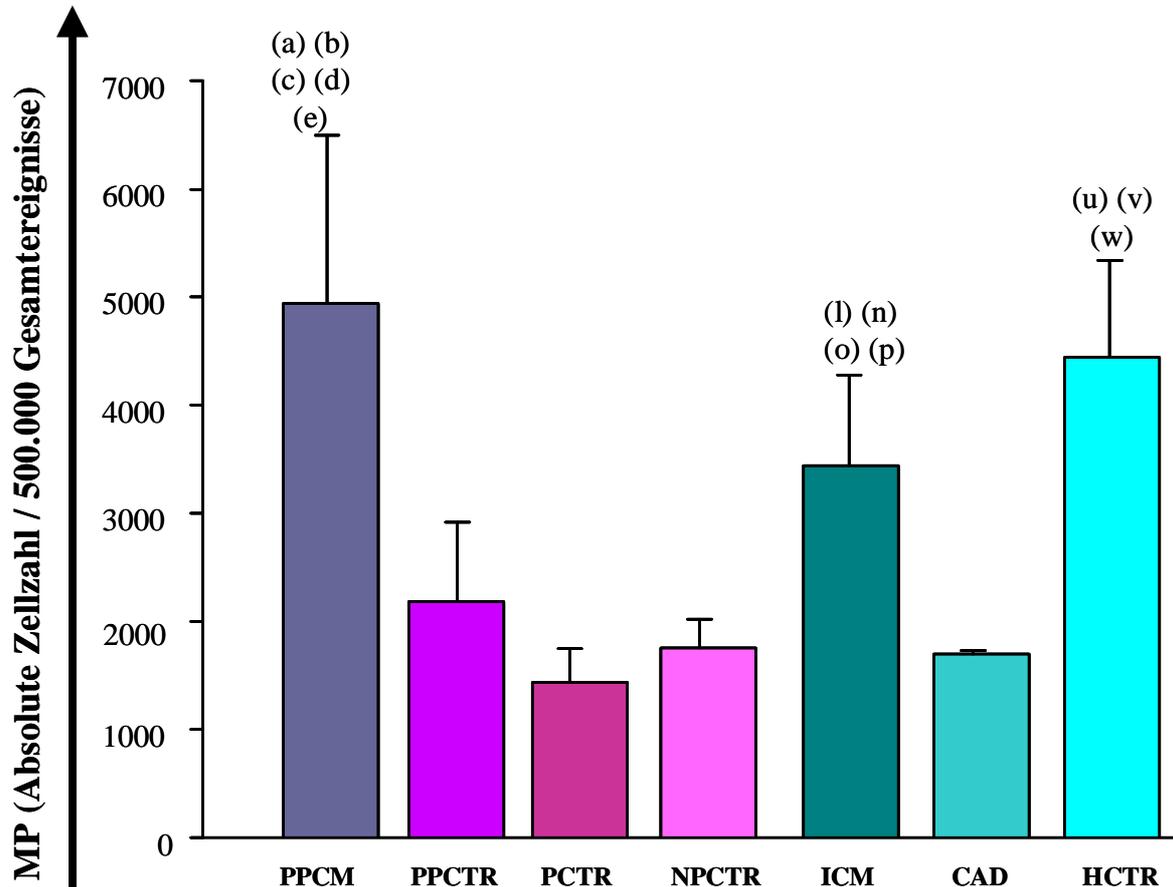


Abbildung 4-6. Apoptotische thrombozytäre Mikropartikel (MP) bei Patientinnen mit peripartaler Kardiomyopathie (PPCM). Der PPCM gegenübergestellt sind altersäquivalente gesunde postpartale Frauen (PPCTR), gesunde schwangere Frauen (PCTR), gesunde nicht-schwangere Frauen (NPCTR), Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie (ICM), Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit (CAD) und deren altersäquivalente gesunde Kontrollen (HCTR).

Apoptotische thrombozytäre MP waren bei Patientinnen mit PPCM signifikant erhöht gegenüber PPCTR, PCTR, NPCTR, ICM und CAD. ICM zeigten sich signifikant erhöht gegenüber PPCTR, PCTR, NPCTR und CAD. EMP bei HCTR zeigten eine signifikante Erhöhung gegenüber PCTR, NPCTR und CAD.

Signifikanz $p < 0,05$: (a) PPCM vs. PPCTR, (b) PPCM vs. PCTR, (c) PPCM vs. NPCTR, (d) PPCM vs. ICM, (e) PPCM vs. CAD, (f) PPCM vs. HCTR, (g) PCTR vs. PPCTR, (h) PCTR vs. NPCTR, (i) PCTR vs. CAD, (j) PCTR vs. HCTR, (k) ICM vs. PPCM, (l) ICM vs. PPCTR, (m) ICM vs. PCTR, (n) ICM vs. NPCTR, (o) ICM vs. CAD, (p) ICM vs. PCTR, (q) CAD vs. PPCTR, (r) CAD vs. PCTR, (s) CAD vs. NPCTR, (t) CAD vs. HCTR, (u) HCTR vs. PCTR, (v) HCTR vs. NPCTR, (w) HCTR vs. CAD

4.1.3 Monozytäre Mikropartikel (MMP)

Monozytäre Mikropartikel (CD14⁺Annexin⁺) zeigten bei Patientinnen mit PPCM eine signifikante Erhöhung gegenüber allen anderen untersuchten Gruppen ($p < 0,001$). Des Weiteren waren MMP bei PCTR signifikant im Vergleich zu PPCTR, NPCTR, CAD und HCTR erhöht. In ICM war eine signifikante Erhöhung gegenüber PPCTR, PCTR, NPCTR, CAD und HCTR nachweisbar (Abbildung 4-7).

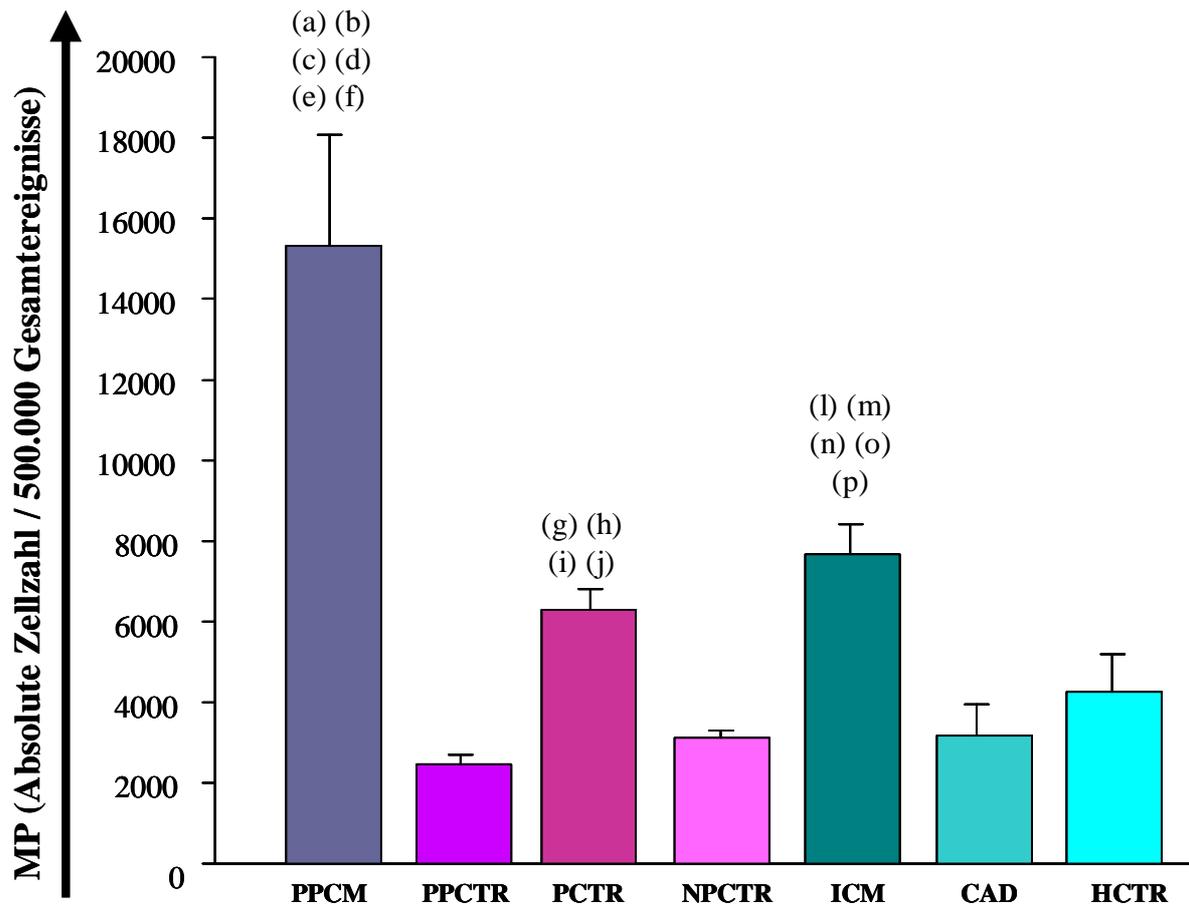


Abbildung 4-7. Monozytäre Mikropartikel (MP) bei Patientinnen mit peripartaler Kardiomyopathie (PPCM). Der PPCM gegenübergestellt sind altersäquivalente gesunde postpartale Frauen (PPCTR), gesunde schwangere Frauen (PCTR), gesunde nicht-schwangere Frauen (NPCTR), Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie (ICM), Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit (CAD) und deren altersäquivalente gesunde Kontrollen (HCTR).

Monozytäre MP waren bei Patientinnen mit PPCM signifikant erhöht gegenüber PPCTR, PCTR, NPCTR, ICM, CAD und HCTR. PCTR zeigte eine signifikante Erhöhung gegenüber PPCTR, NPCTR, CAD und HCTR. Signifikant erhöhte MMP gegenüber ICM waren bei PPCTR, PCTR, NPCTR, CAD und HCTR nachweisbar.

Signifikanz $p < 0,05$: (a) PPCM vs. PPCTR, (b) PPCM vs. PCTR, (c) PPCM vs. NPCTR, (d) PPCM vs. ICM, (e) PPCM vs. CAD, (f) PPCM vs. HCTR, (g) PCTR vs. PPCTR, (h) PCTR vs. NPCTR, (i) PCTR vs. CAD, (j) PCTR vs. HCTR, (l) ICM vs. PPCTR, (m) ICM vs. PCTR, (n) ICM vs. NPCTR, (o) ICM vs. CAD, (p) ICM vs. PCTR.

4.1.4 Leukozytäre Mikropartikel (LMP)

Leukozytäre Mikropartikel (CD45⁺AnnexinV⁺) waren bei Patientinnen mit PPCM signifikant erhöht im Vergleich mit PPCTR ($p < 0,001$) und CAD ($p < 0,001$), jedoch nicht signifikant im Vergleich zu den anderen untersuchten Gruppen. Im Gegensatz dazu waren die LMP in ICM deutlich erhöht verglichen mit PPCTR, PCTR, NPCTR, CAD und HCTR (Abbildung 4-8).

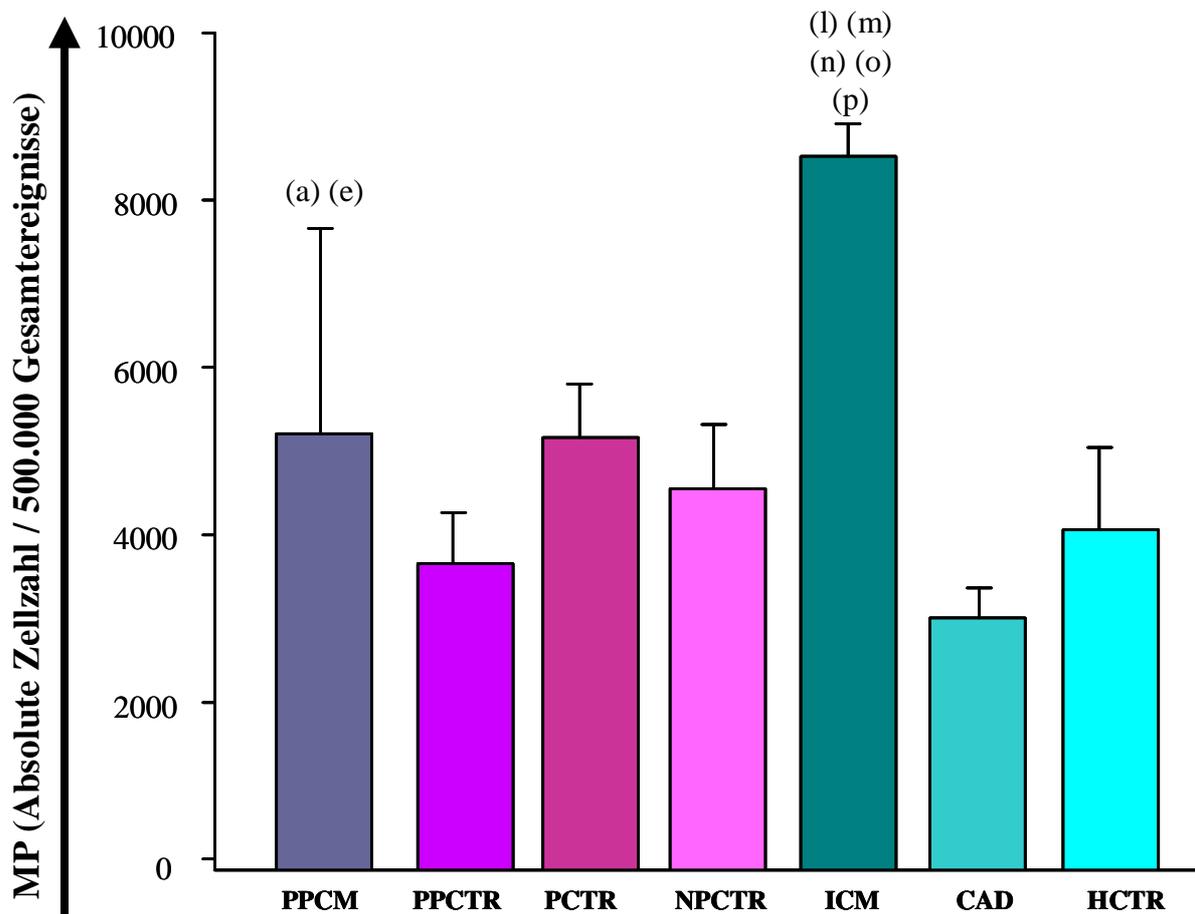


Abbildung 4-8. Leukozytäre Mikropartikel (MP) bei Patientinnen mit peripartaler Kardiomyopathie (PPCM). Der PPCM gegenübergestellt sind altersäquivalente gesunde postpartale Frauen (PPCTR), gesunde schwangere Frauen (PCTR), gesunde nicht-schwangere Frauen (NPCTR), Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie (ICM), Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit (CAD) und deren altersäquivalente gesunde Kontrollen (HCTR).

Leukozytäre MP waren bei Patientinnen mit PPCM signifikant erhöht gegenüber PPCTR und CAD. LMP zeigten sich in ICM signifikant erhöht im Vergleich zu PPCTR, PCTR, NPCTR, CAD und HCTR.

Signifikanz $p < 0,05$: (a) PPCM vs. PPCTR, (e) PPCM vs. CAD, (l) ICM vs. PPCTR, (m) ICM vs. PCTR, (n) ICM vs. NPCTR, (o) ICM vs. CAD, (p) ICM vs. PCTR.

4.2 Mikropartikel bei Patientinnen mit peripartaler Kardiomyopathie mit und ohne Bromocriptin-Therapie

Endotheliale und thrombozytäre Mikropartikel

Patientinnen mit PPCM zeigten nach Bromocriptin-Gabe signifikant rückläufige EMP verglichen mit PPCM-Patientinnen, die ausschließlich die Standard-Herzinsuffizienztherapie erhalten haben ($p < 0,001$). Darüber hinaus waren thrombozytäre Mikropartikel signifikant erniedrigt bei Patientinnen mit Bromocriptin-Therapie (Abbildung 4-9).

Die signifikante Abnahme der MP kann anhand der Subpopulationen der aktivierten und apoptotischen MP nachvollzogen werden. Sowohl aktivierte und apoptotische endotheliale MP als auch aktivierte und apoptotische thrombozytäre MP zeigten sich signifikant reduziert bei PPCM-BR ($p < 0,005$).

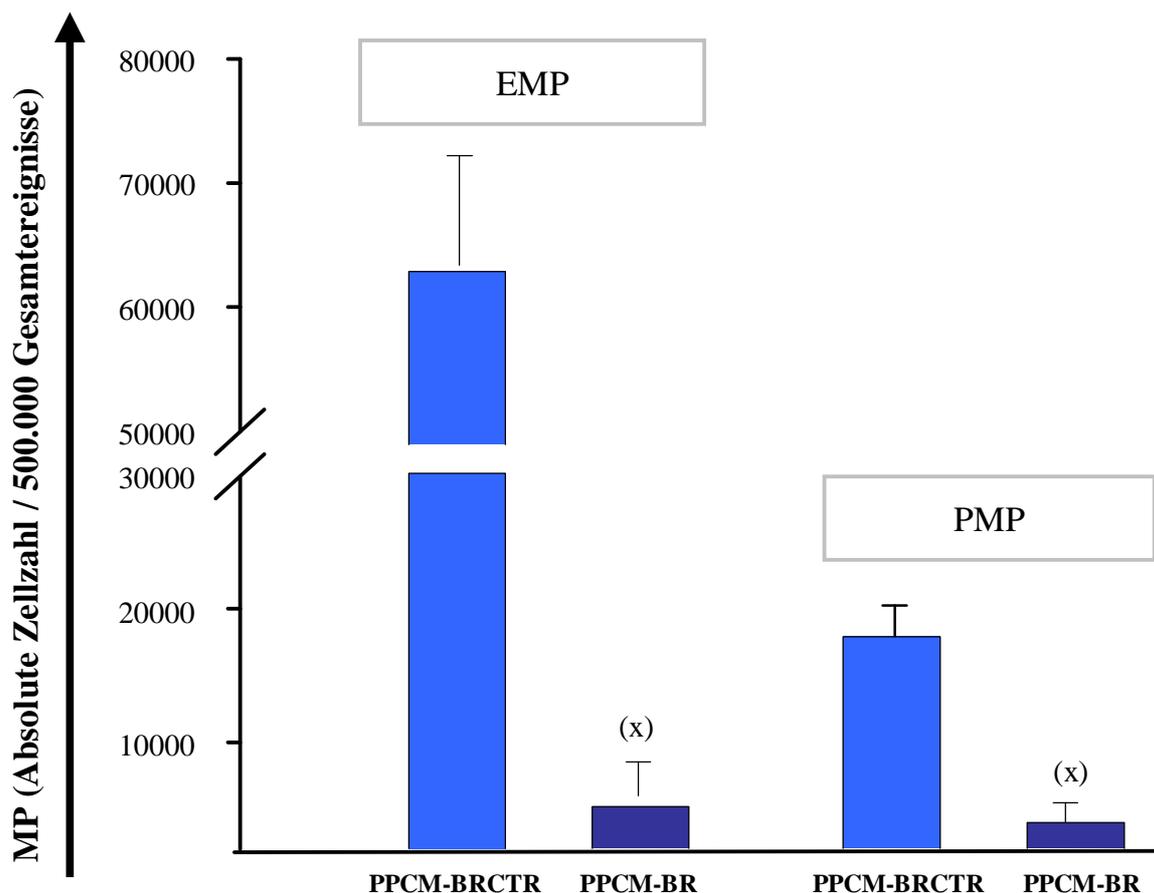


Abbildung 4-9. Endotheliale und thrombozytäre Mikropartikel (MP) bei Patientinnen mit peripartaler Kardiomyopathie (PPCM) und divergierender Therapieoption. Eine Gruppe erhielt ausschließlich eine Standard-Herzinsuffizienztherapie (PPCM-BRCTR), die andere Gruppe zusätzlich Bromocriptin (PPCM-BR).

Bei PPCM-BR zeigten sich sowohl endotheliale MP (EMP) als auch thrombozytäre MP (PMP) signifikant erniedrigt ($p < 0,005$): (x) PPCM-BR vs. PPCM-BRCTR.

4.3 CD62E/CD31-Quotient

Der CD62E/CD31-Quotient wurde als Indikator einer Aktivierung (hoher Quotient, > 4) oder Apoptose (niedriger Quotient, $< 0,4$) berechnet. Bei Patientinnen mit peripartaler Kardiomyopathie (PPCM, PPCM-BR, PPCM-BRCTR) zeigte sich, verglichen mit den anderen untersuchten Patientengruppen, ein höherer Quotient als Hinweis einer Generierung von endothelialen MP mittels aktivierter Prozesse (Tabelle 4-3).

