

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen
Abteilung Innere Medizin III
(Schwerpunkt: Kardiologie und Angiologie)

**Einfluss der MitraClip®-Therapie bei
Mitralklappeninsuffizienz auf ausgewählte humane Zytokine
und dendritische Zellen im peripheren Blut**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Habel, Elisabeth Helene

2021

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Langer

2. Berichterstatter: Professorin Dr. R. Klein

Tag der Disputation: 16.04.2021

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Herzinsuffizienz	1
1.1.1 Eine Erkrankung von sozioökonomischer Relevanz	1
1.1.2 Ätiologie der Herzinsuffizienz	1
1.2 Von der Herzinsuffizienz zur Aktivierung des Immunsystems	2
1.2.1 Das Herz als Hauptort des Geschehens	2
1.2.2 Systemische Hypoxie als Auslöser der Immunaktivierung	3
1.2.3 Immunaktivierung im Darm	3
1.2.4 Neurohormonale Überaktivierung	3
1.3 Herzinsuffizienz und die Zytokine	5
1.3.1 Folgen der Zytokinfreisetzung	5
1.3.2 Zytokine als Biomarker	8
1.3.3 Proinflammatorische Zytokine – Herkunft und Funktion	8
1.3.4 Antiinflammatorisches Zytokin IL-10 – Herkunft und Funktion	12
1.4 Dendritische Zellen – Eine Schnittstelle zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort	13
1.4.1 Der Oberflächenrezeptor HLA-DR	13
1.5 Behandlungsmöglichkeiten der Herzinsuffizienz	14
1.5.1 Allgemeine Behandlungsoptionen	14
1.5.2 Spezielle Therapieoptionen bei Mitralklappeninsuffizienz als Ursache der Herzinsuffizienz	14
2 Zielsetzung	16
3 Patienten, Material und Methoden	17
3.1 Patientenkollektiv	17

3.2	Material.....	18
3.2.1	Geräte.....	18
3.2.2	Verbrauchsmaterial.....	18
3.2.3	Lösungen.....	19
3.2.4	Antikörper.....	20
3.2.5	Software.....	20
3.3	Methoden.....	21
3.3.1	Quantifizierung 13 humaner Zytokine mittels Multiplex-Assay.....	21
3.3.2	FACS-Analyse der 13 humanen Zytokine.....	23
3.3.3	Identifikation von dendritischen Zellen.....	25
3.3.4	FACS-Analyse der dendritischen Zellen.....	27
3.3.5	FACS-Analyse der Oberflächenrezeptoren auf dendritischen Zellen....	28
3.3.6	Nicht parametrisch Korrelation zwischen der Änderung der Mitralklappeninsuffizienz und der MFI von TNF- α und IL-21.....	29
3.3.7	Statistische Methoden.....	29
4	Ergebnisse.....	30
4.1	Patientencharakteristika.....	30
4.2	Zytokine.....	31
4.2.1	Proinflammatorische Zytokine.....	32
4.2.1.1	Interleukin-9.....	32
4.2.1.2	Interleukin-5.....	33
4.2.1.3	Interleukin-2.....	34
4.2.1.4	Interleukin-13.....	35
4.2.1.5	Interleukin-21.....	36
4.2.1.6	Interleukin-17A.....	37
4.2.1.7	Tumornekrosefaktor- α	38
4.2.1.8	Interleukin-4, Interleukin-6, Interleukin-17F, Interleukin-22, Interferon- γ	39

4.2.2	Antiinflammatorisches Interleukin-10	40
4.3	Durchflusszytometrische Analyse plasmazytoider und myeloider dendritischer Zellen	41
4.3.1	Die Zellzahl	41
4.3.2	Der costimulatorische Oberflächenrezeptor HLA-DR.....	42
4.4	Eine Korrelation zwischen der Reduktion der MI und der MFI von TNF- α und IL-21	43
5	Diskussion	44
5.1	Zusammenfassung der Hauptergebnisse	44
5.2	Diskussion der Methoden	44
5.3	Diskussion der Ergebnisse	45
5.3.1	Proinflammatorische Zytokine.....	45
5.3.1.1	Ein signifikanter Anstieg der proinflammatorischen Zytokine IL-9, IL-5, IL-2 und IL-13	45
5.3.1.2	Ein signifikanter Abfall der proinflammatorischen Zytokine IL-21, IL-17A und TNF- α	46
5.3.1.3	Keine signifikante Änderung der proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-22, IFN- γ , IL-4 und IL-17F	47
5.3.1.4	Ein signifikanter Anstieg des antiinflammatorischen Zytokins IL-10	48
5.3.2	Durchflusszytometrische Analyse plasmazytoider und myeloider dendritischer Zellen	49
5.3.2.1	Die Zellzahl.....	49
5.3.2.2	Der costimulatorische Oberflächenrezeptor HLA-DR	50
5.3.3	Eine Korrelation zwischen der Verringerung der MI und der MFI von TNF- α und IL-21	50
5.4	Ausblick.....	51
6	Zusammenfassung	52
7	Literaturverzeichnis	IX
8	Erklärung zum Eigenanteil.....	XV

DanksagungXVI

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 – Von der Herzinsuffizienz zur Aktivierung des Immunsystems.....	4
Abbildung 2 – Folgen der Zytokinfreisetzung.....	7
Abbildung 3 – Quantifizierung 13 humaner Zytokine	24
Abbildung 4 – Gating-Strategie nach Yilmaz	28
Abbildung 5 - Signifikanter Anstieg der MFI von IL-9.....	32
Abbildung 6 - Signifikanter Anstieg der MFI von IL-5.....	33
Abbildung 7 - Signifikanter Anstieg der MFI von IL-2.....	34
Abbildung 8 - Signifikanter Anstieg der MFI von IL-13.....	35
Abbildung 9 - Signifikante Reduktion der MFI von IL-21	36
Abbildung 10 - Signifikante Reduktion der MFI von IL-17A	37
Abbildung 11 - Signifikante Reduktion der MFI von TNF- α	38
Abbildung 12 - Signifikanter Anstieg der MFI von IL-10.....	40
Abbildung 13 - Veränderung der absoluten Zellzahl der pDZ.....	41

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 - Proinflammatorische Zytokine - Herkunft und Funktion	8
Tabelle 2 - Antiinflammatorisches Zytokin IL-10 - Herkunft und Funktion.....	12
Tabelle 3 - Geräte und deren Hersteller	18
Tabelle 4 - Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller	18
Tabelle 5 - Bestandteile des FACS-Puffers und deren Hersteller	19
Tabelle 6 - Bestandteile des Lysepuffers und deren Hersteller	19
Tabelle 7 - Bestandteile der Fixierlösung und deren Hersteller	19
Tabelle 8 - Verwendete Antikörper und deren Hersteller	20
Tabelle 9 - Verwendete Software und deren Hersteller	20
Tabelle 10 - Erstellen der Verdünnungsreihe	22
Tabelle 11 - Bestückung der Mikrotiterplatte	22
Tabelle 12 - Inhalt der Antikörperlösungen.....	26
Tabelle 13 - Pipettierschema der 7 FACS-Röhrchen.....	26
Tabelle 14: Basischarakteristika der Patientengruppen.....	30

Abkürzungsverzeichnis

ACS	Akutes Koronarsyndrom
Ak	Antikörper
APZ	Antigenpräsentierende Zellen
DAMPs	Damage-associated molecular patterns
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DZ	Dendritische Zellen
EF	Ejektionsfraktion
EPO	Erythropoetin
EZM	Extrazelluläre Matrix
Follow-up	acht Monate nach Implantation des MitraClip®
HI	Herzinsuffizienz
HLA-System	Humanes Leukozytenantigen-System
HSP	Hitzeschockproteine
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
KHK	koronare Herzkrankheit
LVEF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
mDZ	myeloide dendritische Zellen
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC-Komplex	Haupthistokompatibilitätskomplex
MI	Mitralklappeninsuffizienz
MI _{post}	Mitralklappeninsuffizienz direkt nach Implantation des MitraClip®
MI _{prä}	Mitralklappeninsuffizienz direkt vor Implantation des MitraClip®
NKZ	Natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
pDZ	plasmazytoide dendritische Zellen
präMC	unmittelbar vor Implantation des MitraClip®
PRRs	Pattern Recognition Receptors
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SA-PE	Streptavidin-Phycoerythrin
TEE	Transösophageale Echokardiographie
Th-Zellen	T-Helfer-Zellen

TNF- α Tumornekrosefaktor- α T_{Reg}-Zelle

Regulatorische T-Zelle

1 Einleitung

1.1 Herzinsuffizienz

1.1.1 Eine Erkrankung von sozioökonomischer Relevanz

Die Herzinsuffizienz (HI) ist eine Erkrankung, die in westlichen Ländern von hoher Relevanz ist. In Industrienationen leiden 1-2 % der erwachsenen Bevölkerung darunter. Unter den über 70-Jährigen sind sogar bis zu 10 % betroffen (Mosterd and Hoes, 2007, Bleumink et al., 2004). Für die Betroffenen stellt diese Erkrankung eine enorme Belastung und Einschränkung der Lebensqualität dar. Über die Hälfte der Patienten berichtet von Kurzatmigkeit, Kraftlosigkeit, Schmerzen, Abgeschlagenheit und Mundtrockenheit (Bekelman et al., 2007). Die Schwere der Erkrankung wird besonders deutlich, wenn man betrachtet, dass die Mehrheit der Patienten, die wegen HI einmal ins Krankenhaus eingewiesen wurden, innerhalb von fünf Jahren verstirbt (Ponikowski et al., 2014). Heutzutage rückt zudem die ökonomische Relevanz einer Erkrankung immer weiter in den Fokus. HI verursacht weltweit Kosten in Höhe von 92 Milliarden Euro pro Jahr und stellt somit eine große wirtschaftliche Belastung dar. (Cook et al., 2014).

1.1.2 Ätiologie der Herzinsuffizienz

Die HI ist ein klinisches Syndrom, das durch strukturelle und/oder funktionelle Veränderungen am Herzen verursacht wird, welche zu einer reduzierten kardialen Auswurfleistung und/oder zu erhöhtem intrakardialen Druck führen (Ponikowski et al., 2016). Ursachen hierfür sind zahlreich, unter anderem ein ischämisches Geschehen im Rahmen einer koronaren Herzkrankheit (KHK), arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Arrhythmien, Kardiomyopathien und Infektionen (McMurray and Stewart, 2000). Eine weitere wichtige Ursache, die zur Entstehung einer HI führen kann, ist die Veränderung der Herzklappen. Mitral- und Aortenklappeninsuffizienz sind die Hauptursachen für eine kardiale Volumenbelastung (Carabello, 2002).

1.2 Von der Herzinsuffizienz zur Aktivierung des Immunsystems

Die genauen Vorgänge, wie es von der HI zur Aktivierung des Immunsystems kommt, sind von großem Interesse und seit Jahren Gegenstand der Forschung. Bis heute gibt es mehrere Theorien dazu.

1.2.1 Das Herz als Hauptort des Geschehens

Die bei der HI vorliegende erhöhte kardiale Druck- oder Volumenbelastung hat weitreichende Folgen für die Kardiomyozyten und die kardiale Extrazellulärmatrix (Frangogiannis, 2017). Der dauerhafte mechanische Stress durch die Überbeanspruchung des Herzmuskels verursacht Schäden an verschiedenen Strukturen des Herzens, woraufhin Reparaturmechanismen im Rahmen einer Entzündungsreaktion aktiviert werden (Zhang et al., 2017). Von den beschädigten Kardiomyozyten werden „Damage-associated molecular patterns“ (DAMPs), endogene Moleküle wie Hitzeschockproteine (HSP) oder reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die bei Gewebeschädigung entstehen, freigesetzt. Diese werden von „Pattern Recognition Receptors“ (PRRs) erkannt, woraufhin eine Entzündungsreaktion ausgelöst wird (Takeuchi and Akira, 2010). Neutrophile Granulozyten, Monozyten und Makrophagen wandern ein, phagozytieren nekrotisches Gewebe und schütten inflammatorische Zytokine aus (Anzai, 2013). Diese bewirken einen Umbau der extrazellulären Matrix (EZM) und führen zur Hypertrophie der Kardiomyozyten (Jankowska et al., 2006). Bestehen die Entzündungsreaktionen jedoch aufgrund der anhaltenden Belastung dauerhaft, können diese Entzündungsreaktionen ihrerseits wiederum zur Progression der HI beitragen. (Genth-Zotz et al., 2004). Nachgewiesen wurde dies bereits für ischämisch verursachte HI. Wenn eine Entzündungsreaktion über die eigentliche Reparaturphase nach einem Myokardinfarkt hinaus besteht, kann dies zu einem ungünstigen Umbau von Myokard führen, das weiter vom Infarktareal entfernt liegt (Anzai, 2013).

1.2.2 Systemische Hypoxie als Auslöser der Immunaktivierung

Eine weitere Hypothese geht davon aus, dass besonders bei hochgradiger HI die Pumpleistung des Herzens nicht mehr ausreicht, um den Körper ausreichend mit Sauerstoff zu versorgen. Diese systemische Hypoxie macht sich besonders im Skelettmuskel bemerkbar (Paulus, 1999). Hier finden ähnliche Prozesse wie im Herzmuskel statt. Aus dem beschädigten Gewebe werden DAMPs freigesetzt, die von PRRs erkannt werden und eine Entzündungsreaktion auslösen (Hasper et al., 1998).

1.2.3 Immunaktivierung im Darm

Die dritte Hypothese, wie es zur Immunaktivierung bei HI kommen kann, besagt, dass es durch die mangelnde Kapazität des Herzens, das Blut weiter zu transportieren, zum venösen Rückstau kommt. Aufgrund des Rückstaus entstehen im Intestinaltrakt Darmwandödeme, die zur bakteriellen Translokation führen. Dadurch werden große Mengen Endotoxin in den Kreislauf freigesetzt, welches von CD14-Rezeptoren gebunden wird. Diese Rezeptoren kommen hauptsächlich auf Monozyten und Makrophagen vor. Die Immunzellen werden durch die Bindung von Endotoxin an CD14 aktiviert (Mari et al., 2002, Niebauer et al., 1999).

1.2.4 Neurohormonale Überaktivierung

Die vierte Hypothese, wie es zur Immunaktivierung bei HI kommt, beruht darauf, dass bei chronischer HI eine übermäßige Aktivierung neurohormonaler Systeme stattfindet. Beispielsweise werden die Nieren durch einen geringeren arteriellen Perfusionsdruck bei HI weniger durchblutet, woraufhin das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) aktiviert wird. Mittels Angiotensin II werden zirkulierende Leukozyten zur Adhäsion an Endothelzellen und zur Synthese von Chemokinen und inflammatorischen Zytokinen veranlasst (Brasier et al., 2002).

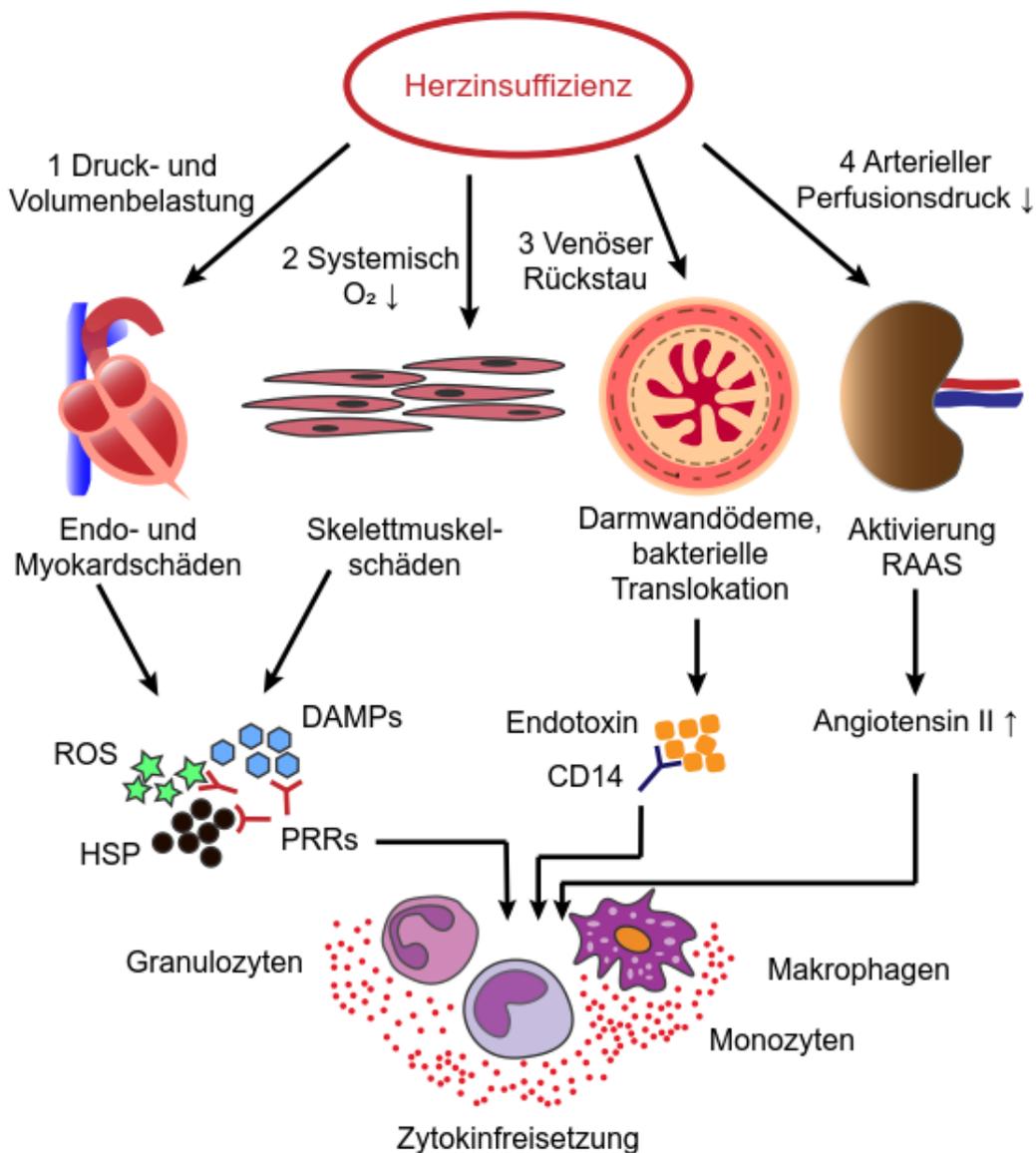


Abbildung 1 – Von der Herzinsuffizienz zur Aktivierung des Immunsystems

Theorie 1: Aufgrund der dauerhaften Druck- und Volumenbelastung bei HI, kommt es zu Endo- und Myokardschäden. Vom geschädigten Gewebe werden DAMPs, ROS und HSP freigesetzt. Diese werden von PRRs erkannt und lösen eine Entzündungsreaktion aus. Neutrophile Granulozyten, Monozyten und Makrophagen wandern ein, phagozytieren nekrotisches Gewebe und schütten verschiedene Zytokine aus. Theorie 2: Aufgrund der eingeschränkten Pumpleistung des Herzens bei HI, entsteht eine systemische Hypoxie, die besonders die Skelettmuskulatur schädigt. Auch diese setzt DAMPs frei, woraufhin der gleiche Signalweg wie bei Theorie 1 in Gang gesetzt wird.

Theorie 3: Durch die mangelnde Pumpleistung bei HI kommt es zum venösen Rückstau. Daraufhin entstehen im Intestinaltrakt Darmwandödeme. Diese führen zur bakteriellen Translokation, woraufhin Endotoxin in den Kreislauf freigesetzt wird. Dieses wird vor allem von Monozyten und Makrophagen über deren CD14-Rezeptoren erkannt, woraufhin die Zellen aktiviert werden und Zytokine freisetzen. Theorie 4: Aufgrund der renalen Minderperfusion bei HI wird das RAAS aktiviert. Angiotensin II regt Leukozyten zur Freisetzung von Zytokinen an.

