

**Aus der Universitätsklinik für
Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie Tübingen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. Dr. h.c. G. Ziemer**

**In vitro Untersuchung zum Einfluss von DEHP auf die
Endothelaktivierung**

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

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

**vorgelegt von
Anika Susanne Volkmann
aus
Viersen**

2010

Dekan:	Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter:	Privatdozent Dr. H.-P. Wendel
2. Berichterstatter:	Professor Dr. J. Geis-Gerstorfer

„Die Wissenschaft ist der Verstand der Welt, die Kunst ihre Seele“

Maxim Gorki 1868-1936

Meinen Eltern und meinem Bruder

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	1
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	5
1 EINLEITUNG	8
1.1 Thematische Einführung	8
1.2 Endothelaktivierung	10
1.3 Polyvinylchlorid	11
1.3.1 Weichmacher	12
1.3.2 Phthalate	12
1.4 Di-(2-ethylhexyl)phthalat	13
1.4.1 Problematik	13
1.4.2 Toxizität	14
1.4.3 Exposition im Medizinbereich	15
1.4.4 Exposition im Alltag	16
1.4.5 Maßnahmen und Lösungsvorschläge	17
1.5 Tri(2-ethylhexyl)trimellitat	18
1.5.1 noDOP [®]	18
1.6 Carmeda [®] BioActive Surface	19
1.7 Fragestellung und Ziel der Arbeit	20
2 MATERIAL UND METHODEN	21
2.1 Untersuchungsmaterial	21
2.2 Versuchsaufbau	22
2.2.1 Chandler-Loop-Modell	22

2.2.2	Zellkulturen -----	23 -
2.2.2.1	Material und Geräte -----	23 -
2.2.2.2	Kulturbedingungen -----	24 -
2.2.2.3	Endothelzellen der Vena saphena -----	25 -
2.2.2.3.1	Isolierung, Kultivierung und Subkultivierung -----	25 -
2.2.2.4	Test auf Mykoplasmen -----	26 -
2.2.2.5	Zellzählung -----	27 -
2.2.2.6	HUVEC -----	27 -
2.3	Versuchsablauf -----	28 -
2.3.1	Probengewinnung -----	28 -
2.3.1.1	Materialien und Geräte -----	28 -
2.3.1.2	Probanden -----	28 -
2.3.1.3	Blutabnahme -----	28 -
2.3.1.4	Rezirkulation -----	29 -
2.3.1.5	Zentrifugation -----	29 -
2.3.1.6	Einfrieren des Serums -----	29 -
2.3.2	Zellkulturversuch -----	29 -
2.3.2.1	Aktivierungen der Endothelzellen -----	29 -
2.4	Untersuchungsmethoden -----	31 -
2.4.1	Analyse der Serumproben auf DEHP und Metaboliten -----	31 -
2.4.1.1	Durchführung -----	31 -
2.4.2	Analyse der Serumproben auf IL-1 β und TNF- α mittels ELISA ----	32 -
2.4.2.1	Prinzip -----	32 -
2.4.2.2	Material und Geräte -----	32 -
2.4.2.3	Analyse auf IL-1 β -----	33 -
2.4.2.4	Analyse auf TNF- α -----	33 -
2.4.3	Analyse von ICAM-1 mittels Durchflusszytometrie -----	34 -
2.4.3.1	Prinzip -----	34 -
2.4.3.2	Material und Geräte -----	34 -
2.4.3.3	Durchführung -----	34 -
2.4.4	Analyse von E-Selektin, ICAM-1, VCAM-1 mittels Real-Time PCR-	35 -

2.4.4.1	Prinzip	35
2.4.4.2	Material und Geräte	36
2.4.4.3	Extraktion der Gesamt-RNA und Real-Time PCR	36
2.4.4.4	Relative Quantifizierung	38
2.4.5	Analyse von E-Selektin und I-CAM mittels Western Blot	38
2.4.5.1	Prinzip	38
2.4.5.2	Material und Geräte	38
2.4.5.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	39
2.4.5.4	Western- Immunblotting nach SDS-PAGE	40
2.5	Statistik	41
3	ERGEBNISSE	42
3.1	Analyse der Serumproben auf DEHP und Metaboliten	42
3.1.1	Analyse auf Di(2-ethylhexyl)phthalat: DEHP	43
3.1.2	Analyse auf Mono(2-ethylhexyl)phthalat: MEHP	44
3.1.3	Analyse auf Mono(2-ethyl-5-hydroxyhexyl)phthalat: 5OH-MEHP	45
3.1.4	Analyse auf Mono(2-ethyl-5-oxohexyl)phthalat: 5oxo-MEHP	46
3.1.5	Analyse auf 2-Ethylhexanol	47
3.2	Analyse der Serumproben auf Zytokine	50
3.2.1	Interleukin-1 β	50
3.2.2	TNF- α	53
3.3	Analyse der Adhäsionsmoleküle	55
3.3.1	Analyse der ICAM-1-Expression mittels Durchflusszytometrie	55
3.3.1.1	HUVEC	56
3.3.1.2	Endothelzellen der Vena saphena	59
3.3.2	Analyse der Adhäsionsmoleküle mittels Real-Time PCR	61
3.3.2.1	ICAM-1	61
3.3.2.1.1	HUVEC	62
3.3.2.1.2	Endothelzellen der Vena saphena	62
3.3.2.2	VCAM-1	63

3.3.2.2.1 HUVEC-----	63 -
3.3.2.2.2 Endothelzellen der Vena saphena-----	64 -
3.3.2.3 E-Selektin -----	65 -
3.3.2.3.1 HUVEC-----	65 -
3.3.2.3.2 Endothelzellen der Vena saphena-----	66 -
3.3.2.4 Positivkontrollen-----	66 -
3.3.3 Analyse der Adhäsionsmoleküle mittels Western Blot-----	68 -
3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse-----	70 -
4 DISKUSSION -----	73 -
4.1 Hintergrund des vorliegenden Versuches-----	73 -
4.2 Methodische Voraussetzung-----	74 -
4.3 Die Freisetzung von DEHP aus PVC-Schläuchen-----	75 -
4.4 Endothelaktivierung durch DEHP-Exposition-----	81 -
4.4.1 Expression von Zytokinen -----	82 -
4.4.2 Expression von Adhäsionsmolekülen -----	85 -
4.5 Schlussfolgerung -----	89 -
5 ZUSAMMENFASSUNG -----	91 -
6 LITERATUR-----	93 -
7 ANHANG-----	103 -
7.1 Danksagung-----	103 -

Abkürzungsverzeichnis

“	Zoll
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
2cx-MMHP	Mono(2-(carboxymethyl)hexyl)phthalate
5cx-MEPP	Mono(2-ethyl-5-carboxypentyl)-phthalat
5OH-MEHP	Mono(2-ethyl-5-hydroxyhexyl)phthalat
5oxo-MEHP	Mono(2-ethyl-5-oxohexyl)phthalat
Abb.	Abbildung
BfArM	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
BSTFA	Bis(trimethylsilyl)-trifluoracetamid
bw	Body weight
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
CBAS	Carmeda® BioActive Surface
CD	Cluster of differentiation molecule
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic acid
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CT	Threshold Cycle, Crossing Point
D	Day
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole·2HCl·H ₂ O.
DEHP	Di(2-ethylhexyl)phthalat
DIN	Deutsches Institut für Normung
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EC	Endothelzelle
ECMO	Extrakorporale Membranoxygenierung
EH	2-Ethylhexanol

ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
et al.	et alii
EU	Europäische Union
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetales Kälberserum
G	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GC	Gaschromatographie
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic
hum.	Human
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cell
ICAM-1	Inter-Cellular Adhesion Molecule 1
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ISO	Internationale Organisation für Normung
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
l	Liter
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
m ²	Quadratmeter
mA	Milliamper
MEHP	Mono(2-ethylhexyl)phthalat
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mRNA	Messenger Ribonucleic acid
MS	Massenspektrometrie
N	Teilchenzahl
N ₂	Stickstoff
Na ₂ SO ₄	Natriumsulfat

NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomol
NOAEL	No observable adverse effect level
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
pg	Pikogramm
PVC	Polyvinylchlorid
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIRS	Systemic-Inflammatory-Response-Syndrom
Tab.	Tabelle
TBS	Tris Buffered Saline
TDI	Tolerable Daily Intake
TEHTM	Tri(2-ethylhexyl)trimellitat
TNF	Tumornekrosefaktor
TNS	Trypsin Neutralizing Solution
U	Unit
V.	Vena
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
z.B.	zum Beispiel

1 EINLEITUNG

1.1 Thematische Einführung

Herz-Kreislaufkrankungen sind in den Industrienationen weit verbreitet und mit Abstand die häufigste Todesursache. Die hierdurch notwendig werdenden operativen Therapiemaßnahmen an Hauptschlagader, Herzklappen, Vorhof- und Ventrikelsepten sowie die Transplantation von Spenderherzen gehören heute in der Kardiochirurgie zum Standard und finden unter Einsatz der Herz-Lungen-Maschine statt. Am stillgelegten Herz zirkuliert das Blut in einem extrakorporalen Kreislauf und die Herz-Lungen-Maschine übernimmt die Funktion von Herz und Lunge. Pumpfunktion und Gasaustausch werden durch die Maschine erfüllt. Die Funktionselemente der Herz-Lungen-Maschine werden untereinander und mit dem Patienten durch Schlauchsysteme verbunden. Diese Schlauchsysteme bestehen aus Polyvinylchlorid und anderen Kunststoffen wie Polyethylen, Polyester, Polypropylen, Polyamid und Silikon. Diese synthetischen Werkstoffe, die als Biomaterialien bezeichnet werden, kommen mit dem biologischen Gewebe des menschlichen Körpers unmittelbar in Kontakt und es finden chemische, physikalische und biologische Wechselwirkungen statt. Aufgrund dieser Tatsache wird neben optimaler Qualität auch eine hohe Biokompatibilität von diesen Materialien gefordert.

Biokompatibilität wird definiert als das Ausmaß, in dem ein künstliches Material vom menschlichen Körper toleriert wird, und beschreibt somit die Verträglichkeit von Werkstoffen mit dem körpereigenen Gewebe (91, 96). Idealerweise sollten die Materialien den Kontakt mit Blut erlauben, ohne dass es zu einer Aktivierung der verschiedenen Blutkomponenten oder zur Freisetzung toxischer Produkte aus dem Material kommt (52). Dennoch sind pathophysiologische Reaktionen des Organismus, die durch den Kontakt von Blut mit einer Fremdoberfläche ausgelöst werden, nicht vollkommen auszuschalten, sollten aber so weit wie möglich reduziert werden. Die folgenden proinflammatorischen

Reaktionen, die durch viele Rückkopplungsmechanismen miteinander verbunden sind, werden durch den Kontakt mit Fremdoberflächen ausgelöst:

- Aktivierung von Zytokinen
- Aktivierung von Leukozyten und Thrombozyten
- Aktivierung des intrinsischen und extrinsischen Gerinnungssystems
- Aktivierung der Fibrinolyse
- Aktivierung des Komplementsystems

Die Beurteilung und Einschätzung der Interaktion zwischen Blut und Fremdmaterial wird allerdings durch die Tatsache erschwert, dass unser Verständnis von hämostatischen Abläufen immer noch limitiert ist (16).

Eine gefürchtete Komplikation nach Einsatz der extrakorporalen Zirkulation ist das Postperfusionssyndrom, das dem „Systemic-Inflammatory-Response-Syndrom“ (SIRS) zugeordnet wird und einer nichtinfektiösen, unspezifischen Entzündungsantwort des gesamten Körpers entspricht. Im schlimmsten Fall entwickeln sich die Komplikationen des SIRS über ein Multiorgan dysfunktions-syndrom bis hin zu dem häufig letal endenden Multiorganversagen in der frühen postoperativen Phase. Pathophysiologische Aspekte des SIRS nach kardiopulmonalem Bypass sind vielfältig. Mit der extrakorporalen Zirkulation assoziierte Aspekte wie eine Kontaktaktivierung der Thrombozyten und der Gerinnung, ein Ischämie-Reperfusionsschaden und eine Endotoxinämie spielen eine Rolle. Weitere Einflüsse sind das Operationstrauma als solches, die Narkose sowie die Hypothermie des Patienten während der Prozedur. In ihrer Gesamtheit bewirken sie eine Kaskade von Reaktionen, die durch Rückkopplungsmechanismen miteinander verbunden sind und an deren Ende das klinische Bild einer Ganzkörperentzündungsreaktion steht. Ein Hauptziel bei der Entwicklung von Biomaterialien ist also die Optimierung der Hämokompatibilität zur Vermeidung operativer und postoperativer Komplikationen.

PVC verfügt über eine gute Hämokompatibilität. Zur weiteren Perfektionierung dieser und anderer Werkstoffe wurden zahlreiche Oberflächenbeschichtungen entwickelt. Die Heparinbeschichtung ist eine davon. Ursprünglich wurde sie zur

Optimierung der Gerinnungshemmung während der extrakorporalen Zirkulation eingesetzt. Sie zeichnet sich aber zusätzlich durch ihre bioaktive Oberfläche als sehr hämokompatibel aus. Diese bioaktive Oberfläche wird durch eine kovalente „Endpunktbefestigung“ der Heparinmoleküle an das Fremdmaterial erreicht.

Grundvoraussetzung für die Blutverträglichkeit ist, dass aus dem Fremdmaterial freiwerdende Substanzen keine negativen Effekte auf den Organismus ausüben. Di(2-ethylhexyl)phthalat (DEHP), ein Weichmacher fast aller PVC-Medizinprodukte, tritt bei Kontakt mit lipophilem Medium aus. Inwieweit diese DEHP-Exposition zu der inflammatorischen Reaktion nach extrakorporaler Zirkulation beiträgt ist noch unklar und sollte in der vorliegenden Studie näher bestimmt werden. Der Fokus liegt auf einer Endothelaktivierung durch DEHP.

1.2 Endothelaktivierung

Alle Gefäße des Herz-Kreislauf-Systems sind mit einem Monolayer von Endothelzellen ausgekleidet. Diese Grenzschicht zwischen intra- und extravasalem Raum beträgt in der Gesamtheit etwa 1000 m². Die Endothelzellen stellen ein autokrines und parakrines Organ dar, das als Sensor für humorale und mechanische Signale fungiert. Im Rahmen lokaler und systemischer Entzündungen ist das Endothel den im Blutstrom zirkulierenden Pathogenen und von ihnen freigesetzten Agenzien ebenso ausgesetzt wie Faktoren der zellulären und humoralen Abwehr. Verschiedenste proinflammatorische Stimuli veranlassen die bislang erst lückenhaft bekannten Signalwege im Endothel. Schrittweise werden verschiedene, meist pro-entzündlichen Veränderungen der Endothelzellen bewirkt und damit die Entzündungsreaktion entscheidend mitgeprägt. Besondere Bedeutung kommt hierbei der endothelialen Expression von Adhäsionsmolekülen zur Rekrutierung von Entzündungszellen und dem Verlust der endothelialen Barrierefunktion zu. Durch Freisetzung proinflammatorischer Substanzen, Rekrutierung von Entzündungszellen, prokoagulatorische Aktivität und endotheliale

Hyperpermeabilität trägt das Endothel entscheidend zur Verschlimmerung der Entzündung bei (50). Beim SIRS vermittelt und moduliert das Endothel die inflammatorische Antwort. Es vollzieht wichtige vasomotorische Funktionen, nimmt Einfluss auf die Gerinnung und Fibrinolyse, ist ein Zytokinproduzent und stellt eine wesentliche Komponente bei der Zelladhärenz und Zellmigration der Leukozyten in das Gewebe dar (22).

1.3 Polyvinylchlorid

PVC ist seit Jahrzehnten einer der wichtigsten Kunststoffe in der Medizin. Es steht bei dem globalen Verbrauch von Kunststoff, hinter Polyethylen und Polypropylen, an dritter Stelle (34). PVC ist ein amorpher, thermoplastischer Kunststoff, der aus der Polymerisation von Vinylchloridmolekülen entsteht. Die Rohstoffe für PVC werden aus Erdöl und Steinsalz gewonnen. Der hohe Chloranteil des PVC ist verantwortlich für die physikalischen Eigenschaften des Materials und den niedrigen Energiebedarf. Er garantiert zudem geringe Produktionskosten (3). PVC ist bei Raumtemperatur hart und spröde und wird erst durch die Zugabe von Weichmachern flexibel und formbar und in seiner Härte und Zähigkeit variabel. Somit unterscheidet man Hart-PVC von Weich-PVC. In der vorliegenden Arbeit wird ausschließlich Weich-PVC untersucht. Weich-PVC verfügt über zahlreiche positive Materialeigenschaften. Hierzu zählt Flexibilität und Festigkeit, Transparenz, chemische Stabilität und eine keimfreie Einstellung durch Dampf-, Ethylenoxid- oder Strahlensterilisierung (15). Außerdem verfügt PVC über eine hohe Kälteelastizität, gutes Rückstellvermögen und Hochfrequenzverschweißbarkeit. Ein weiterer bedeutender Vorteil von PVC besteht in einem geringen Allergiepotezial sowie einer guten Hämokompatibilität (67). Der Anteil an weichmachenden Substanzen variiert stark in Abhängigkeit von den an das Produkt gestellten Erfordernissen.

1.3.1 Weichmacher

Di(2-ethylhexyl)phthalat, kurz DEHP, ist der am häufigsten verwendete Weichmacher für PVC. Weichmacher sind Stoffe, die spröden Materialien zugesetzt werden, um sie weich, biegsam oder dehnbar zu machen. Man kann eine innere Weichmachung von einer externen Weichmachung unterscheiden. Erstere geschieht durch Copolymerisation, letztere durch Zusatz von Additiven. Die externe Weichmachung spielt eine durchaus größere Rolle bei der Produktion von PVC. Hierfür werden von der Industrie sehr unterschiedliche Stoffe eingesetzt, wobei mengenmäßig schwerflüchtige Phthalsäureester überwiegen.

1.3.2 Phthalate

Die Stoffklasse der Phthalate umfasst eine Gruppe von chemischen Verbindungen, die durch Veresterung des Phthalsäureanhydrids mit verschiedenen Alkoholen gewonnen werden. Phthalate sind farblose, geruchslose, schwerflüchtige, lipophile Flüssigkeiten. Ihre jährliche Verarbeitung in Westeuropa beträgt durchschnittlich eine Million Tonnen. 90 Prozent der Phthalate werden in der PVC-Herstellung als Weichmacher eingesetzt (33). Von den Produktions- und Verbrauchsmengen sind folgende Phthalate am bedeutendsten:

- Di-„isodecyl“-phthalat
- Di-„isononyl“-phthalat
- Di(2-ethylhexyl)phthalat
- Dibutylphthalat
- Benzylbutylphthalat

Phthalate kommen in vielen Bereichen des täglichen Lebens zum Einsatz. Sie dienen als Trägersubstanzen für Duftstoffe, als Komponenten in Nagellack und Haarspray, als Formulierungsmittel in der Pestizidanwendung, als industrielle Lösemittel und Schmierstoffe und als Additive in der Textilindustrie (100). Des Weiteren werden sie für pharmazeutische Produkte und im technischen und medizinischen Bereich als Weichmacher eingesetzt.

1.4 Di-(2-ethylhexyl)phthalat

Formel:	$C_{24}H_{38}O_4$
Synonyme:	DEHP Bis(2-ethylhexyl)phthalat DOP Di-sec-octylphthalat Di-(isooctyl)phthalat
CAS-Nr.:	117-81-7

Der wichtigste Vertreter der Phthalate ist DEHP. Chemisch betrachtet ist DEHP ein aromatischer Diester, das Produkt von o-Phthalsäure und 2-Ethylhexanol. Je nach Spezifikation ist DEHP zu 20- 40 Prozent in PVC-Materialien enthalten. Da es bei zu niedrigen Anteilen zu Versprödung kommt, ist ein Mindestzusatz von 20 Prozent erforderlich (90). Die Einsatzmöglichkeit von DEHP-haltigem PVC ist breit gefächert. Sowohl im Bereich der Technik als auch in der Medizin findet DEHP-PVC großen Absatz. In vielen Medizinprodukten, Blut-, Dialyse- und Urinbeuteln, in Kathedern, Schlauchsystemen für extrakorporale Kreisläufe und deren funktionelle Einheit, in Behältnissen für enteral oder parenteral zu verabreichende lipophile Flüssigkeiten, Infusions- und Transfusionssystemen und deren Konnektoren sowie Filtern und Verlängerungen ist DEHP nur schwer zu ersetzen (100). Obwohl Phthalate mit einem höheren Siedepunkt sowie Adipate, Zitate und Trimellitate als Weichmacher eingesetzt werden, ist DEHP für PVC der Weichmacher der Wahl. Die PVC-Medizinprodukte erhalten durch DEHP die bestmöglich gewünschten mechanischen Eigenschaften (49).

1.4.1 Problematik

DEHP ist nicht kovalent mit den PVC-Molekülen verbunden, sondern physikalisch, als gelartige Struktur, in die Polymer-Matrix eingelagert. Über Van-der-Waals-Kräfte bindet die polare Estergruppe des Weichmachers mit Hydroxid- und Chloridionen des Polymers. Der lineare Anteil des Weichmachers lagert sich wie ein Puffer zwischen die Polymerketten und

vergrößert so deren Abstand. Dies schwächt die Bindung benachbarter Polymerketten, wodurch PVC Flexibilität und weitere wünschenswerte physikalische Eigenschaften erhält. Da keine chemische Bindung vorliegt, kann DEHP aus dem Kunststoff ausdünsten. Im Gegensatz zu leicht flüchtigen organischen Verbindungen, die über einen kürzeren Zeitraum aus Produkten ausgasen, dünsten Phthalate zwar langsam, aber dauerhaft während der Nutzung aus (51). Eine Migration, ein Abrieb oder ein Auswaschen aus dem PVC Material sind ebenso möglich. Voraussetzung hierfür ist der Kontakt von DEHP-PVC mit DEHP-lösenden, lipophilen oder lipidhaltigen Substanzen. Diese Eigenschaften werden von Blut, Plasma, Blutplättchenkonzentrat, künstlicher Nährlösung wie auch intravenöser Medikation erfüllt.

1.4.2 Toxizität

Der Austritt von DEHP ist problematisch. In zahlreichen Studien konnte die Toxizität von DEHP im Tierversuch nachgewiesen werden. Es wurde wiederholt gezeigt, dass DEHP einen Einfluss auf die geschlechtliche Entwicklung hat und im Ergebnis seiner Wirkung zu einer Verweiblichung männlicher Nachkommen führt. Vergleichbare Effekte auf den Menschen konnten zwar bisher nicht nachgewiesen werden, negative gesundheitliche Folgen können jedoch auch beim Menschen nicht ausgeschlossen werden (12). Laut Koch et al. (58) ist DEHP im Tiermodell entwicklungs- und reproduktionstoxisch und steht im Verdacht auch in den Hormonhaushalt des Menschen als „Endocrine Modulator“ einzugreifen. Wittasek et al. (101) bezeichnen DEHP sogar als „Endocrine Disruptor“, einen endokrin wirksamen Stoff. DEHP könnte somit die Fortpflanzungsfähigkeit der männlichen Nachkommenschaft negativ beeinflussen. Ob es aber überhaupt zu negativen Folgen beim Menschen kommen kann, ist kontrovers (18). DEHP verfügt in Tierstudien über folgende negative Potentiale (15):

- Einwirkung auf Reproduktion und Entwicklung
- Hormonstörungen und Hodentoxizität
- Peroxisomenproliferation der Leber und dadurch Steigerung der Inzidenz des Leberkarzinoms bei Nagetieren

DEHP verursacht im Tierversuch die Bildung von Vakuolen in Sertolizellen, gewebliche Veränderungen am Keimzellepithel sowie tubuläre Atrophie mit Verlust der Spermienbildung (13). DEHP beeinträchtigt die Morphologie der Leydigzellen von Nagetieren und auch Körper- und Hodengewicht werden beeinträchtigt. DEHP steht im Verdacht, ein antiandrogenes Agens zu sein (84). Weitere Tierstudien zeigen zudem eine nephrotoxische und lungentoxische Wirkung des DEHP (49). In vitro und in vivo durchgeführte Untersuchungen auf Genotoxizität fielen negativ aus. DEHP und seine Metaboliten werden als nicht-genotoxische Substanzen angesehen (13)

1.4.3 Exposition im Medizinbereich

Trotz begrenzter Evidenz über eine negative Auswirkung für den Menschen, ist eine hohe DEHP-Exposition bei medizinischer Behandlung hinsichtlich seiner gesundheitsschädlichen Wirkung als besorgniserregend und kritisch zu beurteilen (15). Folgende medizinische Verfahren können zu einer erhöhten DEHP-Exposition des Menschen führen (11):

- Transfusionstherapie mit separierten Blutkomponenten und Vollblut
- Infusionstherapie mit lipophiler Lösung
- Enterale und parenterale Ernährungstherapie
- Therapie mit Anschluss an extrakorporale Kreisläufe wie:
 - Herz-Lungen-Maschine
 - Dialyse
 - Lungenersatzverfahren
 - Therapeutische Aphereseverfahren (Lipapherese, Immunapherese, Plasmapherese)

Zusätzlich können Summationseffekte bei mehreren, zeitgleichen Behandlungsverfahren, wie auf der Intensivstation üblich, zu einer erhöhten DEHP-Belastung beitragen (11). So sind besonders Neugeborene, die auf der Intensivstation behandelt werden, einer besonders großen Belastung von DEHP ausgesetzt. Green et al. (40) fordern weitere Studien um potentielle gesundheitliche Schäden für intensivmedizinisch betreute Früh- und Neugeborene festzustellen. Im Tierversuch konnte eine erhöhte Anfälligkeit in

Bezug auf eine Reproduktionstoxizität bei Jungtieren beobachtet werden. Deshalb stehen Früh- und Neugeborene, die auf intensivmedizinische Therapien angewiesen sind, besonders im Fokus (15). Doch es gibt noch weitere Risikogruppen. Auch die Gesundheit von Säuglingen und Kleinkindern, Kindern, Jugendlichen vor Abschluss der Geschlechtsreife, schwangeren Frauen und stillenden Müttern kann durch DEHP negativ beeinflusst werden.

1.4.4 Exposition im Alltag

Nicht nur im Medizinbereich kommt der Mensch mit DEHP in Berührung. Auch im Alltag ist ein ständiger Kontakt zu Weichmachern durch Innenraumlufte und Hausstaub gegeben. Quellen sind Materialien aus Weich-PVC, wie Einrichtungsgegenstände, Duschvorhänge, Badewannen- und Duscheinlagen, Elektrokabel, Kosmetika, Spielzeug, Lebensmittelkontaktmaterialien, Kunstleder und Bauprodukte. Nach Ausdünstung neigen Phthalate dazu, sich an Partikel zu binden und können so, durch Staubpartikel, auch über größere Strecken transportiert werden (51). Die DEHP-Exposition kann also durch direkten Kontakt erfolgen, aber auch eine indirekte Exposition durch die DEHP-Kontamination der Umwelt und das Übertreten in andere Produkte ist möglich (48). DEHP ist demnach ein allgegenwärtiger Schadstoff, der in Luft, Staub, Wasser, Boden, Sediment und Nahrungsmitteln vertreten ist (20). Die DEHP-Exposition der allgemeinen Bevölkerung wird, ausgenommen medizinischer und berufsbedingter Expositionen, auf 1-30 µg/kg bw/d geschätzt (77). Fast bei jedem Menschen sind Phthalate oder ihre Abbauprodukte im Blut und/oder im Urin nachweisbar (51). Wittassek et al. (101, 62) schätzen die mittlere DEHP-Exposition der deutschen Bevölkerung auf 2-5 µg/kg bw/d. Kinder scheinen dabei, bezogen auf das Körpergewicht, mit einem Wert von durchschnittlich 4-8 µg/kg/d einer höheren Exposition ausgesetzt zu sein (101). Heudorf et al. (48) weisen daraufhin, dass die tolerierbare Aufnahmemenge von DEHP bei Kindern weit überschritten wird, in manchen Fällen sogar über das Zwanzigfache. In einem Fall wurde die tolerierbare tägliche Aufnahmemenge (TDI) für DEHP um das ca. 70-fache nach einem operativen Eingriff mit Bluttransfusion überschritten (38).