Tabelle 4-3. CD62E/CD31-Quotient endothelialer Mikropartikel

	CD62E/CD31-Quotient \pm SEM	p-Wert vs. PPCM
PPCM	3,2 \pm 0,8	-
PPCTR	1,5 \pm 0,2	0,018
PCTR	1,0 \pm 0,1	0,002
NPCTR	0,9 \pm 0,1	$< 0,001$
ICM	2,0 \pm 0,5	0,204
CAD	1,1 \pm 0,7	0,026
HCTR	1,5 \pm 0,5	0,033
PPCM-BR	6,1 \pm 1,0	0,004
PPCM-BRCTR	2,9 \pm 0,3	0,870

CD62E/CD31-Quotient endothelialer Mikropartikel bei Patientinnen mit peripartaler Kardiomyopathie (PPCM), altersäquivalenten gesunden postpartalen Frauen (PPCTR), gesunden schwangeren Frauen (PCTR), gesunden nicht-schwangeren Frauen (NPCTR), Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie (ICM), Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit (CAD) und altersäquivalenten gesunden Kontrollen (HCTR). Ebenso wurden PPCM-Patienten unter Standard-Herzinsuffizienz-Therapie (PPCM-BRCTR) sowie solche mit zusätzlicher Bromocriptin-Therapie (PPCM-BR) berücksichtigt. Darstellung \pm Standardabweichung des Mittelwertes (SEM, standard error of the mean). Der p-Wert des Quotienten wurde jeweils mit PPCM verglichen.

4.4 Statistikübersicht

Die statistischen Ergebnisse sind in Tabelle 4-4 bis Tabelle 4-7 zusammengefasst.

Tabelle 4-4. Zelluläre Mikropartikel von Patientinnen mit peripartaler Kardiomyopathie, gesunden postpartalen Frauen und gesunden schwangeren Frauen

	PPCM	PPCTR			PCTR		
	m ± SEM	m ± SEM	p-Wert vs. PPCM	x-faches ± SEM	m ± SEM	p-Wert vs. PPCM	x-faches ± SEM
EMP							
CD144 ⁺ /AnnexinV ⁺	62957 ± 8746	5184 ± 456	<0,001	12,1 ± 19,2	20300 ± 5760	<0,001	3,1 ± 1,5
CD144 ⁺ /CD31 ⁺ /AnnexinV ⁺	34946 ± 3009	2589 ± 270	<0,001	13,5 ± 11,1	17173 ± 2047	<0,001	2,0 ± 1,6
CD31 ⁺ /Annexin V ⁺	10455 ± 1968	1827 ± 148	<0,001	5,7 ± 10,2	8720 ± 861	0,437	1,2 ± 1,7
CD62E ⁺	31946 ± 4733	2719 ± 212	0,002	11,8 ± 22,3	8840 ± 1669	<0,001	3,6 ± 2,8
PMP							
CD62P ⁺ /CD42b ⁺ /AnnexinV ⁺	19861 ± 2142	2730 ± 320	<0,001	7,2 ± 6,6	9600 ± 1442	<0,001	2,1 ± 1,5
CD62P ⁺	14952 ± 1515	818 ± 70	<0,001	18,3 ± 21,6	6966 ± 3448	0,016	2,1 ± 0,4
CD42b ⁺ /AnnexinV ⁺	4942 ± 1553	2181 ± 736	0,003	2,3 ± 2,1	433 ± 312	0,004	3,5 ± 4,9
MMP							
CD14 ⁺ /AnnexinV ⁺	15321 ± 2751	2461 ± 236	<0,001	6,2 ± 11,6	6297 ± 1520	<0,001	2,4 ± 1,8
LMP							
CD45 ⁺ /AnnexinV ⁺	5211 ± 2447	3360 ± 613	<0,001	1,6 ± 3,9	5159 ± 644	0,986	1,0 ± 3,8

Dargestellt sind jeweils die durchschnittliche Zellzahl pro 500.000 Gesamtereignisse unter Berücksichtigung der Standardabweichung sowie p-Wert vs. PPCM und die x-fache Erhöhung der Zellzahl der PPCM unter Berücksichtigung der Standardabweichung.

MP, Mikropartikel; EMP, endotheliale Mikropartikel; PMP, thrombozytäre Mikropartikel; MMP, monozytäre Mikropartikel; LMP, leukozytäre Mikropartikel; m, Mittelwert; SEM, Standardabweichung; PPCM, peripartale Kardiomyopathie; PPCTR, gesunde postpartale Frauen; PCTR, gesunde schwangere Frauen.

Tabelle 4-5. Zelluläre Mikropartikel von Patientinnen mit peripartaler Kardiomyopathie, gesunden nicht-schwangeren Frauen und Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie

	PPCM	NPCTR			ICM		
	m ± SEM	m ± SEM	p-Wert vs. PPCM	x-faches ± SEM	m ± SEM	p-Wert vs. PPCM	x-faches ± SEM
EMP							
CD144 ⁺ /AnnexinV ⁺	62957 ± 8746	3963 ± 428	<0,001	15,9 ± 20,4	16216 ± 1926	<0,001	3,8 ± 4,5
CD144 ⁺ /CD31 ⁺ /AnnexinV ⁺	34946 ± 3009	2916 ± 159	<0,001	12,0 ± 18,9	12093 ± 1098	<0,001	2,9 ± 2,4
CD31 ⁺ /Annexin V ⁺	10455 ± 1968	1438 ± 326	<0,001	7,2 ± 4,6	5291 ± 853	0,031	1,9 ± 1,7
CD62E ⁺	31946 ± 4733	1317 ± 212	<0,001	24,3 ± 22,3	10448 ± 2234	0,002	3,0 ± 2,0
PMP							
CD62P ⁺ /CD42b ⁺ /AnnexinV ⁺	19861 ± 2142	3372 ± 1229	<0,001	5,9 ± 1,7	9285 ± 426	<0,001	2,1 ± 5,0
CD62P ⁺	14952 ± 1515	1974 ± 905	<0,001	7,6 ± 1,6	6405 ± 542	<0,001	2,3 ± 2,7
CD42b ⁺ /AnnexinV ⁺	4942 ± 1553	1752 ± 265	<0,001	2,8 ± 2,7	3443 ± 835	0,015	2,8 ± 1,9
MMP							
CD14 ⁺ /AnnexinV ⁺	15321 ± 2751	3121 ± 181	<0,001	3,3 ± 15,1	7668 ± 751	<0,001	2,0 ± 3,7
LMP							
CD45 ⁺ /AnnexinV ⁺	5211 ± 2447	4557 ± 766	0,617	1,1 ± 3,1	8528 ± 383	0,011	0,6 ± 6,3

Dargestellt sind jeweils die durchschnittliche Zellzahl pro 500.000 Gesamtereignisse unter Berücksichtigung der Standardabweichung sowie p-Wert vs. PPCM und die x-fache Erhöhung der Zellzahl der PPCM unter Berücksichtigung der Standardabweichung.

MP, Mikropartikel; EMP, endotheliale Mikropartikel; PMP, thrombozytäre Mikropartikel; MMP, monozytäre Mikropartikel; LMP, leukozytäre Mikropartikel; m, Mittelwert; SEM, Standardabweichung; PPCM, peripartale Kardiomyopathie; NPCTR, gesunde nicht-schwangere Frauen; ICM, ischämische Kardiomyopathie.

Tabelle 4-6. Zelluläre Mikropartikel von Patientinnen mit peripartaler Kardiomyopathie, Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit und gesunden Kontrollen

	PPCM		CAD		HCTR		
	m ± SEM	m ± SEM	p-Wert vs. PPCM	x-faches ± SEM	m ± SEM	p-Wert vs. PPCM	x-faches ± SEM
EMP							
CD144 ⁺ /AnnexinV ⁺	62957 ± 8746	7127 ± 427	<0,001	8,8 ± 20,7	1072 ± 679	<0,001	58,7 ± 12,9
CD144 ⁺ /CD31 ⁺ /AnnexinV ⁺	34946 ± 3009	7067 ± 622	<0,001	4,9 ± 4,8	1688 ± 991	<0,001	20,7 ± 3,0
CD31 ⁺ /Annexin V ⁺	10455 ± 1968	4775 ± 1799	0,034	4,3 ± 0,8	1114 ± 674	<0,001	18,3 ± 2,2
CD62E ⁺	31946 ± 4733	4319 ± 1632	<0,001	7,3 ± 2,9	1572 ± 963	<0,001	20,3 ± 4,9
PMP							
CD62P ⁺ /CD42b ⁺ /AnnexinV ⁺	19861 ± 2142	2134 ± 480	<0,001	9,3 ± 4,4	3804 ± 775	<0,001	5,2 ± 2,7
CD62P ⁺	14952 ± 1515	1177 ± 170	<0,001	2,7 ± 8,9	2866 ± 352	<0,001	5,2 ± 4,3
CD42b ⁺ /AnnexinV ⁺	4942 ± 1553	1699 ± 13	0,003	2,9 ± 11,6	4440 ± 897	0,43	1,1 ± 1,7
MMP							
CD14 ⁺ /AnnexinV ⁺	15321 ± 2751	3183 ± 759	<0,001	4,8 ± 3,6	4278 ± 941	<0,001	3,6 ± 2,9
LMP							
CD45 ⁺ /AnnexinV ⁺	5211 ± 2447	3017 ± 358	<0,012	1,7 ± 6,8	4062 ± 981	0,231	1,2 ± 2,4

Dargestellt sind jeweils die durchschnittliche Zellzahl pro 500.000 Gesamtereignisse unter Berücksichtigung der Standardabweichung sowie p-Wert vs. PPCM und die x-fache Erhöhung der Zellzahl der PPCM unter Berücksichtigung der Standardabweichung.

MP, Mikropartikel; EMP, endotheliale Mikropartikel; PMP, thrombozytäre Mikropartikel; MMP, monozytäre Mikropartikel; LMP, leukozytäre Mikropartikel; m, Mittelwert; SEM, Standardabweichung; PPCM, peripartale Kardiomyopathie; CAD, stabile koronare Herzkrankheit; HCTR, gesunde Kontrollen.

Tabelle 4-7. Zelluläre Mikropartikel von Patientinnen mit peripartaler Kardiomyopathie

	PPCM	PPCM-BR			PPCM-BRCTR		
	m ± SEM	m ± SEM	p-Wert vs. PPCM	x-faches ± SEM	m ± SEM	p-Wert vs. PPCM	x-faches ± SEM
EMP							
CD144 ⁺ /AnnexinV ⁺	62957 ± 8746	5241 ± 742	<0,001	12,0 ± 11,8	63951 ± 8769	0,137	1,0 ± 0,9
CD144 ⁺ /CD31 ⁺ /AnnexinV ⁺	34946 ± 3009	4059 ± 17	<0,001	8,6 ± 3,0	39842 ± 3143	0,802	0,9 ± 0,9
CD31 ⁺ /Annexin V ⁺	10455 ± 1968	918 ± 86	<0,001	22,3 ± 17,5	10088 ± 944	0,802	1,8 ± 0,1
CD62E ⁺	31946 ± 4733	5750 ± 2083	<0,001	3,6 ± 2,3	28656 ± 1933	0,638	1,2 ± 0,3
PMP							
CD62P ⁺ /CD42b ⁺ /AnnexinV ⁺	19861 ± 2142	4023 ± 1398	<0,001	4,9 ± 1,5	17992 ± 2295	0,076	1,1 ± 0,9
CD62P ⁺	14952 ± 1515	1880 ± 218	<0,001	8,0 ± 6,9	14084 ± 1812	0,26	1,1 ± 0,8
CD42b ⁺ /AnnexinV ⁺	4942 ± 1553	843 ± 290	<0,001	5,9 ± 5,3	4946 ± 790	0,993	1,0 ± 1,19
MMP							
CD14 ⁺ /AnnexinV ⁺	15321 ± 2751	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
LMP							
CD45 ⁺ /AnnexinV ⁺	5211 ± 2447	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Dargestellt sind jeweils die durchschnittliche Zellzahl pro 500.000 Gesamtereignisse unter Berücksichtigung der Standardabweichung sowie p-Wert vs. PPCM und die x-fache Erhöhung der Zellzahl der PPCM unter Berücksichtigung der Standardabweichung.

MP, Mikropartikel; EMP, endotheliale Mikropartikel; PMP, thrombozytäre Mikropartikel; MMP, monozytäre Mikropartikel; LMP, leukozytäre Mikropartikel; m, Mittelwert; SEM, Standardabweichung; n.d., keine Daten; PPCM, peripartale Kardiomyopathie; PPCM-BR, PPCM unter Standardherzinsuffizienztherapie aus Sliwa *et al.*, 2010a; PPCM-BRCTR, PPCM mit additiver Bromocriptin-Therapie aus Sliwa *et al.*, 2010a.

5 Diskussion

Mikropartikel (MP) verfügen über das Potential, als Biomarker für die Diagnostik der peripartalen Kardiomyopathie (PPCM) geeignet zu sein. Die in dieser Studie vorgelegten Daten belegen, dass die endothelialen und thrombozytären Mikropartikel richtungsweisend für die Erkennung der PPCM sein können und gleichzeitig den ursächlichen pathophysiologischen molekularen Prozess reflektieren. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass bei der PPCM endotheliale und thrombozytäre MP signifikant erhöht sind.

MP sind eine heterogene Population von Plasmamembranstrukturen in einer Größe von 0,1 - 1 μm , auf deren Oberfläche zahlreiche Moleküle vorwiegend rezeptorvermittelt getragen werden, die sowohl für die lokale als auch periphere interzelluläre Kommunikation und Interaktion eine entscheidende Bedeutung haben. Die MP bestehen aus einer Phospholipiddoppelschicht, die zahlreiche zytosolische Komponenten in Form von Enzymen, Transkriptionsfaktoren, mRNA, microRNA etc. umschließt (Hunter *et al.*, 2008; Leroyer *et al.*, 2010). Des Weiteren tragen MP zahlreiche Oberflächenproteine, die der Mutterzelle zuzuordnen sind, unter anderem CD144, CD146 und CD31 für die MP endothelialen Ursprungs (Sinning *et al.*, 2011). In zahlreichen Publikationen konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass die MP in der Regulation inflammatorischer Prozesse, der Initiierung der Koagulation, der Steuerung vaskulärer Funktionen, der Apoptose und im Rahmen der Zellproliferation und Zelldifferenzierung einen wichtigen Beitrag leisten (Horstman *et al.*, 2004b). Die Formation der zirkulierenden MP erfolgt auf der Grundlage verschiedener Signalfunktionen. In diesem Prozess sind phosphorylierte Proteine, Proteinkinasen, aktiviertes Calmodulin, TNF- α , Thrombin, Entzündungsproteine, Zytokine und weitere Signalmoleküle beteiligt. Dazu zählen auch der Scherstress und die Hypoxie (Boulanger *et al.*, 2007; Distler *et al.*, 2005; Lynch und Ludlam, 2007; Wiedmer und Sims, 1991). Die p38 mitogen-aktivierte Proteinkinase zeigt eine signifikante und selektive Formation endothelialer MP (Curtis *et al.*, 2009; Morel *et al.*, 2011).

In Abbildung 5-1 ist der Pathomechanismus der MP-Bildung exemplarisch dargestellt, wobei gleichzeitig auf die differente Funktion der MP verwiesen wird. Die MP sind im menschlichen Organismus ein Teil des interzellulären lokalen und peripheren Steuerungsmechanismus. Unter pathologischen Bedingungen kommt es zu einer deutlichen Zunahme der MP im zirkulierenden Blut. In Langzeitstudien bei kardiovaskulären Erkrankungen konnte gezeigt werden, dass Patienten mit konstant erhöhtem zirkulierenden CD31-positiven und Annexin V-

positiven MP-Serumspiegel eine deutlich höhere Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen aufwiesen (Sinning *et al.*, 2011).

Die MP verschiedener Ursprungszellen unterscheiden sich in der Signalfunktion. Es gibt zahlreiche Hinweise, dass die Anzahl und die Zusammensetzung der MP sowie die spezifische Funktion von den vorliegenden pathophysiologischen Bedingungen abhängig sind. Bei verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen mit entzündlichen Komponenten, beispielsweise Herzinfarkt und Arteriosklerose, wurde eine ausgeprägte Erhöhung der MP beobachtet (Bernal-Mizrachi *et al.*, 2004; Burnier *et al.*, 2009; Lynch und Ludlam, 2007; Mallat *et al.*, 2000; Sinning *et al.*, 2011). Eine spezifische Zunahme der endothelialen MP konnte auch unter den Bedingungen des Scherstress beobachtet werden (Boulanger *et al.*, 2007; Boulanger *et al.*, 2008) (Abbildung 5-1).

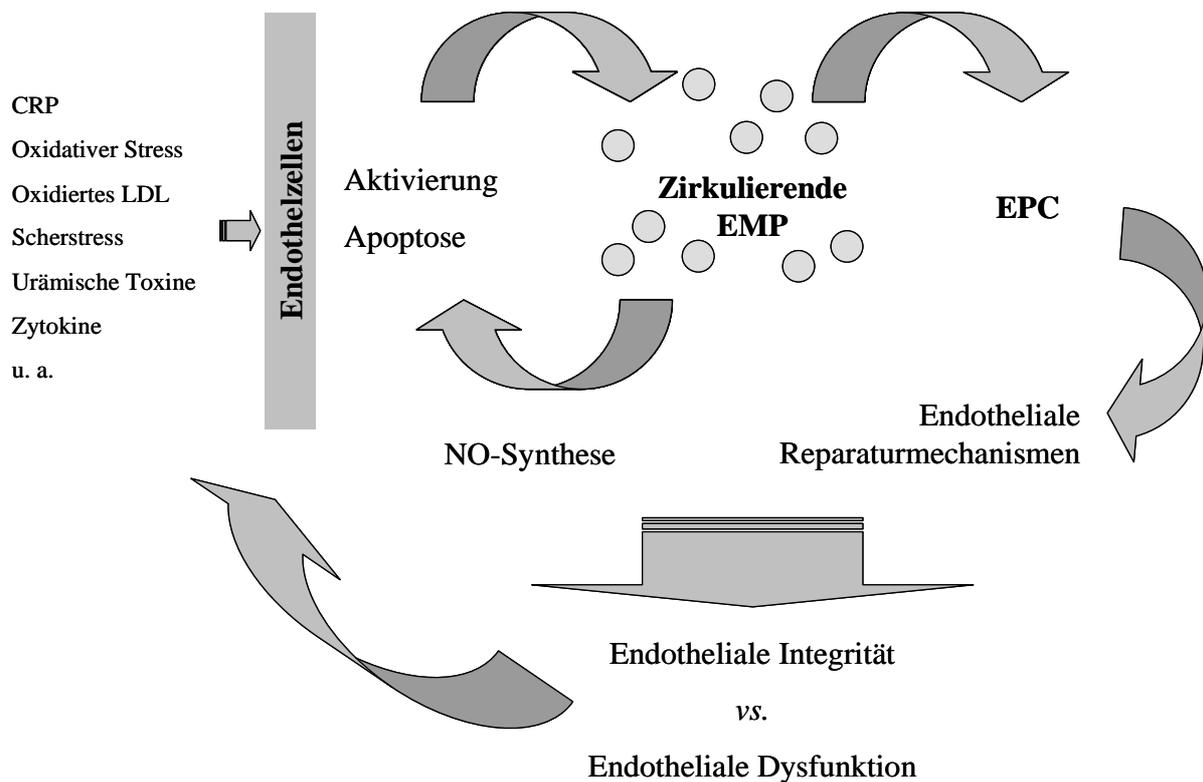


Abbildung 5-1. Endotheliale Mikropartikel (EMP) als Plasma-Marker der endothelialen Integrität. Die Freisetzung von EMP kann durch verschiedene Stimuli, die auf die Endothelzellen der Gefäßwand wirken, getriggert werden. In Abhängigkeit der initiierten Effekte werden Mikropartikel aktivierter oder apoptotischer Genese freigesetzt. Diese können u. a. die Stickstoffmonoxid (NO)-Freisetzung bzw. die endothelialen Reparaturkapazität mittels Anzahl an endothelialer Progenitorzellen (EPC) beeinflussen. Die Prozesse können bei reduzierter NO-Freisetzung und/oder reduzierten Reparaturmechanismen zur endothelialen Dysfunktion führen. Diese Kaskade kann im Sinne eines *circulus vitiosus* unterhalten werden.