1.3 Herzinsuffizienz und die Zytokine

Zytokine sind unerlässlich für die Ausbreitung der Immunantwort. Sie locken Zellen des Immunsystems an den Ort der Entzündung und fördern deren Proliferation und Differenzierung. Somit nehmen Zytokine eine zentrale Rolle bei der Immunaktivierung ein (Torre-Amione, 2005).

1.3.1 Folgen der Zytokinfreisetzung

Die gewünschte Funktion der Zytokinfreisetzung bei der HI besteht darin, die Wundheilung des beschädigten Myokards in Gang zu setzen und somit Schäden, die durch die Druck- und Volumenbelastung entstanden sind, zu reparieren und das Myokard besser an die Belastungen anzupassen (Gullestad et al., 2012). Dies geschieht durch exzentrische Hypertrophie der Kardiomyozyten und Umbau der EZM (Hutchinson et al., 2010). Bestehen diese Entzündungsreaktionen jedoch über längere Zeit, kann es zu Narbenbildung, linksventrikulärer Dilatation und kontraktile Dysfunktion kommen, was wiederum zur Progression der HI beiträgt (Mann, 2003). Im Tiermodell wurde nachgewiesen, dass bei der Volumenbelastung zuerst Teile der EZM, besonders Kollagen I, abgebaut werden. Beim Aufbau der neuen Matrix wird hingegen vor allem Kollagen III gebildet. Dies hat eine Reduktion der Myokardwanddicke zur Folge (Brower and Janicki, 2001, Hutchinson et al., 2010). Wenn Zytokine in hoher Dosierung vorliegen, sind sie mitverantwortlich für negativ inotrope Effekte auf das Myokard. Durch toxische Einflüsse endogener Zytokine kommt es zu Apoptose und Nekrose der Kardiomyozyten (Candia et al., 2007, Seta et al., 1996). Von den beschädigten Kardiomyozyten werden, wie in Kapitel 1.2.1 beschrieben, endogene Moleküle freigesetzt, die zu einer noch stärkeren Entzündungsreaktion führen. Da Zytokine in die Blutbahn abgegeben werden und somit systemisch vorkommen, haben sie auch Auswirkungen auf andere Organe und Gewebe. Beispielsweise wurde für Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin-1 (IL-1) und Interleukin-6 (IL-6) bereits nachgewiesen, dass sie eine Anämie verursachen können, indem sie die Produktion von Erythropoetin (EPO) beeinträchtigen und die Apoptose von Vorläuferzellen im Knochenmark fördern (Okonko and Anker, 2004). Außerdem beeinträchtigen inflammatorische Zytokine die Endothelfunktion durch mehrere Mechanismen. Sie fördern zum einen die Expression von Adhäsionsmolekülen und

inflammatorischen Chemokinen, was wiederum die Entzündungsreaktion innerhalb der Gefäßwand verstärkt. Außerdem kann TNF- α direkt die Apoptose von Endothelzellen induzieren (Li et al., 2003). Zudem beeinflussen inflammatorische Zytokine das Gleichgewicht zwischen endogenen Vasodilatoren (z.B. NO) und Vasokonstriktoren (z.B. Endothelin-1) zugunsten der Konstriktoren, was zu einer reduzierten Organperfusion führt. Die daraus resultierende Gewebshypoxie kann unter anderem zu Myopathien und/oder Leberfunktionsstörungen führen (Tousoulis et al., 2005).

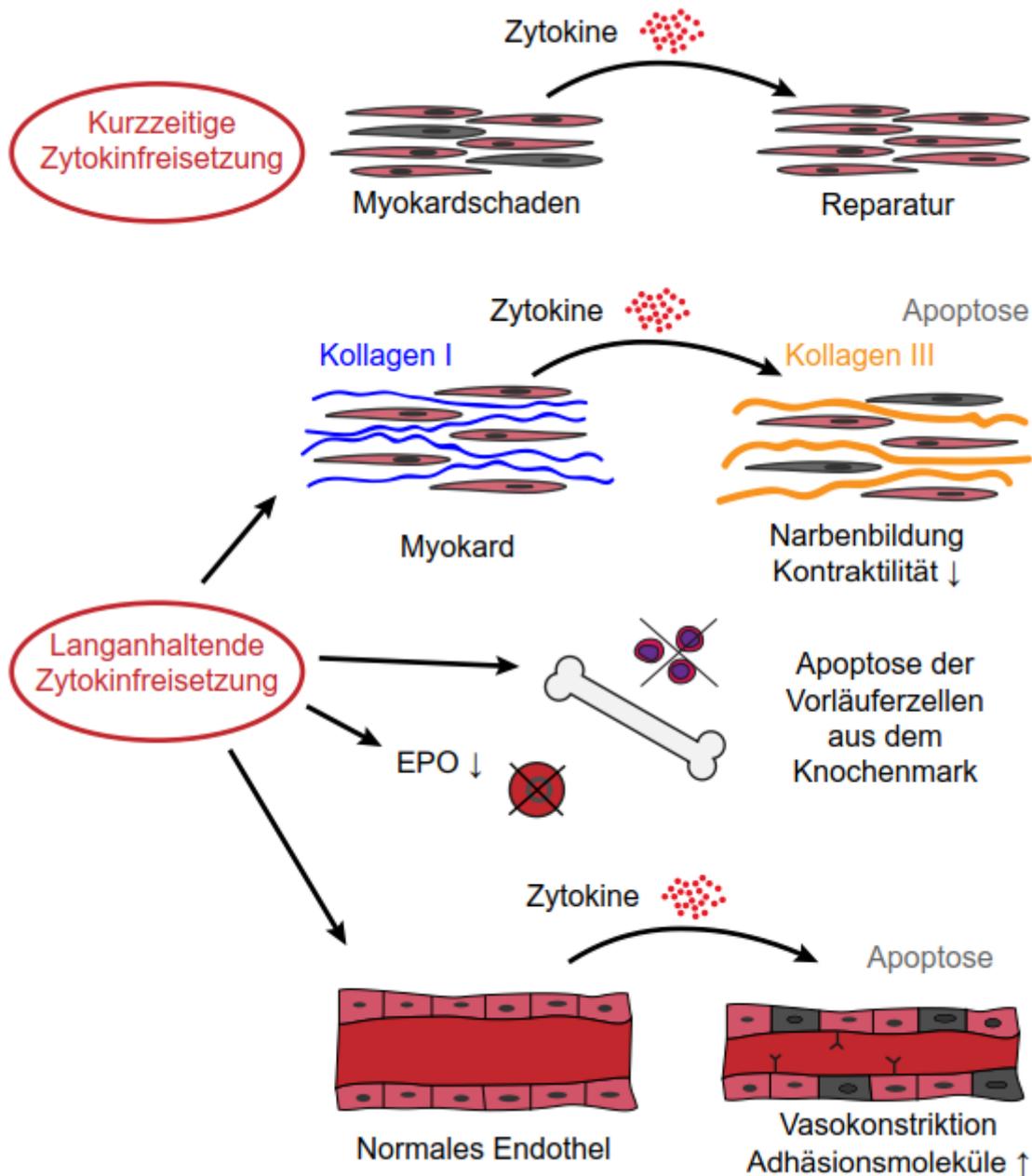


Abbildung 2 – Folgen der Zytokinfreisetzung

Besteht der erhöhte Zytokinspiegel nur für kurze Zeit, fördern die Zytokine die Wundheilung bei geschädigtem Myokard. Bestehen die erhöhten Zytokinspiegel jedoch für längere Zeit, kommt es am Myokard zur Narbenbildung mit kontraktile Dysfunktion. Dies geschieht vor allem dadurch, dass Kollagen I abgebaut und durch Kollagen III ersetzt wird. Zudem beeinträchtigen einige Zytokine die Produktion von EPO, wodurch sie eine Anämie verursachen können und fördern die Apoptose von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark. Außerdem fördern hohe Zytokinspiegel über längere Zeit die Expression von Adhäsionsmolekülen am Endothel, was die Entzündungsreaktion innerhalb der Gefäßwand verstärkt. Sie induzieren die Apoptose von Endothelzellen und führen zur Vasokonstriktion, was zu einer reduzierten Organperfusion führt.

1.3.2 Zytokine als Biomarker

Bei Patienten mit HI wurden erhöhte Spiegel verschiedener inflammatorischer Zytokine gemessen, was zu der Frage führt, ob sich Zytokine als Biomarker eignen würden. Dies könnte für die Diagnosesicherung, die Prognose und zur Überprüfung des Behandlungserfolgs hilfreich sein. In mehreren Studien wurde nachgewiesen, dass erhöhte Plasma-/Serumspiegel bestimmter Zytokine signifikant mit einer reduzierten kardialen Belastbarkeit korrelieren (Testa et al., 1996, Yndestad et al., 2006). Zudem waren Zytokine wie TNF- α und IL-6 besonders bei Patienten mit schlechtem Outcome erhöht (Fildes et al., 2009). Vor allem lösliche TNF- α -Rezeptoren stellten sich als stärkste Prädiktoren für die Langzeitmortalität heraus. Demnach korrelieren erhöhte Spiegel verschiedener proinflammatorischer Zytokine nicht nur mit der Schwere der Erkrankung, sondern können auch Hinweise für eine Prognose geben (Rauchhaus et al., 2000).

1.3.3 Proinflammatorische Zytokine – Herkunft und Funktion

Im Folgenden sollen die Hauptproduzenten und die wichtigsten Funktionen der proinflammatorischen Zytokine erläutert werden, die in dieser Studie untersucht wurden. Die Effekte verschiedener Zytokine sind vielfältig. Die Wirkungen sind teilweise redundant, jedoch werden die Moleküle unter verschiedenen Umständen ausgeschüttet (Petersen and Felker, 2006).

Tabelle 1 - Proinflammatorische Zytokine - Herkunft und Funktion

Zytokin	Hauptproduzent	Wichtigste Funktionen
IL-2	Th1-Lymphozyten (Hwang et al., 2005)	Proliferation von CD4 ⁺ -T-Lymphozyten, CD8 ⁺ -T-Gedächtniszellen, Natürlichen Killerzellen (NKZ) und B-Lymphozyten, Steigerung der Antikörpersekretion in B-Lymphozyten, Steigerung der Zytokinproduktion in T-Lymphozyten und NKZ (Gaffen and Liu, 2004), in vitro negativ inotrop (Mari et al., 2002)

Zytokin	Hauptproduzent	Wichtigste Funktionen
IL-4	Th2-Lymphozyten Neutrophile Granulozyten Basophile Granulozyten Makrophagen (Chomarat and Banchereau, 1997, Sokol et al., 2008)	Regulation der Antikörperproduktion, Regulation der B- und T-Zellantwort, Wachstumsfaktor für Lymphozyten (Gadani et al., 2012, Brown and Hural, 1997)
IL-5	Th2-Lymphozyten (Ikutani et al., 2012)	Stimulation von Wachstum und Differenzierung eosinophiler Granulozyten und B-Lymphozyten (Leckie et al., 2000, Murphy et al., 2014)
IL-6	Th2-Lymphozyten Neutrophile Granulozyten Basophile Granulozyten Makrophagen Myozyten (Diehl and Rincon, 2002, Febbraio and Pedersen, 2005)	Induktion der Produktion bestimmter Akute-Phase-Proteine in der Leber, Regulation von Eisen- und Zinktransportern, Förderung der Thrombozytenfreisetzung aus dem Knochenmark, Förderung der Differenzierung von T-Lymphozyten (Tanaka et al., 2014)
IL-9	Th1-Lymphozyten Th2-Lymphozyten (Noelle and Nowak, 2010)	Wachstumsfaktor für Mastzellen, Mobilisation eosinophiler Granulozyten, Aktivierung von Th2-, Th17- und B-Lymphozyten (Murphy et al., 2014, Noelle and Nowak, 2010)

Zytokin	Hauptproduzent	Wichtigste Funktionen
IL-13	Th2-Lymphozyten (McKenzie et al., 1998)	Stimulation von Wachstum und Differenzierung der B-Lymphozyten, Vermittlung des Antikörperklassenwechsels hin zu IgE, Mediator beim Auslösen von Asthmaanfällen (Seyfizadeh et al., 2015, Murphy et al., 2014)
IL-17A	Th17-Lymphozyten (Cua and Tato, 2010)	Induktion der Zytokin- und Chemokinproduktion in Epithelzellen, Fibroblasten und Keratinozyten, Förderung der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten (Iwakura et al., 2011, Murphy et al., 2014)
IL-17F	Th17-Lymphozyten Monozyten Basophile Granulozyten Mastzellen (Starnes et al., 2001, Kawaguchi et al., 2001)	Induktion der Zytokinproduktion in Endothelzellen, Epithelzellen, Fibroblasten und eosinophilen Granulozyten (Chang and Dong, 2009)
IL-21	Th17-Lymphozyten (Liu and King, 2013)	Induktion der Proliferation und Differenzierung von B-, T-Lymphozyten und NKZ (Monteleone et al., 2008)
IL-22	Th1-Lymphozyten Th22-Lymphozyten Th17-Lymphozyten (Duhon et al., 2009)	Förderung der Gewebsregeneration in verschiedenen Epithelien und Stromazellen, Förderung der Produktion antimikrobieller Moleküle in Lunge, Haut und Darm (Dudakov et al., 2015)

Zytokin	Hauptproduzent	Wichtigste Funktionen
IFN- γ	NKZ Th1-Lymphozyten Zytotoxische T-Zellen (Schoenborn and Wilson, 2007)	Aktivierung von Makrophagen, Förderung der Antigenpräsentation, Regulation des Gleichgewichts zwischen Th1- und Th2-Lymphozyten (Schroder et al., 2004, Tau and Rothman, 1999)
TNF- α	Makrophagen (Parameswaran and Patial, 2010)	Aktivierung des Endothels und auch In- duktion der Apoptose von Endothelzellen möglich, Erhöhung der Permeabilität der Gefäß- wände, Reduktion der Produktion von EPO, Förderung der Apoptose von Vorläuferzellen im Knochenmark (Pfeffer, 2003, Parameswaran and Patial, 2010)

1.3.4 Antiinflammatorisches Zytokin IL-10 – Herkunft und Funktion

Nachfolgend sind die Hauptproduzenten und die wichtigsten Funktionen von IL-10, des einzigen antiinflammatorischen Zytokins, das in dieser Studie untersucht wurde, aufgeführt.

Tabelle 2 - Antiinflammatorisches Zytokin IL-10 - Herkunft und Funktion

Zytokin	Hauptproduzent	Wichtigste Funktionen
IL-10	Th1-Lymphozyten Th2-Lymphozyten (Trinchieri, 2007)	Hemmung der Entwicklung von Th1-Lymphozyten, Hemmung von Makrophagenfunktionen, Reduktion der Freisetzung von NO und freien Sauerstoffradikalen aus Makrophagen Reduktion der Produktion von IL-1, IL-2, IL-5, IL-6 und TNF- α (Genth-Zotz et al., 2004, El-Menyar, 2008, Murphy et al., 2014, Moore et al., 2001)

1.4 Dendritische Zellen – Eine Schnittstelle zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort

Dendritische Zellen (DZ) gehören zu den professionell antigenpräsentierenden Zellen (APZ) und kommen in fast allen Geweben des menschlichen Körpers vor. Sie sind beweglich und besitzen bäumchenartige Ausläufer (Steinman and Idoyaga, 2010). Im unreifen Zustand exprimieren die DZ nur wenige Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHC-Komplexe) und kostimulatorische Oberflächenrezeptoren auf ihrer Oberfläche. Sobald sie jedoch ein Antigen aufgenommen haben, verändern die DZ ihre Oberfläche, exprimieren 10 – 100 mal mehr MHC-Komplexe als Monozyten oder B-Zellen und wandern in den nächsten Lymphknoten, um dort naive T-Zellen zu aktivieren. (Banchereau and Steinman, 1998, Schraml and Reis e Sousa, 2015). Aktiviert werden die DZ jedoch beispielsweise auch durch HSP, welche ein „Gefahrensignal“ für DZ darstellen (Fildes et al., 2009). Dies geschieht, wie in Kapitel 1.2.1 beschrieben, im Rahmen einer HI. Je nach Art der Aktivierung der DZ verändert sie ihre Oberfläche. Je nachdem, welche kostimulatorischen Oberflächenrezeptoren die DZ exprimieren und welche Zytokine sie ausschütten, kann die zelluläre Immunantwort moduliert werden. Damit bilden die DZ eine Schnittstelle zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort (Mildner and Jung, 2014). Unterschieden werden bei den DZ vor allem zwei Hauptgruppen, je nach ihrer Abstammung. Die myeloiden dendritischen Zellen (mDZ) ähneln Monozyten. Sie exprimieren CD1c und CD11 und werden vor allem durch Bakterien aktiviert. Die plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDZ) ähneln Plasmazellen. Sie exprimieren CD303 und CD123 und werden bevorzugt durch Viren aktiviert (Liu, 2001, Dzionek et al., 2000).

1.4.1 Der Oberflächenrezeptor HLA-DR

Von besonderer Relevanz auf der Oberfläche der DZ ist der Oberflächenrezeptor HLA-DR. Die humane Leukozytenantigen (HLA) -Genregion liegt auf Chromosom 6 und codiert für die MHC-Komplexe. Der Zusatz „DR“ beschreibt hierbei einen speziellen Genloкус in der HLA-Region (Nunes et al., 2011). Nur Zellen, die ein Antigen auf einem HLA-DR-Rezeptor präsentieren, sind in der Lage, T-Zellen zu aktivieren (Bottazzo et al., 1983).

1.5 Behandlungsmöglichkeiten der Herzinsuffizienz

1.5.1 Allgemeine Behandlungsoptionen

Nach aktueller „Nationaler VersorgungsLeitlinie Chronische Herzinsuffizienz von 2019“, gehört zur Basistherapie einer chronischen HI bei jedem Patienten immer eine konservative Therapie, bestehend aus Schulung des Patienten und Modifikation des Lebensstils. Des Weiteren sollen immer auch prognostisch relevante Faktoren, wie kardiovaskuläre Erkrankungen, Diabetes mellitus oder chronische Niereninsuffizienz berücksichtigt und gegebenenfalls behandelt werden (Bundesärztekammer (BÄK) et al., 2019). Eine medikamentöse Therapie ist darüber hinaus vor allem bei Patienten mit einer verringerten linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) sinnvoll. Diese sollte, je nach NYHA-Stadium, aus einem ACE-Hemmer, einem Beta-Blocker, einem Mineralokortikoidrezeptorantagonisten oder einer Kombination dieser Medikamente bestehen. Je nach Komorbidität kommen weitere Medikamente zur Anwendung (Ponikowski et al., 2016). Neben der Basisversorgung der HI ist die Behandlung der Ursache am wichtigsten. Im Folgenden soll vor allem auf die Therapie einer Mitralklappeninsuffizienz (MI) eingegangen werden, wenn diese als Ursache der HI zugrunde liegt.