1.4.5 Maßnahmen und Lösungsvorschläge

Die Weichmacher DEHP, Butylbenzylphthalat und Dibutylphthalat sind in der EU als fortpflanzungsgefährdend eingestuft (28). Entsprechend dem Richtlinien-Entwurf des Europäischen Parlaments vom 05.07.2005 dürfen sie künftig bei der Herstellung von Spielwaren nicht mehr verwendet werden. Ein Verbot für den Einsatz von DEHP im Medizinproduktebereich gibt es nicht. Von der EU werden DEHP und Dibutylphthalat in Kategorie zwei als "fortpflanzungsgefährdend" eingestuft (2003/36/EG; 76/769/EWG). Als Stoff und in Zubereitungen müssen sie als "R 61: Kann das Kind im Mutterleib schädigen" und "R 62: Kann möglicherweise die Fortpflanzungsfähigkeit beeinträchtigen" deklariert werden (100). Die Einstufung in Kategorie zwei bedeutet, dass die Klassifizierung auf tierexperimentellen Nachweisen basiert. Stoffe, die bekanntermaßen beim Menschen die Fortpflanzungsfähigkeit beeinträchtigen, sind in Kategorie eins eingestuft. Die maximal zulässige Dosis (TDI) für DEHP wurde bei 50 µg/kg bw festgelegt (32). Die Dosis ohne nachteilige Wirkung, NOAEL, liegt bei 4,8 mg pro kg Körpergewicht und Tag.

Zur Reduktion der DEHP-Exposition spricht das BfArM (12) folgende Empfehlungen aus:

- Die Anwender von Medizinprodukten sollten möglichst auf solche DEHP-haltigen Medizinprodukte verzichten, bei deren Anwendung der Patient mit DEHP unnötig belastet werden kann.
- Zu den Risikogruppen zählen alle Kinder und insbesondere Knaben, vom Neugeborenen bis zur Vollendung der Pubertät sowie schwangere Frauen und stillende Mütter.
- Die Hersteller sind aufgefordert, risikoärmere Alternativprodukte weiter zu entwickeln, anzubieten und als solche kenntlich zu machen.
- Dem Anwender sollte es vom Hersteller ermöglicht werden, sich darüber zu informieren, ob das Produkt DEHP enthält

1.5 Tri(2-ethylhexyl)trimellitat

Formel:	$C_{33}H_{54}O_6$
Synonyme:	TEHTM Tris(2-ethylhexyl)benzene-1,2,4-tricarboxylate Trioctyl trimellitat TOTM Trioctyl benzene-1, 2, 4-tricarboxylate 1, 2, 4-bezenetricarboxylic acid Trioctyl ester
CAS-Nr.:	3319-31-1

TEHTM ist der Triester der Mellitsäure. Der Unterschied zu DEHP liegt in einer zusätzlichen Carboxylgruppe am C4-Atom des Aromaten. Diese wird mit einem weiteren Molekül 2-Ethylhexanol verestert. Im Gegensatz zu DEHP hat TEHTM ein höheres Molekulargewicht und einen höheren Siedepunkt und ist dadurch relativ schwer aus der Polymermatrix zu extrahieren (95). TEHTM ist, ebenso wie DEHP, ein Weichmacher für PVC. Aufgrund einer geringeren weichmachenden Wirkung, ist bei gleicher Materialhärte (Shore Härte) ein höherer Gehalt an Weichmacher erforderlich. Der Einsatz von TEHTM bietet sich als Alternative für DEHP und bei hohem Temperaturniveau an, insbesondere wenn eine geringe Migrationsrate gefordert wird (15).

1.5.1 noDOP®

TEHTM-haltige PVC-Halbzeugartikel laufen bei der Firma Raumedic AG unter der Bezeichnung noDOP®. Anfang der 1980er Jahre fand die Entwicklung von noDOP® Materialien in Zusammenarbeit mit dem damaligen Bundesministerium für Forschung und Technologie statt. Ziel war es, eine physiologische Optimierung und Verbesserung der Hämokompatibilität der verfügbaren medizinischen PVC-Rezepturen zu erreichen.

Die Herstellerfirma empfiehlt die Anwendung von noDOP® für folgende Bereiche:

- Pädiatrie
- ECMO
- Enterale Ernährung
- Extrakorporale Zirkulation
- Dialyse

1.6 Carmeda[®] BioActive Surface

Carmeda[®] BioActive Surface, CBAS[®], ist eine auf Heparin basierende Oberflächenmodifizierungstechnik der schwedischen Firma Carmeda. Bereits in den 1970er Jahren wurde diese Beschichtungstechnik erfunden und das Patent 1983 durch weitere Forschungsarbeit von Prof. O. Larm vermarktet. Die Besonderheit dieser Beschichtung liegt in einer „Endpunktbefestigung“ der Heparinmoleküle an die Fremdoberfläche. Durch die kovalente Bindung bleibt die hochspezifische aktive Sequenz des Heparins erhalten. So kann eine endothelähnliche Oberfläche nachgeahmt werden. Die CBAS[®]-Heparinbeschichtung ist die bislang bestuntersuchtete Beschichtungstechnik. Mittlerweile wurde eine Vielzahl von experimentellen und klinischen Studien zu diesem Thema veröffentlicht und der Nutzen des heparinbeschichteten Systems aufgezeigt (98). Folgende Vorteile ergeben sich durch CBAS[®]-beschichtete Fremdoberflächen:

- Reduktion der Komplementaktivierung (92, 53, 37, 76)
- Inaktivierung von Thrombin (92, 66)
- geringere humorale und zelluläre Aktivierung (64, 75, 97)
- Reduktion des SIRS (98)
- Verkürzung des Klinikaufenthalts mit weniger Komplikationen (88)
- Senkung der Kosten für Kliniken (72).

1.7 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist eine in vitro Studie zur Untersuchung des Einflusses von DEHP auf die Endothelaktivierung.

Mit Hilfe des Chandler-Loop-Modells und humanem Vollblut wird die extrakorporale Zirkulation der Herz-Lungen-Maschine simuliert. Hierfür werden drei unterschiedliche Schlauchmaterialien aus Weich-PVC verwendet und untersucht:

- PVC
- Carmeda[®]
- noDOP[®]

Aufgrund der beschriebenen Lipidlöslichkeit von DEHP befasst sich der erste Teil der Studie mit der Konzentrationsbestimmung von freigesetztem DEHP und seiner Metabolite aus den PVC-Schläuchen während der extrakorporalen Zirkulation.

Der zweite Teil der Studie analysiert die Aktivierung der Endothelzellen durch DEHP mittels verschiedener Methoden. Die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin und der Zytokine IL-1 β und TNF- α werden detektiert und quantifiziert.

Folgende Fragestellungen sollen durch die Studie beantwortet werden:

- Reduziert eine CBAS[®]-Beschichtung von PVC-Material die Freisetzung von DEHP und Metaboliten in das Blut?
- Können Endothelzellen durch die Migration von DEHP in das Blut aktiviert werden?
- Besteht ein Unterschied zwischen unbeschichtetem und CBAS[®]-beschichtetem DEHP-PVC bezüglich des Aktivierungspotentials auf Endothelzellen?
- Besteht ein Unterschied zwischen einer Rezirkulationszeit von 60 zu 120 Minuten bezüglich der Freisetzung von DEHP und Metaboliten?
- Ermöglicht TEHTM eine reale Verbesserung bezüglich der oben aufgeführten Fragestellungen?

2 MATERIAL UND METHODEN

Anhand verschiedener Methoden wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit vergleichende Untersuchungen zum Einfluss von DEHP auf die Endothelzellaktivierung durchgeführt. Im Mittelpunkt der Studie standen drei unterschiedliche Schlauchtypen aus Weich-PVC. Zur in vitro Simulation eines extrakorporalen Kreislaufes wurden diese PVC-Schläuche in einem modifizierten Chandler-Loop-Modell getestet. Der erste Teil der Studie befasste sich mit der Freisetzung von DEHP und der Metaboliten aus den drei Testschläuchen in das Blut. Im zweiten Teil der Studie wurden die Blutproben, nach Kontakt mit den PVC-Schläuchen im Chandler-Loop-Modell, auf proinflammatorische Zytokine untersucht. In einem weiteren Schritt wurden Endothelzellen, nach Aktivierung mit dem rezirkulierten Serum, auf die Ausbildung von Adhäsionsmolekülen überprüft.

2.1 Untersuchungsmaterial

In einem Flussmodell, dem modifizierten Chandler-Loop-Modell, wurden drei verschiedene Schläuche aus Weich-PVC mit heparinisiertem Vollblut analysiert. Untersuchte Schlauchmaterialien:

- **PVC:**
Das für die Extrakorporale Zirkulation standardmäßig verwendete unbeschichtete PVC, Weichmacher: DEHP
(Medtronic GmbH, D-Düsseldorf)
- **Carmeda[®]:**
PVC mit Heparinbeschichtung, Weichmacher: DEHP
(Medtronic GmbH, D-Düsseldorf)
- **noDOP[®]:**
DEHP-freies unbeschichtetes PVC, Weichmacher: TEHTM
(Raumedic AG, D-Münchberg)

Der Durchmesser der Schläuche betrug einheitlich 3/8“ bei einer Länge von 50 cm und einer Schichtdicke von 2 mm. Die Schläuche wurden durch einen Konnektor aus Silikon spaltlos zu einem Ring verschlossen. Die Shore-Härte, nach Albert Shore benannt, dient als wesentliche Kenngröße bei der Prüfung von Kunststoffen und Elastomeren, wobei die Shore-Härte auf einer Skala von 0-100 angegeben wird. Die hier verwendeten PVC-Schläuche wiesen eine Härte Shore A von 75 ± 5 nach DIN EN ISO 868 auf. Der Weichmacheranteil von Schlauchmaterial noDOP[®] beträgt 37,8% mit zusätzlich 2,2% weiteren weichmachenden, extrahierbaren Substanzen. Der Weichmacheranteil der Schlauchmaterialien PVC und Carmeda[®] konnte von der Firma Medtronic GmbH aus Gründen der strengen Vertraulichkeit dieser Information nicht an uns übermittelt werden.

2.2 Versuchsaufbau

2.2.1 Chandler-Loop-Modell

Das Chandler-Loop-Modell, ein in vitro System, ermöglicht die Rezirkulation von kleineren Blutvolumina. Der Kontakt zwischen Blut und unphysiologischen Oberflächen, wie er z.B. beim Einsatz der Herz-Lungen-Maschine stattfindet, sollte hier möglichst realistisch in vitro nachgebildet werden. Der Versuchsaufbau bestand aus einem Wasserbad und einer Walze. Das Wasserbad wurde ständig bei 37°C gehalten, indem eine Pumpe das Wasser fortlaufend über einen Thermostat und einen Erhitzer austauschte. Die Walze lag zu 80 Prozent im Wasser und rotierte 15-mal pro Minute. Somit wurde eine hinreichende Annäherung an die physiologischen intrakorporalen Bedingungen geschaffen. Durch den dynamischen Fluss floss das Blut kontinuierlich an den Innenoberflächen der Schläuche vorbei, wodurch ein ständiger Oberflächenkontakt und damit die entsprechenden Wechselwirkungen zwischen Fremdoberfläche und Blutbestandteilen gewährleistet werden konnten.

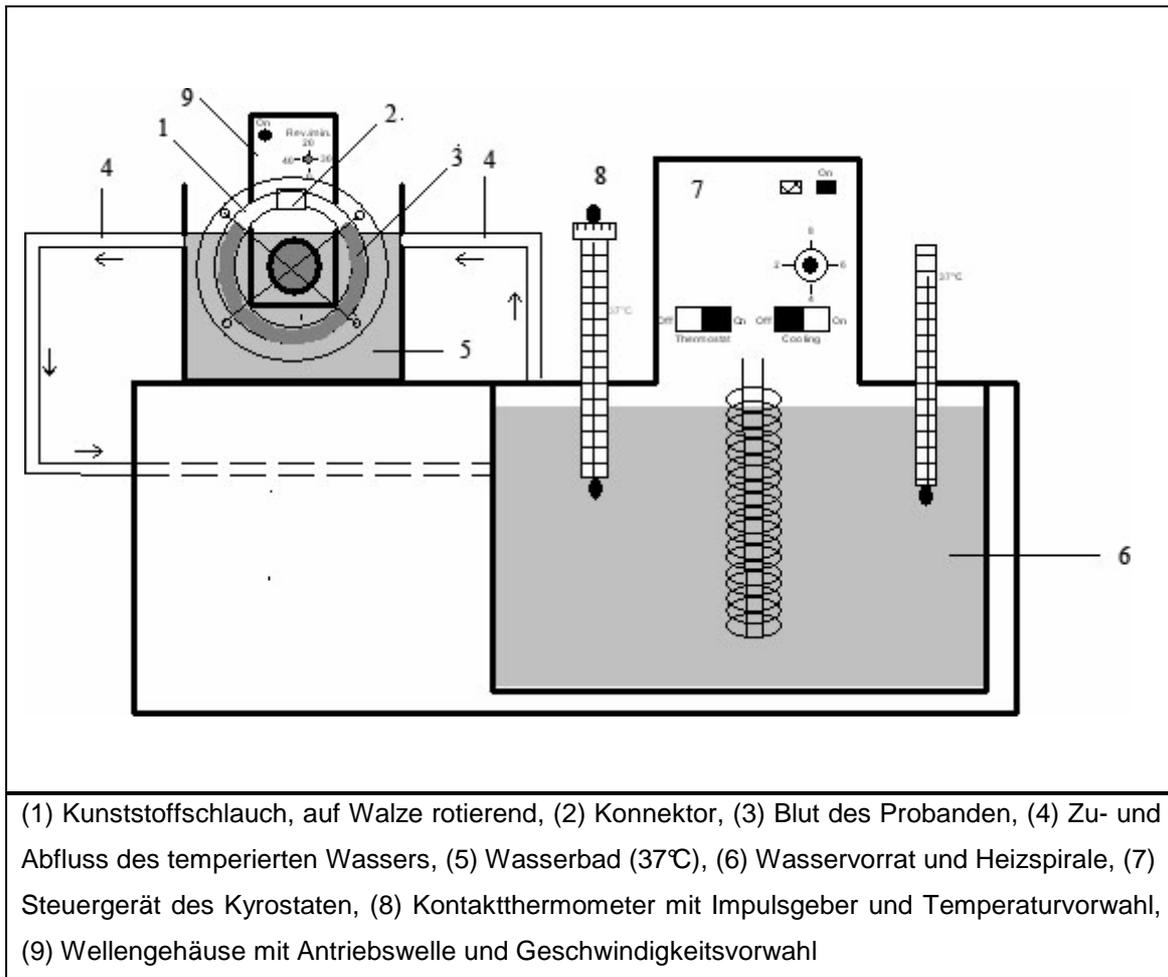


Abb. 1: Modifiziertes Chandler-Loop-Modell

2.2.2 Zellkulturen

2.2.2.1 Material und Geräte

Ampuwa (Fresenius, D-Bad Homburg)

DAPI (Serva, D-Heidelberg)

Detach Kit 250 (Promo Cell, D-Heidelberg)

Komponenten: HepesBSS (30mM Hepes, D-Glucose, NaCl, KCl, NaPhosphate, PhenolRed), Trypsin/EDTA (0.04% / 0.03%), Trypsin Neutralizing Solution (TNS) aus Sojabohnen

D-PBS (Gibco™, NZ-Auckland)

Endothelzellmedium (Cambrex Bio Science, B-Verviers)

Komponenten: EBM[®]-2, CC-3156, Endotheliales Basalmedium, EGM-2 Single Quots, CC-4176, Zusätze und Wachstumsfaktoren (Hydrocortisone, hEGF, FBS, VEGF, hFGF-B, R3-IGF-1, Ascorbinsäure, Heparin, Gentamicin/ Amphotericin-B)

Ethanol (Merck, D-Darmstadt) Gentamycin (PromoCell, D-Heidelberg)

Kollagenaselösung (PAA, A-Pasching)

Kollagen G (Biochrom KG, D-Berlin)

Lösung A pH 7,3 : 137 mM NaCl (Merck, D-Darmstadt)

5,4 mM KCl (Merck, D-Darmstadt)

4,2 mM NaHCO₃ (Merck, D-Darmstadt)

5 mM D-Glucose (Sigma, USA-St.Louis)

Steriles Wasser (Ampuwa[®]) ad 500 ml, steril filtrieren

Methanol GR for analysis (Merck, D-Darmstadt)

RPMI 1640 (Cambrex Bio Science, B-Verviers)

Trypanblaulösung 0,4% (Sigma-Aldrich, D-Steinheim)

Zellkulturflasche Cellstar[®] (Art.Nr.658175) (Greiner Bio One, D-Frickenhausen)

Inkubator, Typ BB 6220 CU (Heraeus, D-Hanau)

Lichtmikroskop, Axiovert B5 (Zeiss, D-Esslingen)

Sterile Werkbank (BDK, D-Sonnenbühl-Genkingen)

Zentrifuge: Varifuge RF Inert (Heraeus, D-Wehrheim)

2.2.2.2 Kulturbedingungen

Das Arbeiten mit den Zellkulturen erfolgte unter einer sterilen Werkbank bei RT. Die Inkubation der Endothelzellen fand in einem CO₂-begasteten Inkubator unter standardisierten Bedingungen von 37°C, Wasserdampfsättigung und einem CO₂-Gehalt von fünf Prozent statt. Durch regelmäßige mikroskopische Kontrolle wurde ein bakterien- und pilzfreies Wachstum sichergestellt.

2.2.2.3 Endothelzellen der Vena saphena

2.2.2.3.1 Isolierung, Kultivierung und Subkultivierung

Die humanen Endothelzellen wurden aus gesunden Abschnitten der Vena saphena gewonnen, die im Rahmen einer Bypassoperation zur Verfügung standen. Die anonymen Spender hatten eine schriftliche Einverständniserklärung über die Verwendung des Venenpräparates zu Forschungszwecken abgegeben. Um die Endothelzellkulturen nachzuweisen, wurden Untersuchungen der Expression endothelspezifischer Zelloberflächenantigene wie CD31 und VEGF mittels Durchflusszytometrie durchgeführt.

Isolierung

Nach der Präparatentnahme lagerte die Vene bei RT in 0,9 Prozent NaCl und wurde innerhalb einer Stunde aufbereitet. Das Venenpräparat inkubierte für 20 Minuten in RPMI-1640 Medium mit 0,5-prozentigem Gentamycin im Inkubator. Unter sterilen Bedingungen erfolgte anschließend die Desinfektion der Venenoberfläche durch 70-prozentiges Ethanol (verdünnt in D-PBS). Vor der enzymatischen Aufbereitung durch sterile 0,1-prozentige Kollagenase wurde die Vene zweimal mit 25 ml Lösung A und einmal mit 5 ml 0,1-prozentiger Kollagenaselösung (verdünnt in D-PBS) mit Hilfe einer stumpfen Kanüle und Klemme durchgespült. Sodann wurde ein Ende der Vene mit einer Bulldogklemme verschlossen, die Vene prall mit 0,1-prozentiger Kollagenase befüllt, das andere Ende verschlossen und unter Befeuchtung von Kompletmedium auf einer Petrischale eine Stunde im Brutschrank inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden durch Auffangen des Eluats und Spülung der Vene mit Pufferlösung (10 ml PBS) in ein 15 ml Falconröhrchen überführt. Es folgte die Zentrifugierung der Zellen, fünf Minuten bei 220 g, das Absaugen des Überstands, Resuspension in 500 µl Kompletmedium und Kultivierung auf einer kollagenbeschichteten sechs-well Platte in 2 ml Medium im Inkubator.

Kontaminierende Zellen wie Erythrozyten, Fibrozyten sowie Zelltrümmer wurden nach 24 Stunden durch Spülung mit Medium beseitigt.

Kultivierung und Subkultivierung der Zellen

Ausreichend konfluente Endothelzellkolonien wurden trypsinisiert und auf Zellkulturflaschen (75 cm², 250 ml, Filterschraubverschluss) transferiert (750 µl in Medium) und im Inkubator kultiviert. Die Gewebekulturflaschen wurden vorher mit Kollagen (40-prozentig in D- PBS) beschichtet (10 ml Kollagenlösung auf 250 ml Flasche, Inkubation 24 Stunden) und mit 16 ml Kulturzellmedium (37°C) befüllt 24-36 Stunden nach der Zellumsetzung wurde die Anheftung der Endothelzellen unter einem inversen Lichtmikroskop überprüft. Das Kulturmedium wurde alle 48 Stunden gewechselt. Die Anzucht konnte als erfolgreich bewertet werden, wenn eine Anheftung der Zellen von 70 Prozent und mehr, eine gleichmäßige und normale Zellmorphologie, einschichtiger Bewuchs und das Auftreten von Mitose spätestens nach 48 Stunden erkennbar waren. Das Subkultivieren der Endothelzellen erfolgte mit dem DetachKit. Bei einer Konfluenz von ca. 70 Prozent wurde die adhärenente Zellkultur mit Hilfe von Trypsin in T75 Zellkulturflaschen passagiert. Nach Waschen der Kultur mit 5 ml HEPES wurde die Zellkultur mit 7,5 ml Trypsin bedeckt und für zwei Minuten im Brutschrank inkubiert. Nach maximal sieben Minuten wurde 7,5 ml TNS hinzugefügt und die Zellsuspension in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert. Die gelösten Zellen wurden bei 220g vier Minuten abzentrifugiert, mit 2 ml Medium resuspendiert und auf fünf T75 Zellkulturflaschen passagiert.

2.2.2.4 Test auf Mykoplasmen

Um eine Kontamination der Zellkultur durch Mykoplasmen auszuschließen, wurde in regelmäßigen Abständen und vor den Versuchsreihen ein Farbttest, d.h. ein DAPI-Test, durchgeführt. Der Test beruht auf dem Nachweis von Mykoplasmen-DNS durch den Fluoreszenzfarbstoff DAPI, 4',6-Diamidino-2-phenylindole·2HCl· H₂O. DAPI bindet selektiv an DNS, wodurch stark fluoreszierende Zellkerne entstehen. Ist eine Zellkultur mit Mykoplasmen infiziert, zeigt sie charakteristische Merkmale unter dem Fluoreszenzmikroskop.

Einzelne fluoreszierende Punkte im Zytoplasma der Endothelzellen oder im interzellulären Raum werden sichtbar. Die Zellproben einer Passage wurden mit 5 ml DAPI-Methanol (Methanol GR for analysis, Merck, D-Darmstadt) gespült und mit weiteren 10 ml 15 Minuten bei RT inkubiert. Nach dem Waschen mit Methanol wurde die Probe in PBS aufgenommen und unter dem Fluoreszenzmikroskop bei LP 420 beurteilt.

In den hier beschriebenen Versuchen kamen ausschließlich Mykoplasmen-negative Kulturen zum Einsatz.

2.2.2.5 Zellzählung

Die Zellzahlbestimmung sowie ein Vitalitätstest erfolgten durch Inkubation der Endothelzellen mit 0,4-prozentiger Trypanblaulösung im Sinne einer Ausschlussfärbung. Der sonst nicht durchlässige Farbstoff Trypanblau kann die defekte Membran devitaler Zellen passieren. Die abgestorbenen Zellen erscheinen tiefblau. Die Zellzahlbestimmung wurde beim Aufteilen der Zellen vorgenommen. 20 µl Zellsuspension wurden mit 80 µl Trypanblaulösung eingefärbt und in der Neubauer Zählkammer mikroskopisch ausgezählt. Durch Auszählen der vier großen Quadrate und Multiplizieren des Mittelwerts mit dem Kammerfaktor 10^4 sowie der Verdünnungsstufe ergibt sich die Zellzahl/ml. Formel zur Bestimmung der Zellzahl:

$$\text{Zellen/ml} = \text{Anzahl der Zellen} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsstufe}$$

2.2.2.6 HUVEC

Die vaskulären Endothelzellen aus der Nabelschnurvene, Passage zwei, wurden freundlicherweise vom Institut für Medizinische Mikrobiologie, Arbeitsgruppe Prof. Dr. V. M. Kempf, der Eberhard-Karls-Universität Tübingen zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung der Zellen entsprach Beschreibung 2.2.2.3. (Kultivierung und Subkultivierung der Zellen). Als Medium fand Endothelial Cell Growth Medium der Firma Promocell (D-Heidelberg) Verwendung. Für die Subkultivierung wurden die HUVEC mit 5 ml 0,05-prozentigem Trypsin (Gibco, NZ-Auckland) trypsinisiert (ein bis fünf Minuten

Einwirkzeit bei 37°C) und dann mit 12 ml Medium neutralisiert. Die anschließend abzentrifugierten Zellen (300 g, 4°C / RT, fünf bis zehn Minuten) wurden in Medium resuspendiert und auf Zellkulturflaschen verteilt.

2.3 Versuchsablauf

2.3.1 Probengewinnung

2.3.1.1 Materialien und Geräte

Butterfly- M19 (Venisystem, Abbot Ireland LTD, IE-Sligo)

Liquemin[®] (Hoffmann La Roche, CH-Basel)

Neutralmonovette (Sarstedt, D-Nümbrecht)

Safe-Lock-Cups (Eppendorf AG , D-Hamburg)

Serummonovetten (Sarstedt, D-Nümbrecht)

2.3.1.2 Probanden

Die Untersuchung erfolgte mit dem Blut sechs gesunder Probanden im Alter zwischen 20-30 Jahren. Die Probanden hatten folgende Kriterien zu erfüllen: männlich, Nichtraucher, keine Einnahme von Medikamenten 14 Tage vor der Blutspende, insbesondere die Hämostase beeinflussende Pharmaka. Sechs weitere Probanden, die nach den gleichen Kriterien ausgewählt wurden, spendeten für die Konzentrationsbestimmung von DEHP und Metaboliten Blut.

2.3.1.3 Blutabnahme

Die Blutabnahme erfolgte mittels Butterfly-M19 und Neutralmonovette. Nach Desinfektion der Einstichstelle und kurzer Stauung wurde eine große Kubitalvene mit Butterfly punktiert und das Blut mit einer Neutralmonovette aspiriert. Der Neutralmonovette wurde 1/U Liquemin[®]/ml Blut zur Heparinisierung zugesetzt. Es wurde auf eine schonende Blutabnahme und eine zügige Weiterbearbeitung geachtet. Unmittelbar nach der Blutentnahme wurde das heparinisierte Vollblut in ein Plastikgefäß gefüllt. Ein Anteil des Blutes wurde als Kontrolle/Nullprobe sofort als Serum abgetrennt.

2.3.1.4 Rezirkulation

Je Proband wurden die drei oben genannten Schlauchtypen PVC, Carmeda[®] und noDOP[®] (50 cm Länge und 3/8“ Durchmesser) untersucht. Die festgelegte Rezirkulationsdauer betrug 60 und 120 Minuten. Je 20 ml des heparinisierten Humanblutes wurde in die entsprechenden PVC-Schläuche gefüllt. Die Schläuche wurden durch Silikonschlauchstückchen (2 cm) spaltlos zu einem Ring verschlossen und sofort im Chandler-Loop-Modell bei 37°C und 15 Umdrehungen/Minute rezirkuliert. Von jedem Schlauchmaterial wurden zwei Schläuche pro Versuch, für den 60-Minuten- und 120-Minuten-Wert, benötigt.

2.3.1.5 Zentrifugation

Nach der Rezirkulation wurde das Blut des entsprechenden Schlauchs zur Serumgewinnung in drei Serummonovetten aufgeteilt, für 30 bis 40 Minuten bei RT stehen gelassen und danach fünf Minuten bei 5000 Umdrehungen/Minute (RT) zentrifugiert.

2.3.1.6 Einfrieren des Serums

Von jeder Probe wurden jeweils zehn Safe-Lock-Cups mit 1 ml Serum in N₂ schockgefroren und bei minus 20°C gelagert.