Modifiziert nach Boulanger *et al.*, 2008

Das Auftreten der endothelialen MP (EMP) gilt als Hinweis für die endotheliale Dysfunktion (Horstman *et al.*, 2004a). Die endothelialen Zellen besitzen wichtige Funktionen im Rahmen der Aufrechterhaltung der Homöostase und zahlreichen weiteren physiologischen Prozessen im Gefäß. Eine endotheliale Dysfunktion tritt bei verschiedenen klinischen Erkrankungen auf, bei denen vermehrte EMP nachgewiesen werden konnten (Lynch und Ludlam, 2007). Die endotheliale Dysfunktion ist charakterisiert durch eine verminderte Aktivität der NO-Synthase und der damit verbundenen Folgeschritte. Dies führt unter anderem zu vermehrter Thrombozytenadhäsion und Thrombozytenaggregation sowie Leukozytenadhäsion auf der Grundlage einer getriggerten Expression von Adhäsionsmolekülen (Bauer und Sotnikova, 2010; Rösen, 2002). Im Vordergrund stehen Erkrankungen entzündlicher Genese, beispielsweise Lupus erythematoses visceralis, Vaskulitis, akutes Koronarsyndrom, Arteriosklerose, Präeklampsie und weitere Erkrankungen (Brogan *et al.*, 2004; Ferro *et al.*, 1997; Filer *et al.*, 2003; Gonzalez-Quintero *et al.*, 2003; Sinning *et al.*, 2011).

Ein generelles Merkmal aktivierter endothelialer Zellen sowie der Endothelzellen, die der Apoptose unterliegen, ist der Verlust der Asymmetrie der Membranphospholipidstruktur (Zwaal und Schroit, 1997). Diesem Mechanismus kann eine Schlüsselfunktion im Rahmen der Entstehung von MP zugeordnet werden. Die nachweisbaren EMP sind somit ein Spiegelbild des vaskulären Entzündungsprozesses und ermöglichen einen frühzeitigen diagnostischen Einblick in verschiedene Krankheitsgeschehen. So konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einer aktiven systemischen Vaskulitis eine signifikant höhere Anzahl von E-Selektin-positiven (CD62E⁺) EMP aufweisen (Brogan *et al.*, 2004). Die aktivierten Endothelzellen, die EMP bilden, sind durch CD62E charakterisiert im Gegensatz zu den apoptotischen Endothelzellen, deren EMP vordergründig durch die Marker CD31, CD105 oder Annexin V typisiert sind. Das Verhältnis von CD62E zu CD31 ermöglicht eine genauere Zuordnung zu den im Krankheitsprozess vorliegenden Mechanismen auf der Ebene der endothelialen Dysfunktion (Jimenez *et al.*, 2003).

Die Bildung von thrombozytären MP beruht im Wesentlichen auf aktivierten und phosphorylierten Kompartments des Thrombozyten und unterliegt der Steuerung durch Calmodulin, Myosinleichtkettenkinase und weiteren Calmodulin-regulierenden Proteinen. Wiedmer und Sims berichteten über eine zunehmende Formation von thrombozytären MP auf Grundlage des Phosphatase-Inhibitors Vanadate (Wiedmer und Sims, 1991). Die MP-Formation konnte wiederum inhibiert werden durch den Proteinkinaseinhibitor Sphingosine, den Myosinleichtkettenkinase-Inhibitor ML-7, den Calmodulin-Antagonisten W-7 und unter den Bedingungen

erhöhter zytosolischer cAMP-Konzentrationen (Wiedmer und Sims, 1991). Daraus ist ersichtlich, dass die Herausbildung und Formierung der MP einem komplexen molekularbiologischen Steuerungsprozess unterliegt. PMP-Oberflächen sind angereichert mit Membranrezeptoren für die Koagulationsfaktoren Va, VIII, IX und führen damit zu einer wesentlichen Signalverstärkung der Gerinnungskaskade. Die PMP führen zu einer bis 100fach gesteigerten prokoagulativen Aktivität gegenüber aktivierten Thrombozyten (Sinauridze *et al.*, 2007). Daraus ist abzuleiten, dass die PMP von entscheidender Bedeutung für thrombotische Prozesse im Rahmen akuter arterieller Verschlüsse in arteriosklerotisch veränderten Gefäßen sind (Mobarrez *et al.*, 2011). Eine erhöhte Anzahl der PMP sind bei verschiedenen Erkrankungen beobachtet worden, darunter die instabile Angina pectoris, der akute Myokardinfarkt sowie zerebrovaskuläre Ereignisse. PMP verfügen über die Fähigkeit, auch monozytäre Zellen zu aktivieren, wobei sowohl die inflammatorische als auch prokoagulatorische Funktionen der Monozyten im Rahmen der Interaktion mit dem Endothel zur Wirkung kommen (Barry *et al.*, 1997; Barry *et al.*, 1998). Thrombozytäre MP können die Expression endothelialer Marker humaner Stammzellen modulieren und die Ausschüttung proangiogenetischer und proinflammatorischer Mediatoren fördern (Distler *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2004; Mause und Weber, 2010). Die bedeutsame pathophysiologische Wirksamkeit der PMP konnte am Beispiel des Scott Syndroms eindrucksvoll nachgewiesen werden. Bei diesem Krankheitsbild haben die Thrombozyten die Fähigkeit verloren, MP zu bilden. Die zur Aktivierung führende Signalkaskade kommt nicht zur Wirkung, wodurch die Blutgerinnung beeinträchtigt wird und infolgedessen schwere Blutungen auftreten können (Sims *et al.*, 1989; Toti *et al.*, 1996; Weiss und Lages, 1997; Zwaal *et al.*, 2004).

Das klinische Bild der PPCM zeigt neben dem Hauptkriterium der Herzinsuffizienz häufig thrombembolische Komplikationen. Das prokoagulatorische Potential prä- und postpartal wird durch die direkte prokoagulatorische Wirkung sowohl der PMP als auch der EMP weiter verstärkt. Die hohe Anzahl apoptotischer MP fördert die prokoagulatorische Aktivität insbesondere auf der Ebene der Phosphatidylserin-Expression.

Im Rahmen der wissenschaftlichen Aufklärung der Pathomechanismen zur Herausbildung der PPCM konnten in den letzten Jahren Fortschritte erzielt werden (Hilfiker-Kleiner *et al.*, 2007a). So wurde von Hilfiker-Kleiner *et al.* das anti-angiogenetische, pro-apoptotische und pro-inflammatorische 16-kDa-Protein, das durch die Spaltung von Prolaktin mittels Cathepsin D und anderer Metalloproteinasen entsteht, als bedeutsam für die Ausbildung der PPCM beschrieben (Baldocchi *et al.*, 1993; Clapp *et al.*, 1993; Corbacho *et al.*, 2002) (Abbildung 5-2). Die auslösenden Ursachen für den Aktivierungsprozess des 16-kDa Prolaktins sind nicht restlos verstanden. Es wird vermutet, dass Bedingungen, die dem oxidativen Stress entsprechen, wesentlich für die Initiierung der Prozesskaskade sind (Hilfiker-Kleiner *et al.*, 2007a). Ob den MP in diesem Prozess eine modulierende Rolle zukommt, ist noch nicht ausreichend aufgeklärt. Das betrifft unter anderem auch die Aktivitäten der Metalloproteinasen, die in dem Prozess der 16-kDa Prolaktinformierung beteiligt sind (Horstman *et al.*, 2004b; Macotela *et al.*, 2006; Reuwer *et al.*, 2010).

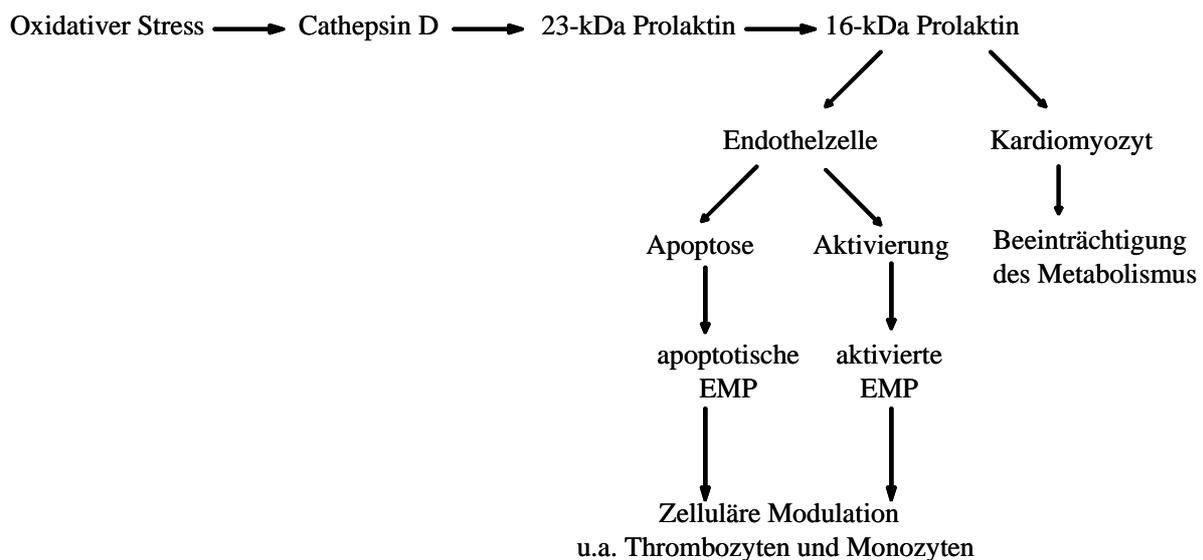


Abbildung 5-2. Kaskade der 16-kDa Prolaktinbildung und nachfolgender Wirkung auf Endothelzelle und Kardiomyozyt.

EMP, endotheliale Mikropartikel.

Die Aufklärung der Signalkaskade erfolgte an transgenen Mäusen, denen der Transkriptionsfaktor STAT3 im Herzmuskel fehlt (Hilfiker-Kleiner *et al.*, 2007a). Die Expression und Aktivierung von STAT3 ist deutlich reduziert in den Endstadien der Herzinsuffizienz der dilatativen und peripartalen Kardiomyopathie (Haghikia *et al.*, 2011; Hilfiker-Kleiner *et al.*, 2007a; Podewski *et al.*, 2003). Der Transkriptionsfaktor STAT3 ist in die Regulation zahlreicher molekularer Prozesse einbezogen, das betrifft vor allem antioxidative Prozesse, die Angiogenese und Revaskularisation, die Modulation der Hypertrophie sowie metabolische und Energieaufrechterhaltende Mechanismen (Haghikia *et al.*, 2011). STAT3 wird durch zahlreiche proinflammatorische Faktoren aktiviert, wobei IL-6 dominiert (Zhong *et al.*, 1994). Grundsätzlich ist STAT3 ein ubiquitäres Steuerungsprotein für zahlreiche zu modulierende molekulare Prozesse auf der Ebene des „cardiac remodeling“ (Haghikia *et al.*, 2011). Bei STAT3-reduziertem Myokardgewebe folgt ein Mangel an dem antioxidativ wirkenden Enzym Mangan-Sodium-Dismutase und es kommt somit zur Freisetzung der Protease Cathepsin D aus den Lysosomen, die das zirkulierende Hormon 23-kDa Prolaktin in die 16-kDa Prolaktinform spaltet. Das 16-kDa Prolaktin hat eine Wirkung auf die endothelialen Zellen und auf die Kardiomyozyten (DFG, 2008; Hilfiker-Kleiner *et al.*, 2008b). Als Folge tritt eine Aktivierung oder eine Apoptose endothelialer Zellen ein (Hilfiker-Kleiner *et al.*, 2007a; Sliwa *et al.*, 2006a). Dies wiederum führt zur Ausbildung aktivierter sowie apoptotischer EMP, die der Bestimmung mittels Durchflusszytometrie oder anderer Methoden zugänglich sind.

Mit großer Sicherheit ist anzunehmen, dass die komplexe angiogenetische Imbalance die eigentliche Ursache für die Herausbildung der PPCM ist (Patten *et al.*, 2012). Es wird davon ausgegangen, dass dieser Prozess mindestens zwei molekulare Ebenen umfasst. Das betrifft das anti-angiogenetische zirkulierende Protein sFlt1, das oben beschriebene 16-kDa Prolaktin sowie die Überstimulation von AT₁-Rezeptoren (Patten *et al.*, 2012; Wallukat *et al.*, 1999). Eine reduzierte Aktivität von PGC-1 α sowie STAT3 begünstigen einen Prolaktin-vermittelten anti-angiogenetischen Effekt (Patten *et al.*, 2012). Aus dem beschriebenen Pathomechanismus wird ersichtlich, dass sich differente Wege für die Therapie der PPCM eröffnen.

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass das Auftreten der MP im Rahmen des Krankheitsprozesses der PPCM als eine Folge oben beschriebener Pathomechanismen gewertet werden kann. Das beobachtete MP-Profil belegt, dass die PPCM gegenüber anderen kardialen Erkrankungen in Form von ischämischer Kardiomyopathie oder stabiler koronarer Herzkrankheit eindeutig zu differenzieren ist (Abbildung 4-1 bis Abbildung 4-8). Das Verhältnis der MP-Oberflächenproteine CD62E/CD31 bei den untersuchten PPCM-

Patientinnen zeigt, dass der Vorgang der MP-Generierung vermehrt über Aktivierungsprozesse erfolgt ist. (Tabelle 4-3). Das Auftreten von MP in anderen Kohorten (gesunde postpartale Frauen, gesunde schwangere Frauen und gesunde nicht-schwangere Frauen) war signifikant erniedrigt gegenüber den PPCM. In der Studie wurden endotheliale MP, thrombozytäre MP, leukozytäre MP und monozytäre MP definiert und quantitativ erfasst. Die im Rahmen der PPCM auftretenden MP sind vordergründig endothelialen und thrombozytären Ursprungs und reflektieren somit den entzündlichen Prozess, der diese Erkrankung charakterisiert. Die Kohorte der gesunden schwangeren Frauen (Durchschnittsalter 31 ± 6 Jahre) zeigte eine statistisch signifikante Erhöhung der apoptotischen EMP gegenüber PPCTR, NPCTR und HCTR (Abbildung 4-3). Eine ätiologische Zuordnung dieses Befundes ist nicht möglich. Am ehesten kann davon ausgegangen werden, dass durch die hormonelle Aktivierung des Körpers im Rahmen der Schwangerschaft ein erhöhter zellulärer Austausch auf der Ebene der Endothelzellen stattfindet. Das Krankheitsbild der PPCM zeigt eine statistisch signifikante Zunahme sowohl der aktivierten EMP, der apoptotischen EMP als auch der aktivierten und apoptotischen PMP gegenüber den untersuchten Kontrollgruppen (Abbildung 4-1 bis Abbildung 4-6). Ausgenommen davon sind apoptotische EMP in PCTR und apoptotische PMP in HCTR (Abbildung 4-3 und Abbildung 4-6). Das erklärt weitgehend, dass im Rahmen des Krankheitsprozesses der PPCM ein aktivierter Entzündungsprozess auf der Ebene des Endothels bevorzugt im Mikrozirkulationsbereich stattfindet. Die thrombozytären MP verfügen über die Eigenschaft der Stimulation endothelialer Zellen. Diesem Pathomechanismus muss auch für die Beurteilung des Verlaufs des Krankheitsbildes eine wichtige Bedeutung zugewiesen werden. Monozytäre und leukozytäre MP sind für die Differenzierung der PPCM von anderen Formen der Herzinsuffizienz nicht geeignet (Abbildung 4-7 und Abbildung 4-8). Apoptotische PMP sind bei den Erkrankungsbildern der ICM und CAD gegenüber der altersäquivalenten Kontrollgruppe (Durchschnittsalter 71 ± 8 Jahre) nicht erhöht (Abbildung 4-6). Aktivierte PMP zeigen bei der Erkrankungsgruppe der ICM eine statistisch gesicherte Erhöhung gegenüber PPCTR, NPCTR, CAD und HCTR (Abbildung 4-5). Dies kann als Hinweis für einen permanenten entzündlichen Prozess im Rahmen der ICM gewertet werden. Im Zusammenhang mit der Tatsache, dass die leukozytären MP bei der ICM gegenüber PPCTR, PCTR, NPCTR, CAD und HCTR signifikant erhöht sind (Abbildung 4-8), muss des Weiteren davon ausgegangen werden, dass neben der ischämischen Komponente, die die Erkrankung klassifiziert, sekundäre entzündliche Prozesse initiiert werden, die einer weiteren Abklärung bisher nicht unterzogen worden sind.

Der diagnostische Zugang zu der PPCM wird primär durch das klinische Krankheitsbild und dessen Komplikationen determiniert. Im Zusammenhang mit den physiologischen Adaptationsmechanismen während der Schwangerschaft, der Geburt und in der postpartalen Phase besteht eine erhöhte Blutgerinnungsneigung, die ein Risiko für die Ausbildung von thromboembolischen Ereignissen darstellt (James, 2009). Postpartal zeigen sich venöse Thrombosen 4fach und pulmonale Embolien 15fach erhöht gegenüber der Schwangerschaft, wobei das relative Risiko bei Spätgebärenden deutlich erhöht ist (Heit *et al.*, 2005). Vorbestehende minimale und physiologisch unbedeutende Mitralinsuffizienzen können sich unter den Bedingungen der Schwangerschaft demaskieren und bei der Entwicklung und Ausformung der PPCM mit extremer Vergrößerung des linken Ventrikels zu einer zusätzlichen bedeutsamen hämodynamischen Belastung führen, die das Schwerebild der Krankheit beschleunigen kann. Infolge der Gefügedilatation des Herzens und der resultierenden Einschränkung der linksventrikulären Ejektionsfraktion wird auch die Entstehung vor allem linksventrikulärer Thromben begünstigt. Die Einleitung einer antikoagulativen Therapie sollte im Einzelfall erwogen werden (Blauwet und Cooper, 2011).

Die prä- und postpartale klinische Beschwerdesymptomatik wird von den erstkonsultierenden Ärzten häufig nicht zielführend eingeordnet. In der Regel werden die Patientinnen dem Kardiologen erst im Stadium der Herzinsuffizienz III und IV nach NYHA vorgestellt (Fett *et al.*, 2002; Sliwa *et al.*, 2006a). Die verspäteten Diagnosestellungen bedingen in der Regel nicht nur eine Verzögerung der notwendigen intensiven Behandlung, sondern führen auch zu einer direkten vitalen Gefährdung der Mutter bzw. der Schwangeren und des Ungeborenen. So wurde in einer retrospektiven Studie unter anderem über eine ≥ 1 Woche verzögerte Diagnosestellung der PPCM bei 48% der Patientinnen mit schwerwiegenden klinischen unerwünschten Ereignissen (Tod, Notwendigkeit von Transplantation oder Assist-Devices, thromboembolische Zwischenfälle) berichtet (Goland *et al.*, 2009).

Unter dem Gesichtspunkt der Epidemiologie ist das Krankheitsbild der PPCM für geographische Räume, wie beispielsweise Haiti, von enormer soziologischer Bedeutung. Das besonders häufige Vorkommen der PPCM in der schwarzen Bevölkerung - unter afrikanisch-stämmigen Amerikanerinnen zeigte sich ein 15,7fach erhöhtes Risiko (Gentry *et al.*, 2010) - besitzt unter dem Gesichtspunkt der höheren allgemeinen Fruchtbarkeitsziffer eine zusätzliche Gewichtung. Aus der Erkenntnis, dass Mehrfachgebärende und ältere Mütter bzw. Schwangere häufiger an der PPCM erkranken und dass bei schwarzen Frauen das Erkrankungsbild einen schwereren Verlauf zeigt, ist diesem Patientinnenkollektiv aus klinischer Sicht eine besondere

Aufmerksamkeit zu widmen (Goland *et al.*, 2013; Modi *et al.*, 2009). Weitere Faktoren dürften im kulturellen Brauchtum und der begrenzten Verfügbarkeit von adäquater Nahrung für Säuglinge und Kleinkinder zu suchen sein (Ford *et al.*, 1998). Die Stillperiode erstreckt sich in den afrikanischen Ländern in 92% über 5 Monate. Nach 12 Monaten werden noch 77% der Kinder gestillt (Seftel und Susser, 1961).

