

Klinik für Innere Medizin III
Kardiologie, Angiologie und internistische Intensivmedizin
Klinische und experimentelle Medizin
Universitätsklinikum des Saarlandes
Prof. Dr. Ulrich Laufs

Einfluss eines Marathons auf zirkulierende Mikropartikel

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanmedizin
der medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2017

Vorgelegt von:
Philip Düsing
geboren am 22.06.1993 in Bonn

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	6
1.1. Deutsche Zusammenfassung	6
1.2. Englische Zusammenfassung	8
2. Einleitung	10
2.1. Biomarker	10
2.2. Mikropartikel	10
2.2.1. Freisetzung der Mikropartikel	11
2.2.2. Molekulare Zusammensetzung der Mikropartikel	14
2.2.3. Physiologie	14
2.2.4. Pathophysiologie	15
2.3. Ausdauersport	16
2.4. Fragestellung der Arbeit	17
3. Material und Methoden	19
3.1. Studiendesign und Studienkollektiv	19
3.2. Geräte, Chemikalien und Computer-Software	21
3.2.1. Verwendete Geräte	21
3.2.2. Chemikalien und Reagenzien	23
3.2.3. Lösungen	24
3.2.4. Fluoreszierende Antikörper	25
3.2.5. Computer-Software	26
3.2.6. Verbrauchsmittel	27
3.3. Durchflusszytometrie	28
3.4. Untersuchte Mikropartikel-Populationen	33
3.5. Versuchsprotokoll	34
3.5.1. Ausnahmen	36
3.6. Statistik	36

4. Ergebnisse	37
4.1. Charakteristika der Probanden	37
4.2. Vitalparameter	39
4.3. Laborparameter	40
4.3.1. Hochsensitives Troponin T	40
4.3.2. Harnstoff	41
4.3.3. Blutbild	42
4.4. Mikropartikel	43
4.4.1. Stabilität der Mikropartikel-Messungen	43
4.4.2. Endotheliale Mikropartikel	45
4.4.3. Thrombozytäre Mikropartikel	47
4.4.4. Monozytäre und leukozytäre Mikropartikel	49
4.5. Kardiovaskuläre Risikofaktoren und Mikropartikel	51
5. Diskussion	52
5.1. Endotheliale Mikropartikel und Rückschlüsse auf mögliche kardiovaskuläre Auswirkungen	53
5.2. Thrombozytäre Mikropartikel	56
5.3. Monozytäre, leukozytäre Mikropartikel und Inflammation	57
5.4. Limitationen der Studie	60
5.5. Schlussfolgerung	61
6. Literaturverzeichnis	62
7. Publikationen	68
8. Danksagung	69

Abkürzungsverzeichnis

Mikropartikel

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

Laborparameter

Abkürzung	Bedeutung
CRP	C-reaktives Protein
hs Troponin T	hochsensitives Troponin T

Durchflusszytometrie

Abkürzung	Bedeutung
FACS	fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
PE	Phycoerythrin
APC	Allophycocyanin

Sonstige

Abkürzung	Bedeutung
Interleukin-6 (8)	IL-6 (IL-8)
ABP	Antigen bindende Proteine
KHK	koronare Herzkrankheit
PBS	phosphate buffered saline
ROCK I	Rho-Kinase 1
cMRT	cranielle Magnetresonanztomographie
EKG	Elektrokardiographie
NO	Stickstoffmonoxid
sVCAM-1	soluble vascular cell adhesion molecule 1
TNF-alpha	Tumornekrosefaktor alpha
RNA	Ribonukleinsäure
CD	cluster of differentiation

1. Zusammenfassung

1.1. Deutsche Zusammenfassung

Langfristige, positive Effekte regelmäßiger körperlicher Aktivität auf das kardiovaskuläre System sind umfassend beschrieben. Die akuten kardiovaskulären Auswirkungen von körperlichen Extrem-Belastungen sind jedoch weniger gut verstanden. Aktuelle Daten lassen vermuten, dass durch sehr ausgeprägte körperliche Aktivität, wie zum Beispiel einem Marathonlauf, zelluläre Veränderungen vermittelt werden, welche sich als protektiv, teilweise aber auch als schädlich für das kardiovaskuläre System erweisen können.

Zirkulierende Mikropartikel (MP) gelten als zelluläre Marker für vaskuläre Funktion und Schädigung. MP sind Zellmembranfragmente welche in ihrer Größe zwischen 0,1 - 1 µm variieren und nach Markierung mit spezifischen Antikörpern mittels Durchflusszytometrie qualitativ und quantitativ analysiert werden können. Die Bildung und Freisetzung der MP wird durch unterschiedliche physiologische und pathophysiologische Reize stimuliert, so dass die MP in eine Vielzahl von biochemischen Prozessen eingreifen. Ziel der vorliegenden Studie war es, zirkulierende Mikropartikel nach einem Marathonlauf zu quantifizieren und unter Berücksichtigung zusätzlicher klinischer Daten und laborchemischer Parameter Rückschlüsse über Veränderungen auf zellulärer Ebene zu ziehen.

Das Studienkollektiv umfasste 99 Teilnehmer des 38. Berlin-Marathons 2011. Blutproben wurden vor, unmittelbar nach und innerhalb von zwei Tagen nach dem Lauf asserviert.

Der Marathonlauf induzierte eine Leukozytose und erhöhte die Thrombozyten- sowie Monozytenzahl, während die Anzahl der Lymphozyten absank. Zudem konnte ein Anstieg von Troponin T beobachtet werden, welches jedoch innerhalb von zwei Tagen nach dem Marathon zu seinem Ausgangswert zurückkehrte. Unmittelbar nach dem Marathonlauf stiegen endotheliale MP um 22,2% ($117,9 \pm 9,3$ pro 500.000 Events nach

vs. $96,5 \pm 7,8$ pro 500.000 Events vor dem Marathon, $p=0,008$) und thrombozytäre MP um 38,4% (291 ± 22 pro 500.000 Events nach vs. 210 ± 16 pro 500.000 Events vor dem Marathon, $p<0,0001$) an. Sie näherten sich nach zwei Tagen wieder dem Ausgangswert. MP leukozytären und monozytären Ursprungs hingegen sanken unmittelbar nach dem Marathon ab und blieben auch zwei Tage nach dem Lauf unterhalb des Ausgangsniveaus.

Diese Ergebnisse lassen auf einen akuten endothelialen Zellschaden mit prothrombotischem und pro-inflammatorischem Milieu schließen. Körperliche Extrembelastungen, wie z.B. ein Marathonlauf, können zu akutem vaskulären Stress führen, welcher sich in der vorliegenden Studie als vorübergehend und reversibel erweist.

1.2. Englische Zusammenfassung (English Summary)

Long-term positive effects of regular physical activity on cardiovascular health are widely characterized. In contrast, the acute effects of high intensity physical activity are less well understood. Recent data suggest cellular changes induced by extreme physical activities such as running a marathon which may be both protective and damaging for the cardiovascular system.

Circulating microparticles are cellular markers for vascular function and damage. They are cell fragments which vary in size between 0.1 - 1 μm and can be determined qualitatively and quantitatively by flow-cytometry. MP can be produced and released under different (patho)physiological circumstances and may mediate different biochemical processes. The aim of this study was to quantify circulating microparticles following a marathon run in the context of clinical data and other laboratory values to further characterize cellular changes under these conditions.

Microparticles were analyzed in 99 participants of the 38th Berlin-Marathon 2011. Blood samples were taken before, immediately after and within two days after the marathon run. Different populations of MP were quantitated by flow cytometry.

The marathon run induced leukocytosis, monocytosis and an increased platelet count. In contrast, lymphocytes were decreased after the run. Endothelial microparticles (EMP) were increased by 22.2% (117.9 ± 9.3 per 500,000 events after vs. 96.5 ± 7.8 per 500,000 events before the marathon, $p=0.008$) immediately after the marathon. Thrombocyte-derived microparticles (PMP) were increased by 38.4% (291 ± 22 per 500,000 events after vs. 210 ± 16 per 500,000 events before the marathon, $p<0.0001$). EMP and PMP levels returned to baseline within two days after the marathon. In contrast, monocyte- and leukocyte-derived MP were decreased immediately after the marathon run and remained below baseline for the following two days. Compared to baseline, troponin T increased immediately after the run and returned to baseline after two days.

The observed changes are consistent with acute endothelial cell damage induced by intense physical activity. In addition, the increase in thrombocyte-derived MP paralleled by a decrease of monocyte- and leukocyte-derived MP indicates a pro-thrombotic and pro-inflammatory state. These findings demonstrate acute vascular stress induced by very high intensity physical activity that is transient and reversible.

2. Einleitung

2.1. Biomarker

Biomarker sind eine heterogene Gruppe von Charakteristika eines biologischen Systems. Sie können objektiv gemessen werden und dienen als Indikatoren für physiologische und pathologische Prozesse, pharmakologische Effekte und therapeutische Interventionen (53). Die Bestimmung von Biomarkern spielt in der experimentellen sowie der klinischen Medizin eine stark zunehmende Rolle.

2.2. Mikropartikel

Eine jüngere Gruppe von Biomarkern stellen die als Mikropartikel (MP) bezeichneten Zellfragmente dar. Sie wurden erstmalig 1967 von Peter Wolf in seiner Arbeit „The nature and significance of platelet products in human plasma“ beschrieben. Dabei untersuchte Wolf Material, welches er als „platelet-dust“ bezeichnete. Dieser „thrombozytäre Staub“ leitete sich von Thrombozyten ab, war reich an Phospholipiden und zeigte prokoagulatorische Eigenschaften, ähnlich der von „tissue factor“ (61). Aufgrund von elektronenmikroskopischer Untersuchung wurde zunächst vermutet, dass die MP aus den Granulae der Thrombozyten freigesetzt werden und an deren Aktivierung maßgeblich beteiligt sind (61).

Nach weiterer Forschung ist der heutige Stand der Wissenschaft, dass sowohl das Gefäßendothel als auch alle zirkulierenden Blutzellen diese membranösen Fragmente als MP in einer Größe $< 1 \mu\text{m}$ aus ihrer Plasmamembran freisetzen können (24). In der Literatur sind MP als Zellfragmente beschrieben, welche in ihrer Größe zwischen $0,1-1 \mu\text{m}$ variieren und von einer Doppelschicht aus Phospholipiden umgeben sind (7, 8). Die Mehrheit der im Blut zirkulierenden MP stammen von Thrombozyten, während MP leukozytärer, endothelialer oder erythrozytärer Herkunft in geringerer Anzahl vorkommen (Abbildung 2-1)(15, 19). Es existieren jedoch signifikante Unterschiede in

der Zusammensetzung zirkulierender MP-Fractionen im Blut gesunder Probanden und von Patienten mit einer kardiovaskulären Erkrankung wie Hypertonie oder Atherosklerose (7, 9, 15). Die Bildung und Freisetzung der MP wird durch unterschiedliche physiologische und pathophysiologische Reize stimuliert, so dass die MP in eine Vielzahl von biochemischen Prozessen eingreifen. Dabei sind es die Ursprungszelle sowie die Art ihrer Aktivierung, welche die Zusammensetzung und somit die Wirkung der MP an der Zielzelle kontrollieren (9, 15).

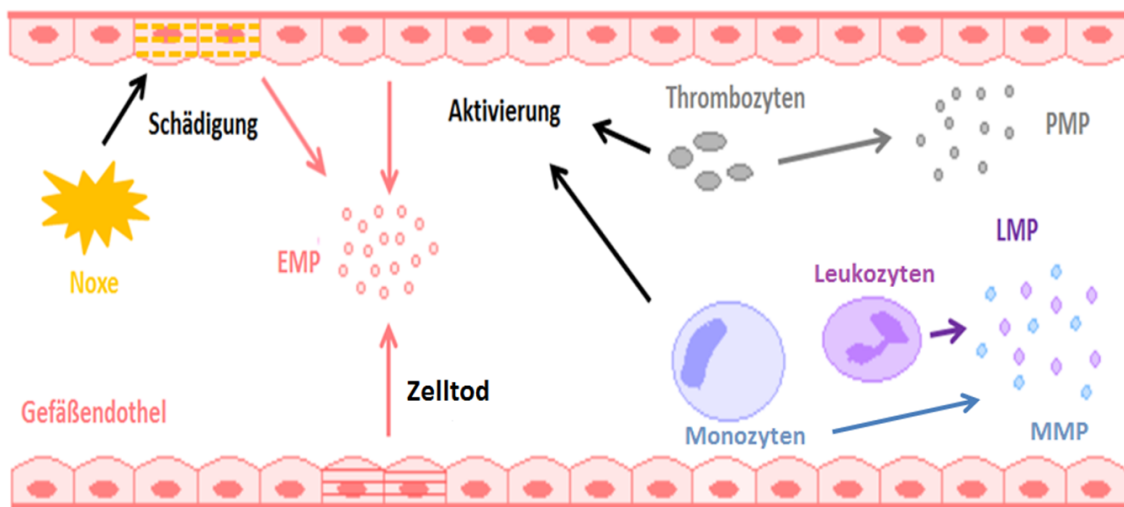


Abbildung 2-1: Freisetzung im Blut zirkulierender Mikropartikel.

2.2.1. Freisetzung der Mikropartikel

In der angloamerikanischen Literatur wird unter den extrazellulären Vesikeln, welche der interzellulären Kommunikation dienen, zwischen den sogenannten „Exosomes“ und „Ectosomes“ unterschieden. Die „Exosomes“ werden aus „multivesicular bodys“ über Exozytose freigesetzt. „Ectosomes“ formieren sich direkt an der Zellmembran und werden von dieser freigesetzt. MP sind demnach den „Ectosomes“ zuzuordnen (9, 10).

Im Ruhezustand sind die Phospholipide in der Zellmembran zwischen zytoplasmatischer und extrazellulärer Schicht asymmetrisch verteilt. Während sich in der äußeren Schicht Phosphatidylcholin und Sphingomyelin befinden, sind

Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin in der zytoplasmatischen Schicht lokalisiert (9, 26). Diese spezifische Verteilung von Phospholipiden innerhalb der Plasmamembran wird über ein dreiteiliges System von Enzymen aufrechterhalten, welches auch für die Freisetzung der MP von Bedeutung ist. Die Aminophospholipid-Translokase, welche als Flippase bezeichnet wird, transportiert spezifisch Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin von der äußeren auf die innere Seite der Lipid-Doppelschicht (9). Das Enzym Floppase stellt eine nach außen gerichtete Pumpe für Phospholipide dar (9). Schließlich erlaubt die im Ruhezustand der Zelle inaktive Scramblase die unspezifische, bidirektionale Umverteilung von Phospholipiden zwischen den beiden Schichten der Plasmamembran (9, 26).

Zwei Hauptmechanismen sind identifiziert worden, die zur Freisetzung von MP aus der Zellmembran führen. Diese sind sowohl die Aktivierung als auch die Apoptose der Zelle (Abbildung 2-2) (55). Wird eine Zelle durch einen Agonisten aktiviert, führt dies in der Regel zu einem Anstieg des intrazellulären Calciums, beispielsweise durch Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum. Kommt es nun zu einem solchen Anstieg der Calciumkonzentration innerhalb der Zelle, ändert sich die Verteilung der Phospholipide innerhalb der Zellmembran. Dies liegt daran, dass ein Calcium-Anstieg die Flippase inaktiviert, während Floppase und Scramblase aktiviert werden. Dies hebt die asymmetrische Verteilung der Phospholipide auf und unterbricht damit Verbindungen zwischen Phospholipiden und dem Zytoskelett. Phosphatidylserin wird nun auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran exprimiert (9, 26). Zusätzlich wird im Zytosol die calciumabhängige Cysteinprotease Calpain aktiviert. Calpain hydrolisiert Actin-bindende Proteine (ABP), welche die Verbindung zwischen dem Zytoskelett und der Plasmamembran ermöglichen (9, 18). Diesen Veränderungen an der Zellmembran folgt schließlich die Freisetzung der MP (26).

Bei der Apoptose handelt es sich um den programmierten Zelltod, bei welchem die Zelle charakteristische Veränderungen durchläuft. Es kommt zur Kontraktion der Zelle, das Chromatin kondensiert, die DNA wird fragmentiert und an der Zellmembran bilden sich Bläschen („membrane blebbing“) (38). Eine zentrale Rolle spielt dabei die Rho-Kinase 1 (ROCK I), welche von bei der Apoptose aktivierten Caspasen gespalten und so

in ihre aktive Form überführt wird (55). Die Rho-Kinase 1 fördert die Phosphorylierung der leichten Myosinketten sowie die Kopplung von Aktin-Myosin Filamenten an die Plasmamembran und bildet somit die Grundlage für die Entstehung der apoptotischen MP sowie die Verteilung von fragmentierter DNA auf diese, welche für die interzelluläre Kommunikation eine große Rolle spielt (35). Die dabei entstehenden MP können sich in Größe, Lipid- und Proteinzusammensetzung sowie ihren physiologischen und pathophysiologischen Effekten unterscheiden (Abbildung 2-2) (35).

Allerdings können MP auch unter weniger kontrollierten Bedingungen, wie beispielsweise bei der Nekrose freigesetzt werden. Ein möglicher Mechanismus hierfür ist der Verlust der Membranintegrität oder eine mechanische Schädigung der Zelle (26).