1.5.2 Spezielle Therapieoptionen bei Mitralklappeninsuffizienz als Ursache der Herzinsuffizienz

Wenn eine MI die Ursache für eine HI darstellt, hat die medikamentöse Therapie eher einen geringeren Stellenwert. Nur bei symptomatischen Patienten, deren LVEF weniger als 30% beträgt, sollte nach aktueller „ESC Leitlinie für Herzklappenerkrankungen von 2017“ eine Therapie mit Nitraten und Diuretika eingeleitet werden. Sind die Symptome darunter jedoch nicht ausreichend gelindert oder beträgt die LVEF mehr als 30%, sollte bevorzugt eine interventionelle Therapie erfolgen (Baumgartner et al., 2017). Wenn bei dem Patienten keine Kontraindikationen gegen eine Operation vorliegen, ist der Goldstandard der Therapie der MI der chirurgische Klappenersatz (De Bonis et al., 2017). Handelt es sich jedoch um einen Hochrisikopatienten, dem eine Operation oder die Kreislaufübernahme durch eine Herz-Lungen-Maschine nicht zugemutet werden kann, kommen minimalinvasive Techniken zum Einsatz (Lim et al., 2014). Das am häufigsten

eingesetzte System, um minimalinvasiv eine MI zu reduzieren, ist das MitraClip®-System. Es verwendet das Rekonstruktionsverfahren nach Alfieri. Hierbei wird ein Katheter, an dessen Spitze sich der Clip befindet, über die Vena femoralis bis in den rechten Vorhof vorgeschoben. Durch Punktion des Vorhofseptums gelangt er in den linken Vorhof und wird unter Röntgenkontrolle zwischen den Segeln der Mitralklappe positioniert. Der Clip wird so geschlossen, dass er die Mitten der beiden Mitralsegel miteinander verbindet (Alfieri et al., 2001). Bei Kontrolluntersuchungen mittels transösophagealer Echokardiographie (TEE) konnte gezeigt werden, dass sich nach erfolgreicher MitraClip®-Implantation das linksventrikuläre und linksatriale Blutvolumen verringert hatte (Grayburn et al., 2013). Alle Patienten zeigten eine signifikant erhöhte kardiale Auswurfleistung und einen signifikant erniedrigten pulmonalarteriellen Druck (Patzelt et al., 2017a, Gaemperli et al., 2013). Es konnte sogar gezeigt werden, dass sich sechs Monate nach Implantation des MitraClips® der Durchmesser des Mitralklappenannulus von im Durchschnitt 34 mm auf 31 mm verringert hatte (Patzelt et al., 2017b). Diese nachhaltigen Veränderungen der Herzgeometrie führen durch eine Verbesserung der Hämodynamik zu strukturellem und funktionellem Umbau des Myokards, auch „reverse remodeling“ genannt (Grayburn et al., 2013). Da die korrekte Implantation des MitraClips® eine sofortige Reduktion des Wandstress auf das Myokard bedeutet und sich die Herzgeometrie nachhaltig verbessert, bildet diese Therapie die ideale Grundlage für die folgende Interventionsstudie.

2 Zielsetzung

Es ist wissenschaftlich belegt, dass die Aktivierung des Immunsystems eine wichtige Rolle beim Voranschreiten der Herzinsuffizienz spielt. Die Herzinsuffizienz ist derzeit eine der bedeutendsten Erkrankungen in den westlichen Industrieländern und ist von immer größer werdender sozioökonomischer Relevanz. Jedoch gibt es kaum Daten darüber, inwieweit eine Volumenüberladung des linken Ventrikels bei Mitralklappeninsuffizienz zur Aktivierung des Immunsystems beiträgt. Ziel der vorliegenden Studie war es daher, die Auswirkung der Mitralklappeninsuffizienz auf verschiedene Komponenten des Immunsystems zu untersuchen. Bei Patienten mit Mitralklappeninsuffizienz verbessert die Implantation eines MitraClips® signifikant die kardiale Auswurfleistung und reduziert somit die Volumenüberladung. Daher stellt die Untersuchung von Patienten vor und acht Monate nach Implantation einen guten Versuchsaufbau dar. Zytokine und dendritische Zellen bilden mit ihrer Mediatorfunktion den Dreh- und Angelpunkt einer jeden Immunantwort, weshalb der Fokus dieser Studie auf der Veränderung dieser Komponenten lag. Langfristig soll die Studie einen Beitrag dazu leisten, die komplexen Veränderungen bei der systemischen Erkrankung Herzinsuffizienz besser zu verstehen, um weitere Therapieoptionen entwickeln zu können.

Ziel der hier vorliegenden Follow-up-Studie war:

- eine Veränderung der mittleren Fluoreszenzintensität verschiedener pro- und antiinflammatorischer Zytokine durch MitraClip®-Implantation zu zeigen.
- eine Zellzahländerung von dendritischen Zellen durch MitraClip®-Implantation zu ermitteln.
- eine veränderte Expression des Oberflächenrezeptors HLA-DR auf dendritischen Zellen durch MitraClip®-Implantation zu erfassen.
- eine Korrelation zwischen der Verringerung der Mitralklappeninsuffizienz durch Implantation des MitraClip®-Systems und einer Veränderung der mittleren Fluoreszenzintensität verschiedener inflammatorischer Zytokine aufzuzeigen.

3 Patienten, Material und Methoden

3.1 Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv bestand aus 305 Patienten mit NYHA Stadium 2 – 4. Alle Patienten haben eine minimalinvasive Behandlung bei Mitralklappeninsuffizienz (MitraClip®) in der Inneren Medizin III, Kardiologie und Angiologie, der Universität Tübingen erhalten.

Eingeschlossen in die Studie wurden 156 Patienten, welche alle am Follow-up teilnahmen, im Durchschnitt nach 8,47 Monaten.

Ausgeschlossen aus der Studie wurden 149 Patienten. Von ihnen sind 69 Patienten verstorben, 75 Patienten sind nicht zum Follow-up erschienen und 5 Patienten haben nachträglich ihr Einverständnis zur Teilnahme an der Studie zurückgezogen.

Die Kontrollgruppe bestand aus 40 kardiologischen Patienten die zufällig im Herzkatheterlabor ausgewählt wurden.

Alle Patienten wurden über die Studie informiert und haben ihr Einverständnis zur Teilnahme und Blutentnahme schriftlich gegeben. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Tübingen genehmigt (Ethikvotum 270/2011B01, 260/2015R, 757/2018B02).

3.2 Material

3.2.1 Geräte

Tabelle 3 - Geräte und deren Hersteller

Absaugpumpe Vacusafe Comfort	Integra Biosciences
Compact Digital Microplate Shaker	Thermo Scientific
FACS Calibur, 2 Laser	BD-Biosciences
FACSLyric™	BD-Biosciences
Gefrierschrank MDF-U54V Ultra-Low	Sanyo Panasonic
Ultraschallbad Sonorex Super	Bandelin
Zellzähler KX-21N	Sysmex
Zentrifuge Multifuge 3S+	Heraeus
Zentrifuge Rotina 420R	Hettich

3.2.2 Verbrauchsmaterial

Tabelle 4 - Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller

S-Monovette® 5,5 ml, Lithium-Heparin	Sarstedt
S-Monovette® 10 ml, Citrat 3,2%	Sarstedt
Safe-Lock Tube 1,5 ml (Eppendorf-Cup)	Eppendorf
Falcon 5mL Polystyrene Test Tube (FACS-Röhrchen)	BD
Microplate, 96 Well, PP, V-Bottom	Greiner bio-one

3.2.3 Lösungen

FACS-Puffer:

Tabelle 5 - Bestandteile des FACS-Puffers und deren Hersteller

0,5% Bovine Serum Albumin Fraction CAS-Nr.: 9048-46-8	AppliChem PanReac EC-Nr.: 232-936-2
0,1% Natriumazid CAS-Nr.: 26628-22-8	Carl Roth
PBS Tablets Produktcode: 18912014	Thermo Fisher

Lysepuffer:

Tabelle 6 - Bestandteile des Lysepuffers und deren Hersteller

0,88% Ammoniumchlorid CAS-Nr.: 12125-02-9	AppliChem PanReac EC-Nr.: 235-186-4
0,1% Kaliumhydrogenkarbonat CAS-Nr.: 298-14-6	Merck EC-Nr.: 206-059-0
0,02% Ultrapure™ 0.5M EDTA	Thermo Fisher

Fixierungslösung

Tabelle 7 - Bestandteile der Fixierlösung und deren Hersteller

25% Formaldehydlösung 4%	Otto Fischar GmbH
PBS Tablets	Thermo Fisher

Lösungen aus dem „LEGENDplex™ Human Th Cytokine Panel (13-plex)“

(BioLegend®, San Diego, USA)

- Human Th Cytokine Panel Standard Cocktail
- LEGENDplex™ SA-PE
- LEGENDplex™ Matrix B
- LEGENDplex™ Assay Buffer (Test-Puffer)
- LEGENDplex™ Wash Buffer

3.2.4 Antikörper

Tabelle 8 - Verwendete Antikörper und deren Hersteller

Antigen	Fluorochrom	Klon	Hersteller
CD1c (BDCA-1)	PE	AD5-8E7	Miltenyi
CD11a	FITC	HI111	BioLegend
CD14	PerCPCy5.5	M5E2	BioLegend
CD19	PerCPCy5.5	HIB19	BioLegend
CD40	FITC	G28.5	BioLegend
CD86	APC	IT2.2	BioLegend
CD303	PE	AC144	Miltenyi
C3aR	A488	hC3aRZ1	AbdSerotec
C5aR (CD88)	A647	P12/1	AbdSerotec
FcR Blocking, human			Miltenyi
HLA-DR	APC	L243	BioLegend

Antikörper aus dem „LEGENDplex™ Human Th Cytokine Panel (13-plex)“

- Human Th Cytokine Panel Detection Antibodies
- Human Th Cytokine Panel Pre-mixed Beads, darin enthalten sind:
Human IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22,
IFN- γ und TNF- α Beads

3.2.5 Software

Tabelle 9 - Verwendete Software und deren Hersteller

CellQuest Pro™	BD Biosciences®, San Jose, USA
FlowJo®	FlowJo® LLC, Ashland, USA
LEGENDplex™ Data Analysis Software	BioLegend®, San Diego, USA
JMP	SAS Institute, Cary, USA
SPSS	IBM
Adobe Illustrator	Adobe Inc., Delaware, USA

3.3 Methoden

3.3.1 Quantifizierung 13 humaner Zytokine mittels Multiplex-Assay

Den Patienten wurde unmittelbar vor der MitraClip®-Implantation venöses Vollblut aus der Leiste entnommen. Beim Follow-up wurde Blut aus einer peripheren Vene verwendet. Die Blutproben wurden in Zitrat-Monovetten gefüllt. Diese Proben wurden bei 1800 g für 10 min zentrifugiert und je 1 ml Zitratplasma bei -80 °C eingefroren.

Unter Verwendung des „LEGENDplex™ Human Th Cytokine Panels (13-plex)“ (BioLegend®, San Diego, USA) wurden nach Anleitung des Herstellers die Zytokine IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IFN- γ und TNF- α untersucht. Hierfür wurde das Zitratplasma auf Eis aufgetaut. Alle Reagenzien des Tests wurden auf Raumtemperatur erwärmt. Zu Beginn wurden die gefriergetrocknete „LEGENDplex™ Matrix B“ in 5 ml „LEGENDplex™ Assay Buffer“ (Test-Puffer) und das gefriergetrocknete „Human Th Cytokine Panel Standard Cocktail“ in 250 μ l Test-Puffer gelöst. Im „Human Th Cytokine Panel Standard Cocktail“ ist jedes der 13 Zytokine in einer Konzentration von 10.000 pg/ml vorhanden. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten wurde der gelöste „Human Th Cytokine Panel Standard Cocktail“ in ein Eppendorf-Cup gefüllt (C7). In sechs weitere Eppendorf-Cups wurden je 75 μ l Test-Puffer gegeben (C6 – C1). In den Eppendorf-Cup C6 wurden 25 μ l des Standard Cocktail aus C7 pipettiert, was im Cup C6 somit eine 1:4 Verdünnung des Standard Cocktail ergab. Die Verdünnungsreihe wurde so erstellt, dass jeweils 25 μ l der Lösung des vorherigen Cups zu 75 μ l Test-Puffer gegeben wurden, bis schließlich in Eppendorf-Cup C1 eine Verdünnung von 1:4096 entstanden war. In Cup C0 wurden lediglich 75 μ l Test-Puffer gegeben.

Tabelle 10 - Erstellen der Verdünnungsreihe

Bezeichnung	Verdünnung	Konzentration (pg/ml)
C7 = Standardpräparat	unverdünnt	10.000
C6	1:4	2.500
C5	1:16	625
C4	1:64	156,3
C3	1:256	39,1
C2	1:1024	9,8
C1	1:4096	2,4
C0 = Test-Puffer	-	

Die Flasche mit den vom Hersteller gemischten Beads (Human Th Cytokine Panel Pre-mixed Beads) wurde zur Vorbereitung eine Minute in ein Ultraschallbad gelegt und anschließend 30 s gevortext, da die Beads sonst verklumpen. Jede Probe wurde in zwei Wells einer 96 Well Mikrotiterplatte mit V-Boden pipettiert. Zunächst wurde die Standardreihe erstellt, indem in ein Well jeweils 25 µl „LEGENDplex™ Matrix B“, 25 µl der Verdünnungsreihe (aus einem Eppendorf-Cup C7- C0), 25 µl der gemischten Beads und 25 µl der „Human Th Cytokine Panel Detection Antibodies“ (Detektions-Antikörper) gegeben wurden. In die restlichen Wells der Mikrotiterplatte wurden 37,5 µl Test-Puffer, 12,5 µl der jeweiligen Zitratplasma-Probe, 25 µl der gemischten Beads und 25 µl der Detektions-Antikörper gegeben.

Tabelle 11 - Bestückung der Mikrotiterplatte

Standardreihe	Zitratplasma Proben
25 µl Matrix B	37,5 µl Test-Puffer
25 µl Verdünnungsreihe	12,5 µl Zitratplasma
25 µl gemischte Beads	25 µl gemischte Beads
25 µl Detektions-Antikörper	25 µl Detektions-Antikörper

Die Platte wurde 2 h im Dunkeln bei Raumtemperatur mit 600 rpm geschüttelt. Ohne zu waschen wurden anschließend in jedes Well 25 µl Streptavidin-Phycoerythrin (LEGENDplex™ SA-PE) pipettiert und die Platte 30 min bei 600 rpm geschüttelt. Anschließend folgte eine Zentrifugation bei 1000 g für 5 min. Der Überstand wurde durch zügiges Wenden der Platte ausgekippt. Die Pellets sind am V-Boden zurückgeblieben. Durch Zugabe von je 200 µl Waschpuffer (LEGENDplex™ Wash Buffer), Resuspendieren, erneuter Zentrifugation bei 1000 g für 5 min und Auskippen des Überstands, wurden die Pellets gewaschen. Zur Analyse im FACS wurden nochmals je 150 µl Waschpuffer hinzugefügt und resuspendiert. Die Messung fand am selben Tag statt.

3.3.2 FACS-Analyse der 13 humanen Zytokine

Für die Durchflusszytometrie wurde ein FACSLyric™ (BD Biosciences®, San Jose, USA) verwendet. Jedes spezifische Bead hat eine charakteristische Größe, weshalb es im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht identifiziert werden kann. Außerdem unterscheiden sich die Beads in ihrer Fluoreszenzintensität, weshalb sie unterschiedliche Populationen bilden. Jedes Bead ist an einen Antikörper gekoppelt, der spezifisch an eines der 13 verschiedenen Zytokine bindet. Auch jeder Detektions-Antikörper passt spezifisch zu einem der 13 Zytokine. Die Antikörper umschließen sozusagen den Analyt. SA-PE wiederum bindet mit sehr hoher Affinität an Biotin der Detektions-Antikörper. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) des SA-PE im FACS ist dann proportional zur Menge des gebundenen Zytokins. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels LEGENDplex™ Data Analysis Software (BioLegend®, San Diego, USA).

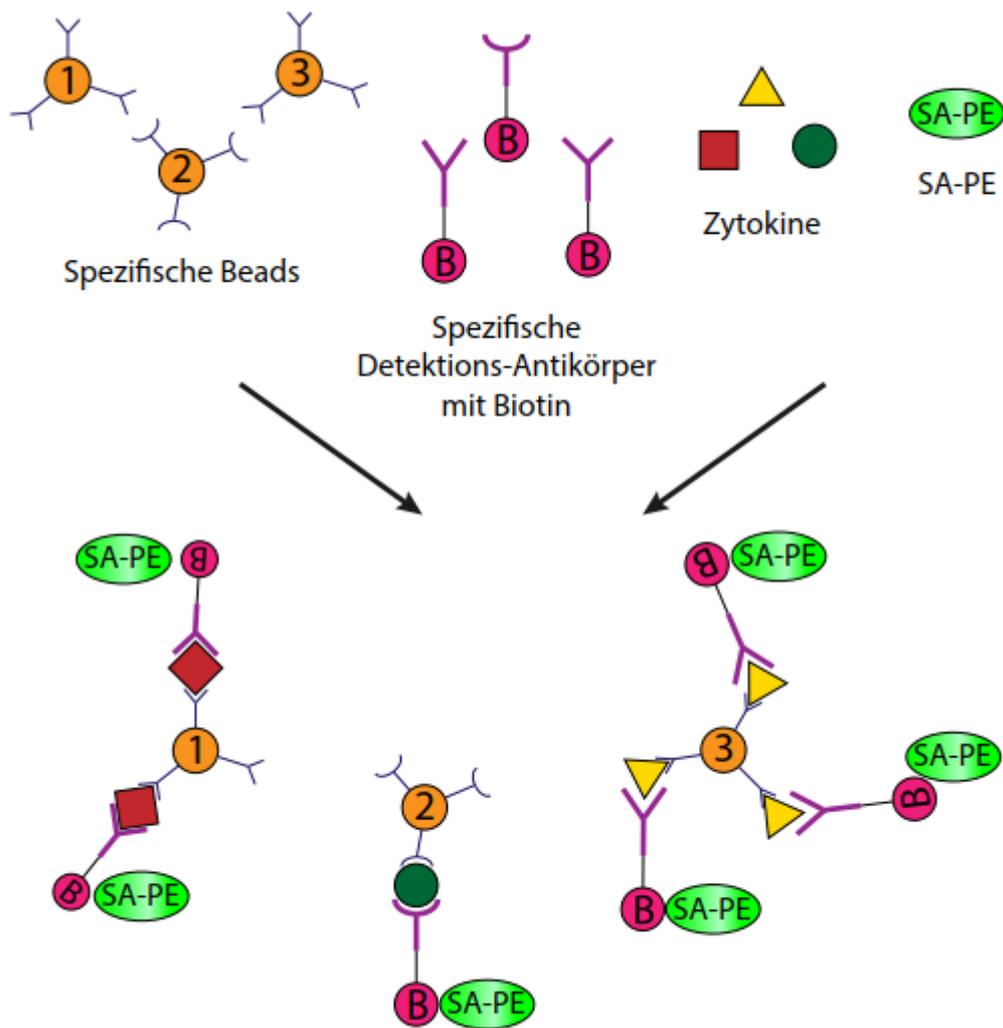


Abbildung 3 – Quantifizierung 13 humaner Zytokine

Jedes Zytokin wird von einem spezifischen Bead und einem spezifischen Detektions-Antikörper gebunden. Jeder spezifische Detektions-Antikörper enthält Biotin, an das SA-PE mit sehr hoher Affinität bindet.

3.3.3 Identifikation von dendritischen Zellen

Den Patienten wurde unmittelbar vor der MitraClip®-Implantation venöses Vollblut aus der Leiste entnommen. Beim Follow-up wurde Blut aus einer peripheren Vene verwendet. Die Blutproben wurden in Lithium-Heparin- Monovetten gefüllt. Aus diesen Proben wurde direkt, mithilfe des Sysmex, die Leukozytenzahl bestimmt. Anschließend wurde in 7 FACS-Röhrchen je 300 µl Vollblut pipettiert. Nach Zugabe von 3 ml FACS-Puffer, wurden die Proben mithilfe eines Vortexmischers durchmischt und bei 300 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt. Der Buffy-Coat musste verbleiben. Der FACS-Puffer stand während der gesamten Zeit auf Eis. Das verbleibende Pellet wurde in 3 ml Lysepuffer resuspendiert. Durch gutes Durchmischen wurde sichergestellt, dass sich das Pellet vollständig löst. Die FACS-Röhrchen inkubierten für 15 min im Dunkeln auf Eis. Die Proben sollten bei einer erfolgreichen Lyse der Erythrozyten klar geworden sein. Nach erneutem Durchmischen wurden die Proben wieder bei 300 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde bis ca. 1,5 cm über dem Boden abgesaugt. Der restliche Überstand wurde abgesaugt, während man das Röhrchen neigte, um keine Zellen des Pellets zu verlieren. Die verbleibenden Zellen wurden mit 3 ml FACS-Puffer gewaschen, bei 450 g für 5 min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt, wie zuvor beschrieben. Zu jeder Probe pipettierte man 10 µl FcR Blocking Reagenz und 40 µl FACS-Puffer und ließ sie 10 min auf Eis inkubieren. Dies soll verhindern, dass die später zugefügten Antikörper vom Fc-Rezeptor der Leukozyten und Thrombozyten abgefangen werden. Dadurch verbessert sich die spezifische Bindung der Antikörper (Miltenyi Biotec GmbH, 2013). Durch Zugabe von 2 ml FACS-Puffer, Zentrifugation bei 450 g für 5 min und Absaugen des Überstandes, wurden die Proben wieder gewaschen. Nach Beschriftung der Röhrchen, folgten alle weiteren Schritte bei minimierter Lichtexposition und bei Raumtemperatur. Als nächstes wurden drei verschiedene Antikörper-Lösungen vorbereitet. Jede der Lösungen enthielt CD14- und CD19-Antikörper, da diese Antikörper an Monozyten beziehungsweise B-Lymphozyten binden und diese Zellen dadurch während der späteren FACS-Analyse von den DZ separiert werden können. Alle weiteren Antikörper dienen der Identifikation verschiedener Oberflächenmerkmale der DZ.