Die Patientinnen, die in der vorliegenden Studie eingeschlossen worden sind, zeigten das klassische Erkrankungsbild der PPCM. Aktuell liegen keine Untersuchungen vor, wie das Krankheitsbild in der Übergangsphase im Gegensatz zur klassischen Ausprägung differenziert werden kann. Das bisher vorhandene Methodenspektrum zur Erkennung der PPCM (Schwangerschaft, klinisches Beschwerdebild, EKG, Echokardiographie, (hs-)CRP, NT-proBNP) ist weiterhin uneingeschränkt gültig. Die peripartale Kardiomyopathie (PPCM) entspricht dem klinischen Bild einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM). Die entscheidende Differenzierung im klinischen Krankheitsbild beruht auf einer vorangegangenen Schwangerschaft und der raschen Progredienz, sodass diese Erkrankung innerhalb weniger Tage zum Exitus letalis führen kann. In den vorliegenden Publikationen zur Erkrankung der PPCM werden unterschiedliche Erfahrungen zum Verlauf mitgeteilt, die einem differenten Krankengut entsprechen. Abhängig von Patientinnenkollektiv und Untersuchungszeitraum wird unterschiedlich über die Mortalitätsrate der PPCM berichtet. Amos *et al.* beschreiben keine Todesfälle über einen durchschnittlichen Beobachtungszeitraum von 43 Monaten, wobei eine Herztransplantationsrate von 10% erforderlich wurde (Amos *et al.*, 2006). Duran *et al.* berichten im Gegensatz zu Amos *et al.* über eine Mortalitätsrate von 30% über 47 Monate (Duran *et al.*, 2008). Felker *et al.* beziffern die 8,6-Jahres-Mortalitätsrate auf 7% (Felker *et al.*, 2000b), Fett *et al.* beschreiben eine 5-Jahres-Mortalitätsrate von 15,3% (Fett *et al.*, 2005b). Die PPCM ist ein weltweit verbreitetes Krankheitsbild mit unterschiedlicher geographischer Häufigkeit (Sliwa *et al.*, 2010b). Für die europäische Union liegen keine entsprechenden Publikationen vor, wobei das Auftreten der Erkrankung beispielsweise in Deutschland deutlich unterschätzt wird (Hilfiker-Kleiner *et al.*, 2008a). Insgesamt zeigt die PPCM gegenüber anderen bekannten Formen der Herzinsuffizienz, insbesondere der DCM und ICM, langfristig eine günstigere Prognose, wobei darauf hinzuweisen ist, dass diese positiven Ergebnisse nur unter der Voraussetzung optimaler medizinischer Betreuung erreicht werden können (Felker *et al.*, 2000b) (Abbildung 5-3, Studiendaten - Vereinigte Staaten von Amerika).

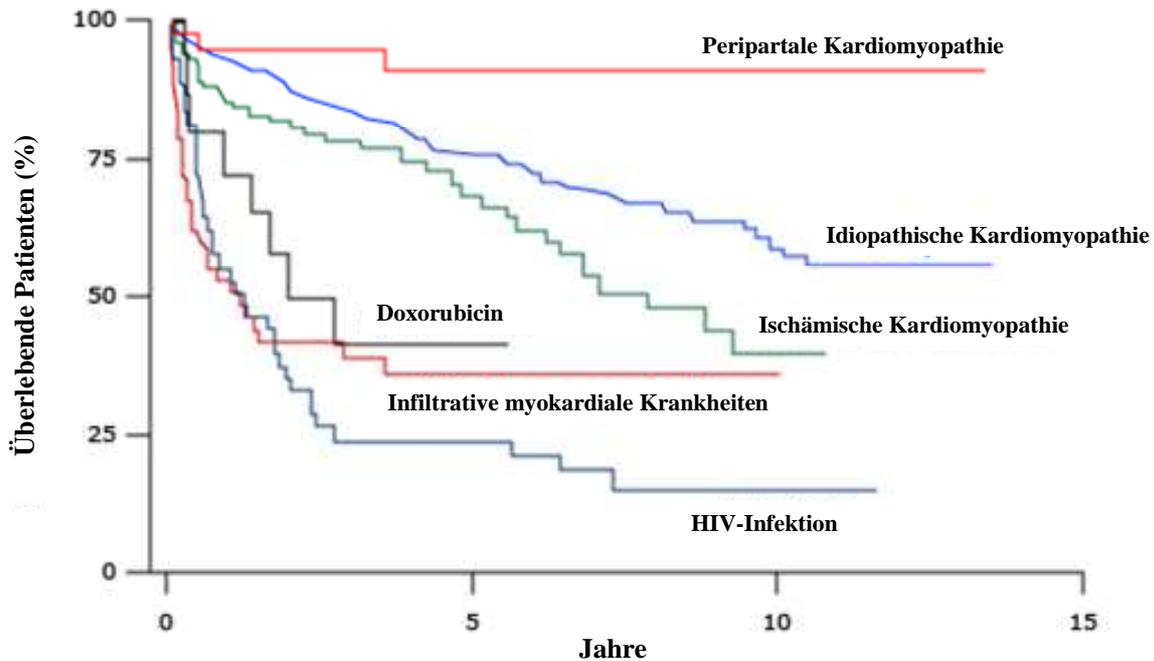


Abbildung 5-3. Adjustierte Überlebenszeitanalyse nach Kaplan-Meier von 1230 Patienten bezogen auf die Ätiologie der Kardiomyopathie. Die günstigste Langzeitprognose bestand bei Patientinnen mit peripartaler Kardiomyopathie, die ungünstigste Prognose wiesen infiltrative myokardiale Krankheiten und solche mit HIV-Assoziation auf.

Nach Felker *et al.*, 2000a.

Übereinstimmend von verschiedenen Arbeitsgruppen ist die Echokardiographie nicht nur für die Absicherung der Diagnose, sondern auch für den Verlauf und die Prognose der Erkrankung besonders wertvoll. So konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einer linksventrikulären enddiastolischen Größe (LVESD) von < 55 mm und einer linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) von $> 27\%$ zu einer kompletten klinischen Erholung tendieren (Duran *et al.*, 2008). Der Anteil der Patientinnen mit PPCM, die nach 6 Monaten eine linksventrikuläre Ejektionsfraktion von $> 50\%$ erreichen, ist deutlich höher gegenüber einer weiblichen und männlichen Kontrollgruppe mit Herzinsuffizienz anderer Genese (Cooper *et al.*, 2012). Die Ursache für die differenten Prognosen oben genannter Patientengruppen ist offensichtlich auf die zugrunde liegenden Pathomechanismen zurückzuführen. Bei der Ausbildung der PPCM kommt es letztlich zu einer Limitierung des 16-kDa Prolaktin-bildenden Prozesses.

Aus Längsschnittuntersuchungen ist bekannt, dass die Häufigkeit des Auftretens der PPCM in den Folgeschwangerschaften erhöht ist. Der Anteil des Wiederauftretens der PPCM ist direkt abhängig von der zum Eintritt der Gravität vorhandenen Ejektionsfraktion (EF) (Demakis und Rahimtoola, 1971; Fett *et al.*, 2010). Bei einer EF von $< 55\%$ entwickelten 46,2% der Patientinnen erneut eine PPCM, bei einer EF $> 55\%$ waren es lediglich 17% der Patientinnen

(Fett *et al.*, 2010). Das bedeutet, dass bei dieser Patientinnengruppe keine Ausheilung erfolgte und offensichtlich die Stimulierung des Pathomechanismus zur Ausbildung der Erkrankung erneut zur Entfaltung kam. Sliwa *et al.* konnten 2004 zeigen, dass sich die linksventrikuläre Ejektionsfraktion bei allen PPCM-Patientinnen während einer erneuten Schwangerschaft deutlich verschlechterte. Weiterführende Untersuchungen, die die höhere Erkrankungshäufigkeit unter den vorgenannten Bedingungen erklären könnten, sind bisher nicht publiziert worden.

Als einen weiteren prognostischen Indikator hat sich die QRS-Zeit im Elektrokardiogramm (EKG) bewährt. Die Verlängerung der QRS-Zeit über 120 ms ist als unabhängiger Faktor für die Mortalität und den plötzlichen Herztod in einer großen Gruppe von Patienten mit einer ischämischen oder nicht-ischämischen Herzinsuffizienz anerkannt (Duran *et al.*, 2008; Iuliano *et al.*, 2002). 96% der Patientinnen mit PPCM weisen ein auffälliges 12-Kanal-EKG auf, wobei T-Wellen-, P-Wellen-, QRS-Komplex-Veränderungen sowie Achsenabweichungen vordergründig sind. Des Weiteren sind Sinusfrequenzerhöhungen meist nachweisbar (Demakis *et al.*, 1971; Tibazarwa *et al.*, 2012). Der plötzliche Herztod ist bis zu 50% für die Mortalität in der Erkrankungsgruppe der PPCM verantwortlich (Duran *et al.*, 2008). Die elektrische Instabilität ist auf unterschiedliche elektrophysiologische Mechanismen im Myokardgewebe zurückzuführen. Die große Häufigkeit des plötzlichen Herztodes bei der PPCM-Erkrankung weist darauf hin, dass molekulare Mechanismen auf der Ebene der Myokardzellen durch den Entzündungsprozess gestört sind. Dem 16-kDa Prolaktin wird neben der Bedeutung für die MP-Bildung unter anderem eine microRNA-vermittelte Wirkung auf Kardiomyozyten zugeschrieben (Halkein *et al.*, 2013). Es wird vermutet, dass die kontraktilen Proteine direkt negativ beeinflusst werden (Hilfiker-Kleiner *et al.*, 2007a). Zu dem molekularen Pathomechanismus gibt es zurzeit keine Erkenntnisse; es wird lediglich über ein Forschungsprojekt der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) zu dieser Problematik berichtet (DFG, 2008). Die im Rahmen der Herzinsuffizienz auftretende ausgeprägte Verminderung der kontraktilen Funktion des Myokards als Ausdrucksform der reduzierten Ejektionsfraktion führt zu einer Herzvergrößerung insbesondere des linken Ventrikels auf der Grundlage der Frank-Starling-Mechanismen. Die notwendige Abgrenzung zur PPCM kann auf der Grundlage der Bestimmung der MP richtungsweisend erfolgen. Unter Einbeziehung serologischer Marker, insbesondere der CRP- und der hs-CRP-Aktivität, dem NT-proBNP, dem Fas/Apo-1 ist das Krankheitsbild der PPCM gegenüber gesunden Kontrollen abgrenzbar (Forster *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2012; Sliwa *et al.*, 2006b; Sliwa *et al.*, 2000). Die frühzeitige Bestimmung des atrialen

natriuretischen Hormons (ANP) ist sehr hilfreich für die richtungsweisende Diagnostik (Adesanya *et al.*, 1991). Die im Rahmen der normalen Schwangerschaft auftretenden physiologischen Veränderungen, insbesondere die Hypervolämie, führen unter Einbeziehung der gleichzeitig stattfindenden hormonellen Umstellungen zu zahlreichen klinisch differenten Beschwerdebildern, die jedoch in der Regel zu spät dem wirklich vorliegenden Krankheitsbild der PPCM zugeordnet werden. Die verzögerte diagnostische Zuordnung begünstigt die Herausbildung schwererer Verlaufsformen, die damit zum Teil die ungünstige Prognose der PPCM bedingen.

Die Ätiologie der Erkrankung ist auf der molekularen Ebene nicht vollständig aufgeklärt. Es ist jedoch davon auszugehen, dass weitere unbekannte Faktoren den Schweregrad der Erkrankung und die Prognose modulieren. In einer Publikation von Fidzianska *et al.* wurden mittels elektronenmikroskopischer Diagnostik ultrastrukturelle Veränderungen im Kapillarbereich und den Endothelzellen nachgewiesen (Fidzianska *et al.*, 2010). Dies kann als ein deutlicher Hinweis auf den beschriebenen Pathomechanismus der 16-kDa Prolaktin-Wirkung verstanden werden. Die von Fidzianska *et al.* beobachtete starke Schädigung kleinster Gefäße durch Lumenverschluss, Endothelzell-Remodeling, apoptotische Veränderungen mit dem Auftreten von Mastzellen und Präadipozyten stimmt mit der 16-kDa Prolaktin-Wirkung überein. Im direkten Vergleich mit Biopsien anderer Patienten mit manifester Herzinsuffizienz (2 Patienten mit Myokarditis, 1 Patient mit DCM) konnten diese Veränderungen nicht beobachtet werden (Fidzianska *et al.*, 2010). Obwohl die Fallbeschreibung nicht repräsentativ ist, fügen sich die beobachteten ultrastrukturellen Veränderungen in das Krankheitsbild ein.

Auf der Grundlage der Erkenntnisse zur Entwicklung der PPCM wurde der Einsatz von Bromocriptin, einem Inhibitor der Prolaktin-Sekretion, untersucht. Der Einsatz von Bromocriptin zeigte im Tiermodell sowie in klinischen Studien zur PPCM einen eindeutigen therapeutischen Nutzen (Hilfiker-Kleiner *et al.*, 2007a; Sliwa *et al.*, 2010a). Es konnte nachgewiesen werden, dass sich unter der Therapie mit Bromocriptin bei manifest erkrankten PPCM-Patientinnen der klinische Zustand deutlich besserte (Sliwa *et al.*, 2010a) (Abbildung 5-4).

	PPCM-BR		PPCM-BRCTR	
	zum Ausgangszeitpunkt (n=10) n (%)	nach 6-monatiger Therapie (n=9) n (%)	zum Ausgangszeitpunkt (n=10) n (%)	nach 6-monatiger Therapie (n=6) n (%)
NYHA				
I	0	9 (100)	0	0
II	5 (50)	0	5 (50)	3 (50)
III / IV	5 (50)	0	5 (50)	3 (50)

Abbildung 5-4. Vergleich der funktionellen Klassifikation NYHA bei PPCM-BR und PPCM-BRCTR zum Ausgangszeitpunkt und nach 6 Monaten unter divergierender Therapie. Die niedrigere Anzahl an Patientinnen nach 6-monatiger Therapie begründet sich durch Todesfälle.

PPCM-BRCTR, peripartale Kardiomyopathie mit Standard-Herzinsuffizienztherapie; PPCM-BR, additive Bromocriptin-Therapie; n, Anzahl der Patientinnen; NYHA, New York Heart Association.

Modifiziert nach Sliwa *et al.*, 2010a

In der vorliegenden Studie konnte weiterhin gezeigt werden, dass die mit Bromocriptin behandelten PPCM-Patientinnen (PPCM-BR) signifikant erniedrigte EMP aufweisen im Vergleich mit Patientinnen ohne additive Bromocriptin-Therapie (PPCM-BRCTR) (Abbildung 4-9). Bei dem untersuchten Patientinnenkollektiv und deren Kontrollgruppe handelte es sich um das identische Patientinnenkollektiv der Publikation von Sliwa *et al.*, 2010. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass der im Krankheitsbild der PPCM vermutete pathophysiologisch entscheidende Prozess der Endothelschädigung durch 16-kDa Prolaktin mittels einer Intervention mit Bromocriptin limitiert oder auch unterbrochen werden kann. Weiterführende Untersuchungen sind erforderlich, um die qualitative und quantitative Wirksamkeit von Bromocriptin in diesem Prozess zu definieren.

Die massive Abnahme der EMP und PMP im peripheren Blut nach Bromocriptin-Therapie geht konform mit der deutlichen Verbesserung des klinischen Zustandes der Patientinnen mit Bromocriptin-Therapie (Abbildung 4-9). Dies wird insbesondere durch die Verbesserung der linksventrikulären Funktion (LVEF) bestätigt (Sliwa *et al.*, 2010a) (Abbildung 5-5).

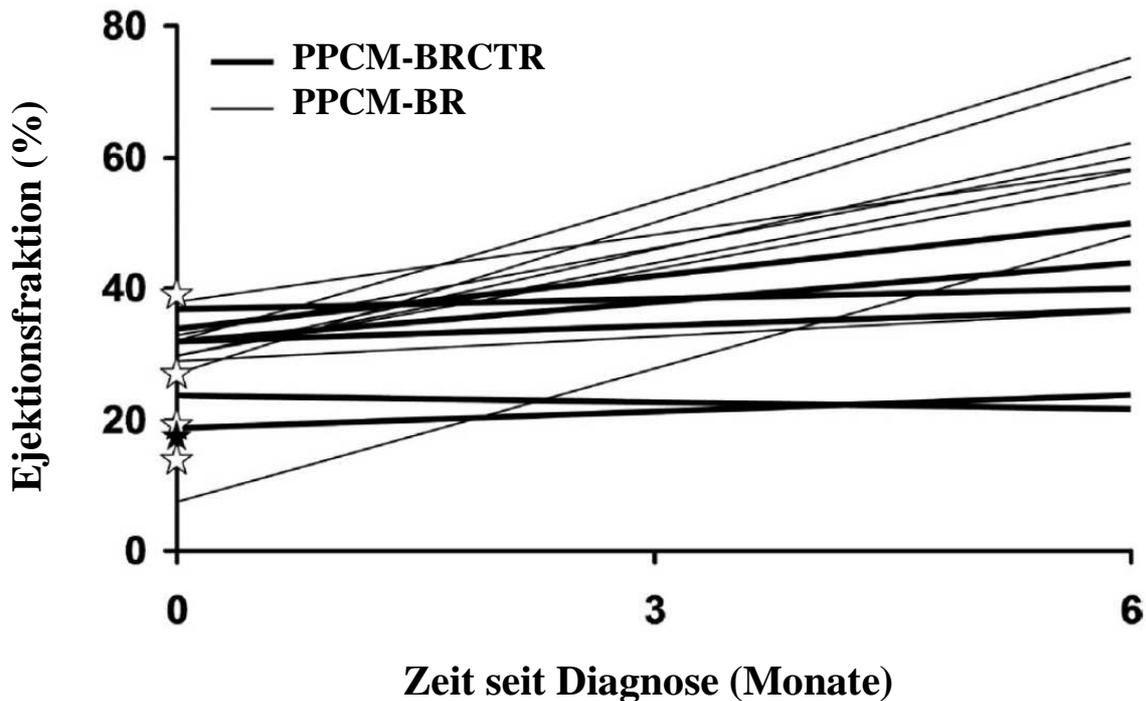


Abbildung 5-5. Linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) bei PPCM-BRCTR und PPCM-BR zum Ausgangszeitpunkt und nach 6 Monaten unter divergierender Therapie. Die Sterne repräsentieren die LVEF von Verstorbenen zum Ausgangszeitpunkt.

PPCM-BRCTR, peripartale Kardiomyopathie mit Standard-Herzinsuffizienztherapie; PPCM-BR, additive Bromocriptin-Therapie.

Modifiziert nach Sliwa *et al.*, 2010a

Aus dieser Pilotstudie von Sliwa *et al.* wird ersichtlich, dass das Prolaktin für die Entstehung der PPCM von zentraler Bedeutung ist und Bromocriptin diesen Pathomechanismus zu supprimieren vermag. Dies kann als weiterer Hinweis für die Richtigkeit der oben beschriebenen Signalkaskade gewertet werden. 2013 wurde erstmals ein möglicher Zusammenhang zwischen Prolaktinerhöhung und Herzinsuffizienz anderer Genese beschrieben (Landberg *et al.*, 2011; Parissis *et al.*, 2013). Die gewonnenen Daten belegen auch, dass die PPCM gegenüber anderen, im peripartalen Zeitraum auftretenden Formen der symptomatischen Herzinsuffizienz, abgegrenzt werden kann. In unveröffentlichten laborinternen Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass die PPCM von der DCM durch eine statistisch signifikante Differenz der EMP, insbesondere der Subgruppen aktivierter und apoptotischer EMP, sicher differenziert werden kann (Abbildung 5-6). Ebenso sind die PMP bei der DCM gegenüber der PPCM signifikant erhöht (Abbildung 5-7).

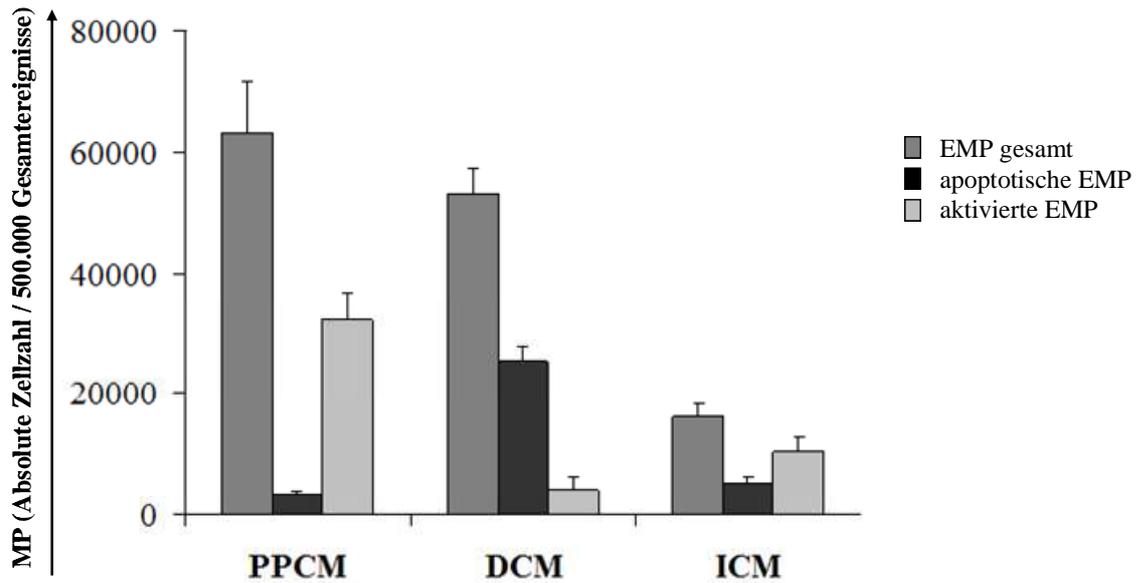


Abbildung 5-6. Endotheliale Mikropartikel (MP) bei Patientinnen mit peripartaler Kardiomyopathie (PPCM), Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie (DCM) und Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie (ICM). In der Abbildung sind zum einen die Gesamtzahl an endothelialen MP dargestellt sowie zum anderen die Subpopulationen der aktivierten und apoptotischen endothelialen MP.

