

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik mit Poliklinik
Tübingen
Abteilung Innere Medizin III
(Schwerpunkt Kardiologie und Kreislaufkrankungen)
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Gawaz**

**Pharmakologische Beeinflussung der
Monozytenaktivierung bei Hypothermie durch
GPIIb/IIIa-Rezeptorantagonisten im modifizierten
Chandler Loop Modell**

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

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

vorgelegt von

**Eva Griesel
geb. Scherzler**

aus Reutlingen

2012

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. M. Beyer

2. Berichterstatter: Professor Dr. H.-P. Wendel

Für meinen Mann, für unsere Kinder

und

für meine Mutter.

ABSTRACT

Die Monozytenaktivierung ist bei einem entzündlichen Geschehen wie der Arteriosklerose ein wichtiger Fakt. Studien der letzten Jahre konnten eine antiinflammatorische Wirkung der Hypothermie belegen. Aus diesem Grund hat die Hypothermie nach Veröffentlichung von zwei multizentrischen Studien im Jahr 2002 Einzug erhalten in die Leitlinien bezüglich reanimierter Patienten nach Myokardinfarkt. Die Verbesserung des neurologischen Outcomes ist auch in der Neuro- und Kardiochirurgie ein wichtiger Grundstein für den Einsatz einer Hypothermie. Unter milder therapeutischer Hypothermie kam es zu signifikant weniger Reinfarkten, als unter Normothermie. Die durch die Hypothermie reduzierten Enzymausschüttungen und Expressionsminderungen von Oberflächenmarkern bewirken eine antiinflammatorische Situation. Der Einsatz einer Kühlung - sei es über extra- oder intrakorporale Methoden - konfrontiert den Organismus mit einer unphysiologischen Oberfläche. Die Oberfläche der Katheter und Schläuche aktiviert die Gerinnungskaskade und trägt zur Thrombusbildung bei. Oftmals kommt bei Patienten nach Reanimation ein intrakorporales Kühlverfahren (z.B. CoolGard[®]) zum Einsatz. Neben der Koronarangiografie stellt die kardiopulmonale Bypass- (CPB-) Operation ein weiteres Interventionsverfahren bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung dar. Hierbei kommt Blut ebenfalls durch die Herz-Lungen-Maschine mit einer unphysiologischen Oberfläche in Kontakt. Zudem wird die CPB-Operation unter Hypothermie durchgeführt. Viele Studien der letzten Jahre beschäftigten sich mit der Frage der Thrombozytenaktivierung bei Hypothermie. Ziel der hier vorliegenden Studie war es, den kardioprotektiven Effekt der Hypothermie unter besonderer Berücksichtigung der Aktivierung der Monozyten zu prüfen. Weil viele Hochrisikopatienten unter der Therapie eines GPIIb/IIIa Rezeptor Antagonisten stehen wurde dieser Tatsache Rechnung getragen und die Monozytenaktivierung unter Einfluss der Medikamente Tirofiban und Eptifibatid gemessen.

METHODE:

Mit Hilfe der Durchflußzytometrie wurde die Ausprägung der Adhäsionsrezeptoren der Monozyten bei tiefer (18°C) und milder (28°C) Hypothermie und bei Normothermie (36°C) untersucht. Als Studienmedikamente wurden Tirofiban und Eptifibatid als Vertreter der GPIIb/IIIa Antagonisten gewählt. Mit einem modifizierten Chandler Loop

Model konnten wir den Blutfluss durch eine Herz-Lungen-Maschine (HLM) simulieren (LOOP) und verglichen diese mit einem statischen Model (STASE). Untersuchte Antikörper waren CD11b, CD54 und CD162, die in besonderer Weise die Aktivierung der Monozyten aufzeigen.

ERGEBNIS:

Wir konnten erstens zeigen, dass die Expression der monozytären Adhäsionsmoleküle CD11b und CD162 mit sinkender Temperatur abnimmt, was den Nutzen der therapeutischen Hypothermie im klinischen Alltag bestätigt. Durch Einsatz von tiefer und milder Hypothermie kann ein antiinflammatorischer Effekt erzielt werden, der zur Verminderung des arteriosklerotischen Entzündungskreislaufes führt. Zweitens konnten wir zeigen, dass die Expression des monozytären Adhäsionsmoleküls CD11b ansteigt bei Stimulation im extrakorporalen Blutfluss (LOOP). Diese Tatsache legt nahe, den Kontakt des Patientenblutes mit den Fremdoberflächen so gering wie möglich zu halten. Drittens konnte gezeigt werden, dass die Medikamente keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Monozyten haben, weder im Bezug auf die Temperatur noch im Bezug auf die Behandlungsweise des Blutes (LOOP oder STASE). Somit können die GPIIb/IIIa Inhibitoren Eptifibatid und Tirofiban ohne nachteiligen Effekt auf die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Monozyten bei hypothermen oder normothermen Verhältnissen oder bei Einsatz der HLM verwendet werden.

Abkürzungen

ACS	Akutes Koronarsyndrom
AMI	Akuter Myokardinfarkt
AP	Angina pectoris
CAPTURE	“Chimeric c7E3 anti-platelet therapy in refractory unstable angina Treatment”
CD	Cluster of Differentiation
CPR	Kardiopulmonale Reanimation
DHCA	Deep hypothermic circulation arrest
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EPIC	“Evaluation of c7E3 for the prevention of ischemic complications”
EPILOG	“Evaluation of PTCA to improve longterm outcome by c7E3”
EPISTENT	“Evaluation of platelet GPIIb/IIIa inhibitor for stenting”
GUSTO	“Global utilisation of streptokinase and t-PA for occluded coronary arteries IV in acute coronary syndromes”
HACA	“Hypothermia after cardiac arrest”
HLM	Herz Lungen Maschine
HWZ	Halbwertszeit
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1 (CD54)
IL-1	Interleukin-1
ILCOR	International Liaison Committee on Resuscitation
IMPACT-II	“Integrelin to minimize platelet aggregation and to prevent coronary thrombosis”
LDL	Low Density Lipoproteine
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen 1 (CD11a/CD18 Integrin)
LPS	Lipopolysaccharide
LSCM	Laser scanning confocal microscopy
NK	Natürliche Killerzellen

NSTEMI	Nicht-ST-Hebungsinfarkt
PCI	Percutaneous coronary intervention
PRISM	“Platelet receptor inhibition for ischemic syndrome management”
PRISM-PLUS	“Platelet receptor inhibition for ischemic syndrome management – patients limited by unstable signs and symptoms”
PTR	Proben Temperatur Gerät
PURSUIT	“Platelet glycoprotein IIb/IIIa in Unstable angina: Receptor Suppression Using Integrilin Therapy”
RCA	Rechte Koronararterie
RCX	Ramus circumflexus
RESTORE	“Randomized efficacy study of Tirofiban for outcomes and restenosis”
RIVA	Ramus interventricularis anterior
ROSC	Return of spontaneous circulation
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome
STEMI	ST-Hebungsinfarkt
TIA	Transitorische ischämische Attacke
TNF α	Tumornekrosefaktor α
vWF	Von Willebrand Faktor

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Einführung	1
1.2	Arteriosklerose und Akutes Koronarsyndrom	3
1.3	Kardiogener Schock.....	4
1.4	KHK.....	4
1.5	Koronarangiographie und PCI.....	4
1.6	HLM und Bypass Operation	5
1.7	Hypothermie	7
1.8	Leukozyten.....	9
1.9	Monozyten	10
1.10	Leukozytenaktivierung	12
1.10.1	„Rolling“.....	12
1.10.2	„Sticking“	12
1.11	Adhäsionsrezeptoren.....	14
1.11.1	Selektine	14
1.11.2	Integrine.....	15
1.11.3	Immunglobulin Superfamilie.....	16
1.11.4	Cadherine.....	17
1.12	Antigene.....	17
1.12.1	CD45.....	17
1.12.2	CD11b.....	18
1.12.3	CD54.....	19
1.12.4	CD162.....	19
1.13	Hämostase.....	20
1.13.1	Primäre Hämostase	20

1.13.2	Sekundäre Hämostase.....	21
1.14	Interaktion zwischen Leukozyten und Thrombozyten.....	22
1.15	Glycoprotein IIb/IIIa Antagonisten.....	23
1.16	Tirofiban	25
1.17	Eptifibatid	25
1.18	Zielsetzung der Studie	26
2	Material und Methoden.....	27
2.1	Patienten und Blutentnahme	27
2.2	Untersuchungsmethoden.....	28
2.2.1	Inkubationsprotokoll „STASE“	28
2.2.2	Inkubationsprotokoll „LOOP“	29
2.3	Das modifizierte Chandler-Loop-Modell	30
2.4	Probentemperaturgerät (PTR).....	31
2.5	Durchflusszytometer	31
2.6	Weitere Geräte	33
2.7	Chemikalien	34
2.7.1	Zur Probenaufbereitung bei den Versuchen „LOOP“ und „STASE“	34
2.7.2	Reagenzien zur Messung mit dem Zytometer	35
2.8	Statistische Auswertung.....	36
2.9	Statistische Vergleiche.....	39
3	Ergebnisse.....	40
3.1.1	Einfluss der Medikamente auf die Expression der monozytären Ädhäsionsrezeptoren CD11b, CD54 und CD162	40
3.1.2	Einfluss der Temperatur auf die Expression der monozytären Ädhäsionsrezeptoren CD11b, CD54 und CD162	49

3.1.3	Einfluss der Temperatur auf die Expression der monozytären Ädhäsionsrezeptoren CD11b, CD54 und CD162 in Abhängigkeit von LOOP oder STASE	56
3.1.4	Einfluss der Temperatur auf die Expression der monozytären Ädhäsionsrezeptoren CD11b, CD54 und CD162 mit NaCl bei LOOP und bei STASE	60
3.1.5	Einfluss und Vergleich von LOOP und STASE auf die Expression der monozytären Ädhäsionsrezeptoren CD11b, CD54 und CD162	64
3.1.6	Vergleich zwischen der Behandlungsart LOOP und der Behandlungsart STASE bezüglich der Expression von monozytären Adhäsionsmolekülen CD11b, CD54, CD162 bei NaCl	68
4	Diskussion	72
4.1	Einfluss der Medikamente auf die Expression der monozytären Ädhäsionsrezeptoren CD11b, CD54 und CD162	72
4.1.1	Tirofiban und Eptifibatid - Allgemeines	72
4.1.2	Eptifibatid und Tirofiban - vorliegende Studie und Literaturübersicht	74
4.2	Einfluss der Temperatur auf die Expression der monozytären Adhäsionsrezeptoren CD11b, CD54 und CD162	77
4.2.1	Einfluss der Temperatur in der Medizin - Allgemeines	77
4.2.2	Adhäsionsrezeptoren und Temperatur - vorliegende Studie und Literaturübersicht	81
4.3	Einfluss und Vergleich von LOOP und STASE auf die Expression der monozytären Ädhäsionsrezeptoren CD11b, CD54 und CD162	87
4.3.1	Einfluss der Fremdkörperaktivierung - Allgemeines	87
4.3.2	Einfluss der Fremdkörperaktivierung - vorliegende Studie und Literaturübersicht	88
4.4	Zusammenfassung der Ergebnisse	93
5	Anhang	95

6	Literaturverzeichnis	98
7	Danksagung	114

1 Einleitung

1.1 Einführung

Die Todesursachenstatistiken weltweit werden angeführt von kardiovaskulären Erkrankungen. Hauptrisikofaktor dafür ist die Hypertonie, die oftmals mit Arteriosklerose vergesellschaftet ist. 20% aller Deutschen leiden an Hypertonie, die Erkrankungsrate nimmt mit steigendem Alter zu. Es wird geschätzt, dass 70% der 70jährigen Hypertoniker sind. Risikofaktoren wie Adipositas, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie, Nikotinabusus und Stress sind zudem weit verbreitet und begünstigen die Ausbildung von Arteriosklerose. Grundlage der kardiovaskulären Erkrankungen liegt in arteriosklerotischen Veränderungen, die aufgrund thrombotischer Ereignisse mit einer hohen Sterblichkeitsrate einhergehen.

Die Inzidenz des akuten Koronarsyndroms (ACS) in Deutschland liegt bei ca. 300 von 100 000 eingelieferten Patienten in den Notaufnahmen der Kliniken. Dabei ist zu bedenken, dass das ACS als eine Gruppe von Erkrankungen anzusehen ist. Dazu gehören die instabile Angina Pectoris, der Nicht-ST-Hebungsinfarkt (NSTEMI) und der ST-Hebungsinfarkt (STEMI).

In Deutschland erlitten laut Statistischem Bundesamt in Wiesbaden 2003 ca. 280 000 Patienten einen Herzinfarkt, wovon 62 000 verstarben. Bei circa 7% aller Patienten mit akutem Myokardinfarkt kam es zur Ausbildung eines kardiogenen Schocks. Der kardiogene Schock ist von der Größe des infarzierten Myokards abhängig. Meist ist eine Schädigung von über 30% des Herzgewebes vorhanden. Die Mortalität des kardiogenem Schocks ist in den letzten Jahren gesunken, dennoch liegt die 30 Tage Mortalität bei ca. 50-70% (1).

Die Angaben über die Inzidenz des plötzlichen Herzstillstandes mit nachfolgender Reanimation in Europa schwanken außerklinisch zwischen 37 und 80 beobachteten Fällen pro 100 000 Einwohner (2) (3). Innerklinisch liegt die Inzidenz einer Reanimation zwischen 150 pro 100 000 aufgenommenen Patienten in Norwegen und 350 Patienten in England (4). Natürlich basieren nicht alle plötzlichen Kreislaufstillstände auf einem primär kardialen Ereignis. Ca. 80% der Reanimationen werden aufgrund eines AMI durchgeführt. Die restlichen 20% werden auf Schlaganfall, Lungenembolie, Unfall, Suizid, Ertrinken o.ä. zurückgeführt. Der plötzliche

Herzstillstand wird vom Statistischen Bundesamt im Jahr 2007 als Todesursache von 4552 Patienten in Deutschland angegeben. Leider ist das Erreichen eines Spontankreislaufes nach durchgeführter Reanimation nur bei ca. 50% der Patienten möglich (5) (6). Die Zahl der Toten nach einer kardial bedingten Reanimation ist weiter rückläufig. Ursache dafür ist die verbesserte Diagnostik im Akutfall und die zügigere Intervention (7). Hierzu tragen ein leitliniengerechtes Vorgehen mit schneller Durchführung einer Perkutanen Koronarintervention (PCI) und die Einleitung einer milden Hypothermie deutlich bei.

Die PTCA mit den Möglichkeiten einer Thrombektomie, einer Ballondilatation und des Einsatzes von Stents ermöglicht eine schnelle Revaskularisierung der Koronarien. Das Endothel wird bei der PTCA oder bei Anlage eines intrakorporalen Katheters stark geschädigt. Es kommt zur endothelialen Aktivierung und konsekutiv zu einem inflammatorischen Prozess. Bei der Nutzung einer HLM wird ebenfalls über Fremdkörperaktivierung eine Kontakt-Phasen-Aktivierung und ein inflammatorischer Prozess angestoßen. Aber auch die zugrunde liegende Arteriosklerose basiert auf einem Entzündungsgeschehen. Bei all diesen inflammatorischen Ereignissen spielen Monozyten mit ihrer Fähigkeit der Migration eine entscheidende Rolle. Zum einen ist bekannt, dass die Hypertonie eine vermehrte Aktivierung von Monozyten nach sich zieht (8) (9) (10), zum anderen ist Hypoxie, wie sie bei Lumeneinengung oder Verschluss eines Gefäßes vorkommen, für die Aktivierung von Monozyten verantwortlich (11). Deshalb sind Monozyten Hauptfaktoren für die Entwicklung einer Arteriosklerose. Monozyten werden über verschiedene Schritte aktiviert. Über die Schritte „rolling“, „sticking“ und „transmigration“ entstehen Schaumzellen, die den Beginn einer Arteriosklerose darstellen. Es entstehen Plaques, an die sich Thrombozyten anlagern können. Kommt es zur Plaqueruptur kann in Folge dessen eine Thrombusbildung mit partiellem oder vollständigem Verschluss des Gefäßes entstehen. Seit den frühen 1950er Jahren wird die Hypothermie therapeutisch eingesetzt um die inflammatorischen Prozesse zu mildern. Eine Reihe von Studien konnte belegen, dass es unter Hypothermie zu einer Verminderung der Inflammation kommt und damit zu verminderten arteriosklerotischen Veränderungen (12) (13) (14) (15). Zudem ist als direkt sichtbarer Erfolg der therapeutischer Hypothermie das deutlich verbesserte neurologische Outcome von reanimierten Patienten zu nennen. Bei kardiochirurgischen

Einsätzen oder bei neurochirurgischen Operationen mit Nutzung der HLM wird seit Jahren eine therapeutische Hypothermie durchgeführt. Nun ist seit 2003 die therapeutische milde Hypothermie ein leitliniengerechtes Instrument in der Behandlung von reanimierten Patienten, die eine PTCA erhalten. Dabei wird ein GPIIb/IIIa Rezeptorantagonist eingesetzt, der die Thrombozytenaktivierung hemmt.