Vorbereiten der Antikörper-Lösungen:

Tabelle 12 - Inhalt der Antikörperlösungen

Lösung 1	Lösung 2	Lösung 3
11 µl CD40-Ak	11 µl CD11a-Ak	44 µl C3aR-Ak
11 µl CD86-Ak	11 µl HLA-DR-Ak	44 µl C5aR-Ak
11 µl CD14 -Ak	11 µl CD14-Ak	5,5 µl CD14-Ak
11 µl CD19-Ak	11 µl CD19-Ak	5,5 µl CD19-Ak
132 µl FACS-Puffer	132 µl FACS-Puffer	

In je zwei FACS-Röhrchen wurde eine der drei vorbereiteten Antikörperlösungen pipettiert. In die Hälfte der Röhrchen wurden 10µl CD1c-Ak zugefügt, in die andere Hälfte 10µl CD303-Ak. Ein Röhrchen blieb ohne Antikörperlösung, ungefärbt als Kontrolle. CD1c-Ak markieren hierbei myeloide DZ (mDZ) und CD303-Ak markieren plasmazytoide DZ (pDZ).

Pipettierschema:

Tabelle 13 - Pipettierschema der 7 FACS-Röhrchen

Röhrchen	Antikörper-Lösung	Zusätzlicher Antikörper
1.1	40 µl Lösung 1	10 µl CD1c-Ak
1.2	40 µl Lösung 1	10 µl CD303-Ak
2.1	40 µl Lösung 2	10 µl CD1c-Ak
2.2	40 µl Lösung 2	10 µl CD303-Ak
3.1	45 µl Lösung 3	10 µl CD1c-Ak
3.2	45 µl Lösung 3	10 µl CD303-Ak
U (Ungefärbt)	50 µl FACS-Puffer	

Nach 10 min Inkubation im Dunkeln, wurden die Ansätze mit 3 ml FACS-Puffer, Zentrifugation bei 450 g für 5 min und anschließendem Absaugen des Überstandes, gewaschen. Zur Fixierung der Zellen inkubierten die Proben mit je 250 µl 1% PFA für 10 min im Dunkeln und wurden gewaschen, wie eben beschrieben. Nach Zugabe von 300 µl FACS-Puffer wurden die Ansätze bei 4 °C aufbewahrt, bis sie noch am selben Tag im FACS-Calibur analysiert wurden.

3.3.4 FACS-Analyse der dendritischen Zellen

Im Durchflusszytometer werden die Zellen nach ihrem Volumen und ihrer Granularität aufgetrennt. Zur graphischen Darstellung der Verteilung der peripheren Leukozyten, wurde auf der x-Achse das Vorwärtsstreulicht (FSC), was dem Volumen entspricht und auf der y-Achse das Seitwärtsstreulicht (SSC), was der Granularität entspricht, aufgetragen. Die Flussrate wurde auf „low“ gestellt und die Proben wurden mit FACS-Puffer soweit verdünnt, bis ca. 1000 Zellen pro Sekunde gemessen wurden. Da es sich bei DZ um eine kleine Zellpopulation handelt, wurden pro Patient je drei Proben für mDZ und drei Proben für pDZ gemessen und daraus der Durchschnitt berechnet, um möglichst genaue Werte zu erhalten. Zur Auswertung der Ergebnisse wurde die Software FlowJo® (FlowJo® LLC, Ashland, USA) verwendet. Aufgrund der kleinen Zellpopulation wurde eine besondere Gating-Strategie nach Yilmaz zur Auswertung verwendet (Yilmaz et al., 2006). Als erstes wurden die Zellen nach ihrem Volumen (FSC) und ihrer Granularität (SSC) aufgeteilt und dadurch die Leukozyten separiert. Im nächsten Schritt wurden die Leukozyten in Granulozyten (hohe Granularität), Monozyten (CD14 positiv), B-Lymphozyten (CD19 positiv) und DZ aufgeteilt. Im letzten Schritt wurden dann Vorläuferzellen von mDZ (CD1c positiv) und pDZ (CD303 positiv) identifiziert.

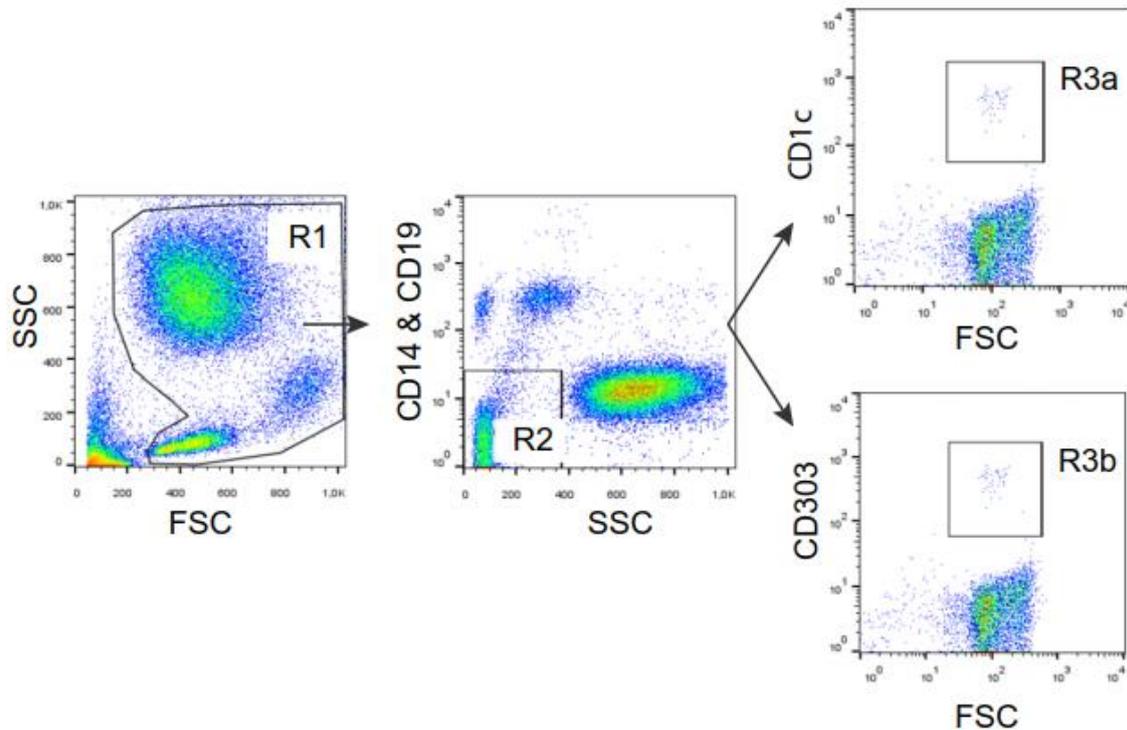


Abbildung 4 – Gating-Strategie nach Yilmaz

Zur Identifikation der Vorläuferzellen von mDZ und pDZ:

R1: Leukozyten werden isoliert, indem die Zellen nach ihrem Volumen im Vorwärtsstreulicht (FSC) und ihrer Granularität im Seitwärtsstreulicht (SSC) aufgeteilt werden. R2: Monozyten (CD14 positiv), B-Lymphozyten (CD19 positiv) und Granulozyten (hohe Granularität im SSC) werden ausgeschlossen. R3a: Extraktion der mDZ-Vorläufer (CD1c positiv). R3b: Extraktion der pDZ-Vorläufer (CD303 positiv).

Mittels dieser Auswertung erhält man den prozentualen Anteil der mDZ und pDZ an den Leukozyten. Die absolute Zahl der mDZ und pDZ (Zellen/ μ l) wird mithilfe der zu Beginn aus dem Vollblut gemessenen Leukozytenzahl berechnet.

3.3.5 FACS-Analyse der Oberflächenrezeptoren auf dendritischen Zellen

In jeder Probe sind die verwendeten Ak zur Analyse der Oberflächenrezeptoren auf DZ an unterschiedliche Fluorochrome gekoppelt (siehe Tabelle 8). Die verwendeten Ak leuchten somit während der FACS-Analyse in verschiedenen Farben. Da ein Ak spezifisch einen bestimmten Oberflächenrezeptor bindet, ist die Fluoreszenzintensität proportional zur Menge der gebundenen Oberflächenrezeptoren.

3.3.6 Nicht parametrisch Korrelation zwischen der Änderung der Mitralklappeninsuffizienz und der MFI von TNF- α und IL-21

Bei jedem Patienten erfolgte, bei bereits eingeleiteter Sedierung und konstanter Hämodynamik, unmittelbar vor und nach MitraClip-Implantation die Bestimmung der MI mittels TEE nach den Empfehlungen der „European Association of Echocardiography“ (Lancellotti et al., 2010). Die direkte Reduktion der MI wurde berechnet, indem die MI nach Implantation (MI_{post}) von der MI vor Implantation ($MI_{\text{prä}}$) subtrahiert wurde ($\Delta MI = MI_{\text{prä}} - MI_{\text{post}}$). Was bedeutet, je größer dieser Wert ausfällt, umso größer war der Effekt des MitraClip®. Zudem wurde für jeden Patienten, wie in Kapitel 3.3.2 beschrieben, die MFI von TNF- α und IL-21 vor (PräMC) und acht Monate nach (Follow-up) MitraClip®-Implantation gemessen. Die Änderung der MFI wurde berechnet, indem die MFI PräMC von der MFI Follow-up subtrahiert wurde ($\Delta MFI = \text{Follow-up} - \text{PräMC}$). Bei nicht normalverteilten Daten wurde anschließend eine nicht parametrische Korrelation mittels Spearman-Test durchgeführt, um den Einfluss der direkten Verringerung der MI durch Implantation des MitraClip®-Systems auf die Veränderung der MFI von TNF- α und IL-21 zu ermitteln.

3.3.7 Statistische Methoden

Als Statistiksoftware wurde JMP (SAS Institute, Cary, USA) und SPSS (IMB, Armonk, New York, USA) verwendet. Bei nicht normalverteilten, verbundenen Stichproben wurde ein Wilcoxon-Rang-Test verwendet. Bei nicht normalverteilten, unverbundenen Stichproben wurde ein Wilcoxon-Mann-Whitney-Test angewandt. Für die nicht parametrische Korrelation wurde ein Spearman-Test angewandt. Der zweiseitige p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Patientencharakteristika

Wie in Kapitel 3.1 Patientenkollektiv beschrieben, wurden die Patienten in die Studie aufgenommen, die eine minimalinvasive Behandlung bei Mitralklappeninsuffizienz (MitraClip®) erhielten und auch am Follow-up teilnahmen. In Tabelle 14 sind die wichtigsten Basischarakteristika der MitraClip®-Patienten und der Kontrollgruppe aufgelistet.

Tabelle 14: Basischarakteristika der Patientengruppen

	MitraClip®-Patienten	Kontrollgruppe
Anzahl	156	40
Alter (Jahre)	77,6 (42 - 90)	63,6 (23,9 - 86,9)
Männliches Geschlecht	91 (58,3%)	34 (85%)
NYHA-Stadium 3 - 4	127 (81,4%)	6 (15%)
KHK	114 (73,1%)	31 (77,5%)
Vorhofflimmern	104 (66,6%)	9 (22,5%)
Hypertonie	108 (69,2%)	32 (80%)
Raucher	25 (16,0%)	12 (30%)
Diabetes	41 (26,3%)	8 (20%)
Hyperlipoproteinämie	68 (43,6%)	20 (50%)
Niereninsuffizienz	67 (42,9%)	6 (15%)
Betablocker	132 (84,6%)	29 (72,5%)
Aldosteronantagonisten	90 (57,7%)	10 (25%)
Diuretika	138 (88,5%)	21 (52,5%)
Digitalisglykoside	14 (9,0%)	1 (2,5%)
Calcium-Antagonisten	27 (17,3%)	10 (25%)
Antikoagulation	106 (67,9%)	11 (27,5%)
Leukozyten / μ l	7760 (3250 - 16420)	7920 (3660 - 17810)
CRP (mg/dl)	1,06 (0 - 15,7)	1,02 (0 - 8,18)

4.2 Zytokine

Aus dem Zitratplasma von 156 Patienten wurden je 13 verschiedene Zytokine mittels eines Bead-basierten-Immunoassays quantifiziert (siehe Kapitel 3.3.1). Das Zitratplasma wurde den Patienten vor dem MitraClip®-Eingriff (präMC) und im Schnitt nach 8,47 Monaten (Follow-up) entnommen. Bei einer Kontrollgruppe von 40 Patienten wurde das gleiche Verfahren angewandt (Kontrolle). Jedes Zytokin wurde spezifisch von einem Detektionsantikörper gebunden. An diesen band wiederum SA-PE (s. Abbildung 3). Die Fluoreszenzintensität des SA-PE wurde im FACS gemessen und war proportional zur Menge des Analyten. Da im Plasma nur eine sehr geringe Zytokinmenge vorlag, wurde diese hier weiterhin als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) angegeben, da eine Umrechnung in pg/ml zu ungenau wäre. Die MFI ist ein Maß dafür, wie viel Fluoreszenzfarbstoff pro Partikel gebunden ist. Die wichtigsten Ergebnisse wurden nachfolgend in Ausreißer-Box-and-Whiskers-Plots dargestellt. Hierbei markiert die Linie innerhalb des Rechtecks (Box) den Median. Die untere Begrenzung der Box ist das 25%-Quantil (Q_1), die obere, das 75%-Quantil (Q_3). Die Länge der Box entspricht somit dem Interquartilsabstand ($Q_3 - Q_1$). Die senkrechten Linien, die sich an die Box anschließen (Whiskers) sind maximal so lang, wie der 1,5 fache Interquartilsabstand oder sie enden vorher an dem letzten Wert, der sich noch innerhalb dieser Spannweite befindet. Alle Werte, die darüber oder darunter liegen, werden als Ausreißer betrachtet. Die Ergebnisse wurden nach Relevanz sortiert.

4.2.1 Proinflammatorische Zytokine

4.2.1.1 Interleukin-9

Die größte Änderung der gemessenen MFI zwischen vor und nach dem MitraClip®-Eingriff zeigte sich bei Interleukin-9. Der Median der PräMC-Gruppe lag bei 124,4 MFI, $Q_1 = 107,5$ MFI, $Q_3 = 152,9$ MFI. Für die Follow-up-Gruppe betrug der Median 163,4 MFI, $Q_1 = 138,1$ MFI, $Q_3 = 206,4$ MFI. Im Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test ergab sich für diese beiden Gruppen ein signifikanter Unterschied in der MFI von IL-9 mit $p < 0,0001$. Die MFI von IL-9 der Kontrollgruppe lag jeweils signifikant unter der MFI, jeder der anderen beiden Gruppen (Follow-up gegen Kontrolle, $p < 0,0001$; PräMC gegen Kontrolle, $p = 0,02$): Der Median der Kontrollgruppe lag bei 112,7 MFI, $Q_1 = 101,5$ MFI, $Q_3 = 136,7$ MFI.

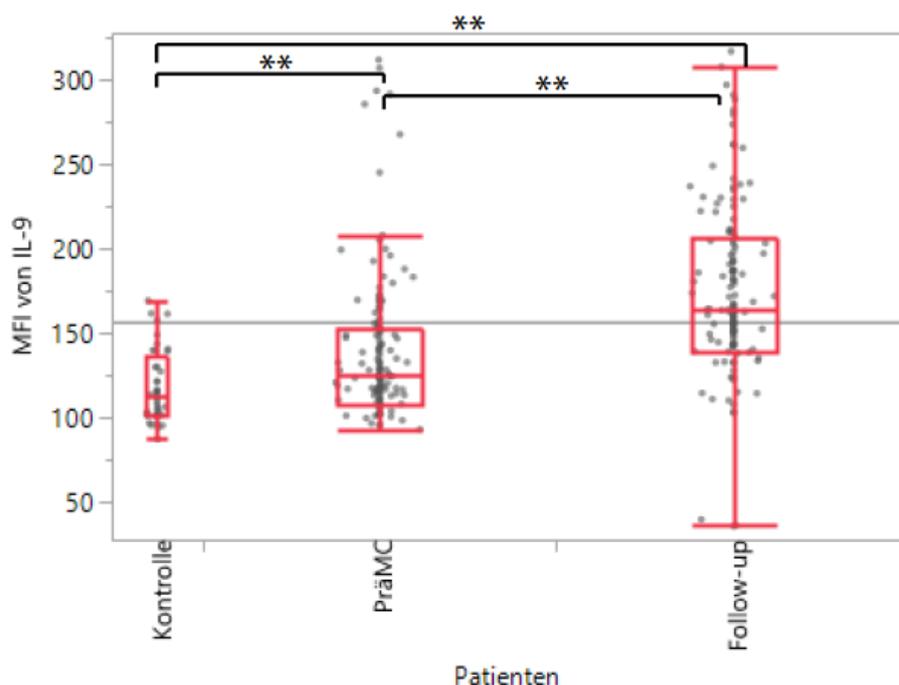


Abbildung 5 - Signifikanter Anstieg der MFI von IL-9

Bei 156 Patienten wurde die MFI von IL-9 vor Implantation des MitraClip® (PräMC), mit der MFI von IL-9 nach Implantation (Follow-up) verglichen. Zur Kontrolle wurde die MFI von IL-9 bei 40 Patienten gemessen, die keinen MitraClip® erhalten haben (Kontrolle).

** $p < 0,0001$

4.2.1.2 Interleukin-5

Die MFI von Interleukin-5 im Zitratplasma war bei der Kontrolle und der PräMC-Gruppe sehr ähnlich. Jedoch fand sich eine signifikant höhere MFI bei den Follow-up-Proben (Follow-up gegen PräMC, $p < 0,0001$; Follow-up gegen Kontrolle, $p < 0,0001$). Der Median der PräMC-Gruppe betrug 78,9 MFI, $Q_1 = 69,6$ MFI, $Q_3 = 94,7$ MFI. Für die Follow-up-Gruppe lag der Median bei 83,7 MFI, $Q_1 = 72,3$ MFI, $Q_3 = 98,2$ MFI. Der Median der Kontrollgruppe betrug 79,4 MFI, $Q_1 = 70,6$ MFI, $Q_3 = 93,1$ MFI.