Sowohl die Gesamtzahl an endothelialen Mikropartikeln (EMP) als auch die Subgruppe der aktivierten EMP zeigten sich in PPCM signifikant erhöht gegenüber DCM und ICM. Bei DCM ließen sich im Vergleich zur ICM eine signifikant höhere Anzahl an EMP gesamt und apoptotischen EMP nachweisen. Auch gegenüber PPCM zeigte die DCM signifikant mehr apoptotische EMP.

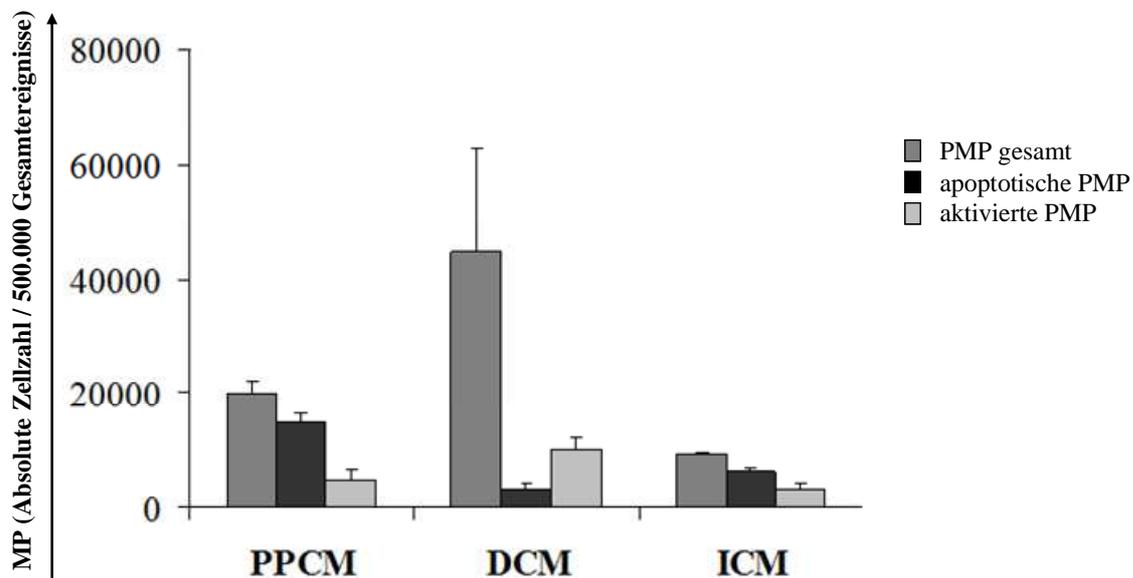


Abbildung 5-7. Thrombozytäre Mikropartikel (MP) bei Patientinnen mit peripartaler Kardiomyopathie (PPCM), Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie (DCM) und Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie (ICM). In der Abbildung sind zum einen die Gesamtzahl an PMP dargestellt sowie zum anderen die Subpopulationen der aktivierten und apoptotischen thrombozytären MP.

Sowohl die Gesamtzahl an thrombozytären Mikropartikeln (PMP) als auch die Subgruppe der aktivierten PMP zeigten sich in DCM signifikant erhöht gegenüber PPCM und ICM.

In der vorliegenden Studie war es nicht möglich, Patientinnen mit peripartaler Kardiomyopathie (PPCM) vor und nach Bromocriptin-Therapie mit der Frage der Häufigkeit von EMP und PMP zu untersuchen, da entsprechendes Untersuchungsmaterial nicht vorlag. Dieser intra-individuelle Vergleich ist notwendig, um die in dieser Studie gewonnenen Daten abzusichern. Trotz dieser Einschränkung kann davon ausgegangen werden, dass die gewonnenen Ergebnisse richtungsweisend für die frühzeitige Erkennung der PPCM sind. Gleichzeitig reflektiert das Ergebnis den Nutzen einer therapeutischen Intervention mit dem Wirkstoff Bromocriptin.

Prolaktin, vorwiegend ein Hormon der Neurohypophyse, wird im letzten Monat der Schwangerschaft sowie postpartal vermehrt sezerniert. Die physiologische Wirkung von Prolaktin besteht in der Initiierung und Steuerung der Laktation. Prolaktin ist ein Polypeptidhormon, das in drei Unterformen im menschlichen Blut (♀, ♂) nachgewiesen werden kann (Corbacho *et al.*, 2002). Die monometrische Form mit einem Molekulargewicht von 23-kDa ist entscheidend für die Steuerung der physiologischen Prozesse. Der Prolaktinspiegel erhöht sich während der Schwangerschaft sowohl im maternalen als auch fetalen Blut stetig. In der Amnionflüssigkeit werden beispielsweise bis 100fach erhöhte Werte gegenüber dem mütterlichen Blut gemessen (Tyson *et al.*, 1972). In fortgeschrittenen Schwangerschaftsstadien ist das 16-kDa Prolaktin als Spaltprodukt des 23-kDa Prolaktins nachweisbar und erreicht kurz vor der Geburt seinen Höhepunkt (Sinha *et al.*, 1985). Das 16-kDa Prolaktin wirkt nicht über die bekannten kardialen Prolaktin-Rezeptoren (Clapp *et al.*, 1993; Hilfiker-Kleiner *et al.*, 2008b; Neville *et al.*, 2002). Der Serumspiegel von Prolaktin bei Patientinnen mit PPCM ist um das 3fache gegenüber einer altersäquivalenten peripartalen Kontrollgruppe erhöht (Forster *et al.*, 2008). Patientinnen, die keine Verbesserung des klinischen Status 6 Monate nach Auftreten des Krankheitsbildes aufwiesen, zeigten weiterhin einen pathologisch erhöhten Prolaktinspiegel im Gegensatz zu den Patientinnen, bei denen sich der Prolaktinspiegel und die klinische Symptomatik normalisierten (Forster *et al.*, 2008). 16-kDa Prolaktin verfügt über eine eigenständige proinflammatorische Aktivität (Corbacho *et al.*, 2002; Hilfiker-Kleiner *et al.*, 2007a; Tabruyn *et al.*, 2005).

Wie bereits ausgeführt, hat Prolaktin eine Schlüsselfunktion in der Ausbildung der PPCM. Es lag daher nahe, die Prolaktinsekretion auf der seit langem bekannten Therapiegrundlage mit Bromocriptin zu unterdrücken. Bromocriptin (2-Bromo-alpha-Ergotryptin), ein Dopamin-D2-Agonist, ist zur medikamentösen Therapie seit dem Zeitraum um 1980 zur Unterbrechung der Laktation zugelassen (Stewart, 2012). Bromocriptin wirkt auf präsynaptische dopaminerge

Rezeptoren, wodurch die neuronale Norepinephrin-Freisetzung erniedrigt wird (Francis *et al.*, 1983; Ziegler *et al.*, 1979). Die reduzierte Norepinephrin-Freisetzung bedingt eine adäquate Blutdrucksenkung auf der Basis eines reduzierten peripher-vaskulären Widerstandes. Eine Aldosteron-antagonistische Wirkung und Herunterregulierung von AT₁-Rezeptoren unterstützen dieses Phänomen. Diese positiven Effekte auf die hämodynamischen Parameter durch eine Bromocriptin-Therapie wurden bereits vor über 30 Jahren beobachtet, noch bevor ACE-Hemmer und Beta-Rezeptorenblocker in die Therapie der Herzinsuffizienz eingeführt worden sind (Francis *et al.*, 1983). Aufgrund dieser Auswirkungen auf das sympathische Nervensystem und die Hämodynamik kann Bromocriptin ein Nutzen in der Therapie der PPCM zugeschrieben werden (Hilfiker-Kleiner *et al.*, 2007b). Bromocriptin hat ebenso Einfluss auf zahlreiche metabolische Parameter. Das betrifft insbesondere den Zucker- und Fettstoffwechsel (Kok *et al.*, 2006).

Die Einführung der Bromocriptin-Therapie für die Behandlung der PPCM hat sich als kausale Therapie in den bisher vorliegenden Publikationen bestätigt (Hilfiker-Kleiner *et al.*, 2007a; Sliwa *et al.*, 2010a). Diese Therapiekonzeption ist bisher nur in Fällen manifester Erkrankungen umgesetzt worden. In nahezu allen Fällen konnte eine eindeutige Verbesserung der klinischen Symptomatik erreicht werden. Patientinnen, die von dieser Therapie nachweislich profitierten, erwiesen nicht in jedem Fall eine komplette Ausheilung in Form der völligen Normalisierung der kontraktilen Funktion als auch Größenverhältnisse des Herzens (Hilfiker-Kleiner *et al.*, 2007a; Sliwa *et al.*, 2010a). Die Frage, ob ein früherer Einsatz von Bromocriptin einen bedeutenden Einfluss auf die Prognose des Krankheitsbildes aufweisen kann, ist bisher am Menschen nicht beantwortet worden. In Tierversuchen konnte bei Mäusen mit Knockout für den herzspezifischen Angiogeneseregulator PGC-1 α gezeigt werden, dass die Bromocriptin-Applikation während der Trächtigkeit zu einer deutlichen Reduktion der Ausbildung der PPCM führte (Patten *et al.*, 2012). Weiterhin muss die Frage beantwortet werden, ob bei schweren Krankheitsverläufen von PPCM eine initial höhere Dosis von Bromocriptin von Vorteil sein kann im Rahmen der Beherrschung des akuten Krankheitsbildes. Patientinnen mit einer bekannten PPCM wurden im Rahmen einer Folgeschwangerschaft postpartal prophylaktisch mit Bromocriptin therapiert. Unter diesen Bedingungen kam es trotz 5facher Erhöhung des Prolaktinspiegels bei Therapiebeginn zu keiner negativen Beeinträchtigung der kardialen Pumpfunktion im Gegensatz zu Nichtbehandelten (Hilfiker-Kleiner *et al.*, 2007a). Ein genereller prophylaktischer Einsatz von Bromocriptin bei bekannter Vorerkrankung an einer PPCM kann zurzeit mangels Studiendaten nicht verfolgt werden. Einschränkend ist weiterhin

die Tatsache, dass die U.S. Food and Drug Administration (FDA) im Jahr 1994 die Zulassung von Bromocriptin für die Indikation der Laktationsinhibierung für die Vereinigten Staaten von Amerika zurückgezogen hat (Becker-Brüser, 1994), da dem Bromocriptin zahlreiche klinische Komplikationen wie Myokardinfarkt, Schlaganfall und thrombembolische Ereignisse zugeschrieben worden sind (Hopp *et al.*, 1996; Iffy *et al.*, 1996; Ruch und Duhring, 1989; Y-Hassan und Jernberg, 2011). Unabhängig von dieser Entscheidung ist zu erwarten, dass in den nächsten Jahren eine endgültige Aussage zum effektiven Nutzen und der Sicherheit der Bromocriptin-Therapie bei PPCM in den Erst- und Folgeschwangerschaften erfolgen wird. Die Bromocriptin-Therapie hat während der Frühphase der Schwangerschaft keine negativen Auswirkungen auf die Kindesentwicklung oder Abortrate gezeigt; diese Fragestellung ist an einem großen Patientinnenkollektiv von 1410 schwangeren Frauen untersucht worden (FachInfo, 2012a). Zum Einsatz von Bromocriptin in der Spätschwangerschaft sind keine validen Daten bekannt. Prolaktin ist im mütterlichen Körper sowie fetalen Kreislauf nachweisbar, obwohl Prolaktin nicht plazentagängig ist (Holzgreve, 2007). Es wird in beiden durch die Plazenta getrennten Individuen unabhängig voneinander synthetisiert. Im Gegensatz dazu ist Bromocriptin plazentagängig (FachInfo, 2012a). Die biologische Rolle des Prolaktins in der fetalen Entwicklung ist nicht abschließend geklärt. Beschrieben werden unter anderem Einflüsse auf den Wasser- und Elektrolythaushalt (Pullano *et al.*, 1989) und die Lungenreifung (Snyder, 1992). Aus diesen Angaben kann indirekt abgeleitet werden, dass der sich Einsatz von Bromocriptin in der Spätschwangerschaft, bei präpartal diagnostizierter PPCM oder als Prophylaxe bei erneuter Schwangerschaft nach vorausgegangener PPCM nachteilig für den Fetus erweisen könnte. In einer neueren Publikation wird über einen therapeutischen Einsatz von Cabergolin bei PPCM berichtet, das als starker und lang anhaltender Inhibitor der Prolaktin-Ausschüttung wirkt und einen dem Bromocriptin vergleichbaren Effekt erzielt (de Jong *et al.*, 2009; FachInfo, 2012b; Lucreziotti *et al.*, 2011).

Während der Schwangerschaft kommt es zu einer deutlichen Erhöhung des Östrogenspiegels gegenüber nicht schwangeren und gesunden Frauen (Soldin *et al.*, 2005). Dies führt bekannterweise ebenfalls zu häufigeren thrombembolischen Ereignissen und Komplikationen (James, 2009). Dem Östrogen wird jedoch eine kardioprotektive Wirkung zugeschrieben, die im Wesentlichen eine Überhöhung des Norepinephrinspiegels ausgleicht und die Synthese von Stickstoffmonoxid (NO) aktiviert (Fukumoto *et al.*, 2012). Des Weiteren sind G-Proteingekoppelte Östrogenrezeptoren in den Prozess der Kardioprotektion eingebunden (Deschamps *et al.*, 2010; Mendelsohn, 2002). Durch den massiven Abfall des Östrogenspiegels unmittel-

bar postpartal wird offensichtlich die kardioprotektive Wirkung des Östrogens reduziert (Martin *et al.*, 1980). Im Gegensatz zum Östrogenspiegel kommt es zu einem deutlichen Anstieg des Prolaktins, das physiologischerweise Ausdruck der Laktationsphase ist (Martin *et al.*, 1980; Tyson *et al.*, 1972). Das deutlich häufigere Auftreten der PPCM postpartal könnte auf diese hormonelle Umstellung zurückzuführen sein (Elkayam *et al.*, 2005). 93% der PPCM-Patientinnen erkranken postpartal, davon sind 75% im ersten Monat bzw. 82% innerhalb der ersten drei Monate postpartal betroffen (Demakis und Rahimtoola, 1971; Elkayam *et al.*, 2005)(Abbildung 5-8).

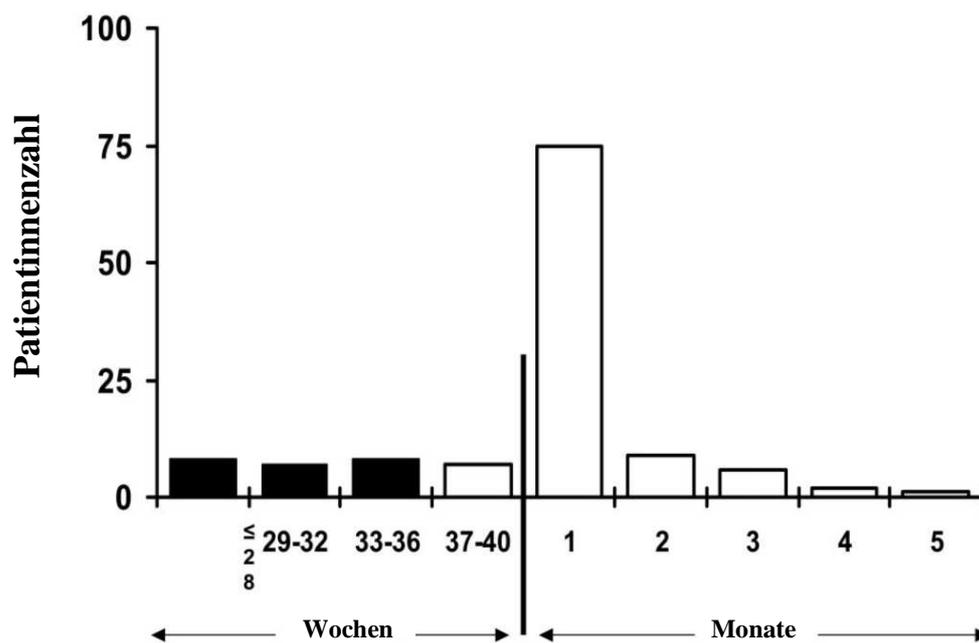


Abbildung 5-8. Diagnosezeitpunkt der peripartalen Kardiomyopathie bei 123 Patientinnen.
 Schwarze Balken repräsentieren 23 Patientinnen mit früher schwangerschaftsassoziierter Kardiomyopathie. Weiße Balken repräsentieren 100 Patientinnen mit klassischer peripartaler Kardiomyopathie.
 Modifiziert nach Elkayam *et al.*, 2005

Es ist weniger wahrscheinlich, dass die postpartal auftretenden thrombembolischen Erkrankungen dem abfallenden Östrogenspiegel zuzuordnen sind. Vielmehr kann die veränderte Hämodynamik durch Eintreten der schweren Herzinsuffizienz unter dem Krankheitsbild der PPCM und anderer pathophysiologischer Bedingungen, beispielsweise der signifikanten Erhöhung der MP, die Entstehung von thrombembolischen Ereignissen begünstigen. Die mit der Entbindung stattfindende plötzliche Umkehr des Hormonstatus in Form des massiven Prolaktinanstiegs bei gleichzeitig massiver Östrogenerniedrigung besitzt offensichtlich einen weite-

ren initiierenden Effekt auf die Ausbildung und Ausprägung der PPCM (Martin *et al.*, 1980). Es wird berichtet, dass ein höherer Östrogenspiegel zu einer niedrigeren Anzahl an Spaltprodukten in Form des 16-kDa Prolaktins führt (Torner *et al.*, 1999). Postpartal sind der Progesteron- und der Östrogenspiegel reduziert, Prolaktin ist bei stillenden Frauen gegenüber nicht-stillenden Frauen deutlich erhöht (Martin *et al.*, 1980). In dem Zeitfenster von 72 h nach der Geburt konnten bei gesunden Frauen (PPCTR) keine erhöhten MP-Werte nachgewiesen werden (Abbildung 4-1 bis Abbildung 4-8). Das zeigt, dass das Auftreten der MP ein sehr zeitnaher Indikator sowohl physiologischer als auch pathophysiologischer Prozesse ist. Eine intervallmäßige Bestimmung der MP könnte für die frühe Erkennung der PPCM von großem Nutzen sein. Aktuell kann keine Aussage getroffen werden, in welchen Zeitabständen die Bestimmung der MP erfolgen sollte. Es liegt nahe, dass bei ersten klinischen Hinweisen für eine kardiale Erkrankung postpartal die Diagnostik über eine Bestimmung der MP erfolgen könnte. Die mit dieser Studie nachgewiesene starke Dynamik der MP in dem peripartalen Prozess könnte richtungsweisend sein.

Zur Bedeutsamkeit der MP bei der Herausbildung der Erkrankung kann mit der vorliegenden Studie keine abschließende Stellung genommen werden. Es ist auch weiterhin unklar, warum das Krankheitsbild der PPCM teilweise in einem extrem kurzen Zeitraum zum myokardialen Pumpversagen mit der Notwendigkeit eines mechanischen Kreislaufunterstützungssystems („assist device“) bis zur Herztransplantation führt. 1% aller Herztransplantationen bzw. 5% der Herztransplantationen bei Frauen sind auf die PPCM zurückzuführen (Rasmusson *et al.*, 2007). Bis zu 11% der Patientinnen mit PPCM bedürfen einer Herztransplantation (Amos *et al.*, 2006; Duran *et al.*, 2008; Elkayam *et al.*, 2005; Felker *et al.*, 2000b; Witlin *et al.*, 1997). Nach erfolgter Transplantation haben Frauen mit zugrundeliegender PPCM eine zum Krankheitsbild der idiopathischen dilatativen Kardiomyopathie vergleichbare Langzeitprognose. Auch bezüglich einer Transplantatvaskulopathie zeigten sich keine signifikanten Differenzen (Rasmusson *et al.*, 2007).

Offensichtlich sind die in dem Prozess der Ausbildung der PPCM wirkenden Mechanismen in der Gesamtheit und Berücksichtigung des betroffenen Organismus nicht identisch. Die besondere Herausforderung für die klinische Medizin besteht darin, frühzeitig Hinweise für die differenzierte Ausprägung des Krankheitsbildes zu erhalten. Inwieweit möglicherweise die MP diesbezüglich von Nutzen sein können, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten. Ableitend von anderen Erkrankungen, insbesondere thrombembolischer Natur, kann erwartet werden, dass die MP in der Amplifizierung des Prozesses entscheidende Bedeutung haben.