1.2 Arteriosklerose und Akutes Koronarsyndrom

Die Arteriosklerose ist eine Erkrankung des gesamten Gefäßsystems basierend auf einer endothelialen Dysfunktion. Jedoch ist die Auswirkung einer Koronararteriosklerose mit den schwerwiegendsten Folgen verbunden. Eine lokale Entzündungsreaktion spielt in diesem Zusammenhang eine große Rolle (16):

Plasma-Cholesterin, das als Bestandteil von LDL gebunden und transportiert wird, kann bei zu hohen Konzentrationen im Blut nicht mehr von der Leber aus dem Organismus entfernt werden. Ablagerungen von LDL in den Gefäßwänden ist die Folge. Endothelzellen überwuchern diese LDL-Ansammlungen und schütten proinflammatorische Zytokine aus. Zudem wird die Expression von E- und P-Selektinen, ICAM-1 und VCAM-1 erhöht (17). Es kommt zu Einwanderungen von Lymphozyten und Monozyten. Monozyten gelangen durch Diapedese der Endothelschicht in die untere Gefäßschicht einer Arterie. In der Tunica media angelangt wandeln sich die Monozyten zu Makrophagen um und sind dort in der Lage Lipide und Cholesterinester einzulagern. Sie werden zu sogenannten „Schaumzellen“, die im weiteren Verlauf der Erkrankung absterben. Hierdurch entsteht der gefährliche arteriosklerotische Plaque. Durch den Plaque entsteht eine Lumeneinengung, die u.a. zu einer Angina pectoris führen kann. Die Gefahr einen Herzinfarkt zu erleiden ist nicht durch die Lumeneinengung, sondern durch die „Reparaturmechanismen“ des Körpers gegeben. Es setzt eine Entzündungsreaktion ein, vor allem durch T-Lymphozyten und Monozyten getriggert, die eine Destabilisierung des Plaques zu Folge hat. Diese Entzündungsreaktion ist für das Aufreißen der den Plaque überziehenden fibrösen Kappe verantwortlich und führt zur Bildung eines Thrombus, der einen Schlaganfall oder Herzinfarkt zu Folge haben kann. Durch das Rupturieren des Plaques entsteht eine

Kaskade mit Freisetzung prokoagulatorischen Inhaltes aus dem Plaque und einer Gerinnungsaktivierung mit lokaler Thrombusbildung (18).

1.3 Kardiogener Schock

Als kardiogener Schock wird ein Zustand beschrieben, der durch Herzversagen ausgelöst wird. Die Symptome sind v.a. Atembeschwerden als Zeichen der Lungenstauung und Schmerzen im Brust oder Oberbauch. Ursächlich ist meist ein Herzinfarkt (STEMI), schwere Herzrhythmusstörungen, eine Myokarditis, terminale Herzinsuffizienz, Perikardtamponade oder eine Lungenembolie (19). Der kardiogene Schock kann hierbei Stunden oder gar Tage nach dem eigentlichen Myokardinfarkt (AMI) auftreten. Dies ist abhängig von der Nekrotisierung und Infarzierung des betroffenen Gewebes. Kann durch eine PTCA nach akutem Myokardinfarkt der Blutfluss schnell wieder hergestellt werden, so wird eine signifikante Verbesserung des Langzeitüberleben der Patienten erreicht. Wird die PTCA jedoch erst sehr spät eingeleitet, bleibt auch der Behandlungserfolg sehr schlecht (20). Laut der GUSTO Studie erlitten fast 60% der Patienten mit AMI einen kardiogenen Schock. Die Mortalität im Schock lag bei 80% (21).

1.4 KHK

Koronare Herzkrankheit (KHK) bedeutet die Verengung von Herzkranzgefäßen. Vor allem Ramus circumflexus (RCX), Ramus interventricularis anterior (RIVA) und rechte Koronararterie (RCA) sind oft verengt. Man spricht dann von 1 - 2 oder 3 Gefäßerkrankung. Diese Verengung kann durch Arteriosklerose langsam geschehen oder bei einem Herzinfarkt plötzlich vorliegen. Als diagnostisches und therapeutisches Verfahren hat sich seit vielen Jahren die Koronarangiographie bewährt.

1.5 Koronarangiographie und PCI

Die Koronarangiographie ist eine radiologische Darstellung der Herzkranzgefäße mittels der Linksherzkatheteruntersuchung. Unter einer PCI (perkutanen koronaren Intervention) versteht man die Kombination aus einer diagnostischen Koronarangiographie und einer interventionellen Therapie. Man ist in der Lage die

Durchgängigkeit der Herzkranzgefäße zu prüfen und bei Bedarf eine Ballondilatation (PTCA) durchzuführen oder einen Stent einzuführen um das betroffene Gefäß offen zu halten (22).

Im klinischen Betrieb wird aktuell bei PCI eine Begleitmedikation mit ASS und Heparin routinemäßig verabreicht und häufig durch die Gabe von GPIIb/IIIa-Rezeptor-Antagonisten und/oder Clopidogrel ergänzt (23). Laut den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie - Herz und Kreislaufforschung e.V. sollte die Zeit zwischen Arzt-Erstkontakt und PCI zwischen 90 und maximal 120 Minuten liegen. Sollte die Zeit über 120 Minuten betragen, bevor man eine PCI durchführen kann, wird empfohlen mit einer Lysetherapie zu beginnen (24) (25). Jedoch ist in Deutschland die Abdeckung mit Herzkatheterlaboren ausgesprochen gut. Die Diagnostik bereits im Krankenwagen mit EKG und die intrahospitalen Laboruntersuchungen gewährleisten eine schnelle Diagnose des ACS und die Zuführung der Patienten zur PCI. Im Jahr 2009 verstarben bei einer Herzkatheteruntersuchung in Deutschland (Elektiv- und Notfalluntersuchung) ca. 4 000 von ca. 418 000 Patienten (ca. 1%), bei interventionellen Herzkatheteruntersuchungen mit Dilatation und/oder Stenteinlage verstarben ca. 6 000 von 250 000 Patienten (ca. 2,4%) (26).

1.6 HLM und Bypass Operation

Sind die Koronargefäße des Patienten durch Arteriosklerose stark geschädigt und ist die Therapie mittels medikamentöser Therapie und PTCA ausgereizt, so ist die Herzchirurgie oftmals die letzte Möglichkeit dem Patienten zu helfen. Bereits seit Jahren werden die Patienten perioperativ einer tiefen bis milden Hypothermie mit Temperaturen zwischen 18-34°C unterzogen, um die Dauer der Operation so weit als möglich ausdehnen zu können. Die Kühlung des Patientenblutes hat zur Folge, dass sauerstoffsensible Organe wie das Gehirn länger mit reduziertem Sauerstoffangebot auskommen und die hypoxische Schädigung im Rahmen der Operation gering bleibt. Eine Erhöhung der OP-Zeiten konnte so erreicht werden, was vielfältige neue Operationsmöglichkeiten zuließ.

Laut Statistischem Bundesamt in Wiesbaden wurden im Jahr 2009 347 000 Operationen am Herzen in deutschen Krankenhäusern durchgeführt. Dies entsprach im Vergleich

zum Vorjahr einem Anstieg um 3,7%. Dabei entfielen 88 000 Eingriffe auf die Anlage eines aortokoronaren Bypasses. Dabei ist die Herz-Lungen-Maschine (HLM) ein zentrales Instrument in der Kardiochirurgie. Wird ein aortokoronarer Bypass gelegt, bei dem ein Vena-saphena-Segment oder ein Arteria-mammaria-Segment eingesetzt wird, kann der Kreislauf des Patienten mithilfe einer HLM aufrecht erhalten werden. Der Einsatz der HLM zieht jedoch auch eine Reihe von physiologischen Veränderungen nach sich, wie die Veränderung des pulsatilen Blutflusses, Vermehrte Scherkräfte, die auf das Blut einwirken und Exposition des Blutes mit unphysiologische Oberflächen (27). Zudem löst die HLM eine Reihe von proinflammatorischen Reaktionen aus, indem es zu einer Aktivierung der humoralen und zellulären Abwehr kommt: Das fibrinolytische System und das Komplementsystem werden aktiviert und damit die Gerinnungskaskade initiiert. Durch Aktivierung des Endothels kommt es zur Zytokinausschüttung mit nachfolgender Thrombozyten- und Leukozytenaktivierung. All diese Faktoren können zu einem Syndrom der systemischen Inflammation (SIRS) führen, das bis zum Multiorganversagen führen kann (28).

Eine Bypass-Operation birgt nicht nur viele Stressfaktoren für den Körper, sondern auch für das Transplantat selbst. Durch Hypoxie, operationsbedingte Traumata, Zytokinstimuli durch die HLM und die veränderten Blutdruckwerte für das transplantierte venöse Ersatzgefäß, wird gerade das neue Gefäß dem Risiko einer Restenose ausgesetzt (29).

Bei der HLM wird das Blut des Patienten meist durch das Schlauchsystem einer Rollenpumpe geleitet. Das Blut wird jedoch nicht nur weitergepumpt, es wird auch oxigeniert, so dass sowohl Herz als auch Lungen ersetzt werden. Die HLM dient zudem als Blutvolumenspeicher und zur Filterung des Blutes von Blutgerinnseln oder Gasbläschen. Die Temperaturregulation des Patienten geschieht durch einen Wärmeübertrager, der meist im Oxygenator enthalten ist, aber auch an unterschiedlichen Stellen des extrakorporalen Blutflusses angesiedelt sein kann.

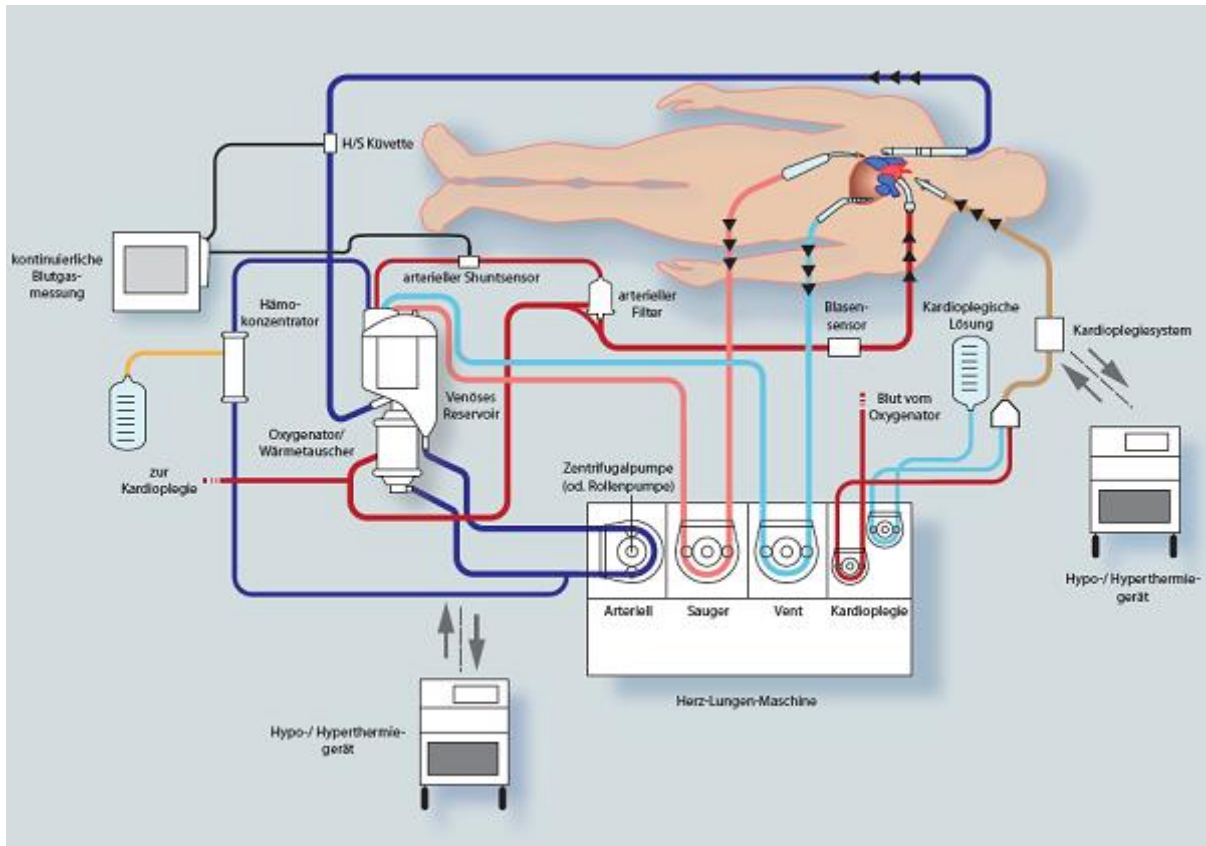


Abbildung 1-1: Schematische Darstellung einer Herz-Lungen Maschine (30).

1.7 Hypothermie

Der menschliche Körper versucht normalerweise unter allen Umständen seine Temperatur konstant bei Werten um 37°C zu halten. Natürlich gibt es genügend inter- und intraindividuelle Unterschiede, so dass der Normwert zumeist mit $35\text{-}37^{\circ}\text{C}$ angegeben wird. Bei Unfällen, Intoxikationen oder externer Kühlung (z.B. bei Beinahertrinken) kann der Körper jedoch auch tiefere Temperaturen aushalten, die von dem „Wunschwert“ 37°C abweichen.

Man unterscheidet bei der Hypothermie in der Regel folgende Hypothermiegrade:

- Die milde Hypothermie liegt zwischen 35°C und 32°C Körpertemperatur und geht mit erhöhtem Metabolismus, Muskelzittern und einer Vasokonstriktion einher. Der Körper versucht das kalte Blut vom zentralen Kern des Körpers fernzuhalten und bildet eine Art Mantel um den Körper aus kaltem Blut, der ein Durchmischen der Blutanteile gering halten soll.

- Zwischen 32°C und 28°C spricht man von moderater Hypothermie, die von einer Erschöpfung aller Organsysteme gekennzeichnet ist und bei der das Kältezittern aufhört und es zu einer Bewusstseinsbeeinträchtigung kommt.
- Zwischen 28°C und 18°C wird von tiefer Hypothermie gesprochen, der mit Bewusstseinsverlust und oftmals mit Herzrhythmusstörungen bis zum Tod einhergehen kann.
- Unter 18°C wird von profunder Hypothermie gesprochen. Lichtstarre Pupillen, Pulslosigkeit und Atemstillstand deuten auf den Tod hin (jedoch: „no one is dead until rewarmed and dead“ (31)) oder führen zum Tod.

Dass akzidentiell hypotherme Patienten klinisch gesehen ein relativ gutes neurologisches Outcome hatten, brachte die Wissenschaft schon früh dazu über eine therapeutische Hypothermie nachzudenken. Biegelow et al. beschrieben bereits 1950 die positiven Effekte der Hypothermie nach Kardiopulmonaler Reanimation (CPR) (32). Seit Beginn der sechziger Jahre wurde auf Empfehlung von Dr. Peter Safar zunehmend eine künstliche Hypothermie in der Intensivmedizin bei reanimierten Patienten eingesetzt.

Als Kontraindikationen für eine systemische hypotherme Therapie werden folgende Parameter angesehen:

- therapieresistente hämodynamische Instabilität
- schwere aktive Blutung
- primäre Koagulopathie
- schwere Sepsis
- Schwangerschaft
- lebensbedrohliche Arrhythmien
- fortgeschrittene maligne Grunderkrankung

1.8 Leukozyten

Leukozyten sind weiße Blutzellen, deren Aufgabe die Immunabwehr ist. Sowohl die Bekämpfung von Körperfremdem, als auch von Körpereigenem wird von den Leukozyten wahrgenommen. Sie spielen eine entscheidende Rolle bei inflammatorischen Ereignissen (33).

Man unterscheidet bei den Leukozyten:

- Granulozyten
 - Neutrophile Granulozyten mit einem Anteil von 50-70% im Blut, die sich in stab- und segmentkernige neutrophile Granulozyten unterscheiden.
 - Eosinophile Granulozyten mit einem Anteil von 2-4% im Blut.
 - Basophile Granulozyten mit einem Anteil von 0,5-1% im Blut.
- Lymphozyten mit einem Anteil von 30% im Blut.
 - B-Lymphozyten und
 - T-Lymphozyten
- Monozyten mit einem Anteil von 2-8% im Blut.

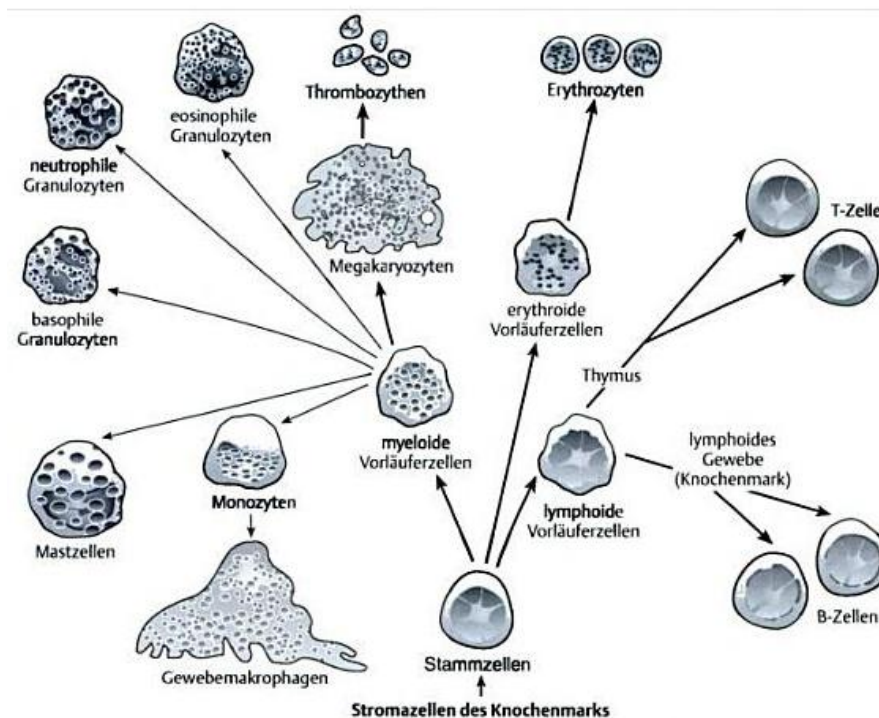


Abbildung 1-2: Das dargestellte Modell zeigt wie aus einer pluripotenten Knochenmarkszelle über die verschiedenen Schritte der Differenzierung die unterschiedlichen Zellreihen entstehen (34).