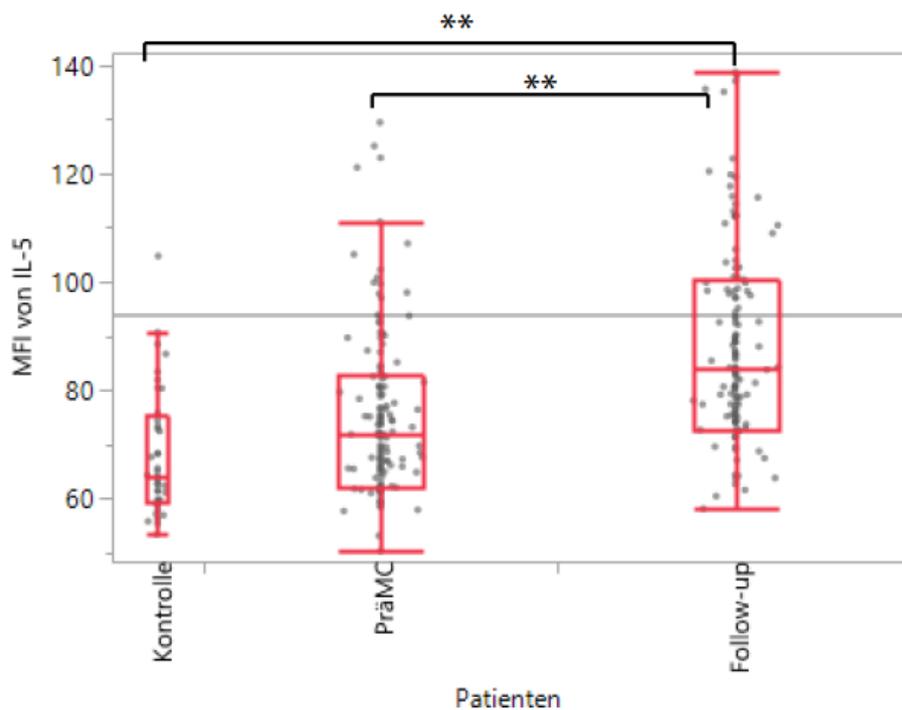


Abbildung 6 - Signifikanter Anstieg der MFI von IL-5

Bei 156 Patienten wurde die MFI von IL-5 vor Implantation des MitraClip® (PräMC), mit der MFI von IL-5 nach Implantation (Follow-up) verglichen. Zur Kontrolle wurde die MFI von IL-5 bei 40 Patienten gemessen, die keinen MitraClip® erhalten haben (Kontrolle).
** $p < 0,0001$

4.2.1.3 Interleukin-2

Bei der Messung der MFI von Interleukin-2 zeigte sich ebenfalls der Einfluss der MitraClip®-Therapie. Auch hier wurde ein signifikanter Unterschied in der MFI von IL-2 zwischen der PräMC und der Follow-up-Gruppe ermittelt ($p < 0,0001$). Der Median der PräMC-Gruppe lag bei 66,7 MFI, $Q_1 = 62,3$ MFI, $Q_3 = 74,4$ MFI. Für die Follow-up-Gruppe betrug der Median 69,5 MFI, $Q_1 = 63,9$ MFI, $Q_3 = 76,7$ MFI. Der Median der Kontrollgruppe war 65,9 MFI, $Q_1 = 62,8$ MFI, $Q_3 = 76,9$ MFI. Im Vergleich der Kontrollgruppe mit der PräMC-Gruppe beziehungsweise der Follow-up-Gruppe konnte im Wilcoxon-Mann-Whitney-Test kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

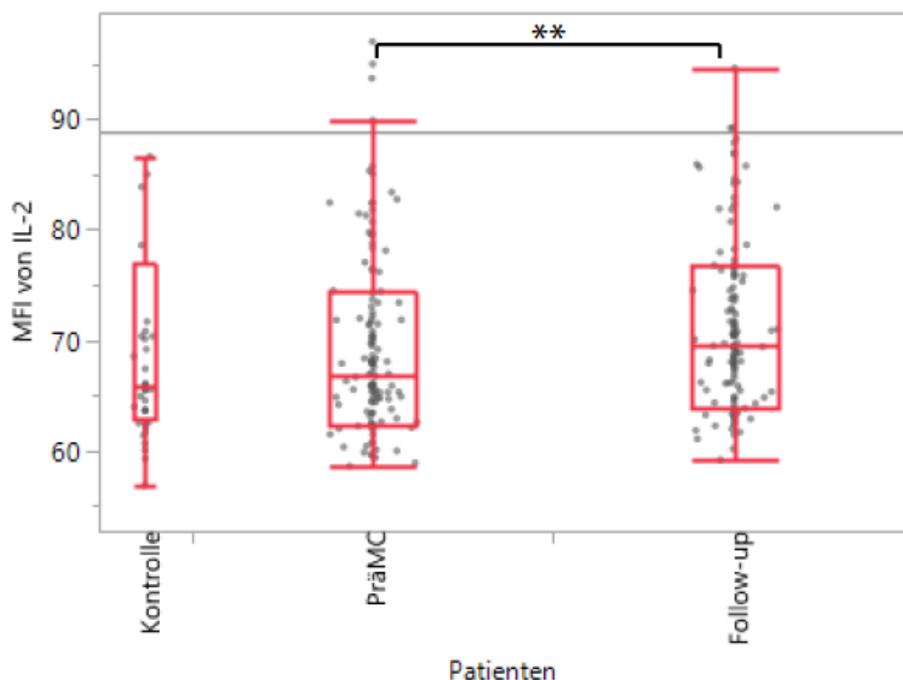


Abbildung 7 - Signifikanter Anstieg der MFI von IL-2

Bei 156 Patienten wurde die MFI von IL-2 vor Implantation des MitraClip® (PräMC), mit der MFI von IL-2 nach Implantation (Follow-up) verglichen. Zur Kontrolle wurde die MFI von IL-2 bei 40 Patienten gemessen, die keinen MitraClip® erhalten haben (Kontrolle).

** $p < 0,0001$

4.2.1.4 Interleukin-13

Die MFI von Interleukin-13, die im Zitratplasma der PräMC-Gruppe gemessen wurde, entsprach ungefähr der MFI, die auch bei der Kontrollgruppe vorlag. Der Median der PräMC-Gruppe betrug 78,9 MFI, $Q_1 = 69,6$ MFI, $Q_3 = 94,7$ MFI. Der Median der Kontrollgruppe lag bei 79,4 MFI, $Q_1 = 70,6$ MFI, $Q_3 = 93,1$ MFI. Hin- gegen lag eine signifikant höhere MFI von IL-13 nach der MitraClip®-Therapie vor (PräMC gegen Follow-up, $p = 0,0002$). Der Median der Follow-up-Gruppe betrug 83,7 MFI, $Q_1 = 72,3$ MFI, $Q_3 = 98,2$ MFI.

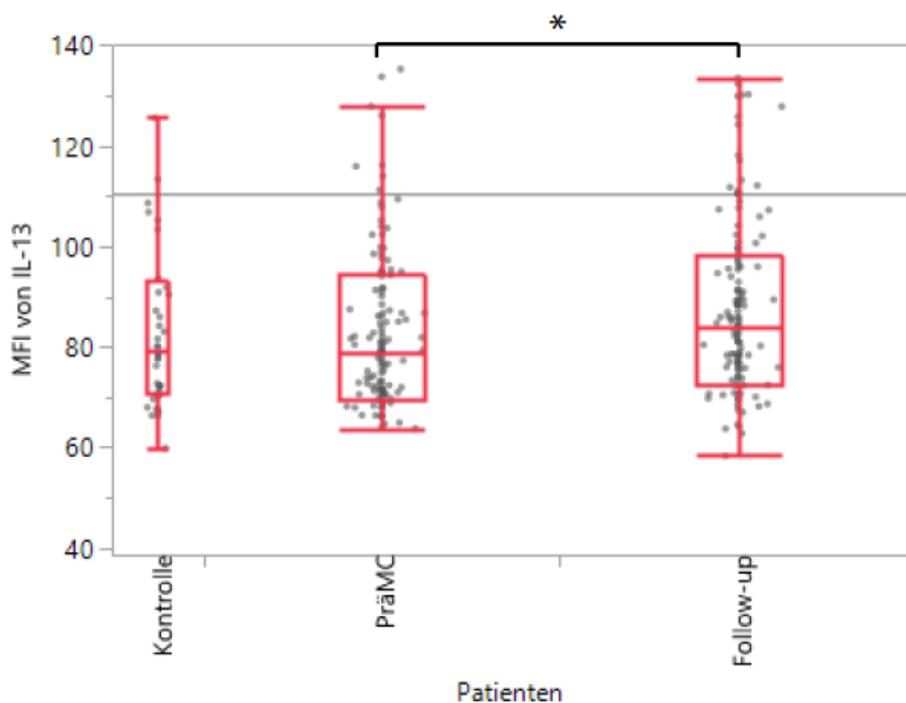


Abbildung 8 - Signifikanter Anstieg der MFI von IL-13

Bei 156 Patienten wurde die MFI von IL-13 vor Implantation des MitraClip® (PräMC), mit der MFI von IL-13 nach Implantation (Follow-up) verglichen. Zur Kontrolle wurde die MFI von IL-13 bei 40 Patienten gemessen, die keinen MitraClip® erhalten haben (Kontrolle).

* $p < 0,05$

4.2.1.5 Interleukin-21

Bei der Untersuchung der MFI von Interleukin-21 zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied im Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test zwischen der PräMC- und der Follow-up-Gruppe ($p < 0,0001$). Der Median der PräMC-Gruppe lag bei 90,6 MFI, $Q_1 = 82,7$ MFI, $Q_3 = 112,6$ MFI. Der Median der Follow-up-Gruppe betrug 88,1 MFI, $Q_1 = 82,5$ MFI, $Q_3 = 97,8$ MFI. Hier fiel besonders die Veränderung des Interquartilsabstands auf. Der Interquartilsabstand der PräMC-Gruppe betrug 29,9 MFI, der der Follow-up-Gruppe hingegen nur noch 15,3 MFI. Das 25-%-Quantil war bei beiden Gruppen ähnlich hoch (82,7 gegen 82,5). Das 75-%-Quantil war bei der PräMC-Gruppe dagegen deutlich höher, als beim Follow-up (112,6 gegen 97,8). Zwischen der Kontrollgruppe und den anderen beiden Gruppen konnten keine signifikanten Unterschiede in der MFI von IL-21 festgestellt werden. Bei der Kontrollgruppe lag der Median bei 90,5 MFI, $Q_1 = 84,1$ MFI, $Q_3 = 97,2$ MFI. Der Interquartilsabstand betrug 13,1 MFI und ähnelte somit dem der Follow-up-Gruppe.

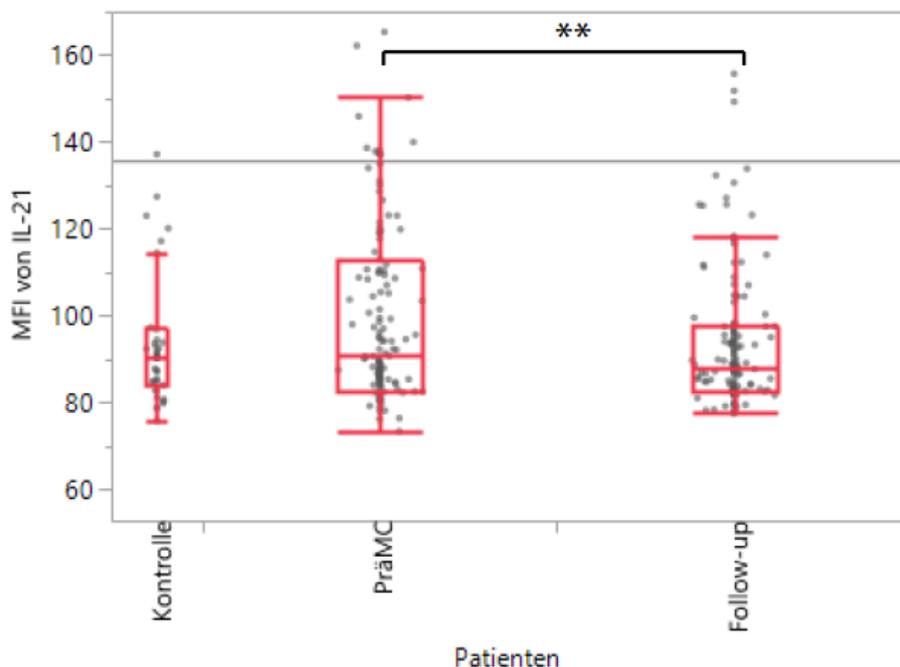


Abbildung 9 - Signifikante Reduktion der MFI von IL-21

Bei 156 Patienten wurde die MFI von IL-21 vor Implantation des MitraClip® (PräMC), mit der MFI von IL-21 nach Implantation (Follow-up) verglichen. Zur Kontrolle wurde die MFI von IL-21 bei 40 Patienten gemessen, die keinen MitraClip® erhalten haben (Kontrolle).

** $p < 0,0001$

4.2.1.6 Interleukin-17A

Die MFI von Interleukin-17A veränderte sich signifikant im Vergleich von vor und nach dem MitraClip®-Eingriff (PräMC gegen Follow-up, $p = 0,0003$). Der Median der PräMC-Gruppe betrug 46,0 MFI, $Q_1 = 37,3$ MFI, $Q_3 = 66,7$ MFI. Der Median der Follow-up-Gruppe lag bei 43,4 MFI, $Q_1 = 37,8$ MFI, $Q_3 = 55,3$ MFI. Auch hier fiel ein größerer Interquartilsabstand der PräMC- im Vergleich zur Follow-up-Gruppe auf (29,4 MFI gegen 17,5 MFI). Der Median der Kontrollgruppe lag bei 40,8 MFI, $Q_1 = 35,5$ MFI, $Q_3 = 49,1$ MFI. Der Interquartilsabstand betrug 13,6. Die MFI von IL-17A, die bei der Kontrollgruppe im Serum vorlag ähnelte der MFI, die bei der Follow-up-Gruppe gemessen wurde.

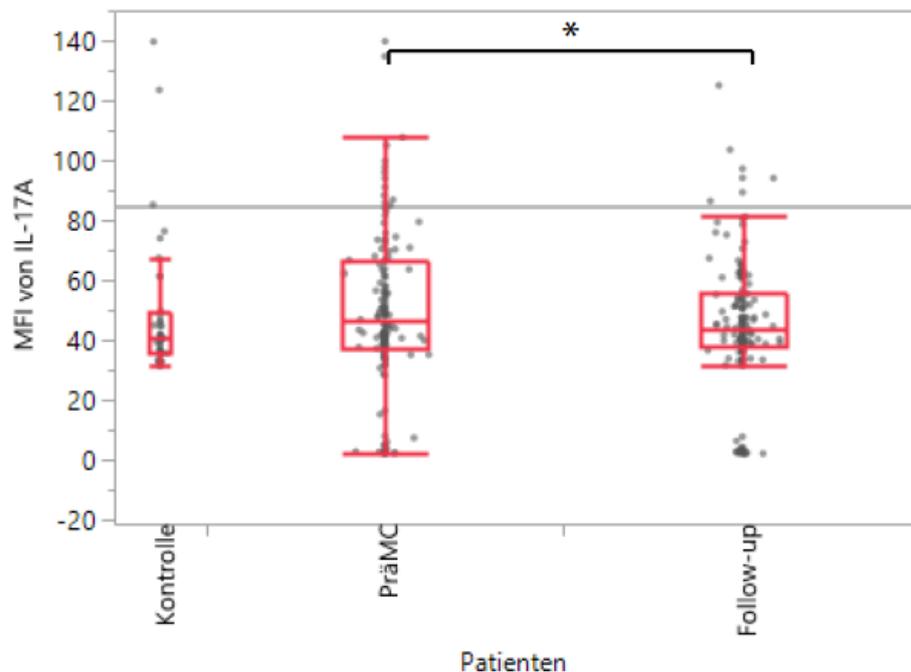


Abbildung 10 - Signifikante Reduktion der MFI von IL-17A

Bei 156 Patienten wurde die MFI von IL-17A vor Implantation des MitraClip® (PräMC), mit der MFI von IL-17A nach Implantation (Follow-up) verglichen. Zur Kontrolle wurde die MFI von IL-17A bei 40 Patienten gemessen, die keinen MitraClip® erhalten haben (Kontrolle). * $p < 0,05$

4.2.1.7 Tumornekrosefaktor- α

Bei der Bestimmung der MFI von Tumornekrosefaktor- α zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den PräMC- und den Follow-up-Proben ($p = 0,003$). Der Median der PräMC-Gruppe lag bei 36,3 MFI, $Q_1 = 31,3$ MFI, $Q_3 = 49,9$ MFI. Der Median der Follow-up-Gruppe betrug 35,0 MFI, $Q_1 = 31,7$ MFI, $Q_3 = 43,2$ MFI. Zwischen der Kontrollgruppe und den anderen beiden Gruppen konnten im Wilcoxon-Mann-Whitney-Test keine signifikanten Unterschiede in der MFI von TNF- α festgestellt werden. Der Median der Kontrollgruppe lag bei 34,5 MFI, $Q_1 = 30,7$ MFI, $Q_3 = 45,0$ MFI.

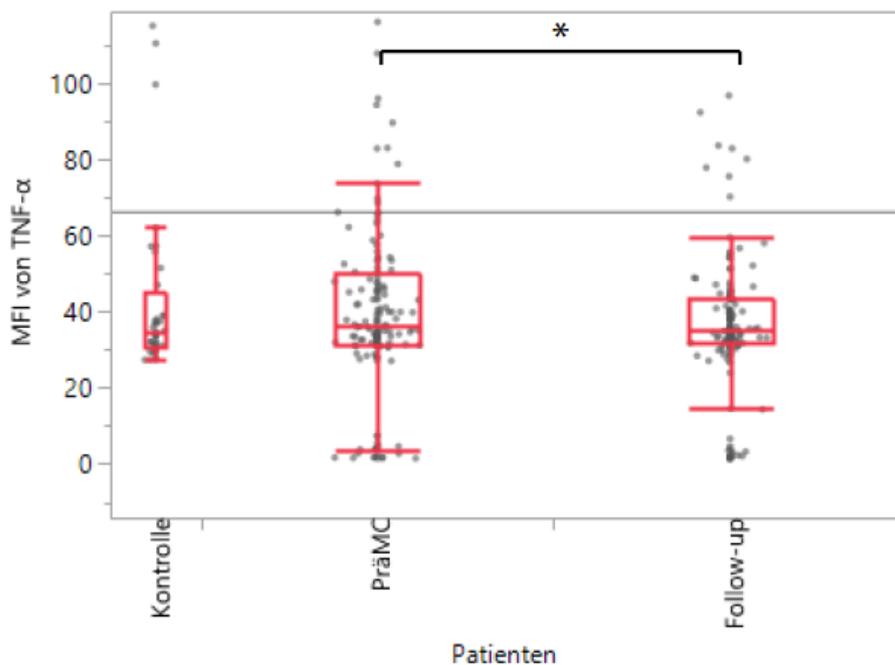


Abbildung 11 - Signifikante Reduktion der MFI von TNF- α

Bei 156 Patienten wurde die MFI von TNF- α vor Implantation des MitraClip® (PräMC), mit der MFI von TNF- α nach Implantation (Follow-up) verglichen. Zur Kontrolle wurde die MFI von TNF- α bei 40 Patienten gemessen, die keinen MitraClip® erhalten haben (Kontrolle). * $p < 0,05$

4.2.1.8 Interleukin-4, Interleukin-6, Interleukin-17F, Interleukin-22, Interferon- γ

Wie bei den zuvor erwähnten Zytokinen, wurde auch bei Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-17F (IL-17F), Interleukin-22 (IL-22) und Interferon- γ (IFN- γ) die jeweilige MFI aus dem Zitratplasma bestimmt. Jedoch konnten bei diesen Analyten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe, den Proben vor MitraClip® -Therapie und den Proben nach Therapie festgestellt werden. Im Wilcoxon-Rang-Test zur Messung einer signifikanten Veränderung der MFI zwischen Proben vor MitraClip®-Therapie und den Proben nach Therapie ergab ich für IL 4 $p = 0,8869$, für IL-6 $p = 0,3109$, für IL-17F $p = 0,3509$, für IL-22 $p = 0,5230$ und für IFN- γ $p = 0,3187$.