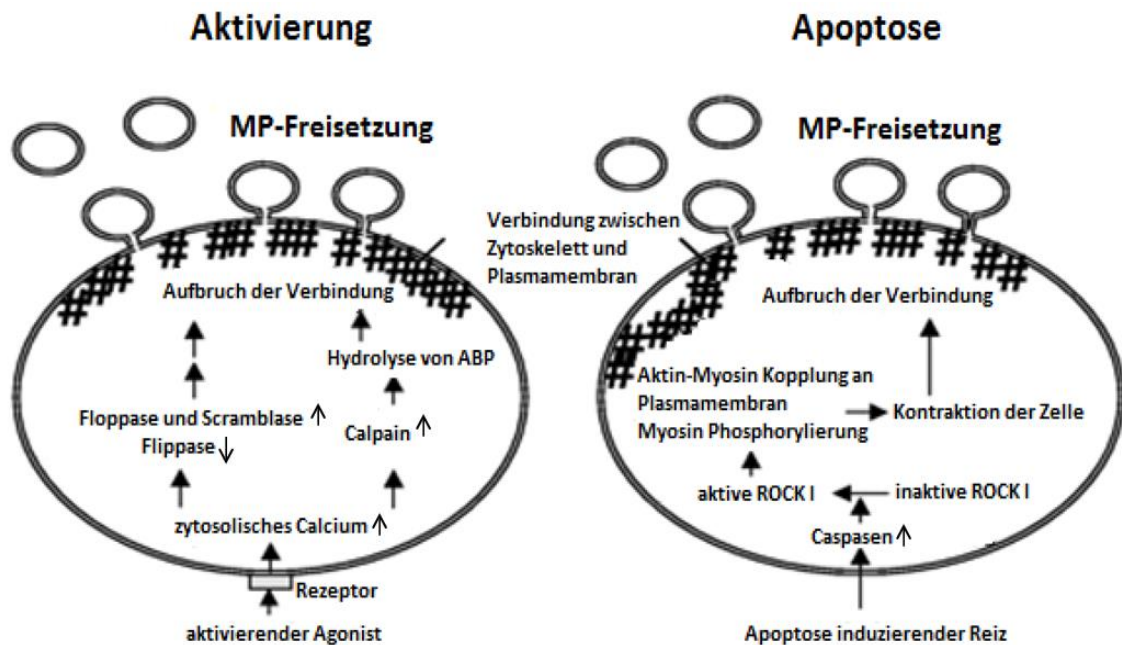


Abbildung 2-2: MP Freisetzung in einer aktivierten und apoptotischen Zelle. Modifiziert nach VanWijk MJ, VanBavel E, Sturk A, Nieuwland R (2003) Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res.* 59:277-287 (55).

2.2.2. Molekulare Zusammensetzung der Mikropartikel

Bei den MP handelt es sich um eine heterogene Gruppe extrazellulärer Vesikel mit einer komplexen Zusammensetzung. Gemeinsam ist ihnen der Aufbau mit einer Phospholipid-Doppelschicht, welche transmembrane Proteine sowie Rezeptoren aufweist und zytosolische Komponenten umschließt (34). In ihnen lassen sich eine Reihe biologisch aktiver Fragmente wie Transkriptionsfaktoren, mRNA sowie auch nukleäre Bestandteile wie DNA und RNA nachweisen (16, 34).

Die Verteilung von Oberflächenmolekülen auf den MP ist vom Zelltypus abhängig, dem die MP entstammen. Anhand dieser spezifischen Antigene, welche denen ihrer Ursprungszelle entsprechen, lassen sich die MP ihrer Herkunft zuordnen. Während sich auf MP thrombozytärer Herkunft insbesondere Glykoprotein GpIb (CD42b), „platelet-endothelium adhesion molecule-1“ (PECAM-1 oder CD31) (15) und Aktivierungsmarker wie P-Selektin (CD62P) (15, 30) finden, weisen von Endothelzellen stammende MP unter anderem CD144, CD31 und CD62E auf (27, 29, 54). Leukozytäre MP sind insbesondere durch CD45, solche monozytären Ursprungs durch CD14 charakterisiert (24).

2.2.3. Physiologie

MP beeinflussen in Abhängigkeit von ihrer Herkunft und molekularen Zusammensetzung mehrere physiologische Prozesse, wie beispielsweise Koagulation oder Inflammation. So zeigen MP endothelialer, thrombozytärer oder leukozytärer Herkunft die negativ geladene Phosphatidylserin an Ihrer Oberfläche tragen, welches Gerinnungsfaktoren binden und aktivieren kann, ein prokoagulatives Potenzial (26). Zusätzlich dazu kann „Tissue Factor“ und damit den Aktivator des extrinsischen Weges der Blutgerinnung an die Oberfläche der MP gebunden sein, was ihr prokoagulatorisches Potenzial noch verstärkt (24, 55). Mesri et al. zeigten 1998 die Aktivierung von endothelialen Zellen durch leukozytäre MP. Dabei setzen Leukozyten nach einer Stimulierung mit inflammatorischen Agonisten eine heterogene MP-

Population frei. Mit diesen MP inkubierte endotheliale Zellen reagierten unter anderem mit einer Ausschüttung der Entzündungsmediatoren Interleukin-6 und 8 (IL-6, IL-8) und einer vermehrten Expressierung von Zelladhäsionsmolekülen wie Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1). Die leukozytären MP wirkten somit proinflammatorisch auf die Endothelzellen (37).

2.2.4. Pathophysiologie

Neben diesen physiologischen Funktionen spielen MP auch in der Pathophysiologie verschiedener Erkrankungen eine Rolle. Ein eindrucksvolles Beispiel hierfür ist das Scott Syndrom, eine seltene kongenitale Blutungsstörung. Bei diesem Krankheitsbild sind die Thrombozyten der Patienten in ihrer Fähigkeit, prokoagulatorische MP zu bilden, stark eingeschränkt, was zu einer Beeinträchtigung der Blutgerinnung führt (40, 50, 62). Auch bei kardiovaskulären Krankheitsbildern sind MP von Bedeutung. Boulanger et al. zeigten 2001, dass MP, die von Patienten mit einem Myokardinfarkt isoliert wurden, den NO-Übertragungsweg in isolierten Arterien beeinträchtigten und so zu einer endothelialen Dysfunktion führten. Die MP gesunder Probanden zeigten diesen Effekt nicht (6).

Da MP bei Aktivierung oder Schädigung von Zellen mit Kontakt zum Blutsystem gebildet werden, können sie auch Veränderungen für wichtige kardiovaskuläre Erkrankungen, wie die koronare Herzkrankheit (KHK) oder das akute Koronarsyndrom reflektieren (40). So konnte in einer Studie gezeigt werden, dass bei Patienten mit einer KHK eine signifikant höhere Anzahl von CD31 und CD51 positiven EMP im Blut zirkulierten als im Blut der Probanden aus der Kontrollgruppe (2). Darüber hinaus zeigten Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom höhere Spiegel an CD31 positiven EMP als Patienten mit einer stabilen Angina pectoris (2). Mittels Mikropartikelmessungen gelang der hiesigen Arbeitsgruppe die Abgrenzung von Patientinnen mit peripartaler Kardiomyopathie von weiteren Formen einer Herzinsuffizienz (57). Ebenso konnten Endothelschädigung und Initiierung von Inflammationsprozessen infolge von Zigarettenrauchen mittels

Mikropartikelmessungen nachvollzogen werden (45). Diese Beispiele illustrieren, dass durch die weitgehende Aufklärung der Wirkungsmechanismen von MP fundamentale Prozesse Endothel-assoziiierter Erkrankungen besser verstanden werden können (3, 34, 52).

2.3. Ausdauersport

Langfristig positive Effekte regelmäßiger, moderater körperlicher Aktivität auf das kardiovaskuläre System sind allgemein bekannt. Die Folgen von Extrembelastungen sind jedoch weniger gut verstanden. Langstreckenlauf erfreut sich weltweit großer Beliebtheit, bei einem Marathonlauf wird eine Distanz von 42,195 km zurückgelegt. Alleine in den USA haben im Jahre 2015 etwa 509.000 Sportler an einem Marathon teilgenommen und ihn erfolgreich beenden können (41). Körperliche Extrembelastung bringt jedoch nicht automatisch größeren gesundheitlichen Nutzen mit sich. Korrelationen der Intensität von Lauftraining mit der Mortalität zeigten, dass sich die geringste Mortalität in der Gruppe derer findet, welche 1,0 - 2,4h/ Woche Lauftraining absolvierten (44). Bei jenen Sportlern, welche mehr trainierten, fand sich im Vergleich eine signifikant höhere Mortalität entsprechend derer, die nicht joggten (44).

Die zugrundeliegenden Mechanismen der möglicherweise negativen Auswirkungen von extremer sportlicher Aktivität sind nur unzureichend verstanden und mögen auf hämodynamische, vasokonstriktive, prothrombotische und proinflammatorische Prozesse zurückzuführen sein. Nach einem Marathonlauf zeigte sich ein Anstieg von Inflammationsmarkern (CRP, Leukozyten) sowie einer Thrombozytenaktivierung, begleitet von einer erhöhten Fibrinolyseaktivität (49). Am Folgetag nach einem Marathon ist jedoch eine selektive Persistenz der prokoagulatorischen Aktivität beschrieben worden (49). Diese lässt auf eine mögliche sekundäre hämodynamische Imbalance schließen, welche wiederum kardiovaskuläre Ereignisse nach ausgedehnter körperlicher Aktivität begünstigen könnte.

Im Rahmen eines Ultramarathons über 308 km zeigte sich „Soluble Vascular Cell Adhesion Molecule-1“ (sVCAM-1) als Surrogat Parameter einer endothelialen Dysfunktion sowie Leukozyten und CRP-Wert erhöht (28). Hierzu passend zeigten sich auch weitere humorale Inflammationsmarker wie IL-6 und Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF-alpha) nach Marathon erhöht (4). In einer weiteren Studie konnte die Inflammationsintensität positiv mit einer Ausschüttung von Troponin T, einem myokardialen Nekrosemarker korreliert werden (42). Eine Übersichtsarbeit hingegen beschreibt Troponin-Anstiege nach körperlicher Aktivität mit einer ausgedehnten Schwankungsbreite zwischen 0-100%. Durch körperliche Aktivität kommt es weiterhin zu einer vermehrten Ausschüttung endothelialer MP, unter denen insbesondere CD62E-positive endotheliale MP über proangiogenes Potential verfügen (31). Passend hierzu zeigte sich nach Höhenttraining, dass ein erhöhter Uptake endothelialer Mikropartikel in vitro mit reduzierten apoptotischen Prozessen einherging (56). Bereits ein kurzfristiger Rückgang der alltäglichen körperlichen Aktivität hatte einen Anstieg von apoptotischen endothelialen Mikropartikeln zur Folge, jedoch bei unveränderten aktivierten endothelialen Mikropartikeln (8). Ebenso führte ein durch körperliches Training hervorgerufener Anstieg von endothelialen Progenitorzellen zu antiapoptotischen Effekten (33). Passend hierzu konnte gezeigt werden, dass sich - sowohl im Mausmodell als auch bei Athleten - körperliche Aktivität über die Regulation Telomer-stabilisierender Proteine protektiv gegenüber stress-induzierter vaskulärer Apoptose erweist (59, 60).

Diese und andere Ergebnisse lassen vermuten, dass durch körperliche Aktivität zelluläre Veränderungen vermittelt werden, welche sich sowohl als protektiv als auch als schädlich für das kardiovaskuläre System erweisen können.

2.4. Fragestellung der Arbeit

Ziel der Studie war es, zu untersuchen, ob und in welcher Weise ein Marathonlauf die Freisetzung zirkulierender Mikropartikel verändert. Hierzu wurden folgende Populationen von MP analysiert:

- EMP, apoptotische EMP, aktivierte EMP
- PMP, apoptotische PMP, aktivierte PMP
- MMP, LMP

Diese werden in Blutproben von 99 Marathonläufern zu den Zeitpunkten vor („vor“), unmittelbar nach („nach“) und innerhalb von 2 Tagen nach dem Marathon untersucht. Hauptaugenmerk liegt dabei auf Veränderungen der endothelialen MP, welche Rückschlüsse auf Auswirkungen des Marathonlaufes auf das Gefäßendothel zulassen könnten.

3. Material und Methoden

3.1. Studiendesign und Studienkollektiv

Die „Berlin Beat of Running“ Studie ist eine prospektive, observierende, Untersucher-initiierte Studie, welche vom Zentrum für Schlaganfallforschung Berlin, Charité Berlin in Zusammenarbeit mit der Klinik für Kardiologie, Charité (Campus Virchow-Klinikum) und dem medizinischen Institut „SMS Sports Medicine Berlin“ des 38. BMW Berlin-Marathon durchgeführt wurde. Das „Berlin Beat of Running“ Studienprotokoll (21) ist in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki und wurde von der lokalen Ethikkommission freigegeben (Nummer des Ethikvotums: EA4/042/11). Die Rekrutierung der Athleten wurde durch die SCC EVENTS GmbH (Sporting Club Charlottenburg, SCC) unterstützt.

Studienkollektiv sind 99 der insgesamt rund 42.000 Teilnehmer des 38. BMW Berlin-Marathons 2011, welche im Rahmen der prospektiven Observationsstudie „Berlin Beat of Running“ rekrutiert wurden. Für die Studie wurden registrierte Teilnehmer des Marathons ausgewählt, welche zwischen 35 und 60 Jahren alt waren, mindestens 2 Marathons innerhalb der letzten 5 Jahre gelaufen sind, pro Woche mindestens 40 km Lauftraining absolvierten und am Tag der Registrierung einen Sinusrhythmus hatten. Ausschlusskriterien für die Studie waren bekannte kardiale Vorerkrankungen oder Arrhythmien, Zustand nach Schlaganfall, eine transitorisch-ischämische Attacke in der Vorgeschichte, Hirntumoren oder infektiösen Krankheiten welche das Gehirn beeinflussen, sowie akute Hirninfarkte oder andere Pathologien welche bei der Eingangsuntersuchung inklusive einer kraniellen Magnetresonanztomographie (cMRT) detektiert wurden. Zusätzlich wurden Teilnehmer mit Kontraindikationen für eine MRT-Untersuchung, schwerer Leber- oder Niereninsuffizienz, Hyperthyreose, Schwangere und Stillende aus der Studie ausgeschlossen (21).

Die erste Untersuchung der Probanden („vor“) wurde 3 Tage vor dem Termin des Marathons durchgeführt. Hier wurden zunächst die soziodemographischen Daten, die Prävalenz kardiovaskulärer Risikofaktoren und die Art des physischen Trainings der

Läufer erfasst (Tabelle 3-1). Anschließend wurden die Herzfrequenz und der Blutdruck als Vitalparameter erhoben (Tabelle 3-1) und eine venöse Blutuntersuchung (Tabelle 3-2) durchgeführt (21).

Am Tag des Marathons folgte innerhalb von 30 Minuten nach Beendigung des Laufs („nach“) eine zweite venöse Blutentnahme, die Vitalparameter wurden erneut erhoben (21).

Innerhalb von zwei Tagen nach dem Marathon wurde die dritte venöse Blutentnahme durchgeführt und die Vitalparameter wurden ein letztes Mal erhoben (21).

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden uns mitsamt dem Serum der Probanden für die MP-Analyse von der Arbeitsgruppe aus Berlin zur Verfügung gestellt und von Herm et al. 2017 publiziert (23).

Vor	Nach	2 Tage
Venöse Blutuntersuchung	Venöse Blutuntersuchung	Venöse Blutuntersuchung
Vitalparameter	Vitalparameter	Vitalparameter
Soziodemographische Daten		
Trainingsgewohnheiten		

Tabelle 3-1: Untersuchungen, welche bei den Probanden zu den drei Zeitpunkten vor („vor“), ≤ 30 Minuten nach („nach“) und innerhalb von 2 Tagen („2 Tage“) nach dem Marathonlauf durchgeführt wurden.

3.2. Geräte, Chemikalien und Computer-Software

3.2.1. Verwendete Geräte

Name	Hersteller
Computer:	
MacPro 5,1	Apple, Kalifornien (USA)
Aspire X3900	Acer, Neu-Taipeh, Republik China
Autoklav:	
LVSA 50/60	Zirbus Technology GmbH, Bad Grund/ Harz
Durchflusszytometer BD FACSCalibur™	BD Biosciences, Heidelberg
Eismaschine	ZIEGRA Eismaschinen GmbH, Isernhagen
Kühlschrank Liebherr Economy	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riss
Gefrierschränke	
-80 C, SLIMVIP Insulation 830 L	Skadi Europe, Niederlande
Magnetrührer RCT	Jahnke & Kunkel GmbH & Co. KG, IKA® Labortechnik, Staufen im Breisgau
pH-mV-Meter, pH 526	WTW, Weilheim
Pipetten Eppendorf Research®	Eppendorf AG, Hamburg
0,5-10 µl	
10-100 µl	
100-1000 µl	
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	Sartorius AG, Göttingen
CS Series 200g	OHAUS Europe GmbH, Schweiz
Zentrifugen	
Megafuge 1.0	Heraeus instruments GmbH, Osterode am Harz
Megafuge 1.0R	Thermo Electron Corporation, Osterode am Harz
Sigma Laborzentrifuge 1K15	SIGMA Laborzentrifugen GmbH, Osterode amHarz

Tabelle 3-2: Verwendete Laborgeräte.

3.2.2. Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
Calciumchloriddihydrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck KGaA, Darmstadt
Flächendesinfektionsmittel antifect®	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	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck KGaA, Darmstadt
Wasser vollentsalzt und destilliert (Aqua dest.)	Aus der hauseigenen Anlage
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

Tabelle 3-3: verwendete Chemikalien und Reagenzien.

3.2.3. Lösungen

Lösung	Binding 10-fach konzentriert		Phosphat buffered Saline 1-fach konzentriert	
	Substanz	Menge	Substanz	Menge
	Hepes	1,19 g	NaCl	8,0 g
	Aqua dest.	35 ml	KCl	0,2 g
	NaOH	bis pH = 7,4	KH ₂ PO ₄	0,24 g
	NaCl	4,091 g	Na ₂ HPO ₄	1,44 g
	CaCl * 2 H ₂ O	0,183 g	Aqua dest.	900 ml
	Aqua dest.	Bis 50 ml auffüllen		
Vorgehen	steril filtrieren, Aufbewahrung bei 4°C.		pH 7,2 mit KOH einstellen, auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen, anschließend autoklavieren, Aufbewahrung bei Raumtemperatur.	

Tabelle 3-4: Verwendete Lösungen und Vorgehen zum Ansatz dieser (46).