1.9 Monozyten

Monozyten sind mobile Phagozyten mit einem Durchmesser von 12-20 μm . Der charakteristische große einzelne („monos“) Kern ist meist bohnenförmig. Ihr Entstehungsort ist das Knochenmark, der Hauptspeicherort die rote Milzpulpa. Die Monozytopoese wird z.B. im Fall einer Sepsis durch Lipopolysaccharide (LPS), Tumornekrosefaktor α ($\text{TNF}\alpha$) und γ -Interferon stimuliert (35). Die Lebensdauer der Monozyten beträgt ca. 3 Tage im Blut; nach Ausdifferenzierung leben sie - dann Makrophagen genannt - mehrere Wochen bis Monate im Gewebe. In unterschiedlichen Geweben haben sie im Laufe der Forschungsgeschichte diverse Namen bekommen: Kupffersche Sternzellen in der Leber, Mikrogliazellen im Zentralnervensystem oder Alveolarmakrophagen in der Lunge.

Die Aufgabe der Monozyten besteht in der Phagozytose von körperfremden Strukturen und in der Antigenpräsentation. Sie sezernieren Zytokine wie Interferon α und β , $\text{TNF}\alpha$, Prostaglandine und Leukotriene, Wachstumsfaktoren, Komplementfaktoren und Selektine. Somit sind Monozyten in der Lage entzündliche Prozesse zu triggern. Die im Monozyten enthaltenen Granula beinhalten saure Hydrolasen und Peroxidasen, um phagozytierte Mikroorganismen zu lysieren (36) (37).

Die wichtigsten proinflammatorisch wirksamen Zytokine sind: IL-1, IL-6, IL-8, und $\text{TNF}\alpha$, wobei IL-8 und $\text{TNF}\alpha$ über Chemotaxis Monozyten an den Ort der Inflammation rekrutieren. IL-1 beteiligt sich an der Inflammation, indem es Endothelzellen zur Produktion von E-Selektin anregt und daraufhin die Diapedese von Leukozyten möglich macht (38). IL-6 initiiert u.a. die Produktion von Akute-Phase-Proteine (CRP, Komplement C3, Fibrinogen u.a.) in der Leber.

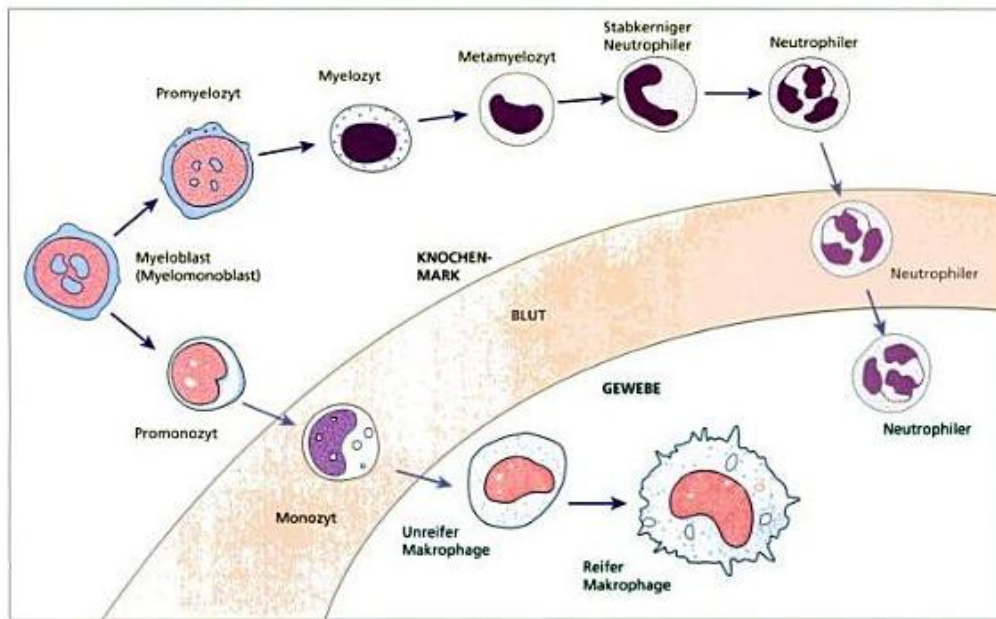


Abbildung 1-3: Bildung der Monozyten und der neutrophilen Granulozyten (39).

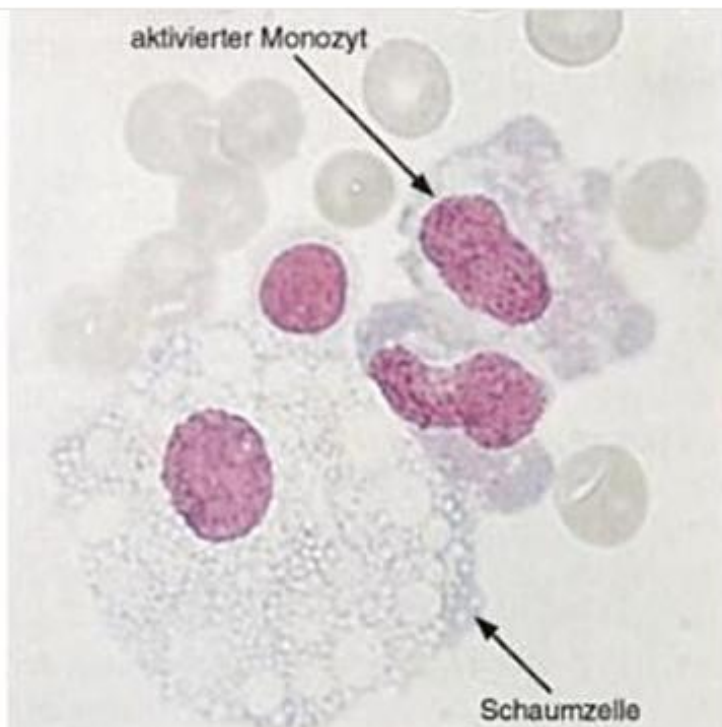


Abbildung 1-4: Wenig aktivierte, von Vakuolen durchsetzte Monozyten und zur Schaumzelle umgewandelter Monozyt (40).

1.10 Leukozytenaktivierung

Auf eine Entzündungssituation reagiert der Organismus mit Aktivierung von Monozyten. Der Monozyt produziert in hohem Maße TNF α , das wiederum die Aufregulation von Adhäsionsmolekülen auf der Endothelzelle bewirkt (41) und die Makrophagen ihrerseits zur Zytokinproduktion (IL-1, IL-6 TNF α) anregt. Durch die Produktion von ICAM-1 (CD54) wird die Diapedese der Leukozyten durch die Endothelwand vermittelt. Dies geschieht über die Mechanismen „rolling“ und „sticking“.

1.10.1 „Rolling“

Im postkapillären Blutstrom mit langsamerer Fließgeschwindigkeit des Blutes in den Venolen aggregieren Erythrozyten leicht und drängen die Leukozyten an den Rand. Dort rollen die Leukozyten langsam an der Endothelwand entlang. Dieser Vorgang wird „rolling“ genannt. An den Endothelwänden befinden sich ausreichend Adhäsine, an denen sich die Leukozyten „festhalten“ können. Nach dem „rolling“ stoßen sie sich wieder von der Wand ab und gelangen wieder zurück in den Blutfluss. Dort angekommen werden die Leukozyten erneut von den Erythrozyten verdrängt. Ist der Leukozyt an der Endothelwand angelangt, bindet er locker an diese Adhäsine und beginnt erneut an der Gefäßoberfläche zu rollen.

Die Endothelwand sezerniert im aktivierten Zustand E und P Selektine (CD 62). Diese „fangen“ die Adhäsionsmoleküle auf den Leukozyten (CD162) und vermitteln so die Rollbewegung, wobei es jedoch nicht zu einer festen Bindung kommt. Somit ist CD162 in Interaktion mit CD62 für die Rollbewegung des Leukozyten verantwortlich.

1.10.2 „Sticking“

Als „sticking“ wird das feste Anheften der Leukozyten an die Endothelwand bezeichnet. Diese Bindung wird durch ICAM-1 und VCAM-1 (die vom Endothel exprimiert werden) und durch die β 2 Einheit der Integrine auf dem Leukozyten, zustande gebracht. Die Integrine bestehen aus der β 2 (CD 18) Untereinheit, die konstant bleibt und dem α -Teil, der aus CD11a (dann LFA1) oder CD11b (dann MAC-1) besteht. Nur durch diese

Bindung kann eine Emigration stattfinden. Binden die Leukozyten an das Endothel, kommt es zu einer Konformationsänderung mit Abflachung der Leukozyten. Diese Formveränderung erleichtert die transzelluläre Migration (42) (43).

Die einzelnen Phasen der Leukozytenmigration

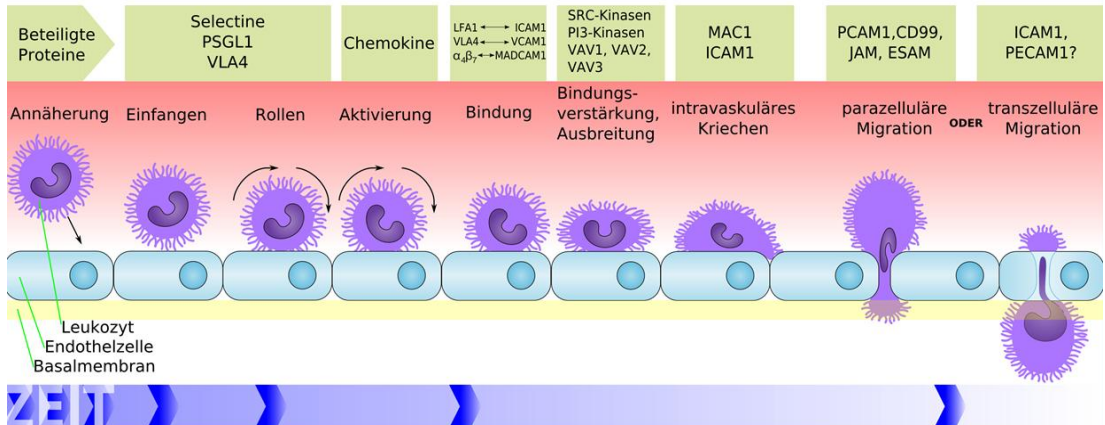


Abbildung 1-5: Die Diapedese der Leukozyten schematisch dargestellt (43).

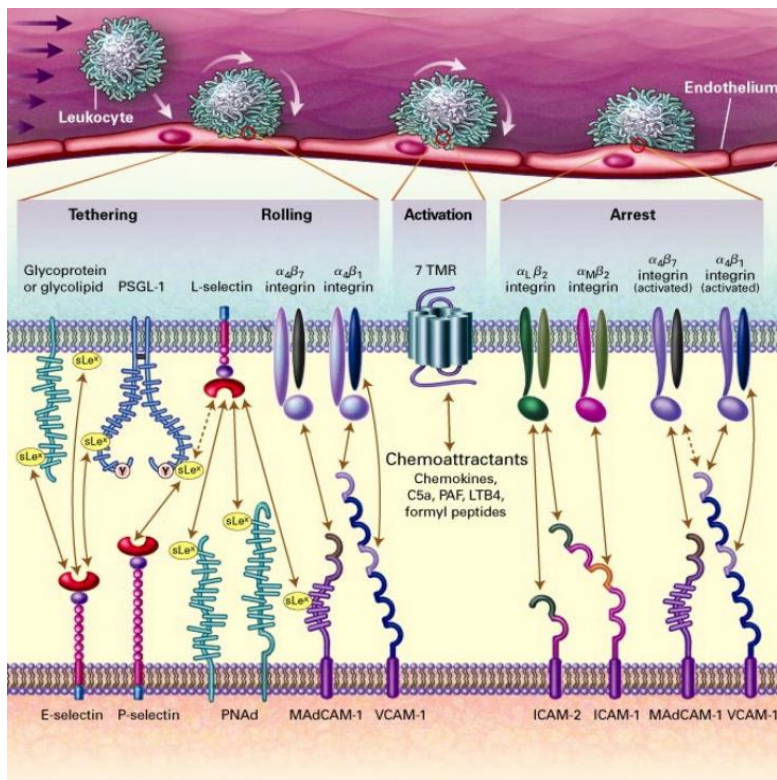


Abbildung 1-6: In dieser Übersichtsabbildung der Leukozytenmigration kann man die Adhäsionsrezeptoren auf Leukozytenoberfläche (Mitte) und Endotheloberfläche (Unten) und deren Interaktionsmöglichkeiten sehen (43).

1.11 Adhäsionsrezeptoren

Die Kommunikation zwischen körpereigenen Zellen kann grundsätzlich über zwei Wege geschehen:

- Lösliche Stoffe, wie Zytokine, die die Interaktion von Zellen und Endothel fördern.
- Direkte Zell zu Zell Kommunikation über Liganden-Rezeptor-Bindung, die durch Oberflächenmoleküle, den sogenannten Adhäsionsmolekülen geregelt wird. Die Adhäsionsmoleküle werden in vier große Gruppen eingeteilt: Selektine, Integrine, Immunglobulin-Superfamilie und Cadherine.

1.11.1 Selektine

Selektine sind membrangebundene Glykoproteine, die entsprechend ihrer Herkunft in L-(Leukozyten), E-(Endothel) und P-(Plättchen und Endothel) Selektin eingeteilt werden. Sie sind für die Kontaktaufnahme zwischen Endothel des Blutgefäßes und dem Leukozyten zuständig, damit der Leukozyt dort „rollt“ (44) (45).

Sowohl Endothelzellen als auch Thrombozyten synthetisieren P-Selektine. In den Endothelzellen wird das P-Selektin in den Weibel-Palade-Körperchen gespeichert. Die Thrombozyten speichern P-Selektin in ihren α -Granula. Werden die Thrombozyten oder Endothelzellen durch Mediatoren wie Interleukine aktiviert, dann kommt es zu einer vermehrten Expression von P-Selektin auf der Zelloberfläche.

Selektine	Expression	Liganden
E-Selektin (CD62E)	aktivierte Endothelzellen	ESL-1 PSGL-1 Sialyl Lewis X Monozyten Neutrophile Granulozyten Lymphozyten
P-Selektin (CD62P)	aktivierte Thrombozyten und Endothelzellen	PSGL-1

L-Selektin (CD62L)	alle Leukozyten	GlyCAM CD34 Aktivierte Endothelzellen
PSGL-1 (CD162)	Neutrophile Lymphozyten Monozyten Thrombozyten	CD62P

1.11.2 Integrine

Die Familie der Integrine hat eine große Variabilität. Ihre Aufgabe besteht v.a. in der Signalübertragung zwischen intra- und extrazellulärem Raum (46). Die Moleküle werden auf unterschiedlichsten Geweben exprimiert. Die von Leukozyten exprimierten Integrine bestehen aus mit einander verbundenen transmembranösen α und β Untereinheiten. Die β -Kette, die auch als CD18 bezeichnet wird, kommt auf allen Integrinen vor, die α -Kette ist spezifisch für das jeweilige Integrin. Einige Integrine wie das MAC-1 (CD11b/CD18) werden auf Monozyten und Granulozyten exprimiert, andere wie LFA-1 (CD11a/CD18) kommen auf allen Leukozyten vor. Die Aufgabe des MAC-1 besteht in der Signaltransduktion (47) und der festen Anheftung der Leukozyten an die Endothelwand (44) (48). Die Integrine binden nach Aktivierung der exprimierenden Zellen affin an die Oberflächenliganden und binden so an die Gefäßwand (49).

Integrine	Untereinheiten	Vorkommen	Liganden
VLA (Very late appearing Antigen 1-6)	$\alpha 1- 6\beta 1$	T-Lymphozyten	Laminin Kollagen Fibronektin VCAM-1
LFA-1 (CD11a/CD18)	$\alpha L\beta 2$	alle Leukozyten	ICAM-1 ICAM-2
MAC-1	$\alpha M\beta 2$	Monozyten	ICAM-1

(CD11b/CD18)		Neutrophile Granulozyten	iC3b Fibrinogen Faktor X
p150 (CD11c/CD61)	$\alpha\chi\beta 2$	Gewebemakrophagen	Fibrinogen iC3b
GPIIb/IIIa (CD41/CD61)	$\alpha\text{IIb}\beta 3$	Thrombozyten Megakaryozyten	Fibrinogen Vitronektin Fibronektin vWF
Vitronektin- Rezeptor (CD51)	$\alpha\upsilon\beta 3$	Thrombozyten	Vitronektin Fibronektin vWF Thrombospondin Osteopoetin

1.11.3 Immunglobulin Superfamilie

Auch Adhäsionsmoleküle dieser Gruppe sind transmembranöse Glykoproteine. Sie werden durch eine Immunglobulin-ähnliche Faltungsdomäne klassifiziert. Diese Familie ist sehr groß. Sie sind v.a. für die transendotheliale Migration von Leukozyten zuständig. Ihre wichtigsten Vertreter sind:

Immunglobulin Superfamilie	Vorkommen	Ligand
ICAM-1 (CD54) (Interzelluläres Adhäsionsmolekül)	Endothelzellen Epithelzellen Tumorzellen	LFA1 MAC-1
VCAM1 (vaskuläres Adhäsionsmolekül)	Endothelzellen Makrophagen	VLA4

PECAM (CD31)	Endothelzellen Thrombozyten Neutrophile Granulozyten Monozyten	PECAM1 Vitronektin-Rezeptor
--------------	---	--------------------------------

1.11.4 Cadherine

Die Cadherine sind eine große Gruppe von über 300 verschiedenen transmembranösen Glykoproteinen. Sie kommen v.a. in Desmosomen und Adherens Junction vor. Ihre Aufgabe besteht vor allem in der Aufrechterhaltung der Zell – Zell – Kontakte und der Stabilität von Gewebe (50). Da sie nicht Gegenstand dieser Arbeit sind werden sie im Weiteren nicht näher beschrieben.