Dies könnte die beobachteten Differenzen in der Geschwindigkeit der Ausprägung des Krankheitsbildes erklären. Auf Grundlage der bisherigen Erkenntnisse unter Einbeziehung der Bedeutung der MP erscheint es notwendig, für das Krankheitsbild der PPCM eine Risikostrategie zu entwickeln, da sich beispielsweise auf Haiti bei 16% asymptomatischer PPCM-Patientinnen eine bedeutsame Beeinträchtigung der linksventrikulären Funktion zeigte (Fett *et al.*, 2005a). Für die Risikostrategie ist es erforderlich, Parameter zu definieren, die die Risikopatientinnen in einem sehr engen Zeitraum erfassen können. Aktuell existieren keine Informationen zur Bedeutung der MP in Bezug auf die Ausprägung des Schweregrades der PPCM. Auch diese Fragestellung muss weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Das bei der PPCM auftretende myokardiale Schädigungsprofil wird weiterhin relativ kontrovers diskutiert. Im Rahmen von Myokardbiopsien gelang es nicht, ein eindeutiges und wiederkehrendes pathologisches histomorphologisches Bild zu beschreiben (Felker *et al.*, 2000a; Fidzianska *et al.*, 2010; Fuentes und Sybers, 1988). Unter der Sicht der primären Auslösung des pathologischen Kaskadenmechanismus erscheint es möglich, dass im Rahmen des umfassenden Begriffes des oxidativen Stresses dieses Krankheitsbild ein heterogenes morphologisches Schädigungsbild aufweist. Das Krankheitsgeschehen der PPCM ist im Wesentlichen durch den Nachweis von Entzündungsparametern gekennzeichnet. So konnte gezeigt werden, dass Interferon-gamma (IFN- γ) signifikant mit der Prognose der PPCM verknüpft ist (Forster *et al.*, 2008). Während Patientinnen mit kompletter Erholung einen signifikanten Abfall des IFN- γ -Serumspiegels im Verlauf von 6 Monaten aufwiesen, zeigten die weiterhin klinisch Erkrankten keinen Rückgang des IFN- γ -Serumspiegels (Forster *et al.*, 2008). In diesem Zusammenhang erscheint es von wesentlicher Bedeutung, dass IFN- γ reduzierend auf die Papillarmuskelkontraktion wirkt und die Beta-Adrenorezeptoren-Aktivität erniedrigt. Dieser Befund muss Beachtung finden, da eine direkte Korrelation zwischen dem IFN- γ -Serumspiegel und dem klinischen Krankheitsverlauf existiert.

Die in dieser Studie untersuchten MP wurden keinem Schweregrad der Herzinsuffizienz entsprechend der Klassifizierung nach NYHA zugeordnet. Langzeitstudien im Rahmen der Ausheilung der PPCM sowie ihrem Wiederauftreten in Folgeschwangerschaften sind bisher nicht erfolgt. Die Herausforderung für die klinische Routinediagnostik besteht darin, sowohl manifest an der PPCM Erkrankte als auch formal gesunde schwangere Patientinnen frühzeitig zu erkennen und zu differenzieren. Wie bereits aufgeführt, werden die klassischen Zeichen einer manifesten Herzinsuffizienz von den im Rahmen der Schwangerschaft auftretenden hämodynamischen Veränderungen überlagert. Das führt häufig zu einer Fehlinterpretation zugunsten

der schwangerschaftsbedingten Veränderungen. Aktuell kann davon ausgegangen werden, dass nur jene Patientinnen erfasst werden, die schwer an der PPCM erkranken und möglicherweise in der Anamnese richtungsweisende kardiovaskuläre Erkrankungen benennen.

In diesem Zusammenhang muss darauf verwiesen werden, dass die Präeklampsie als ein Risikofaktor für die Ausbildung der PPCM erkannt worden ist (Bello *et al.*, 2013). Die Prävalenz beträgt 4 - 5% bei Schwangeren (VanWijk *et al.*, 2000). Es wird diskutiert, dass die PPCM und die Präeklampsie auf eine gleiche molekulare pathophysiologische Genese zurückzuführen sind, indem die Matrixmetalloproteinasen der Trophoblasten eine erhöhte Aktivität aufweisen und somit die Proteolyse des 23-kDa Prolaktins zum 16-kDa Prolaktin fördern (Reuwer *et al.*, 2010). In diesen Prozess sind wahrscheinlich auch Metalloproteinasen-tragende MP einbezogen (Lozito und Tuan, 2012). Gleichzeitig ist sFlt-1 erhöht (Patten *et al.*, 2012). Die Präeklampsie ist ein bedeutsamer Risikofaktor für Schwangere und Ungeborenes. Die zur Präeklampsie führenden pathophysiologischen Schritte beinhalten hypoxische Bedingungen als oxidative Stressfaktoren, die gekoppelt sind mit der Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems und der endothelialen Dysfunktion. Das Auftreten von stimulierenden AT₁-Autoantikörpern führt zusätzlich zu einer Freisetzung von sFlt-1 und weiteren antiangionösen Botenstoffen (Hubel *et al.*, 2007). Das 16-kDa Prolaktin spielt offensichtlich auch eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der Präeklampsie. In diesem Zusammenhang werden wichtige molekulare Regulationsmechanismen beschrieben. Insbesondere die Herabregulierung der induzierbaren Sauerstoffmonoxid-Synthase (iNOS) in endothelialen Zellen, die Inhibierung der endothelialen Urokinase-Aktivität, die Aktivierung des Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1 (PAI-1) und dessen Expression sind in diesem Prozess vordergründig beteiligt (Lee *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2005). Diese molekularen Mechanismen sind die Eckpfeiler der endothelialen Dysfunktion.

Die Präeklampsie ist ebenfalls eine Folge der endothelialen Dysfunktion und wird über die Fragmentierung des Prolaktins initiiert (Parra und Ramirez-Peredo, 2002; VanWijk *et al.*, 2000). Auf diesen Zusammenhang zur Pathogenese der PPCM wurde in der Publikation von Hilfiker-Kleiner im Jahre 2012 hingewiesen (Hilfiker-Kleiner *et al.*, 2012; Leanos-Miranda *et al.*, 2008). Patientinnen mit Präeklampsie zeigten ebenfalls bis zu 40% eine signifikante diastolische Dysfunktion und verschiedene Ausprägungen der myokardialen Schädigung (Melchiorre *et al.*, 2011). Eine signifikante Zunahme von Mikropartikeln bei der Präeklampsie ist in zahlreichen Publikationen belegt worden (Lok *et al.*, 2007; Marques *et al.*, 2012; Orozco *et al.*, 2008). In der vorliegenden Studie wurde das eigenständige Krankheits-

bild der Präeklampsie nicht untersucht, sodass zu dem MP-Profil im direkten Vergleich mit der PPCM keine Aussage getroffen werden kann. Es bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten, ob mittels Mikropartikelprofilen eine frühzeitige Differenzierung beider Erkrankungen getroffen werden kann, wobei die endotheliale Dysfunktion als entscheidendes pathogenetisches Kriterium sowohl der PPCM als auch Präeklampsie anerkannt ist.

Die Erfassung und Quantifizierung der MP sind für die PPCM von bedeutender diagnostischer Wertigkeit, wobei die methodische Standardisierung Voraussetzung für die klinische Adaptation der Methodik ist.

6 Methodenkritik

Die in dieser Studie eingeschlossenen Patientengruppen rekrutierten sich aus dem Universitätsklinikum des Saarlandes, der Medizinischen Hochschule Hannover sowie dem Chris Hani Baragwanath Hospital in Johannesburg/Südafrika. Die Patientinnen mit schwerer Herzinsuffizienz wurden in den oben genannten Kliniken unter einheitlichen Kriterien als peripartale Kardiomyopathie klassifiziert und somit in die Studie eingeschlossen. Für die Therapiestrategie der Patientinnen mit PPCM wurde kein Studienprotokoll erstellt. Inwieweit ein differentes Medikamentenspektrum und die Dosierung der Medikamente in der Therapie der PPCM auf die Bildung der MP einen Einfluss hat, ist nicht untersucht worden.

Die Blutentnahmen erfolgten nicht standardisiert, die Probenaufbewahrung und -aufbereitung wurde dem vorliegenden Versuchsprotokoll entsprechend durchgeführt. Die externen Blutproben wurden auf Trockeneis transportiert und somit identischen Bedingungen unterzogen. Die Bestimmung der MP mittels Durchflusszytometrie erfolgte standardisiert nach einem laborintern entwickelten Arbeitsprotokoll in Homburg. Die gewonnenen Messergebnisse bedürfen einer nachträglichen planimetrischen Erfassung, die subjektive minimale Differenzen nicht ausschließen lassen. Interindividuelle Abweichungen sind im Ergebnisprotokoll nicht vorhanden, da die Messungen und Auswertungen ausschließlich von der Autorin der vorliegenden Arbeit durchgeführt worden sind. Die vorliegenden Messergebnisse der MP sind nicht mit den Resultaten anderer Studien direkt vergleichbar, da methodische Differenzen sowohl auf der Ebene der Blutasservierung, der Zentrifugation, der Verwendung differenter fluoreszierender Oberflächenmarker, der zugesetzten Lösungen als auch der spezifischen Geräteeinstellungen in Abhängigkeit vom verwendeten Gerätetyp vorhanden sind. In den Untersuchungen zur Vorbereitung hat sich gezeigt, dass die MP ein relativ stabiles Verhalten im Rahmen von Gefrier- und Auftauprozessen aufweisen (Abbildung 3-5). Geringere quantitative und qualitative Veränderungen durch den Gefrier- und Auftauprozess der MP sind entsprechend von Literaturangaben nicht sicher auszuschließen (Chandler, 2013; Dey-Hazra *et al.*, 2010).

7 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Studie konnte erstmals gezeigt werden, dass bei der peripartalen Kardiomyopathie endotheliale und thrombozytäre Mikropartikel signifikant erhöht sind. Das Mikropartikelprofil bei Patientinnen mit peripartaler Kardiomyopathie zeigte eine signifikante Differenz gegenüber gesunden postpartalen Frauen, gesunden schwangeren Frauen, gesunden nicht-schwangeren Frauen, Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie, stabiler koronarer Herzkrankheit und gesunden altersäquivalenten Kontrollen. Damit erhalten die Mikropartikel für die Diagnostik der peripartalen Kardiomyopathie die Wertstellung eines Biomarkers.

Unter Bezugnahme auf die signifikante Erhöhung der endothelialen Mikropartikel kann davon ausgegangen werden, dass die Induktion der endothelialen Dysfunktion ein wesentliches Moment in der Ausbildung der PPCM darstellt. Unter einer Bromocriptin-Therapie trat eine statistisch signifikante Erniedrigung der Mikropartikel im peripheren Blut auf und dies in Übereinstimmung mit dem verbesserten klinischen Bild der Patientinnen.

Es bleibt weiteren Studien vorbehalten, die vorliegenden Ergebnisse der Mikropartikelbestimmung an einem größeren Patientinnenkollektiv in Bezug auf die diagnostische Sicherheit und die Wertigkeit zum Krankheitsverlauf zu validieren. Wegen der großen klinischen Bedeutung der peripartalen Kardiomyopathie erscheint es sinnvoll, unter Einbeziehung der diagnostischen Wertigkeit der Mikropartikel eine Risikostrategie für klinisch symptomatische prä- und postpartale Frauen zu entwickeln.

8 Literaturverzeichnis

1. Adesanya, C.O., Anjorin, F.I., Sada, I.A., Parry, E.H., Sagnella, G.A., und MacGregor, G.A. (1991). Atrial natriuretic peptide, aldosterone, and plasma renin activity in peripartum heart failure. *Br Heart J* 65, 152-154.
2. Amos, A.M., Jaber, W.A., und Russell, S.D. (2006). Improved outcomes in peripartum cardiomyopathy with contemporary. *Am Heart J* 152, 509-513.
3. Andriantsitohaina, R., Gaceb, A., Vergori, L., und Martinez, M.C. (2012). Microparticles as regulators of cardiovascular inflammation. *Trends Cardiovasc Med* 22, 88-92.
4. Ansari, A.A., Fett, J.D., Carraway, R.E., Mayne, A.E., Onlamoon, N., und Sundstrom, J.B. (2002). Autoimmune mechanisms as the basis for human peripartum cardiomyopathy. *Clin Rev Allergy Immunol* 23, 301-324.
5. Bachelier-Walenta, K., Hilfiker-Kleiner, D., und Sliwa, K. (2013). Peripartum cardiomyopathy: update 2012. *Curr Opin Crit Care* 19, 397-403.
6. Baldocchi, R.A., Tan, L., King, D.S., und Nicoll, C.S. (1993). Mass spectrometric analysis of the fragments produced by cleavage and reduction of rat prolactin: evidence that the cleaving enzyme is cathepsin D. *Endocrinology* 133, 935-938.
7. Barry, O.P., Pratico, D., Lawson, J.A., und FitzGerald, G.A. (1997). Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles. *J Clin Invest* 99, 2118-2127.
8. Barry, O.P., Pratico, D., Savani, R.C., und FitzGerald, G.A. (1998). Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. *J Clin Invest* 102, 136-144.
9. Bauer, V., und Sotnikova, R. (2010). Nitric oxide--the endothelium-derived relaxing factor and its role in endothelial functions. *Gen Physiol Biophys* 29, 319-340.
10. Becker-Brüser, W., Halbekath, J., Kochen, M.M., von Maxen, A., Schönhöfer, P.S., Wille, H., Ziegeler B. (1994). Abstillmittel Borocriptin (Kirim, Pravidel) überwiegend schädlich In arznei-telegramm 09-1994 (A.T.I. Arzneimittelinformation Berlin GmbH).
11. Bello, N., Rendon, I.S., und Arany, Z. (2013). The relationship between pre-eclampsia and peripartum cardiomyopathy: a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol* 62, 1715-1723.
12. Bernal-Mizrachi, L., Jy, W., Fierro, C., Macdonough, R., Velazques, H.A., Purow, J., Jimenez, J.J., Horstman, L.L., Ferreira, A., de Marchena, E., *et al.* (2004). Endothelial microparticles correlate with high-risk angiographic lesions in acute coronary syndromes. *Int J Cardiol* 97, 439-446.
13. Bernal-Mizrachi, L., Jy, W., Jimenez, J.J., Pastor, J., Mauro, L.M., Horstman, L.L., de Marchena, E., und Ahn, Y.S. (2003). High levels of circulating endothelial microparticles in patients with acute coronary syndromes. *Am Heart J* 145, 962-970.
14. Biasucci, L.M., Porto, I., Di Vito, L., De Maria, G.L., Leone, A.M., Tinelli, G., Tritarelli, A., Di Rocco, G., Snider, F., Capogrossi, M.C., *et al.* (2012). Differences in microparticle release in patients with acute coronary syndrome and stable angina. *Circ J* 76, 2174-2182.

15. Biteker, M., Ilhan, E., Biteker, G., Duman, D., und Bozkurt, B. (2012). Delayed recovery in peripartum cardiomyopathy: an indication for long-term follow-up and sustained therapy. *Eur J Heart Fail* 14, 895-901.
16. Blauwet, L.A., und Cooper, L.T. (2011). Diagnosis and management of peripartum cardiomyopathy. *Heart* 97, 1970-1981.
17. Boulanger, C.M., Amabile, N., Guerin, A.P., Pannier, B., Leroyer, A.S., Mallat, C.N., Tedgui, A., und London, G.M. (2007). In vivo shear stress determines circulating levels of endothelial microparticles in end-stage renal disease. *Hypertension* 49, 902-908.
18. Boulanger, C.M., Leroyer, A.S., Amabile, N., und Tedgui, A. (2008). [Circulating endothelial microparticles: a new marker of vascular injury]. *Ann Cardiol Angeiol (Paris)* 57, 149-154.
19. Brar, S.S., Khan, S.S., Sandhu, G.K., Jorgensen, M.B., Parikh, N., Hsu, J.W., und Shen, A.Y. (2007). Incidence, mortality, and racial differences in peripartum cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 100, 302-304.
20. Bretscher, M.S. (1972). Asymmetrical lipid bilayer structure for biological membranes. *Nat New Biol* 236, 11-12.
21. Brogan, P.A., Shah, V., Brachet, C., Harnden, A., Mant, D., Klein, N., und Dillon, M.J. (2004). Endothelial and platelet microparticles in vasculitis of the young. *Arthritis Rheum* 50, 927-936.
22. Burnier, L., Fontana, P., Kwak, B.R., und Angelillo-Scherrer, A. (2009). Cell-derived microparticles in haemostasis and vascular medicine. *Thromb Haemost* 101, 439-451.
23. Capriola, M. (2013). Peripartum cardiomyopathy: a review. *Int J Womens Health* 5, 1-8.
24. Chandler, W.L. (2013). Microparticle counts in platelet-rich and platelet-free plasma, effect of centrifugation and sample-processing protocols. *Blood Coagul Fibrinolysis* 24, 125-132.
25. Clapp, C., Martial, J.A., Guzman, R.C., Rentier-Delure, F., und Weiner, R.I. (1993). The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. *Endocrinology* 133, 1292-1299.
26. Cooper, L.T., Mather, P.J., Alexis, J.D., Pauly, D.F., Torre-Amione, G., Wittstein, I.S., Dec, G.W., Zucker, M., Narula, J., Kip, K., *et al.* (2012). Myocardial recovery in peripartum cardiomyopathy: prospective comparison with recent onset cardiomyopathy in men and nonperipartum women. *J Card Fail* 18, 28-33.
27. Corbacho, A.M., Martinez De La Escalera, G., und Clapp, C. (2002). Roles of prolactin and related members of the prolactin/growth hormone/placental lactogen family in angiogenesis. *J Endocrinol* 173, 219-238.
28. Curtis, A.M., Wilkinson, P.F., Gui, M., Gales, T.L., Hu, E., und Edelberg, J.M. (2009). p38 mitogen-activated protein kinase targets the production of proinflammatory endothelial microparticles. *J Thromb Haemost* 7, 701-709.
29. Daleke, D.L., und Lyles, J.V. (2000). Identification and purification of aminophospholipid flippases. *Biochim Biophys Acta* 1486, 108-127.
30. de Jong, J.S., Rietveld, K., van Lochem, L.T., und Bouma, B.J. (2009). Rapid left ventricular recovery after cabergoline treatment in a patient with peripartum cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail* 11, 220-222.