2.3.2 Zellkulturversuch

2.3.2.1 Aktivierungen der Endothelzellen

Die Endothelzellen wurden 24 Stunden vor der Aktivierung mit Serum in kollagenisierte 12-Loch-Platten (Greiner Bio One, D-Frickenhausen) ausgesät und mit 1 ml Endothelzellmedium (siehe 2.2.2.1) unter normalen Bedingungen inkubiert. Für die nachfolgenden Analysen wurden pro Versuch insgesamt 32 Löcher mit der Zellkultur befüllt. Zum Erhalt eines konfluenten Monolayers erfolgte das Pipettieren von $1,5 \times 10^5$ Zellen/Loch nach Trypsinierung der Zellkultur und Auszählung in der Neubauer Zählkammer. Nach 24 Stunden wurden die adhärennten Zellen unter dem inversen Lichtmikroskop auf ihre Konfluenz überprüft.

Als nächster Schritt erfolgte die Stimulation der Endothelzellen mit den Serumproben des Probanden.

Tab. 1: Pipettierschema

(_0/_60/_120: Rezirkulationszeit in min)

Durchfluss- zytometrie	Durchfluss- zytometrie	Western Blot	PCR
Serum_0	Serum_0	Serum_0	
PVC_60	PVC_60	PVC_60	PVC_60
Carmeda [®] _60	Carmeda [®] _60	Carmeda [®] _60	Carmeda [®] _60
noDOP [®] _60	noDOP [®] _60	noDOP [®] _60	noDOP [®] _60
PVC_120	PVC_120	PVC_120	PVC [®] _120
Carmeda [®] _120	Carmeda [®] _120	Carmeda [®] _120	Carmeda [®] _120
noDOP [®] _120	noDOP [®] _120	noDOP [®] _120	noDOP [®] _120
TNF- α	TNF- α		
Kontrolle_0	Kontrolle_0		

Die Aktivierung von HUVEC und Endothelzellen der Vena saphena erfolgte parallel je Proband. Zur Stimulation der Endothelzellen wurde das Medium abgesaugt und anschließend 500 μ l Endothelzellmedium und 500 μ l des entsprechenden Serums auf die Zellen gegeben und unter Standardbedingungen für 12 bis 15 Stunden inkubiert. Für die Analyse mittels Durchflusszytometrie wurden zwei Negativkontrollen erhoben. Es wurden unstimulierte Endothelzellen „Kontrolle_0“ gemessen und solche die mit „0-Serum“, d.h. Serum, das keinen Kontakt zu den PVC-Schläuchen hatte, aktiviert wurden. Für eine Positivkontrolle wurden die Endothelzellen mit 1 μ l 0,147 nM TNF- α (2,5 ng/ml) (BD Bioscience, D-Heidelberg) für 12 Stunden stimuliert. Auch für die Real-Time PCR wurde eine Negativ- und Positivkontrolle durchgeführt. Endothelzellen wurden hierfür mit 5 μ l 0,147 nM TNF- α (5 ng/ml) (BD Bioscience, D-Heidelberg) für 12 Stunden stimuliert. Als Negativkontrolle diente eine Messung von nicht aktivierten Endothelzellen.

2.4 Untersuchungsmethoden

2.4.1 Analyse der Serumproben auf DEHP und Metaboliten

2.4.1.1 Durchführung

Für die Extraktion wurden hochreine Chemikalien verwendet und die benutzten Geräte gründlich vorgereinigt. DEHP und seine Metaboliten wurden aus den Serumproben mit Hilfe einer Flüssig-Flüssig-Extraktion nach Ansäuerung auf pH 2 isoliert. Nach Zugabe der internen Standards, Mono-n-octylphthalat und Di-n-octylphthalat, wurde zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Die Extrakte wurden über Na_2SO_4 getrocknet, in Spezialgefäße überführt und eingeeengt. Durch Zugabe des Derivatisierungsreagenz Diazomethan wurde methyliert. Nach erneuter Einengung wurde als zweites Derivatisierungsreagenz Bis(trimethylsilyl)-trifluoracetamid (BSTFA) hinzugegeben und die Proben wurden silyliert. DEHP und die derivatisierten Metaboliten wurden mittels Gas-Chromatographie, gekoppelt an Massenspektrometrie (GC-MS) (Finnigan 4000, D-Bremen), analysiert und quantifiziert. Hierfür wurden die Analyte in den aufgearbeiteten Proben nach splitloser Injektion im GC mit einem speziellen Temperaturprogramm auf einer GC-Säule DB1 (J & W Scientific, D-Langen) aufgetrennt. Die Identifizierung der Analyte erfolgte anhand ihrer Retentionszeit und ihrer Massenspektren, die mit Referenzsubstanzen verifiziert wurden. Detektiert wurde das für die Weichmacher charakteristische Hauptfragment mit der Masse m/z 148 im negativ chemischen Ionisierungsmodus mittels der selektiven und sehr sensitiven Methode des Single Ion Monitoring. Die Quantifizierung der Weichmacher und Metabolite erfolgte unter Zuhilfenahme gekaufter, synthetischer Referenzsubstanzen über Kalibrierungskurven. Die Nachweisgrenze im Serum für die Weichmacherbestimmung betrug 0.1 mg/l Serum für 2-Ethylhexanol und 0,0001 mg/l für alle übrigen Substanzen.

2.4.2 Analyse der Serumproben auf IL-1 β und TNF- α mittels ELISA

Die Identifizierung und Quantifizierung der Zytokine IL-1 β und TNF- α in den Serumproben erfolgte durch ELISA Quantikine[®] gemäß den Herstellerangaben. Zur Untersuchung stand eine Negativkontrolle und Proben des rezirkulierten Serums aus.

2.4.2.1 Prinzip

ELISA ist eine immunochemische Bestimmungsmethode zur Ermittlung einer Antigen- oder Antikörperkonzentration durch Markierung des zu bestimmenden Reagens. Dabei werden zum Nachweis eines Proteins die Mechanismen einer Antigen-Antikörperreaktion ausgenutzt. Antikörper werden mit einem Enzym markiert. Dieses Enzym katalysiert eine Farbreaktion und dient somit als Nachweis für das Vorhandensein des zu bestimmenden Antigens. Das Prinzip des hier verwendeten enzymgekoppelten Immunadsorptionstest ELISA ist die so genannte Sandwich Technik: Ein monoklonaler Antikörper, der spezifisch an das nachzuweisende Antigen bindet, wird auf eine feste Phase, eine Mikrotiterplatte, fixiert. Pipettiert man die Probe auf diese feste Phase, so wird das entsprechende zu identifizierende Antigen an den monoklonalen, fest gebundenen Antikörper gekoppelt. Durch Waschen der Platte werden alle ungebundenen Antigene entfernt und zurück bleibt nur der gebundene Anteil. Ein zweiter enzymgekoppelter polyklonaler Antikörper wird zugegeben, der ebenfalls an das Antigen bindet. Es entsteht ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex. Nachdem die Mikrotiterplatte erneut gewaschen wird, um alle ungebundenen Probenanteile zu entfernen, fügt man eine Substratlösung hinzu, worauf sich eine Farbreaktion einstellt. Diese enzymgesteuerte Farbreaktion ist mit einem ELISA-Photometer messbar und steht proportional zur Quantität des gebundenen Antigens.

2.4.2.2 Material und Geräte

ELISA Quantikine[®] (R&D Systems GmbH, USA-Minneapolis)

ELISA- Reader MR 7000 (Dynatech, D-Denkendorf)

2.4.2.3 Analyse auf IL-1 β

Als feste Phase diente eine IL-1 β -Mikroplatte aus Polystyrol, beschichtet mit murinen, monoklonalen Antikörpern gegen IL-1 β . In jede Vertiefung der Mikroplatte wurde nach Vorlage von 100 μ l des Verdünnungspuffers, RD1C, 150 μ l Probe, Standard bzw. Kontrolle hinzu pipettiert. Durch eine Immunreaktion kommt eine Bindung zwischen humanem IL-1 β und den monoklonalen Antikörpern gegen IL-1 β zustande. Nach einer Inkubationszeit von 14-20 Stunden bei RT wurden die Lösungen abgesaugt und die Vertiefungen insgesamt viermal mit Waschpuffer gewaschen. 200 μ l Konjugat, bestehend aus einem polyklonalen Antikörper gegen IL-1 β , gekoppelt mit einer alkalischen Phosphatase, wurde in jede Vertiefung pipettiert und drei Stunden bei RT inkubiert. Die anschließend hinzu gegebene 50 μ l Substratlösung (lyophilisiertes NADPH mit Stabilisator und Pufferlösung; Inkubation 45 Minuten, RT) und 50 μ l Verstärkerlösung (alkoholische Deydrogenase, Diaphorase und Iodonitrotetrazolium Violet; Inkubation 45 Minuten, RT) führte zu einer enzymatischen Farbreaktion welche durch 50 μ l 2 N Schwefelsäure gestoppt wurde. Die Extinktion des entstandenen Farbstoffs wurde innerhalb 30 Minuten durch den ELISA-Reader MR 7000 bei einer Wellenlänge von 490 nm gemessen und steht direkt proportional zu der Menge an gebundenem IL-1 β .

2.4.2.4 Analyse auf TNF- α

In die Vertiefung der Mikrotiterplatte aus Polystyrol, die mit murinen monoklonalen Antikörpern gegen TNF- α beschichtet ist, wurde ein Verdünnungspuffer RD1F (50 μ l) und anschließend 200 μ l Probe, Standard bzw. Kontrolle, hinzu pipettiert und für zwei Stunden bei RT inkubiert. Nach Absaugen der Lösungen und Waschen der Mikrotiterplatte fand eine Inkubation (zwei Stunden, RT) mit 200 μ l TNF- α -Konjugat (polyklonale Antikörper gegen TNF- α gekoppelt an Meerrettichperoxidase) statt. Der Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex reagierte nach Waschen der Mikrotiterplatte mit Waschpuffer (dreimal) mit 200 μ l Substratlösung (Hydrogenperoxid und chromogenes Tetramethylbenzidin; Inkubation für 20 Minuten unter Lichtschutz, RT). Zum Abstoppen der Reaktion wurde 50 μ l Schwefelsäure verwendet, die

keinen Einfluss auf die Farbintensität nimmt. Die Messung der Farbintensität erfolgte durch den ELISA-Reader MR 7000 bei einer Wellenlänge von 450 nm innerhalb 30 Minuten nach Abstoppen der Reaktion. Die Farbentwicklung stand hierbei direkt proportional zur Menge der Bindungen von TNF- α an den monoklonalen murinen Antikörper gegen TNF- α .

2.4.3 Analyse von ICAM-1 mittels Durchflusszytometrie

2.4.3.1 Prinzip

Die Durchflusszytometrie, auch als FACS bezeichnet, basiert auf der Emission von optischen Signalen seitens der Zellen, wenn diese einen Laserstrahl passieren. Antikörper, die gegen bestimmte Oberflächenmerkmale gerichtet werden und mit verschiedenen fluoreszierenden Farbstoffen verbunden sind, werden mit der Probe inkubiert. Zellen mit den entsprechenden Oberflächenmerkmalen können so detektiert und quantifiziert werden.

2.4.3.2 Material und Geräte

BD Cell Quest™ Pro Software (BD Bio Science, D-Heidelberg)

CD 54 (ICAM-1) Antikörper, PE, (BD Bio Science, D-Heidelberg)

FAC Scan™ (BD Bio Science, D-Heidelberg)

FACS-Lösung: 12,5 g Formaldehyd. pH 7,4 PBS ad 500 g, steril filtriert (Merck, D-Darmstadt)

FCS.(Gibco™, NZ-Auckland)

2.4.3.3 Durchführung

Bei der Durchflusszytometrie im FACScan™ wurden die mit CD54 markierten Endothelzellen mit der Anregungswellenlänge 488 nm eines 15 Watt Argon Lasers bestrahlt. Die markierten Zellen emittierten das Licht bei einer charakteristischen Wellenlänge. Die Auswertung der aufgenommenen Daten erfolgte über die BD CellQuest™ Pro Software. Die Daten folgender Parameter wurden registriert:

- Vorwärtsstreulicht als Maß für Zellgröße
- Seitwärtsstreulicht als Maß für Granularität der Zelle

- Rot-Fluoreszenz Phycoerythrin-(PE) gekoppelter Zellen;
- Lichtemission bei 585/ 42 nm

Zellschrott wurde anhand des Streulichts identifiziert und von der Analyse ausgeschlossen. Die stimulierten Endothelzellen (2.3.2.2) wurden mit Endothelzellmedium (37°C) gewaschen und mit 1 ml in aktivierten FCS (5 % in PBS, pH 7,4) und 3,33 µl ICAM-1 Antikörper pro Loch inkubiert (eine Stunde, 4°C). Nach Inkubation wurden die Ansätze gewaschen, trypsinisiert, zentrifugiert und das Pellet in die FACS-Lösung aufgenommen. Pro Probe wurden die Daten von 5000 Zellen mit dem FACScan™ aufgenommen und durch die BD CellQuest™ Pro Software ausgewertet. Der Prozentsatz der ICAM-1 exprimierenden Zellen wurde verglichen.

2.4.4 Analyse von E-Selektin, ICAM-1, VCAM-1 mittels Real-Time PCR

Um den Aktivierungszustand der Endothelzellen nach Probenkontakt zu bestimmen, wurde neben Western Blot und Durchflusszytometrie auch die Genexpressionsanalyse (PCR) gewählt. Bei der Genexpressionsanalyse reichen schon kleinste Mengen an Material aus um die gesuchten Substanzen zu bestimmen. Die PCR-Technik mit vorgeschalteter cDNA-Synthese (Real-Time PCR) zeichnet sich durch extrem hohe Empfindlichkeit gegenüber allen anderen Methoden aus.

Für die Bestimmung von ICAM-1 wurden die Proben der Probanden eins bis sechs analysiert, für VCAM-1 und E-Selektin die Proben der Probanden eins, drei und fünf.

2.4.4.1 Prinzip

Die Real-Time PCR beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion und bietet zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung des entsprechenden DNA-Abschnittes während oder am Ende des PCR-Zyklus. Mit Hilfe der Real-Time PCR ist es möglich, kleinste Mengen an DNA durch Amplifikation zu detektieren und zu quantifizieren. Zur Quantifizierung der PCR-Produkte wird ein Fluoreszenzfarbstoff eingesetzt, der sich an doppelsträngige

DNA anlagert. Durch diese Komplexbildung steigt die Fluoreszenz des Farbstoffes an. Der Anstieg der Fluoreszenz korreliert mit der Zunahme der Ziel-DNA. Eine Schmelzkurvenanalyse am Ende der PCR dient der Spezifizierung der amplifizierten DNA-Abschnitte. Zur relativen Quantifizierung der Expression des Zielgens wird ein konstant exprimiertes Referenz-Gen, beispielsweise GAPDH, eingeführt und mitgemessen. Das Referenzgen muss über eine stabile mRNA-Synthese verfügen, die selbst unter experimentellen Bedingungen stabil bleibt. Der CT-Wert, Crossing Point, dient als Maß für die Quantifizierung der Startmenge. Er entspricht der Anzahl der PCR-Zyklen, die zum Erreichen eines konstant definierten Fluoreszenzniveaus nötig sind. Ein um eine Einheit geringerer CT-Wert entspricht der doppelten Menge an Start-DNA.

2.4.4.2 Material und Geräte

Biophotometer (Eppendorf, D-Hamburg)

iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System (Bio RAD, D-München)

IQ™SYBR®Green Supermix (Bio RAD, D-München)

iScript™ Synthesis Kit (Bio RAD Laboratories GmbH, D-München)

RNeasy® Protect Mini Kit (Qiagen GmbH, D-Hilden)

2.4.4.3 Extraktion der Gesamt-RNA und Real-Time PCR

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus Endothelzellen erfolgte mit Hilfe des RNeasy® Protect Mini Kit gemäß den Herstellerangaben. Das Prinzip von RNeasy® Protect Mini Kit beruht auf der Bindung von RNA an eine Silica–Gel-Membran: durch ein spezielles, hochsalzhaltiges Puffersystem wird die Bindung von bis zu 100 µg RNA, die länger als 200 Basenpaare ist, an diese Membran ermöglicht. Bis zur weiteren Analytik wurden die Proben in Stickstoff schockgefroren und bei minus 80°C gelagert. Für die anschließende Synthese der cDNA mit dem iScript™ cDNA Synthesis Kit wurde die Konzentration und Qualität mit Hilfe des Biophotometers ermittelt. Die Primer für die Real-Time PCR wurden mit „Primer3“ und Primer Premier 5 Software (PREMIER Biosoft International, USA-CA) so ausgewählt, dass die optimale Annealingtemperatur 60°C und der GC-Gehalt 55-63 Prozent betrug. Die Spezifität der Primer konnte

durch Untersuchung der PCR-Produktgröße belegt werden. Hierfür wurde Gelelektrophorese und Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Um die Amplifikation von genomischer DNA zu vermeiden, überspannten alle verwendeten Primer ein Intron. Zusätzlich zeigten die Schmelzkurvenanalyse und die Agarose-Gelelektrophorese, dass keine Nebenprodukte außer den spezifischen mit Primer versehenen Sequenzen der cDNA vervielfältigt wurden. Für die Real-Time PCR wurden folgende genspezifische Primersequenzen verwendet:

Tab. 2: Genspezifische Primersequenzen

Gen	Primer	5`-3`Primersequenz	Hersteller
hum. GAPDH	Sense	TCAACAGCGACACCCACTCC	Operon (D-Köln)
	Antisense	TGAGGTCCACCACCCTGTTG	
hum. ICAM-1	Sense	CTTGAGGGCACCTACCTCTGTC	Operon (D-Köln)
	Antisense	CGGCTGCTACCACAGTGATG	
hum. VCAM-1	Sense	ACACTTTATGTCAATGTTGCCCC	Operon (D-Köln) MWG-Biotech AG (D-Ebersberg)
	Antisense	GAGGCTGTAGCTCCCGTTAG	

Der 15 µl PCR-Ansatz enthielt IQ™SYBR®Green Supermix, 300 µM Sense- und Antisense-Primer und 2 ng cDNA als Template. Der Ansatz wurde im Thermocycler (iCycler) drei Minuten auf 95°C erhitzt um eine initiale Denaturierung herbeizuführen. Es folgte die Amplifikation der cDNA mit spezifischem PCR-Programm durch zyklisches Denaturieren (95°C, 15 Sekunden), Annealing (60°C, 30 Sekunden) und DNA-Synthese (72°C, 10 Sekunden). Insgesamt wurden 40 Zyklen durchlaufen. Je Probe wurden drei Replikationen durchgeführt, um Variabilitäten der PCR-Amplifikation auszugleichen.

2.4.4.4 Relative Quantifizierung

Für die Datenverarbeitung wurde der CT-Wert (Schwellenwert) verwendet. Dieser Schwellenwert wurde im Bereich der exponentiellen Amplifikation bei 10 Prozent der durchschnittlichen maximalen Fluoreszenz festgelegt. Zur Auswertung der erhobenen PCR-Daten wurde in diesem Versuch die relative Quantifizierung gewählt. Hierfür ist die zusätzliche Quantifizierung eines Referenzgens nötig. Durch dieses Referenzgen, hier GAPDH, dessen mRNA-Synthese während der gesamten Versuchsreihe konstant bleibt, ist es möglich einen relativen Mengenvergleich durchzuführen. Die interne Kontrolle kann Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten RNA ausgleichen. Bedingung ist, dass die Expressionrate stabil ist und keinen Varianzen unterliegt. Zur weiteren Verbesserung der Genauigkeit wurden die Werte nach der delta-delta-CT-Methode berechnet. Als Effizienz des PCR-Ansatzes wurde 100 Prozent errechnet. Die Ergebniswerte der Gruppen Carmeda[®] und noDOP[®] wurden in Bezug zu PVC gesetzt. PVC wurde gleich eins gesetzt.

2.4.5 Analyse von E-Selektin und I-CAM mittels Western Blot

2.4.5.1 Prinzip

Im Western-Blot-Analyseverfahren, auch Immunblot genannt, werden Proteine zunächst nach ihrer Größe elektrophoretisch aufgetrennt, dann auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und durch Reaktion mit einem spezifischen Antikörper sichtbar gemacht.

2.4.5.2 Material und Geräte

Filterpapier (Whatman, USA)

Goat-anti-mouse IgG-AP 0810 (Immunotech, F-Marseille)

Heizblock HB-130 (UNITEK, D-Leutenbach-Nellmersbach)

HMW-Marker (BioRad, D-München)

Mouse-anti-human-hsp70 MA3-006 (Dianova, D-Hamburg)

Quentix Western Blot Signal Enhance (PIERCE, USA-Rockford)

Rotamax 120 (Heidolph, D-Schwabach)

SDS (Sigma, USA-St. Louis)

SigmaFast™ BCIP/NBT (Sigma, D-Deisenhofen)

Trockenmilch (Sigma, D-München)

Tween®20 (Merck, D-Darmstadt)

2.4.5.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die stimulierten Endothelzellen (2.3.2.2) wurden mit 800 µl HEPES gewaschen, sieben Minuten mit 450 µl Trypsin trypsinisiert, und mit 450 µl TNS neutralisiert. Nach Zentrifugierung und Absaugen des Überschusses wurden die Zellen mit 1000 µl Endothelzellmedium und 50 µl DMSO bis zur weiteren Analyse durch Western Blot bei minus 80°C gelagert. Vor dem eigentlichen Western-Blot-Analyseverfahren wurde das Proteingemisch durch Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt, entsprechend der Größe, Ladung oder anderen Eigenschaften. Für die Western-Blot-Analyse wurden die Zell-Lysate mit einem Protein-Extraktionskit aufbereitet und mit Microcon-Filter fünffach konzentriert und weiter mit nicht reduzierendem Probenpuffer im Verhältnis 1:3 fünf Minuten bei 95°C in einem Heizblock inkubiert. Die Proteine wurden durch diese Behandlung mit Natriumdodecylsulfat (SDS) markiert und erhielten so eine negative Ladung, wodurch die elektrophoretische Trennung möglich wurde. Zur Bestimmung der relativen Molekülmasse der Proteine diente ein HMW-Marker. Dieser Marker enthielt folgende Eichproteine: Myosin (200 kDa), β -Galaktosidase (116,25 kDa), Phosphorylase b (97,5 kDa), Serumalbumin (66,2 kDa), Ovalbumin (45 kDa). Der Marker wurde in einem Verhältnis von 1:20 mit Probenpuffer verdünnt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte durch SDS-PAGE nach Laemmli (Laemmli, 1970). Es wurde eine vertikale Gelkammer verwendet (BioRad). Das Gel bestand aus acht Prozent Trenngel und vier Prozent Sammelgel, die Schichtdicke betrug 1 mm. Pro Geltasche wurde 30 µl Probe und 25 µl HMW Standard aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit einem Elektrodenpuffer bei einer Stromstärke von 20 mA durchgeführt. Für die ersten zehn Minuten wurde eine Spannung von 70 Volt angelegt, dann folgte für 28 Minuten eine Spannung von 200 Volt.

2.4.5.4 Western- Immunblotting nach SDS-PAGE

Die Proteine wurden nach der Elektrophorese aus dem SDS-Gel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Es folgte die Inkubation von Gel, Nitrozellulosemembran (NZM, mit Porengröße 0,45 µm) und zwei Filterpapieren für 15 Minuten im Transferpuffer. Kurz vor dem eigentlichen Blottingvorgang wurden Papiertücher auf Graphitplatten der Blottingapparatur appliziert und mit Transferpuffer gesättigt. Sodann wurden folgende Teile „sandwichartig“ aufgebaut:

- Filterpapier
- Nitrozellulosemembran
- Gel
- Filterpapier

Der Blottingvorgang erfolgte bei 15 Volt über 30 Minuten.

Es folgte die „Fast- Green- Färbung“ des Blots. Dafür wurde der Blot in 0,1-prozentigem Fast Green mit einprozentiger Essigsäure unter leichtem Schütteln (Rotamax 120) für fünf Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde durch Aufbringen von bidestilliertem Wasser gestoppt und die angefärbten Banden des HMW-Standards markiert. Zur Durchführung der Antikörperreaktion erfolgte die Entfärbung mit 0,2 M NaOH und Spülung mit bidestilliertem Wasser. Zur Absättigung unspezifischer Bindungen fand die Inkubation des Blot über Nacht (4°C) in dreiprozentiger Trockenmilch statt. Die Proteinbanden konnten nun auf der Membran mit Hilfe von spezifischen Antikörpern identifiziert werden. Spezifische Antikörper banden an der passenden Proteinbande auf der Membran. Der Blot wurde in TTBS (0,05 Prozent Tween[®]20 in 20 mM TBS) für eine Minute und für je fünf Minuten dreimal in TBS gewaschen. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper, Mouse-anti-human-hsp70, 6 µl Antikörper und 20 ml TBS lief über zwei Stunden bei RT. Nach der Bindung des primären Antikörpers an das entsprechende auf dem Blot fixierte Protein konnte der sekundäre Antikörper, der mit alkalischer Phosphatase konjugiert war, an den primären Antikörper binden. Nach der Inkubation mit dem primären Antikörper folgten fünf Waschschriffe mit TBS zu je zwei Minuten. Darauf folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper, goat-anti-mouse-IgG-AP, 4 µl in 20 ml TBS, für

weitere zwei Stunden bei RT. Nach weiteren Waschschritten, fünfmal zwei Minuten mit TBS, erfolgte nun die Sichtbarmachung. Das Hinzufügen einer Substratlösung führte zu einer Farbreaktion. Die alkalische Phosphatase katalysierte das Substrat zu einem stark gefärbten, unlöslichen Produkt. Durch diese Farbreaktion konnten die Proteine detektiert werden. Sie wurden als Banden auf dem Blot sichtbar. Als Substrat wurde 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate/ nitro-blue tetrazolium (SigmaFast™ BCIP/NBT) gewählt. Die präzipitierende Substratlösung wurde nach Herstellerangaben angesetzt. Nach 90 Minuten wurde die Reaktion durch mehrmaliges Waschen mit destilliertem Wasser abgestoppt und die Blots wurden luftgetrocknet und dunkel gelagert. Zur Identifikation von ICAM-1 wurde als primärer Antikörper Mouse-anti-human-CD54, 1:10.000, und als sekundärer Antikörper Goat-anti-mouse-CD54 eingesetzt. Zur Identifizierung von E-Selektin wurde als primärer Antikörper Mouse-anti-human-CD62E, verdünnt 1:1000 mit TBS, und als sekundärer Antikörper Goat-anti-mouse-IgG-AP verwendet.

2.5 Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe des Softwarepakets JMP, Version 7.0.1, SAS Institute (USA-Cary) durchgeführt. Die Schaubilder wurden mit Sigmaplot, SPSS Inc. (USA-Chicago) erstellt.

Bei den meisten Variablen wurden zur Varianzstabilisierung Box-Cox-Transformationen durchgeführt. Die transformierten Werte wurden zur Interpretation der Ergebnisse wieder zurück transformiert und als Mittelwerte mit ihren 95-prozentigen Vertrauensintervallen dargestellt. Bei einigen Variablen wurden die Werte logarithmiert. Zur Interpretation der Ergebnisse wurden die Logarithmen wieder delogarithmiert und als geometrische Mittelwerte ausgegeben. Das Varianzanalysemodell enthielt als festen Faktor den Schlauchtyp und als zufälligen Faktor die Versuchsnummer. Die verschiedenen Schlauchtypen unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Zeiten (60 bzw. 120 Minuten) wurden mit dem Tukey-HSD-Test auf paarweise Unterschiede geprüft.

3 ERGEBNISSE

Im Mittelpunkt der Untersuchungen standen drei unterschiedliche PVC-Schlauchmaterialien: das für die Extrakorporale Zirkulation standardmäßig verwendete PVC mit DEHP (Gruppe PVC), PVC mit Heparinbeschichtung (Gruppe Carmeda[®]) und ein DEHP-freies PVC mit dem alternativen Weichmacher TEHTM (Gruppe noDOP[®]). Von Interesse war die Freisetzung von DEHP und Metaboliten aus den Schlauchmaterialien in das Patientenblut. Zunächst wurden DEHP und seine Metaboliten in den Serumproben quantifiziert und miteinander verglichen. In einem weiteren Schritt wurde die Aktivierung von humanen Endothelzellen durch DEHP und Metaboliten analysiert. Hierzu wurden die Serumproben auf Konzentrationen der Zytokine IL-1 β und TNF- α mittels ELISAs überprüft. Nach Inkubation von humanen Endothelzellen der Vena saphena und HUVEC mit den Serumproben erfolgte die Analyse der Zellen auf die Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin durch Real-Time PCR. Um die Ergebnisse zu verifizieren wurden weitere Methoden zur Bestimmung etabliert. E-Selektin wurde zusätzlich mit Hilfe der Western-Blot-Methode bestimmt. Die Expression von ICAM-1 wurde durch Durchflusszytometrie-Analyse und Western Blot geprüft.