1.12 Antigene

Oberflächenmerkmale auf Zellen wurden 1981 nach internationaler Übereinkunft in verschiedene Gruppen, die sogenannten „Cluster of Differentiation“ - abgekürzt CD - eingeteilt. Zumeist handelt es sich bei den Oberflächenmerkmalen um membrangebundene Glykoproteine. Oftmals werden sie zellspezifisch exprimiert. Sie können Rezeptor- oder Signalfunktion haben und bei der Kommunikation zwischen Zellen vermitteln.

1.12.1 CD45

Das Antigen CD45 ist ein membranständiges Protein auf der Oberfläche von Leukozyten. Es wird von nahezu allen Zellen des hämatopoetischen Systems exprimiert außer von den Erythrozyten. Es werden hierbei jedoch zelltypabhängig unterschiedliche Splice- und Glykosylierungsvarianten gebildet, die sich ausschließlich in der extrazellulären Domäne unterscheiden.

Der Antikörper CD45 bindet membranständig an das Antigen CD45, daher wird er auch als Pan-Leukozytenmarker bezeichnet. Makrophagen und Histozyten zeigen auf den Antikörper ein variables Reaktionsmuster. Neutrophile Granulozyten werden in der Regel nicht markiert, ebenso sind Plasmazellen negativ für CD45 (51).

CD Antigen	Alternative Namen	Zelluläre Expression	Molekulares Gewicht (kDa)
CD45	Leukocyte common antigen (LCA), T200, B220	Fast alle hämatopoetischen Zellen	180-240 (multiple Isoformen)

1.12.2 CD11b

MAC-1 ist ein Integrin, ein Molekül, das auf Monozyten, neutrophilen Granulozyten und natürlichen Killerzellen (NK) und einigen Lymphozyten exprimiert wird. Es besteht aus einer α - (CD11b) und einer β - (CD18) Untereinheit. Seine Aufgabe besteht in der Vermittlung immunologischer Vorgänge, in der Blutgerinnung und in der Mitwirkung an inflammatorischen Prozessen. Hierzu wurden eine Vielzahl von Liganden festgestellt: ICAM-1, Heparin, Fibronectin, Kollagen, bakterielle und fugale Epitope und viele mehr.

MAC-1 hat vier große Anknüpfungspunkte:

1. MAC-1 Bindung an Fibrinogen:

Die Bindung von MAC-1 an ein an der Endothelwand abgelagertes Fibrinogen führt zur Monozytenadhäsion, die durch ICAM-1 verstärkt werden kann. Aber auch Fibrinogen das an Thrombozyten angelagert ist, wird gebunden.

2. MAC-1 Bindung an Faktoren der Gerinnungskaskade:

Durch die Bindung von MAC-1 an Faktor X wird dieser in einen aktivierten Zustand versetzt und startet so die Gerinnungskaskade, was die prokoagulatorische Fähigkeit von MAC-1 beweist.

3. MAC-1 Bindung an Faktoren des Komplementsystems:

Durch die Anlagerung von MAC-1 an iC3b ist das Integrin auch an der Phagozytose von Bakterien und Pilzen beteiligt.

4. MAC-1 Bindung an Oberflächenmarker:

MAC-1 bindet an ICAM-1 und ist so ein Hauptfaktor für die Leukozytenadhäsion an die Endothelwand (52).

CD Antigen	Alternative Namen	Zelluläre Expression	Molekulares Gewicht (kDa)
CD11b	Mac-1 Macrophage-1-antigen Complement Receptor 3	Monozyten NK Zellen Leukozyten	170

1.12.3 CD54

ICAM-1 ist ein Adhäsionsrezeptor der Immunglobulin-Superfamilie, der auf Endothelzellen, Leukozyten, Fibroblasten und Epithelzellen vorkommt. Durch die Aktivierung von ICAM-1 durch IL-1 oder TNF α (Zytokine) wird ICAM-1 verstärkt exprimiert und bewirkt durch Bindung der β 2-Integrine die Leukozytenadhäsion. Selbst ist ICAM-1 in der Lage IL-1 und TNF α zu inhibieren. Nach Bindung an LFA-1 und MAC-1 wird die Leukozytenadhäsion an die Endothelzellen vermittelt und die Transmigration ins Gewebe ermöglicht (53) (54) (44).

CD Antigen	Alternative Namen	Zelluläre Expression	Molekulares Gewicht (kDa)
CD54	ICAM-1 Intercellular adhesion molecule 1	Hämatopoetische und nicht-hämatopoetische Zellen	75-115

1.12.4 CD162

CD162 gehört zu der Gruppe der Selektine und wird von Thrombozyten, neutrophilen Granulozyten, Monozyten und den meisten Lymphozyten (einschließlich NK) exprimiert. CD162, auch bekannt unter dem beschreibenden Namen "P-Selektin Glycoprotein Ligand-1" ist ein transmembranöses Glycoprotein, das an alle drei Formen des CD62 bindet (E-, P- und L-Selektin). Durch die Bindung von CD162 an CD62P wird das Rollen der Leukozyten an der luminalen Oberfläche des aktivierten Endothels initiiert. Zudem besteht eine Interaktion zwischen Thrombozyten und Leukozyten (55). CD162 ist Hauptfaktor für die Bildung von Monozyten-Thrombozyten-Aggregaten.

CD Antigen	Alternative Namen	Zelluläre Expression	Molekulares Gewicht (kDa)
CD162	PSGL-1 P-Selektin Glycoprotein Ligand-1	Neutrophile Granulozyten Lymphozyten Monozyten Thrombozyten	120

1.13 Hämostase

Die Hämostase wird in zwei Phasen eingeteilt (56):

1. Primäre Hämostase
 - Vasokonstriktion
 - Thrombozytenadhäsion
 - Thrombozytenaggregation
2. Sekundäre Hämostase
 - Blutgerinnung

1.13.1 Primäre Hämostase

Als Hämostase wird die Bildung eines Gefäßwandthrombus genannt, der zur Blutstillung dient. Über Vasokonstriktion und Thromboxanexpression wird eine Verringerung des Blutflusses bewirkt. Thrombozyten werden aktiviert und adhären an die Endothelwand um nachfolgend über Fibrinpolymere einen Gefäßverschluss zu bewirken. Von der verletzten Endothelwand werden u.a. Kollagen und Fibronectin exprimiert, die an den Thrombozyten adhären. Die Adhäsion wird über den von Willebrand Faktor (vWF) vermittelt, der mit Fibronectin und Laminin eine Verbindung zum thrombozytären GPIb/IX Rezeptor herstellt. Durch die Thrombozytenadhäsion wird die Thrombozytenaktivierung ausgelöst. Thromboxan A₂, ADP, Serotonin und andere Stoffe werden ausgeschüttet, die die Vasokonstriktion induzieren. Zudem kommt es zur Erhöhung der GPIIb/IIIa Rezeptoren an der Thrombozytenoberfläche. Und als dritter Punkt der Aktivierung folgt eine Konformitätsänderung des Thrombozyten mit Pseudopodienbildung. Die Thrombozytenaggregation erfolgt nach Aktivierung durch die Konformitätsänderung des Thrombozyten, indem es zu Thrombozyten-

Thrombozyten Vernetzung („weißer Thrombus“) kommt. Quervernetzungen der Thrombozyten mit Fibrinogen mittels vWF über den GPIIb/IIIa Rezeptor lassen einen „roten Thrombus“ entstehen.

1.13.2 Sekundäre Hämostase

Die sekundäre Hämostase läuft zeitgleich mit der primären Hämostase ab.

Das Komplementsystem ist ein kaskadenartiges System aus vielen unterschiedlichen Proteinen, die auf Zelloberflächen und im Blut vorkommen und Fremdstoffe inaktivieren können (ob nun mit oder ohne Einsatz von Antikörpern). Das Komplementsystem besteht aus 9 einzelnen Komplementen (C1, C2, C3 usw.), die kaskadenartig nacheinander aktiviert werden.

Es gibt einen klassischen Weg des Systems, der mit Antigen-Antikörper Reaktion arbeitet und einen alternativen Weg, der durch bakterielle Lipopolysaccharide (LPS), Immunkomplexe und Kontakt zu artifiziellen Membranen ausgelöst wird. Die wichtigsten Vertreter des Komplementsystems sind die Faktoren C3b und C5a. Nach Aktivierung des Faktors C3 mündet der klassische und der alternative Weg in einer gemeinsamen Endstrecke. Durch C3a und C5a wird eine Degranulation von Granulozyten und Makrophagen und damit die Freisetzung von lysosomalen Enzymen (Elastasen und Kollagenasen) initiiert, was zu einer endothelialen Schädigung und zu einer Akkumulationsneigung von aktivierten Leukozyten führen kann. Zudem ist C3e für die Ausschüttung reifer Leukozyten aus dem Knochenmark zuständig (57) (58).

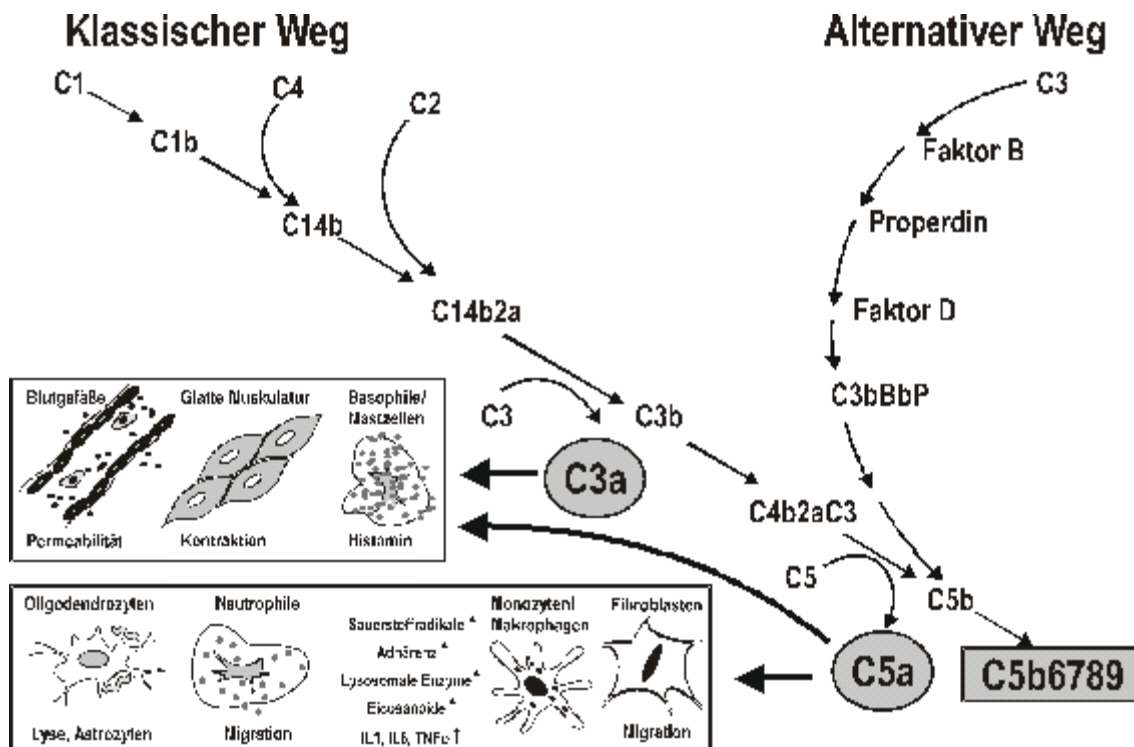


Abbildung 1-7: Vereinfachte Komplementkaskade und Wirkung der Anaphylatoxine C3a und C5a auf Zellen und Gewebe. Blutgefäße, glatte Muskulatur, Mastzellen und basophile Granulozyten reagieren auf C3a und C5a. Oligodendrozyten, neutrophile Granulozyten, Monozyten und Fibroblasten reagieren vorrangig auf C5a (59).

1.14 Interaktion zwischen Leukozyten und Thrombozyten

Die Interaktion zwischen Leukozyten und Thrombozyten beruht auf einer multifaktoriellen Interaktion. Sowohl Entzündungsgeschehen als auch Trauma vermögen eine Thrombozytenaktivierung nach sich zu ziehen. P-Selektin wird vom aktivierten Thrombozyten aus den α -Granula freigesetzt und vermittelt über die Interaktion mit PSGL-1 (CD162) die Adhäsion des Thrombozyten an den Monozyten, der daraufhin Entzündungsmediatoren freisetzt (60). Dabei kann der Monozyt sowohl an die Endothelwand, als auch an den Thrombozyten adhären (61). Thrombozyten-Monozyten-Bindung entsteht aber auch durch Fibrinogen, welches primär ein Ligand für den GPIIb/IIIa Rezeptor auf Thrombozyten ist, aber auch MAC-1 bindet.

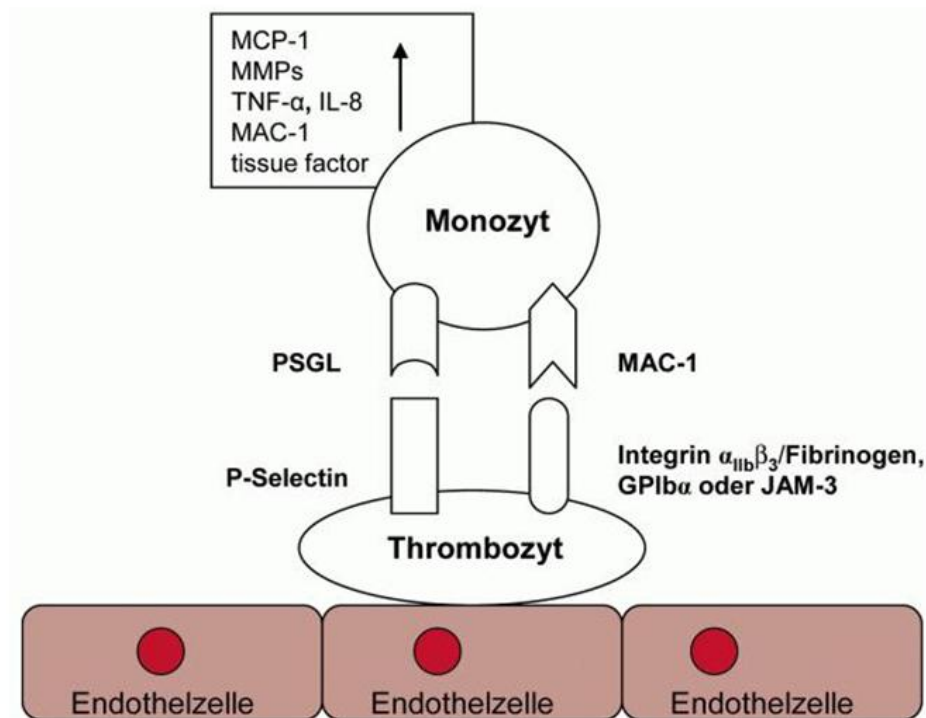


Abbildung 1-8: Interaktion zwischen Thrombozyt und Monozyt (62).