31. Demakis, J.G., und Rahimtoola, S.H. (1971). Peripartum cardiomyopathy. *Circulation* 44, 964-968.
32. Demakis, J.G., Rahimtoola, S.H., Sutton, G.C., Meadows, W.R., Szanto, P.B., Tobin, J.R., und Gunnar, R.M. (1971). Natural course of peripartum cardiomyopathy. *Circulation* 44, 1053-1061.
33. Desai, D., Moodley, J., und Naidoo, D. (1995). Peripartum cardiomyopathy: experiences at King Edward VIII Hospital, Durban, South Africa and a review of the literature. *Trop Doct* 25, 118-123.
34. Deschamps, A.M., Murphy, E., und Sun, J. (2010). Estrogen receptor activation and cardioprotection in ischemia reperfusion injury. *Trends Cardiovasc Med* 20, 73-78.
35. Dey-Hazra, E., Hertel, B., Kirsch, T., Woywodt, A., Lovric, S., Haller, H., Haubitz, M., und Erdbruegger, U. (2010). Detection of circulating microparticles by flow cytometry: influence of centrifugation, filtration of buffer, and freezing. *Vasc Health Risk Manag* 6, 1125-1133.
36. DFG (2008). Projekt: Untersuchungen zur Rolle von 16kDa Prolaktin in der myokardialen Pathophysiologie. Förderung seit 2008. (GEPRIS, geförderte Projekte der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG)).
37. Diamant, M., Tushuizen, M.E., Sturk, A., und Nieuwland, R. (2004). Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease? *Eur J Clin Invest* 34, 392-401.
38. Dignat-George, F., und Boulanger, C.M. (2011). The many faces of endothelial microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31, 27-33.
39. Distler, J.H., Pisetsky, D.S., Huber, L.C., Kalden, J.R., Gay, S., und Distler, O. (2005). Microparticles as regulators of inflammation: novel players of cellular crosstalk in the rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 52, 3337-3348.
40. Duran, N., Gunes, H., Duran, I., Biteker, M., und Ozkan, M. (2008). Predictors of prognosis in patients with peripartum cardiomyopathy. *Int J Gynaecol Obstet* 101, 137-140.
41. Elkayam, U., Akhter, M.W., Singh, H., Khan, S., Bitar, F., Hameed, A., und Shotan, A. (2005). Pregnancy-associated cardiomyopathy: clinical characteristics and a comparison between early and late presentation. *Circulation* 111, 2050-2055.
42. Elkayam, U., Tummala, P.P., Rao, K., Akhter, M.W., Karaalp, I.S., Wani, O.R., Hameed, A., Gviazda, I., und Shotan, A. (2001). Maternal and fetal outcomes of subsequent pregnancies in women with peripartum cardiomyopathy. *N Engl J Med* 344, 1567-1571.
43. FachInfo (2012a). Bromocriptin-CT (Rote Liste Service GmbH, FachInfo-Service, Berlin).
44. FachInfo (2012b). Cabergolin-ratiopharm® 0,5 mg (Rote Liste Service GmbH, FachInfo-Service, Berlin).
45. Felker, G.M., Jaeger, C.J., Klodas, E., Thiemann, D.R., Hare, J.M., Hruban, R.H., Kasper, E.K., und Baughman, K.L. (2000a). Myocarditis and long-term survival in peripartum cardiomyopathy. *Am Heart J* 140, 785-791.
46. Felker, G.M., Thompson, R.E., Hare, J.M., Hruban, R.H., Clemetson, D.E., Howard, D.L., Baughman, K.L., und Kasper, E.K. (2000b). Underlying causes and long-term

- survival in patients with initially unexplained cardiomyopathy. *N Engl J Med* 342, 1077-1084.
47. Ferro, D., Pittoni, V., Quintarelli, C., Basili, S., Saliola, M., Caroselli, C., Valesini, G., und Violi, F. (1997). Coexistence of anti-phospholipid antibodies and endothelial perturbation in systemic lupus erythematosus patients with ongoing prothrombotic state. *Circulation* 95, 1425-1432.
 48. Fett, J.D., Carraway, R.D., Dowell, D.L., King, M.E., und Pierre, R. (2002). Peripartum cardiomyopathy in the Hospital Albert Schweitzer District of Haiti. *Am J Obstet Gynecol* 186, 1005-1010.
 49. Fett, J.D., Christie, L.G., Carraway, R.D., Ansari, A.A., Sundstrom, J.B., und Murphy, J.G. (2005a). Unrecognized peripartum cardiomyopathy in Haitian women. *Int J Gynaecol Obstet* 90, 161-166.
 50. Fett, J.D., Christie, L.G., Carraway, R.D., und Murphy, J.G. (2005b). Five-year prospective study of the incidence and prognosis of peripartum cardiomyopathy at a single institution. *Mayo Clin Proc* 80, 1602-1606.
 51. Fett, J.D., Fristoe, K.L., und Welsh, S.N. (2010). Risk of heart failure relapse in subsequent pregnancy among peripartum cardiomyopathy mothers. *Int J Gynaecol Obstet* 109, 34-36.
 52. Fidzianska, A., Walczak, E., Glinka, Z., Religa, G., Sobieszczanska-Malek, M., und Bilinska, Z.T. (2010). Ultrastructural evidence of myocardial capillary remodeling in peripartum cardiomyopathy. *Med Sci Monit* 16, CS62-66.
 53. Filer, A.D., Gardner-Medwin, J.M., Thambyrajah, J., Raza, K., Carruthers, D.M., Stevens, R.J., Liu, L., Lowe, S.E., Townend, J.N., und Bacon, P.A. (2003). Diffuse endothelial dysfunction is common to ANCA associated systemic vasculitis and polyarteritis nodosa. *Ann Rheum Dis* 62, 162-167.
 54. Fillmore, S.J., und Parry, E.H. (1977). The evolution of peripartur heart failure in Zaria, Nigeria. Some etiologic factors. *Circulation* 56, 1058-1061.
 55. Ford, L., Abdullahi, A., Anjorin, F.I., Danbauchi, S.S., Isa, M.S., Maude, G.H., und Parry, E.H. (1998). The outcome of peripartum cardiac failure in Zaria, Nigeria. *QJM* 91, 93-103.
 56. Forster, O., Hilfiker-Kleiner, D., Ansari, A.A., Sundstrom, J.B., Libhaber, E., Tshani, W., Becker, A., Yip, A., Klein, G., und Sliwa, K. (2008). Reversal of IFN-gamma, oxLDL and prolactin serum levels correlate with clinical improvement in patients with peripartum cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail* 10, 861-868.
 57. Francis, G.S., Parks, R., und Cohn, J.N. (1983). The effects of bromocriptine in patients with congestive heart failure. *Am Heart J* 106, 100-106.
 58. Fuentes, F., und Sybers, H.D. (1988). Peripartum cardiomyopathy: the value of endomyocardial biopsy in diagnosis, prognostication, and therapy. *Tex Heart Inst J* 15, 55-58.
 59. Fukumoto, T., Tawa, M., Yamashita, N., Ohkita, M., und Matsumura, Y. (2012). Protective effects of 17beta-estradiol on post-ischemic cardiac dysfunction and norepinephrine overflow through the non-genomic estrogen receptor/nitric oxide-mediated pathway in the rat heart. *Eur J Pharmacol* 699, 74-80.

60. Gentry, M.B., Dias, J.K., Luis, A., Patel, R., Thornton, J., und Reed, G.L. (2010). African-American women have a higher risk for developing peripartum cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 55, 654-659.
61. George, F.D. (2008). Microparticles in vascular diseases. *Thromb Res* 122 Suppl 1, S55-59.
62. Geva, T., Mauer, M.B., Striker, L., Kirshon, B., und Pivarnik, J.M. (1997). Effects of physiologic load of pregnancy on left ventricular contractility and remodeling. *Am Heart J* 133, 53-59.
63. Goland, S., Modi, K., Bitar, F., Janmohamed, M., Mirocha, J.M., Czer, L.S., Illum, S., Hatamizadeh, P., und Elkayam, U. (2009). Clinical profile and predictors of complications in peripartum cardiomyopathy. *J Card Fail* 15, 645-650.
64. Goland, S., Modi, K., Hatamizadeh, P., und Elkayam, U. (2013). Differences in clinical profile of african-american women with peripartum cardiomyopathy in the United States. *J Card Fail* 19, 214-218.
65. Gonzalez-Quintero, V.H., Jimenez, J.J., Jy, W., Mauro, L.M., Hortman, L., O'Sullivan, M.J., und Ahn, Y. (2003). Elevated plasma endothelial microparticles in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 189, 589-593.
66. Gouley, B.M., TM. Bellet S (1937). Ideopathic myocardial degeneration associates with pregnancy and especially the puerperium. *Am J Med Sci* 19, 185-199.
67. Haghikia, A., Stapel, B., Hoch, M., und Hilfiker-Kleiner, D. (2011). STAT3 and cardiac remodeling. *Heart Fail Rev* 16, 35-47.
68. Halkein, J., Tabruyn, S.P., Ricke-Hoch, M., Haghikia, A., Nguyen, N.Q., Scherr, M., Castermans, K., Malvaux, L., Lambert, V., Thiry, M., *et al.* (2013). MicroRNA-146a is a therapeutic target and biomarker for peripartum cardiomyopathy. *J Clin Invest* 123, 2143-2154.
69. Heijnen, H.F., Schiel, A.E., Fijnheer, R., Geuze, H.J., und Sixma, J.J. (1999). Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood* 94, 3791-3799.
70. Heit, J.A., Kobbervig, C.E., James, A.H., Petterson, T.M., Bailey, K.R., und Melton, L.J., 3rd (2005). Trends in the incidence of venous thromboembolism during pregnancy or postpartum: a 30-year population-based study. *Ann Intern Med* 143, 697-706.
71. Hibbard, J.U., Lindheimer, M., und Lang, R.M. (1999). A modified definition for peripartum cardiomyopathy and prognosis based on echocardiography. *Obstet Gynecol* 94, 311-316.
72. Hilfiker-Kleiner, D., Kaminski, K., Podewski, E., Bonda, T., Schaefer, A., Sliwa, K., Forster, O., Quint, A., Landmesser, U., Doerries, C., *et al.* (2007a). A cathepsin D-cleaved 16 kDa form of prolactin mediates postpartum cardiomyopathy. *Cell* 128, 589-600.
73. Hilfiker-Kleiner, D., Meyer, G.P., Schieffer, E., Goldmann, B., Podewski, E., Struman, I., Fischer, P., und Drexler, H. (2007b). Recovery from postpartum cardiomyopathy in 2 patients by blocking prolactin release with bromocriptine. *J Am Coll Cardiol* 50, 2354-2355.

74. Hilfiker-Kleiner, D., Schieffer, E., Meyer, G.P., Podewski, E., und Drexler, H. (2008a). Postpartum cardiomyopathy: a cardiac emergency for gynecologists, general practitioners, internists, pulmonologists, and cardiologists. *Dtsch Arztebl Int* 105, 751-756.
75. Hilfiker-Kleiner, D., Sliwa, K., und Drexler, H. (2008b). Peripartum cardiomyopathy: recent insights in its pathophysiology. *Trends Cardiovasc Med* 18, 173-179.
76. Hilfiker-Kleiner, D., Struman, I., Hoch, M., Podewski, E., und Sliwa, K. (2012). 16-kDa prolactin and bromocriptine in postpartum cardiomyopathy. *Curr Heart Fail Rep* 9, 174-182.
77. Holzgreve, W., Jonat, W., Shneider, K.-T. M., Weiss, J.W. (Hrsg.), Diedrich, K. (Autor) (2007). *Gynäkologie und Geburtshilfe* (Springer-Verlag GmbH, Heidelberg).
78. Hopp, L., Weisse, A.B., und Iffy, L. (1996). Acute myocardial infarction in a healthy mother using bromocriptine for milk suppression. *Can J Cardiol* 12, 415-418.
79. Horstman, L.L., und Ahn, Y.S. (1999). Platelet microparticles: a wide-angle perspective. *Crit Rev Oncol Hematol* 30, 111-142.
80. Horstman, L.L., Jy, W., Jimenez, J.J., und Ahn, Y.S. (2004a). Endothelial microparticles as markers of endothelial dysfunction. *Front Biosci* 9, 1118-1135.
81. Horstman, L.L., Jy, W., Jimenez, J.J., Bidot, C., und Ahn, Y.S. (2004b). New horizons in the analysis of circulating cell-derived microparticles. *Keio J Med* 53, 210-230.
82. Huang, G.Y., Zhang, L.Y., Long-Le, M.A., und Wang, L.X. (2012). Clinical characteristics and risk factors for peripartum cardiomyopathy. *Afr Health Sci* 12, 26-31.
83. Hubel, C.A., Wallukat, G., Wolf, M., Herse, F., Rajakumar, A., Roberts, J.M., Markovic, N., Thadhani, R., Luft, F.C., und Dechend, R. (2007). Agonistic angiotensin II type 1 receptor autoantibodies in postpartum women with a history of preeclampsia. *Hypertension* 49, 612-617.
84. Hugel, B., Martinez, M.C., Kunzelmann, C., und Freyssinet, J.M. (2005). Membrane microparticles: two sides of the coin. *Physiology (Bethesda)* 20, 22-27.
85. Hunter, M.P., Ismail, N., Zhang, X., Aguda, B.D., Lee, E.J., Yu, L., Xiao, T., Schafer, J., Lee, M.L., Schmittgen, T.D., *et al.* (2008). Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One* 3, e3694.
86. Hunter, S., und Robson, S.C. (1992). Adaptation of the maternal heart in pregnancy. *Br Heart J* 68, 540-543.
87. Iffy, L., Lindenthal, J., McArdle, J.J., und Ganesh, V. (1996). Severe cerebral accidents postpartum in patients taking bromocriptine for milk suppression. *Isr J Med Sci* 32, 309-312.
88. Iuliano, S., Fisher, S.G., Karasik, P.E., Fletcher, R.D., und Singh, S.N. (2002). QRS duration and mortality in patients with congestive heart failure. *Am Heart J* 143, 1085-1091.
89. Jahns, B.G., Stein, W., Hilfiker-Kleiner, D., Pieske, B., und Emons, G. (2008). Peripartum cardiomyopathy--a new treatment option by inhibition of prolactin secretion. *Am J Obstet Gynecol* 199, e5-6.
90. James, A.H. (2009). Venous thromboembolism in pregnancy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29, 326-331.

91. Jansen, F., Yang, X., Hoelscher, M., Cattelan, A., Schmitz, T., Proebsting, S., Wenzel, D., Vosen, S., Franklin, B.S., Fleischmann, B.K., *et al.* (2013). Endothelial microparticle-mediated transfer of MicroRNA-126 promotes vascular endothelial cell repair via SPRED1 and is abrogated in glucose-damaged endothelial microparticles. *Circulation* *128*, 2026-2038.
92. Jeanneteau, J., Hibert, P., Martinez, M.C., Tual-Chalot, S., Tamarelle, S., Furber, A., Andriantsitohaina, R., und Prunier, F. (2012). Microparticle release in remote ischemic conditioning mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* *303*, H871-877.
93. Jimenez, J.J., Jy, W., Mauro, L.M., Soderland, C., Horstman, L.L., und Ahn, Y.S. (2003). Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis. *Thromb Res* *109*, 175-180.
94. Khan, I., Zucker-Franklin, D., und Karparkin, S. (1975). Microthrombocytosis and platelet fragmentation associated with idiopathic/autoimmune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* *31*, 449-460.
95. Kim, H.K., Song, K.S., Chung, J.H., Lee, K.R., und Lee, S.N. (2004). Platelet microparticles induce angiogenesis in vitro. *Br J Haematol* *124*, 376-384.
96. Koch, K.C. (2008). Heart disease in pregnancy. *Deut Med Wochenschr* *133*, 1684-+.
97. Kok, P., Roelfsema, F., Frolich, M., van Pelt, J., Stokkel, M.P., Meinders, A.E., und Pijl, H. (2006). Activation of dopamine D2 receptors simultaneously ameliorates various metabolic features of obese women. *Am J Physiol Endocrinol Metab* *291*, E1038-1043.
98. Köppler, M.B. (2005). Charakterisierung der molekularen Mechanismen des Transfers von Mikropartikeln und dessen Einfluss auf Akzeptorzellen. In Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München (Heilbronn).
99. Lacroix, R., Robert, S., Poncelet, P., und Dignat-George, F. (2010). Overcoming limitations of microparticle measurement by flow cytometry. *Semin Thromb Hemost* *36*, 807-818.
100. LaMarca, B. (2010). Progress toward identifying potential markers for preeclampsia: role of agonistic autoantibody to the angiotensin II type I receptor. *Hypertension* *55*, 236-237.
101. Lampert, M.B., Hibbard, J., Weinert, L., Briller, J., Lindheimer, M., und Lang, R.M. (1993). Peripartum heart failure associated with prolonged tocolytic therapy. *Am J Obstet Gynecol* *168*, 493-495.
102. Landberg, E., Dahlstrom, U., und Alehagen, U. (2011). Serum prolactin and macroprolactin in heart failure: no relation to established laboratory or clinical parameters. *Ann Clin Biochem* *48*, 51-56.
103. Leanos-Miranda, A., Marquez-Acosta, J., Cardenas-Mondragon, G.M., Chinolla-Arellano, Z.L., Rivera-Leanos, R., Bermejo-Huerta, S., Romero-Arauz, J.F., Alvarez-Jimenez, G., Ramos-Leon, J.C., und Ulloa-Aguirre, A. (2008). Urinary prolactin as a reliable marker for preeclampsia, its severity, and the occurrence of adverse pregnancy outcomes. *J Clin Endocrinol Metab* *93*, 2492-2499.
104. Lee, H., Struman, I., Clapp, C., Martial, J., und Weiner, R.I. (1998). Inhibition of urokinase activity by the antiangiogenic factor 16K prolactin: activation of plasminogen activator inhibitor 1 expression. *Endocrinology* *139*, 3696-3703.

105. Lee, S.H., Nishino, M., Mazumdar, T., Garcia, G.E., Galfione, M., Lee, F.L., Lee, C.L., Liang, A., Kim, J., Feng, L., *et al.* (2005). 16-kDa prolactin down-regulates inducible nitric oxide synthase expression through inhibition of the signal transducer and activator of transcription 1/IFN regulatory factor-1 pathway. *Cancer Res* *65*, 7984-7992.
106. Lee, S.T., Chu, K., Jung, K.H., Kim, J.M., Moon, H.J., Bahn, J.J., Im, W.S., Sunwoo, J., Moon, J., Kim, M., *et al.* (2012). Circulating CD62E+ microparticles and cardiovascular outcomes. *PLoS One* *7*, e35713.
107. Leroyer, A.S., Anfosso, F., Lacroix, R., Sabatier, F., Simoncini, S., Njock, S.M., Jourde, N., Brunet, P., Camoin-Jau, L., Sampol, J., *et al.* (2010). Endothelial-derived microparticles: Biological conveyors at the crossroad of inflammation, thrombosis and angiogenesis. *Thromb Haemost* *104*, 456-463.
108. Lkhider, M., Castino, R., Bouguyon, E., Isidoro, C., and Ollivier-Bousquet, M. (2004). Cathepsin D released by lactating rat mammary epithelial cells is involved in prolactin cleavage under physiological conditions. *J Cell Sci* *117*, 5155-5164.
109. Lok, C.A., Nieuwland, R., Sturk, A., Hau, C.M., Boer, K., Vanbavel, E., and Vanderpost, J.A. (2007). Microparticle-associated P-selectin reflects platelet activation in preeclampsia. *Platelets* *18*, 68-72.
110. Lozito, T.P., and Tuan, R.S. (2012). Endothelial cell microparticles act as centers of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) activation and vascular matrix remodeling. *J Cell Physiol* *227*, 534-549.
111. Lucreziotti, S., Belletti, S., Massironi, L., and Lombardi, F. (2011). Rapid recovery from peripartum cardiomyopathy after inhibition of prolactin. *Int J Cardiol* *151*, e105-106.
112. Lynch, S.F., and Ludlam, C.A. (2007). Plasma microparticles and vascular disorders. *Br J Haematol* *137*, 36-48.
113. Macotela, Y., Aguilar, M.B., Guzman-Morales, J., Rivera, J.C., Zermeno, C., Lopez-Barrera, F., Nava, G., Lavalle, C., Martinez de la Escalera, G., and Clapp, C. (2006). Matrix metalloproteinases from chondrocytes generate an antiangiogenic 16 kDa prolactin. *J Cell Sci* *119*, 1790-1800.
114. Mallat, Z., Benamer, H., Hugel, B., Benessiano, J., Steg, P.G., Freyssinet, J.M., and Tedgui, A. (2000). Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation* *101*, 841-843.
115. Mallat, Z., Hugel, B., Ohan, J., Leseche, G., Freyssinet, J.M., and Tedgui, A. (1999). Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity. *Circulation* *99*, 348-353.
116. Marques, F.K., Campos, F.M., Filho, O.A., Carvalho, A.T., Dusse, L.M., and Gomes, K.B. (2012). Circulating microparticles in severe preeclampsia. *Clin Chim Acta* *414*, 253-258.
117. Martin, R.H., Glass, M.R., Chapman, C., Wilson, G.D., and Woods, K.L. (1980). Human alpha-lactalbumin and hormonal factors in pregnancy and lactation. *Clin Endocrinol (Oxf)* *13*, 223-230.
118. Mause, S.F., and Weber, C. (2010). Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circ Res* *107*, 1047-1057.

119. McMurray, J.J., Adamopoulos, S., Anker, S.D., Auricchio, A., Böhm, M., Dickstein, K., Falk, V., Filippatos, G., Fonseca, C., Gomez-Sanchez, M.A., *et al.* (2012). ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J* 33, 1787-1847.
120. Melchiorre, K., Sutherland, G.R., Baltabaeva, A., Liberati, M., und Thilaganathan, B. (2011). Maternal cardiac dysfunction and remodeling in women with preeclampsia at term. *Hypertension* 57, 85-93.
121. Mendelsohn, M.E. (2002). Protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *Am J Cardiol* 89, 12E-17E; discussion 17E-18E.
122. Meyer, G.P., Labidi, S., Podewski, E., Sliwa, K., Drexler, H., und Hilfiger-Kleiner, D. (2010). Bromocriptine treatment associated with recovery from peripartum cardiomyopathy in siblings: two case reports. *J Med Case Rep* 4, 80.
123. Midei, M.G., DeMent, S.H., Feldman, A.M., Hutchins, G.M., und Baughman, K.L. (1990). Peripartum myocarditis and cardiomyopathy. *Circulation* 81, 922-928.
124. Mielniczuk, L.M., Williams, K., Davis, D.R., Tang, A.S., Lemery, R., Green, M.S., Gollob, M.H., Haddad, H., und Birnie, D.H. (2006). Frequency of peripartum cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 97, 1765-1768.
125. Mobarrez, F., He, S., Broijersen, A., Wiklund, B., Antovic, A., Antovic, J., Egberg, N., Jorneskog, G., und Wallen, H. (2011). Atorvastatin reduces thrombin generation and expression of tissue factor, P-selectin and GPIIIa on platelet-derived microparticles in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Thromb Haemost* 106, 344-352.
126. Modi, K.A., Illum, S., Jariatul, K., Caldito, G., und Reddy, P.C. (2009). Poor outcome of indigent patients with peripartum cardiomyopathy in the United States. *Am J Obstet Gynecol* 201, 171 e171-175.
127. Morales, A., Painter, T., Li, R., Siegfried, J.D., Li, D., Norton, N., und Hershberger, R.E. (2010). Rare variant mutations in pregnancy-associated or peripartum cardiomyopathy. *Circulation* 121, 2176-2182.
128. Morel, O., Jesel, L., Freyssinet, J.M., und Toti, F. (2011). Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31, 15-26.
129. Nadaud, S., Poirier, O., Girerd, B., Blanc, C., Montani, D., Eyries, M., Imbert-Bismut, F., Pacheco, A., Vigne, J., Tregouet, D.A., *et al.* (2013). Small platelet microparticle levels are increased in pulmonary arterial hypertension. *Eur J Clin Invest* 43, 64-71.
130. Negoro, S., Kunisada, K., Fujio, Y., Funamoto, M., Darville, M.I., Eizirik, D.L., Osugi, T., Izumi, M., Oshima, Y., Nakaoka, Y., *et al.* (2001). Activation of signal transducer and activator of transcription 3 protects cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation-induced oxidative stress through the upregulation of manganese superoxide dismutase. *Circulation* 104, 979-981.
131. Neville, M.C., McFadden, T.B., und Forsyth, I. (2002). Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 7, 49-66.
132. Nomura, S., Ozaki, Y., und Ikeda, Y. (2008). Function and role of microparticles in various clinical settings. *Thromb Res* 123, 8-23.