3.1 Analyse der Serumproben auf DEHP und Metaboliten

Die quantitative Analyse von DEHP und seinen Metaboliten wurde mittels Gas-Chromatographie, gekoppelt an Massenspektrometrie (GC-MS) durchgeführt.

Die Blutproben wurden vor der Zirkulation sowie 60 Minuten und 120 Minuten nach Start der Zirkulation entnommen. In Abhängigkeit von den drei unterschiedlichen PVC-Schläuchen und Zirkulationszeiten von 60 und 120 Minuten wurden Unterschiede in der Freisetzung des Weichmachers untersucht.

Die Nachweisgrenze für die Weichmacherbestimmung im Serum betrug 0.0001 mg/l Serum für DEHP und Metaboliten und 0.1 mg/l für 2-Ethylhexanol.

3.1.1 Analyse auf Di(2-ethylhexyl)phthalat: DEHP

Die signifikant höchste Konzentration an freigesetztem DEHP wurde bei Proben der Gruppe PVC mit einem Wert von 35.8 mg/l Serum bei 60 Minuten und von 65.0 mg/l bei 120 Minuten detektiert. Proben des Schlauchtyps Carmeda[®] setzten eine DEHP-Konzentration von 2.11 mg/l Serum bei 120 Minuten frei, die ebenfalls signifikant gegenüber den Werten des Schlauchtyps noDOP[®] erhöht war. Die geringste Konzentration an DEHP konnte bei Proben des Schlauchtyps noDOP[®] mit 0.33 mg/l verzeichnet werden. Gegenüber der Kontrolle war die Menge an freigesetztem DEHP bei noDOP[®] dennoch signifikant erhöht. Zwischen den Rezirkulationszeiten von 60 und 120 Minuten war bei keinem Schlauchtyp ein signifikanter Unterschied erkennbar.

Tab. 3: DEHP-Konzentration (mg/l)

(_0/_60/_120: Rezirkulationszeit in min)

Probe	Mittelwert
Kontrolle_0	0.12
PVC_60	35.80
PVC_120	65.00
Carmeda [®] _60	1.47
Carmeda [®] _120	2.11
noDOP [®] _60	0.27
noDOP [®] _120	0.33

Tab. 4: DEHP-Konzentration (mg/l)

(_0/_60/_120: Rezirkulationszeit in min; Tukey Test: Werte mit gleichen Buchstaben zeigen keinen signifikanten Unterschied, $\alpha=0.05$)

Probe		Mittelwert
PVC_120	A	65.00
PVC_60	A	35.80
Carmeda [®] _120	B	2.11
Carmeda [®] _60	B	1.47
noDOP [®] _120	C	0.33
noDOP [®] _60	C	0.27
Kontrolle_0	D	0.12

3.1.2 Analyse auf Mono(2-ethylhexyl)phthalat: MEHP

Die Serumproben der Gruppe des Schlauchtyps PVC wiesen signifikant die höchste Konzentration an MEHP auf. Es bestand bei dieser Gruppe ein signifikanter Unterschied von 0.67 mg/l bei 120 gegenüber 60 Minuten. Die MEHP-Konzentration der Proben der Gruppe PVC waren gegenüber der Gruppe des Carmeda[®]-Schlauchmaterial bei 60 Minuten um 1.42 mg/l und bei 120 Minuten um 1.75 mg/l erhöht und lagen gegenüber Proben des Schlauchmaterials noDOP[®] um 5.10 mg/l (60 Minuten) und 5.60 mg/l (120 Minuten) höher. Die Werte der Gruppe des Schlauchmaterials Carmeda[®] waren gegenüber denen der Gruppe des noDOP[®]-Schlauchmaterials signifikant um 3.67 mg/l (60 Minuten) und 3.84 mg/l (120 Minuten) erhöht. Bei Proben der Gruppe des noDOP[®]-Materials (120 Minuten) war ein signifikanter Unterschied an MEHP von 0.45 mg/l zum Kontrollserum messbar. Der 60-Minutenwert der Gruppe des Schlauchmaterials noDOP[®] unterschied sich nicht von der Kontrolle. Die Kontrolle wies mit 0.02 mg/l die geringste MEHP-Konzentration auf. Zwischen 60 und 120 Minuten konnte bei Proben der Schlauchgruppe Carmeda[®] und noDOP[®] keine signifikante Veränderung gemessen werden.

Tab. 5: MEHP-Konzentration (mg/l)

(_0/_60/_120: Rezirkulationszeit in min)

Probe	Mittelwert
Kontrolle_0	0.02
PVC_60	3.39
PVC_120	6.65
Carmeda®_60	0.82
Carmeda®_120	1.15
noDOP®_60	0.02
noDOP®_120	0.03

Tab. 6: MEHP-Konzentration (mg/l)

(_0/_60/_120: Rezirkulationszeit in min; Tukey Test: Werte mit gleichen Buchstaben zeigen keinen signifikanten Unterschied, $\alpha=0,05$)

Probe	Mittelwert
PVC_120	6.65
PVC_60	3.39
Carmeda®_120	1.15
Carmeda®_60	0.82
noDOP®_120	0.03
noDOP®_60	0.02
Kontrolle_0	0.02

3.1.3 Analyse auf Mono(2-ethyl-5-hydroxyhexyl)phthalat: 5OH-MEHP

Der Sekundärmetabolit des DEHP 5OH-MEHP war nur bei der Gruppe des Schlauchmaterials PVC nachzuweisen. Mit 0.03 mg/l war die Konzentration bei einer Rezirkulation von 120 Minuten signifikant gegenüber dem 60-Minutenwert von 0.01 mg/l erhöht.

Tab. 7: 5OH-MEHP-Konzentration (mg/l)

(_60/_120: Rezirkulationszeit in min)

Probe	Mittelwert
PVC_60	0.01
PVC_120	0.03

3.1.4 Analyse auf Mono(2-ethyl-5-oxohexyl)phthalat: 5oxo-MEHP

5oxo-MEHP war nur bei Proben der Gruppe mit PVC-Schlauchmaterial und der Kontrolle identifizierbar. Die Menge an 5oxo-MEHP war bei Proben der Gruppe PVC signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht. Ein Unterschied zwischen dem 60- und 120-Minutenwert bei Proben der Gruppe mit PVC-Schlauchmaterial war nicht zu verzeichnen.

Tab. 8: 5oxo-MEHP-Konzentration (mg/l)

(_0/_60/_120: Rezirkulationszeit in min)

Probe	Mittelwert
Kontrolle_0	0.0003
PVC_60	0.0029
PVC_120	0.0054

Tab. 9: 5oxo-MEHP-Konzentration (mg/l)

(_0/_60/_120: Rezirkulationszeit in min; Tukey Test: Werte mit gleichen Buchstaben zeigen keinen signifikanten Unterschied, $\alpha = 0,05$)

Probe		Mittelwert
PVC_120	A	0.0054
PVC_60	A	0.0029
Kontrolle_0	B	0.0003

3.1.5 Analyse auf 2-Ethylhexanol

2-Ethylhexanol war in Proben der Gruppen Kontrolle, PVC und noDOP[®] detektierbar. Proben der Schlauchgruppe Carmeda[®] wiesen Konzentrationen auf Niveau der Nachweisgrenze von 0.1 mg/l Serum auf. Die Schlauchgruppe PVC präsentierte die signifikant höchste Konzentration an 2-Ethylhexanol gefolgt von Proben der Schlauchgruppe noDOP[®], die einen signifikanten Anstieg gegenüber der Kontrolle aufzeigte. Ebenso bestand mit einer Differenz von 0.76 mg/l ein signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen dem 60- und dem 120-Minutenwert bei Proben der Schlauchgruppe PVC. Die Differenz zwischen der Gruppe des Schlauchmaterials PVC und noDOP[®] betrug bei 60 Minuten 0.82 mg/l und bei 120 Minuten 1.70 mg/l.

Tab. 10: 2-Ethylhexanol-Konzentrationen (mg/l)

(_0/_60/_120: Rezirkulationszeit in min)

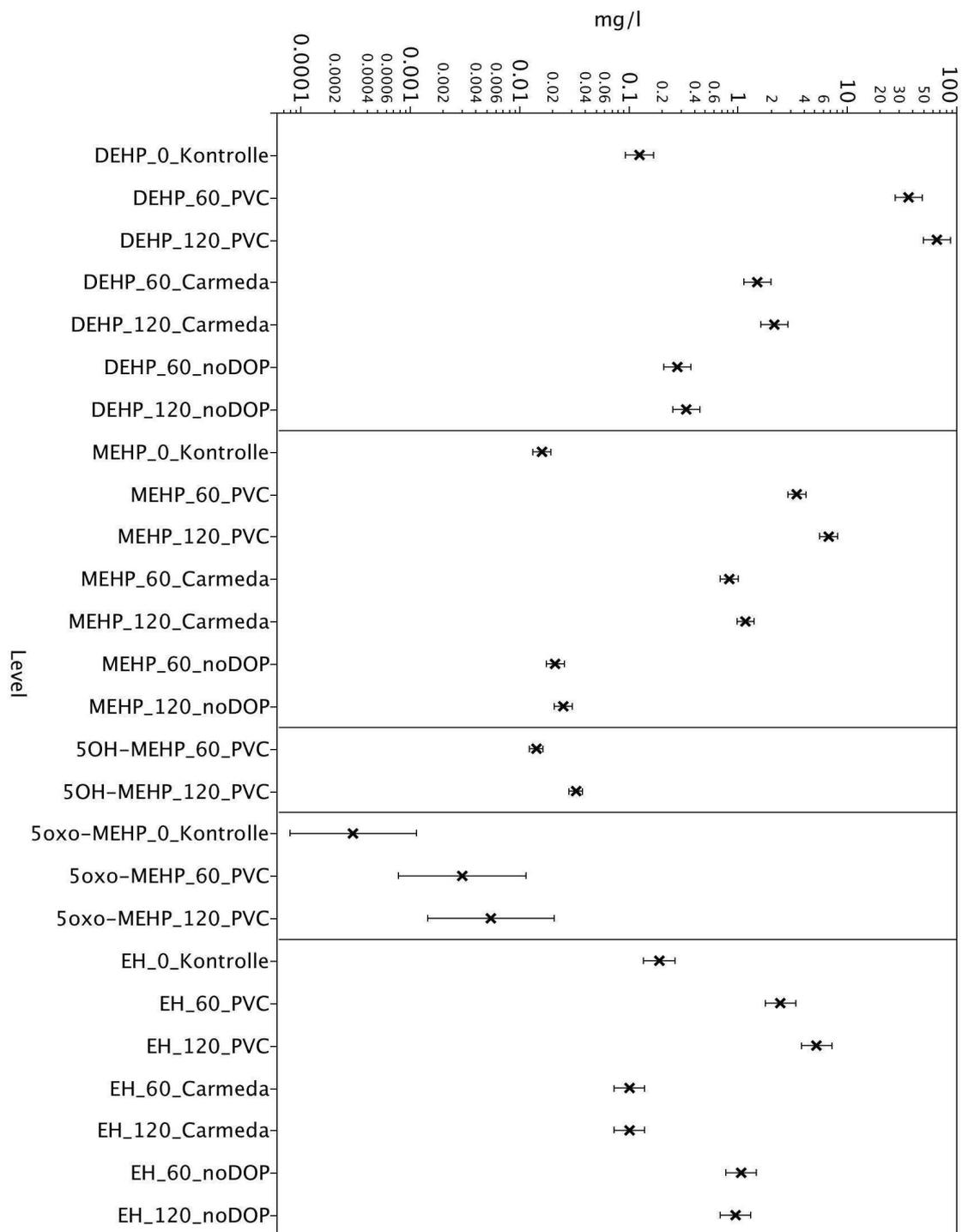
Probe	Mittelwert
Kontrolle_0	0.19
PVC_60	2.40
PVC_120	5.13
Carmeda [®] _60	0.10
Carmeda [®] _120	0.10
noDOP [®] _60	1.05
noDOP [®] _120	0.93

Tab. 11: 2-Ethylhexanol-Konzentration (mg/l)

(_0/_60/_120: Rezirkulationszeit in min); Tukey Test: Werte mit gleichen Buchstaben zeigen keinen signifikanten Unterschied, $\alpha=0,05$)

Probe		Mittelwert
PVC_120	A	5.13
PVC_60	B	2.40
noDOP [®] _60	C	1.05
noDOP [®] _120	C	0.93
Kontrolle_0	D	0.19
Carmeda [®] _120	D	0.10
Carmeda [®] _60	D	0.10

3 ERGEBNISSE



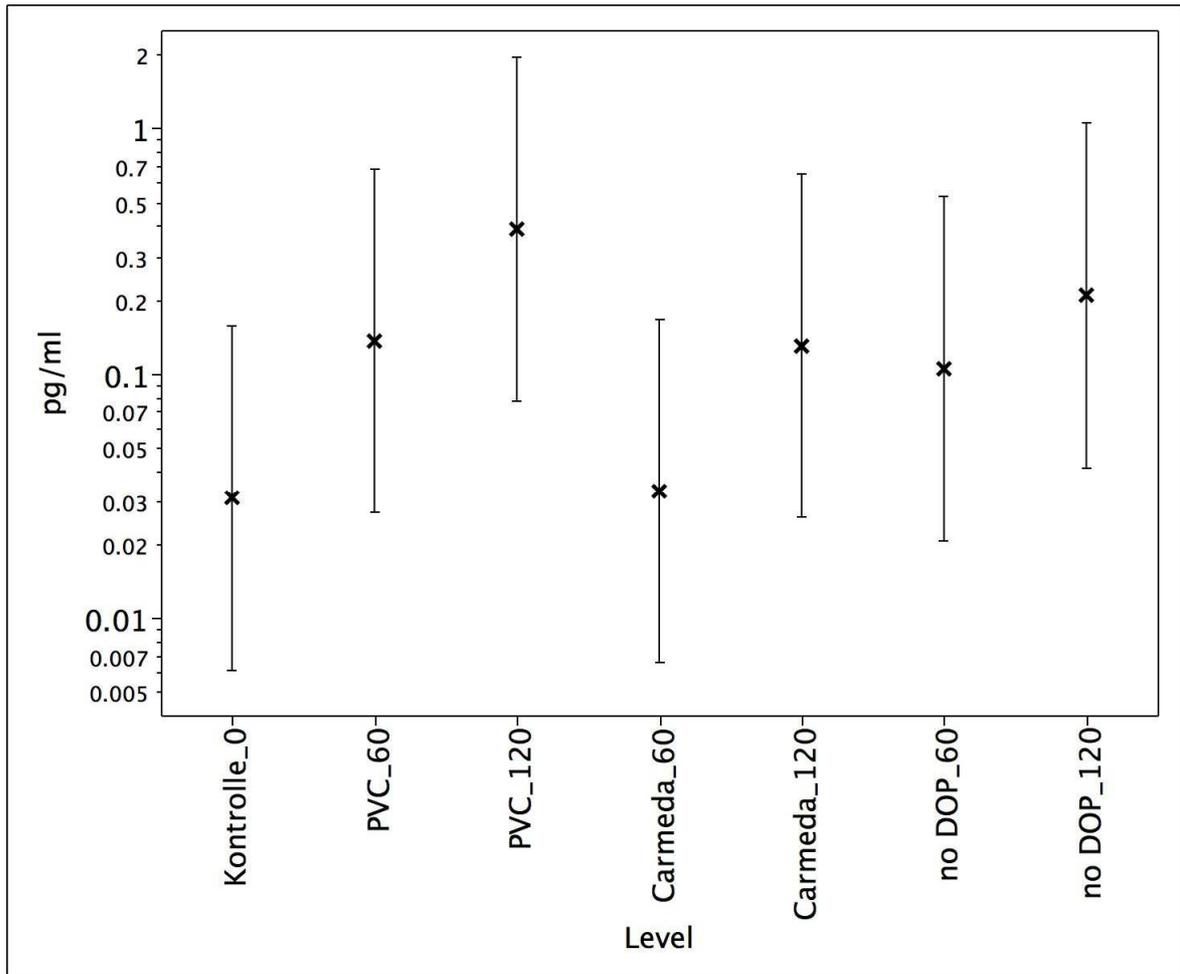
_0/_60/_120: Rezirkulationszeit in min; _Kontrolle: Kontrollgruppe ohne Kontakt zu Schlauchmaterial, _PVC/_Carmeda/_noDOP: Schlauchmaterialien PVC, Carmeda®; noDOP®, _DEHP/_MEHP/_5OH-MEHP/5oxo-MEHP/_EH: DEHP und Metabolite

Abb. 2: Konzentrationen (mg/l) von DEHP und Metaboliten in den Serumproben (Mittelwert und 95% Konfidenzintervall)

3.2 Analyse der Serumproben auf Zytokine

Zur Beurteilung einer Aktivierung der Serumproben wurde in der Gruppe der Zytokine die Konzentration des IL-1 β und TNF- α durch ELISA bestimmt.

3.2.1 Interleukin-1 β



Kontrolle_0: Negativkontrolle, Serum ohne Kontakt zu Schlauchmaterial, 0 min Rezirkulation

PVC_60/PVC_120: Gruppe Schlauchmaterial PVC, 60 bzw. 120 min Rezirkulation

Carmeda_60/Carmeda_120: Gruppe Schlauchmaterial Carmeda[®], 60 bzw. 120 Rezirkulation

no DOP_60/no DOP_120: Gruppe Schlauchmaterial noDOP[®], 60 bzw. 120 Rezirkulation

Abb. 3: IL-1 β -Konzentration (pg/ml)

(y= Mittelwert und 95% Konfidenzintervall)

Die Konzentration an IL-1 β unterschied sich bei Proben der Schlauchgruppe PVC, noDOP[®] und Carmeda[®] nach 120 Minuten signifikant von der Kontrolle. Proben der Gruppe mit PVC-Schlauchmaterial wiesen auch bei 60 Minuten einen statistisch signifikanten Konzentrationsunterschied gegenüber der Kontrollprobe auf. Die Differenz betrug hier 1.48 pg/ml (60 Minuten) und 2.53 pg/ml (120 Minuten) im Mittelwert.

Messungen der IL-1 β Konzentration bei Proben der Schlauchgruppe Carmeda[®] ergaben gegenüber der Kontrolle einen signifikanten Konzentrationsanstieg von mittelwertig 1.43 pg/ml nach 120 Minuten. Zu Gruppe des PVC- und noDOP[®]-Materials bestand kein signifikanter Unterschied für den 120-Minutenwert. Nach einer 60-minütigen Rezirkulation traten weder signifikante Konzentrationsunterschiede zur Kontrolle noch zu den zwei anderen Schlauchtypen auf. Auch der 60-Minutenwert der Gruppe noDOP[®] wies keinen signifikanten Konzentrationsunterschied gegenüber der Kontrolle auf. Bei 120 Minuten zeigten die Proben der Gruppe mit noDOP[®]-Schlauchmaterial einen Konzentrationsanstieg von 1.91 pg/ml gegenüber der Kontrolle. Zwischen 60 und 120 Minuten trat bei keiner Schlauchgruppe ein signifikanter Unterschied in der IL-1 β -Konzentration auf.

Tab. 12: IL-1 β -Konzentration (pg/ml)

(_0/_60/_120: Rezirkulationszeit in min)

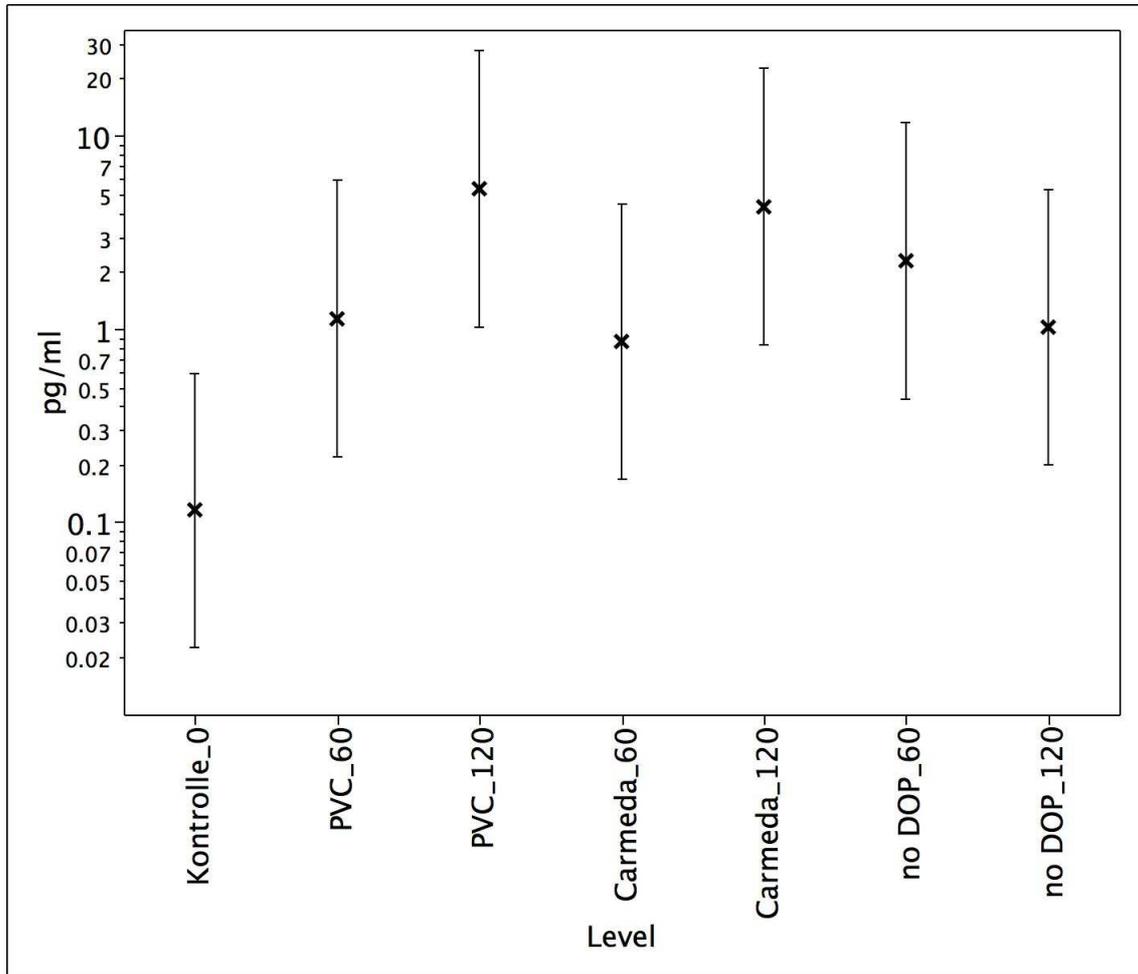
Probe	Mittelwert
Kontrolle_0	0.03
PVC_60	0.14
PVC_120	0.39
Carmeda [®] _60	0.03
Carmeda [®] _120	0.13
noDOP [®] _60	0.10
noDOP [®] _120	0.21

Tab. 13: IL-1 β -Konzentration (pg/ml)

(_0/_60/_120: Rezirkulationszeit in min; Tukey Test: Werte mit gleichen Buchstaben zeigen keinen signifikanten Unterschied, $\alpha=0,05$)

Probe		Mittelwert
PVC_120	A	0.39
noDOP [®] _120	A	0.21
PVC_60	A B	0.14
Carmeda [®] _120	A B	0.13
noDOP [®] _60	A B C	0.10
Carmeda [®] _60	B C	0.03
Kontrolle_0	C	0.03

3.2.2 TNF- α



Kontrolle_0: Negativkontrolle, Serum ohne Kontakt zu Schlauchmaterial, 0 min Rezirkulation
 PVC_60/PVC_120: Gruppe Schlauchmaterials PVC, 60 bzw. 120 min Rezirkulation
 Carmeda_60/Carmeda_120: Gruppe Schlauchmaterials Carmeda[®], 60 bzw. 120 Rezirkulation
 no DOP_60/no DOP_120: Gruppe Schlauchmaterial noDOP[®], 60 bzw. 120 Rezirkulation

Abb. 4: TNF- α -Konzentration (pg/ml)

(y= Mittelwert und 95% Konfidenzintervall)

Unter allen untersuchten Proben konnte ein statistisch signifikanter Konzentrationsanstieg von TNF- α nur bei Proben der Schlauchgruppe PVC und Carmeda[®] bei einer Rezirkulationszeit von 120 Minuten registriert werden. Bezogen auf die Kontrollprobe betrug die Differenz hierfür bei Proben der Gruppe mit PVC-Schlauchmaterial 3.84 pg/ml und 3.62 pg/ml für Proben der

3 ERGEBNISSE

Gruppe Carmeda[®]. Alle weiteren Ergebnisse zeigten keine signifikanten Unterschiede untereinander und zur Kontrollprobe.

Tab. 14: TNF- α -Konzentration (pg/ml)

(_0/_60/_120: Rezirkulationszeit in min)

Probe	Mittelwert
Kontrolle_0	0.11
PVC_60	1.14
PVC_120	5.34
Carmeda [®] _60	0.87
Carmeda [®] _120	4.30
noDOP [®] _60	2.26
noDOP [®] _120	1.03

Tab. 15: TNF- α -Konzentration (pg/ml)

(_0/_60/_120: Rezirkulationszeit in min; Tukey Test: Werte mit gleichen Buchstaben zeigen keinen signifikanten Unterschied, $\alpha=0,05$)

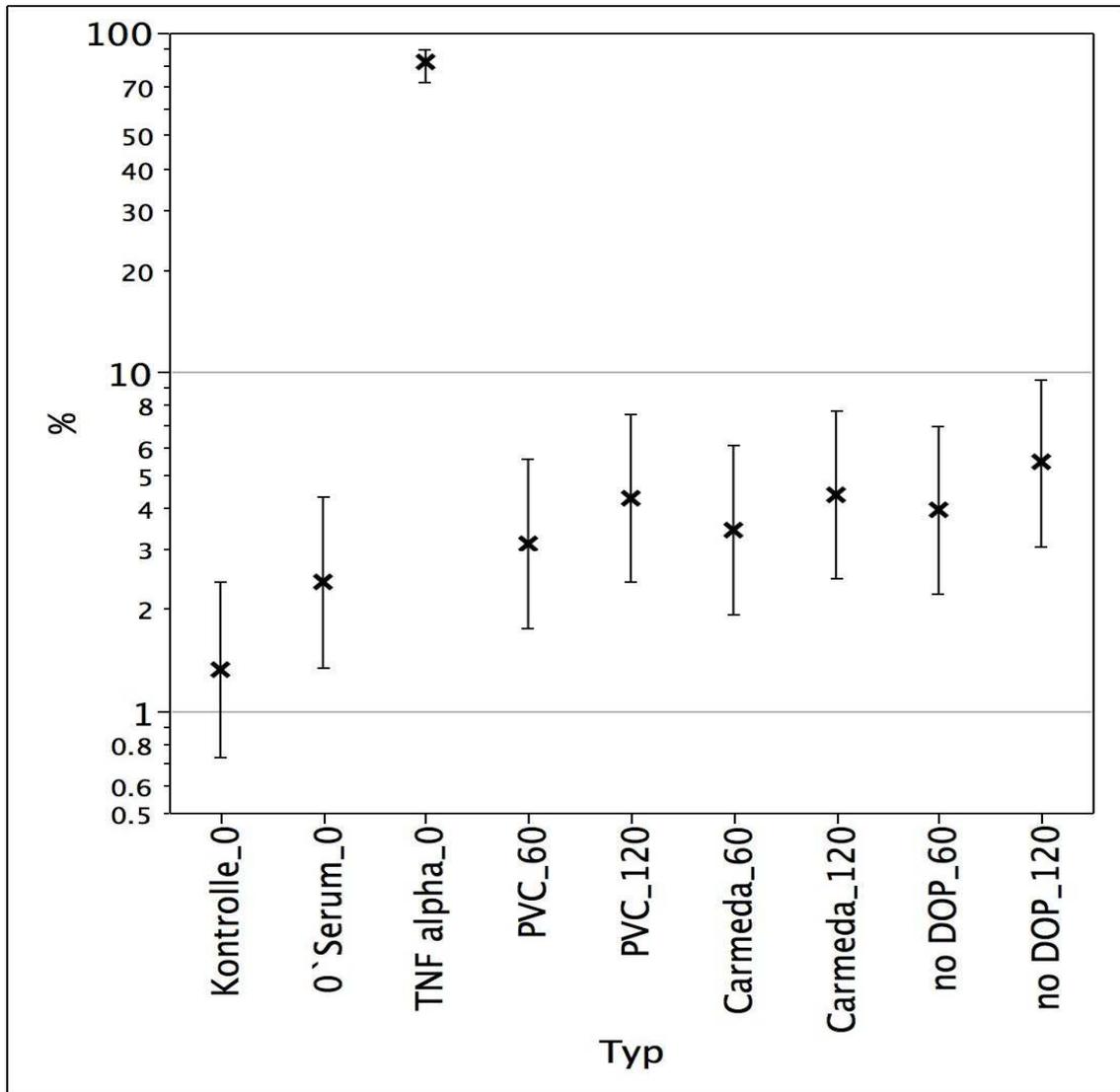
Probe		Mittelwert
PVC_120	A	5.34
Carmeda [®] _120	A	4.30
noDOP [®] _60	A B	2.26
PVC_60	A B	1.13
noDOP [®] _120	A B	1.03
Carmeda [®] _60	A B	0.87
Kontrolle_0	B	0.11

3.3 Analyse der Adhäsionsmoleküle

3.3.1 Analyse der ICAM-1-Expression mittels Durchflusszytometrie

Die Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 durch humane Endothelzellen der Umbilikalvene und der Saphenavene wurde nach Aktivierung mit den Serumproben mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die nachstehenden Tabellen zeigen die prozentualen Werte der ICAM-1-Expression bezogen auf den Gesamtwert von 5000. Die Gruppeneinteilung ergab sich aus Schlauchgruppe und Zeiteinheit. Es bestanden zwei Negativkontrollgruppen. Die Gruppe Kontrolle_0 stellte HUVECs bzw. Zellen der Vena saphena dar, die nicht mit Serumproben aktiviert wurden. Bei Gruppe Serum_0 handelte es sich um HUVECs bzw. Endothelzellen der Vena saphena, die mit Probandenserum aktiviert wurden, das jedoch nicht durch die Schläuche rezirkulierte. Die Positivkontrolle stellte Gruppe TNF- α dar. Die Positivkontrolle sollte belegen, dass ICAM-1 durch die untersuchten Endothelzellen bei gegebener Stimulation ausgebildet werden kann.