1.15 Glycoprotein IIb/IIIa Antagonisten

Es gibt verschiedene GPIIb/IIIa Rezeptorinhibitoren: Eptifibatid, Tirofiban und Abciximab. Sie gehören alle zu der Klasse der Fibrinogenrezeptorantagonisten, die im Gegensatz zu ASS nicht die Thrombozytenaktivierung verhindern, sondern die Aggregation der Plättchen selbst. Tirofiban, Eptifibatid und Abciximab werden parenteral verabreicht. Auf der Thrombozyten-Membran ist der GPIIb/IIIa Rezeptor verankert, der als transmembranöses Glycoprotein die Funktion eines Adhäsionsrezeptors (Integrin) hat. Aufgebaut ist der GPIIb/IIIa Rezeptor aus einer α_{IIb} -Kette, die vier Kalziumionenbindungsstellen und eine Fibrinogenbindungsstelle hat, und einer β_3 -Kette, die zwei Fibrinogenbindungsstellen hat, an welche die RGD-Sequenz (Arg-Gly-Asp) bindet. Der GPIIb/IIIa Rezeptor kann durch ADP, Thrombin, Kollagen, Serotonin Thromboxan A2 oder Epinephrin aktiviert werden. Nach dieser Aktivierung ist eine Erkennung von RGD Sequenzen möglich. Diese sind z.B. vWF, Fibronectin oder Vitronectin, die nach Plaqueruptur freigesetzt werden. Eine Konformationsänderung des GPIIb/IIIa-Rezeptors auf dem Thrombozyten folgt, der die

Voraussetzung für die Thrombozytenadhäsion ist. Nun kann sich Fibrinogen an den GPIIb/IIIa-Rezeptor anlagern. Da Fibrinogen an zwei GPIIb/IIIa-Rezeptorstellen binden kann, wird eine Brücke zwischen zwei Thrombozyten gebildet und die Thrombozyten können sich zu Thromben vernetzen. Die GPIIb/IIIa Antagonisten docken nun irreversibel (Abciximab) oder reversibel (Eptifibatid und Tirofiban) an den Rezeptor an und verhindern, dass Fibrinogen an den Fibrinogen-Rezeptor der Thrombozyten binden kann. Es wird die Plättchen-Plättchen Interaktion gestört, die für die Ausbildung eines Thrombus notwendig ist. Allen GPIIb/IIIa Antagonisten ist gemeinsam, dass eine Bindung an den aktivierten und den ruhenden Thrombozyten gelingt (63). Die GPIIb/IIIa-Rezeptorantagonisten haben deshalb nicht nur die Fähigkeit die Thrombozytenaggregation zu hemmen, sondern vermögen auch eine Plättchendisaggregation herbeizuführen (64). Ihren klinischen Einsatz finden diese Substanzen derzeit beim ACS und bei der Durchführung einer PCI. Obwohl Abciximab bessere Langzeitergebnisse auf die Verhinderung eines Myokardinfarktes zeigt, ist es von Vorteil ein kurz wirksames Mittel bei PCI einzusetzen, denn die Thrombozytenhemmende Wirkung von Abciximab hält in abgeschwächter Form 2-3 Tage an, während Tirofiban und Eptifibatid mit 20-100 Minuten Halbwertszeit eine deutlich bessere Steuerbarkeit aufweisen.

Die Deutsche Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung e.V. (65) hat die Indikationen folgendermaßen empfohlen:

„Invasive Behandlung: Das 30-Tage-Risiko für Tod und Myokardinfarkt ist niedriger, wenn Patienten vor der PCI GPIIb/IIIa-Inhibitoren erhalten und die Therapie während der Intervention fortgesetzt wird. Vor der Angiographie („Upstream-Therapie“) kommen nur Eptifibatid oder Tirofiban infrage, während für Abciximab die beste Datenlage für die Gabe nach der Angiographie als Vorbereitung zur PCI existiert.

Koronare Bypassoperation: GPIIb/IIIa-Inhibitoren sollten bei Bypass-Operationen abgesetzt werden. Tirofiban und Eptifibatid haben eine so kurze Halbwertszeit, dass sich die Thrombozytenfunktion bis zum Ende der Operation wieder erholt. Abciximab hat eine längere Halbwertszeit und muss früher abgesetzt werden.“

1.16 Tirofiban

Tirofiban ist ein Sulfonamid, das auch unter dem Namen Aggrastat[®] vertrieben wird. Es ist ein Plättchenaggregationshemmer, der die Glycoprotein IIb/IIIa Rezeptoren der Thrombozyten reversibel hemmt und bei akutem Koronarsyndrom eingesetzt wird. Es imitiert die oberflächlichen Ladungseinheiten der RGD Sequenz, d.h. einer Arginin-Glycin-Asparaginsäure-Sequenz, die auf Fibrinogen, vWF und Fibronectin vorkommt und eine Erkennungsfunktion für den Thrombozyten besitzt. Durch die Kopplung von Tirofiban an den Thrombozyten wird die Bindung von Fibrinogen an Thrombozyten und damit deren Quervernetzung beziehungsweise die Thrombusbildung verhindert, die nach einer Plaqueruptur in einem arteriosklerotisch veränderten Gefäß eingeleitet wird. Die Plättchenaggregationshemmung beginnt bereits nach wenigen Minuten, ist dosisabhängig und ist ca. 6 Stunden nach Infusionsende wieder verschwunden. Die Applikation erfolgt parenteral und die Plasmahalbwertszeit liegt zwischen 1,4 und 1,8 Stunden. In drei großen klinischen Studien (PRISM; PRISM-PLUS; RESTORE) hat Tirofiban seine Wirksamkeit als Thrombozytenaggregationshemmer belegen können (66) (67) (68).

1.17 Eptifibatid

Eptifibatid ist ein zyklisches Heptapeptid, das auch unter dem Namen Integrilin[®] vertrieben wird. Es bindet kompetitiv im Bereich der RGD-Erkennungsregion des GPIIb/IIIa-Rezeptors (im Vergleich zu Tirofiban, das die oberflächlichen Ladungseinheiten der RGD Sequenz nur imitiert) und verhindert damit die Thrombozytenaggregation. Die Halbwertszeit ist deutlich kürzer als die von Tirofiban und beträgt ca. 10-15Minuten (anstelle von ca. 100 Minuten). Mehrere große klinische Studien wie PURSUIT und IMPACT-II belegten die Wirksamkeit von Eptifibatid als Thrombozytenaggregations-Inhibitor (69) (70) (71).

1.18 Zielsetzung der Studie

Durch die Bestimmung der Expression der monozytären Adhäsionsmoleküle CD11b, CD54 und CD162 wollten wir folgende Themen untersuchen:

- Erstens die Wirkung der Hypothermie als Inflammationshemmung.
- Zweitens sollte der Einfluss einer verstärkten Fremdkörperaktivierung bestimmt werden, um eine Einschätzung der HLM- und katheterinduzierten Monozytenaktivierung zu bekommen.
- Drittens sollte die Einflussgrößen der GPIIb/IIIa Rezeptorantagonisten im Bezug auf die Monozytenaktivierung untersucht werden.

Von gesunden Männern entnahmen wir Frischblut und inkubierten es mit NaCl oder mit einem der GPIIb/IIIa Rezeptorantagonisten Tirofiban oder Eptifibatid. In einem modifizierten Chandler Loop Modell (LOOP) konnten wir sowohl einen Blutfluss simulieren, als auch eine Temperatursensibilität der Parameter bestimmen. Als Vergleich verwendeten wir einen konventionellen Versuchsaufbau im Reagenzglas (STASE). Durchflußzytometrisch wurde die Aktivität der Monozyten anhand der Adhäsionsmoleküle CD11b, CD54 und CD162 gemessen.

2 Material und Methoden

2.1 Patienten und Blutentnahme

Die vorliegenden Untersuchungen wurden an der Medizinischen Klinik der Eberhard Karls Universität Tübingen in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie durchgeführt. Die Patienten willigten nach Aufklärung in die Studie in mündlicher und schriftlicher Form ein. Die Untersuchung wurde durch die Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen genehmigt. Ethikkommissionsnummer: 65/2002V.

Das Patientenkollektiv bestand insgesamt aus 16 gesunden, männlichen Probanden. Ausschlusskriterien waren die Einnahme von Medikamenten zur Zeit der Blutentnahme und das Bestehen einer akuten oder chronischen Krankheit.

	STASE	LOOP
Anzahl der Probanden	11	6
Alter der Probanden Mittelwert (Standardabweichung)	28,7 (4,2)	26,5 (5,7)

Die Blutentnahme erfolgte so schonend wie möglich. Nach kurzer Stauung des Armes wurde mittels einer Nadel peripher venöses Blut entnommen. Anschließend wurden die ersten 3 ml Blut verworfen. Es wurden Monovetten mit 4,5 ml bzw. 9 ml Inhalt ohne Präparierung benutzt. Das entnommene Blut wurde mit Heparin versetzt (3 IE/ml) und sofort zu den Versuchen verwendet um eine Aktivierung des Gerinnungssystems zu vermeiden. Die Versuche fanden an unterschiedlichen Tagen direkt nach Blutentnahme statt. Im Anschluss an die Versuche wurde binnen 30-60 Minuten die durchflußzytometrische Bestimmung der Adhäsionsrezeptoren durchgeführt.

2.2 Untersuchungsmethoden

Zwei verschiedene Behandlungsarten des Blutes wurden unterschieden:

STASE:

Bei STASE inkubierte das Gemisch aus Blut und Heparin in Dunkelheit und Ruhe bei 3 verschiedenen Temperaturen 18°C, 28°C und 36°C, um einen DHCA (deep hypothermic circulation arrest) zu untersuchen.

LOOP:

Bei LOOP rotierte das Blutgemisch in Plastikschräuchen durch ein Wasserbad mit denselben 3 Temperaturen (Chandler-Modell), um eine extrakorporale Zirkulation zu simulieren.

2.2.1 Inkubationsprotokoll „STASE“

Bei diesem Versuch wurden 11 Probanden eingeschlossen.

- Das heparinisierte EDTA-Blut eines Probanden wurde in Reagenzgläser gefüllt und mit CD 45 und jeweils einem anderen Antikörper (CD11b, CD54, CD162) versetzt.
- Zugegeben wurde zu der Probe jeweils ein Medikament: Tirofiban (150ng/ml) oder Eptifibatid (2,5µg/ml).
- Zur Kontroll- und Vergleichsmessung wurde einer Probe NaCl zugesetzt.
- Nach dem Vortexen der Probe wurde das Gemisch 30 Minuten in Dunkelheit inkubiert. Dies geschah bei den Temperaturen 18°C und 36°C in einem Probentemperaturgerät (PTR).
- Mit 1 ml der 1:10 verdünnter Lyselösung wurde die Probe lysiert.
- Nach erneutem Vortexen folgte eine weitere Inkubation für 10 Minuten.
- Die Probe wurde in der Zentrifuge bei 1550 Umdrehungen bei Raumtemperatur für 10 min belassen und der Überstand (also der komplette Probeninhalt bis auf das Pellet) mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt.
- Es folgte das erneute Vortexen des Pellets und Zugabe von 0,5 ml PBS-Puffer.
- Nach Zentrifugation und dem nochmaligen Absaugen bis auf das Pellet wurde die Probe durchflußzytometrisch untersucht.

2.2.2 Inkubationsprotokoll „LOOP“

Bei diesem Versuch wurden 6 Probanden eingeschlossen.

- Je 20 ml des mit EDTA heparinisierten Blutes eines Probanden wurde mit einem der Medikamente versetzt: Tirofiban (150ng/ml), Eptifibatid (2,5µg/ml) oder NaCl
- Das Blutgemisch wurde in einen Schlauch gefüllt und 30 min im Wasserbad der Chandler-Loop-Apparatur bewegt (mit 15 Umdrehungen pro Minute). Dies geschah bei den Temperaturen 18°C, 28°C und 36°C.
- Anschließend wurde das aufbereitete Blut in Reagenzgläser bzw. Eppendorfgefäße gefüllt und in das Proben temperaturgerät gegeben.
- Im PTR wurden die Proben für 10 Minuten bei 18°C, 28°C und 36°C inkubiert.
- Die Proben wurden anschließend jeweils mit CD 45 und einem der anderen AK (CD11b, CD54, CD162) versetzt.
- Nach dem Vortexen der Probe wurde das Gemisch 20 Minuten in der Dunkelheit inkubiert bei den Temperaturen 18°C, 28°C und 36°C.
- Mit 1 ml der 1:10 verdünnten Lyselösung wurde die Probe lysiert.
- Es folgte das erneute Vortexen der Proben und die weitere Inkubation für 10 Minuten in Dunkelheit bei den entsprechenden Temperaturen.
- Die Proben wurden bei 1550 Umdrehungen mit den Temperaturen 18°C, 28°C und 36°C zentrifugiert.
- Nach 10 Minuten Inkubationszeit wurde der Überstand (also alles bis auf das Pellet) mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt.
- Das Pellet wurde gevortext und mit 0,5 ml PBS Puffer versetzt.
- Nach einer erneuten Zentrifugation und dem nochmaligen Absaugen bis auf das Pellet wurde die Probe durchflußzytometrisch untersucht.

2.3 Das modifizierte Chandler-Loop-Modell

Mithilfe dieses Gerätes waren wir in der Lage eine extrakorporale Blutzirkulation zu simulieren, indem 20 ml vollheparinisiertes Blut in PVC-Schläuche mit 3/8“ Durchmesser, 3/32“ Wandstärke und 50 cm Länge gefüllt wurde und fest verschlossen für 30 Minuten in einem gleichmäßig temperierten Wasserbad bewegt wurde. Die Temperaturen können bei diesem modifizierten „Chandler Loop“ frei gewählt werden. In unserem Fall lagen Sie bei 18°C, 28°C und 36°C. Die Schläuche befanden sich zu ca. 80 % im Wasser und drehten bei einer Geschwindigkeit von 15 Umdrehungen in der Minute um den menschlichen Blutfluss zu imitieren. Durch das Eigengewicht des Blutes wurde dieses auch bei der Rotation durch die Pumpe ständig unter Wasser gehalten.

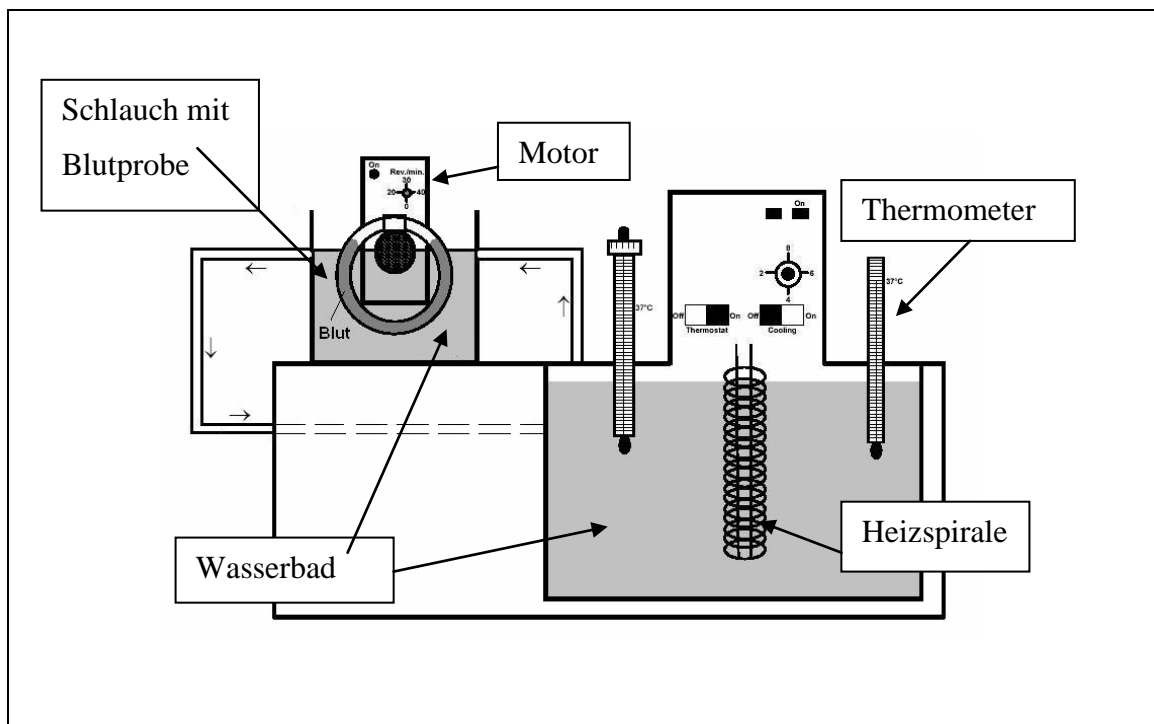


Abbildung 2-1: Modifiziertes Chandler-Loop: (Tübinger-Loop-Modell): links sieht man den Schlauch mit Blut gefüllt im Wasserbad, dieses kann durch die Wasserzuleitung rechts auf der gewünschten Temperatur gehalten werden. Über den Motor wird der Schlauch in Rotation versetzt.

2.4 Probentemperaturgerät (PTR)

Dieses Gerät beinhaltet zehn einzeln ansteuerbare Metallblocks, in denen die Temperatur jeweils gesondert geregelt werden kann. In die Metallblocks können jeweils 8 Eppendorf -Tubes eingeführt werden. Bei den Versuchsaufbauten wurden die Proben mit fixen Temperaturen von 18°C, 28°C und 36°C inkubiert.

Das PTR-Gerät ist eine Konstruktion der Sektion für Medizinische Werkstoffkunde & Technologie (MWT) des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde (ZZMK) der Universitätsklinik Tübingen.



Abbildung 2-2: Das PTR-Gerät (Probentemperaturgerät) des Zentrums für Zahn- Mund und Kieferheilkunde (ZZMK) der Universitätsklinik Tübingen (Design by Wedenig).

2.5 Durchflusszytometer

Das Durchflusszytometer ermöglicht ein optisches Verfahren um die Blutzellen innerhalb eines Mediums voneinander unterscheiden zu können. Durch die Firma Becton-Dickinson wurde der Ausdruck "FACS" geprägt, der für Fluorescence Activated Cell Sorting steht. Das Durchflusszytometer besitzt eine Messkammer (Flow Cell), durch die die Zellen einzeln hindurch gleiten. Ein Laserstrahl, der auf eine Zelle trifft, wird abgelenkt. Je größer eine Zelle ist und je mehr Strukturen in ihrem Inneren vorliegen, desto größer ist das entstehende Streulicht (light scattern). Die Zelle streut das Licht in verschiedene Richtungen. Man erhält, je nachdem in welchem Winkel man das Streulicht misst, unterschiedliche Informationen.

Man unterscheidet ein Vorwärtsstreulicht von einem Seitwärtsstreulicht:

- Beim Vorwärtsstreulicht (Forward Light Scatter oder Low Angle Scatter) verursachen große Zellen ein großes und kleine Zellen ein kleines Vorwärtsstreulichtsignal.
- Beim Seitwärtsstreulicht (Side Scatter, Orthogonal Scatter oder Right Angle Scatter) wird die Granulierung der Zellen gemessen.