133. Nozaki, T., Sugiyama, S., Koga, H., Sugamura, K., Ohba, K., Matsuzawa, Y., Sumida, H., Matsui, K., Jinnouchi, H., und Ogawa, H. (2009). Significance of a multiple biomarkers strategy including endothelial dysfunction to improve risk stratification for cardiovascular events in patients at high risk for coronary heart disease. *J Am Coll Cardiol* 54, 601-608.
134. Nozaki, T., Sugiyama, S., Sugamura, K., Ohba, K., Matsuzawa, Y., Konishi, M., Matsubara, J., Akiyama, E., Sumida, H., Matsui, K., *et al.* (2010). Prognostic value of endothelial microparticles in patients with heart failure. *Eur J Heart Fail* 12, 1223-1228.
135. Orozco, A.F., Jorgez, C.J., Horne, C., Marquez-Do, D.A., Chapman, M.R., Rodgers, J.R., Bischoff, F.Z., und Lewis, D.E. (2008). Membrane protected apoptotic trophoblast microparticles contain nucleic acids: relevance to preeclampsia. *Am J Pathol* 173, 1595-1608.
136. Osumi, K., Ozeki, Y., Saito, S., Nagamura, Y., Ito, H., Kimura, Y., Ogura, H., und Nomura, S. (2001). Development and assessment of enzyme immunoassay for platelet-derived microparticles. *Thromb Haemost* 85, 326-330.
137. Parissis, J.T., Farmakis, D., Fountoulaki, K., Rigas, A., Nikolaou, M., Paraskevaïdis, I.A., Bistola, V., Venetsanou, K., Ikonomidis, I., Anastasiou-Nana, M., *et al.* (2013). Clinical and neurohormonal correlates and prognostic value of serum prolactin levels in patients with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail* 15, 1122-1130.
138. Parra, A., und Ramirez-Peredo, J. (2002). The possible role of prolactin in preeclampsia: 2001, a hypothesis revisited a quarter of century later. *Med Hypotheses* 59, 378-384.
139. Patten, I.S., Rana, S., Shahul, S., Rowe, G.C., Jang, C., Liu, L., Hacker, M.R., Rhee, J.S., Mitchell, J., Mahmood, F., *et al.* (2012). Cardiac angiogenic imbalance leads to peripartum cardiomyopathy. *Nature* 485, 333-338.
140. Pearson, G.D., Veille, J.C., Rahimtoola, S., Hsia, J., Oakley, C.M., Hosenpud, J.D., Ansari, A., und Baughman, K.L. (2000). Peripartum cardiomyopathy: National Heart, Lung, and Blood Institute and Office of Rare Diseases (National Institutes of Health) workshop recommendations and review. *JAMA* 283, 1183-1188.
141. Piccin, A., Murphy, W.G., und Smith, O.P. (2007). Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev* 21, 157-171.
142. Podewski, E.K., Hilfiker-Kleiner, D., Hilfiker, A., Morawietz, H., Lichtenberg, A., Wollert, K.C., und Drexler, H. (2003). Alterations in Janus kinase (JAK)-signal transducers and activators of transcription (STAT) signaling in patients with end-stage dilated cardiomyopathy. *Circulation* 107, 798-802.
143. Pullano, J.G., Cohen-Addad, N., Apuzzio, J.J., Ganesh, V.L., und Josimovich, J.B. (1989). Water and salt conservation in the human fetus and newborn. I. Evidence for a role of fetal prolactin. *J Clin Endocrinol Metab* 69, 1180-1186.
144. Rasmusson, K.D., Stehlik, J., Brown, R.N., Renlund, D.G., Wagoner, L.E., Torre-Amione, G., Folsom, J.W., Silber, D.H., und Kirklin, J.K. (2007). Long-term outcomes of cardiac transplantation for peri-partum cardiomyopathy: a multiinstitutional analysis. *J Heart Lung Transplant* 26, 1097-1104.
145. Redman, C.W., und Sargent, I.L. (2008). Circulating microparticles in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Placenta* 29 Suppl A, S73-77.
146. Reuwer, A.Q., Reuwer, P.J., van der Post, J.A., Cramer, M.J., Kastelein, J.J., und Twickler, M.T. (2010). Prolactin fragmentation by trophoblastic matrix

- metalloproteinases as a possible contributor to peripartum cardiomyopathy and pre-eclampsia. *Med Hypotheses* 74, 348-352.
147. Ritchie, C. (1849). Clinical contributions to the pathology, diagnosis, and treatment of certain chronic diseases of the heart. *Edinb Med Surg J* 2.
148. Roos, M.A., Gennero, L., Denysenko, T., Reguzzi, S., Cavallo, G., Pescarmona, G.P., und Ponzetto, A. (2010). Microparticles in physiological and in pathological conditions. *Cell Biochem Funct* 28, 539-548.
149. Rösen, P. (2002). Endotheliale Dysfunktion: ein Synonym für funktionelle Arteriosklerose. *J KARDIOL* 9, 556-562.
150. Ruch, A., und Duhring, J.L. (1989). Postpartum myocardial infarction in a patient receiving bromocriptine. *Obstet Gynecol* 74, 448-451.
151. Seftel, H., und Susser, M. (1961). Maternity and myocardial failure in African women. *Br Heart J* 23, 43-52.
152. Sims, P.J., Wiedmer, T., Esmon, C.T., Weiss, H.J., und Shattil, S.J. (1989). Assembly of the platelet prothrombinase complex is linked to vesiculation of the platelet plasma membrane. Studies in Scott syndrome: an isolated defect in platelet procoagulant activity. *J Biol Chem* 264, 17049-17057.
153. Sinauridze, E.I., Kireev, D.A., Popenko, N.Y., Pichugin, A.V., Panteleev, M.A., Krymskaya, O.V., und Ataulkhanov, F.I. (2007). Platelet microparticle membranes have 50- to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets. *Thromb Haemost* 97, 425-434.
154. Sinha, Y.N., Gilligan, T.A., Lee, D.W., Hollingsworth, D., und Markoff, E. (1985). Cleaved prolactin: evidence for its occurrence in human pituitary gland and plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 60, 239-243.
155. Sinning, J.M., Losch, J., Walenta, K., Böhm, M., Nickenig, G., und Werner, N. (2011). Circulating CD31+/Annexin V+ microparticles correlate with cardiovascular outcomes. *Eur Heart J* 32, 2034-2041.
156. Sliwa, K., Blauwet, L., Tibazarwa, K., Libhaber, E., Smedema, J.P., Becker, A., McMurray, J., Yamac, H., Labidi, S., Struman, I., *et al.* (2010a). Evaluation of bromocriptine in the treatment of acute severe peripartum cardiomyopathy: a proof-of-concept pilot study. *Circulation* 121, 1465-1473.
157. Sliwa, K., Fett, J., und Elkayam, U. (2006a). Peripartum cardiomyopathy. *Lancet* 368, 687-693.
158. Sliwa, K., Forster, O., Libhaber, E., Fett, J.D., Sundstrom, J.B., Hilfiker-Kleiner, D., und Ansari, A.A. (2006b). Peripartum cardiomyopathy: inflammatory markers as predictors of outcome in 100 prospectively studied patients. *Eur Heart J* 27, 441-446.
159. Sliwa, K., Hilfiker-Kleiner, D., Petrie, M.C., Mebazaa, A., Pieske, B., Buchmann, E., Regitz-Zagrosek, V., Schaufelberger, M., Tavazzi, L., van Veldhuisen, D.J., *et al.* (2010b). Current state of knowledge on aetiology, diagnosis, management, and therapy of peripartum cardiomyopathy: a position statement from the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology Working Group on peripartum cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail* 12, 767-778.
160. Sliwa, K., Skudicky, D., Bergemann, A., Candy, G., und Sareli, P. (2000). Peripartum cardiomyopathy: Analysis of clinical outcome, left ventricular function, plasma levels of

- cytokines and Fas/APO-1. *Journal of the American College of Cardiology* 35, 165a-165a.
161. Snyder, J.M., Dekowsk, Steven A. (1992). The Role of Prolactin in Fetal Lung Maturation. *Semin Reprod Med* 10, 287-293.
162. Soldin, O.P., Guo, T., Weiderpass, E., Tractenberg, R.E., Hilakivi-Clarke, L., and Soldin, S.J. (2005). Steroid hormone levels in pregnancy and 1 year postpartum using isotope dilution tandem mass spectrometry. *Fertil Steril* 84, 701-710.
163. Stewart, G.C. (2012). Management of peripartum cardiomyopathy. *Curr Treat Options Cardiovasc Med* 14, 622-636.
164. Sutton, M.S., Cole, P., Plappert, M., Saltzman, D., and Goldhaber, S. (1991). Effects of subsequent pregnancy on left ventricular function in peripartum cardiomyopathy. *Am Heart J* 121, 1776-1778.
165. Tabruyn, S.P., Nguyen, N.Q., Cornet, A.M., Martial, J.A., and Struman, I. (2005). The antiangiogenic factor, 16-kDa human prolactin, induces endothelial cell cycle arrest by acting at both the G0-G1 and the G2-M phases. *Mol Endocrinol* 19, 1932-1942.
166. Tabruyn, S.P., Sorlet, C.M., Rentier-Delrue, F., Bours, V., Weiner, R.I., Martial, J.A., und Struman, I. (2003). The antiangiogenic factor 16K human prolactin induces caspase-dependent apoptosis by a mechanism that requires activation of nuclear factor-kappaB. *Mol Endocrinol* 17, 1815-1823.
167. Tibazarwa, K., Lee, G., Mayosi, B., Carrington, M., Stewart, S., und Sliwa, K. (2012). The 12-lead ECG in peripartum cardiomyopathy. *Cardiovasc J Afr* 23, 322-329.
168. Torner, L., Nava, G., Duenas, Z., Corbacho, A., Mejia, S., Lopez, F., Cajero, M., Martinez de la Escalera, G., und Clapp, C. (1999). Changes in the expression of neurohypophyseal prolactins during the estrous cycle and after estrogen treatment. *J Endocrinol* 161, 423-432.
169. Toti, F., Satta, N., Fressinaud, E., Meyer, D., und Freyssinet, J.M. (1996). Scott syndrome, characterized by impaired transmembrane migration of procoagulant phosphatidylserine and hemorrhagic complications, is an inherited disorder. *Blood* 87, 1409-1415.
170. Tramontano, A.F., Lyubarova, R., Tsiakos, J., Palaia, T., Deleon, J.R., und Ragolia, L. (2010). Circulating endothelial microparticles in diabetes mellitus. *Mediators Inflamm* 2010, 250476.
171. Tyson, J.E., Hwang, P., Guyda, H., und Friesen, H.G. (1972). Studies of prolactin secretion in human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 113, 14-20.
172. van Spaendonck-Zwarts, K.Y., van Tintelen, J.P., van Veldhuisen, D.J., van der Werf, R., Jongbloed, J.D., Paulus, W.J., Dooijes, D., und van den Berg, M.P. (2010). Peripartum cardiomyopathy as a part of familial dilated cardiomyopathy. *Circulation* 121, 2169-2175.
173. VanWijk, M.J., Kublickiene, K., Boer, K., und VanBavel, E. (2000). Vascular function in preeclampsia. *Cardiovasc Res* 47, 38-48.
174. VanWijk, M.J., VanBavel, E., Sturk, A., und Nieuwland, R. (2003). Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res* 59, 277-287.

175. Walenta, K., Schwarz, V., Schirmer, S.H., Kindermann, I., Friedrich, E.B., Solomayer, E.F., Sliwa, K., Labidi, S., Hilfiker-Kleiner, D., und Böhm, M. (2012). Circulating microparticles as indicators of peripartum cardiomyopathy. *Eur Heart J* 33, 1469-1479.
176. Wallukat, G., Homuth, V., Fischer, T., Lindschau, C., Horstkamp, B., Jupner, A., Baur, E., Nissen, E., Vetter, K., Neichel, D., *et al.* (1999). Patients with preeclampsia develop agonistic autoantibodies against the angiotensin AT1 receptor. *J Clin Invest* 103, 945-952.
177. Weiss, H.J., und Lages, B. (1997). Family studies in Scott syndrome. *Blood* 90, 475-476.
178. Werner, N., Kosiol, S., Schiegl, T., Ahlers, P., Walenta, K., Link, A., Böhm, M., und Nickenig, G. (2005). Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med* 353, 999-1007.
179. Whitehead, S.J., Berg, C.J., und Chang, J. (2003). Pregnancy-related mortality due to cardiomyopathy: United States, 1991-1997. *Obstet Gynecol* 102, 1326-1331.
180. Wiedmer, T., Shattil, S.J., Cunningham, M., und Sims, P.J. (1990). 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* 29, 623-632.
181. Wiedmer, T., und Sims, P.J. (1991). Participation of protein kinases in complement C5b-9-induced shedding of platelet plasma membrane vesicles. *Blood* 78, 2880-2886.
182. Witlin, A.G., Mabie, W.C., und Sibai, B.M. (1997). Peripartum cardiomyopathy: an ominous diagnosis. *Am J Obstet Gynecol* 176, 182-188.
183. Wolf, P. (1967). The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol* 13, 269-288.
184. Y-Hassan, S., und Jernberg, T. (2011). Bromocriptine-induced coronary spasm caused acute coronary syndrome, which triggered its own clinical twin--Takotsubo syndrome. *Cardiology* 119, 1-6.
185. Yang, H., Kim, T.H., An, B.S., Choi, K.C., Lee, H.H., Kim, J.M., und Jeung, E.B. (2013). Differential expression of calcium transport channels in placenta primary cells and tissues derived from preeclamptic placenta. *Mol Cell Endocrinol* 367, 21-30.
186. Yong, P.J., Koh, C.H., und Shim, W. (2012). Endothelial Microparticles: Missing Link in Endothelial Dysfunction? *Eur J Prev Cardiol*.
187. Zhong, Z., Wen, Z., und Darnell, J.E., Jr. (1994). Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science* 264, 95-98.
188. Ziegler, M.G., Lake, C.R., Williams, A.C., Teychenne, P.F., Shoulson, I., und Steinsland, O. (1979). Bromocriptine inhibits norepinephrine release. *Clin Pharmacol Ther* 25, 137-142.
189. Zwaal, R.F., Comfurius, P., und Bevers, E.M. (2004). Scott syndrome, a bleeding disorder caused by defective scrambling of membrane phospholipids. *Biochim Biophys Acta* 1636, 119-128.
190. Zwaal, R.F., und Schroit, A.J. (1997). Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood* 89, 1121-1132.

9 Publikation, Abstracts und Preise

9.1 Publikation

Walenta, K., Schwarz, V., Schirmer, S.H., Kindermann, I., Friedrich, E.B., Solomayer, E.F., Sliwa, K., Labidi, S., Hilfiker-Kleiner, D., und Böhm, M. (2012). Circulating microparticles as indicators of peripartum cardiomyopathy. *Eur Heart J* 33, 1469-1479.

9.2 Abstracts

Walenta, K., Friedrich, E.B., Schwarz, V., Molaen, S., Kindermann, I., Labidi, S., Hilfiker-Kleiner, D., und Böhm, M. (2010). Elevation of circulating microparticles as indicator for vascular damage in peripartum cardiomyopathy. 76. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie 2010.

Walenta, K., Friedrich, E.B., Schwarz, V., Molaen, S., Kindermann, I., Labidi, S., Hilfiker-Kleiner, D., und Böhm, M. (2010). Zirkulierende Mikropartikel als Indikator für den Gefäßschaden bei der Peripartalen Kardiomyopathie. 116. Internistenkongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin 2010.

Walenta, K., Friedrich, E.B., Schwarz, V., Molaen, S., Kindermann, I., Labidi, S., Hilfiker-Kleiner, D., und Böhm, M. (2010). Circulating microparticles as indicator for vascular damage in peripartum cardiomyopathy. *European Heart Journal* 31 (Abstract Supplement), 314-315.

Walenta, K., Schwarz, V., Solomayer, E.F., Kindermann, I., Labidi, S., Hilfiker-Kleiner, D., Sliwa, K., und Böhm, M. (2011). Circulating microparticles as indicators of peripartum cardiomyopathy reflecting therapeutic intervention with bromocriptine. 77. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie 2011. *Vortrag durch Schwarz, V.

Walenta, K., Schwarz, V., Kindermann, I., Solomayer, E.F., Labidi, S., Hilfiker-Kleiner, D., Sliwa, K., und Böhm, M. (2011). Circulating microparticles as indicators of peripartum cardiomyopathy reflecting therapeutic intervention with bromocriptine. *European Heart Journal* 32 (Abstract Supplement), 453. *Posterpräsentation durch Schwarz, V.

9.3 Preise

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden Frau Dr. med. Katrin Bachelier-Walenta folgende Preise verliehen:

- „Wissenschaftspreis des Deutschen Ärztinnenbundes e.V. für Nachwuchsforscherinnen“ für die Arbeit mit dem Titel „Pathognomonische Mikropartikelprofile bei Kardiomyopathien“, Berlin, 2013.
- „State of the Art and featured Research-Special Award on Heart Failure dedicated to the Memory of Prof. Helmut Drexler“ für die Arbeit mit dem Titel “Circulating microparticles as indicator for vascular damage in peripartum cardiomyopathy”, Kongress der European Society of Cardiology (ESC), Stockholm, 2010.

10 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Michael Böhm danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und die Möglichkeit, die erforderlichen Untersuchungen im kardiologischen Forschungslabor der Klinik für Innere Medizin III des Universitätsklinikums des Saarlandes durchzuführen. Ihm gilt ein großer Dank für seine außerordentliche Fähigkeit, Interesse und Begeisterung für wissenschaftliches Arbeiten zu wecken. Ebenso danke ich Prof. Böhm für seine Anregungen mit aktuellen Publikationen sowie die Möglichkeit, frühzeitig auf nationalen und internationalen Kongressen auftreten zu dürfen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. med. Katrin Bachelier-Walenta für die hervorragende und motivierende Unterstützung zu allen Abschnitten dieser Arbeit sowie ihre ständige Bereitschaft, mit hilfreichen Ideen und Freundschaft beratend zur Seite zu stehen.

Für die ständige Hilfsbereitschaft und das sehr angenehme Arbeitsklima bedanke ich mich bei allen medizinisch-technischen Assistentinnen, Biologen, Doktoranden und Ärzten des kardiologischen Forschungslabors. Mein Dank gilt insbesondere Frau Claudia Schormann für die Einarbeitung in die Methode sowie für die Unterstützung und Hilfe bei der Durchführung der Experimente.

Ich danke Herrn Prof. Erich-Franz Solomayer (Gynäkologie, Universitätsklinikum des Saarlandes) für die Möglichkeit, Blutseren für die Kontrollgruppe der gesunden schwangeren Frauen in der gynäkologischen Klinik akquirieren zu dürfen.

Mein Dank gilt Frau Prof. Denise Hilfiker-Kleiner (Molekulare Kardiologie, Medizinische Hochschule Hannover) sowie ihrer Doktorandin Saida Labidi für die Überlassung der Blutseren von Patientinnen mit peripartaler Kardiomyopathie und gesunden postpartalen Frauen.

Besonderer Dank gilt Frau Prof. Karen Sliwa-Hähnle (Hatter Cardiovascular Research Institute, Kapstadt/Südafrika & Soweto Cardiovascular Research Unit, Chris Hani Baragwanath Hospital, Johannesburg/Südafrika) für die Überlassung der Blutseren von Frauen mit peripartaler Kardiomyopathie aus ihrer publizierten Pilotstudie. Ich bedanke mich sehr für die Einladung sowie Gastfreundschaft während des „African Translational Research Workshop on Peripartum Cardiomyopathy“ in Kapstadt.

Zuletzt ein großer Dank an meine Familie und Freunde, die mir außerhalb von Labor und Klinik zu jeder Zeit liebevolle Unterstützung gegeben haben.