3.3.1.1 HUVEC



Kontrolle_0: Negativkontrolle, ECs ohne Serumaktivierung, 0 min Rezirkulation
 0`Serum_0: Negativkontrolle, EC aktiviert mit Serum ohne Schlauchkontakt, 0 min Rezirkulation
 TNF α _0: Positivkontrolle, ECs mit TNF α aktiviert
 PVC_60/PVC_120: Gruppe Schlauchmaterials PVC, 60 bzw. 120 min Rezirkulation
 Carmeda_60/Carmeda_120: Gruppe Schlauchmaterials Carmeda[®], 60 bzw. 120 Rezirkulation
 no DOP_60/no DOP_120: Gruppe Schlauchmaterial noDOP[®], 60 bzw. 120 Rezirkulation

Abb. 5: Totalevents (%) der ICAM-1-Expression bei HUVEC

(Darstellung von Mittelwert und 95% Konfidenzintervall)

Bei allen neun Gruppen war eine Expression von ICAM-1 nachweisbar. Die unstimulierten Endothelzellen präsentierten mit einem Wert von 1.32 % die geringste Expression. Die Werte der Gruppe der Schlauchmaterialien PVC, Carmeda[®], noDOP[®] sowie die Positivkontrolle zeigten signifikante Erhöhungen der ICAM-1-Expression gegenüber der Kontrolle. Die Positivkontrolle (TNF- α) erreichte einen Wert von 82 % und war gegenüber allen Werten deutlich erhöht. Zwischen den Schlauchgruppen und zwischen den Rezirkulationszeiten von 60 und 120 Minuten waren statistisch signifikante Unterschiede in Bezug auf die Erhöhung der ICAM-1-Expression messbar.

Tab. 16: Totalevents (%) der ICAM-1-Expression von HUVEC

(_0/_60/_120: Rezirkulationszeit in min)

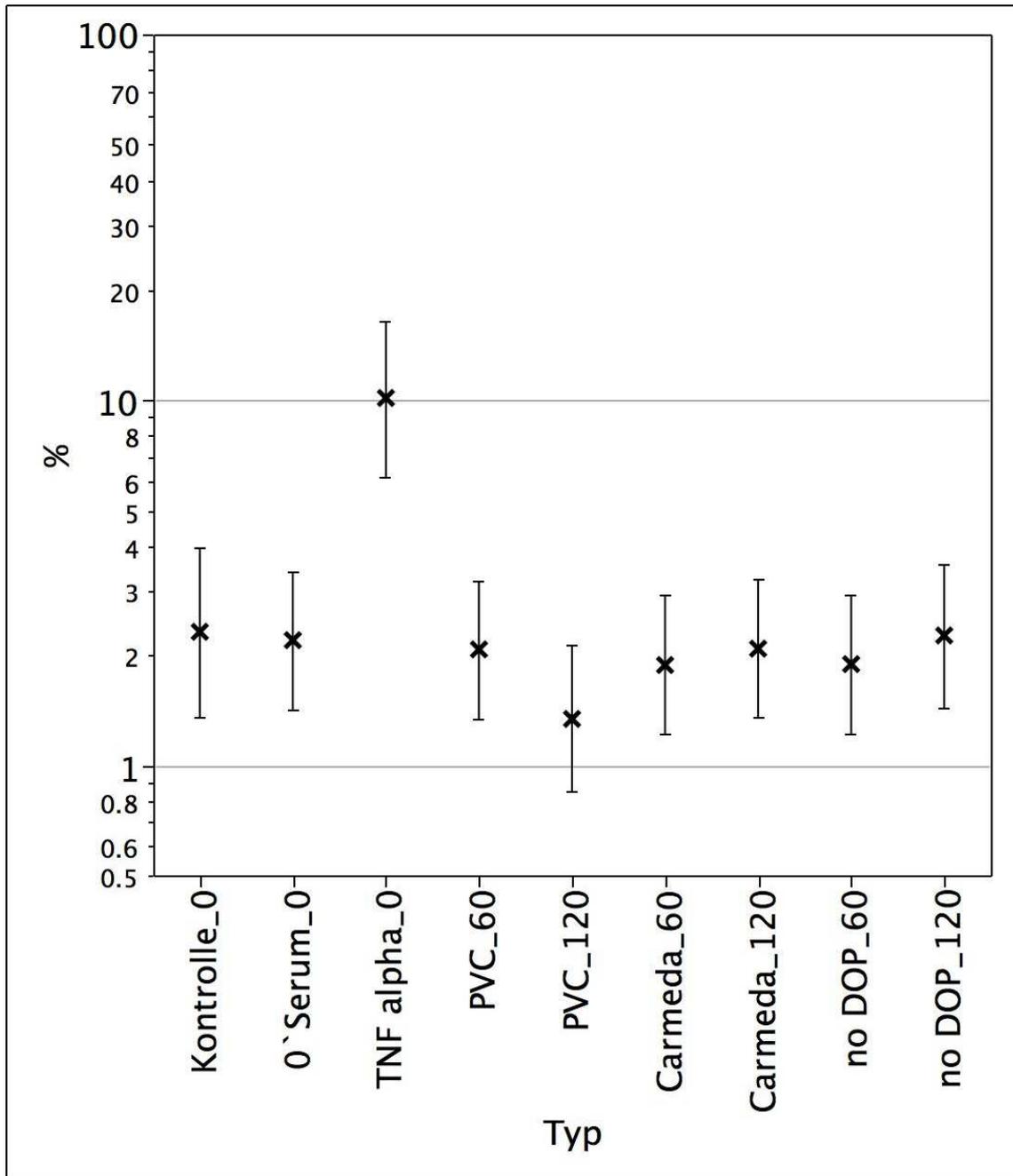
Probe	Mittelwert
Kontrolle_0	1.32
Serum_0	2.39
TNF- α	82.00
PVC_60	3.12
PVC_120	4.25
Carmeda [®] _60	3.42
Carmeda [®] _120	4.35
noDOP [®] _60	3.93
noDOP [®] _120	5.44

Tab. 17: Totalevents (%) der ICAM-1-Expression bei HUVEC

(_0/_60/_120: Rezirkulationszeit in min; Tukey Test: Werte mit gleichen Buchstaben zeigen keinen signifikanten Unterschied, $\alpha=0,05$)

Probe		Mittelwert
TNF- α _0	A	82.00
noDOP [®] _120	B	5.44
Carmeda [®] _120	B C	4.35
PVC_120	B C	4.25
noDOP [®] _60	B C	3.93
Carmeda [®] _60	B C	3.42
PVC_60	B C	3.12
Serum_0	C D	2.39
Kontrolle_0	D	1.32

3.3.1.2 Endothelzellen der Vena saphena



Kontrolle_0: Negativkontrolle, EC ohne Serumaktivierung, 0 min Rezirkulation
 0`Serum_0: Negativkontrolle, EC aktiviert mit Serum ohne Schlauchkontakt, 0 min Rezirkulation
 TNF α _0: Positivkontrolle, EC mit TNF α aktiviert, 0 min Rezirkulation
 PVC_60/PVC_120: Gruppe Schlauchmaterials PVC, 60 bzw. 120 min Rezirkulation
 Carmeda_60/Carmeda_120: Gruppe Schlauchmaterials Carmeda[®], 60 bzw. 120 Rezirkulation
 no DOP_60/no DOP_120: Gruppe Schlauchmaterial noDOP[®], 60 bzw. 120 Rezirkulation

Abb. 6: Totalevents (%) der ICAM-1-Expression bei ECs der V. saphena.
 (Darstellung von Mittelwert und 95% Konfidenzintervall)

3 ERGEBNISSE

Alle Gruppen exprimierten ICAM-1. Ein statistisch signifikanter Anstieg der ICAM-1-Expression war außer bei der Positivkontrolle, die mit TNF- α stimuliert wurde, nicht zu detektieren. Die drei Gruppen der Schlauchmaterialien wiesen untereinander keine signifikanten Unterschiede auf.

Tab. 18: Totalevents (%) der ICAM-1-Expression bei ECs der V. saphena
(_0/_60/_120: Rezirkulationszeit in min)

Probe	Mittelwert
Kontrolle_0	2.32
Serum_0	2.20
TNF- α	10.20
PVC_60	2.07
PVC_120	1.34
Carmeda [®] _60	1.88
Carmeda [®] _120	2.20
noDOP [®] _60	1.89
noDOP [®] _120	2.27

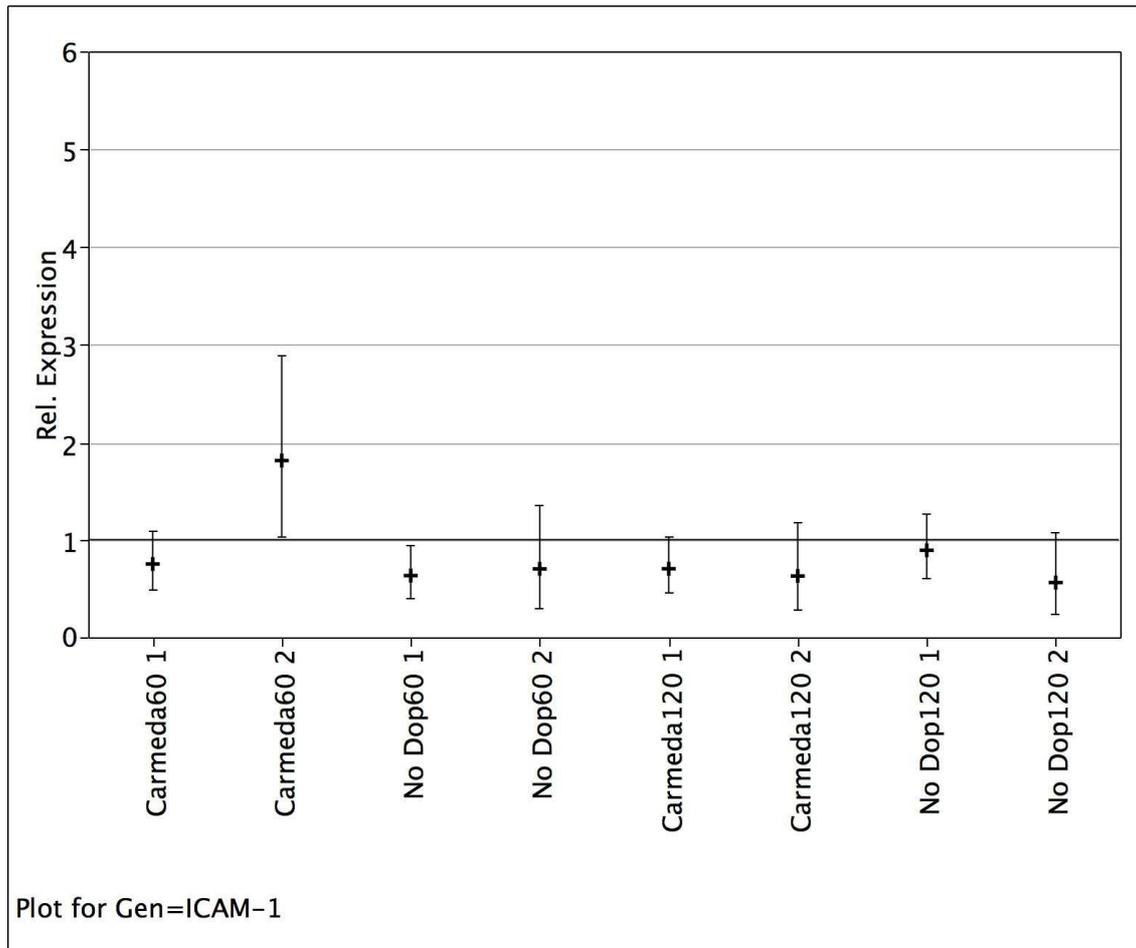
Tab. 19: Totalevents (%) ICAM-1-Expression bei ECs der V. saphena;
(_0/_60/_120: Rezirkulationszeit in min; Tukey Test: Werte mit gleichen Buchstaben zeigen keinen signifikanten Unterschied, $\alpha=0,05$)

Probe		Mittelwert
TNF- α	A	10.20
Kontrolle_0	B	2.32
noDOP [®] _120	B	2.27
Serum_0	B	2.20
Carmeda [®] _120	B	2.08
PVC_60	B	2.07
noDOP [®] _60	B	1.89
Carmeda [®] _60	B	1.88
PVC_120	B	1.34

3.3.2 Analyse der Adhäsionsmoleküle mittels Real-Time PCR

Die Expression von ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin bei humanen Endothelzellen der Umbilikalvene und Saphenavene wurde nach Aktivierung mit den Serumproben durch Real-Time PCR untersucht.

3.3.2.1 ICAM-1



1: HUVEC, 2: ECs von humaner Vena saphena
 60: 60 min Rezirkulation; 120: 120 min Rezirkulation
 Carmeda: Schlauchgruppe Carmeda®, No Dop: Schlauchgruppe noDOP®

Abb. 7: Relative ICAM-1-Expression für HUVEC und ECs der Vena saphena

(CT-Werte nach relativer Quantifizierung; Mittelwert und 95 %-Konfidenzintervall)

3.3.2.1.1 HUVEC

Die Expression von ICAM-1 war bei allen Proben nachzuweisen. Zwischen der Schlauchgruppe Carmeda® und noDOP® und zwischen den Rezirkulationszeiten 60 und 120 Minuten bestand keine signifikante Steigerung der Expression.

Tab. 20: Relative ICAM-1-Expression bei HUVEC

(CT-Werte nach relativer Quantifizierung; _60/_120: Rezirkulationszeit in min)

Probe	Mittelwerte
Carmeda®_60	0.75
noDOP®_60	0.63
Carmeda®_120	0.70
noDOP®_120	0.89

3.3.2.1.2 Endothelzellen der Vena saphena

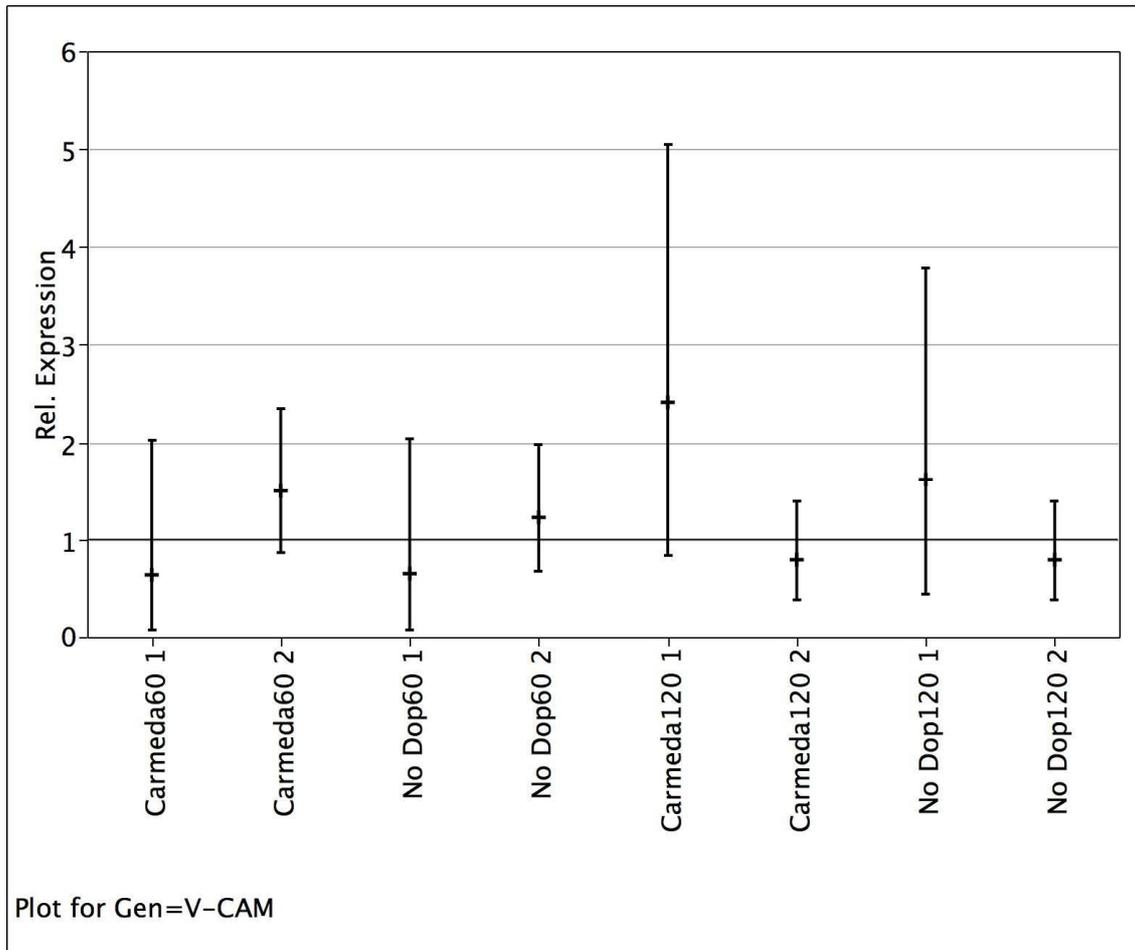
Nach 60-minütiger Rezirkulation wies die Gruppe Carmeda® einen signifikanten Unterschied zu Proben von noDOP® auf. Die ICAM-1-Expression stieg um einen CT-Wert von 0.88 an. Nach 120 Minuten zeichnete sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen ab. In der Gruppe Carmeda® trat zwischen dem 60- und 120-Minutenwert eine signifikante Expressionserhöhung auf. Die 60-Minutenwerte waren um einen CT-Wert von 0.96 erhöht. Die Gruppe noDOP® zeigte im zeitlichen Verlauf nur schwache Veränderungen.

Tab. 21: Relativen ICAM-1-Expression bei ECs der V. saphena

(CT-Werte nach relativer Quantifizierung; _60/_120: Rezirkulationszeit in min)

Probe	Mittelwert
Carmeda®_60	1.82
noDOP®_60	0.70
Carmeda®_120	0.63
noDOP®_120	0.56

3.3.2.2 VCAM-1



1: HUVEC, 2: ECs von humaner Vena saphena
 60: 60 min Rezirkulation; 120: 120 min Rezirkulation
 Carmeda: Schlauchgruppe Carmeda®, No Dop: Schlauchgruppe noDOP®

Abb. 8: Relative VCAM-1-Expression für HUVEC und ECs der V. saphena (CT-Werte nach relativer Quantifizierung; Mittelwert und 95%-Konfidenzintervall)

3.3.2.2.1 HUVEC

Im Vergleich zu noDOP® trat bei Carmeda® bei 120 Minuten ein signifikanter Anstieg der VCAM-1-Expression auf. Der CT-Wert der VCAM-1-Expression war bei Carmeda® um 0.45 signifikant hochreguliert.

Bei 60 Minuten war kein Unterschied der VCAM-1-Expression zu messen. Nach 120 Minuten kam es bei Proben der Gruppe Carmeda® zu einer signifikanten Hochregulierung der Expression um 1.27 CT-Werte ein. Bei Proben der Gruppe noDOP® trat nach 120 Minuten ebenso eine signifikante Hochregulierung der VCAM-1-Expression um 0.80 CT-Werten ein.

Tab. 22: Relative VCAM-1-Expression bei HUVEC

(CT-Werte nach relativer Quantifizierung; _60/_120: Rezirkulationszeit in min)

Probe	Mittelwert
Carmeda®_60	0.64
noDOP®_60	0.65
Carmeda®_120	2.41
noDOP®_120	1.62

3.3.2.2 Endothelzellen der Vena saphena

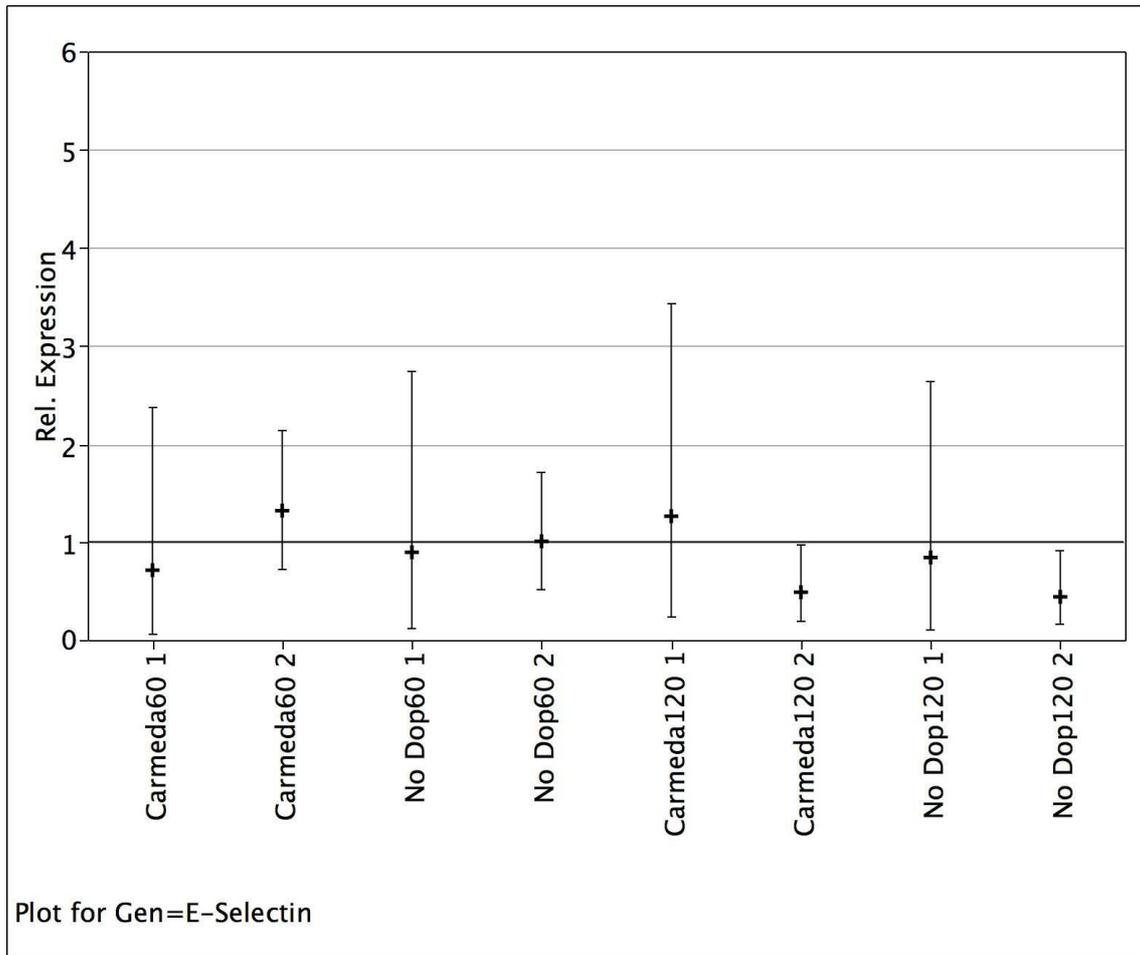
Bezüglich der relativen Expression von VCAM-1 waren bei keinem Schlauchtyp und zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikante Unterschiede zu detektieren.

Tab. 23: Relative VCAM-1-Expression bei ECs der V. saphena

(CT-Werte nach relativer Quantifizierung; _60/_120: Rezirkulationszeit in min)

Probe	Mittelwert
Carmeda®_60	1.50
noDOP®_60	1.23
Carmeda®_120	0.79
noDOP®_120	0.79

3.3.2.3 E-Selektin



1: HUVEC, 2: ECs von humaner Vena saphena
 60: 60 min Rezirkulation; 120: 120 min Rezirkulation
 Carmeda: Schlauchgruppe Carmeda®, No Dop: Schlauchgruppe noDOP®

Abb. 9: Relative E-Selektin-Expression für HUVEC und ECs der V. saphena CT-Werte nach relativer Quantifizierung; Mittelwert und 95%-Konfidenzintervall)

3.3.2.3.1 HUVEC

Die statistische Auswertung zeigte, dass E-Selektin in allen Gruppen exprimiert wird. Zwischen Proben der Gruppe Carmeda® und noDOP® war keine Hochregulierung der E-Selektin-Expression nachzuweisen. Auch die Rezirkulationszeiten von 60 und 120 Minuten zeigten keine Signifikanzen.

Tab. 24: Relative Expression von E-Selektin bei HUVEC

(CT-Werte nach relativer Quantifizierung; _60/_120: Rezirkulationszeit in min)

Probe	Mittelwert
Carmeda®_60	0.71
noDOP®_60	0.89
Carmeda®_120	1.26
noDOP®_120	0.84

3.3.2.3.2 Endothelzellen der Vena saphena

Nach 120 Minuten sank die Expression von E-Selektin signifikant in der Gruppe Carmeda® um einen CT-Wert von 0.80. Die Ergebnisse der Gruppe noDOP® zeigten keine signifikanten Expressionsunterschiede bei 60 und 120 Minuten. Beim Vergleich der Werte von Carmeda® und noDOP® waren keine signifikanten Unterschiede detektierbar.

Tab. 25: Relative Expression von E-Selektin bei ECs der V. saphena

(CT-Werte nach relativer Quantifizierung; _60/_120: Rezirkulationszeit in min)

Probe	Mittelwert
Carmeda®_60	1.32
noDOP®_60	1.01
Carmeda®_120	0.49
noDOP®_120	0.44

3.3.2.4 Positivkontrollen

Über eine Positivkontrolle wurde die Fähigkeit der Endothelzellen überprüft, bei gegebener Stimulation Adhäsionsmoleküle zu exprimieren. Alle untersuchten Endothelzellen bildeten nach Stimulation mit TNF- α Adhäsionsmoleküle aus. Bei HUVECs war die Expression von E-Selektin signifikant gegenüber VCAM-1

erhöht. Endothelzellen der V. saphena zeigten einen signifikanten Anstieg von E-Selektin gegenüber ICAM-1.