3.2.4. Fluoreszierende Antikörper

Antikörper-bezeichnung	Markierte Zellen	Spezies	Hersteller
CD144 ≙ VE-Cadherin (vascular endothelial cadherin)	Endothelzellen (Adhäsionsmolekül)	Kaninchen	Acris Antibodies, Herford
CD62E ≙ E-Selektin, endothelial leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1)	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, retikuläre dendritische Zellen,	Maus	BD Biosciences, Heidelberg

	interfollikuläre Makrophagen und Langerhans Zellen		
Annexin V	erfasst Phosphatidylserin, ein sensitiver Marker für apoptotische Zellen	rekombinant	BD Biosciences, Heidelberg

Tabelle 3-5: Verwendete fluoreszierende Antikörper mit Beschreibung des angefärbten Zelltypus, der Spezies des Tieres von welchem die Antikörper stammen sowie des Herstellers.

3.2.5. Computer-Software

Bezeichnung	Hersteller
Microsoft® Office Excel 2010	Microsoft Corporation, Redmond, Washington (USA)
Microsoft® Office Word 2010	Microsoft Corporation, Redmond, Washington (USA)
Microsoft® Office PowerPoint® 2010	Microsoft Corporation, Redmond, Washington (USA)
Microsoft® Windows 7 Paint®	Microsoft Corporation, Redmond, Washington (USA)
Cellquest™ Pro vers. 6,0	BD Biosciences, Heidelberg
IBM SPSS Statistics 23	IBM, New York (USA)
GraphPad Prism 7	GraphPad Software, Kalifornien (USA)
Colwiz Desktop	Colwiz Ltd., Irland

Tabelle 3-6: Verwendete Computer-Software.

3.2.6. Verbrauchsmittel

Bezeichnung	Hersteller
BD FACST TM BD FACS Flow Sheath Fluid	BD Biosciences, Heidelberg
BD FACS TM BD FACS Clean Solution BD FACS Rinse Solution	BD Biosciences, Heidelberg
BD Falcon TM Round-Bottom Tube, 5 ml Greiner centrifuge tubes, 50 ml Greiner centrifuge tubes, 15 ml	BD Biosciences, Heidelberg Merck KGaA, Darmstadt Merck KGaA, Darmstadt
Eis	Aus eigener Produktion
SafeSeal Gefäß, 1,5 ml	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
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 Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
VWR Light-Duty Tissue Wipers	VWR, USA
Softasept [®] N, Hautdesinfektion	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Transferpipetten, 3 ml	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht
Venofix [®] Safety, G21	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
S-Monovette [®] Kalium-EDTA Natrium-Citrat	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht

Tabelle 3-7: Für Laborarbeiten und Blutentnahme verwendete Verbrauchsmittel.

3.3. Durchflusszytometrie

Die Zytometrie beschreibt einen Prozess, bei welchem physikalische und chemische Eigenschaften von Zellen oder kleineren Partikeln mithilfe eines sogenannten „Zytometers“ analysiert werden. Bei der Durchflusszytometrie erfolgt diese Analyse während die zu messenden Partikel das Durchflusszytometer in einem Flüssigkeitsstrom mit hoher Geschwindigkeit durchfließen und einen Laserstrahl passieren (47). Diese Technik findet sowohl in der Forschung als auch in der klinischen Medizin vielfache Anwendung.

Für die Durchführung der Experimente dieser Dissertationsarbeit wurde die „FACS“-Analyse verwandt. FACS bedeutet „fluorescence-activated cell sorting“ und ist eine geschützte Handelsmarke der amerikanischen Medizintechnik-Firma Becton, Dickinson and Company (BD Co). Die Besonderheit der FACS-Analyse besteht darin, dass die zu analysierende Suspension mit fluoreszierenden Antikörpern inkubiert wird und so hinsichtlich unterschiedlicher Fraktionen von Partikeln analysiert werden kann und diese schließlich noch sortiert werden können (5). Für die Experimente der vorliegenden Arbeit wurde das FACS-Gerät allerdings lediglich in seiner Funktion als Durchflusszytometer verwandt.

Die Funktionsweise eines Durchflusszytometers beruht auf einem dreiteiligen System bestehend aus einem optischen, elektrischen und Flüssigkeits-System. Der Flüssigkeitsapparat dient der Aufnahme des Probenmaterials und führt dieses in einem laminaren Flüssigkeitsstrom dem optischen System zur Analyse zu. Dazu wird die Probe von einer schnell fließenden Trägerflüssigkeit (z.B. BDFacsFlow) umgeben, welche die Probe beschleunigt und den Probenfluss gebündelt durch die Messkammer, die „Durchflusszelle“, transportiert. Dieses Prinzip wird als „hydrodynamische Fokussierung“ bezeichnet und ermöglicht, dass immer nur ein Partikel den Laserstrahl passiert (Abbildung 3-1). Dabei hängt die Breite des Probenflusses von dem Druck ab, unter dem die Probe steht. Ein höherer Probedruck verbreitert den Probenfluss während ein niedriger ihn schmälert und so eine genauere Messung zulässt. Für die vorliegende Arbeit wurde ein niedriger Probenfluss gewählt.

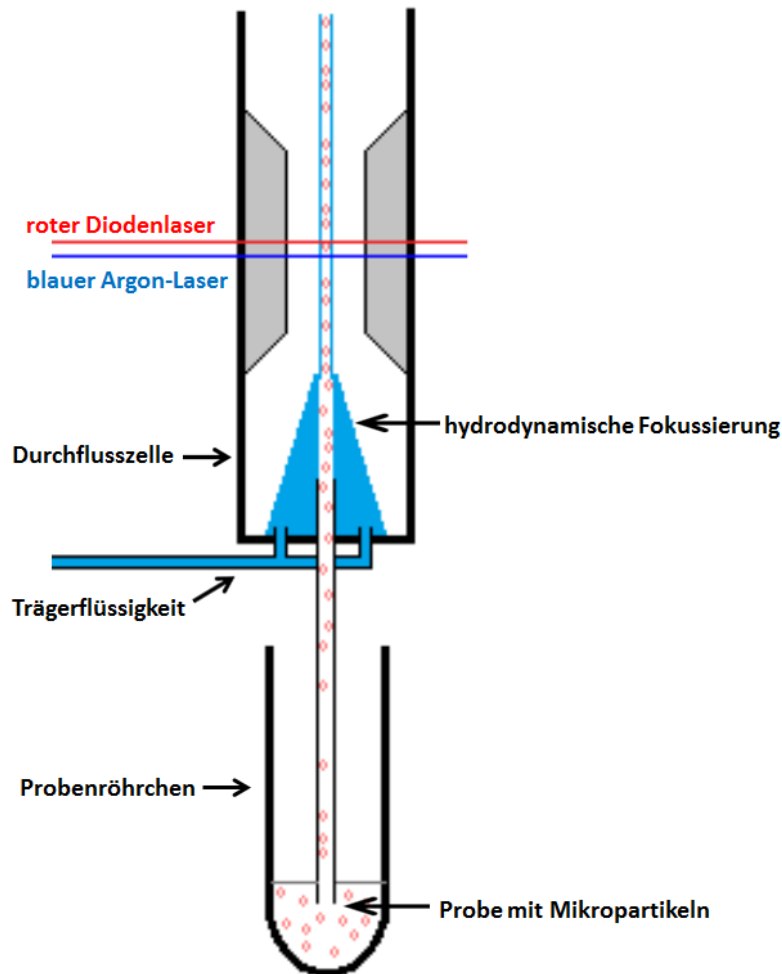


Abbildung 3-1: Flüssigkeits-System eines Durchflusszytometers mit hydrodynamischer Fokussierung der Mikropartikel. Modifiziert nach Givan AL (ed) 2001 Flow cytometry: first principles. 2nd edition, Hoboken, New Jersey (20).

Das optische System besteht bei dem in der vorliegenden Arbeit verwandten System BDFACSCalibur™ aus zwei Lasern, welche die Partikel in der Suspension anstrahlen, sowie Detektoren, die das dabei entstehende Streulicht erfassen. Dabei ist der erste Laser ein blauer Argon-Ionen Laser, welcher Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm emittiert, während der zweite, rote Dioden Laser auf eine Wellenlänge von 635 nm eingestellt ist. Bei der Analyse wird unter zwei Arten des Streulichts unterschieden. Das „Vorwärtsstreulicht“ (FSC, Forward Scatter) dient der Analyse der Zelloberfläche und der Zellgröße und ist proportional zu dieser. Das „Seitwärtsstreulicht“ (SSC, Side Scatter) im 90° Winkel zum einfallenden Lichtstrahl detektiert und dient der Analyse der Granularität der Partikel. Jedoch wird vom optischen System nicht nur die

Lichtstreuung detektiert, da es zusätzlich auch in der Lage ist, Fluoreszenzen der gemessenen Partikel zu erfassen. Hierfür besitzt das FACSCalibur™ 4 Fluoreszenz-Detektoren für grüne, gelbe, orangene und rote Fluoreszenzen. Mithilfe von mit Fluorchromen markierten Antikörpern ist es dadurch möglich, bestimmte Oberflächenmoleküle der zu analysierenden Partikel gezielt anzufärben und so zu untersuchen. Da sich die Emissionsspektren der einzelnen Fluorchrome teilweise überlappen, werden sie gleichzeitig von mehreren Detektoren erfasst. Um einer Mehrfacherfassung entgegenzuwirken, führt das Gerät eine Kompensation durch, so dass ein Farbstoff von nur einem Detektor gemessen wird.

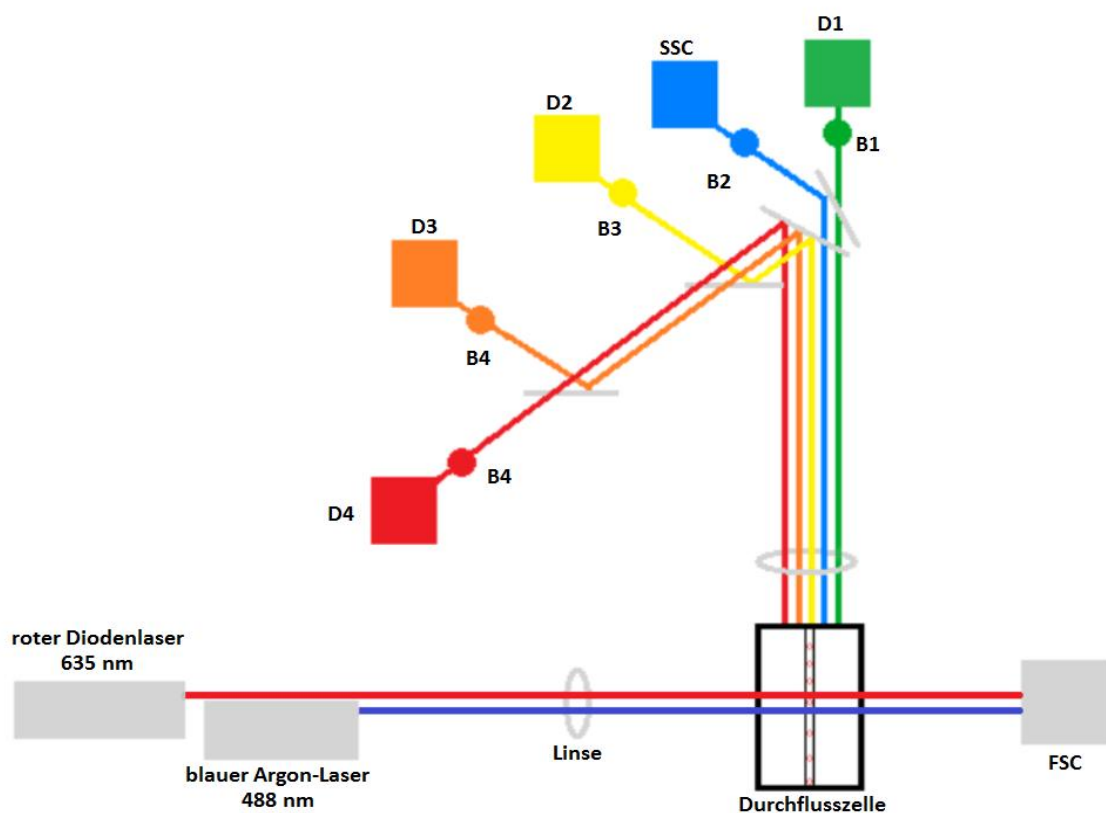


Abbildung 3-2: Optisches System eines Durchflusszytometers. Licht wird durch einen blauen (488 nm) und einen roten (635 nm) Laser emittiert, gebündelt und durch die Durchflusszelle gelenkt. Vorwärtsstreulicht wird durch den FSC-Detektor („FSC“), Seitwärtsstreulicht durch den SSC-Detektor („SSC“) registriert. Die farbigen Fluoreszenzen werden durch die Detektoren („D1“ bis „D4“) mit vorgeschaltetem Bandbreitenfilter („B1“ bis „B5“) aufgenommen. D1 detektiert dabei grüne, D2 gelbe, D3 orangene und D4 rote Fluoreszenzen. Modifiziert Givan AL (ed) 2001 Flow cytometry: first principles. 2nd edition, Hoboken, New Jersey (20).

Passieren Partikel nun im Flüssigkeitsstrom den Laser, streuen sie das Licht und emittieren fluoreszierende Strahlung. Diese wird von den jeweiligen Detektoren erfasst und in einen äquivalenten elektrischen Strom umgewandelt. Dieser Strom wird von einem Verstärker linear oder logarithmisch verstärkt und in einen Spannungspuls umgewandelt, welcher dann digital verarbeitet wird. Die dabei gewonnenen Daten können dann in Form eines Punktwolkendiagramms oder Histogramms graphisch dargestellt und schließlich ausgewertet werden. Aus den dabei entstehenden Punktwolkendiagrammen können dann durch das Erstellen so genannter „Gates“ einzelne Populationen von Partikeln markiert werden, welche näher analysiert werden sollen (Abbildung 3-3) (20, 36, 47).

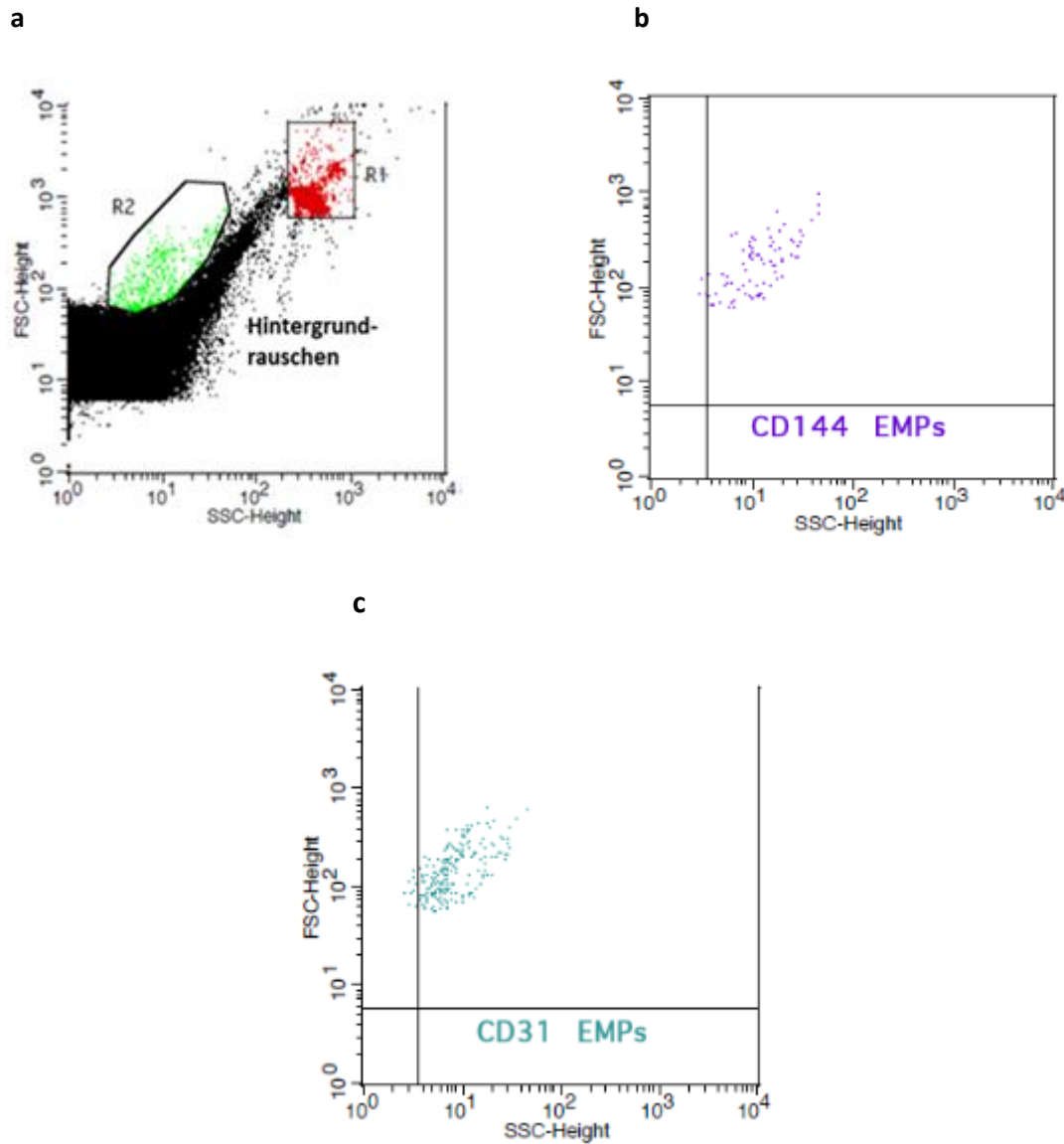


Abbildung 3-3: Repräsentative FACS Punktwolkendiagramme. Aus EDTA-Plasma isolierte MP wurden mittels Durchflusszytometrie nach Versuchsprotokoll analysiert. (a) Mikropartikel (grüne Punkte) und Kalibrationspartikel (rote Punkte, je 3 μm), welche im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht (FSC und SSC) detektiert wurden. R2: MP (Größe 0,1-1 μm) planimetrisch nacherfasst und logarithmisch aufgetragen. (b, c) Repräsentative Punktwolkendiagramme von (b) CD144⁺Annexin⁺ bzw. CD31⁺Annexin⁺ (c) endothelialen MP im Plasma.