4.2.2 Antiinflammatorisches Interleukin-10

Die Veränderung der MFI von Interleukin-10 verhielt sich ähnlich zu IL-9. Auch hier wurde eine signifikant erhöhte MFI von IL-10 beim Follow-up im Vergleich zur PräMC-Gruppe gemessen ($p < 0,0001$). Der Median der PräMC-Gruppe lag hier bei 98,1 MFI, $Q_1 = 80,3$ MFI, $Q_3 = 115,2$ MFI. Für die Follow-up-Gruppe betrug der Median 112,2 MFI, $Q_1 = 96,3$ MFI, $Q_3 = 139,2$ MFI. Die MFI des IL-10 der Kontrollgruppe lag wieder sowohl signifikant unter den MFI der Follow-up-Gruppe, als auch signifikant unter der PräMC-Gruppe (Follow-up gegen Kontrolle, $p < 0,0001$; präMC gegen Kontrolle, $p = 0,0018$). Der Median der Kontrollgruppe betrug 112,2 MFI, $Q_1 = 96,3$ MFI, $Q_3 = 139,2$ MFI.

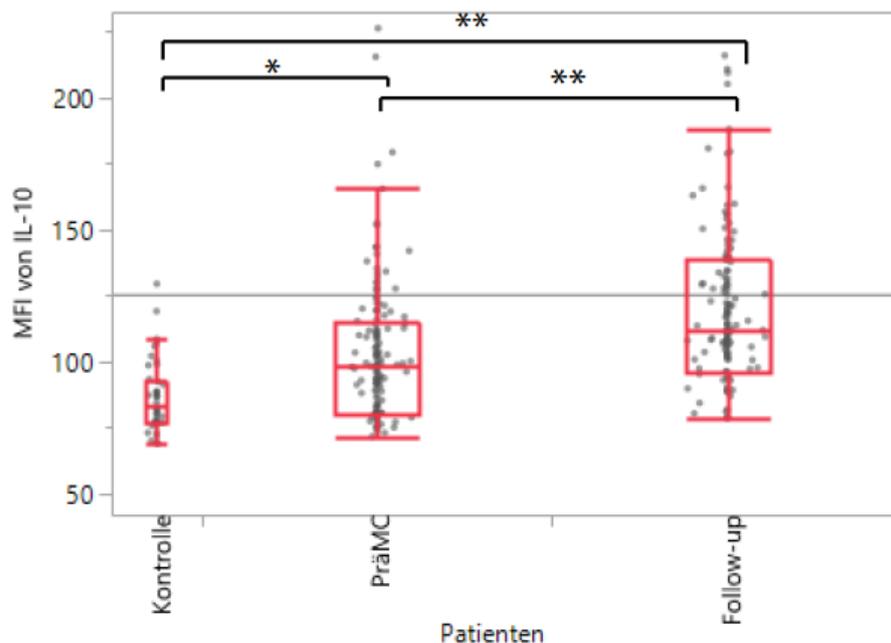


Abbildung 12 - Signifikanter Anstieg der MFI von IL-10

Bei 156 Patienten wurde die MFI von IL-10 vor Implantation des MitraClip® (PräMC), mit der MFI von IL-10 nach Implantation (Follow-up) verglichen. Zur Kontrolle wurde die MFI von IL-10 bei 40 Patienten gemessen, die keinen MitraClip® erhalten haben (Kontrolle).

* $p < 0,05$ ** $p < 0,0001$

4.3 Durchflusszytometrische Analyse plasmazytoider und myeloider dendritischer Zellen

4.3.1 Die Zellzahl

Bei einer Subpopulation von 64 Patienten wurden zusätzlich zu den Zytokinen die relative und absolute Anzahl der pDZ und mDZ untersucht. Eine Analyse erfolgte vor (präMC) und im Schnitt 8,48 Monate nach dem MitraClip®-Eingriff (Follow-up). Die kleine Zellpopulation wurde wie in Kapitel 3.3.4 FACS-Analyse der dendritischen Zellen beschrieben, identifiziert.

Der Anteil der pDZ an der gesamt Leukozytenanzahl lag zwischen 0,007% bis 0,42%, der der mDZ zwischen 0,01% bis 0,39%. Das entsprach einer tatsächlichen Zellzahl der pDZ von 0,5 / μ l bis 14,7 / μ l und der mDZ von 0,6 / μ l bis 18,1 / μ l. Festgestellt wurde eine signifikant niedrigere relative und absolute pDZ-Zahl vor dem Eingriff gegenüber der Kontrollgruppe ($p = 0,0003$). Nach 8,47 Monaten war die relative und absolute Zahl der pDZ signifikant gestiegen ($p < 0,0001$) und hatte sich der Kontrollgruppe eindeutig angenähert.

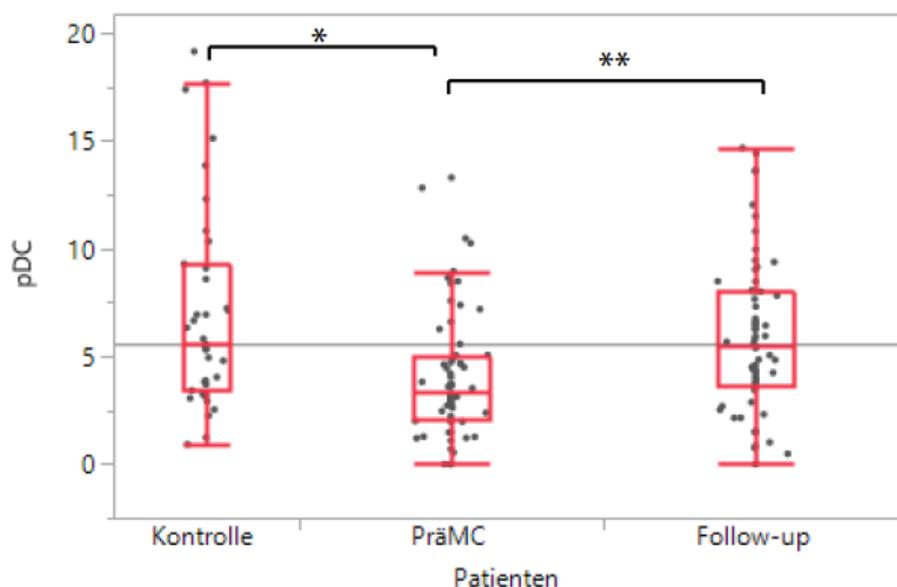


Abbildung 13 - Veränderung der absoluten Zellzahl der pDZ

Bei 64 Patienten wurde die absolute Zellzahl der pDZ vor Implantation des MitraClip® (PräMC), mit der absoluten Zellzahl der pDZ nach Implantation (Follow-up) verglichen. Zur Kontrolle wurde die absolute Zellzahl der pDZ bei 40 Patienten gemessen, die keinen MitraClip® erhalten haben (Kontrolle). * $p < 0,05$ ** $p < 0,0001$

Bei der Ermittlung der absoluten Zellzahl der pDZ ergaben sich folgende Kenngrößen:

Median der Kontrollgruppe: 5,6 / μ l, $Q_1 = 3,4$ / μ l, $Q_3 = 9,3$ / μ l.

Median der PräMC-Proben: 3,4 / μ l, $Q_1 = 2,1$ / μ l, $Q_3 = 5,0$ / μ l

Median der Follow-up-Proben: 5,5 / μ l, $Q_1 = 3,6$ / μ l, $Q_3 = 8,0$ / μ l

Die relative und absolute Zellzahl der myeloiden dendritischen Zellen hat sich durch die MitraClip®- Therapie nicht signifikant verändert. Auch im Vergleich der Kontrollgruppe mit der Therapiegruppe konnten keine signifikanten Unterschiede in der mDZ-Zahl nachgewiesen werden.

4.3.2 Der costimulatorische Oberflächenrezeptor HLA-DR

Ergänzend zur Bestimmung der pDZ- und mDZ-Zahl wurde die Expression des costimulatorischen Oberflächenrezeptors HLA-DR untersucht. Um die Expression des Rezeptors zu messen, wurden die Rezeptoren mit einem Antikörper markiert. Im FACS wurde dann die MFI gemessen. Damit wurde untersucht, ob sich die Expression des costimulatorischen Rezeptors HLA-DR auf den dendritischen Zellen verändert. Hierbei konnte weder auf mDZ noch auf pDZ eine signifikant unterschiedliche Expression des Rezeptors vor dem MitraClip®-Eingriff und im Follow-up (nach 8,47 Monaten) festgestellt werden. Allein die Expression des HLA-DR auf pDZ der Kontrollgruppe und auf denen der Follow-up-Proben war signifikant unterschiedlich ($p=0,04$). Der Median der Kontrollgruppe betrug 348 MFI, $Q_1 = 283$ MFI, $Q_3 = 476$ MFI. Der Median der PräMC-Gruppe betrug 373 MFI, $Q_1 = 278$ MFI, $Q_3 = 598$ MFI. Der Median der Follow-up-Gruppe betrug 405 MFI, $Q_1 = 315$ MFI, $Q_3 = 586$ MFI.

4.4 Eine Korrelation zwischen der Reduktion der MI und der MFI von TNF- α und IL-21

Wie in Kapitel 3.3.6 beschrieben, wurde bei jedem Patienten die direkte Reduktion der MI durch Implantation des MitraClip®-Systems gemessen. Je größer die Reduktion der MI, umso größer war der Effekt des Clips. Die Änderung der MFI von TNF- α und IL-21 wurde berechnet, indem die MFI vor Implantation (PräMC) von der MFI acht Monate nach Implantation (Follow-up) subtrahiert wurde ($\Delta\text{MFI} = \text{Follow-up} - \text{PräMC}$). Wenn die Zytokinmenge im Follow-up gesunken war, ergab sich demnach eine negative Änderung der MFI. Mittels Spearman-Test wurde eine nicht parametrische Korrelation zwischen der direkten Reduktion der MI und der Veränderung der MFI von TNF- α vor und acht Monate nach MitraClip®-Implantation erstellt. Diese ergab einen Korrelationskoeffizienten von -0,182 mit einer Signifikanz von $p = 0,026$. Was bedeutet, je größer die direkte Reduktion der MI, desto größer war die Veränderung der MFI von TNF- α . Bei einer großen direkten Verringerung der MI war zum Zeitpunkt des Follow-up eine deutlich geringere MFI von TNF- α messbar, als vor Implantation des Clips. Ein vergleichbares Ergebnis ergab sich bei der nicht parametrischen Korrelation zwischen der direkten Reduktion der MI und der Veränderung der MFI von IL-21 vor und acht Monate nach MitraClip®-Implantation. Der Korrelationskoeffizient betrug -0,170 mit einer Signifikanz von $p = 0,037$. Was bedeutet, je größer die direkte Reduktion der MI, desto größer war die Veränderung der MFI von IL-21. Bei einer großen direkten Verringerung der MI war zum Zeitpunkt des Follow-up eine deutlich geringere MFI von IL-21 messbar, als vor Implantation des Clips.

5 Diskussion

5.1 Zusammenfassung der Hauptergebnisse

Diese Studie zeigt die Auswirkungen der Therapie einer Mitralklappeninsuffizienz mittels MitraClip® auf verschiedene pro- und antiinflammatorische Zytokine, auf die Anzahl der dendritischen Zellen und auf die Expression des Oberflächenrezeptors HLA-DR auf dendritischen Zellen. Eingeschlossen in die Studie wurden 156 Patienten zwischen 42 und 90 Jahren mit NYHA-Stadium 2 bis 4. Bei allen Patienten wurden vor Implantation des MitraClip®-Systems und acht Monate danach aus Zitratplasma, mittels Multiplex-Assay, 13 humane Zytokine quantifiziert. Zu den gleichen Zeitpunkten wurde aus Vollblut, mittels Markierung durch Immunfluoreszenz und anschließender FACS-Analyse, die Anzahl der dendritischen Zellen und die Expression des Oberflächenrezeptors HLA-DR bestimmt. Die MFI der Zytokine IL-2, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13 war acht Monate nach Therapie signifikant erhöht, die MFI für IL-17A, IL-21 und TNF- α signifikant erniedrigt. Zudem zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Anzahl der pDZ.

5.2 Diskussion der Methoden

Zur Quantifizierung der 13 humanen Zytokine wurde das „LEGENDplex™ Human Th Cytokine Panel (13-plex)“ (BioLegend®, San Diego, USA) verwendet. Die Qualität wurde vom Hersteller garantiert, der nach ISO 13485:2016 zertifiziert war (BioLegend, 2019). Als Proben wurde vom Hersteller Serum oder EDTA-Plasma empfohlen. In dieser Studie wurde Zitratplasma verwendet. In folgenden Studien sollte überprüft werden, inwieweit die Verwendung von Zitratplasma zu einer Veränderung des Ergebnisses beiträgt. Alle weiteren Schritte wurden nach Herstellerangaben befolgt. Insbesondere wurde darauf geachtet, die Proben langsam auf Eis aufzutauen, um das Ausfällen von Proteinen zu verhindern.

Die Identifikation der DZ wurde nach Anleitung des Protokolls des „Blood Dendritic Cell Enumeration Kit“ von Miltenyi Biotec durchgeführt. Diese Technik wurde schon in vielen anderen Studien zur Identifikation dendritischer Zellen verwendet (Yilmaz et al., 2006, Vogelsang et al., 2010, Chen et al., 2008). Eine Schwierigkeit in dieser Studie bestand darin, dass nach Zentrifugation des Vollbluts, das

Plasma mit einer Pumpe von Hand abgesaugt werden musste, wobei der Buffy-Coat im Reagenzglas verbleiben sollte. Diese Technik erfordert etwas Übung und kann beim Erlernen zu Verfälschungen der Ergebnisse führen, wenn zu viele Leukozyten mit abgesaugt werden. Daher ist eine große Anzahl an Proben von Vorteil, um Unterschiede beim Absaugen statistisch auszugleichen. In dieser Studie wurden dafür pro Patient jeweils drei Proben für mDZ und pDZ gemessen und daraus der Durchschnitt der Zellzahl berechnet.

5.3 Diskussion der Ergebnisse

5.3.1 Proinflammatorische Zytokine

5.3.1.1 Ein signifikanter Anstieg der proinflammatorischen Zytokine IL-9, IL-5, IL-2 und IL-13

In der vorliegenden Studie wurde ein signifikanter Anstieg der MFI von IL-9, IL-5, IL-2 und IL-13 im peripheren Blutplasma der Patienten acht Monate nach Implantation des MitraClip®-Systems festgestellt. Es stellte sich nun die Frage, wie ein Anstieg dieser proinflammatorischen Zytokine, mit der Reduktion der HI durch die MitraClip®-Implantation und dadurch einer Reduktion der Druck- und Volumenbelastung des Myokards und anderer Organe, in Einklang zu bringen war. Durch die Reduktion der HI war eigentlich ein Rückgang der Entzündung und damit eine Reduktion der proinflammatorischen Zytokine zu erwarten gewesen. Eine Gemeinsamkeit von IL-9, IL-5, IL-2 und IL-13 ist, dass ihre Hauptproduzenten jeweils T-Lymphozyten sind, genauer Th1- und Th2-Lymphozyten (Noelle and Nowak, 2010, Ikutani et al., 2012, Hwang et al., 2005, McKenzie et al., 1998). Th1-Zellen initiieren vor allem die zelluläre Immunantwort und aktivieren unter anderem Makrophagen, Th2-Zellen steuern vor allem die humorale Immunantwort, indem sie vor allem B-Zellen aktivieren (Romagnani, 1999). Sie sind somit zentrale Regulatoren bei der Steuerung der Immunantwort. Warum sind nun acht Monate nach Implantation des MitraClip®-Systems mehr Produkte der Th1- und Th2-Zellen im peripheren Blut zu finden? Dies liegt vermutlich daran, dass sich die Th1- und Th2-Zellen vor allem im entzündeten Gewebe befinden. Kishimoto induzierte im Jahr 1985 bei 160 Mäusen eine HI, indem er sie mit einem Virus infizierte und dadurch eine virale Myokarditis hervorrief. Er konnte in

histologischen Untersuchungen zeigen, dass sich 80% der T-Zellen im Myokard befanden und die T-Zellzahl im peripheren Blut signifikant gesunken war (Kishimoto et al., 1985). Die Vermutung liegt nahe, dass sich humane T-Zellen ähnlich verhalten und sich bei HI vor allem im geschädigten Gewebe aufhalten. Wenn sich die Belastung des Myokards nach Implantation des MitraClip®-Systems reduziert und sich das Gewebe erholt, wandern voraussichtlich weniger Th1- und Th2-Zellen in das Gewebe ein und verbleiben somit im Blutkreislauf. Dies würde erklären, warum auch ihre Produkte, wie IL-9, IL-5, IL-2 und IL-13, 8 Monate nach Therapie der HI, vermehrt im peripheren Blut messbar sind.

5.3.1.2 Ein signifikanter Abfall der proinflammatorischen Zytokine IL-21, IL-17A und TNF- α

In der vorliegenden Studie wurde ein signifikanter Abfall der MFI von IL-21, IL-17A und TNF- α im peripheren Blutplasma der Patienten acht Monate nach Implantation des MitraClip®-Systems festgestellt. Es stellte sich die Frage, warum sich die MFI dieser drei Zytokine gegensätzlich zur MFI der oben erwähnten Zytokine verhielt.

IL-21 und IL-17A werden im Gegensatz zu IL-9, IL-5, IL-2 und IL-13, vor allem auch von Th17-Lymphozyten ausgeschüttet (Cua and Tato, 2010, Liu and King, 2013). Th17-Lymphozyten fördern die Granulopoese und spielen vor allem bei der bakteriellen Abwehr eine große Rolle (Ouyang et al., 2008). Sowohl bei Patienten mit einer dilatativen Kardiomyopathie (Yi et al., 2009), als auch bei Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom (ACS) wurde eine erhöhte Zellzahl von Th17-Lymphozyten detektiert. Besonders das Verhältnis von Th17-Lymphozyten zu regulatorischen T-Zellen (T_{Reg}-Zellen) scheint bei der Pathogenese der Destabilisierung von Plaques beim ACS eine entscheidende Rolle zu spielen (Cheng et al., 2008). Dieses Missverhältnis konnte auch bei Patienten mit einer HI nachgewiesen werden. Auch hier lagen signifikant mehr Th17-Zellen, als bei Patienten ohne HI vor (Li et al., 2010). Es lässt sich demnach vermuten, dass die Implantation des MitraClip® und die damit einhergehende Reduktion der HI zu einer Normalisierung der Th17-Zellzahl beitragen könnte. Dies würde den signifikanten Abfall der Produkte der Th17-Zellen (IL-21 und IL-17A) erklären. Weitere Studien,

die die Th17-Zellzahl bei Patienten vor und nach MitraClip®-Implantation bestimmen, würden zur Klärung beitragen.

TNF- α wiederum wird vor allem von aktivierten Makrophagen in verschiedenen Geweben (zum Beispiel von Mikroglia im Gehirn, Kupffer-Sternzellen in der Leber, Alveolarmakrophagen in der Lunge) ausgeschüttet (Parameswaran and Patial, 2010). Wie in Kapitel 1.2.2 beschrieben, kann durch die mangelnde Pumpleistung des Herzens bei der HI eine systemische Hypoxie entstehen, welche Schäden an verschiedensten Organen verursacht. Diese Gewebeschäden aktivieren unter anderem Makrophagen (Laskin et al., 2011). Mithilfe der MitraClip®-Implantation kann die systemische Hypoxie durch Verbesserung der Pumpleistung des Herzens reduziert werden. Es kann davon ausgegangen werden, dass dadurch die Gewebeschädigung abnimmt, weniger Gewebsmakrophagen aktiviert werden und diese daher wiederum weniger TNF- α ausschütten, was die Abnahme der MFI acht Monate nach MitraClip®-Implantation erklären würde.

5.3.1.3 Keine signifikante Änderung der proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-22, IFN- γ , IL-4 und IL-17F

In der vorliegenden Studie wurde keine signifikante Änderung der MFI von IL-6, IL-22, IFN- γ , IL-4 und IL-17F im peripheren Blutplasma der Patienten vor und acht Monate nach Implantation des MitraClip®-Systems festgestellt. Es stellte sich die Frage, warum die Reduktion der HI keinen signifikanten Einfluss auf die MFI dieser Zytokine hatte.