HUVECs zeigten eine höhere Expression von ICAM-1 als Endothelzellen der Vena saphena. VCAM-1 war bei Endothelzellen der Vena saphena signifikant gegenüber HUVECs hochreguliert.

Tab. 26: Positivkontrollen der relative Expression der Adhäsionsmoleküle bei HUVEC

(CT-Wert nach relativer Quantifizierung)

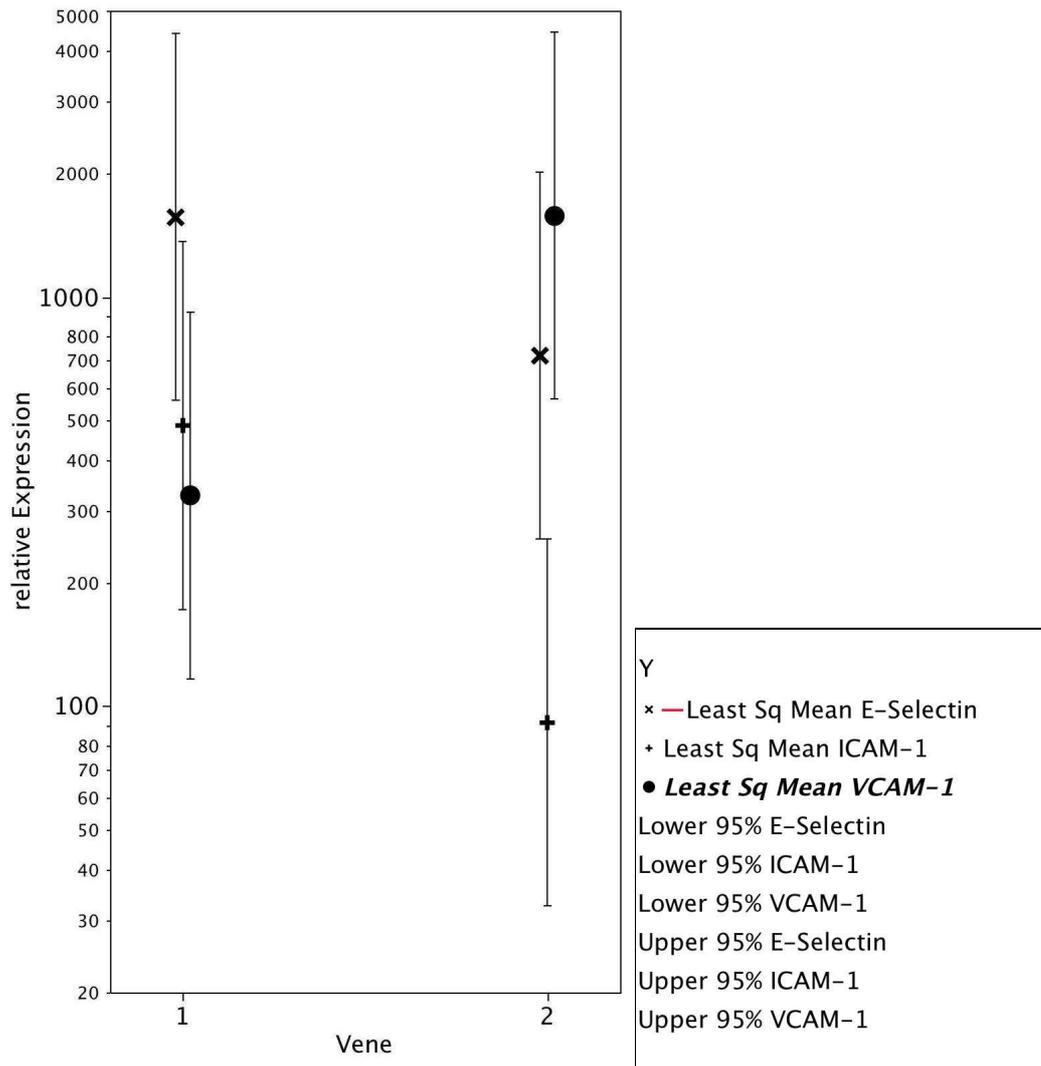
Probe	Mittelwert
ICAM-1	485.10
VCAM-1	327.50
E-Selektin	1564.00

Tab. 27: Positivkontrolle der relativen Expression der Adhäsionsmoleküle bei ECs der V. saphena

(CT-Wert nach relativer Quantifizierung)

Level	Mittelwert
ICAM-1	91.21
VCAM-1	1576.00
E-Selektin	718.50

3 ERGEBNISSE



Vene 1: HUVEC; Vene 2: Endothelzellen Vena saphena

Abb. 10: relative Expression (CT-Werte) von ICAM-1, VCAM-1, E-Selektin bei HUVEC und ECs der V. saphena nach Stimulation mit TNF- α (5ng/ml)

3.3.3 Analyse der Adhäsionsmoleküle mittels Western Blot

Mit Hilfe der Western-Blot-Analyse sollten die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und E-Selektin in den Proben detektieren werden

Es zeigte sich, dass bei HUVEC E-Selektin nur bei der Positivkontrolle (Stimulation mit TNF- α) nachweisbar war. Die Proben der drei verschiedenen

3 ERGEBNISSE

Schlauchmaterialien und die Negativkontrolle der Endothelzellen der Umbilikalvene zeigten keine Banden. Ebenso fiel der Nachweis auf ICAM-1 negativ aus. Von keiner Probe wurde eine Bande ausgebildet.

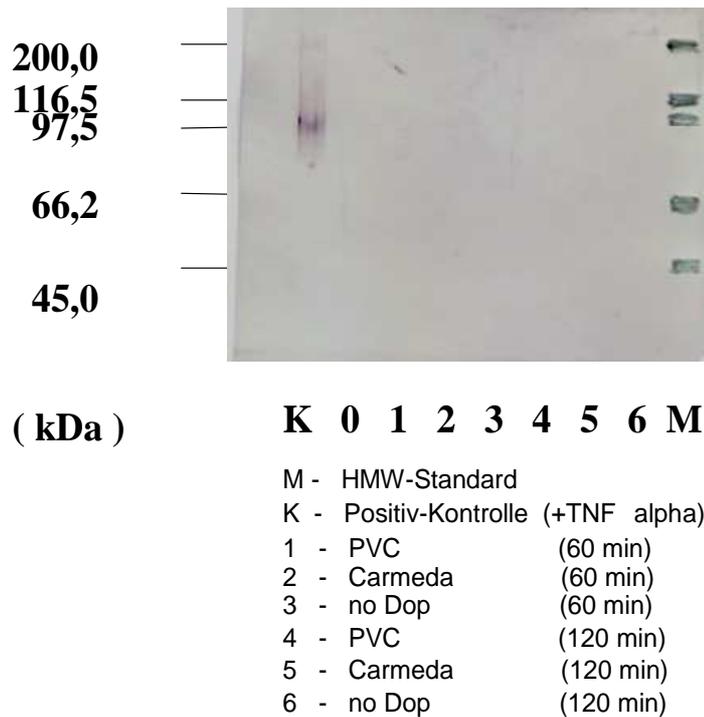


Abb. 11: Expression von E-Selektin bei HUVEC

Bei Endothelzellen der Vena saphena zeigte nur die Positivkontrolle ein Bandenmuster für E-Selektin. Für das Protein ICAM-1 wurde bei keiner der Proben ein Signal empfangen.

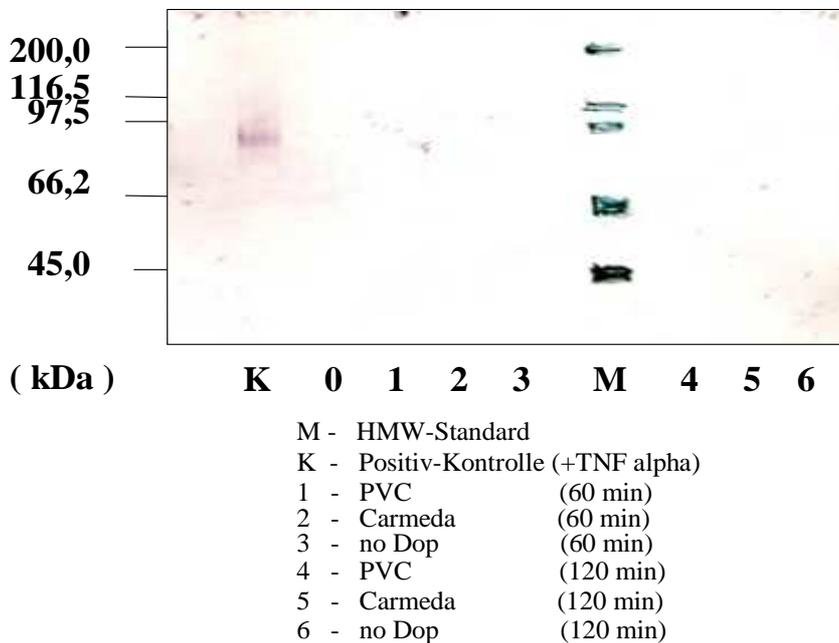


Abb. 12: Expression von E-Selektin bei ECs der *V. saphena*

3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Anschluss an die Rezirkulation der Serumproben im Chandler-Loop-Modell, unter Verwendung der drei Schlauchmaterialien wurde die Analyse auf DEHP und Metaboliten, darunter MEHP, 5OH-MEHP, 5oxo-MEHP, 5cx-MEPP und 2-Ethylhexanol durchgeführt. Von den quantifizierten Substanzen war DEHP, MEHP und 2-Ethylhexanol in höchster Konzentration nachweisbar.

Serumproben, die 60 und 120 Minuten in dem PVC-Schlauch rezirkulierten, zeigten signifikant die höchste Konzentration an DEHP, MEHP und 2-Ethylhexanol. Auch die Sekundärmetabolite 5OH-MEHP und 5oxo-MEHP konnten bei Proben des PVC-Schlauches identifiziert werden.

Für den Heparinbeschichteten PVC-Schlauch (Schlauchgruppe Carmeda[®]) fiel die Konzentration an freigesetztem DEHP und MEHP deutlich geringer im Vergleich zu PVC aus, war aber signifikant gegenüber der Gruppe mit noDOP[®]-

Schlauchmaterial erhöht. Konzentrationen von 2-Ethylhexanol liegen unterhalb der Nachweisgrenze.

Proben der Gruppe von Schlauchmaterial noDOP[®] wiesen statistisch die signifikant geringste Menge an DEHP auf. MEHP war detektierbar, allerdings nur für den 120-Minutenwert, wo es signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht war. Der Wert für 2-Ethylhexanol unterschied sich signifikant von der Kontrollprobe, fiel aber bei Proben der Gruppe noDOP[®] gegenüber der Gruppe mit PVC-Schlauchmaterial deutlich geringer aus.

Zwischen den Rezirkulationszeiten von 60 und 120 Minuten traten ausschließlich bei der Gruppe mit PVC-Schlauchmaterial für MEHP, 2-Ethylhexanol und 5OH-MEHP signifikante Unterschiede auf. Die Konzentration an Mono(2-ethyl-5-carboxypentyl) phthalat (5cx-MEPP) lag bei allen drei Gruppen der Schlauchmaterialien unterhalb der Nachweisgrenze.

Die Zytokine IL-1 β und TNF- α waren in allen Proben der drei Schlauchmaterialien nachweisbar. Bei 120 Minuten trat eine signifikante Steigerung der Konzentration von IL-1 β bei Gruppe PVC, Carmeda[®] und noDOP[®] auf. Bei einer Rezirkulation von 60 Minuten war IL-1 β bei der Gruppe mit PVC-Schlauchmaterial signifikant erhöht. TNF- α wurde bei der Gruppe mit PVC- und Carmeda[®]-Schlauchmaterial nach 120 Minuten hochreguliert.

Die Analyse der Endothelzellen auf Expression von Adhäsionsmolekülen wurde durch Durchflusszytometrie und Real-Time PCR bei Endothelzellen der Vena saphena und der Umbilikalvene durchgeführt.

Messungen an stimulierten Endothelzellen der Umbilikalvene ergaben bei den drei Schlauchgruppen keine signifikante Expressionssteigerungen von ICAM-1. Die Positivkontrolle und die Negativkontrolle unterschieden sich sowohl von den übrigen Werten als auch untereinander signifikant.

Hinsichtlich der ICAM-1-Expression zeigten Endothelzellen der Vena saphena keine Signifikanzen zwischen den Schlauchmaterialien. Hier unterschied sich ausschließlich die Positivkontrolle signifikant von den übrigen Werten.

Mittels Real-Time PCR wurde die Expression von ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin analysiert. Bei allen drei Schlauchtypen wurde ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin exprimiert.

Die Gruppe mit Carmeda[®]-Schlauchmaterial zeigte eine Hochregulierung von ICAM-1 bei 60 Minuten und von VCAM-1 bei 120 Minuten. Die VCAM-1-Expression stieg bei der Gruppe noDOP[®] nach 120 Minuten signifikant gegenüber 60 Minuten an. Die Gruppe Carmeda[®] zeigte eine Senkung der E-Selektin-Expression nach 120 Minuten gegenüber 60 Minuten.

Der Nachweis von E-Selektin und ICAM-1 durch die Western-Blot-Analyse fiel negativ aus. Nur bei der Positivkontrolle von HUVECs konnte E-Selektin nachgewiesen werden.

4 DISKUSSION

4.1 Hintergrund des vorliegenden Versuches

Artikel aus Polyvinylchlorid verfügen über ein breites Anwendungsspektrum. Zahlreiche Bedarfsgegenstände des Alltags sowie Produkte für Bau und Technik werden aus diesem Werkstoff hergestellt. Auch im Medizinbereich und besonders in der Intensivmedizin werden Artikel aus Weich-PVC in Form so genannter „medical devices“ verwendet. Grund für den hohen Einsatz dieses Werkstoffes sind seine vielen positiven Materialeigenschaften.

Weich-PVC ist mit Weichmachern und weichmachenden Substanzen versetzt. In den meisten Fällen ist dies DEHP, ein Phthalsäureester, der im Verdacht steht, über entwicklungs- und reproduktionstoxische Eigenschaften zu verfügen. DEHP ist nicht kovalent mit dem Polymer verbunden und kann durch lipophile Flüssigkeiten, wie beispielsweise Blut, herausgelöst werden.

Kommt Blut mit einem Fremdmaterial in Kontakt, führt dies zur Freisetzung proinflammatorischer Marker, die einen Einfluss auf die Endothelzellfunktion haben. Hierbei spielen Adhäsionsmoleküle eine zentrale Rolle. Sie begünstigen die Migration von Leukozyten mit nachfolgenden Störungen der Organfunktion. Ziel der Studie war es, den Einfluss von freigesetztem DEHP auf eine Endothelzellaktivierung zu untersuchen.

Diese in vitro Studie simulierte einen extrakorporalen Kreislauf der Herz-Lungen-Maschine unter Anwendung dreier unterschiedlicher Weich-PVC-Schlauchmaterialien:

- PVC: unbeschichtetes PVC, Weichmacher: DEHP
- Carmeda[®]: PVC mit Heparinbeschichtung, Weichmacher: DEHP
- noDOP[®]: DEHP-freies unbeschichtetes PVC, Weichmacher: TEHTM

Im ersten Teil der Studie wurden die Schläuche auf die Freisetzung von DEHP und seiner Metaboliten in das Patientenblut untersucht. In einem weiteren Schritt folgte die Analyse der Endothelaktivierung durch das freigesetzte DEHP.

4.2 Methodische Voraussetzung

Ein standardisiertes Prüfverfahren ist Voraussetzung für die Untersuchung des Release von DEHP und Metaboliten aus PVC-Schläuchen und für die Untersuchung proinflammatorischer Marker (IL-1 β , TNF- α , ICAM-1, VCAM-1, E-Selektin). Dieses Verfahren sollte einen guten Kontakt zwischen Blut und Fremdoberfläche gewährleisten und eine extrakorporale Zirkulation, wie sie beim Einsatz der Herz-Lungen-Maschine stattfindet, simulieren. Das modifizierte Chandler-Loop-Modell, ein so genanntes „Closed-Loop-Modell“, bietet sich in idealer Weise für die Simulation der extrakorporalen Zirkulation an. Durch die exakte Einstellung von Temperatur und Umdrehungszahl/Minute sind die Bedingungen standardisiert, konstant und somit reproduzierbar. Durch den dynamischen Fluss ist ein ständiger Oberflächenkontakt von Blut zur Innenoberfläche der Schlauchmaterialien gegeben und somit eine Wechselwirkung zwischen Fremdoberfläche und Blutbestandteilen gewährleistet.

Die untersuchten Schlauchmaterialien entsprachen in Material und Abmessung den PVC-Schläuchen des klinischen Gebrauchs. Zum direkten Vergleich wurde als Material ein Weich-PVC mit identischer Shore-Härte verwendet.

Als Kontaktmedium wurde Vollblut gewählt. Alle Aktivierungs-, Inhibierungs- und Feedbackmechanismen auf zellulärer und humoraler Ebene waren hierdurch gegeben. Das Modell kam so der klinischen Situation sehr nahe. Dennoch unterschied sich das in vitro Modell von der klinischen Situation. Im menschlichen Körper sind alle Abläufe durch ein komplexes Netzwerk miteinander verbunden, welche in vitro allein schon aufgrund des fehlenden Endothels nicht nachzustellen sind.

Es ist bekannt, dass bestimmte Medikamente wie Glukokortikoide beispielsweise, einen Einfluss auf die Zytokinproduktion und -freisetzung

haben. Um diese Störfaktoren auszuschalten und ein homogenes Probandenkollektiv zu erhalten, wurden vor Beginn der Studie Ausschlusskriterien festgelegt. Die Probanden waren gesund und unterlagen keiner medikamentösen Therapie.

Zur Bestimmung des Aktivierungszustandes der Endothelzellen stehen mehrere Untersuchungsmöglichkeiten zur Verfügung. Hierzu zählen Enzym-gekoppelte Immunoassays (ELISAs), Western Blot, die Durchflusszytometrie (FACS) und die Genexpressionsanalyse (Real-Time PCR). ELISA, Western Blot und FACS sind Analyseverfahren auf Proteinniveau. Die PCR-Analyse ermöglicht eine Untersuchung auf DNA- bzw. RNA-Level und zeichnet sich infolgedessen durch eine sehr hohe Empfindlichkeit gegenüber den anderen Methoden aus. Zudem sind nur äußerst geringe Mengen an Probenmaterial erforderlich. Durch die Western-Blot-Methode ist eine quantitative Aussage nicht möglich, lediglich die Expression des gesuchten Proteins kann bestimmt werden. Die Durchflusszytometrie ermöglicht eine quantitative Aussage, die eine objektive und vom Untersucher unabhängige Untersuchung garantiert. Zudem werden weitere Informationen über die Zellen geliefert und devitale Zellen können von der Messung ausgeschlossen werden. Die verwendete Real-Time PCR ist eine schnelle, sensitive und akkurate Quantifizierungsmethode. Das PCR-Produkt wird in der exponentiellen Phase gemessen und es sind keine nachgeschalteten Detektionsverfahren mehr nötig, was das Risiko an Kontamination vermindert (106). Die Untersuchung der Adhäsionsmoleküle erfolgte durch drei unterschiedliche Analyseverfahren. Die Expression von ICAM-1 wurde mittels FACS-Analyse, Real-Time PCR und Western Blot untersucht. Durch Anwendung dieser drei verschiedenen Methoden konnten die Messwerte vervollständigt und eventuelle Fehlerquellen so weit wie möglich ausgeglichen werden.

4.3 Die Freisetzung von DEHP aus PVC-Schläuchen

Eine DEHP-Extraktion aus Medizinprodukten in das Blut stellt ein Risiko hinsichtlich des für den Menschen diskutierten und in Tierstudien belegten

toxischen Potentials dar. Das Phänomen der DEHP-Migration wurde 1982 von Peck und Albro bei Blutkonserven, die in PVC-Beuteln gelagert wurden, beobachtet (78).

Wie durch vorangegangene Studien beschrieben (49, 43, 45, 46, 54, 71, 70, 69) ist die Rate der Migration dabei abhängig von folgenden Faktoren:

- Temperatur
- Menge
- Fließrate
- Lipophilität der Kontaktflüssigkeit
- Kontaktdauer
- Ausmaß des Schüttelns des Kontaktmediums

Bei unserem Versuch konnten die Größen Temperatur, Menge, Fließrate und Ausmaß des Schüttelns des Kontaktmediums als annähernd konstant angesehen werden. Die Versuche im Chandler-Loop-Modell fanden bei einem ständig überwachten Temperaturniveau von 37°C statt, mit 20 ml Probandenblut pro Durchlauf. Mit 15 Umdrehungen/Minute konnte ein kontinuierlicher Blutfluss geschaffen werden. Die Lipophilität des Blutes ist bei den Probanden individuell verschieden. Der Anteil an Cholesterin und Triglyceriden im Blut korreliert mit der Extraktionsrate (55). Die Kontaktdauer des Blutes mit dem Material betrug in unserem Versuch 60 und 120 Minuten. Ein Vergleich der Rezirkulationszeiten war Teil der Untersuchung.

Unsere Ergebnisse zeigten, dass die Verwendung einer CBAS[®]-Heparinbeschichtung bei PVC-Medizinprodukten eine gute Protektion gegen den Übertritt von DEHP in das Blut darstellt. Die gemessenen Werte von DEHP mit 2.11 mg/l Serum bei der Gruppe mit Carmeda[®]-Schlauchmaterial fielen deutlich geringer aus im Vergleich zur Gruppe mit unbeschichtetem PVC-Material mit 65.0 mg/l Serum DEHP. Dennoch waren die Messwerte signifikant gegenüber der Kontrollprobe erhöht.

Frühere Studien zeigen tendenziell ähnliche Ergebnisse hinsichtlich der Barrierewirkung einer Heparinbeschichtung gegen die DEHP-Extraktion. Unsere Messergebnisse fanden wir in der Studie von Haishima et al. (44)

bestätigt. Auch hier konnte eine geringere DEHP-Freisetzung bei Anwendung einer Oberflächenbeschichtung aus kovalent gebundenem Heparin, wie beispielsweise CBAS[®], nachgewiesen werden. Die Barrierewirkung konnte die Studie allerdings nicht für ionisch gebundene Heparinbeschichtungen bestätigen. Burkhart et al. (14) belegten, dass es auch bei Carmeda[®]-beschichtetem Weich-PVC zu einer DEHP-Migration kommt. Drei unbeschichtete und vier beschichtete ECMO-Systeme aus PVC wurden untersucht. Alle unbeschichteten PVC-Materialien und Carmeda[®] führten zu einer DEHP-Freisetzung. Zwar bestätigte die Studie von Burkhart et al. unsere Messergebnisse, doch untersuchten sie auch noch drei weitere Beschichtungen, deren freigesetzte Menge an DEHP sogar unterhalb der Nachweisgrenze lagen. Es handelt sich hierbei um COBE smart, Medtronic Trillium und Terumo x-coated.

Karle et al. (72) führten eine vergleichende prospektive klinische Studie zur Auswertung von DEHP-Plasmakonzentrationen durch. Untersucht wurde das Blut von Kindern, welche durch extrakorporale Membranoxygenierung (ECMO) therapiert wurden. Bei Verwendung von Weich-PVC-Schläuchen mit CBAS[®]-Beschichtung konnten sie keine DEHP-Konzentrationen im Blut der Kinder nachweisen. Sie schlossen daraus, dass die CBAS[®]-Beschichtung das DEHP-Risiko eliminiert. Unberücksichtigt blieben jedoch der rasche Metabolismus von DEHP und die Analyse der toxischen Produkte.

Das PVC-Material noDOP[®] enthält anstatt DEHP den Weichmacher TEHTM. Welle et al. (95) beobachteten, dass auch beim TEHTM-System zur Migration von DEHP kommt. TEHTM zeigte sehr geringe Migrationswerte auf, DEHP war jedoch als Nebenprodukt enthalten.

Proben der Gruppe von noDOP[®]-Schlauchmaterial zeigten bei unseren Ergebnissen nur geringe Konzentrationen von 0.33 mg/l Serum DEHP, wohingegen die Gruppe von PVC-Schlauchmaterial eine DEHP-Konzentration von 65 mg/l Serum erreichte. Im Vergleich zu unbeschichtetem und beschichtetem DEHP-PVC, setzte noDOP[®] demnach die geringste Menge an DEHP frei. Im Vergleich aber zur Kontrolle mit 0.12 mg/l Serum DEHP war die

Konzentration signifikant erhöht. Nur wenige Studien wurden zu dieser Thematik durchgeführt. Christensson et al. (19) verglichen in vivo die Weichmacher DEHP und TEHTM in Hämodialyseschläuchen. Sie dokumentierten eine unterhalb oder nah an der Nachweisgrenze liegende Konzentration von DEHP und eine nicht nachzuweisende Konzentration von TEHTM, und bestätigten damit unsere Daten. Eine Migration von TEHTM wurde in unserer Studie nicht untersucht. Auch Kambia et al. (55) beobachteten in einer in vivo Studie eine Reduktion der DEHP-Freisetzung beim Einsatz von TEHTM. Grund für die geringe Migrationsrate von TEHTM ist sein höheres Molekulargewicht und seine sehr geringen Löslichkeit (95). Die TEHTM-Exposition wird somit für den Patienten reduziert (15). Laut Europäischer Kommission ist das akut toxische Potential von TEHTM als gering einzustufen. Des Weiteren ist der Metabolismus von TEHTM, basierend auf den verfügbaren Daten, niedrig. Es kann kein wasserlöslicher Hauptmetabolit identifiziert werden. Morphologische und biochemische Leberveränderung durch TEHTM und DEHP wurden dennoch bei Nagetieren detektiert. Der Grad der Schädigung durch TEHTM fiel jedoch bei weitem geringer aus.

In unserer Studie sollte auch die Frage geklärt werden, ob sich die freigesetzte DEHP-Menge bei längerer Rezirkulationszeit erhöht. Unsere Ergebnisse zeigten, dass zwischen einer Kontaktdauer von 60 zu 120 Minuten keine signifikante Erhöhung der DEHP-Konzentration nachzuweisen ist. Bei längerer Rezirkulationszeit trat bei allen drei Schlauchmaterialien eine Tendenz zu höheren Werten auf, die auf dem 5-Prozent-Niveau jedoch nicht signifikant war. Es ist anzunehmen, dass bei Perfusionszeiten von über 120 Minuten ein signifikanter Anstieg messbar sein wird. So konnten Loff et al. (70) einen signifikanten Anstieg der freigesetzten Menge an DEHP nach 24 Stunden gegenüber 4 Stunden bei PVC-Infusionsschläuchen belegen. Auch Haishima et al. (44) bestätigen diese Hypothese des zeitabhängigen Anstiegs austretenden DEHPs.

Die Detektierung und Quantifizierung von DEHP in den zu untersuchenden Blutproben allein ist nicht ausreichend. DEHP wird in eine Vielzahl von

Metaboliten umgewandelt und bei Messung des freigesetzten DEHP ist somit immer auch die Messung der Oxidationsprodukte unabdingbar. Als erster Schritt der Oxidation erfolgt die Hydrolyse von DEHP zu dem noch toxischeren Metaboliten MEHP (80) und 2-Ethylhexanol. 2-Ethylhexanol wird über verschiedene Zwischenschritte komplett abgebaut. MEHP wird an fünf verschiedenen Positionen der Ethylhexylseitenketten zu primären und sekundären Alkoholen hydroxyliert. Diese werden weiter zu Ketonen oder Carboxylsäuren oxidiert. Die Oxidierung von DEHP wird im Blutkreislauf durch Lipasen des Plasmas katalysiert. Diese unspezifischen Lipasen befinden sich bei Ratten hauptsächlich in Pankreas, Intestineller Mukosa, Leber aber eben auch im Blutplasma (1). Der zweite Schritt der oxidativen Hydrolysierung findet bei Ratten in Leber und Niere statt (1). In einer Humanstudie von Koch et al. (61) konnte nachgewiesen werden, dass ein Spitzenwert aller Metaboliten im Serum nach zwei Stunden auftritt. Im Gegensatz zu Urin war der Hauptmetabolit im Serum MEHP.