Mittels beider Verfahren kann man nun Größe und Granularität der Zellen unterscheiden. Ein Leukozyt kann also als Lymphozyt (kleine Zelle, kaum Granula), als Monozyt (große Zelle, kaum Granula) oder als Granulozyt (große Zelle, viele Granula) identifiziert werden. Bevor die weißen Blutkörperchen im Durchflusszytometer gemessen werden können, müssen mithilfe der „Lyse-Lösung“ (FACS Lysin Solution) die roten Blutkörperchen zerstört werden.

In einem Dot-Plot, also einer graphischen Darstellung der Streulicht-Messergebnisse, wird das Vorwärtsstreulicht auf der x-Achse und das Seitwärtsstreulicht auf der y-Achse aufgetragen. Ein dargestellter Punkt steht für eine Zelle, die das Gerät passiert. Zudem ist das Durchflusszytometer in der Lage Fluoreszenzlicht zu messen. Anhand von Fluoreszenz-Markierungen mit monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern, die gegen bestimmte Oberflächenproteine (z.B. Proteine der CD-Klassifizierung) gerichtet sind, kann nun eine Oberflächenstruktur auf einer Zelle gesondert markiert und dargestellt werden. Diese Markierung kann mittels eines FITC-gekoppelten Antikörpers oder eines PE-gekoppelten Antikörpers erfolgen, wobei FITC (Fluoreszein-Isothiocyanat) ein grün fluoreszierendes und PE (=Phycoerythrin) ein gelbrot fluoreszierendes Molekül ist (72) (73). Der Leukozytenmarker CD45 (FITC) wurde in dieser Arbeit verwendet um die Leukozyten zu identifizieren. Die (PE) Antikörper (CD11b, CD54, CD162) konnten dann quantitativ dargestellt werden. Durch Einsatz von verschiedenfarbigen Lasern und Filtern konnte die Anzahl der einsetzbaren Farbstoffe pro Messung und damit die Informationsdichte erhöht werden. Die Farbstoffmenge ist dabei proportional der Anzahl der Bindungsstellen. Die Wellenlänge des Argonlasers von 488nm regt beide Fluoreszenzfarbstoffe an, so dass eine Messung des von den Zellen emittierten Lichtes innerhalb eines Durchganges möglich ist. Durch das so genannte „gating“, einer flächenhaften Einengung der Datenhaufen im Dot Plot am Computer, können

Zellpopulationen voneinander getrennt und somit der statistischen Auswertung zugeführt werden (72) (73).

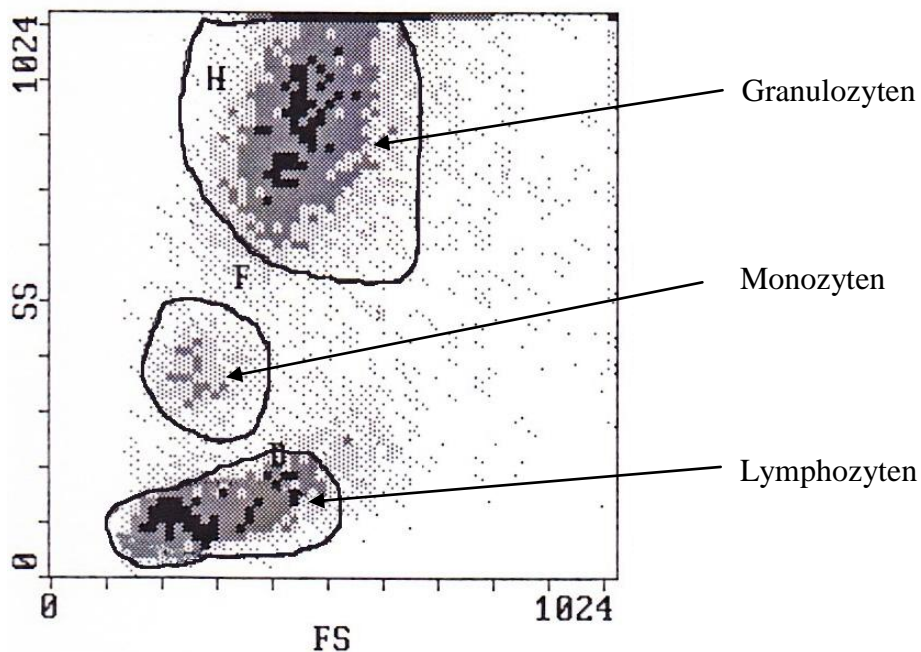


Abbildung 2-3: Charakterisierung von ungefärbten Zellen anhand der Lichtstreuung im Dot Plot. Große Zellen befinden sich rechts in der Abbildung. Granuläre Zellen befinden sich oben. Im Dot Plot kann man auf der y-Achse das Seitwärts- und auf der x-Achse das Vorwärtsstreulicht sehen. Durch das „gating“ werden am Computer die unterschiedlichen Zellhaufen markiert und somit der Analyse zugänglich gemacht.

2.6 Weitere Geräte

Pipettiergeräte

Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Pipettierspitzen

1µl-10µl, 10-100µl, 100µl-1000µl.

Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Eppendorf Tubes

1,5 ml

Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Zentrifuge Cryofuge 8000

Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland

Einstellung: accel 9, speed 1100rpm

Wasserwärmer des „Chandler loop“

Meßgerätewerk LAUDA Typ D8/17V

Dr. R. Wobser KG

Vortex Schüttler VV3

VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland

PVC-Schläuche

mit 3/8“ Durchmesser 3/32“ Wandstärke und 50 cm Länge

Jostra, Hirrlingen, Deutschland

2.7 Chemikalien

2.7.1 Zur Probenaufbereitung bei den Versuchen „LOOP“ und „STASE“

Ampuwa

Wasser für Injektionszwecke und andere Anwendungen

Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg, Deutschland

Becton Dicensen FACS Lysin Solution

Zum Gebrauch im Verhältnis 1:10 mit Wasser von Reagenzgüte verdünnt

Becton-Dickinson, Biosciences. San Jose, USA

PBS Dulbecco´s

Phosphate- Buffered Saline, pH 7,2 +/- 0,2; 0,01 mol/l PO₄³⁻ und 0,15 mol/l NaCl ohne Kalzium, Magnesium, Phenolrot oder Natriumazid.

Life Technologies, Gibco BRL, Carlsbad, USA

Tirofiban (Aggrastat®)

Tirofibanhydrochlorid Wirkstoff GPIIb/IIIa-Rezeptor-Blocker

MSD SHARP & DOHME GMBH, Haar, Deutschland

Eptifibatid (Integrilin®)

GPIIb/IIIa-Rezeptor-Blocker

Essex-Pharma, München, Deutschland

NaCl

Isotonische Kochsalzlösung 0,9%

Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg, Deutschland

Heparin

Liquemin N 25000 IE in 5 ml

Hofmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland

Monoklonale Fluorochrom-konjugierte Antikörper

CD11b = MAC-1 (PE)

CD54 = ICAM-1(PE)

CD45 (FITC)

Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, USA

CD162 = PSGL-1 (PE)

Immunotech, Coulter, Marseille, Frankreich

2.7.2 Reagenzien zur Messung mit dem Zytometer

Trägerflüssigkeit:

Isoton II

säurefreie balancierte Elektrolytlösung

Coulter Euro Diagnostics GmbH, Krefeld, Deutschland

Spüllösungen:

Coulter Clenz

Coulter Euro Diagnostics GmbH, Krefeld, Deutschland

Natrium-Hypochlorid

Coulter Euro Diagnostics GmbH, Krefeld, Deutschland

Aqua dest.

Coulter Euro Diagnostics GmbH, Krefeld, Deutschland

2.8 Statistische Auswertung

Die Analysen wurden von Herrn Dr. rer. nat. Siegfried Lang aus der Sektion Experimentelle Kardiologie der I. Medizinische Klinik der Universität Mannheim durchgeführt. Im Vorfeld wurde die Statistik von Herrn Prof. K. Diez aus dem Medizinisch-Biometrischen Institut der Universität Tübingen geplant und betreut. Mittels der Statistiksoftware JMP 4 SAS Statistical Software (North Carolina, USA) wurden die Berechnungen zu Mittelwert, Standardabweichung, Standardfehler, Median Minimum und Maximum berechnet. Die Programme SPSS 16.0 (Illinois, USA) und InStat 3.01 (Kalifornien, USA) wurden verwendet, um einen linearen Zusammenhang feststellen zu können. Dazu verwendeten wir ein Allgemeines Lineares Modell (ALM), in dem abhängige und unabhängige Variablen berücksichtigt wurden.

Das partielle Eta Quadrat (Effektstärke) wurde aus diesem Model erhoben. Verwendet wurde die international übliche Einteilung des Eta Quadrats:

$\eta^2 = 0.01$, dies entspricht einem kleinen Effekt.

$\eta^2 = 0.06$, dies entspricht einem mittleren Effekt.

$\eta^2 = 0.14$, dies entspricht einem großen Effekt.

Das Signifikanzniveau: alpha gleich 0,05 entspricht 5%. Dies bedeutet, dass im Durchschnitt in 5 von 100 gleichartigen Experimenten der Test zu einer fälschlichen Ablehnung der Nullhypothese führt, d.h., für den Fall, dass die Nullhypothese zutrifft,

wird sie mit 5 % Wahrscheinlichkeit irrtümlicherweise abgelehnt (74). Bei allen Tests gilt folgende international übliche Einteilung:

Ist $p \leq 0,001$, nennt man das Testergebnis höchst signifikant.

Ist $0,001 < p$ und $p \leq 0,01$, bezeichnet man das Testergebnis als hoch signifikant.

Ist $0,01 < p$ und $p \leq 0,05$, heißt das Testergebnis signifikant.

Ist $0,05 < p$ und $p \leq 0,1$, kann man das Testergebnis schwach signifikant nennen.

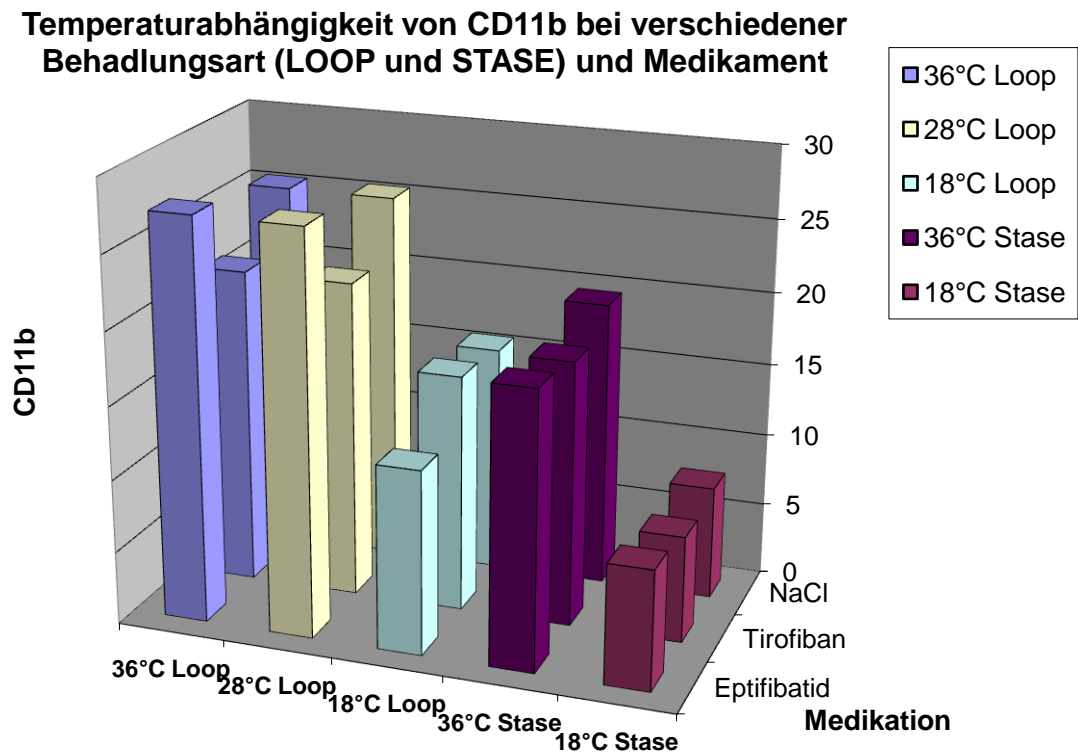
Kontinuierliche Daten wurden bei Normalverteilung mit dem ungepaarten Student T-Test analysiert. Bei nicht-normalverteilten Werten wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney U Test benutzt. Abweichungen von der Normalverteilung wurden mit dem Kolmogorov-Smirnov Test bestimmt. Mehr als 2 Gruppen wurden mit ANOVA oder dem Kruskal Wallis Test bei nicht normalverteilten Daten analysiert. Als Post Hoc Test wurde das Tukey-Kramer-Verfahren verwendet. Dieser Test gibt an, ob es für die diversen Ausprägungen ihrer unabhängigen Variablen einen Unterschied bezüglich der abhängigen Variable gibt.

Unser Interesse galt der Expression der Adhäsionsmoleküle CD11b, CD54 und CD162 auf Monozyten im Bezug auf Medikament, Temperatur und Behandlungsart. Die Werte, die zur Statistik herangezogen wurden, sind alle in MY (Median der Fluoreszenzintensität aus 10 000 gemessenen Zellen) angegeben.

Als Studienmedikamente wurden Tirofiban, Eptifibatid und als Kontrollsubstanz NaCl verwendet. Bei den Temperaturen handelt es sich um 18°C, 28°C und 36°C.

Die Behandlungsart bezieht sich auf die zwei verschiedenen Versuchsaufbauten. Wir nutzten ein modifiziertes Chandler Loop Modell um einen Blutfluss zu simulieren - im folgenden LOOP genannt. Der andere Versuchsaufbau - STASE genannt - wurde als „klassischer“ Versuch im Reagenzglas durchgeführt und simuliert einen Kreislaufstillstand.

In dem folgenden Balkendiagramm ist beispielhaft zu sehen, wie bei CD11b die verschiedenen Temperaturen mit den Medikamenten bei LOOP und bei STASE im Zusammenhang stehen:



Balkendiagramm 1:Beispielhafte Darstellung der Ergebnisse durch das ALM für CD11b.

2.9 Statistische Vergleiche

Folgende statistischen Vergleiche wurden durchgeführt:

- Einfluss der Medikamente auf die Expression der monozytären Adhäsionsrezeptoren CD11b, CD54 und CD162.
- Einfluss der Temperatur auf die Expression der monozytären Adhäsionsrezeptoren CD11b, CD54 und CD162.
- Einfluss der Temperatur auf die Expression der monozytären Adhäsionsrezeptoren CD11b, CD54 und CD162 in Abhängigkeit von LOOP oder STASE.
- Einfluss der Temperatur auf die Expression der monozytären Adhäsionsrezeptoren CD11b, CD54 und CD162 mit NaCl bei LOOP und bei STASE.
- Einfluss und Vergleich von LOOP und STASE auf die Expression der monozytären Adhäsionsrezeptoren CD11b, CD54 und CD162.
- Vergleich zwischen der Behandlungsart LOOP und der Behandlungsart STASE bezüglich der Expression von monozytären Adhäsionsmolekülen CD11b, CD54, CD162 bei NaCl-Zusatz.

3 Ergebnisse

3.1.1 Einfluss der Medikamente auf die Expression der monozytären Adhäsionsrezeptoren CD11b, CD54 und CD162

In unserer Studie wurden die Medikamente Eptifibatid und Tirofiban und die Kontrollsubstanz NaCl eingesetzt. Klären wollten wir die Frage, inwieweit unter GPIIb/IIIa Inhibitoren die Hypothermie Einfluss hat auf die Aktivierung von Monozyten. Dies maßen wir mittels Durchflußzytometrie anhand der monozytären Adhäsionsmoleküle CD11b, CD54 und CD162.

Die Berechnungen erfolgten mit Hilfe eines Allgemeinen linearen Modells (ALM) und Tukey HSD Post Tests. Dazu wurden die Temperatur mit den 3 "Faktorstufen" 18°C, 28°C, 37°C gepoolt ("unabhängig"), ebenso wie die Behandlungsart mit den 2 "Faktorstufen" LOOP und STASE. Abhängige Variablen waren die Medikamente Tirofiban, Eptifibatid und NaCl.

Für alle Oberflächenmarker haben wir einen Tukey HSD (Tukey's honest significance test) Post Test des ALM verwendet. Bestimmt wurden die Unterschiede zwischen den einzelnen Medikamenten um festzustellen, ob eines der Medikamente Tirofiban oder Eptifibatid eine vermehrte oder verminderte Expression auf den Monozyten hervorruft als die physiologische Kochsalzlösung.