Hauptproduzenten von IL-22 sind Th1-Lymphozyten, Th22-Lymphozyten und Th17-Lymphozyten (Duhon et al., 2009). Wie zuvor beschrieben, kann davon ausgegangen werden, dass sich die Zellzahl der Th1-Zellen im peripheren Blut bei einer Reduktion der HI erhöht und die Zellzahl der Th17-Zellen im peripheren Blut verringert. Es wäre möglich, dass sich aufgrund der Tatsache, dass ein Hauptproduzent von IL-22 vermehrt vorliegt und ein anderer weniger, im Endeffekt die MFI von IL-22 durch eine Reduktion der HI nicht signifikant ändert.

IL-4 und IL-6 werden von vielen verschiedenen Zellen ausgeschüttet, von Th2-Lymphozyten, basophilen Granulozyten, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, Myozyten und einigen anderen Zellen (Diehl and Rincon, 2002, Chomarat and Banchereau, 1997, Febbraio and Pedersen, 2005, Sokol et al.,

2008). In der Literatur können darunter nur schwer zelluläre Hauptproduzenten dieser Zytokine ausgemacht werden. Es wäre jedoch denkbar, dass ähnliche Mechanismen wie bei IL-22 vorliegen und sich daher auch bei IL-4 und IL-6 keine signifikante Änderung der MFI vor und acht Monate nach MitraClip®-Therapie verzeichnen lässt.

IFN- γ wird hauptsächlich von NKZ, Th1-Lymphozyten und zytotoxischen T-Zellen produziert (Schoenborn and Wilson, 2007). Da nach MitraClip®-Therapie von einem Anstieg der Th1-Lymphozyten auszugehen ist, hätte man auch einen Anstieg der MFI von IFN- γ erwarten können. Allerdings wird durch IL-10 die Produktion von IFN- γ vor allem in NKZ gehemmt (D'Andrea et al., 1993). Wie zuvor beschrieben, wurde in der vorliegenden Studie ein signifikanter Anstieg der MFI von IL-10 im peripheren Blut acht Monate nach Implantation des MitraClip®-Systems festgestellt. Auch hier wäre ein Entgegenwirken dieser beiden Mechanismen, zum einen mehr Th1-Lymphozyten und zum anderen mehr antiinflammatorisch wirkendes IL-10, denkbar, was im Endeffekt zu keiner signifikanten Änderung der MFI von IFN- γ nach MitraClip®-Therapie führen würde.

Generell wären zur weiteren Klärung dieser Hypothesen zusätzliche Studien sinnvoll, die die Zellzahl unterschiedlicher Zellen des Immunsystems, wie beispielsweise Th1-, Th2, Th17-Lymphozyten, NKZ oder Makrophagen vor und nach Implantation des MitraClip®-Systems untersuchen würden.

IL-17F hat sehr große Ähnlichkeit zu IL-17A. Es wird auch hauptsächlich von Th17-Lymphozyten ausgeschüttet, aber zudem auch von aktivierten Monozyten, basophilen Granulozyten und Mastzellen (Starnes et al., 2001, Kawaguchi et al., 2001). Die Funktionen und Auswirkungen von IL-17F sind, im Gegensatz zu IL-17A, noch nicht so gut untersucht (Yang et al., 2008). Hier könnten künftig weitere Studien helfen, die Unterschiede zwischen diesen beiden ähnlichen Zytokinen besser zu verstehen und die Ursachen der unterschiedlichen Veränderung der MFI vor und nach MitraClip®-Therapie näher zu beleuchten.

5.3.1.4 Ein signifikanter Anstieg des antiinflammatorischen Zytokins IL-10

In der vorliegenden Studie wurde ein signifikanter Anstieg der MFI von IL-10 im peripheren Blutplasma der Patienten acht Monate nach Implantation des MitraClip®-Systems festgestellt. Obwohl IL-10 ein antiinflammatorisches Zytokin ist,

verhält sich die MFI, wie die, der proinflammatorischen Zytokine IL-9, IL-5, IL-2 und IL-13. Wie diese vier proinflammatorischen Zytokine wird IL-10 auch hauptsächlich von Th1- und Th2-Lymphozyten produziert (Trinchieri, 2007). Da, wie zuvor beschrieben, davon ausgegangen werden kann, dass durch Reduktion der HI weniger entzündetes Gewebe vorliegt und Th1- und Th2-Zellen wieder vermehrt im peripheren Blut zu finden sind, ist dies gut damit vereinbar, dass auch die MFI von IL-10 nach MitraClip®-Therapie angestiegen ist.

5.3.2 Durchflusszytometrische Analyse plasmazytoider und myeloider dendritischer Zellen

5.3.2.1 Die Zellzahl

Bei einer Subpopulation von 64 Patienten wurde zusätzlich zu den Zytokinen die relative und absolute Anzahl der pDZ und mDZ untersucht. Es wurde eine signifikant niedrigere relative und absolute pDZ-Zahl vor dem Eingriff gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt. Nach 8 Monaten war die relative und absolute Zahl der pDZ signifikant gestiegen und hatte sich der Kontrollgruppe eindeutig angenähert. Die Zellzahl der mDZ hatte sich nicht signifikant verändert. In der Studie von Pistulli et al. aus dem Jahr 2016, lagen bei Patienten, die an einer chronischen HI aufgrund einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM) litten auch eine verringerte Anzahl DZ im peripheren Blut, im Vergleich zur Kontrollgruppe, vor. Allerdings waren bei Patienten mit DCM die mDZ signifikant verringert, wohingegen die pDZ keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe aufwiesen (Pistulli et al., 2016). Diese Ergebnisse deuten auf einen zellspezifischen Pathomechanismus hin, der in künftigen Studien genauer untersucht werden könnte. Für den Grund der Reduktion der Zellzahl der DZ lässt sich vermuten, dass, analog zu den T-Zellen, wie in Kapitel 5.3.1.1 beschrieben, die DZ bei HI vermehrt in entzündetes Gewebe einwandern. In einer Studie von Yilmaz et al. aus dem Jahr 2006 wurde nachgewiesen, dass DZ auch im Rahmen einer KHK in verringerter Anzahl, im Vergleich zur Kontrollgruppe, im peripheren Blut vorliegen. Dafür wurde in vulnerablen Plaques der A. carotis, im Gegensatz zu stabilen Plaques, eine signifikant erhöhte mDZ-Zellzahl gefunden (Yilmaz et al., 2006). Auch dies deutet darauf hin, dass DZ aus dem peripheren Blut in entzündetes Gewebe

einwandern und passt zu den hier vorliegenden Ergebnissen, dass acht Monate nach Implantation des MitraClip®-Systems die pDZ-Zahl signifikant angestiegen ist.

5.3.2.2 *Der costimulatorische Oberflächenrezeptor HLA-DR*

Ergänzend zur Bestimmung der pDZ- und mDZ-Zahl, wurde die Expression des costimulatorischen Oberflächenrezeptors HLA-DR vor und acht Monate nach Implantation des MitraClip®-Systems untersucht. Weder auf mDZ, noch auf pDZ wurde eine signifikante Änderung der Expression des Rezeptors festgestellt. Wie in Kapitel 1.4.1 beschrieben, können DZ nur T-Zellen aktivieren, wenn sie ein Antigen auf diesem Rezeptor präsentieren. Werden DZ aktiviert, nimmt die Expression von HLA-DR signifikant zu (Bottazzo et al., 1983). Nimmt also die Expression von HLA-DR auf den DZ acht Monate nach Implantation des MitraClip®-Systems nicht zu, obwohl die Zellzahl der pDZs im peripheren Blut zugenommen hat, spricht das dafür, dass die DZ weniger in entzündetes Gewebe abwandern und im peripheren Blut aber auch nicht vermehrt aktiviert werden.

5.3.3 Eine Korrelation zwischen der Verringerung der MI und der MFI von TNF- α und IL-21

Die nicht parametrische Korrelation nach Spearman zeigte, je größer die direkte Reduktion der MI war, desto größer war die Veränderung der MFI von TNF- α und IL-21. Dies bestärkt die These, dass die MI und damit die Volumenbelastung des linken Ventrikels, einen Einfluss auf die Menge freigesetzter Zytokine hat.

5.4 Ausblick

In der vorliegenden Studie konnte, soweit bekannt, erstmals eine Veränderung der MFI verschiedener pro- und antiinflammatorischer Zytokine vor und acht Monate nach MitraClip®-Implantation, bei Patienten mit HI aufgrund einer MI, gezeigt werden. Insgesamt trägt diese Studie damit, sowie mithilfe der Bestimmung der Zellzahl der pDZ und mDZ und der Expression des Oberflächenrezeptors HLA-DR dazu bei, den Einfluss der Volumenüberladung bei MI auf verschiedene Teile des Immunsystems besser zu verstehen. Weitere Studien werden klären, ob ähnliche Immunreaktionen auch bei HI anderer Ätiologie auftreten. Sinnvoll wäre auch eine Untersuchung der Zellzahl anderer Zellen des Immunsystems, wie beispielsweise Th1-, Th2, Th17-Lymphozyten, NKZ oder Makrophagen vor und nach Implantation des MitraClip®-Systems. Insgesamt zeigt diese Untersuchung, dass durch die Implantation des MitraClip®-Systems und der dadurch erreichten Reduktion der Volumenbelastung des Herzens, höchstwahrscheinlich eine Reduktion der inflammatorischen Aktivität im Rahmen der HI erreicht werden kann.

6 Zusammenfassung

Hintergrund: Die HI ist eine der häufigsten Erkrankungen in westlichen Ländern. Eine der wichtigsten Ursachen der HI sind Klappenerkrankungen, wie die MI. Als systemische Erkrankung beeinflusst die HI unter anderem verschiedene Komponenten des Immunsystems. Eine zentrale Rolle bei der Immunantwort nehmen Zytokine und DZ ein. Bei Patienten mit MI verbessert die Implantation eines MitraClips® signifikant die kardiale Auswurfleistung. **Zielsetzung:** Ziel der hier vorliegenden Studie war es, den Einfluss der MitraClip®-Therapie auf 13 ausgewählte humane Zytokine und auf die Zellzahl von DZ im peripheren Blut zu untersuchen. **Methoden:** Hierfür wurde bei 156 Patienten zwischen 42 und 90 Jahren, mit NYHA-Stadium 2 bis 4, vor Implantation des MitraClip®-Systems und acht Monate danach, Blut aus einer peripheren Vene entnommen. Aus Zitratplasma wurde zu beiden Zeitpunkten, unter Verwendung des LEGENDplex™ Human Th Cytokine Panels (13-plex) (BioLegend®, San Diego, USA), die MFI von IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IFN- γ und TNF- α bestimmt und mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Test miteinander verglichen. Bei 64 Patienten wurde zusätzlich aus Vollblut, mittels Immunfluoreszenzmarkierung und anschließender durchflusszytometrischer Analyse, die Zellzahl der pDZ und mDZ bestimmt. **Ergebnisse:** Im Vergleich zum Zeitpunkt vor MitraClip®-Implantation war die MFI von IL-2 (präMC 66,7 MFI; Follow-up 69,5 MFI; $p < 0,0001$), IL-5 (präMC 78,9 MFI; Follow-up 83,7 MFI; $p < 0,0001$), IL-9 (präMC 124,4 MFI; Follow-up 163,4 MFI; $p < 0,0001$), IL-10 (präMC 98,1 MFI; Follow-up 112,2 MFI; $p < 0,0001$) und IL-13 (präMC 78,9 MFI; Follow-up 83,7 MFI; $p < 0,0002$) acht Monate nach Implantation signifikant angestiegen. Die MFI der Zytokine IL-17A (präMC 46,0 MFI; Follow-up 43,4 MFI; $p < 0,0003$), IL-21 (präMC 90,6 MFI; Follow-up 88,1 MFI; $p < 0,0001$) und TNF- α (präMC 36,3 MFI; Follow-up 35,0 MFI; $p < 0,003$) war acht Monate nach Therapie, im Vergleich zum Zeitpunkt vor MitraClip®-Implantation, signifikant reduziert. Außerdem war die Zellzahl der pDZ im peripheren Blut acht Monate nach Therapie, im Vergleich zum Zeitpunkt vor MitraClip®-Implantation, signifikant angestiegen (präMC 3,4 / μ l, Follow-up 5,5 / μ l, $p < 0,0001$).

Ausblick: Insgesamt trägt diese Studie, mittels Bestimmung der MFI ausgewählter humaner Zytokine sowie der Bestimmung der Zellzahl dendritischer Zellen im peripheren Blut, dazu bei, den Einfluss der Volumenüberladung bei MI auf verschiedene Teile des Immunsystems besser zu verstehen. Um zu bestätigen, dass oben genannte Ergebnisse generell bei Patienten mit HI vorliegen, könnten weitere Studien sinnvoll sein, die die oben genannten Zytokine und DZ bei Patienten mit HI anderer Ätiologie bestimmen.

7 Literaturverzeichnis

- ALFIERI, O., MAISANO, F., DE BONIS, M., STEFANO, P. L., TORRACCA, L., OPPIZZI, M. & LA CANNA, G. 2001. The double-orifice technique in mitral valve repair: a simple solution for complex problems. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 122, 674-81.
- ANZAI, T. 2013. Post-infarction inflammation and left ventricular remodeling: a double-edged sword. *Circ J*, 77, 580-7.
- BANCHEREAU, J. & STEINMAN, R. M. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392, 245-52.
- BAUMGARTNER, H., FALK, V., BAX, J. J., DE BONIS, M., HAMM, C., HOLM, P. J., IUNG, B., LANCELLOTTI, P., LANSAC, E., RODRIGUEZ MUNOZ, D., ROSENHEK, R., SJOGREN, J., TORNOS MAS, P., VAHANIAN, A., WALTHER, T., WENDLER, O., WINDECKER, S., ZAMORANO, J. L. & GROUP, E. S. C. S. D. 2017. 2017 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease. *Eur Heart J*, 38, 2739-2791.
- BEKELMAN, D. B., HAVRANEK, E. P., BECKER, D. M., KUTNER, J. S., PETERSON, P. N., WITTSTEIN, I. S., GOTTLIEB, S. H., YAMASHITA, T. E., FAIRCLOUGH, D. L. & DY, S. M. 2007. Symptoms, depression, and quality of life in patients with heart failure. *J Card Fail*, 13, 643-8.
- BIOLEGEND. 2019. Production and Quality Control at BioLegend [Online]. Available: <https://www.biolegend.com/QC> [Accessed 01.06.2019].
- BLEUMINK, G. S., KNETSCH, A. M., STURKENBOOM, M. C., STRAUS, S. M., HOFMAN, A., DECKERS, J. W., WITTEMAN, J. C. & STRICKER, B. H. 2004. Quantifying the heart failure epidemic: prevalence, incidence rate, lifetime risk and prognosis of heart failure The Rotterdam Study. *Eur Heart J*, 25, 1614-9.
- BOTTAZZO, G. F., PUJOL-BORRELL, R., HANAFUSA, T. & FELDMANN, M. 1983. Role of aberrant HLA-DR expression and antigen presentation in induction of endocrine autoimmunity. *Lancet*, 2, 1115-9.
- BRASIER, A. R., RECINOS, A., 3RD & ELEDRISI, M. S. 2002. Vascular inflammation and the renin-angiotensin system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22, 1257-66.
- BROWER, G. L. & JANICKI, J. S. 2001. Contribution of ventricular remodeling to pathogenesis of heart failure in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 280, H674-83.
- BROWN, M. A. & HURAL, J. 1997. Functions of IL-4 and control of its expression. *Crit Rev Immunol*, 17, 1-32.
- BUNDESÄRZTEKAMMER (BÄK), KASSENÄRZTLICHE BUNDESVEREINIGUNG (KBV) & ARBEITSGEMEINSCHAFT DER WISSENSCHAFTLICHEN MEDIZINISCHEN FACHGESELLSCHAFTEN (AWMF). 2019. Nationale Versorgungsleitlinie Chronische Herzinsuffizienz - Langfassung [Online]. Available: www.herzinsuffizienz.versorgungsleitlinien.de [Accessed 23.07.2020].
- CANDIA, A. M., VILLACORTA, H., JR. & MESQUITA, E. T. 2007. Immune-inflammatory activation in heart failure. *Arq Bras Cardiol*, 89, 183-90, 201-8.
- CARABELLO, B. A. 2002. Concentric versus eccentric remodeling. *J Card Fail*, 8, S258-63.
- CHANG, S. H. & DONG, C. 2009. IL-17F: regulation, signaling and function in inflammation. *Cytokine*, 46, 7-11.

- CHEN, X. Q., MAKALA, L. H. C., JIN, Y. L., HOPKINS, D., MUIR, A., GARGE, N., PODOLSKY, R. H. & SHE, J. X. 2008. Type 1 diabetes patients have significantly lower frequency of plasmacytoid dendritic cells in the peripheral blood. *Clinical Immunology*, 129, 413-418.
- CHENG, X., YU, X., DING, Y. J., FU, Q. Q., XIE, J. J., TANG, T. T., YAO, R., CHEN, Y. & LIAO, Y. H. 2008. The Th17/Treg imbalance in patients with acute coronary syndrome. *Clin Immunol*, 127, 89-97.
- CHOMARAT, P. & BANCHEREAU, J. 1997. An update on interleukin-4 and its receptor. *European Cytokine Network*, 8, 333-344.
- COOK, C., COLE, G., ASARIA, P., JABBOUR, R. & FRANCIS, D. P. 2014. The annual global economic burden of heart failure. *Int J Cardiol*, 171, 368-76.
- CUA, D. J. & TATO, C. M. 2010. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat Rev Immunol*, 10, 479-89.
- D'ANDREA, A., ASTE-AMEZAGA, M., VALIANTE, N. M., MA, X., KUBIN, M. & TRINCHIERI, G. 1993. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J Exp Med*, 178, 1041-8.
- DE BONIS, M., ALFIERI, O., DALRYMPLE-HAY, M., DEL FORNO, B., DULGUEROV, F. & DREYFUS, G. 2017. Mitral Valve Repair in Degenerative Mitral Regurgitation: State of the Art. *Prog Cardiovasc Dis*, 60, 386-393.
- DIEHL, S. & RINCON, M. 2002. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Mol Immunol*, 39, 531-6.
- DUDAKOV, J. A., HANASH, A. M. & VAN DEN BRINK, M. R. 2015. Interleukin-22: immunobiology and pathology. *Annu Rev Immunol*, 33, 747-85.
- DUHEN, T., GEIGER, R., JARROSSAY, D., LANZAVECCHIA, A. & SALLUSTO, F. 2009. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat Immunol*, 10, 857-63.
- DZIOONEK, A., FUCHS, A., SCHMIDT, P., CREMER, S., ZYSK, M., MILTENYI, S., BUCK, D. W. & SCHMITZ, J. 2000. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol*, 165, 6037-46.
- EL-MENYAR, A. A. 2008. Cytokines and myocardial dysfunction: state of the art. *J Card Fail*, 14, 61-74.
- FEBBRAIO, M. A. & PEDERSEN, B. K. 2005. Contraction-induced myokine production and release: is skeletal muscle an endocrine organ? *Exerc Sport Sci Rev*, 33, 114-9.
- FILDES, J. E., SHAW, S. M., YONAN, N. & WILLIAMS, S. G. 2009. The immune system and chronic heart failure: is the heart in control? *J Am Coll Cardiol*, 53, 1013-20.
- FRANGOIANNIS, N. G. 2017. The extracellular matrix in myocardial injury, repair, and remodeling. *J Clin Invest*, 127, 1600-1612.
- GADANI, S. P., CRONK, J. C., NORRIS, G. T. & KIPNIS, J. 2012. IL-4 in the brain: a cytokine to remember. *J Immunol*, 189, 4213-9.
- GAEMPERLI, O., BIAGGI, P., GUGELMANN, R., OSRANEK, M., SCHREUDER, J. J., BUHLER, I., SURDER, D., LUSCHER, T. F., FELIX, C., BETTEX, D., GRUNENFELDER, J. & CORTI, R. 2013. Real-time left ventricular pressure-volume loops during percutaneous mitral valve repair with the MitraClip system. *Circulation*, 127, 1018-27.
- GAFFEN, S. L. & LIU, K. D. 2004. Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications. *Cytokine*, 28, 109-23.