3.4. Untersuchte Mikropartikel-Populationen

MP tragen unterschiedliche Oberflächenmarker in Abhängigkeit von ihrer Herkunft und des Zustandes der Mutterzelle. Dieser Umstand wurde in der vorliegenden Dissertation genutzt, um die einzelnen MP-Fraktionen zu analysieren. Für die Differenzierung der MP von anderen Zellfragmenten ähnlicher Größe spielt ihre Fähigkeit, Annexin V zu binden, eine zentrale Rolle, welche in der Literatur jedoch zum Teil kontrovers diskutiert wird. So beschreibt eine Arbeitsgruppe 35-fach höhere Zahlen von Annexin V negativen MP im Vergleich zu Annexin V positiven MP (25),(11). Andere Arbeiten beschreiben Annexin V als Markerprotein für die Gesamtheit der MP und als wichtiges Unterscheidungsmerkmal der MP zum Hintergrundrauschen der Durchflusszytometrie (14). In der vorliegenden Arbeit wurden nur Annexin V positive MP untersucht.

Die Zuordnung von EMP gelingt mithilfe des Oberflächenmarkers CD144 („vascular-endothelial cadherin“). Dieser wird ausschließlich von Endothelzellen exprimiert und ist somit ein potenter Marker für die endotheliale Herkunft der MP (54). Darüber hinaus lässt sich anhand der konstitutiven Oberflächenmarker CD31 und CD62E eine Aussage über den Aktivierungszustand der Mutterzelle treffen. CD31 findet sich dabei vermehrt auf apoptotischen EMP während CD62E mehr auf aktivierten EMP nachweisbar ist (29). CD31 ist jedoch kein endothelspezifischer Oberflächenmarker und wird zusätzlich auch von Thrombozyten und Leukozyten exprimiert (12). In der vorliegenden Studie wurden demnach CD144⁺Annexin V⁺ EMP als Gesamtheit der EMP interpretiert. Zusätzlich wurden die Populationen von CD31⁺Annexin V⁺, apoptotischen und CD62E⁺Annexin V⁺, aktivierten EMP analysiert.

PMP wurden anhand des Vorhandenseins von Glykoprotein Gplb (CD42b) und P-Selektin (CD62P) erfasst. Dabei ist CD62P ein Marker für die Aktivierung der Thrombozyten (30), während CD42b vorwiegend auf apoptotischen PMP zu finden ist (27). Die analysierten Populationen waren demnach CD42b⁺Annexin V⁺, apoptotische und CD62P⁺Annexin V⁺, aktivierte PMP.

Monozytäre MP wurden anhand des Oberflächenmarkers CD14, die MP leukozytären Ursprungs durch einen Antikörper für CD45 erkannt (24). Untersuchte Populationen waren somit CD45⁺Annexin V⁺ LMP und CD14⁺Annexin V⁺ MMP.

3.5. Versuchsprotokoll

Die FACS Analyse der aus Berlin bereitgestellten Blutproben erfolgt nach einem arbeitsgruppeninternen und bereits in vorherigen Studien und Vorversuchen etablierten Protokoll (46, 57) (Tabelle 3-8). Das FACS-Gerät wurde nach der Einschalttroutine von BD Biosciences gestartet und nach Beendigung der Analyse nach der Ausschalttroutine ausgeschaltet. In regelmäßigen Abständen wurde eine Kalibrierung des Gerätes durchgeführt.

Am Analysetag wurde das plättchenreiche Plasma zunächst langsam auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde die Probe erneut bei 15.000 g für 2 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand abpipettiert, um plättchenarmes Plasma als Ausgangsmaterial für die Analyse zu gewinnen. In insgesamt 5 nachfolgend als „Tube“ (Tube 1-5) bezeichneten Rundbodenröhrchen wurden dann je 25 µl plättchenarmes Plasma pipettiert. In Tube 2-5 wurden von zwei verschiedenen Antikörpern (PE und FITC) je 2 µl hinzugefügt während Tube 1 als Isotypenkontrolle frei von Antikörpern blieb. Eine gute Durchmischung wurde durch Vortexen der Tubes erreicht.

Nach der Zugabe von Antikörpern folgt eine erste Inkubationszeit im Dunkeln für 60 min bei 4 Grad Celsius. Nach Ablauf dieser ersten Inkubationszeit wurden allen Tubes je 25 µl Binding Buffer hinzugefügt. Tube 2-4 wurde zusätzlich je 2,5 µl AnnexinV beigefügt. Nach ausgiebigem Vortexen folgte dann eine zweite Inkubationszeit im Dunkeln von 15 min bei Raumtemperatur (RT).

Nach Ablauf dieser zweiten Inkubationszeit wurden den Proben unmittelbar vor der Messung noch 300 µl Binding Buffer hinzugefügt. Zusätzlich dazu wurden 4 µl einer

Lösung von Latex Beads zugefügt, welche vorher im Verhältnis von 1:95 mit PBS verdünnt wurden. Nach Sicherstellung einer guten Durchmischung mittels Vortexen wurden die Proben innerhalb von 60 Minuten der FACS Analyse zugeführt (46).

Tube	1	2	3	4	5
	(Isotypen- kontrolle)				
Plättchen- armes Plasma	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl
Antikörper	-	2 µl CD144 FITC 2 µl CD31 PE	2 µl CD62E FITC 2 µl CD31 PE	2 µl CD14 FITC 2 µl CD45 PE	2 µl CD62P FITC 2 µl CD42b PE
Inkubations- zeit	60 min, 4°C	60 min, 4°C	60 min, 4°C	60 min, 4°C	60 min, 4°C
Binding Buffer	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl
Antikörper	-	2,5 µl Annexin V APC	2,5 µl Annexin V APC	2,5 µl Annexin V APC	2,5 µl Annexin V APC
Inkubations- zeit	15 min, Raumtemper atur (RT)	15 min, RT	15 min, RT	15 min, RT	15 min, RT
Binding Buffer	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl
Latex Beads	4 µl	4 µl	4 µl	4 µl	4 µl
FACS-Analyse innerhalb von 60 Minuten					

Tabelle 3-8: Protokoll der Aufbereitung der Proben im zeitlichen Ablauf von oben nach unten (46).

Um tagesabhängigen Schwankungen vorzubeugen, wurden die drei Proben eines Probanden immer am selben Tag gemessen. Die Auswertung der Messergebnisse

erfolgte zu einem beliebigen Zeitpunkt.

3.5.1. Ausnahmen

Einige der aus Berlin bereitgestellten Proben (n=9) wiesen ein sehr geringes Probenvolumen auf (<125 µl). Nach Zentrifugation und abpipettieren des Überstandes verblieb zu wenig Material, um jeweils 25 µl plättchenarmes Plasma auf 5 Tubes aufteilen zu können. Bei diesen Proben wurden entsprechend der zur Verfügung stehenden Menge jeweils alle Volumina halbiert (n=6) oder gedrittelt (n=3), um die Analyse durchzuführen.

3.6. Statistik

Kontinuierliche Variablen wurden mit dem Kolmogorov-Smirnov und Shapiro-Wilk Test auf Normalverteilung überprüft. MP, Monozyten und das hochsensitive Troponin T zeigten dabei keine Normalverteilung und wurden mittels des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang Test analysiert. Die anderen Laborparameter zeigten Normalverteilung und wurden mit dem Student T-Test analysiert. Korrelationsanalysen wurden mithilfe des Korrelationskoeffizienten und Spearmans Rangkorrelationskoeffizienten durchgeführt. Ein P-Wert von <0,05 wurde dabei als statistisch signifikant angenommen. Die Daten werden als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM) für MP-Messungen und als Mittelwert ± Standardabweichung (SD) für die restlichen Werte angegeben. Statistische Analysen werden mit IBM SPSS Statistics 23 durchgeführt und mit Hilfe von GraphPad Prism 7 graphisch illustriert.

4. Ergebnisse

4.1. Charakteristika der Probanden

Insgesamt wurden 110 Sportler in die Studie eingeschlossen. Ein Teilnehmer musste wegen des Befundes der initialen cMRT-Untersuchung aus der Studie ausgeschlossen werden. Insgesamt nahmen 109 (99,1%) der 110 Sportler an dem Marathon teil und 108 (98,2%) beendeten ihn erfolgreich. Wir erhielten Blutproben von allen drei Zeitpunkten der Entnahme von 99 Teilnehmern des Marathons. Die grundlegenden Charakteristika des Studienkollektivs sind in den Tabellen 4-1 und 4-2 dargestellt.

Die Teilnehmer waren $48,7 \pm 5,9$ Jahre alt, 22 % von ihnen sind weiblich. Vitalparameter wie Herzfrequenz ($61,4 \pm 8,2$ /Minute) sowie systolischer (128 ± 13 mmHg) und diastolischer Blutdruck (84 ± 8 mmHg) waren im Normalbereich. Die Teilnehmer waren normalgewichtig (Body Mass Index [BMI] $23,3 \pm 2,2$ kg/m²). 9,1% der Teilnehmer waren Hypertoniker, 3% hatten eine Hyperlipidämie, 7,1% waren zum Zeitpunkt des Marathons Raucher.

Die mittlere Laufzeit für den Marathon betrug $246,7 \pm 49,7$ Minuten. Die Zeit, welche für den Marathon benötigt wurde, korrelierte mit dem Alter ($r=0,339$, $p=0,001$), weiblichem Geschlecht ($r=0,347$, $p<0,0001$), Body Mass Index ($r=0,405$, $p<0,0001$), systolischem Blutdruck ($r=0,212$, $p=0,035$) und der Herzfrequenz ($r=0,273$, $p=0,006$) bei der Eingangsuntersuchung („vor“). Die Laufzeit korrelierte invers mit der aktuell ($r=-0,381$, $p<0,0001$) und regelmäßig ($r=-0,284$, $p=0,004$) gelaufenen Distanz pro Woche.

Charakteristika der Probanden	Gesamt (n = 99)
Alter & Geschlecht	
Alter (Jahre, Mittelwert \pm Standard Abweichung [SD])	48,7 \pm 5,9
Weibliches Geschlecht (%)	22
Kardiovaskuläre Risikofaktoren	
Hypertonie (%)	9,1
Diabetes mellitus (%)	0
Hyperlipidämie (%)	3,0
Herzinsuffizienz (%)	0
Koronare Herzkrankheit (%)	0
Aktuell Raucher (%)	7,1
Trainingszustand	
Marathonläufe insgesamt (Mittelwert \pm SD)	16,8 \pm 37,6
Marathonläufe in den letzten 5 Jahren (Mittelwert \pm SD)	7,6 \pm 6,9
Aktuell pro Woche gelaufene Distanz (km, Mittelwert \pm SD)	65,2 \pm 17,9
Regulär pro Woche gelaufene Distanz (km, Mittelwert \pm SD)	43,1 \pm 13,8

Tabelle 4-1: Charakteristika der Studienteilnehmer.

Laboruntersuchung vor dem Marathonlauf	Gesamt (n = 99)
Blutbild	
Erythrozyten ($10^{12}/l$, Mittelwert \pm SD)	4,68 \pm 0,30
Hämatokrit (% , Mittelwert \pm SD)	42,80 \pm 0,03
Hämoglobin (g/dl, Mittelwert \pm SD)	14,24 \pm 1,10
Leukozyten ($10^9/l$, Mittelwert \pm SD)	5,95 \pm 1,53
Thrombozyten ($10^9/l$, Mittelwert \pm SD)	239,53 \pm 45,80
Differenzialblutbild	
Lymphozyten ($10^9/l$, Mittelwert \pm SD)	1,84 \pm 0,55
Monozyten ($10^9/l$, Mittelwert \pm SD)	0,48 \pm 0,16
Weitere Parameter	
Troponin T (ng/ ml, Mittelwert \pm SD)	0,012 \pm 0,001
Harnstoff (mg/ dl, Mittelwert \pm SD)	31,88 \pm 7,92

Tabelle 4-2: Laboruntersuchung von venösem Blut 2 Tage vor dem Marathonlauf.

4.2. Vitalparameter

Der Blutdruck war nach dem Marathon gegenüber seinem Ausgangswert erniedrigt messbar ($128\pm 13,1 / 84\pm 8,4$ mmHg [“vor”] vs. $112\pm 22 / 71\pm 13$ mmHg [“nach”], $p < 0,0001$) und kehrte innerhalb der 2 Tage nach dem Marathon zu seinem Ausgangswert zurück ($127\pm 13 / 81\pm 9$ mmHg [“2 Tage”]). Die Herzfrequenz der Probanden blieb 2 Tage nach dem Marathon unverändert zu ihrem Ausgangswert ($61,4 \pm 8,2$ /min [“vor”] vs. $62,3 \pm 9,8$ /min [“2 Tage”]) (Tabelle 4-3).

	vor (n=99)	nach (n=99)	2 Tage (n=99)	p-Wert vor vs nach
Blutdruck (mmHg)	128±13 / 84±8	112±22 / 71± 13	127±13 / 81±9	0,0001
Herzfrequenz (Schläge/Minute)	61,4 ± 8,2	fehlen teilweise	62,3 ± 9,8	

Tabelle 4-3: Blutdruck und Herzfrequenz vor („vor“), ≤30 Minuten nach („nach“) und innerhalb von 2 Tagen („2 Tage“) nach dem Marathonlauf.

4.3. Laborparameter

4.3.1. Hochsensitives Troponin T

Das hochsensitive Troponin T erhöhte sich von seinem Ausgangswert von $0,012 \pm 0,001$ ng/ml [„vor“] um 164% auf $0,032 \pm 0,02$ ng/ml [„nach“] unmittelbar nach dem Lauf ($p < 0,0001$) und kehrte innerhalb der zwei Tage nach dem Marathon ($0,012$ ng/ml $\pm 0,003$ [“2 Tage“], “vor” vs. “2 Tage”, $p = 0,817$) zu seinem Ausgangswert zurück (Tabelle 4-2 und 4-4, Abbildung 4-1). Der Anstieg des Troponin T korrelierte nicht mit den MP-Zahlen.

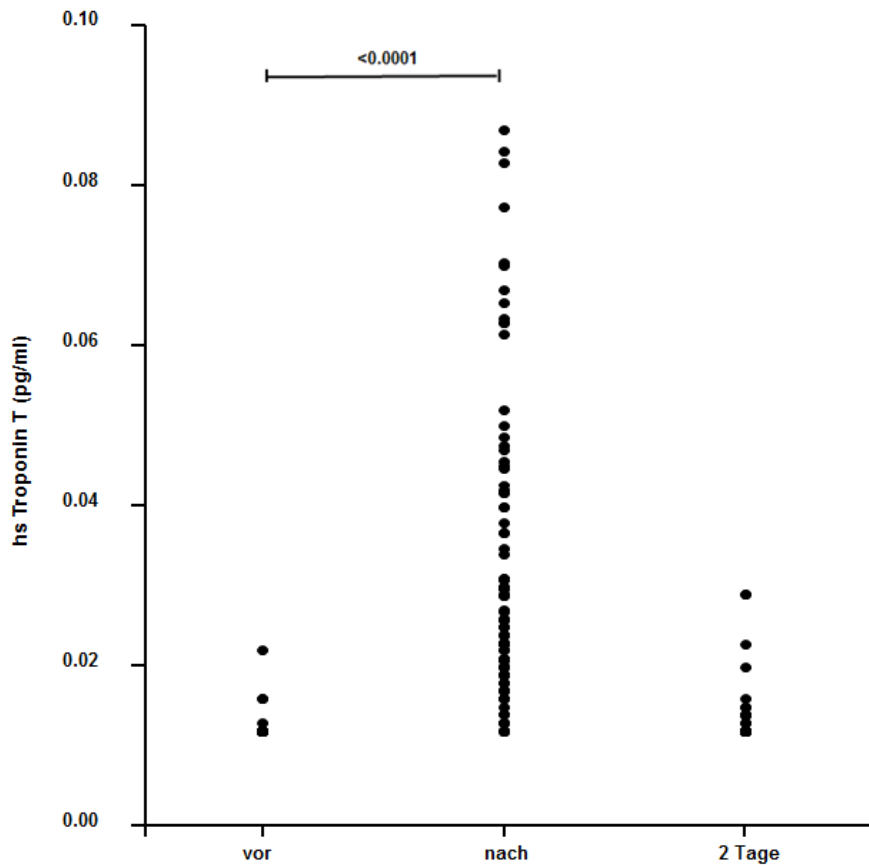


Abbildung 4-1: Quantifizierung des hs Troponin T vor, ≤ 30 Minuten nach und innerhalb von 2 Tagen nach dem Marathonlauf.

4.3.2. Harnstoff

Der Harnstoff stieg nach dem Marathon an und blieb innerhalb der 2 Tage nach dem Lauf oberhalb seines Ausgangswertes ($31,88 \pm 7,92$ mg/dl [“vor”], $38,80$ mg/dl $\pm 7,75$ [“nach”] und $36,12 \pm 8,34$ mg/dl [“2 Tage”]) (Tabelle 4-4).