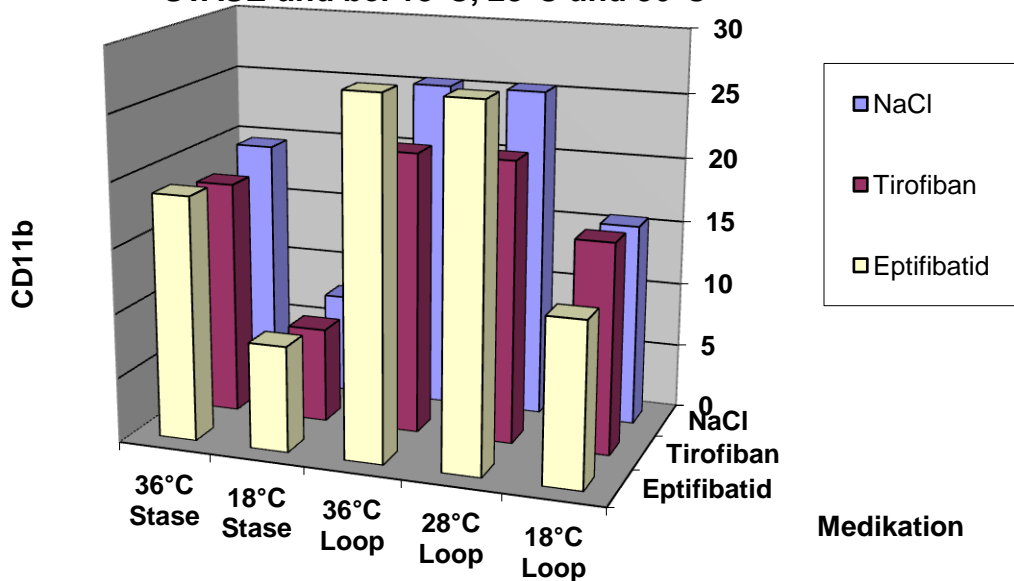
3.1.1.1 CD11b

Wir konnten durch das Allgemeine lineare Modell (ALM) aufzeigen, dass die zugesetzten Medikamente keinen Einfluss ($\text{partial } \eta^2 = 0.042$) auf die Expression des Ädhäsionsrezeptoren CD11b haben. Weder NaCl, noch Tirofiban noch Eptifibatid waren signifikant mit CD11b assoziiert. ($p = 0.114$). Im Post Test zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Medikamenten.

CD11b	Sig.	Partial Eta Squared
LOOP1/STASE0	0,00	0,20
Medikament	0,12	0,04
Temperatur	0,00	0,48
LOOP1/STASE0 * Medikament	0,95	0,00
LOOP1/STASE0 * Temperatur	0,56	0,00
Medikament * Temperatur	0,26	0,05
LOOP1/STASE0 * Medikament * Temperatur	0,32	0,02

Tabelle 1: ALM bezüglich der Effekte auf die Expression von CD11b mit partiellem eta Quadrat. Mit * sind Kombinationen verschiedener Faktorstufen bezeichnet.

CD11b bei verschiedener Medikation, bei LOOP und STASE und bei 18°C, 28°C und 36°C



Balkendiagramm 2: In dem Balkendiagramm für CD11b ist zu sehen, wie die Medikamente bei LOOP und bei STASE bei den verschiedenen Temperaturen im Zusammenhang stehen.

CD11b	Medikament	Medikament im Vergleich	Mean Difference	Std. Error	Sig.
Tukey HSD	NaCl	Tirofiban	1,82	1,25	0,32
		Eptifibatid	-0,46	1,23	0,93
	Tirofiban	NaCl	-1,82	1,25	0,32
		Eptifibatid	-2,28	1,22	0,16
	Eptifibatid	NaCl	0,46	1,23	0,93
		Tirofiban	2,28	1,22	0,16

Tabelle 2: der Tukey HSD Post Test des ALM zeigt, dass der Unterschied zwischen den Medikamenten nicht signifikant ist.

CD11b	Medikament	N	Standardabweichung	Mittelwert
Tukey HSD	Tirofiban	38	6,84	14,76
	NaCl	37	8,00	16,57
	Eptifibatid	40	8,60	17,03
	Sig.			0,16
				1

Tabelle 3: Da die Ergebnisse in einer Spalte (Mittelwert 1) stehen, weiß man nun, dass die Expression von CD11b nicht signifikant von den einzelnen Medikamenten abhängt.

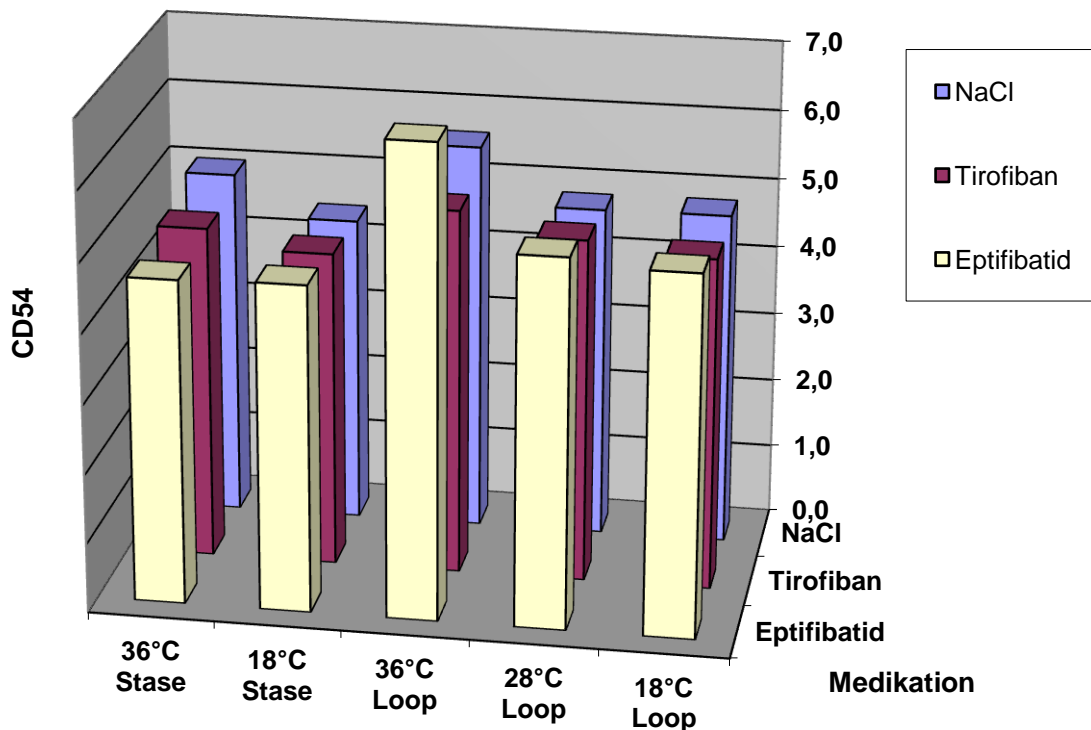
3.1.1.2 CD54

Auch bei CD54 konnten wir durch das ALM aufzeigen, dass die zugesetzten Medikamente keinen Einfluss ($\text{partial } \eta^2 = 0.019$) auf die Expression des Adhäsionsrezeptors CD54 haben. Sowohl NaCl, als auch die GPIIb/IIIa Inhibitoren Tirofiban noch Eptifibatid waren nicht signifikant mit CD54 assoziiert ($p = 0.381$).

CD54	Sig.	Partial Eta Squared
LOOP1/STASE0	0,01	0,07
Medikament	0,38	0,02
Temperatur	0,04	0,07
LOOP1/STASE0 * Medikament	0,28	0,03
LOOP1/STASE0 * Temperatur	0,20	0,02
Medikament * Temperatur	0,91	0,01
LOOP1/STASE0 * Medikament * Temperatur	0,45	0,02

Tabelle 4: ALM bezüglich der Effekte auf die Expression von CD54 mit partiellem eta Quadrat. Mit * sind Kombinationen verschiedener Faktorstufen bezeichnet.

CD54 bei verschiedener Medikation, bei LOOP und STASE und bei 18°C, 28°C und 36°C



Balkendiagramm 3: In dem Balkendiagramm für CD54 ist zu sehen, wie die Medikamente bei LOOP und bei STASE bei den verschiedenen Temperaturen im Zusammenhang stehen.

CD54	Medikament	Medikament im Vergleich	Mean Difference	Std. Error	Sig.
Tukey HSD	NaCl	Tirofiban	0,08	0,28	0,96
		Eptifibatid	-0,28	0,28	0,59
	Tirofiban	NaCl	-0,08	0,28	0,96
		Eptifibatid	-0,36	0,28	0,41
	Eptifibatid	NaCl	0,28	0,28	0,59
		Tirofiban	0,36	0,28	0,41

Tabelle 5: der Tukey HSD Post Test des ALM zeigt, dass der Unterschied zwischen den Medikamenten nicht signifikant ist.

CD54	Medikament	N	Standardabweichung	Mittelwert
				1
Tukey HSD	Tirofiban	38	0,96	4,82
	NaCl	37	1,06	4,90
	Eptifibatid	39	1,61	5,18
	Sig.			0,41

Tabelle 6: Der Tukey Test zeigt, dass die Expression von CD54 nicht signifikant von den einzelnen Medikamenten abhängt, da die Ergebnisse in einer Spalte (Mittelwert 1) stehen.

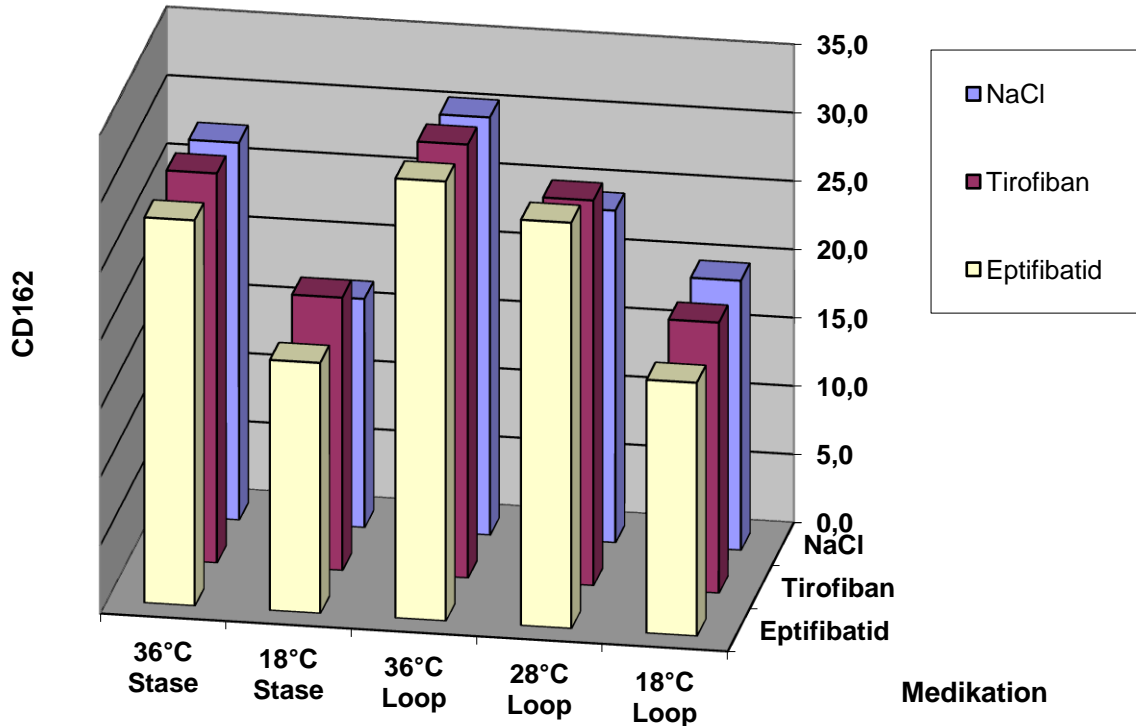
3.1.1.3 CD162

Letztendlich zeigte sich auch bei CD162 durch das ALM, dass die zugesetzten Medikamente keinen Einfluss ($\text{partial } \eta^2 = 0.037$) auf die Expression der Ädhäsionsrezeptoren CD162 haben. Auch hier sind weder NaCl, noch Tirofiban noch Eptifibatid signifikant mit CD162 assoziiert ($p = 0.170$).

CD162	Sig.	Partial Eta Squared
LOOP1/STASE0	0,05	0,04
Medikament	0,17	0,04
Temperatur	0,00	0,51
LOOP1/STASE0 * Medikament	0,87	0,00
LOOP1/STASE0 * Temperatur	0,29	0,01
Medikament * Temperatur	0,66	0,03
LOOP1/STASE0 * Medikament * Temperatur	0,75	0,01

Tabelle 7: Das ALM zeigt hier den Einfluss der verschiedenen Parameter auf die Expression von CD162. Man sieht, dass die Expression nur mit 4% von der Medikamentengabe abhängt. Mit * sind Kombinationen verschiedener Faktorstufen bezeichnet.

CD162 bei verschiedener Medikation, bei LOOP und STASE und bei 18°C, 28°C und 36°C



Balkendiagramm 4: In dem Balkendiagramm für CD162 ist zu sehen, wie die Medikamente bei LOOP und bei STASE und bei den verschiedenen Temperaturen im Zusammenhang stehen.

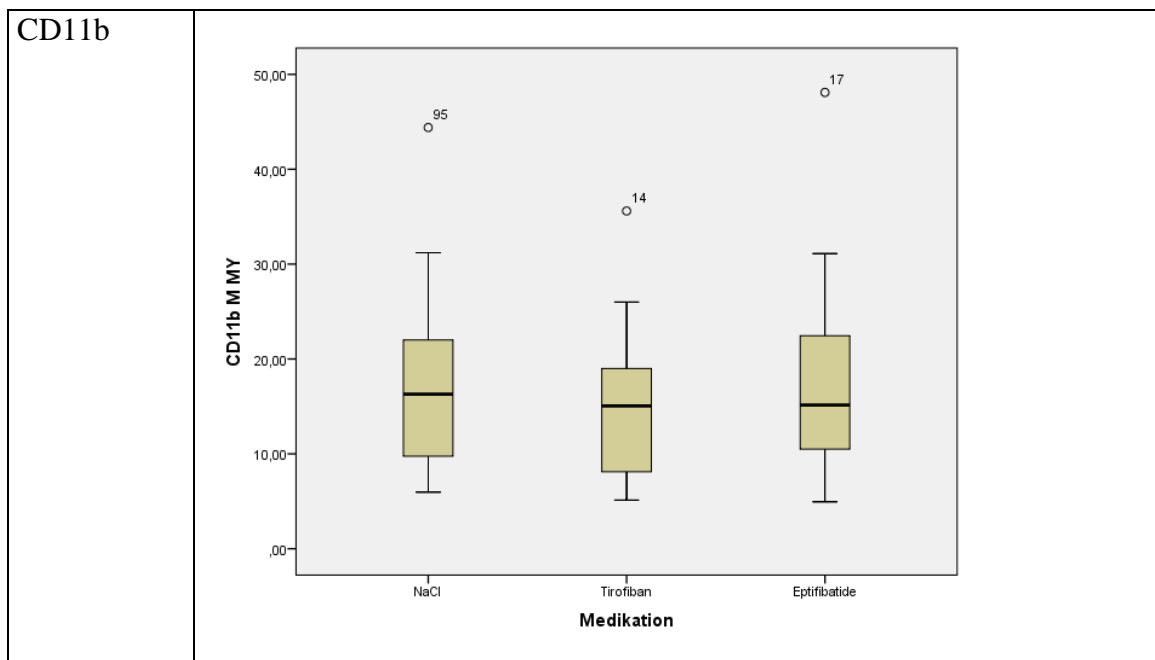
CD162	Medikament	Medikament im Vergleich	Mean Difference	Std. Error	Sig.
Tukey HSD	NaCl	Tirofiban	-1,76	1,19	0,30
		Eptifibatid	-1,02	1,17	0,66
	Tirofiban	NaCl	1,76	1,19	0,30
		Eptifibatid	0,74	1,17	0,80
	Eptifibatid	NaCl	1,02	1,17	0,66
		Tirofiban	-0,74	1,17	0,80

Tabelle 8: In dem Tukey Post Test zeigt sich, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Medikamenten gibt. Der Einfluss auf die Expression von CD162 durch die Medikation ist nicht gegeben.

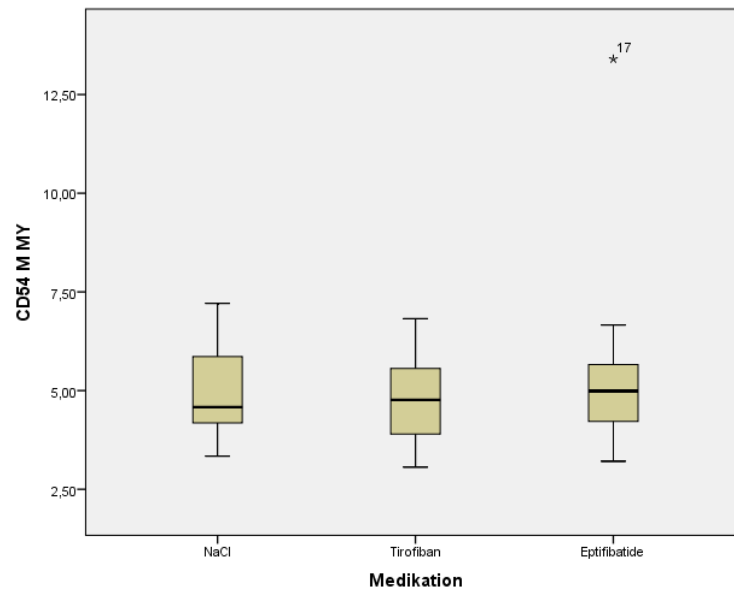
CD162	Medikament	N	Standardabweichung	Mittelwert
				1
Tukey HSD	Tirofiban	36	6,74	25,42
	NaCl	36	7,33	23,65
	Eptifibatid	38	7,39	24,67
	Sig.			0,3

Tabelle 9: Der Post Test der ALM zeigt, dass es keinen Einfluss gibt von den Medikamenten auf die Expression von CD162, da die Ergebnisse in einer Spalte (Mittelwert 1) stehen.