- GENTH-ZOTZ, S., VON HAEHLING, S. & BLANKENBERG, S. 2004. [Immunactivation in chronic heart failure. Inflammatory mediators]. *Z Kardiol*, 93 Suppl 4, Iv24-30.
- GRAYBURN, P. A., FOSTER, E., SANGLI, C., WEISSMAN, N. J., MASSARO, J., GLOWER, D. G., FELDMAN, T. & MAURI, L. 2013. Relationship between the magnitude of reduction in mitral regurgitation severity and left ventricular and left atrial reverse remodeling after MitraClip therapy. *Circulation*, 128, 1667-74.
- GULLESTAD, L., UELAND, T., VINGE, L. E., FINSEN, A., YNDESTAD, A. & AUKRUST, P. 2012. Inflammatory cytokines in heart failure: mediators and markers. *Cardiology*, 122, 23-35.
- HASPER, D., HUMMEL, M., KLEBER, F. X., REINDL, I. & VOLK, H. D. 1998. Systemic inflammation in patients with heart failure. *Eur Heart J*, 19, 761-5.
- HUTCHINSON, K. R., STEWART, J. A., JR. & LUCCHESI, P. A. 2010. Extracellular matrix remodeling during the progression of volume overload-induced heart failure. *J Mol Cell Cardiol*, 48, 564-9.
- HWANG, E. S., HONG, J. H. & GLIMCHER, L. H. 2005. IL-2 production in developing Th1 cells is regulated by heterodimerization of RelA and T-bet and requires T-bet serine residue 508. *J Exp Med*, 202, 1289-300.
- IKUTANI, M., YANAGIBASHI, T., OGASAWARA, M., TSUNEYAMA, K., YAMAMOTO, S., HATTORI, Y., KOURO, T., ITAKURA, A., NAGAI, Y., TAKAKI, S. & TAKATSU, K. 2012. Identification of innate IL-5-producing cells and their role in lung eosinophil regulation and antitumor immunity. *J Immunol*, 188, 703-13.
- IWAKURA, Y., ISHIGAME, H., SAIJO, S. & NAKAE, S. 2011. Functional specialization of interleukin-17 family members. *Immunity*, 34, 149-62.
- JANKOWSKA, E. A., PONIKOWSKI, P., PIEPOLI, M. F., BANASIAK, W., ANKER, S. D. & POOLE-WILSON, P. A. 2006. Autonomic imbalance and immune activation in chronic heart failure - pathophysiological links. *Cardiovasc Res*, 70, 434-45.
- KAWAGUCHI, M., ONUCHIC, L. F., LI, X. D., ESSAYAN, D. M., SCHROEDER, J., XIAO, H. Q., LIU, M. C., KRISHNASWAMY, G., GERMINO, G. & HUANG, S. K. 2001. Identification of a novel cytokine, ML-1, and its expression in subjects with asthma. *J Immunol*, 167, 4430-5.
- KISHIMOTO, C., KURIBAYASHI, K., MASUDA, T., TOMIOKA, N. & KAWAI, C. 1985. Immunologic behavior of lymphocytes in experimental viral myocarditis: significance of T lymphocytes in the severity of myocarditis and silent myocarditis in BALB/c-nu/nu mice. *Circulation*, 71, 1247-54.
- LANCELLOTTI, P., MOURA, L., PIERARD, L. A., AGRICOLA, E., POPESCU, B. A., TRIBOUILLOY, C., HAGENORFF, A., MONIN, J. L., BADANO, L., ZAMORANO, J. L. & EUROPEAN ASSOCIATION OF, E. 2010. European Association of Echocardiography recommendations for the assessment of valvular regurgitation. Part 2: mitral and tricuspid regurgitation (native valve disease). *Eur J Echocardiogr*, 11, 307-32.
- LASKIN, D. L., SUNIL, V. R., GARDNER, C. R. & LASKIN, J. D. 2011. Macrophages and tissue injury: agents of defense or destruction? *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 51, 267-88.
- LECKIE, M. J., TEN BRINKE, A., KHAN, J., DIAMANT, Z., O'CONNOR, B. J., WALLS, C. M., MATHUR, A. K., COWLEY, H. C., CHUNG, K. F., DJUKANOVIC, R., HANSEL, T. T., HOLGATE, S. T., STERK, P. J. & BARNES, P. J. 2000. Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet*, 356, 2144-8.

- LI, J. H., KIRKILES-SMITH, N. C., MCNIFF, J. M. & POBER, J. S. 2003. TRAIL induces apoptosis and inflammatory gene expression in human endothelial cells. *J Immunol*, 171, 1526-33.
- LI, N., BIAN, H., ZHANG, J., LI, X., JI, X. & ZHANG, Y. 2010. The Th17/Treg imbalance exists in patients with heart failure with normal ejection fraction and heart failure with reduced ejection fraction. *Clin Chim Acta*, 411, 1963-8.
- LIM, D. S., REYNOLDS, M. R., FELDMAN, T., KAR, S., HERRMANN, H. C., WANG, A., WHITLOW, P. L., GRAY, W. A., GRAYBURN, P., MACK, M. J. & GLOWER, D. D. 2014. Improved functional status and quality of life in prohibitive surgical risk patients with degenerative mitral regurgitation after transcatheter mitral valve repair. *J Am Coll Cardiol*, 64, 182-92.
- LIU, S. M. & KING, C. 2013. IL-21-producing Th cells in immunity and autoimmunity. *J Immunol*, 191, 3501-6.
- LIU, Y. J. 2001. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell*, 106, 259-62.
- MANN, D. L. 2003. Stress-activated cytokines and the heart: from adaptation to maladaptation. *Annu Rev Physiol*, 65, 81-101.
- MARI, D., DI BERARDINO, F. & CUGNO, M. 2002. Chronic heart failure and the immune system. *Clin Rev Allergy Immunol*, 23, 325-40.
- MCKENZIE, G. J., BANCROFT, A., GRENCIS, R. K. & MCKENZIE, A. N. 1998. A distinct role for interleukin-13 in Th2-cell-mediated immune responses. *Curr Biol*, 8, 339-42.
- MCMURRAY, J. J. & STEWART, S. 2000. Epidemiology, aetiology, and prognosis of heart failure. *Heart*, 83, 596-602.
- MILDNER, A. & JUNG, S. 2014. Development and function of dendritic cell subsets. *Immunity*, 40, 642-56.
- MILTENYI BIOTEC GMBH. 2013. FcR Blocking Reagent, human [Online]. Available: <http://www.miltenyibiotec.com/en/products-and-services/mac3-sample-preparation/fcr-blocking-reagents/fcr-blocking-reagent-human.aspx> [Accessed 11.12.2017].
- MONTELEONE, G., PALLONE, F. & MACDONALD, T. T. 2008. Interleukin-21: a critical regulator of the balance between effector and regulatory T-cell responses. *Trends Immunol*, 29, 290-4.
- MOORE, K. W., DE WAAL MALEFYT, R., COFFMAN, R. L. & O'GARRA, A. 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*, 19, 683-765.
- MOSTERD, A. & HOES, A. W. 2007. Clinical epidemiology of heart failure. *Heart*, 93, 1137-46.
- MURPHY, K. M., TRAVERS, P. & WALPORT, M. 2014. *Janeway Immunologie*, Berlin, Springer.
- NIEBAUER, J., VOLK, H. D., KEMP, M., DOMINGUEZ, M., SCHUMANN, R. R., RAUCHHAUS, M., POOLE-WILSON, P. A., COATS, A. J. & ANKER, S. D. 1999. Endotoxin and immune activation in chronic heart failure: a prospective cohort study. *Lancet*, 353, 1838-42.
- NOELLE, R. J. & NOWAK, E. C. 2010. Cellular sources and immune functions of interleukin-9. *Nat Rev Immunol*, 10, 683-7.
- NUNES, E., HESLOP, H., FERNANDEZ-VINA, M., TAVES, C., WAGENKNECHT, D. R., EISENBREY, A. B., FISCHER, G., POULTON, K., WACKER, K., HURLEY, C. K., NOREEN, H. & SACCHI, N. 2011. Definitions of histocompatibility typing terms. *Blood*, 118, e180-3.
- OKONKO, D. O. & ANKER, S. D. 2004. Anemia in chronic heart failure: pathogenetic mechanisms. *J Card Fail*, 10, S5-9.

- OUYANG, W., KOLLS, J. K. & ZHENG, Y. 2008. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity*, 28, 454-67.
- PARAMESWARAN, N. & PATIAL, S. 2010. Tumor Necrosis Factor- α Signaling in Macrophages. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 20, 87-103.
- PATZELT, J., ZHANG, Y., MAGUNIA, H., JORBENADZE, R., DROPPA, M., ULRICH, M., CAI, S., LAUSBERG, H., WALKER, T., WENGENMAYER, T., ROSENBERGER, P., SCHREIECK, J., SEIZER, P., GAWAZ, M. & LANGER, H. F. 2017a. Immediate increase of cardiac output after percutaneous mitral valve repair (PMVR) determined by echocardiographic and invasive parameters: Patzelt: Increase of cardiac output after PMVR. *Int J Cardiol*, 236, 356-362.
- PATZELT, J., ZHANG, Y., MAGUNIA, H., ULRICH, M., JORBENADZE, R., DROPPA, M., ZHANG, W., LAUSBERG, H., WALKER, T., ROSENBERGER, P., SEIZER, P., GAWAZ, M. & LANGER, H. F. 2017b. Improved mitral valve coaptation and reduced mitral valve annular size after percutaneous mitral valve repair (PMVR) using the MitraClip system. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*.
- PAULUS, W. J. 1999. How are cytokines activated in heart failure? *Eur J Heart Fail*, 1, 309-12.
- PETERSEN, J. W. & FELKER, G. M. 2006. Inflammatory biomarkers in heart failure. *Congest Heart Fail*, 12, 324-8.
- PFEFFER, K. 2003. Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*, 14, 185-91.
- PISTULLI, R., HAMMER, N., ROHM, I., KRETZSCHMAR, D., JUNG, C., FIGULLA, H. R. & YILMAZ, A. 2016. Decrease of circulating myeloid dendritic cells in patients with chronic heart failure. *Acta Cardiol*, 71, 165-72.
- PONIKOWSKI, P., ANKER, S. D., ALHABIB, K. F., COWIE, M. R., FORCE, T. L., HU, S., JAARSMA, T., KRUM, H., RASTOGI, V., ROHDE, L. E., SAMAL, U. C., SHIMOKAWA, H., BUDI SISWANTO, B., SLIWA, K. & FILIPPATOS, G. 2014. Heart failure: preventing disease and death worldwide. *ESC Heart Fail*, 1, 4-25.
- PONIKOWSKI, P., VOORS, A. A., ANKER, S. D., BUENO, H., CLELAND, J. G. F., COATS, A. J. S., FALK, V., GONZALEZ-JUANATEY, J. R., HARJOLA, V. P., JANKOWSKA, E. A., JESSUP, M., LINDE, C., NIHOYANNOPOULOS, P., PARISSIS, J. T., PIESKE, B., RILEY, J. P., ROSANO, G. M. C., RUILOPE, L. M., RUSCHITZKA, F., RUTTEN, F. H. & VAN DER MEER, P. 2016. 2016 ESC Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*, 69, 1167.
- RAUCHHAUS, M., DOEHNER, W., FRANCIS, D. P., DAVOS, C., KEMP, M., LIEBENTHAL, C., NIEBAUER, J., HOOPER, J., VOLK, H. D., COATS, A. J. & ANKER, S. D. 2000. Plasma cytokine parameters and mortality in patients with chronic heart failure. *Circulation*, 102, 3060-7.
- ROMAGNANI, S. 1999. Th1/Th2 cells. *Inflamm Bowel Dis*, 5, 285-94.
- SCHOENBORN, J. R. & WILSON, C. B. 2007. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol*, 96, 41-101.
- SCHRAML, B. U. & REIS E SOUSA, C. 2015. Defining dendritic cells. *Curr Opin Immunol*, 32, 13-20.
- SCHRODER, K., HERTZOG, P. J., RAVASI, T. & HUME, D. A. 2004. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*, 75, 163-89.
- SETA, Y., SHAN, K., BOZKURT, B., ORAL, H. & MANN, D. L. 1996. Basic mechanisms in heart failure: the cytokine hypothesis. *J Card Fail*, 2, 243-9.

- SEYFIZADEH, N., SEYFIZADEH, N., GHARIBI, T. & BABALOO, Z. 2015. Interleukin-13 as an important cytokine: A review on its roles in some human diseases. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 62, 341-78.
- SOKOL, C. L., BARTON, G. M., FARR, A. G. & MEDZHITOV, R. 2008. A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses. *Nat Immunol*, 9, 310-8.
- STARNES, T., ROBERTSON, M. J., SLEDGE, G., KELICH, S., NAKSHATRI, H., BROXMEYER, H. E. & HROMAS, R. 2001. Cutting edge: IL-17F, a novel cytokine selectively expressed in activated T cells and monocytes, regulates angiogenesis and endothelial cell cytokine production. *J Immunol*, 167, 4137-40.
- STEINMAN, R. M. & IDOYAGA, J. 2010. Features of the dendritic cell lineage. *Immunol Rev*, 234, 5-17.
- TAKEUCHI, O. & AKIRA, S. 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 140, 805-20.
- TANAKA, T., NARAZAKI, M. & KISHIMOTO, T. 2014. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 6, a016295.
- TAU, G. & ROTHMAN, P. 1999. Biologic functions of the IFN-gamma receptors. *Allergy*, 54, 1233-51.
- TESTA, M., YEH, M., LEE, P., FANELLI, R., LOPERFIDO, F., BERMAN, J. W. & LEJEMTEL, T. H. 1996. Circulating levels of cytokines and their endogenous modulators in patients with mild to severe congestive heart failure due to coronary artery disease or hypertension. *J Am Coll Cardiol*, 28, 964-71.
- TORRE-AMIONE, G. 2005. Immune activation in chronic heart failure. *Am J Cardiol*, 95, 3C-8C; discussion 38C-40C.
- TOUSOULIS, D., CHARAKIDA, M. & STEFANADIS, C. 2005. Inflammation and endothelial dysfunction as therapeutic targets in patients with heart failure. *Int J Cardiol*, 100, 347-53.
- TRINCHIERI, G. 2007. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. *J Exp Med*, 204, 239-43.
- VOGELSANG, P., BRUN, J. G., OIJORDSBAKKEN, G., SKARSTEIN, K., JONSSON, R. & APPEL, S. 2010. Levels of plasmacytoid dendritic cells and type-2 myeloid dendritic cells are reduced in peripheral blood of patients with primary Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis*, 69, 1235-8.
- YANG, X. O., CHANG, S. H., PARK, H., NURIEVA, R., SHAH, B., ACERO, L., WANG, Y. H., SCHLUNS, K. S., BROADDUS, R. R., ZHU, Z. & DONG, C. 2008. Regulation of inflammatory responses by IL-17F. *J Exp Med*, 205, 1063-75.
- YI, A., JIAN, L., XIAOJING, H. & HUI, X. 2009. The prevalence of Th17 cells in patients with dilated cardiomyopathy. *Clin Invest Med*, 32, E144-50.
- YILMAZ, A., WEBER, J., CICHA, I., STUMPF, C., KLEIN, M., RAITHEL, D., DANIEL, W. G. & GARLICH, C. D. 2006. Decrease in circulating myeloid dendritic cell precursors in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*, 48, 70-80.
- YNDESTAD, A., DAMAS, J. K., OIE, E., UELAND, T., GULLESTAD, L. & AUKRUST, P. 2006. Systemic inflammation in heart failure--the whys and wherefores. *Heart Fail Rev*, 11, 83-92.
- ZHANG, Y., BAUERSACHS, J. & LANGER, H. F. 2017. Immune mechanisms in heart failure. *Eur J Heart Fail*, 19, 1379-1389.

8 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde im Universitätsklinikum Tübingen, Innere Medizin III in der Abteilung für Kardiologie und Angiologie unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Harald Langer durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Herrn Prof. Dr. Harald Langer.

Die Quantifizierung der humanen Zytokine mittels Multiplex-Assay wurde nach Einarbeitung durch Herrn Frederic Emschermann und Frau Dr. Anja Fröhlich der Firma BioLegend® von mir eigenständig durchgeführt.

Die FACS-Analyse der humanen Zytokine wurde von mir mit Unterstützung durch Herrn Frederic Emschermann und Frau Kristin Bieber durchgeführt.

Die Identifikation und FACS-Analyse der dendritischen Zellen, sowie die FACS-Analyse der Oberflächenrezeptoren auf dendritischen Zellen wurde von mir in Zusammenarbeit mit Frau Sarah Mandel, Frau Yingying Zhang und Frau Chaolan Lin durchgeführt.

Die klinischen Daten zur Änderung der Mitralklappeninsuffizienz wurden von Herrn Dr. Johannes Patzelt zur Verfügung gestellt, welcher auch die nicht parametrische Korrelation zwischen der Änderung der Mitralklappeninsuffizienz und der MFI von TNF- α und IL-21 durchführte.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Beratung durch Herrn Prof. Dr. Martin Eichner vom Institut für Klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 23.07.2020

Elisabeth Helene Habel

Danksagung

Von Herzen bedanken möchte ich mich bei meiner ganzen Familie, insbesondere bei meiner Mutter und meinem Verlobten Marc, für die Unterstützung, Bestärkung und den Rückhalt zu jeder Zeit, nicht nur während des Studiums und der Dissertation.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich auch bei Sarah Mandel, die mir als wunderbare Freundin, Kommilitonin und Mitdotorandin während des Studiums und der Dissertation stets eng zur Seite gestanden hat und mit der zusammen auch große Hürden viel leichter zu überwinden waren.

Herrn Prof. Dr. Harald Langer danke ich für die gute Betreuung, die Überlassung des Themas und die Konzeption der Studie.

Bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Langer in Tübingen möchte ich mich ganz herzlich für die Unterstützung bedanken. Vor allem bei Herrn Dr. Johannes Patzelt für die Mitbetreuung und die Durchführung der nicht parametrischen Korrelation, bei Sarah Gekeler, die für alle Fragen im Labor immer ein offenes Ohr hatte, bei Frederic Emschermann, für die gute Mitbetreuung im Labor, die Einarbeitung in die Durchführung des Multiplex-Assays und die Unterstützung bei der FACS-Analyse, bei Yingying Zhang und Chaolan Lin für die gute Zusammenarbeit bei der Identifikation und FACS-Analyse der dendritischen Zellen.

Auch bei Frau Dr. Kristin Bieber bedanke ich mich für die Unterstützung bei der FACS-Analyse der humanen Zytokine.

Bei Frau Dr. Anja Fröhlich der Firma BioLegend® möchte ich mich ebenfalls für die Einarbeitung in die Durchführung des Multiplex-Assays bedanken.

Bei dieser Arbeit wurde die methodische Beratung des Instituts für Klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie der Universität Tübingen in Anspruch genommen. Für die Unterstützung möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Martin Eichner bedanken.

Bei Frau Dr. Inka Montero vom Promotionsbüro in Tübingen bedanke ich mich ganz herzlich für ihre Unterstützung, sodass eine zeitnahe Einreichung der Dissertation möglich war.

Mein besonderer Dank gilt allen Mitarbeitern der MitraClip®-Studie in Tübingen sowie allen Patienten, die durch Ihre Teilnahme diese Studie erst ermöglicht haben.

Elisabeth Helene Habel
Tübingen, den 23.07.2020