4.3.3. Blutbild

Nach dem Marathonlauf war ein Anstieg der Leukozytenzahl um 151% ($5,95 \pm 1,53 \times 10^9/l$ [“vor”] vs. $14,82 \pm 3,29 \times 10^9/l$ [“nach”], $p < 0,0001$) messbar. Dabei zeigte sich neben einem Anstieg der Anzahl von Monozyten um 121% ($0,48 \pm 0,16 \times 10^9/l$ [“vor”] vs. $1,06 \pm 0,35 \times 10^9/l$ [“nach”], $p < 0,0001$) eine Erniedrigung der Lymphozytenzahl um 21% ($1,84 \pm 0,55 \times 10^9/l$ [“vor”] vs. $1,46 \pm 0,48 \times 10^9/l$ [“nach”], $p < 0,0001$). Innerhalb der 2 Tage nach dem Marathon kam es zu einem Absinken der Leukozytenwerte, welche jedoch oberhalb ihrer Ausgangswerte verblieben ($6,59 \pm 1,57 \times 10^9/l$ [“2 Tage”] vs. $5,95 \pm 1,53 \times 10^9/l$ [“vor”], $p < 0,0001$). Die Anzahl der Monozyten verhielt sich dem gegenüber synchron indem sie absank, jedoch über ihrem Ausgangswert verblieb ($0,58 \pm 0,29 \times 10^9/l$ [“2 Tage”] vs. $0,48 \pm 0,16 \times 10^9/l$ [“vor”], $p = 0,002$), dagegen stiegen die Lymphozyten in den 2 Tagen über ihren Ausgangswert an ($2,07 \pm 0,75 \times 10^9/l$ [“2 Tage”] vs. $1,84 \pm 0,55 \times 10^9/l$ [“vor”], $p = 0,006$) (Tabelle 4-4).

Der Marathonlauf induzierte zudem einen Anstieg der Thrombozytenanzahl um 17 % ($239,5 \pm 45,8 \times 10^9/l$ [“vor”] vs. $280,7 \pm 59,1 \times 10^9/l$ [“nach”], $p < 0,0001$). Ihre Anzahl sank 2 Tage nach dem Marathon unter ihren Ausgangswert ab ($235,4 \pm 42,6 \times 10^9/l$ [“2 Tage”] vs. $239,5 \pm 45,8 \times 10^9/l$ [“vor”], $p < 0,0001$) (Tabelle 4-4).

Die Anzahl von Erythrozyten wurde durch den Marathon nicht beeinflusst, sank jedoch 2 Tage nach dem Lauf leicht ab ($4,68 \pm 0,3 \times 10^{12}/l$ [“vor”] vs. $4,5 \pm 0,3 \times 10^{12}/l$ [“2 Tage”], $p < 0,001$). Die Erythrozyten Verteilungsbreite (RDW) blieb dabei unverändert. Auch fanden sich keine Veränderungen des Hämoglobins ($14,2 \pm 1,1 \text{ g/dl}$ [„vor“] vs. $14,5 \pm 2,0 \text{ g/ dl}$ [„nach“], $p = 0,117$) oder Hämatokrits ($42,8 \pm 0,03 \%$ [“vor”] vs. $42,0 \pm 1,0 \%$ [“nach”], $p = 0,577$) durch den Marathon (Tabelle 4-4).

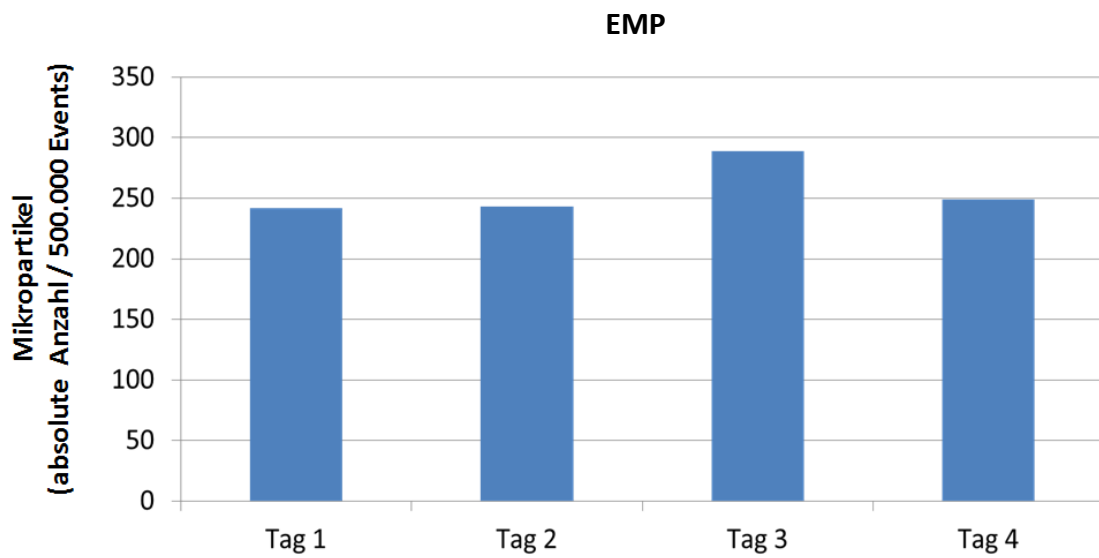
	vor (n=99)	nach (n=99)	2 Tage (n=99)	p-Wert vor vs nach
Hämoglobin (g/dl)	14,2 ± 1,1	14,5 ± 2,0	13,7 ± 1,0	0,117
Hämatokrit (%)	42,8 ± 0,03	42,0 ± 1,0	41,0 ± 0,0	0,577
Erythrozyten (10 ¹² /l)	4,68 ± 0,3	4,7 ± 0,7	4,5 ± 0,3	0,359
Thrombozyten (10 ⁹ /l)	239,5 ± 45,8	280,7 ± 59,1	235,4 ± 42,6	<0,0001
Leukozyten (10 ⁹ /l)	5,95 ± 1,53	14,82 ± 3,29	6,59 ± 1,57	<0,0001
Lymphozyten (10 ⁹ /l)	1,84 ± 0,55	1,46 ± 0,48	2,07 ± 0,75	<0,0001
Monozyten (10 ⁹ /l)	0,48 ± 0,16	1,06 ± 0,35	0,58 ± 0,29	<0,0001
Harnstoff (mg/dl)	31,88 ± 7,92	38,80 ± 7,75	36,12 ± 8,34	0,002
Troponin T (ng/ml)	0,012 ± 0,001	0,032 ± 0,02	0,01 ± 0,003	<0,0001

Tabelle 4-4: Blutbild sowie Serum Harnstoff und Troponin Werte vor („vor“), ≤30 Minuten nach („nach“) und innerhalb von 2 Tagen („2 Tage“) nach dem Marathonlauf.

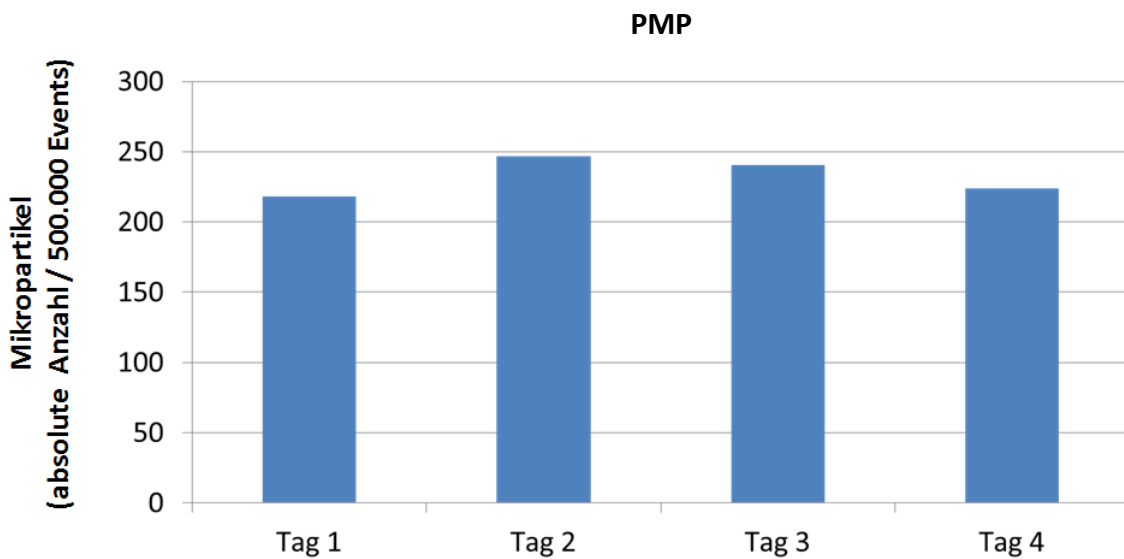
4.4 Mikropartikel

4.4.1. Stabilität der Mikropartikel-Messungen

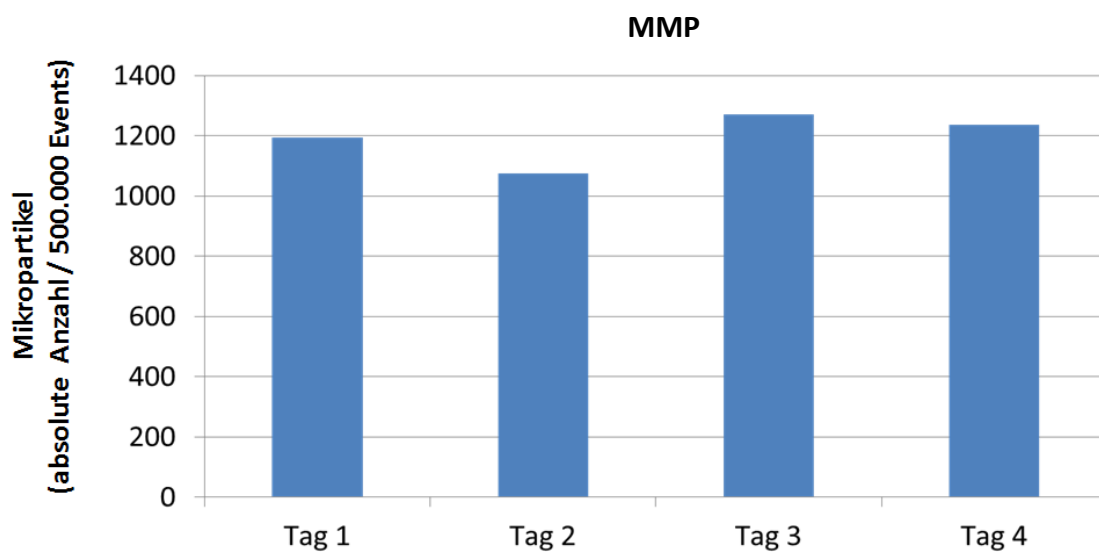
Um Schwankungen bei der MP-Quantifizierung insbesondere infolge des Gefrier- und Auftauprozesses auszuschließen, wurden zusätzlich FACS-Analysen einer sogenannten Nullprobe durchgeführt. Hierfür wurde das EDTA-Vollblut eines gesunden, männlichen Probanden nach vorgenanntem Protokoll aufbereitet. Die Mikropartikel-Profile der endothelialen, thrombozytären, leukozytären und monozytären MP zeigten sich hierbei an 4 aufeinander folgenden Messtagen als reproduzierbar und konstant (Abbildung 4-2).



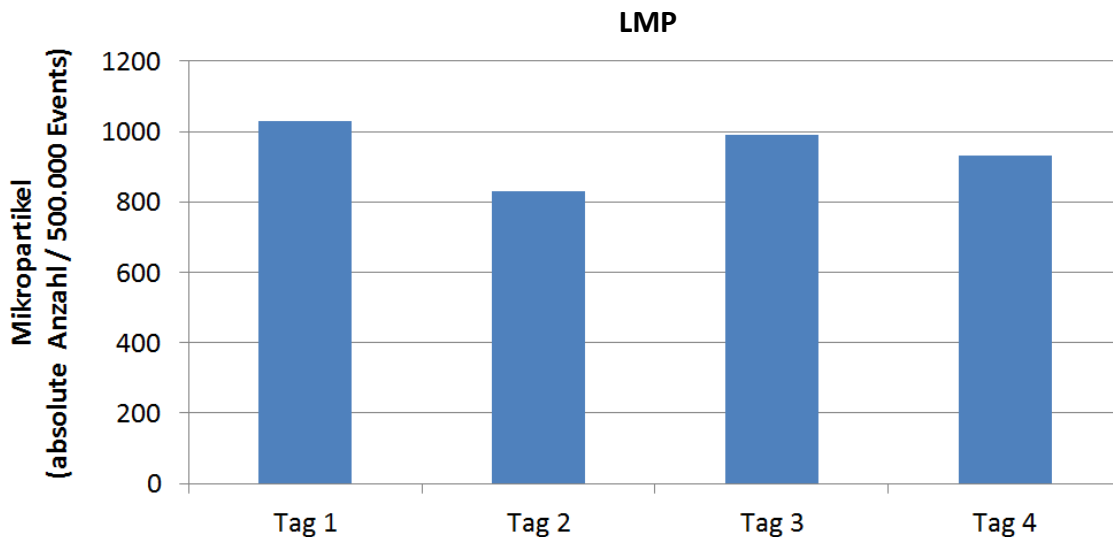
4-2 a



4-2 b



4-2 c



4-2 d

Abbildung 4-2: Stabile absolute Anzahl an Mikropartikeln / 500.000 Events von EMP (a), PMP (b), MMP (c) und LMP (d) bei FACS-Analyse des Plasmas eines gesunden, männlichen Probanden an vier aufeinander folgenden Tagen (Tag 1 bis Tag 4). Zwischen den einzelnen Messungen wurden die Proben erneut eingefroren und am folgenden Tag nach dem Studienprotokoll aufbereitet und analysiert.

4.4.2. Endotheliale Mikropartikel

CD144, CD31 und CD62E sind Markerproteine für endotheliale Mikropartikel (EMP). CD31 identifiziert dabei EMP apoptotischen und CD62E aktivierten Ursprungs. Die Gesamtzahl an CD144 positiven EMP war unmittelbar nach dem Lauf um 22,2% gegenüber dem Ausgangswert erhöht ($117,9 \pm 9,3$ pro 500.000 Events [„nach“] vs. $96,5 \pm 7,8$ [„vor“] pro 500.000 Events, $p=0,008$) (Abbildung 4-3). Insbesondere fand sich eine Erhöhung der apoptotischen, CD31 positiven EMP, welche unmittelbar nach dem Marathonlauf um 30% gegenüber dem Ausgangswert angestiegen waren ($182,1 \pm 13,1$ pro 500.000 Events [„nach“] vs. $140,1 \pm 8,0$ pro 500.000 Events [„vor“], $p=0,007$) (Abbildung 4-1). Im Gegensatz dazu blieben die CD62E positiven, aktivierten EMP

durch den Marathonlauf unverändert ($191,9 \pm 13,0$ pro 500.000 Events [„nach“] vs. $177,2 \pm 10,0$ pro 500.000 Events [„vor“], $p=0,194$) (Abbildung 4-3). Zwei Tage nach dem Marathonlauf waren die EMP-Spiegel wieder in den Messbereich des Ausgangswertes abgefallen ($110,4 \pm 9,4$ pro 500.000 Events [„2 Tage“]) (Abbildung 4-3). Die Anzahl der bisher gelaufenen Marathons der Probanden, nicht jedoch die aktuelle Laufzeit korrelierte dabei mit dem Anstieg der EMP nach dem Marathonlauf ($r=0,473$, $p=0,003$).

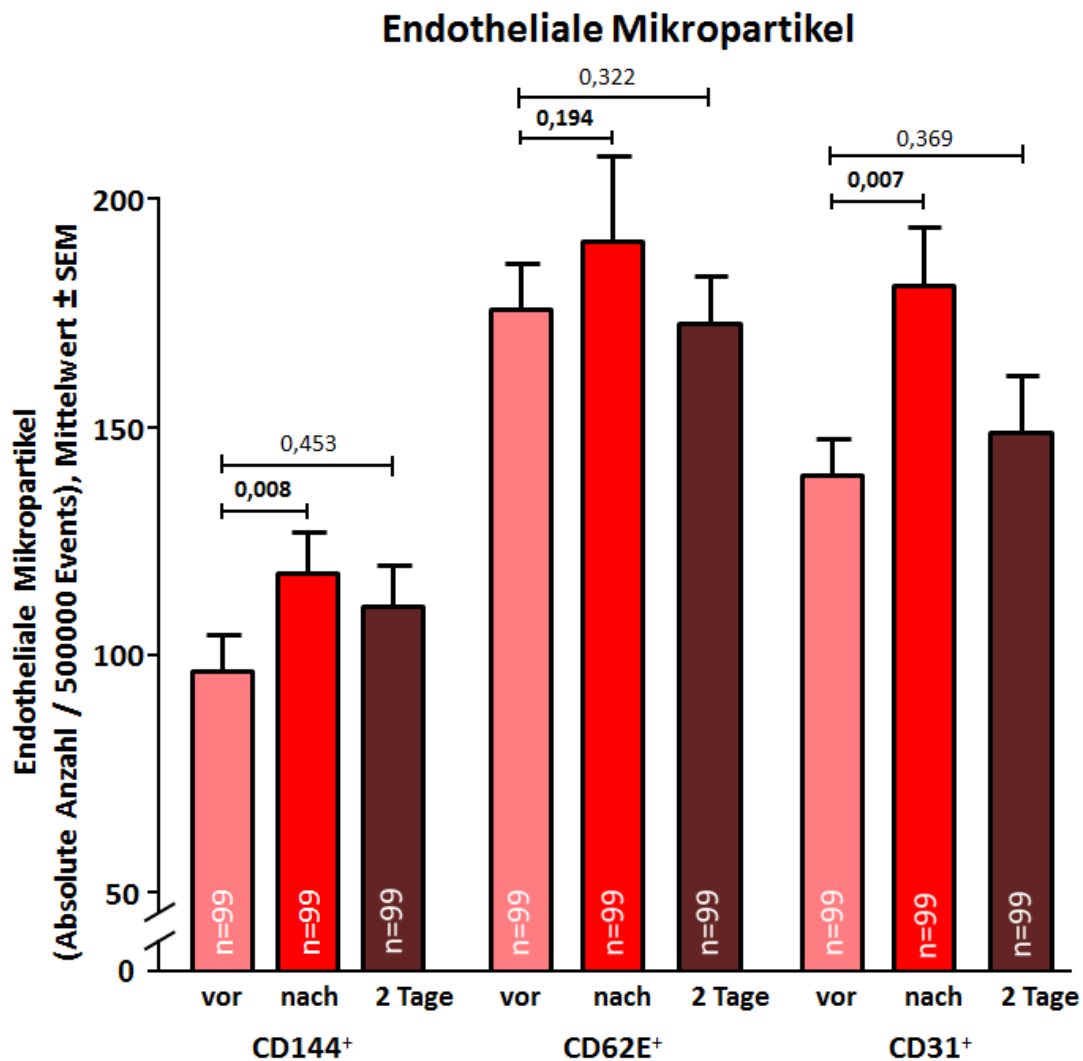


Abbildung 4-3: Änderungen der endothelialen Mikropartikel vor („vor“, hellrot), ≤ 30 Minuten nach („nach“, rot) und innerhalb von 2 Tagen („2 Tage“, dunkelrot) nach dem Marathonlauf. CD144 markiert spezifisch MP endothelialer Herkunft. CD62E markiert aktivierte, CD31 apoptotische, endotheliale MP. Angegeben sind die p-Werte der verschiedenen EMP Fraktionen im Vergleich „nach“ - „vor“ und „2 Tage“ - „vor“ dem Marathon.