Die Ergebnisse der MEHP-Bestimmung korrelierten mit den Daten der DEHP-Analyse. Die Messungen zeigten bei Proben der Schlauchgruppe Carmeda® im Vergleich zur Schlauchgruppe PVC geringe Konzentrationen an MEHP. Noch geringere Konzentrationen wurden bei Proben der noDOP®-Schlauchgruppe gemessen. Beim Vergleich der Konzentrationsunterschiede fiel die Differenz zwischen der Gruppe mit PVC- und Carmeda®-Schlauchmaterial mit 1.75 mg/l Serum MEHP deutlich geringer aus als bei DEHP. Konzentrationen an 2-Ethylhexanol waren in allen Proben nachweisbar. Die Gruppe Carmeda® zeigte Konzentrationen, die im Bereich der Nachweisgrenze lagen. Die Gruppe mit PVC-Schlauchmaterial wies höchste Konzentrationen an 2-Ethylhexanol auf, gefolgt von der Gruppe mit Schlauchmaterial noDOP®. Laut Koch et al. (59) zeigt 2-Ethylhexanol jedoch eine DEHP-Belastung nicht spezifisch an, da es als Oxidationsprodukt auch aus anderen Weichmachern hervorgehen kann. Die Sekundärmetabolite 5OH-MEHP und 5-oxo-MEHP konnten ausschließlich in sehr geringer Konzentration bei der Gruppe mit PVC-Schlauchmaterial nachgewiesen werden. 5oxo-MEHP konnte mit einer äußerst geringen Konzentration auch bei der Kontrollprobe detektiert werden. Die Konzentration

an Mono(2-ethyl-5-carboxypentyl)phthalat (5cx-MEPP) lag bei den drei Gruppen der Schlauchmaterialien unterhalb der Nachweisgrenze. Die Ergebniswerte der Metaboliten entsprachen den Erwartungen der Studie. Die Gruppe mit PVC-Schlauchmaterial wies höchste Konzentrationen an DEHP auf, und auch MEHP war hier gegenüber den anderen Gruppen erhöht. Außerdem waren die Sekundärmetabolite, denen eine besondere Bedeutung wegen ihrer Unempfindlichkeit gegenüber äußerer Kontamination zukommt, nur in Proben der Gruppe PVC zu detektieren. Es könnte einen Hinweis darauf geben, dass Enzyme des sekundären Oxidationsschrittes auch im Blut vorhanden sind.

Fast alle Studien zur Abschätzung einer DEHP-Belastung in Blut und Serum beschränken sich auf die alleinige Messung von DEHP. MEHP wurde bisher nur in wenigen Studien gemessen. Koch et al. (59) betrachten DEHP im Blut als einen äußerst ungeeigneten Parameter, da hohe Leerwerte durch den Gehalt an DEHP in Lösemitteln, Gerätschaften und Laborumgebung hervorgerufen werden. Auch die Messung von MEHP sehen Koch et al. (59) als problematisch an. Laut der Forschergruppe kann MEHP aus DEHP exogen durch einfache enzymatische, mikrobielle oder chemische Hydrolyse gebildet werden und so bei hoher DEHP-Kontamination ebenfalls leerwertbehaftet sein. Aufgrund dieser Problematik werden Messungen zur Überprüfung einer DEHP-Belastung, ein so genanntes Biomonitoring, meistens bei Urinproben durchgeführt (60, 61, 62, 102). Es wurde deutlich, dass sich hierfür die Sekundärmetabolite des DEHP hervorragend eignen. Sie kommen in höherer Konzentration im Urin vor und weisen eine längere Halbwertszeit auf als MEHP (61). Zudem sind sie unempfindlich gegenüber äußerer Kontamination (58) und somit ein zuverlässiger Marker für die DEHP-Belastung. 5OH-MEHP und 5oxo-MEHP sind Marker für kurzzeitige Exposition, 5cx-MEPP und 2cx-MMHP für Langzeitexposition (60, 58).

Die Fragestellung unserer Studie zielte nicht auf ein exaktes Biomonitoring ab. Zudem wurden unsere Messungen an einem *in vitro* Modell durchgeführt. Vielmehr sollte der Problematik nachgegangen werden, ob eine erhöhte Menge an DEHP auch zu einer signifikanten Endothelaktivierung führt. Es handelte

sich hierbei lediglich um Tendenzen, die durch klinische Studien weiter zu verifizieren sind.

In unserer Studie hatten die Negativkontrollen keinen Kontakt zum Schlauchmaterial. Unsere Messungen zeigten, dass jedoch auch hier gewisse Konzentrationen an DEHP (0.12 mg/l), MEHP (0.02 mg/l), 5oxo-MEHP (0.0003 mg/l) und 2-Ethylhexanol (0.19 mg/l) quantifizierbar waren. Dies verdeutlicht eine DEHP-Belastung der Allgemeinbevölkerung, die durch das ubiquitäre Vorkommen dieser Substanz in der Umwelt zu erklären ist. Nicht auszuschließen ist auch eine mögliche Kontamination der Blutproben während des Versuches, beispielsweise bei der Blutabnahme. In unsere statistische Auswertung war diese Kontaminationsmöglichkeit einkalkuliert, denn die Werte wurden in Bezug zur Kontrolle gesetzt.

4.4 Endothelaktivierung durch DEHP-Exposition

Beim Fluss durch die Schläuche und Systeme der Herz-Lungen-Maschine kommt das Patientenblut mit unphysiologischen Fremdoberflächen in Kontakt. Dieser Fremdkörperkontakt greift in das Gleichgewicht der Hämostase ein, und als Folge kommt es zu einer systemischen Abwehrreaktion, wie sie auch beim Einbringen von Fremdkörpern in den humanen Organismus abläuft (21). Dabei werden das Immunsystem (93) und speziell das Plasmamediatorsystem aktiviert, dessen wichtigste Komponenten das Komplement-, Gerinnungs-, Fibrinolyse- und Kallikrein-Kinin-Kaskadensystems (86) sind. Im Rahmen dieser getriggerten systemischen Entzündungsreaktion kommt auch der Aktivierung von Leukozyten und der Freisetzung von Zytokinen eine große Bedeutung zu (8). Bei der inflammatorischen Reaktion findet ein komplexes Zusammenspiel von humoralen und zellulären Komponenten statt. Die humoralen Komponenten, d.h. das Komplementsystems, eine Kontakt-Aktivierungskaskade und Zytokine, aktivieren die zellulären Komponenten: Leukozyten und Endothelzellen. Es folgt dann als initialer Schritt der zellulären Immunantwort eine Interaktion von neutrophilen Granulozyten und

Endothelzellen über Adhäsionsmoleküle. Nach Adhäsionskontakt migrieren die Neutrophilen in den Extravasalraum, wo es zu einer Toxinfreisetzung und dadurch zu einer Schädigung des umliegenden Gewebes kommt (74).

Um eine Veränderung und Aktivierung von Blutzellen, oder in diesem Fall Endothelzellen, zu analysieren, ist die Untersuchung von verschiedenen Genexpressionen in aktivierten Zellen indiziert (29, 106). Sie gibt Hinweis auf die Biokompatibilität des Fremdstoffes. Ein Biomaterial ist dann blutverträglich, wenn es keine oder nur gewünschte Reaktionen des Blutes auslöst und nur Substanzen in nicht-toxischen Konzentrationen freisetzt (106). In unserer Studie wurde der Zusammenhang zwischen einer erhöhten DEHP-Konzentration und der Konzentration an proinflammatorischen Markern nach extrakorporaler Zirkulation *in vitro* untersucht. Das Kontaktmedium Blut wurde auf die Zytokine IL-1 β und TNF- α überprüft. Darauf folgte die Untersuchung der Endothelzellen auf Expression von den Adhäsionsmolekülen ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin.

4.4.1 Expression von Zytokinen

Zytokine sind Peptide, die von aktivierten Leukozyten und vielen anderen Zellen während der natürlichen und spezifischen Immunantwort freigesetzt werden. Sie haben multiple, insbesondere proinflammatorische, immunregulatorische, die Hämatopoese von Entzündungszellen steuernde und chemotaktische Funktionen (79) und entfalten ihre Wirkung bereits in pico- bis nanomolaren Konzentrationen (63). TNF- α und IL-1 β gehören in die Gruppe der proinflammatorische Zytokine, der so genannten Entzündungsmodulatoren. IL-1 β und TNF- α werden hauptsächlich von aktivierten Makrophagen aber auch von zahlreichen anderen Zelltypen, als Reaktion auf Entzündung, Infektion, Verletzung und anderen Schädigungen gebildet. Diese Zytokine initiieren eine Komplexkaskade von zellspezifischen Reaktionen, die zur Aufrechterhaltung der physiologischen Hämostase dienen (82, 85).

IL-1 β gehört als proentzündliches Schlüsselzytokin zu den wichtigsten entzündungsfördernden Signalstoffen des Immunsystems. Es wird nach einem Entzündungsreiz vor allem von Monozyten und Makrophagen gebildet. Entzündungsreize können Bakterien, Hefen, Autoantigene aber auch jede Art

von Fremdpartikeln sein. IL-1 β wirkt beinahe auf alle Zelltypen und oft auch in Verbindung mit TNF- α . Es übt unzählige Funktionen im Rahmen physiologischer und pathologischer Vorgänge aus (26). Hierzu zählt eine Steigerung der Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen und eine Steigerung der Gerinnung, die Bildung von Akutphaseprotein, eine Stimulation der ACTH-Ausschüttung, eine Stammzellaktivierung, die Induktion von IL-1 β - und TNF- α -Synthese und in höheren Konzentrationen die Induktion von Fieber und Blutdruckabfall (79). Klinischer Gewinn und inakzeptable Toxizität für den Menschen liegen hier nah beieinander (25). Im Gegensatz zu TNF- α ist IL-1 β in höheren Konzentrationen nicht letal oder zytotoxisch (79).

Unsere Ergebnisse zeigten, dass alle Proben IL-1 β ausbilden. Es traten keine signifikanten Unterschiede in der IL-1 β -Konzentration zwischen den drei Schlauchmaterialien auf. Auch innerhalb der Gruppen erschienen keine signifikanten Konzentrationsunterschiede bei 60 zu 120 Minuten. Im Vergleich mit der Negativkontrolle lagen die Werte bei 120 Minuten Rezirkulation bei Verwendung von PVC-Schlauchmaterial um 2.53 pg/ml, bei noDOP[®]-Schlauchmaterial um 1.91 pg/ml und bei Carmeda[®]-Schlauchmaterial um 1.43 pg/ml höher. Bei 60 Minuten Rezirkulation überstieg die IL-1 β -Konzentration bei Verwendung von PVC die Negativkontrolle um 1.48 pg/ml. Durch Blutabnahme und Rezirkulation wurde in das Gleichgewicht der Hämostase eingegriffen. Veränderungen von Entzündungsmediatoren, Zytokinen und Leukozytenadhäsionsmolekülen lassen sich praktisch bei allen Patienten feststellen, bei dem das Verfahren der extrakorporalen Zirkulation angewandt wurde (4, 24, 89). Vergleicht man die Ergebnisse der IL-1 β Konzentration mit den freigesetzten DEHP- Konzentrationen, so gibt es folgende Korrelation: Trotz höchster Konzentrationen an DEHP und Metaboliten bei Proben des PVC-Schlauchmaterials war die IL-1 β Konzentration bei diesen Proben zwar gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht, gegenüber den Proben der zwei anderen Schlauchmaterialien jedoch nicht.

TNF- α wird hauptsächlich von Monozyten aber auch stimulierten T-Zellen, natürlichen Killerzellen, und Mastzellen freigesetzt. TNF- α induziert die Hochregulierung von Adhäsionsmolekülen bei Endothelzellen, stimuliert

Neutrophile und Makrophagen und die Synthese von Zytokinen. Schließlich induziert es Fieber und hemmt die Gerinnung (39). In extremer Quantität reduziert es die kardiale Kontraktilität, führt zu Blutdruckabfall und Minderdurchblutung des Gewebes und löst diffuse intravasale Gerinnung mit Verbrauchskoagulopathie aus (79). Membrangebundene oder im Serum lösliche Liganden der TNF-Superfamilie agieren mit mehr oder weniger spezifischen membrangebundenen oder frei löslichen TNF- α Rezeptoren. Die Aktivierung dieser Rezeptoren führt zu Proliferation, Differenzierung und Apoptose der entsprechenden Zelle (47).

Unsere Ergebnisse zeigten, dass TNF- α in allen Proben nachweisbar ist. Zwischen den Gruppen traten keine Signifikanzen auf. Auch innerhalb der Gruppen trat bei 120 gegenüber 60 Minuten Rezirkulation keine Hochregulierung auf. Die TNF- α -Konzentration war bei Proben der Gruppe mit PVC-Schlauchmaterial bei 120-minütiger Rezirkulation statistisch signifikant um 3.84 pg / ml und bei Proben der Gruppe mit Carmeda[®]-Schlauchmaterial um 3.62 pg/ml gegenüber der Negativkontrolle erhöht.

Die Hypothese, dass eine vermehrte DEHP-Freisetzung zu einer Steigerung der TNF- α -Ausschüttung führt, konnte somit nicht bestätigt werden.

Frühere Studien zeigen unterschiedliche Ergebnisse beim Vergleich von PVC-Materialien in Bezug auf die Zytokinfreisetzung. Gourlay et al. (41) vertreten die Hypothese, dass DEHP in PVC-Produkten an der Entwicklung von Entzündungsreaktionen, beispielsweise nach kardiopulmonalem Bypass, mitbeteiligt ist. Die Biokompatibilität von Medizinprodukten aus PVC kann durch eine Heparinbeschichtung ebenso wie durch einen Verzicht auf Weichmacher verbessert werden. Fracasso et al. (36) stimulierten mononukleäre Zellen mit DEHP und analysierten sie auf IL-1 β -Sekretion. Im Vergleich zu unstimulierten Zellen war bei den DEHP-stimulierten Zellen ein deutlicher Anstieg der Produktion an Interleukin messbar. Auch eine Studie von Yamashita et al. (105) konnte die Stimulation der Zytokinausschüttung durch DEHP belegen.

Die folgenden Studien stellen zwar einen Vergleich zwischen unbeschichtetem und heparinbeschichtetem PVC auf, jedoch wird auf den Zusammenhang einer

steigenden Zytokinausschüttung durch eine vermehrte DEHP-Exposition nicht näher eingegangen. Weber et al. (94) bestätigten jedoch, dass eine mRNA-Expression für IL-1 β und TNF- α materialabhängig ist und bei heparinbeschichtetem PVC geringer ausfällt als bei unbeschichtetem PVC. Eine Untersuchung von Yamada et al. (104) kamen ebenfalls zu der Schlussfolgerung, dass eine Heparinbeschichtung die TNF- α -Produktion und daher auch die Neutrophilenaktivierung vermindert. Anastase-Ravion et al. (2) beschreiben antiinflammatorische Eigenschaften von Heparin. Mit Heparin inkubierte Monozyten, die zuvor mit Lipopolysacchariden stimuliert wurden, zeigten eine verringerten TNF- α - und IL-1 β -Produktion. Demgegenüber steht eine Studie von Lappegård et al. (65). Hier stieg die Konzentration von TNF- α und IL-1 β nur geringfügig bei unbeschichtetem PVC gegenüber heparinbeschichtetem PVC an, während Ashraf et al. (5) überhaupt kein signifikantes TNF- α -Level in den Gruppen ermitteln konnten. Dennoch bestätigt die Studie von Ashraf et al. eine Abnahme der systemischen Entzündungsreaktion bei Verwendung von Heparinbeschichtung. Auch Steinberg et al. (87) konnten über keine Veränderung der TNF- α - und IL-1 β -Produktion beim Vergleich von heparinbeschichtetem und unbeschichtetem PVC berichten. Defraigne et al. (23) stellten in einer in vivo Studie keine Abschwächung der Zytokinfreisetzung bei Verwendung einer Heparinbeschichtung fest. Nach 24 Stunden wurde der Ausgangswert von TNF- α erreicht.

In unserer Studie ergab die Verwendung einer CBAS[®]-Beschichtung oder des alternativen Weichmachers TEHTM keine Vorteile hinsichtlich der Expression von IL-1 β und TNF- α gegenüber der Verwendung von PVC.

4.4.2 Expression von Adhäsionsmolekülen

Bei der DEHP-Migration während der extrakorporalen Zirkulation sind die Endothelzellen neben den Blutzellen der Zelltyp, der mit der höchsten Konzentration an Weichmacher in Berührung kommt und somit der potentiellen Toxizität am stärksten ausgesetzt ist. Als Folge davon können lokale

Schädigungen auftreten. Eine Schädigung des Endothels kann sich beispielsweise durch Extravasation, Entzündung oder Thrombosierung äußern. Eine starke Aktivierung der Endothelzellen wird beispielsweise durch TNF- α und IL-1 β ausgelöst (30). Aktivierte Endothelzellen weisen einen veränderten Zellstoffwechsel auf. Es kann zur Expression bestimmter Zelloberflächenrezeptoren, den Adhäsionsmolekülen führen.

Zu den Adhäsionsmolekülen werden die Selektine, Integrine, Strukturen der Immunglobulin-Superfamilie und die Cadherine gezählt (79). Adhäsionsmoleküle sind Glykoproteine, die eine entscheidende Rolle bei Entzündungen und neoplastischen Erkrankungen spielen (30, 6, 10, 35, 42). Ihre Bestimmung ermöglicht eine Überwachung von Krankheitsverläufen, Therapieerfolgen und eine Vorhersage pathologischer Entwicklungen (30). E-Selektin spielt bei Entzündungsvorgängen eine Schlüsselrolle zwischen Leukozyten und Endothelzellen in der ersten Phase der Zelladhärenz. Das Vorkommen von Selektin auf der Zelloberfläche ist streng reguliert und eine übermäßige Expression spricht für ein entzündliches Geschehen (99,73). ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin sind die wichtigsten Adhäsionsmoleküle für die Adhäsion von Immunzellen am Endothel und deren Migration ins Gewebe (57).

ICAM-1 gehört zu den intrazellulären Adhäsionsmolekülen, deren Expression auf die Endothelzelloberfläche durch Zytokine wie IL-1 β , TNF- α und γ -Interferon induziert wird. Liganden für ICAM-1 sind CD11a/CD18- und CD11b/CD18-Integrine, die auf der Zelloberfläche von Neutrophilen, T-Zellen und Makrophagen präsentiert werden (6, 23, 30). Durch diese ICAM-Integrin-Interaktion wird ein selektives Rekrutieren von Leukozyten bei pathologischen Prozessen sichergestellt.

Eine ICAM-1-Expression wurde mittels Durchflusszytometrie, Real-Time PCR und Western Blot bei Endothelzellen der Vena saphena und HUVEC bestimmt. Ziel dieser Studie war nicht der Vergleich der zwei Endothelzellkulturen. Vielmehr sollten durch Untersuchung von Endothelzellen unterschiedlicher Herkunft die Ergebnisse weiter bestätigt werden. Die Durchflusszytometrie

zeigte, dass sich zwischen den drei Schlauchmaterialien kein signifikanter Unterschied bezüglich der ICAM-1-Expression abzeichnete. Auch innerhalb der Gruppen kam es nach einer verlängerten Rezirkulationszeiten von 120 Minuten gegenüber 60 Minuten zu keiner Hochregulierung der Expression. Eine ICAM-1-Expression war zwar bei allen Proben nachweisbar, jedoch fiel sie im Vergleich zu den Positivkontrollen insgesamt gering aus. Die durch Durchflusszytometrie gemessenen prozentualen Anteile an ICAM-1-exprimierenden Endothelzellen reichten von 3.12 – 5.44 % bei HUVEC und 1.34 – 2.27 % bei Endothelzellen der Vena saphena. Beim Vergleich der Positivkontrollen der zwei Endothelzellkulturen fiel auf, dass Endothelzellen der Vena saphena mit 10.2 % deutlich geringere ICAM-1-Expression bei entsprechender Stimulation mit TNF- α aufwiesen als HUVEC, wo der Anteil 82.0 % betrug. Zellen der humanen Umbilikalvene schienen hier empfindlicher zu reagieren. Bei der Western-Blot-Analyse fiel der Nachweis von ICAM-1 negativ aus. Weder bei der Positivkontrolle noch bei den anderen Proben zeichnete sich ein Bandenmuster ab. Die PCR-Analyse bestätigte die Messungen der Durchflusszytometrie. Allerdings waren Endothelzellen der Vena saphena bei Verwendung von Proben der Gruppe mit Carmeda[®]-Schlauchmaterial bei 60 Minuten Rezirkulationszeit gegenüber der Verwendung der Gruppe noDOP[®] und gegenüber dem 120-Minutenwert der eigenen Gruppe erhöht. Hier ist von einem Messfehler auszugehen.

VCAM-1 wird, ebenso wie ICAM-1, von aktivierten Endothelzellen exprimiert (17). Es reguliert die Adhäsion von Monozyten und Lymphozyten an Endothelzellen, die durch Lipopolysaccharide, IL-1 β oder TNF- α stimuliert wurden (7, 27, 31, 68). Die VCAM-1-Expression hat eine hohe Relevanz bei zahlreichen entzündlichen Vorgängen. Eine VCAM-1-Expression wurde durch Real-Time PCR untersucht. Die Analyse von VCAM-1 lieferte für HUVEC und Endothelzellen der Vena saphena kein einheitliches Ergebnis. Bei Endothelzellen der Vena saphena traten keine signifikanten Unterschiede in der relativen VCAM-1-Expression auf. Bei HUVEC war die relative VCAM-1-Expression bei Proben der Gruppe Carmeda[®] nach 120 Minuten Rezirkulation

gegenüber 60 Minuten und gegenüber der Gruppe noDOP[®] hochreguliert. Auch bei Gruppe mit noDOP[®]-Schlauchmaterial war der 120-Minutenwert gegenüber dem 60-Minutenwert hochreguliert. Es handelte sich jedoch lediglich um CT-Werte von 0.45 bis 1.27.

E-Selektin gehört zur Gruppe der Selektine und wird durch IL-1 β - und TNF- α -aktivierte Endothelzellen de novo exprimiert. Besonders in den ersten Stunden einer Entzündungs-/Immunreaktion kommt E-Selektin eine besondere Bedeutung zu. Es bewirkt als Adhäsionsmolekül ein „Rolling“ der Leukozyten auf dem Endothel und eine Aktivierung weitere Adhäsionsmoleküle (83). Eine feste Bindung von Leukozyten an das Endothel wird erst durch die Adhäsionsmoleküle der Ig-Superfamilie ermöglicht. Eine Expression von E-Selektin wurde in unserer Studie durch Real-Time PCR-Analyse und Western Blot untersucht. Die PCR-Analyse ergab für HUVEC keine signifikanten Änderungen der Genexpression. Bei Endothelzellen der Vena saphena sank in der Gruppe Carmeda[®] nach 120 Minuten die relative Expression von E-Selektin. Die Western-Blot-Analyse ergab nur bei den Positivkontrollen starke Banden.

Es wurde bisher keine Studie gefunden, die einen direkten Zusammenhang von DEHP und der Expression von Adhäsionsmolekülen untersucht. Zahlreiche Studien befassen sich mit der Thematik einer nichtinfektiösen, systemischen Entzündungsreaktion nach kardiopulmonalem Bypass, bei der auch der Expression von Zytokinen und speziell Adhäsionsmolekülen eine entscheidende Rolle zukommt. Für diese systemische Inflammation werden zahlreiche Ursachen in Erwägung gezogen. Diskutiert werden der Kontakt von zellulären und humoralen Bestandteilen des Blutes mit der synthetischen Oberfläche, die Ischämie, die Reperfusion, Endotoxine oder das Operationstrauma. Gemessen wurden Adhäsionsmoleküle in löslicher Form als Marker der Endothelzellaktivierung und -schädigung (103). Bei extrakorporaler Zirkulation kommt es zu einer Hochregulierung von sICAM-1, sVCAM-1 und sE-Selektin (103) Laut Yamada et al. (104) kommt es zu einer Hochregulierung von sE-Selektin und TNF- α während und nach der extrakorporalen Zirkulation. Die Konzentrationen sanken signifikant bei der Verwendung von

heparinbeschichteten Systems. Auch wurde eine Korrelation der TNF- α und sE-Selektin Konzentration beobachtet. Laut Schreurs et al. (81) wird durch eine CBAS[®]-Beschichtung die Freisetzung von Entzündungsmediatoren in vielen Fällen reduziert. Unsere Messdaten konnten diese Beobachtungen nicht unterstreichen. Allerdings stützte sich unsere Studie auf Messungen von membranständigen Adhäsionsmolekülen. Lösliche Adhäsionsmoleküle wurden nicht berücksichtigt.

4.5 Schlussfolgerung

Die CBAS[®]-Beschichtung bietet im Vergleich zum unbeschichteten Material eine gute Protektion gegen die Freisetzung von DEHP und Metaboliten. Dennoch ist eine vollständige Barrierewirkung gegen einen DEHP-Austritt auch durch Einsatz von kovalent gebundenem Heparin nicht gegeben.

Das noDOP[®]-Material setzte äußerst geringe Mengen an DEHP frei, die aber signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht waren. Die Ergebnisse von Welle et al. (95) bestätigten unsere Beobachtung, dass DEHP als Nebenprodukt von TEHTM enthalten ist. So bot auch der Einsatz von TEHTM keine vollständige Protektion vor DEHP. Einheitlich führte die Rezirkulationszeit von 120 Minuten gegenüber 60 Minuten zu keiner signifikanten Änderung der DEHP-Migration. Es ist aber anzunehmen, dass es bei längerer Kontaktzeit mit der Fremdoberfläche zu einer weiteren Freisetzung kommt.

Erhöhte Werte von DEHP und Metaboliten gingen nicht mit einer Hochregulierung von IL-1 β und TNF- α einher. Ebenso schien die Expression von membranständigen Adhäsionsmolekülen unabhängig der freigesetzten DEHP-Menge zu sein.

Die Verwendung einer CBAS[®]-Beschichtung und von TEHTM-PVC wies gegenüber DEHP-PVC einen deutlichen Vorteil bezüglich der Migration von DEHP auf. Hinsichtlich der Endothelaktivierung fielen die Werte bei allen drei Schlauchmaterialien verhältnismäßig gering und mit wenigen, nicht aussagekräftigen Signifikanzen aus. Einen direkten Zusammenhang zwischen

4 DISKUSSION

dem DEHP-Spiegel und der Endothelaktivierung konnte somit nicht bestätigt werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Bei der extrakorporalen Zirkulation unter Einsatz der Herz-Lungen-Maschine kommt das Patientenblut mit einer großen Fläche an nichtphysiologischer Fremdoberfläche in Kontakt. Zwischen dem biologischem Gewebe und dem als Biomaterial bezeichneten synthetischen Werkstoff finden chemische, physikalische und biologische Wechselwirkungen statt, die zu ernststen postoperativen Komplikationen, wie dem Postperfusionssyndrom, führen können. Das Endothel vermittelt und moduliert die inflammatorische Antwort. Grundvoraussetzung für eine gute Biokompatibilität ist, dass aus dem Biomaterial freigesetzte Substanzen keinen negativen Einfluss auf den Organismus ausüben.

Di-(2-ethylhexyl)phthalat (DEHP) ist der am häufigsten verwendete Weichmacher für PVC. Er steht im Verdacht, entwicklungs- und reproduktionstoxisch zu sein. Durch eine nicht kovalente Bindung mit PVC ist eine DEHP-Migration bei Kontakt mit lipophilem Medium gegeben. Zur Steigerung der Hämokompatibilität und zur Protektion des Patienten vor einer DEHP-Exposition wurden unterschiedliche Oberflächenbeschichtungen entwickelt und auch alternative Weichmacher eingesetzt.

Die vorliegende Studie hatte zum Gegenstand, den Einfluss von DEHP auf die Endothelaktivierung in vitro zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden die Freisetzung von DEHP aus drei unterschiedliche Weich-PVC-Schläuche analysiert. Auch die ebenso toxischen primären und sekundären Metabolite des DEHP wurden bei der Messung berücksichtigt. Anschließend stand bei der Untersuchung die folgende Frage im Mittelpunkt: Inwieweit beeinflusst freigesetztes DEHP die Aktivierung von Endothelzellen?

Als Schlauchmaterial wurde das für die Extrakorporale Zirkulation standardmäßig verwendete PVC mit DEHP (PVC), ein PVC mit Heparinbeschichtung (Carmeda®) und ein DEHP-freies PVC (noDOP®) gewählt. Mit Hilfe des modifizierten Chandler-Loop-Modells und Vollblut konnte eine

extrakorporale Zirkulation simuliert werden. Die Schlauchmaterialien wurden im „Closed-Loop-Modell“ unter standardisierten Bedingungen über 60 und 120 Minuten mit frischem Humanblut perfundiert.

Die kovalent gebundene Heparinbeschichtung von PVC (Carmeda[®]) zeigte eine gute Protektion gegen die Migration von DEHP und Metabolite. DEHP und das primäre Oxidationsprodukt MEHP traten in sehr geringer Konzentration auf, während sekundäre Metabolite nicht detektierbar waren. Auch das DEHP-freie Schlauchmaterial aus TEHTM-PVC (noDOP[®]) wies, unseren Erwartungen entsprechend, äußerst geringe Mengen an DEHP und MEHP auf. Eine vollständige Protektion ist aber nicht gegeben. Die Proben der Gruppe mit Carmeda[®]- und noDOP[®]- Schlauchmaterial wiesen gegenüber unserer Kontrollprobe dennoch erhöhte DEHP-Konzentration auf.

Durch eine längere Rezirkulationszeit stieg die Konzentration von DEHP und Metabolite in unserer Studie nicht signifikant an. Es ist aber durchaus anzunehmen, dass es bei längerer Perfusionszeit zu einer weiteren Freisetzung kommt.

Trotz deutlich erhöhter Werte von DEHP und Metabolite bei der Gruppe mit PVC-Schlauchmaterial, wurde eine signifikante Hochregulierung der proinflammatorischen Zytokine Interleukin-1 β und TNF- α nicht gemessen. Die Hypothese, dass eine vermehrte DEHP-Freisetzung zu einer gesteigerten Zytokinausschüttung führt, konnte somit nicht bestätigt werden. Ebenso korrelierte die Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle nicht mit dem DEHP-Spiegel.

In Anbetracht aktueller Forschungsergebnisse sollte es ein Ziel sein, die DEHP-Exposition für den Patienten und besonders für den Risikopatienten zu minimieren. Jedoch darf durch die Anwendung von Oberflächenbeschichtungen und alternativen Weichmacher die Qualität der medizinischen Versorgung nicht gefährdet sein.

6 LITERATUR

- 1 Albro PW, Thomas RO. Enzymatic hydrolysis of di-(2-ethylhexyl) phthalate by lipases. *Biochim Biophys. Acta* 1973; 360: 380-390
- 2 Anastase-Ravion S, Blondin C, Cholley B, Haeffner-Cavaillon N, Castellot JJ, Letourneur D. Heparin inhibits lipopolysaccharide (LPS) binding to leukocytes and LPS-induced cytokine production. *J Biomed Mater Res A* 2003; 66(2):376-84
- 3 Arbeitsgemeinschaft PVC und Umwelt e.V. Herstellung von PVC 2004; <http://www.agpu.de/index.php?id=17>
- 4 Ashraf S, Butler J, Tian Y, Cowan D, Lintin S, Saunders NR, Wattersoon KG, Martin PG. Inflammatory mediators in adults undergoing cardiopulmonary bypass: comparison of centrifugal and roller pumps. *Ann Thorac Surg* 1998; 65(2):480-4
- 5 Ashraf S, Tian Y, Cowan D, Entress A, Martin PG, Wattersoon KG. Release of proinflammatory cytokines during pediatric cardiopulmonary bypass: heparin-bonded versus nonbonded oxygenators. *Ann Thorac Surg* 1997; 64(6):1790-4
- 6 Bacus SS, Zelnick CR, Chin DM, Yarden Y, Kaminsky DB, Bennington J, Wen D, Marcus JN, Page DL. Medullary carcinoma is associated with expression of intercellular adhesion molecule-1, Implication to its morphology and its clinical behavior. *Am J Path* 1994; 01 145:1337-1348
- 7 Bochner BS, Luscinskas RW, Gimbrone MA Jr, Newman W, Sterbinsky SA, Derse-Anthony CP, Klunk D, Schleimer RP. Adhesion of human basophils, eosinophils, and neutrophils to interleukin 1-activated human vascular endothelial cells, contributions of endothelial cell adhesion molecules. *J Exp Med* 1991; 173:1553-1556
- 8 Borowiec JW, Hagman L, Tötterman TH, Pekna M, Venge P, Thelin S. Circulating cytokines and granulocyte-derived enzymes during complex heart surgery. A clinical study with special reference to heparin-coating of cardiopulmonary bypass circuits. *Scand J Thorac Cardiovasc Surg* 1995; 29(4):167-74
- 9 Breider MA. Endothelium and inflammation. *J Am Vet Med Assoc* 1993; 203:300-306
- 10 Bruijn JA, Heer De E. Adhesion molecules in renal diseases *Lab Invest* 1995; 72:387-394

- 11 Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte. Empfehlungen des BfArM zur Minimierung des Risikos durch DEHP-haltige Medizinprodukte, 22.05.2006. In: DEHP als Weichmacher in Medizinprodukten aus PVC Referenz-Nr.:9211/0506
- 12 Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte. DEHP in Medizinprodukten. In:Pressemitteilung vom 28.01.2005: Expertengespräch im BfArM März 2005
- 13 Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR). Weichmacher DEHP: Tägliche Aufnahme höher als angenommen? Stellungnahme des BfR vom 23. Juli 2003
- 14 Burkhart HM, Joyner N, Niles S, Ploessl J, Everett J, Iannettoni M, Richenbacher W. Presence of Plasticizer Di-2(ethylhexyl)phthalate in Primed Extracorporeal Circulation Circuits. *Respiratory Support. ASAIO Journal* 2007; 53(3):365-367
- 15 Bridges J, Jong WD, Hajslová J, Stahl D, Almdal K, Angerer J, Degen G, Jaakkola J, Jansson B, Ladefoged O, Latini G, Peltonen K, Ranucci E, Rastogi S, Rodrigues Inacio J. Preliminary Report on the safety of medical devices containing DEHP plasticized PVC or other plasticizers on neonates and other groups possibly at risk. Scientific Committee on Emerging and Newly-Identified Health Risks SCENIHR Brüssel, 2007
- 16 Caliebe J. Adsorption von Plasmaproteinen an modifizierten Fremdoberflächen- Bedeutung für die Hämokompatibilität der extrakorporalen Zirkulation. Medizinische Dissertation, Medizinische Fakultät der Eberhard-Karls-Universität Tübingen 2005; 10
- 17 Carlos TM, Schwartz BR, Kovach NL, Yee E, Rosso M, Osborn L, Chi-Rosso G, Newman B, Lobb R, Harlan JM. Vascular cell adhesion molecule-I mediates lymphocyte adherence to cytokine-activated cultured human endothelial cells. *Blood* 1990; 76:965-970
- 18 Center for Devices and Radiological Health U.S. Food and Drug Administration. Safety Assessment of Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP). PVC Medical Devices Rockville, 2001.
<http://www.fda.gov/cdrh/ost/dehp-pvc.pdf>
- 19 Christensson A, Ljunggren L, Nilsson-Thorell C, Arge B, Diehl U, Hagstam KE, Lundberg M. In vivo comparative evaluation of hemodialysis tubing plasticized with DEHP and TEHTM. *Int J Artif Organs* 1991;(7):407-10

- 20 Clark K, Cousins I, MacKay D, Yamada K. Observed Concentrations in the Environment. In: Staples CA: The Handbook of Environmental Chemistry, 3Q: Phthalate Esters, Springer, New York 2003
- 21 Dapper F, Neppi H, Wozniak G, Strube I, Neuhof H. EKZ-Humorale Systeme und Mediatoren. In: Preuße CB, Schulte HD: Extrakorporale Zirkulation Heute 1991; Steinkopff-Verlag, Darmstadt
- 22 Davies MG, Hagen PO. Systemic inflammatory response syndrome. Br J Surg 1997; 84(7): 920-35
- 23 Defraigne JO, Pincemail J, Larbuisson R, Blaffart F, Limet R. Cytokine release and neutrophil activation are not prevented by heparin-coated circuits and aprotinin administration. Ann Thorac Surg 2000; 69(4):1084-91
- 24 Deng MC, Wiedner M, Erren M, Mollhoff T, Assmann G, Scheld HH. Arterial and venous cytokine response to cardiopulmonary bypass for low risk CABG and relation to hemodynamics. Eur J Cardiothorac Surg 1995; 9(1):22-9
- 25 Dinarello CA. Interleukin-1. Cytokine Growth Factor Rev 1997; 8(4):253-65
- 26 Dinarello CA. Biologic basic for interleukin-1 in disease. Blood 1996; 6:2095-2146
- 27 Dobrina A, Menegazzi R, Carlos TM, Nardon E, Cramer R, Zacchi T, Harlan JM, Patriarca P. Mechanisms of eosinophil adherence to cultured vascular endothelial cells: eosinophils bind to the cytokine-induced endothelial ligand vascular cell adhesion molecule-1 via the very late activation antigen-4 integrin receptor. J Clin Invest 1991; 20-26
- 28 Donner S, Sauerwald C. EU-Richtlinie zu Weichmachern in Kinderspielzeug. Wissenschaftliche Dienste des deutschen Bundestages. Übermittlung der Stellungnahme der Kommission an das Europäische Parlament 16.09.2005, Nr. 11/05
- 29 Eisses MJ, Seidel K, Aldea GS, Chandler WL; Reducing Hemostatic Activation During Cardiopulmonary Bypass: A Combined Approach. Anesth Analg 2004; 98:1208-1216
- 30 Elangbam CS, Qualls CW, Dahlgren J, Dahlgren RR. Cell Adhesion Molecules-Update. Vet Pathol 1997;34: 61-73
- 31 Elites MJ, Osborn L, Takada Y, Crouse C, Luhowskyj S, Hemler ME, Lobb RR. VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA4 at a site distinct from the VLA-Whbronectin binding

- site. Cell 1990; 60:577-584
- 32 European Commission DG SANCO D3: Doc. INT/SYNOPTIC DOCUMENT (04/2003) updated to 13 May 2003
- 33 European Council for Plasticisers and Intermediates (ECPI) Plasticisers. <http://www.ecpi.org/index.asp?page=5>
- 34 Eyerer P, Elsner P, Hirth T. Die Kunststoffe und ihre Eigenschaften 6. Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg 2005
- 35 Fantone JC, Ward PA. Inflammation. In: Rubin E and Farber JL: Pathology, JB Lippincott Co, Philadelphia, PA 1994; 33-66
- 36 Fracasso A, Calo L, Landini S, Morachiello P, Righetto F, Scanferla F, Toffoletto P, Genchi R, Roncali D, Cantaro S: Peritoneal sclerosis: role of plasticizers in stimulating interleukin-1 production. Perit Dial Int 1993; 13 Suppl 2:517-9
- 37 Fukutomi M. Changes in platelet, granulocyte, and complement activation during cardiopulmonary bypass using heparin-coated equipment. Artif Organs 1996; 20:767-76
- 38 Fusch G, Preuss R, Scholz D, Koch H, Angerer J, Fusch C. Standortbestimmung: Phthalatbelastung in Frühgeborenen. Z Geburtshilfe Neonatol 2005; 209 DOI: 10.1055/s-2005-871353
- 39 Glibins E, Lang KS. Immunsystem. In: Schmidt RF, Lang F: Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie 2007; 30. Auflage, Springer Medizin Verlag Heidelberg, 552-553
- 40 Green R, Hauser R, Calafat AM, Weuve J, Schettler T, Ringer S, Huttner K, Hu H. Use of Di(2-ethylhexyl) Phthalate-Containing Medical Products and Urinary Levels of Mono(2-ethylhexyl) Phthalate in Neonatal Intensive Care Unit Infants. Environ Health Perspect 2005; 113:1222-1225
- 41 Gourlay T. Biomaterial development for cardiopulmonary bypass. Perfusion 2001; 16(5):381-90
- 42 Haapasalmi K, Makela M, Oksala O, Heino J, Yamada KM, Uitto VJ, Latjava H. Expression of epithelial adhesion proteins and integrins in chronic inflammation. Am J Path 1995; 01 147: 193-206
- 43 Haishima Y, Seshimo F, Higuchi T, Yamazaki H, Hasegawa C. Development of a simple method for predicting the levels of di(2-ethylhexyl) phthalate migrated from PVC medical devices into pharmaceutical solutions. Int J Pharm 2005; 298:126-42.

- 44 Haishima Y, Matsuda R, Hayashi Y, Hasegawa C, Yagami T, Tsuchiya T. Risk assessment of di(2-ethylhexyl)phthalate released from PVC blood circuits during hemodialysis and pump-oxygenation therapy. *Int J Pharm* 2004; 274(1-2):119-29
- 45 Hanawa T, Endoh N, Kazuno F, Suzuki M, Kobayashi D. Investigation of the release behavior of diethylhexyl phthalate from polyvinyl chloride tubing for intravenous administration based on HCO60. *Int J Pharm* 2003; 267:141-9
- 46 Hanawa T, Muramatsu E, Asakawa K, Suzuki M, Tanaka M. Investigation of the release behavior of diethylhexyl phthalate from the polyvinyl-chloride tubing for intravenous administration. *Int J Pharm* 2000; 210:109-15
- 47 Hehlhans T, Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 2005; 115(1): 1–20
- 48 Heudorf U, Mersch-Sundermann V, Angerer J. Phthalates: Toxicology and exposure. *Int J Hyg Environ Health* 2007; 210(5):623-34
- 49 Hinberg I. DEHP in Medical Devices. In: Medical Devices Bureau, Health Products & Foods Branch Health Canada: An Exposure and Toxicity Assessment 2001
http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/alt_formats/hpfb-dgpsa/pdf/md-im/sapdehp_rep_gcsdehp_rap_2001-04-26_e.pdf
- 50 Hippenstiel S. Endothel und Entzündung: Pathomechanismen der bakteriellen Endothelaktivierung. Medizinische Habilitationsschrift, Medizinischen Fakultät Charité der Humboldt-Universität Berlin 2003; S 25
- 51 Ittershagen M, Döpke A, Leutert D, Mavromati F, Pfeifer T. Phtalate – Die nützlichen Weichmacher mit den unerwünschten Eigenschaften. Umwelt Bundesamt für Mensch und Umwelt, Dessau, Febr. 2007
<http://www.umweltbundesamt.de/uba-info/presse/hintergrund/weichmacher.pdf>
- 52 Janvier G, Baquey C, Roth C, Benillan N, Belisle S, Hardy JF. Extracorporeal circulation, hemocompatibility, and biomaterials. *Ann Thorac Surg* 1996; 62 (6):1926-1934
- 53 Kagisaki K. Biocompatibility of heparin-coated circuits in pediatric cardiopulmonary bypass. *Artif Organs* 1997; 21:836-40

- 54 Kambia K, Dine T, Gressier B, Bah S, Germe AF, Luyckx M. Evaluation of childhood exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate from perfusion kits during long-term parenteral nutrition. *Int J Pharm* 2003; 262:83-91
- 55 Kambia K, Dine T, Azar R, Gressier B, Luyckx M, Brunet C. Comparative study of the leachability of di (2-ethylhexyl) phthalate and tri(2-ethylhexyl) trimellitate from haemodialysis tubing. *Int J Pharm* 2001; 229(1-2):139-46.
- 56 Kavanaugh AE, Lightfoot E, Lipsky PE, Oppenheimer-Marks N. Role of CD11/CD18 in adhesion and transendothelial migration of T cells. Analysis utilizing CD18-deficient T cell clones. *J Immunol* 1991; 146:4149-4156
- 57 Klein A. In-vivo-Untersuchung der Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und ELAM-1 in HCMV-infiziertem Gewebe. Medizinische Dissertation, Medizinische Fakultät der Eberhard-Karls-Universität Tübingen 2004
- 58 Koch HM, Preuss R, Angerer J. Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP): human metabolism and internal exposure – an update and latest results. *International Journal of Andrology* 2006; 29:155-165
- 59 Koch HM. Untersuchung der Di(-2-ethylhexyl)phthalat (DEHP)-Belastung der Allgemeinbevölkerung – Durchführung eines Human- Biomonitorings. Dissertation, Naturwissenschaftliche Fakultät II - Biologie, Chemie, Pharmazie, Universität Erlangen-Nürnberg, 2006
URN (NBN): urn: nbn: de: bvb: 29-opus-5283
- 60 Koch HM, Bolt HM, Preuss R, Angerer J. New metabolites of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in human urine and serum after single oral doses of deuterium-labelled DEHP. *Arch Toxicol* 2005; 79(7):367-76
- 61 Koch HM, Bolt HM, Angerer J. Di (2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) metabolites in human urine and serum after a single oral dose of deuterium-labelled DEHP. *Arch Toxicol* 2004; 78(3):123-30.
- 62 Koch HM, Drexler H, Angerer J. An estimation of the daily intake of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) and other phthalates in the general population. *Int J Hyg Environ Health* 2003; 206:77-83
- 63 Koj A. Initiation of acute phase response and synthesis of cytokines. *Biochem Biophys Acta* 1996; 1317(2): 84-94
- 64 Korn RL, Fisher CA, Livingston ER, Stenach N, Fishman SJ, Jeevanadam V, Addonizio VP. The effects of Carmeda Bioactive Surface on human blood components during simulated extracorporeal circulation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996; 111:1073-1084

- 65 Lappegård KT, Fung M, Bergseth G, Riesenfeld J, Mollnes TE. Artificial surface-induced cytokine synthesis: effect of heparin coating and complement inhibition. *Ann Thorac Surg* 2004; 78(1):38-44; discussion 44-5
- 66 Larm Olle. An approach to anti-thrombosis by surface modification. *Progress in Artificial Organs Cleveland*. ISAIO Press 1985; 313-8
- 67 Linder S. PVC in Medizinprodukten -bewährt und sicher. In: *Arbeitsgemeinschaft PVC und Umwelt e.V.: Kunststofftrends*, Bonn, 2004
- 68 Lobb RR. Integrin-immunoglobulin superfamily interactions in endothelial-leukocyte adhesion. In: Harlan JM and Liu DY :Adhesion. Its Role in Inflammatory Disease. WH Freeman and Co, New York, NY 1992; I-I 8
- 69 Loff S, Subotic U, Reinicke F, Wischmann H, Brade J. Extraction of Diethylhexyl-phthalate from Perfusion Lines of Various Material, Length and Brand by Lipid Emulsions. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004; 39:341-328
- 70 Loff S, Kabs F, Subotic U, Schaible T, Reinecke F, Langbein M. Kinetics of diethylhexylphthalate extraction from polyvinylchloride-infusion lines. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2002; 26:305-9
- 71 Loff S, Kabs F, Witt K, Sartoris J, Mandl B, Niessen KH, Waag KL. Polyvinylchloride infusion lines expose infants to large amounts of toxic plasticizers. *J Pediatr Surg* 2000; 35:1775-81
- 72 Mahoney CB. Heparin-bonded circuits: clinical outcomes and costs. *Perfusion* 1998; 13:192-204
- 73 McEver RP. Selectins. *Curr Opin Immunol* 1994; 6(1):75-84
- 74 Miller BE, Levy JH. The inflammatory response to cardiopulmonary bypass. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 1997; 11(3):355-66
- 75 Moen O, Fosse E, Dregelid E, Brockmeier V, Andersson C, Hogasen K, Venge P, Mollnes TE, Kierulf P. Centrifugal pump and heparin coating improves cardiopulmonary bypass Biocompatibility. *Ann Thorac Surg* 1996; 62: 1134-1140
- 76 Mollnew T. Formation of C5a during cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1991; 52:92-7
- 77 NTP: Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction (CERHR). Monograph on the Potential Human Reproductive and

- Developmental Effects of Di (2-ethylhexyl) Phthalate DEHP. NIH Publication 11/2006; 06-4476, 6
- 78 Peck CC, Albro PW. Toxic potential of the plasticizer di(2- ethylhexyl) phthalate in the context of its disposition and metabolism in primates and man. *Environ Health Perspect* 1982; 45:11–17
- 79 Pichler WJ, Peter HH. Immunsystem. In: Siegenthaler W, Blume HE: *Klinische Pathophysiologie*, 2006; 9.Auflage, Thieme, 529-32, 488-492
- 80 Rock G, Labow RS, Tocchi M. Distribution of di(2-ethylhexyl)phthalate and products in blood and blood components. *Environ Health Perspect* 1986; 65:309-16
- 81 Schreurs HH, Wijers MJ, Gu YJ, van Oeveren W, van Domburg RT, de Boer JH, Bogers AJ. Heparin-coated bypass circuits: effects on inflammatory response in pediatric cardiac operations. *Ann Thorac Surg* 1998; 66(1):166-71
- 82 Serafeim A, Gordon J. The immune system gets nervous. *Curr Opin Pharmacol* 2001; 1: 398–403
- 83 Silbernagl S. Blut. In: Silbernagl S, Lang F: *Taschenatlas der Pathophysiologie* 2005; Georg Thieme Verlag KG, 2: 48-50
- 84 Song XF, Wei GH, Deng YJ, Chen X, Liu X, Zhang DY. Di(2-ethylhexyl)phthalate affects the testes and leydig cells of neonatal KM mice. Department of Urology, Children's Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400014, China 2006; 12(9):775-9
- 85 Spangelo BL, Gorospe WC. Role of the cytokines in the neuroendocrine-immune system axis. *Front Neuroendocrinol* 1995;16:1–22
- 86 Sroka J. Die Rolle der Zytokine in der Pathophysiologie der Extrakorporalen Zirkulation. Medizinische Dissertation 2002; Justus-Liebig-Universität Gießen
URN:urn:nbn:de:hebis:26-opus-8178
URL: <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2002/817/>
- 87 Bizekis C, Greenwald J, Flisser A, Spencer FC, Galloway AC. Heparin bonding of bypass circuits reduces cytokine release during cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1995; 60(3):525-9.
- 88 Svenmarker S, Sandström E, Karlsson T, Jansson E, Hänggmark S, Lindholm R, Appelblad M, Aberg T. Clinical effects of heparin coated surface in cardiopulmonary bypass. *Eur J Cardiothorac Surg* 1997; 11: 957-964

- 89 Uitley JR. Pathophysiology of cardiopulmonary bypass current issues. *J Card Surg* 1990; 5(3):177-89
- 90 VDI-Gesellschaft-Kunststofftechnik-Düsseldorf. PVC: Rezeptierung, Aufbereitung, Verarbeitung und Recycling. VDI Verlag, Düsseldorf, 2002
- 91 Videm V, Mollnes TE, Garred P, Svennevig JL. Biocompatibility of extracorporeal circulation. In vitro comparison of heparin-coated and uncoated oxygenator circuits. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1991; 101(4):654-660
- 92 Videm V. In-vitro comparison of the heparin-coated and uncoated oxygenator circuits and 50% reduction of heparin dose. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1991; 101:654-6
- 93 Vogt S, Troitzsch D, Kasseckert S, Moosdorf R, Weitkemper HH. Interaktion des Blutes mit künstlichen Oberflächen im Extrakorporalen Kreislauf In: Tschau Rudolf J: Extrakorporale Zirkulation in Theorie und Praxis, Papst 2005; 708
- 94 Weber N, Wendel HP, Ziemer G. Gene monitoring of surface-activated monocytes in circulating whole blood using duplex RT-PCR. *J Biomed Mater Res* 2001; 56(1):1-8
- 95 Welle F, Wolz G, Franz R. Migration von Weichmachern aus PVC Schläuchen in enteralen Nahrungslösungen. *Pharma international: Forschung und Entwicklung* 2005;17-21
- 96 Wendel HP. Beschichtungstechniken für Werkstoffe der EKZ-Systeme, IG. Lauterbach: Handbuch der Kardiotechnik, Urban & Fischer Verlag 2002; 106-124
- 97 Wendel HP, Heller W, Gallimore MJ, Hoffmeister HE. Heparin-coated oxygenators significantly reduce contact system activation in an ex-vivo cardiopulmonary bypass model. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1994; 5:673-678
- 98 Wendel HP. Heparinbeschichtete Systeme. In: Tschau RJ: Extrakorporale Zirkulation in Theorie und Praxis, Papst, 1999; 680
- 99 Whelan J. Selectin synthesis and inflammation. *Trends Biochem Sci* 1996; 21(2):65-9
- 100 Wittassek M, Angerer J. Entwicklung und Anwendung einer analytischen Methode zum biologischen Monitoring umwelt- und arbeitsbedingter Phthalsäurediester-Belastungen. Weichmacher - Phthalate

(Phthalsäureester) – DEHP: Institut und Poliklinik für Arbeit-, Sozial- und Umweltmedizin der Universität Erlangen-Nürnberg
www.arbeitsmedizin.uni-erlangen.de/Koch_Phthalate.htm

- 101 Wittassek M, Heger W, Koch HM, Becker K, Angerer J, Kolossa-Gehring M. Daily intake of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) by German children - A. comparison of two estimation models based on urinary DEHP metabolite levels. *Int J Hyg Environ Health* 2007; 210(1):35-42
- 102 Wittassek M, Wiemüller AG, Koch HM, Eckard R, Dobler L, Müller J, Angerer J, Schlüter C. Internal phthalate exposure over the last two decades-A retrospective human biomonitoring study. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 2007; Volume 210: 319-333
- 103 Xiao X, Zhang C, Wei Y. Leukocyte adhesion molecule expression and circulating ICAM-1, E-Selectin levels during cardiopulmonary bypass in patients undergoing valve replacement. *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao* 1999;30(1):81-4. Chinese.
- 104 Yamada H, Kudoh I, Hirose Y, Toyoshima M, Abe H, Kurahashi K. Heparin-coated circuits reduce the formation of TNF alpha during cardiopulmonary bypass. *Acta Anaesthesiol Scand* 1996; 40(3):311-7
- 105 Yamashita U, Sugiura T, Yoshida Y, Kuroda E. Effect of endocrine disrupters on macrophage functions in vitro. *J UOEH* 2005;27(1):1-10
- 106 Zimmermann AK. Untersuchung zur Evaluierung der Hämokompatibilität von Biomaterialien. Logos Verlag Berlin, ISBN 3- 8325-1304-3 2006;11-12, 32

7 ANHANG

7.1 Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr.med. Dr.h.c. Gerhard Ziemer für die Überlassung dieses Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im klinischen Forschungslabor für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie der Universität Tübingen.

Ein großer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD Dr.rer.nat. Hans-Peter Wendel, der mir das interessante und spannende Thema vorschlug und die praktische wie auch die theoretische Arbeit betreute. Er stand mir während der ganzen Zeit sehr hilfreich zur Seite und ich konnte mich jederzeit mit Fragen an ihn wenden.

Ein herzliches Dankeschön gilt Herrn Prof. Dr. Klaus Dietz vom Institut für medizinische Biometrie Tübingen, welcher mir bei der statistischen Auswertung meiner Ergebnisse und der Erstellung der entsprechenden Schaubilder zuverlässig und hilfsbereit zur Seite stand.

Besonders möchte ich mich bei Liane Dreibold- Spranger bedanken. Sie wies mich in den methodischen Teil ein und standen mir sehr hilfsbereit im Labor zur Seite. Ich habe es nicht als selbstverständlich empfunden stets einen Ansprechpartner zu haben und bin ihr darüber sehr dankbar.

Ein großer Dank auch an Michaela Braun, die mir mit großem Engagement die Arbeit im Labor näher brachte und mich bei der Durchführung der Versuche sehr unterstützte.

Bedanken möchte ich mich bei Doris Armbruster, Ingrid Schulz und Bernd Neumann für ihre Hilfe und Unterstützung bei der Durchführung der Versuche.

Zu der sehr angenehmen Arbeitsatmosphäre hat die Hilfsbereitschaft des gesamten Teams des klinischen Forschungslabors beigetragen. Ein herzliches Dankeschön gilt an dieser Stelle besonders den Mitdoktoranden/innen.

Ein Dank gilt auch Lore Horlamus für das Lektorat dieser Arbeit.

Für die Unterstützung in vielerlei Hinsicht danke ich meinen Eltern und meinem Bruder.