4.4.3. Thrombozytäre Mikropartikel

CD42b und CD62P markieren thrombozytäre MP (PMP), wobei CD62P insbesondere aktivierte und CD42b vorwiegend apoptotische PMP identifiziert. Die PMP waren im Vergleich mit ihrem Ausgangswert durch den Marathonlauf um 38,4% (291 ± 22 pro 500.000 events [„nach“] vs. 210 ± 16 pro 500.000 Events [„vor“], $p < 0,0001$) erhöht messbar (Abbildung 4-4). Dies war einem Anstieg von sowohl aktivierten als auch apoptotischen PMP geschuldet (Abbildung 4-4). Dabei erhöhte sich der Spiegel von aktivierten PMP um 25,9% ($119,3 \pm 7,9$ pro 500.000 Events [„nach“] vs. $94,8 \pm 6,9$ pro 500.000 Events [„vor“], $p < 0,0001$), während der Spiegel von apoptotischen PMP um 48,6% ($171,5 \pm 15,1$ pro 500.000 Events [„nach“] vs. $115,4 \pm 8,8$ pro 500.000 Events [„vor“], $p < 0,0001$) anstieg. Die PMP sanken in den 2 Tagen nach dem Lauf wieder ab und näherten sich ihrem Ausgangswert an (Abbildung 4-4). Auch hier fand sich keine Korrelation zwischen PMP Anstieg und der Laufzeit, jedoch mit der Anzahl an insgesamt gelaufenen Marathons ($r=0,704$, $p < 0,0001$). Dies basierte auf einem Anstieg von aktivierten ($r=0,335$, $p < 0,003$) und apoptotischen ($r=0,632$, $p < 0,0001$) PMP. Die Anzahl von PMP korrelierte nicht mit der Gesamtzahl der Thrombozyten im Blut.

Thrombozytäre Mikropartikel

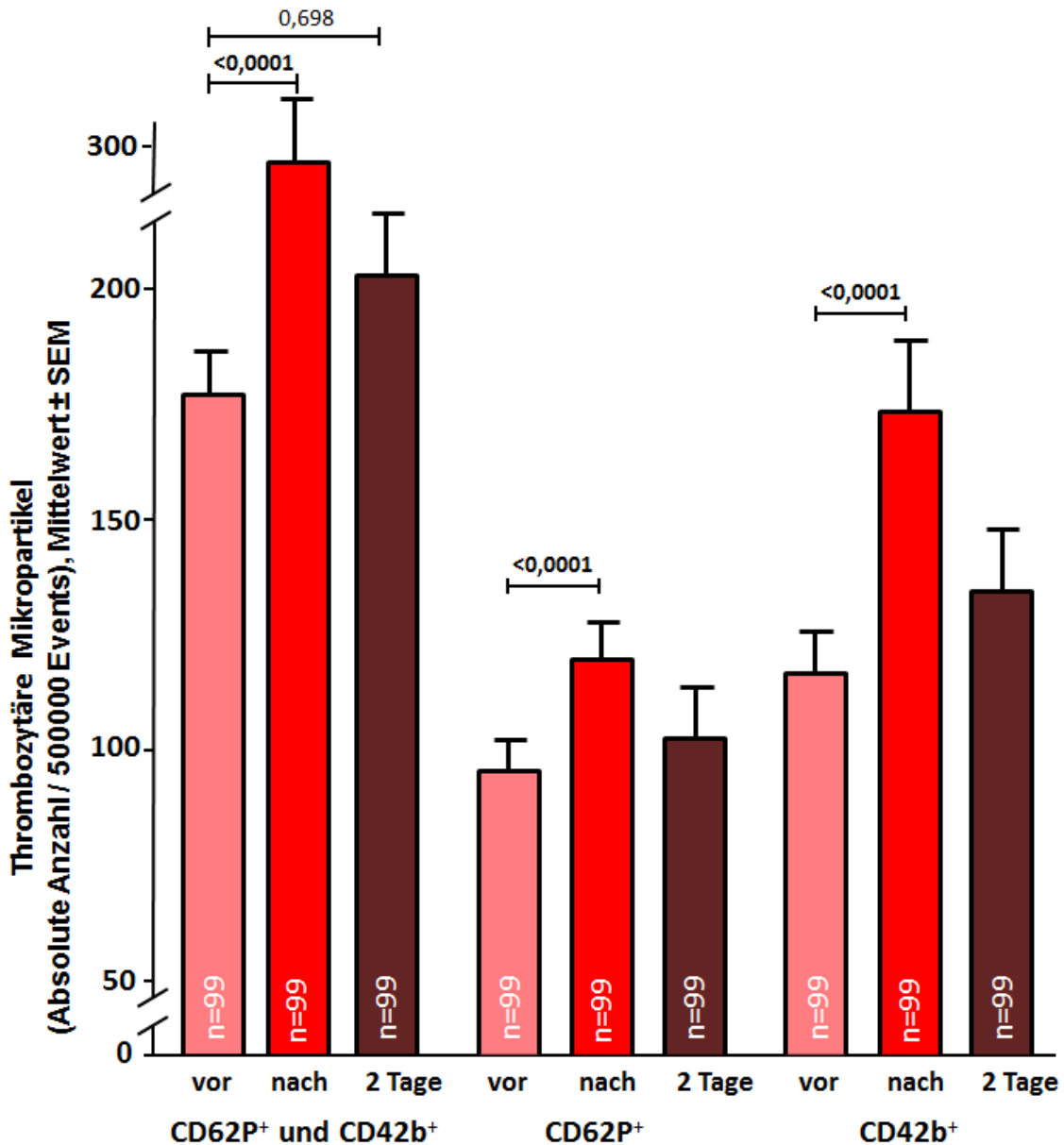


Abbildung 4-4: Änderungen der thrombozytären Mikropartikel vor („vor“, hellrot), ≤ 30 Minuten nach („nach“, rot) und innerhalb von 2 Tagen („2 Tage“, dunkelrot) nach dem Marathonlauf. CD62P und CD42b ordnet MP ihrer thrombozytären Herkunft zu. CD62P markiert aktivierte, CD42b apoptotische PMP. Angegeben sind die p-Werte der verschiedenen PMP Fraktionen im Vergleich „nach“ - „vor“ und „2 Tage“ - „vor“ dem Marathon.

4.4.4. Monozytäre und leukozytäre Mikropartikel

MP monozytären Ursprungs (MMP) wurden mit CD14, MP leukozytären Ursprungs (LMP) mit CD45 markiert. Verglichen mit ihrem Ausgangswert sank sowohl die Gesamtzahl der MMP ($2227,3 \pm 198,4$ pro 500.000 Events [“nach”] vs. $3736,4 \pm 293,0$ pro 500.000 Events [“vor”], $p < 0,0001$) als auch der LMP ($1678,9 \pm 184,4$ per 500.000 Events [“nach”] vs. $2680,5 \pm 223,0$ pro 500.000 Events [“vor”], $p < 0,0001$) um 40,4% (MMP) und 37,4% (LMP) unmittelbar nach dem Marathonlauf ab (Abbildung 4-5). Auch in den nachfolgenden 2 Tagen verblieben sie unterhalb ihres Ausgangswertes ($2680,5 \pm 269,3$ pro 500.000 Events [“2 Tage”], $p = 0,003$ für MMP, $1914,8 \pm 201,5$ pro 500.000 Events [“2 Tage”], $p = 0,008$ für LMP) (Abbildung 4-5). Sowohl LMP- als auch MMP-Anzahl 2 Tage nach dem Marathon („2 Tage“) korrelierten mit der Leukozytenzahl zum Zeitpunkt „2 Tage“ (MMP: $r = 0,224$, $p = 0,027$, LMP: $r = 0,239$, $p = 0,018$), nicht jedoch mit der Monozytenzahl. Der Anstieg des hochsensitiven Troponin T („vor“ vs. „nach“) korrelierte mit der Anzahl von MMP vor dem Marathon ($r = 0,217$, $p = 0,031$).

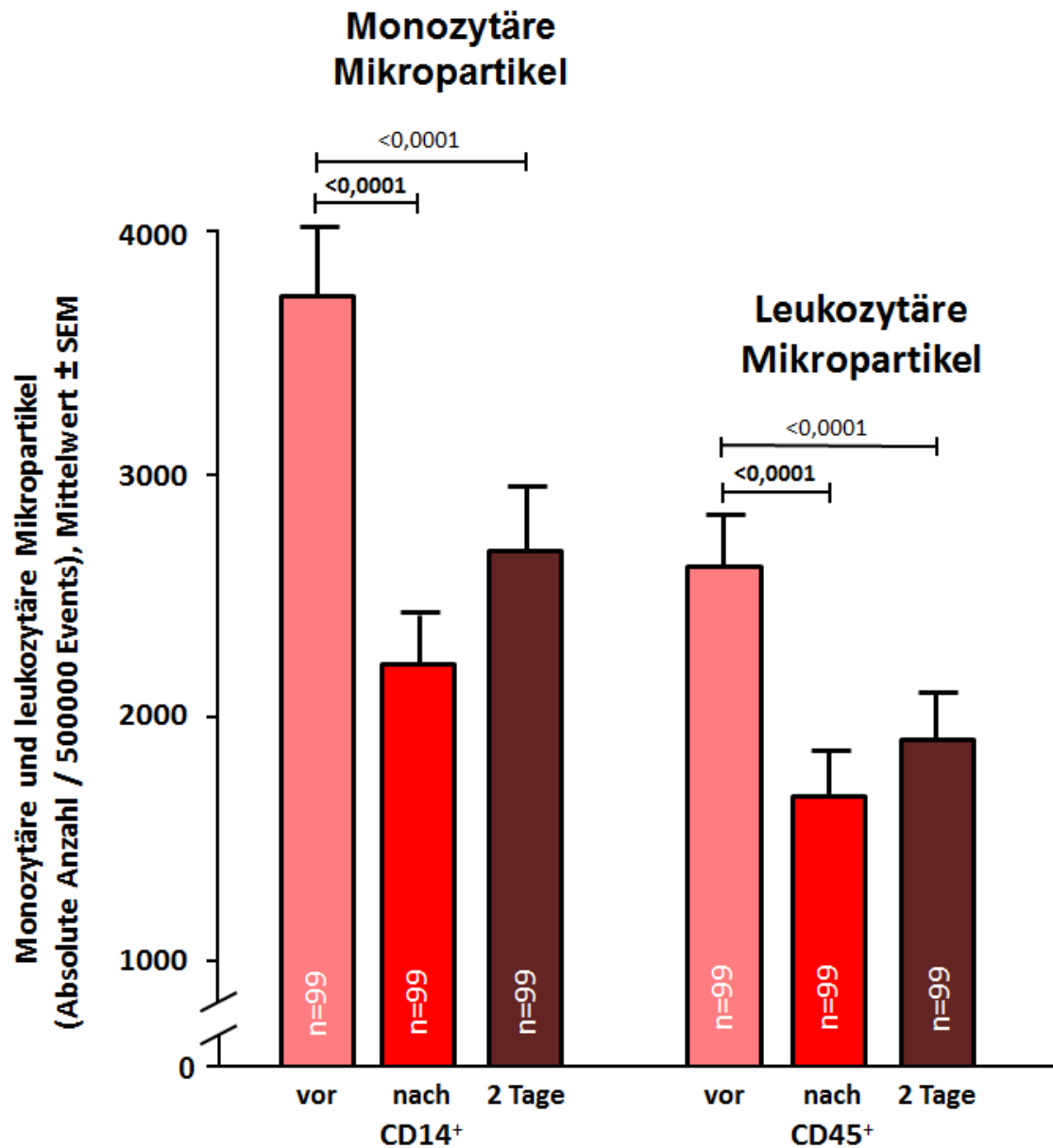


Abbildung 4-5: Änderungen der monozytären und leukozytären Mikropartikel vor („vor“, hellrot), ≤ 30 Minuten nach („nach“, rot) und innerhalb von 2 Tagen („2 Tage“, dunkelrot) nach dem Marathonlauf. CD14 ordnet MP ihrer monozytären, CD45 ihrer leukozytären Herkunft zu. Angegeben sind die p-Werte von MMP und LMP im Vergleich „nach“ - „vor“ und „2 Tage“ - „vor“ dem Marathon.

4.5 Kardiovaskuläre Risikofaktoren und Mikropartikel

Aktuelles Rauchen der Probanden korrelierte invers mit dem Ausgangswert von EMP ($r=-0,297$, $p=0,003$), sowie dem EMP-Wert unmittelbar nach dem Marathonlauf ($r=-0,241$, $p=0,016$). Dieselbe inverse Korrelation fand sich mit dem Ausgangswert der PMP ($r=-0,24$, $p=0,017$), jedoch nicht mit dem PMP-Wert zum Zeitpunkt „nach“. Hyperlipoproteinämie korrelierte invers mit den Ausgangswerten von MMP ($r=-0,235$, $p=0,019$) und LMP ($r=-0,212$, $p=0,035$). Hypertonie korrelierte nicht mit MP-Zahlen.

5. Diskussion

Unsere Daten zeigen erstmals, dass das Laufen eines Marathons Einfluss auf die Qualität und Quantität von zirkulierenden Mikropartikeln (MP) im peripheren Blut hat. Wir beobachteten einen Anstieg der endothelialen MP um 22,2% ($p=0,008$) und thrombozytären MP um 38,4% ($p<0,0001$) unmittelbar nach dem Lauf. Diese näherten sich nach zwei Tagen wieder dem Ausgangswert an. MP leukozytären und monozytären Ursprungs hingegen sanken unmittelbar nach dem Marathon ab und blieben auch zwei Tage nach dem Lauf unterhalb des Ausgangsniveaus. Parallel dazu kam es zu Veränderungen des Blutbildes mit einer Leukozytose sowie einem Anstieg von Thrombozyten- und Monozytenzahlen. Zudem konnte ein Anstieg des myokardialen Nekrosemarkers Troponin T beobachtet werden.

Die positiven Auswirkungen von Ausdauersport auf das kardiovaskuläre System sind vielseitig und gut dokumentiert. Sie spiegeln sich auch im für diese Dissertation untersuchten Kollektiv von 99 Probanden im Alter von 35 bis 60 Jahren wider. Bei ihnen zeigen sich eine normotensive Blutdrucksituation (Mittelwert: 128 ± 13 mmHg / 84 ± 8 mm Hg), eine niedrige Herzfrequenz (Mittelwert: $61,4 \pm 8,2$ /min) sowie ein normaler BMI (Mittelwert: $23,3 \pm 2,2$ kg/m²). Zwar zeigen Studien eine niedrigere Mortalität bei Probanden, welche wöchentlich ein moderates Lauftraining durchführen, jedoch auch eine ansteigende Mortalität in der Gruppe von häufiger trainierenden Probanden (44). Diese und andere Ergebnisse deuten an, dass körperliches Training zwar eine Reihe positiver Effekte auf die Gesundheit ausübt, übermäßige Belastungen jedoch als Stressor auf das kardiovaskuläre System wirken können. Höhere Belastungen führen jedoch insbesondere auch zu einer höheren Leistungsfähigkeit, welche sich in besseren sportlichen Ergebnissen manifestiert und deshalb von vielen Athleten angestrebt wird. Die in der vorliegenden Studie beobachtete inverse Korrelation zwischen Laufzeit während des Marathons und gelaufener Distanz pro Woche ist damit als erwartungsgemäß einzustufen.

Die einem möglichen negativen Effekt von intensivem Ausdauertraining auf das kardiovaskuläre System zugrundeliegenden Mechanismen sind derzeit noch unklar. Als

Modell einer sportlichen Extremlastung ist wiederholt der Marathonlauf untersucht worden. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich Biomarker hinweisend auf inflammatorische Prozesse und eine thrombophile Gerinnungssituation stark erhöhen (49). Der durch die Belastung ausgelöste Stress für den gesamten Organismus spiegelt sich in erhöhten Cortisolwerten nach dem Marathon wieder (13, 22). Die vorliegende Dissertationsarbeit untersucht ebenfalls das Modell des Marathonlaufs hinsichtlich eines neuen Biomarkers, den zirkulierenden MP. MP können als extrazelluläre Partikel mit einer Größe von 0,1 – 1,0 µm von allen Zellen mit Kontakt zum Blutsystem gebildet werden (7, 8, 24). Dabei beruht ihre Freisetzung auf Aktivierung, Apoptose oder Schädigung der Mutterzelle (26, 55). Mittels Antikörpermarkierung und FACS-Analyse lassen sich MP ihrer zellulären Herkunft nach zuordnen und zusätzlich nach dem Zustand ihrer Mutterzelle differenzieren.

5.1. Endotheliale Mikropartikel und Rückschlüsse auf mögliche kardiovaskuläre Auswirkungen

In unserer Studie finden sich nach dem Marathonlauf vermehrt EMP im peripheren Blut der Probanden. Die Zahl der EMP erhöhte sich um 22% unmittelbar nach dem Marathon. Zusätzlich wurden MP von aktivierten und apoptotischen Endothelzellen anhand der Oberflächenmoleküle CD62E und CD31 untersucht. Dabei zeigte sich bei den CD31 positiven, apoptotischen EMP ein Anstieg um 30%, während die Spiegel CD62E positiver, aktivierter EMP unverändert blieben. Eine Erhöhung der Spiegel endothelialer MP (EMP) tritt bei einer Reihe kardiovaskulärer Erkrankungen wie der KHK oder dem akuten Koronarsyndrom auf (40). In der Pathogenese dieser Erkrankungen spielt eine endotheliale Dysfunktion eine zentrale Rolle, weshalb die EMP als Biomarker für eine solche Schädigung der Endothelfunktion angesehen werden können. Unsere Ergebnisse könnten demnach Hinweis auf eine akute Schädigung von Endothelzellen durch die körperliche Extremlastung eines Marathons sein. Eine solche Schädigung ist dabei möglicherweise auf hämodynamische, vasokonstriktive, prothrombotische oder proinflammatorische

Prozesse zurückzuführen. Die Beobachtung, dass die Spiegel von aktivierten EMP unverändert blieben, deckt sich mit den Ergebnissen von Lansford et al. von 2015. Sie untersuchten unter anderem den Effekt einer definierten körperlichen Anstrengung auf zirkulierende, CD62E positive EMP. Dabei wurden keine signifikanten Änderungen in der gemischten Kohorte männlicher und weiblicher Probanden gefunden (31). Die Tatsache, dass die erhöhten Spiegel von EMP innerhalb von zwei Tagen nach dem Marathon wieder in den Messbereich ihres Ausgangswertes abfallen, könnte dafür sprechen, dass die mögliche, durch den Marathon induzierte endotheliale Schädigung transient und reversibel ist.

Die hohe Belastung für das kardiovaskuläre System durch einen Marathonlauf spiegelt sich zusätzlich auch in dem Anstieg des hochsensitiven Troponin T wieder. Dieses ist ein im Klinikalltag etablierter Parameter bei Verdacht auf ein akutes Koronarsyndrom, da die Erhöhung dieses Biomarkers einen Untergang von Herzmuskelzellen anzeigt. Sein Anstieg um 164% ($0,012 \pm 0,001$ ng/ml [„vor“] vs. $0,032 \pm 0,02$ ng/ml [„nach“], [$p < 0,0001$]) verdeutlicht, dass es auf myokardialer Ebene zu einer Schädigung von Zellen durch den Marathonlauf kommt. Dabei ließ sich allerdings keine Korrelation zwischen der Höhe des MP- und Troponin T-Anstieges ermitteln. Jedoch zeigten Herm et al. 2017, dass die Erhöhung des Troponins mit ST-Strecken Senkungen während des Marathons assoziiert ist (23). In der Berlin Beat of Running Study wurde bei 8 Teilnehmern eine relevante ST-Streckensenkung dokumentiert. Zusätzlich zeigten 10 Athleten in der Langzeit-EKG Untersuchung während des Marathons eine nicht anhaltende ventrikuläre Tachykardie (23). Auch diese Befunde verdeutlichen die hohe kardiovaskuläre Belastung während eines Marathons.

Da das Erbringen einer extremen körperlichen Leistung über einen längeren Zeitraum in großem Maße vom Trainingszustand des einzelnen Individuums abhängig ist, stellt sich die Frage, ob die gemessenen Effekte auf das kardiovaskuläre System ebenfalls von der Art und Dauer des regelmäßigen Trainings abhängig sind. Laufs et al. zeigten 2005 einen Anstieg von zirkulierenden, endothelialen Progenitorzellen in Abhängigkeit von der Dauer einer körperlichen Belastung (32). Diese Progenitorzellen werden mit einer verbesserten Gefäßfunktion assoziiert und könnten einen möglichen

Mechanismus der positiven Effekte von Ausdauertraining auf das kardiovaskuläre System darstellen. Dabei wurde die Intensität der Belastung anhand der individuellen anaeroben Schwelle quantifiziert. Probanden, welche eine intensive und eine moderate körperliche Anstrengung über 30 Minuten erbrachten, zeigten hier einen Anstieg der endothelialen Progenitorzellen im Blut (32). Jene, die dieselbe Belastung über 10 Minuten erbrachten, zeigten diesen Anstieg nicht (32). In der vorliegenden Studie zeigte sich eine positive Korrelation zwischen der Anzahl an absolvierten Marathonläufen und dem Anstieg der apoptotischen EMP durch den Marathonlauf, während keine Korrelation zur Laufzeit oder gelaufenen Distanz pro Woche zu finden war. Dies könnte darauf hindeuten, dass einzelne, wiederkehrende Extremlastungen für das Gefäßsystem, wie ein Marathonlauf, das Endothel so schädigen, dass es zu einer reduzierten Resistenz der Zellen hinsichtlich dieser Extremlastung kommt. Ein unterschiedlicher Trainingszustand der einzelnen Sportler scheint hier zunächst keinen Einfluss auf das Ausmaß einer potenziellen Endothelschädigung zu haben. Jedoch ist diesbezüglich eine Besonderheit des Studienkollektivs zu berücksichtigen. So war ein Einschlusskriterium für die Studie, mindestens zwei absolvierte Marathonläufe in den letzten fünf Jahren. Im Durchschnitt ist jeder Proband der Studie bereits knapp 17 (16.8 ± 37.6 SD) Marathons in seinem Leben gelaufen. Bei den hier untersuchten Sportlern handelt es sich also um überdurchschnittlich trainierte Athleten, welche die extreme Belastung eines Marathons schon mehrfach bewältigt haben. Es ist daher fraglich, ob in diesem Kollektiv von trainierten Sportlern ein relevanter Unterschied hinsichtlich des Trainingszustandes besteht. Ein Vergleich mit weniger erfahrenen Marathonläufern wäre hier aufschlussreich.

Der hiesigen Arbeitsgruppe gelang es mittels Analyse von MP, Endothelschädigung und Initiierung von Inflammationsprozessen infolge von Zigarettenrauchen zu aufzuzeigen (21). Dabei wurden allerdings nur die Auswirkungen von Rauchen bei Nichtrauchern untersucht. Im für diese Dissertation untersuchten Studienkollektiv zeigten sich jedoch signifikant niedrigere EMP-Ausgangswerte in der kleinen Gruppe der Raucher ($n=7$) als bei den Nichtrauchern. Dies könnte wiederum ein Indiz für eine mögliche Adaptation des Endothels an spezifische schädigende Reize sein.

Ein Marathonlauf stellt eine extreme Belastungssituation für das kardiovaskuläre System dar. Unsere Ergebnisse der Untersuchung des Einflusses eines Marathons auf endotheliale MP legen eine akute Schädigung von Endothelzellen nahe, welche jedoch als vorübergehend erscheint. Ausmaß, Beeinflussung und langfristige Auswirkungen einer solchen Schädigung sollten Gegenstand weiterer Forschung sein.

5.2. Thrombozytäre Mikropartikel

Durch den Marathon erhöhte sich die Anzahl von PMP in ihrer Gesamtheit um 38,4% im Vergleich zu ihrem Ausgangswert. Dabei fanden sich unmittelbar nach dem Marathon sowohl vermehrt aktivierte PMP, welche um 25,9% anstiegen, als auch apoptotische PMP, welche um 48,6% im Vergleich mit ihrem Ausgangswert anstiegen. Die Oberfläche der PMP hat durch negativ geladene Phospholipide, wie Phosphatidylserin, das Potenzial prokoagulatorische Wirkungen zu entfalten (55). Insbesondere die Kombination von erhöhter Thrombozytenzahl unmittelbar nach dem Marathon mit paralleler Freisetzung aktivierter PMP lässt auf eine vermehrte thrombozytäre Aktivität und damit auf eine hyperkoagulatorische Situation schließen. Diese Ergebnisse fügen sich in das Bild verfügbarer Daten bezüglich Veränderungen der Hämostase durch einen Marathonlauf ein. Siegel et al. zeigten 2001 neben einer Aktivierung von Thrombozyten einen Anstieg von D-Dimeren unmittelbar nach einem Marathonlauf. Parallel dazu kam es allerdings auch zu einer Zunahme der fibrinolytischen Aktivität. Bei Untersuchungen am darauf folgenden Morgen zeigte sich jedoch eine selektive Persistenz der prokoagulatorischen Aktivität, welche auf eine sekundäre Imbalance im Gerinnungssystem hinweist und das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse nach einer körperlichen Extrembelastung begünstigen könnte (49). Eine akute Schädigung des Endothels gepaart mit Hyperkoagulabilität des Blutes spricht für eine pro-thrombotische Situation ausgelöst durch das Laufen eines Marathons und kann so die Gefahr eines thrombotischen oder kardiovaskulären Ereignisses nach einem Marathon erhöhen.

Dieses Risiko wird möglicherweise noch erhöht, wenn Athleten eine längere Anreise zu dem Marathon auf sich nehmen müssen. Parker et al. untersuchten 2012 die Auswirkungen eines Marathons auf hämostasiologische Parameter. Dabei wurden Läufer des 114. Boston Marathon 2010 in Abhängigkeit davon aufgeteilt, ob sie eine mehr als vierstündige Anreise mit dem Flugzeug oder eine kürzer als zweistündige Anreise mit dem Auto auf sich nehmen mussten (39). Auch hier fanden sich erhöhte D-Dimer Spiegel in beiden Gruppen. Die Probanden mit der längeren Anreise per Flugzeug zeigten hier jedoch signifikant höhere Werte, wobei 6 der insgesamt 23 Probanden dieser Gruppe sogar Werte über 500 ng/ml zeigten (39). Dies ist die klinische Grenze zum Ausschluss einer Thrombose. Diese Ergebnisse lassen die Kombination zwischen dem Laufen eines Marathons mit einer längeren Anreise als problematisch erscheinen. Die von uns vermutete Endothelschädigung in Verbindung mit Hyperkoagulabilität und dem eventuellen gestörten Blutfluss in den Extremitäten während eines längeren Fluges erfüllt die Virchowsche Trias und damit drei ursächlichen Faktoren für die Entstehung einer Thrombose. Unseren Ergebnissen nach besteht diese hyperkoagulatorische Situation jedoch nur für einen begrenzten Zeitraum. Innerhalb von zwei Tagen nach dem Marathon sinken sowohl die Spiegel aktivierter und apoptotischer PMP als auch die Thrombozytenzahlen in den Bereich des bzw. unterhalb des Ausgangswertes ab.

Die Ergebnisse unserer Analyse von thrombozytären MP ergänzen die bisherige Forschung an Biomarkern für Thrombophilie nach einem Marathon um einen weiteren Aspekt. Dabei ist die erhöhte Zahl von PMP ein Indiz für eine pro-thrombotische Situation unmittelbar nach dem Laufen eines Marathons.

5.3. Monozytäre, leukozytäre Mikropartikel und Inflammation

Die MP monozytärer (MMP) und leukozytärer (LMP) Herkunft zeigten eine andere Dynamik als EMP und PMP. Die Zahlen monozytärer MP lagen unmittelbar nach dem Marathon 40,4% unter ihrem Ausgangswert während die MP leukozytärer Herkunft um 37,4% absanken. Sie verblieben auch innerhalb der zwei Tage nach dem Marathon

unterhalb ihres Ausgangswertes. Zusätzlich wird durch den Marathon eine akute Leukozytose mit Anstieg der Monozytenzahlen induziert, was einen Teil der unspezifischen Immunantwort auf einen schädigenden Reiz darstellen könnte. Das Absinken der Lymphozytenzahlen kann als Zeichen einer sterilen Inflammation verstanden werden, bei welcher eine spezifische Immunantwort benötigt wird. Diese Ergebnisse stimmen mit der Literatur überein, in welcher von einer Erhöhung von Inflammationsmarkern wie dem C-reaktiven Protein (CRP) oder der Leukozytenzahl nach einem Marathon berichtet wird (49). Zusätzlich zeigten Untersuchungen der Teilnehmer eines Ultramarathons über 308 km neben einer Erhöhung des auf eine endotheliale Dysfunktion hinweisenden Surrogatparameters „Soluble Vascular Cell Adhesion Molecule-1“ (sVCAM-1) ebenfalls erhöhte Leukozytenzahlen und CRP-Werte (44). Passend dazu wurden bei einer weiteren Untersuchung von Marathonläufern signifikant erhöhte Werte von humoralen Inflammationsmarkern wie IL-6 und Tumor Necrosis Factor-alpha dokumentiert (4). Zusätzlich konnte eine andere Studie, welche die Inflammationsmarker CRP, IL-6, die Gesamt-Leukozytenzahl sowie neutrophile Granulozyten und das Troponin T bei Marathonläufern untersuchte, eine Korrelation zwischen Intensität der ausgelösten Inflammation und Ausschüttung von Troponin T ermitteln (42). Trotz einer akuten Leukozytose sowie Anstieg des Troponin T Spiegels nach dem Marathon konnte in der vorliegenden Studie keine Korrelation zwischen diesen beiden Werten beobachtet werden. Die Veränderungen der Leukozytenzahlen sowie die weiteren genannten Ergebnisse mehrerer Arbeitsgruppen lassen ein durch den Marathon induziertes inflammatorisches Geschehen vermuten. Diese Vermutung wird durch den von uns festgestellten Anstieg von aktivierten und apoptotischen PMP gestützt, da in der Literatur vielfach die pro-inflammatorische Wirkung der PMP beschrieben wird. So fördern P-Selectin tragende PMP beispielsweise die Interaktion und Aggregation von Leukozyten untereinander (17) und die Adhäsion von Monozyten an das Gefäßendothel (1).

Das Absinken von MP monozytärer und leukozytärer Herkunft bei steigenden Zahlen von Monozyten und Leukozyten erscheint dabei jedoch paradox. Die Stimulation von Monozyten durch Lipopolysaccharide, wie sie auf der Oberfläche gramnegativer Bakterien vorkommen, führt zu einer vermehrten Freisetzung von MMP

unterschiedlicher Zusammensetzung (58). Dabei finden sich auf der Oberfläche dieser MMP unter anderem negativ geladene Moleküle mit prokoagulatorischen Eigenschaften, wie tissue factor oder Phosphatidylserin (43). Darüber hinaus konnten für die in dieser Situation freigesetzten MMP auch pro-inflammatorische Wirkungen nachgewiesen werden (58). Diese Ergebnisse beleuchten zwar die Rolle von MMP während einer Inflammation, jedoch setzen sie die Aktivierung von Monozyten durch Lipopolysaccharide, wie zum Beispiel ein bakterielles Endotoxin voraus. Bei der vermuteten Inflammation ausgelöst durch einen Marathonlauf handelt es sich jedoch um eine sterile Entzündungsreaktion, bei welcher das Auftreten bakterieller Antigene unwahrscheinlich ist.

Auch LMP werden pro-inflammatorische Wirkungen zugesprochen. Studien zeigen, dass Leukozyten nach einer Stimulation mit inflammatorischen Agonisten eine heterogene MP-Population freisetzen, welche auf Endothelzellen wirken können. Mit diesen MP inkubierte endotheliale Zellen reagierten unter anderem mit einer Ausschüttung der Entzündungsmediatoren IL-6 und IL-8 und einer vermehrten Expressierung von Zelladhäsionsmolekülen wie „Intercellular Adhesion Molecule 1“ (ICAM-1) (37). Eine andere mögliche Ursache für die akute Leukozytose nach dem Marathonlauf könnte ein, in der Literatur bereits beschriebener Anstieg des Stresshormons Cortisol sein (13, 22). Eine Arbeit beschreibt dabei beispielsweise die Anstiege von Cortisolspiegeln nach einem Marathon mit 211% (22). Shinkai et al. untersuchten 1996 den Einfluss eines Anstieges der Cortisolkonzentration nach einer körperlichen Belastung auf die Zahlen von Leukozyten im Blut (48). Dabei fand sich im Blut der Probanden, welche nach einer definierten Belastung mit einem Cortisolanstieg reagierten, wie auch im Blut derer, deren Cortisolwerte sich nicht veränderten, eine Granulozytose sowie eine Lymphozytose noch während der körperlichen Anstrengung (48). Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen bestand darin, dass die Probanden mit einem erhöhten Cortisolwert nach der Belastung Lymphopenie entwickelten während die Lymphozyten der übrigen Probanden zu ihrem Ausgangswert zurückkehrten (48). In der vorliegenden Studie wurde ebenfalls eine Granulozytose sowie ein Absinken der Lymphozytenzahlen nach dem Marathon beobachtet. Diese Ergebnisse ließen die Autoren der genannten Studie vermuten, dass

ein Anstieg des Cortisolspiegels nach einer körperlichen Belastung selektiv die Lymphozyten und weniger die Leukozyten in ihrer Gesamtheit beeinflusst (48).

Trotz der pro-inflammatorischen Wirkungen von sowohl MMP als auch LMP und dem in der vorliegenden Studie beobachteten Anstieg von Leukozyten und Monozyten kommt es jedoch zu einem Absinken der Anzahl der von ihnen freigesetzter Mikropartikel. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich bei MP-Messungen von Patienten mit einer signifikanten Stenose einer Koronararterie, bei welchen eine Dobutamin-Stress-Echokardiographie durchgeführt wurde. Im Blut dieser Probanden zeigten sich unmittelbar nach der kardiovaskulären Belastung verminderte Spiegel von EMP und MMP (51). Die Autoren dieser Studie konnten in vitro eine erhöhte Aufnahme von EMP durch endotheliale Zellen nach Inkubation mit dem Serum der untersuchten Probanden nachweisen und postulierten dies als mögliche Ursache für die Abnahme der EMP-Zahlen (51). Eine gesteigerte Aufnahme von MMP durch Endothelzellen konnte hierbei nicht nachgewiesen werden (51). Eine vermehrte Aufnahme der hoch bioaktiven MMP und LMP durch ihre Zielzellen wäre jedoch eine mögliche Erklärung für ihr Absinken unmittelbar nach dem Marathonlauf.

Die Zusammenschau der verfügbaren Literatur sowie die Veränderungen der im Rahmen dieser Dissertationsarbeit untersuchten Probanden lassen ein pro-inflammatorisches Milieu nach einem Marathonlauf vermuten. Die Rolle der MMP und LMP in dieser Situation sowie die genauen Gründe für das Absinken ihrer Gesamtzahl verbleiben Gegenstand zukünftiger Studien.

5.4. Limitationen der Studie

Die MP zeigten sich nach mehreren Gefrier- und Auftauprozessen als konstanter Parameter (Abbildung 3-4). Geringe Unterschiede konnten dennoch beobachtet werden und sind auch in der Literatur beschrieben (14). Um zu verhindern, dass geringfügige, tagesabhängige Schwankungen Einfluss auf die gemessenen

Unterschiede in den MP-Profilen nehmen, wurden alle drei Blutproben eines Probanden nach identischem Protokoll am selben Messtag analysiert.

Die Ergebnisse der FACS-Analysen wurden planimetrisch erfasst, wobei subjektive Unterschiede nicht restlos auszuschließen sind. Um interindividuelle Abweichungen zu vermeiden, wurden die FACS-Analysen sowie deren planimetrische Erfassung ausschließlich vom Autor der vorliegenden Dissertation durchgeführt.

5.5. Schlussfolgerung

Die Ergebnisse dieser Studie verdeutlichen, dass die körperliche Extremlast eines Marathons als Stressor auf das kardiovaskuläre System wirkt. Dabei sind die akuten Schädigungen auf endothelialer und myokardialer Ebene transient und reversibel. Zusätzlich besteht passager ein pro-thrombotisches und pro-inflammatorisches Milieu. Unsere Ergebnisse über die akut schädigenden Wirkungen des Marathons können jedoch keine Aussage über die langfristigen Auswirkungen auf die Gesundheit der Sportler treffen. Regelmäßiger Sport und Ausdauertraining verbleiben als wichtiger Bestandteil kardiovaskulärer Prävention. Die optimale „Dosis“ körperlichen Trainings zur Erreichung eines optimalen Effektes auf die kardiovaskuläre Prognose bleibt Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen.

6. Literaturverzeichnis

1. Barry OP, Praticò D, Savani RC, FitzGerald GA (1998) Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. *J Clin Invest.* 102: 136-144
2. Bernal-Mizrachi L, Jy W, Jimenez JJ, Pastor J, Mauro LM, Horstman LL, de Marchena E, Ahn YS (2003) High levels of circulating endothelial microparticles in patients with acute coronary syndromes. *Am Heart J.* 145: 962-970
3. Bernal-Mizrachi L, Jy W, Fierro C, Macdonough R, Velazques HA, Purow J, Jimenez JJ, Horstman LL, Ferreira A, de Marchena E, Ahn YS (2004) Endothelial microparticles correlate with high-risk angiographic lesions in acute coronary syndromes. *Int J Cardiol.* 97: 439-446
4. Bernecker C, Scherr J, Schinner S, Braun S, Scherbaum WA, Halle M (2013) Evidence for an exercise induced increase of tnf- α and il-6 in marathon runners. *Scand J Med Sci Sports.* 23: 207-214
5. Bonner WA, Hulett HR, Sweet RG, Herzenberg LA (1972) Fluorescence activated cell sorting. *Rev Sci Instrum.* 43: 404-409
6. Boulanger CM, Scoazec A, Ebrahimian T, Henry P, Mathieu E, Tedgui A, Mallat Z (2001) Circulating microparticles from patients with myocardial infarction cause endothelial dysfunction. *Circulation.* 104: 2649-2652
7. Boulanger CM, Amabile N, Guérin AP, Pannier B, Leroyer AS, Mallat CN, Tedgui A, London GM (2007) In vivo shear stress determines circulating levels of endothelial microparticles in end-stage renal disease. *Hypertension.* 49:902-908
8. Boyle LJ, Credeur DP, Jenkins NT, Padilla J, Leidy HJ, Thyfault JP, Fadel PJ (2013) Impact of reduced daily physical activity on conduit artery flow-mediated dilation and circulating endothelial microparticles. *J Appl Physiol* (1985). 115:1519-1525
9. Burnier L, Fontana P, Kwak BR, Angelillo-Scherrer A (2009) Cell-derived microparticles in haemostasis and vascular medicine. *Thromb Haemost.* 101:439-451
10. Cocucci E, Meldolesi J (2015) Ectosomes and exosomes: shedding the confusion

- between extracellular vesicles. *Trends Cell Biol.* 25: 364-372
11. Connor DE, Exner T, Ma DD, Joseph JE (2010) The majority of circulating platelet-derived microparticles fail to bind annexin V, lack phospholipid-dependent procoagulant activity and demonstrate greater expression of glycoprotein Ib. *Thromb Haemost.* 103: 1044-1052
 12. DeLisser HM, Newman PJ, Albelda SM (1994) Molecular and functional aspects of pcam-1/cd31. *Immunol Today.* 15: 490-495
 13. Dessypris A, Kuoppasalmi K, Adlercreutz H (1976) Plasma cortisol, testosterone, androstenedione and luteinizing hormone (lh) in a non-competitive marathon run. *J Steroid Biochem.* 7: 33-37
 14. Dey-Hazra E, Hertel B, Kirsch T, Woywodt A, Lovric S, Haller H, Haubitz M, 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
 15. Diamant M, Tushuizen ME, Sturk A, Nieuwland R (2004) Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease? *Eur J Clin Investig.* 34:392-401
 16. Dignat-George F, Boulanger CM (2011) The many faces of endothelial microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 31:27-33
 17. Forlow SB, McEver RP, Nollert MU (2000) Leukocyte-leukocyte interactions mediated by platelet microparticles under flow. *Blood* 95: 1317-1323
 18. Fox JE, Austin CD, Reynolds CC, Steffen PK (1991) Evidence that agonist-induced activation of calpain causes the shedding of procoagulant-containing microvesicles from the membrane of aggregating platelets. *J Biol Chem.* 266: 13289-13295
 19. George JN, Thoi LL, McManus LM, Blood TR-, 1982. 1982. Isolation of human platelet membrane microparticles from plasma and serum
 20. Givan AL (ed) 2001 *Flow cytometry: first principles*. 2nd edition, Hoboken, New Jersey
 21. Haeusler KG, Herm J, Kunze C, Krüll M, Brechtel L, Lock J, Hohenhaus M, Heuschmann PU, Fiebach JB, Haverkamp W, Endres M, Jungehulsing GJ (2012) Rate of cardiac arrhythmias and silent brain lesions in experienced marathon runners: rationale, design and baseline data of the berlin beat of running study.

22. Hale RW, Kosasa T, Krieger J, Pepper S (1983) A marathon: the immediate effect on female runners' luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, prolactin, testosterone, and cortisol levels. *Am J Obstet Gynecol.* 146: 550-556
23. Herm J, Töpper A, Wutzler A, Kunze C, Krüll M, Brechtel L, Lock J, Fiebach JB, Heuschmann PU, Haverkamp W, Endres M, Jungehulsing GJ, Haeusler KG (2017) Frequency of exercise-induced ST-T-segment deviations and cardiac arrhythmias in recreational endurance athletes during a marathon race: results of the prospective observational Berlin Beat of Running study. *BMJ Open.* 7(8):e015798
24. Horstman LL, Jy W, Jimenez JJ, Bidot C, Ahn YS (2004) New horizons in the analysis of circulating cell-derived microparticles. *Keio J Med.* 53:210-30
25. Horstman LL, Jy W, Jimenez JJ, Ahn YS (2004) Endothelial microparticles as markers of endothelial dysfunction. *Front Biosci.* 9: 1118-1135
26. Hugel B, Martínez MC, Kunzelmann C, Freyssinet JM (2005) Membrane microparticles: two sides of the coin. *Physiology (Bethesda).* 20:22-27
27. van Ierssel SH, Van Craenenbroeck EM, Conraads VM, Van Tendeloo VF, Vrints CJ, Jorens PG, Hoymans VY (2010) Flow cytometric detection of endothelial microparticles (emp): effects of centrifugation and storage alter with the phenotype studied. *Thromb Res.* 125: 332-33927
28. Jee H, Park J, Oh JG, Lee YH, Shin KA, Kim YJ (2013) Effect of a prolonged endurance marathon on vascular endothelial and inflammation markers in runners with exercise-induced hypertension. *Am J Phys Med & Rehabil.* 92:513-522
29. Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, Soderland C, Horstman LL, Ahn YS (2003) Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis. *Thromb Res.* 109: 175-180
30. Jy W, Horstman LL, Park H, Mao WW, Valant P, Ahn YS (1998) Platelet aggregates as markers of platelet activation: characterization of flow cytometric method suitable for clinical applications. *Am J Hematol.* 57: 33-42
31. Lansford KA, Shill DD, Dicks AB, Marshburn MP, Southern WM, Jenkins NT (2016) Effect of acute exercise on circulating angiogenic cell and microparticle

- populations. *Exp Physiol.* 101:155-167
32. Laufs U, Urhausen A, Werner N, Scharhag J, Heitz A, Kissner G, Böhm M, Kindermann W, Nickenig G (2005) Running exercise of different duration and intensity: effect on endothelial progenitor cells in healthy subjects. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 12:407-414
 33. Laufs U, Werner N, Link A, Endres M, Wassmann S, Jürgens K, Miche E, Böhm M, Nickenig G (2004) Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation.* 109:220-226
 34. Leroyer AS, Anfosso F, Lacroix R, Sabatier F, Simoncini S, Njock SM, Jourde N, Brunet P, Camoin-Jau L, Sampol J, Dignat-George F (2010) Endothelial-derived microparticles: biological conveyors at the crossroad of inflammation, thrombosis and angiogenesis. *Thromb Haemost.* 104: 456-463
 35. Mause SF, Weber C (2010) Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circ Res.* 107: 1047-1057
 36. Melamed MR, Lindmo T, Mendelsohn ML (eds) (1991) *Flow cytometry and sorting.* 2nd edition, New York, New York
 37. Mesri M, Altieri DC (1998) Endothelial cell activation by leukocyte microparticles. *J Immunol.* 161: 4382-4387
 38. Mills JC, Stone NL, Erhardt J, Pittman RN (1998) Apoptotic membrane blebbing is regulated by myosin light chain phosphorylation. *J Cell Biol.* 140: 627-636
 39. Parker BA, Augeri AL, Capizzi JA, Ballard KD, Kupchak BR, Volek JS, Troyanos C, Kriz P, D'Hemecourt P, ThoMPon PD (2012) Effect of marathon run and air travel on pre-and post-run soluble d-dimer, microparticle procoagulant activity, and p-selectin levels. *Am J Cardiol.* 109: 1521-1525
 40. Piccin A, Murphy WG, Smith OP (2007) Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev.* 21: 157-171
 41. Running USA, Statistics and Research. <http://www.runningusa.org/statistics>.
 42. Saravia SG, Knebel F, Schroeckh S, Ziebig R, Lun A, Weimann A, Haberland A, Borges AC, Schimke I (2010) Cardiac troponin t release and inflammation demonstrated in marathon runners. *Clin Lab.* 56: 51-58

43. Satta N, Toti F, Feugeas O, Bohbot A, Dachary-Prigent J, Eschwège V, Hedman H, Freyssinet JM (1994) Monocyte vesiculation is a possible mechanism for dissemination of membrane-associated procoagulant activities and adhesion molecules after stimulation by lipopolysaccharide. *J Immunol.* 153: 3245-3255
44. Schnohr P, O'Keefe JH, Marott JL, Lange P, Jensen GB (2015) Dose of jogging and long-term mortality: the copenhagen city heart study. *J Am Coll Cardiol.* 65: 411-419
45. Schwarz V, Bachelier K, Schirmer SH, Werner C, Laufs U, Böhm M (2017) Red wine prevents the acute negative vascular effects of smoking. *Am J Med.* 130:95-100
46. Schwarz V (2015) Zirkulierende Mikropartikel als Indikator für die Peripartale Kardiomyopathie. doi:10.22028/D291-21989
47. Shapiro HM (ed) (2003) *Practical flow cytometry.* 4th ed. Hoboken, New Jersey
48. Shinkai S, Watanabe S, Asai H, Shek PN (1996) Cortisol response to exercise and post-exercise suppression of blood lymphocyte subset counts. *Int J Sports Med.* 17: 597-603
49. Siegel AJ, Stec JJ, Lipinska I, Van Cott EM, Lewandrowski KB, Ridker PM, Tofler GH (2001) Effect of marathon running on inflammatory and hemostatic markers. *Am J Cardiol.* 88:918-920
50. Sims PJ, Wiedmer T, Esmon CT, Weiss HJ, Shattil SJ (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
51. Sinning JM, Jansen F, Hammerstingl C, Meier A, Losch J, Rohwer K, Schmitz T, Paul K, Sedaghat A, Schueler R, Vasa-Nicotera M, Müller C, Nickenig G, Werner N (2016) Circulating microparticles decrease after cardiac stress in patients with significant coronary artery stenosis. *Clin Cardiol.* 39: 570-577
52. Sinning JM, Losch J, Walenta K, Böhm M, Nickenig G, Werner N (2011) Circulating cd31+/annexin v+ microparticles correlate with cardiovascular outcomes. *Eur Heart J.* 32:2034-2041
53. Strimbu K, Tavel JA (2010) What are biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS.* 5: 463-466

54. Tushuizen ME, Nieuwland R, Rustemeijer C, Hensgens BE, Sturk A, Heine RJ, Diamant M (2007) Elevated endothelial microparticles following consecutive meals are associated with vascular endothelial dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 30:728-730
55. VanWijk MJ, VanBavel E, Sturk A, Nieuwland R (2003) Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res*. 59:277-287
56. Wahl P, Jansen F, Achtzehn S, Schmitz T, Bloch W, Mester J, Werner N (2014) Effects of high intensity training and high volume training on endothelial microparticles and angiogenic growth factors. *PloS one*. 9:e96024
57. Walenta K, Schwarz V, Schirmer SH, Kindermann I, Friedrich EB, Solomayer EF, Sliwa K, Labidi S, Hilfiker-Kleiner D, Böhm M (2012) Circulating microparticles as indicators of peripartum cardiomyopathy. *Eur Heart J*. 33:1469-1479
58. Wen B, Combes V, Bonhoure A, Weksler BB, Couraud PO, Grau GE (2014) Endotoxin-induced monocytic microparticles have contrasting effects on endothelial inflammatory responses. *PLoS One*. 9: e91597
59. Werner C, Fürster T, Widmann T, Pöss J, Roggia C, Hanhoun M, Scharhag J, Büchner N, Meyer T, Kindermann W, Haendeler J, Böhm M, Laufs U (2009) Physical exercise prevents cellular senescence in circulating leukocytes and in the vessel wall. *Circulation*. 120:2438-2447
60. Werner C, Hanhoun M, Widmann T, Kazakov A, Semenov A, Pöss J, Bauersachs J, Thum T, Pfreundschuh M, Müller P, Haendeler J, Böhm M, Laufs U (2008) Effects of physical exercise on myocardial telomere-regulating proteins, survival pathways, and apoptosis. *J Am Coll Cardiol*. 52:470-482
61. Wolf P (1967) The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol*. 13:269-288
62. Zwaal RF, Comfurius P, Bevers EM (2004) Scott syndrome, a bleeding disorder caused by defective scrambling of membrane phospholipids. *Biochim Biophys Acta*. 1636: 119-128

7. Publikationen

Publikation

Schwarz V, Düsing P, Liman T, Werner C, Herm J, Bachelier K, Krüll M, Brechtel L, Jungehülsing GJ, Haverkamp W, Böhm M, Endres M, Haeusler KG, Laufs U (2017) Marathon running increases circulating endothelial- and thrombocyte-derived microparticles. Eur J Prev Cardiol 2017, Epub ahead of print

Abstracts

Schwarz V, Laufs U, Düsing P, Bachelier K, Endres M, Häusler KG, Brechtel L, Herm J, Jungehülsing GJ, Krüll M, Liman T (2017) Untersuchung der Regulation von Mikropartikeln durch einen Marathon-Lauf. Clin Res Cardiol 106, P1084

Schwarz V, Duesing P, Werner C, Bachelier K, Liman T, Herm J, Kruell M, Brechtel L, Jungehülsing GJ, Boehm M, Endres M, Haeusler KG, Laufs U (2017) High intensity physical activity during marathon running increases endothelial microparticles. Eur Heart J, 38, Suppl. 1, P1542

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich einer Reihe von Personen meinen Dank aussprechen, ohne deren Mithilfe und Unterstützung die Anfertigung dieser Dissertation nicht zustande gekommen wäre.

Mein Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. Ulrich Laufs, meinem Doktorvater, für die Überlassung dieses interessanten Themas und der Möglichkeit, die erforderlichen Untersuchungen als Teil seiner Arbeitsgruppe im Forschungslabor der Klinik für Innere Medizin III des Universitätsklinikums des Saarlandes durchzuführen. Sein Vertrauen, dass ich dieses Projekt in der mir zur Verfügung stehenden Zeit vor dem Ende meines Studiums bewältigen kann, hat mich stets sehr motiviert.

Des Weiteren gilt mein besonderer Dank Frau Dr. med. Viktoria Schwarz, welche mich mit hohem persönlichem Aufwand während des gesamten Projekts betreut hat. Dabei stand sie mir nach Einarbeitung in die Methodik sowohl bei der Durchführung der Experimente als auch beim Anfertigen dieser Dissertation zu jeder Zeit mit freundschaftlicher Unterstützung und hilfreichen Anregungen zur Seite.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des kardiologischen Forschungslabors, insbesondere bei Frau Ellen Becker, für das angenehme Arbeitsklima und die Unterstützung während der Durchführung der Experimente.

Zuletzt gilt ein großer Dank meiner Familie, welche mir während der gesamten Arbeiten für diese Dissertation mit Rat und Tat beistand.