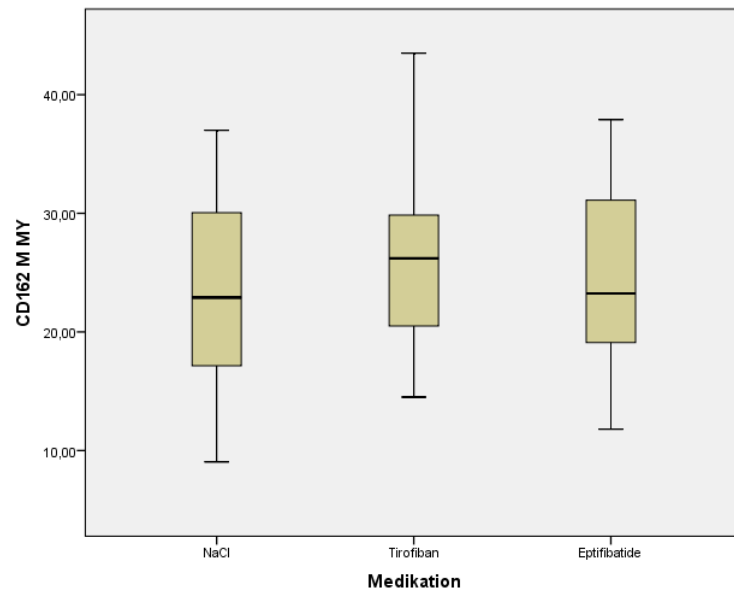
Die unten aufgezeigten Boxplots zeigen in der Übersicht die Wirkung der Medikamente auf die Expression der Oberflächenmarker:



CD54



CD162



Boxplot 1:In den Abbildungen sind die Werte für die Expression der einzelnen Oberflächenmarker getrennt nach Medikamentenzusatz aufgezeigt. Man sieht deutlich, dass es keinen Einfluss der Medikamente Tirofiban und Eptifibatid auf die Expression der Oberflächenmarker CD11b, CD54 und CD162 gibt.

3.1.2 Einfluss der Temperatur auf die Expression der monozytären Ädhäsionsrezeptoren CD11b, CD54 und CD162

Inwieweit ist die die Expression der Ädhäsionsrezeptoren assoziiert mit der Hypothermie? Die statistischen Berechnungen erfolgten mit gepoolten ("unabhängigen") "Faktorstufen" Medikation und Behandlungsart LOOP und STASE. Die Berechnung der „abhängigen“ Faktorstufe Temperatur erfolgte mittels ANOVA und Post Tests.

3.1.2.1 CD11b

Mit einer Signifikanz von $p < 0,001$ konnten wir zeigen, dass der Anteil der Temperaturvarianz an der Gesamtvarianz von CD11b eine Effektstärke von 48% (partial $\eta^2 = 0,48$) hat, was bedeutet, dass der Einfluss der Temperatur auf die Ausprägung der Expression von CD11b sehr groß ist.

Die Temperatur hat - unabhängig von den Medikamenten oder LOOP und STASE - den größten Einfluss auf die Expression von CD11b, wohingegen eine Behandlung per LOOP oder STASE oder mit Medikamenten nur einen geringen Einfluss hat (siehe dazu Kapitel 3.1.1)

CD11b	Sig.	Partial Eta Squared
LOOP1/STASE0	0,00	0,20
Medikament	0,12	0,04
Temperatur	0,00	0,48
LOOP1/STASE0 * Medikament	0,95	0,00
LOOP1/STASE0 * Temperatur	0,56	0,00
Medikament * Temperatur	0,26	0,05
LOOP1/STASE0 * Medikament * Temperatur	0,32	0,02

Tabelle 10: In diesem ALM kann man sehen, dass die Effektstärke für den Faktor Temperatur für CD11b bei 48% liegt und sine deutliche Signifikanz aufweist. Mit * sind Kombinationen verschiedener Faktorstufen bezeichnet.

Der Tukey Kramer Test zeigt, dass es eine Signifikanz gibt bei CD11b zwischen 18°C und 28°C und zwischen 28°C und 36°C und zwischen 18°C und 36°C, d.h., dass die Ausprägung der Adhäsionsmoleküle direkt temperaturabhängig ist.

CD11b	Temperatur °C	Temperatur °C im Vergleich	Mean Difference	Std. Error	Sig.
Tukey HSD	18°C	28°C	-6,10	1,50	0,00
		36°C	-11,36	1,10	0,00
	28°C	18°C	6,10	1,50	0,00
		36°C	-5,26	1,48	0,00
	36°C	18°C	11,36	1,10	0,00
		28°C	5,26	1,48	0,00

Tabelle 11: Der Unterschied in der Expression des Adhäsionsmoleküls CD11b ist signifikant temperaturabhängig.

CD11b	Temperatur C	N	Standardabweichung	Mittelwerte		
				1	2	3
Tukey HSD	18°C	46	3,79	10,14		
	28°C	18	5,95		16,24	
	36°C	51	7,30			21,50
	Sig.			1,00	1,00	1,00

Tabelle 12: Anhand der verschiedenen Spalten (Mittelwerte 1/2/3) kann man hier sehen, dass es in der Expression von CD11b einen signifikant Unterschied gibt zwischen den einzelnen Temperaturen.

3.1.2.2 CD54

Mit einer Signifikanz von $p < 0,001$ konnten wir zeigen, dass der Anteil der Temperaturvarianz an der Gesamtvarianz von CD54 eine Effektstärke von 6,5% (partial $\eta^2 = 0,065$) hat, was bedeutet, dass der Einfluss der Temperatur auf die Ausprägung der Expression von CD54 zwar signifikant ist, jedoch als eher gering zu beschreiben ist.

CD54	Sig.	Partial Eta Squared
LOOP1/STASE0	0,01	0,07
Medikament	0,38	0,02
Temperatur	0,04	0,07
LOOP1/STASE0 * Medikament	0,28	0,03
LOOP1/STASE0 * Temperatur	0,20	0,02
Medikament * Temperatur	0,91	0,01
LOOP1/STASE0 * Medikament * Temperatur	0,45	0,02

Tabelle 13: Man kann hier sehen, dass die Effektstärke mit 6,5% sehr gering ist was bedeutet, dass der Einfluss der Temperatur auf die Expression von CD54 niedrig ist. Mit * sind Kombinationen verschiedener Faktorstufen bezeichnet.

Bei der Durchführung des Tukey Kramer Tests bezüglich der Unterschiede der Temperaturen konnten keine signifikanten Ergebnisse erzielt werden. Dies macht noch einmal den geringen Effekt der Temperatur auf die Expression der Adhäsionsmoleküle CD54 deutlich. Dies zeigt auch der unten dargestellte dazugehörige Boxplot.

CD54	Temperatur °C	Temperatur °C im Vergleich	Mean Difference	Std. Error	Sig.
Tukey HSD	18°C	28°C	-0,33	0,34	0,59
		36°C	-0,53	0,25	0,09
	28°C	18°C	0,33	0,34	0,59
		36°C	-0,20	0,33	0,83
	36°C	18°C	0,53	0,25	0,09
		28°C	0,20	0,33	0,83

Tabelle 14: Hier sieht man im Tukey HSD Test, dass die Expression von CD54 nicht temperaturabhängig ist, da keine Signifikanzen erzielt wurden.

CD54	Temperatur °C	N	Standardabweichung	Mittelwerte
				1
Tukey HSD	18°C	46	0,96	4,69
	28°C	18	0,92	5,02
	36°C	50	1,52	5,21
	Sig.			0,21

Tabelle 15: Da die Ergebnisse in einer Spalte (Mittelwert 1) stehen, weiß man nun, dass die Expression des CD54 zwischen den einzelnen Temperaturstufen sich nicht signifikant voneinander unterscheidet.

3.1.2.3 CD162

Bei CD162 konnten wir zeigen ($p < 0,001$), dass der Anteil der Temperaturvarianz an der Gesamtvarianz von CD162b eine Effektstärke von 51% ($\text{partial } \eta^2 = 0,51$) hat, was bedeutet, dass die Temperatur einen signifikanten Einfluss auf die Expression von CD162 hat, und dieser Effekt sehr groß ist.

Die Temperatur hat zudem den größten Einfluss auf die Expression von CD54 im Vergleich zur Behandlungsart oder einer der anderen Kombinationen. Das bedeutet, dass kein anderer Faktor so sehr auf die Expression des monozytären Markers einwirkt wie die Temperatur.

Auch der Tukey Kramer Test bestätigt dieses Ergebnis:

CD162	Sig.	Partial Eta Squared
LOOP1/STASE0	0,05	0,04
Medikament	0,17	0,04
Temperatur	0,00	0,51
LOOP1/STASE0 * Medikament	0,87	0,00
LOOP1/STASE0 * Temperatur	0,29	0,01
Medikament * Temperatur	0,66	0,03
LOOP1/STASE0 * Medikament * Temperatur	0,75	0,01

Tabelle 16: Hier wird gezeigt, dass die Effektstärke für den Faktor Temperatur mit 51% sehr groß ist. Mit * sind Kombinationen verschiedener Faktorstufen bezeichnet.

Der folgende Post Test zeigt, dass es eine Signifikanz gibt bei CD162 zwischen 18°C und 28°C und zwischen 18°C und 36°C, d.h., dass die Ausprägung der Adhäsionsmoleküle direkt temperaturabhängig ist. Zwischen 28°C und 36°C zeigen sich keine signifikanten Ergebnisse.

CD162	Temperatur °C	Temperatur °C im Vergleich	Mean Difference	Std. Error	Sig.
Tukey HSD	18°C	28°C	-8,69	1,43	0,00
		36°C	-10,74	1,04	0,00
	28°C	18°C	8,69	1,43	0,00
		36°C	-2,05	1,43	0,33
	36°C	18°C	10,74	1,04	0,00
		28°C	2,05	1,43	0,33

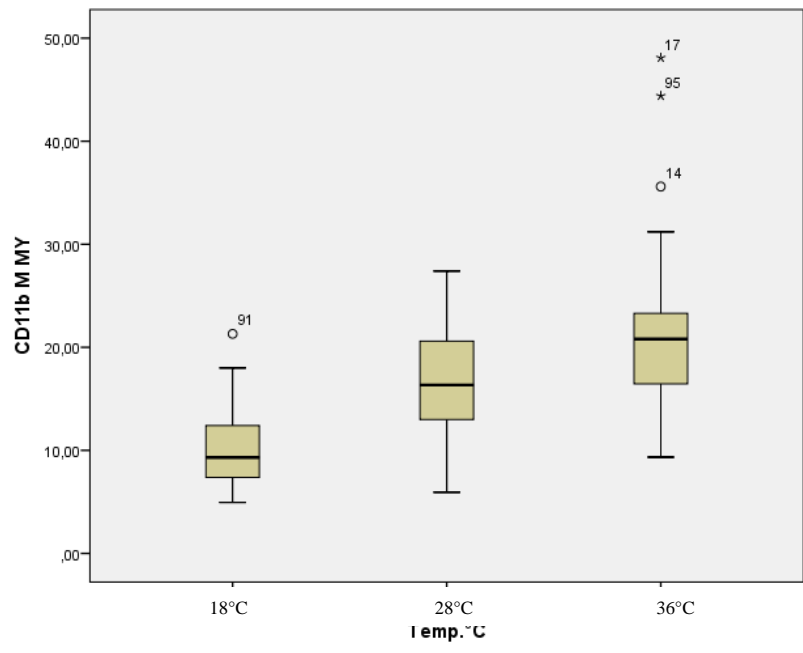
Tabelle 17: Der Unterschied in der Expression des Adhäsionsmoleküls CD162 ist signifikant temperaturabhängig.

CD162	Temperatur °C	N	Standardabweichung	Mittelwerte	
				1	2
Tukey	18°C	46	4,16	18,65	
HSD	28°C	17	6,89		27,34
	36°C	47	5,04		29,39
	Sig.			1,00	0,27

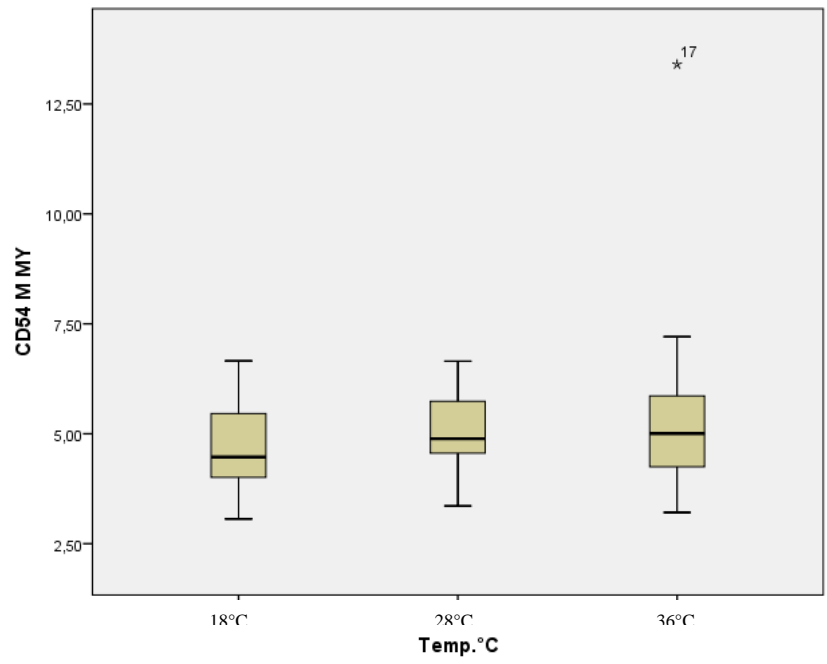
Tabelle 18: Da die Ergebnisse in zwei Spalten (Mittelwert 1 und 2) stehen, weiß man nun, dass die Unterschiede in der Expression des CD162 zwischen 18°C und 36 °C und zwischen 18°C und 28°C signifikant sind.

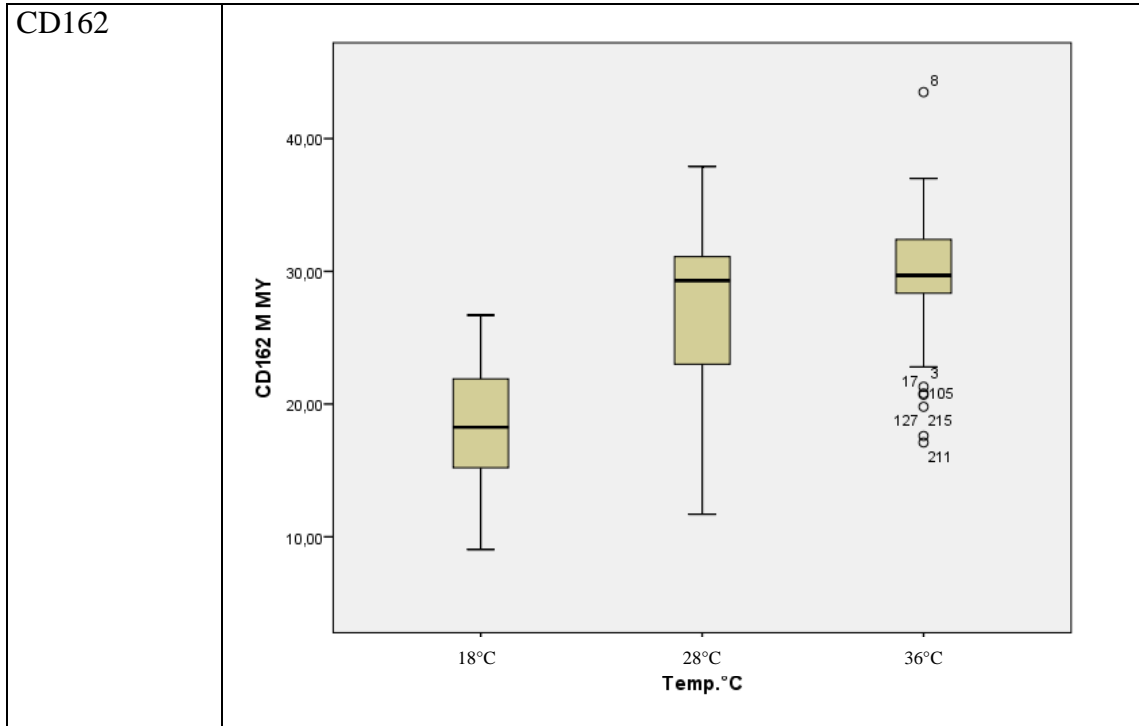
In den folgenden Boxplots sieht man anschaulich, dass die Expression der Rezeptoren CD11b und CD162 bei 18°C deutlich niedriger ist als bei 36°C. Bei CD54 ist dieser Effekt nicht sehr stark ausgeprägt:

CD11b



CD54





Boxplot 2: In den Boxplots sieht man anschaulich wie die bei der Expression der Adhäsionsfaktoren CD11b und CD162 die Temperatur eine große Rolle spielt. Je höher die Temperatur, desto höher die Expression des Rezeptors. Der Rezeptor CD54 ist hingegen nicht temperatursensibel.

3.1.3 Einfluss der Temperatur auf die Expression der monozytären Adhäsionsrezeptoren CD11b, CD54 und CD162 in Abhängigkeit von LOOP oder STASE

Kann man eine unterschiedliche Aussage über die Temperaturabhängigkeit der Expression von Oberflächenmarkern erhalten, wenn man die Faktoren LOOP und STASE getrennt betrachtet?

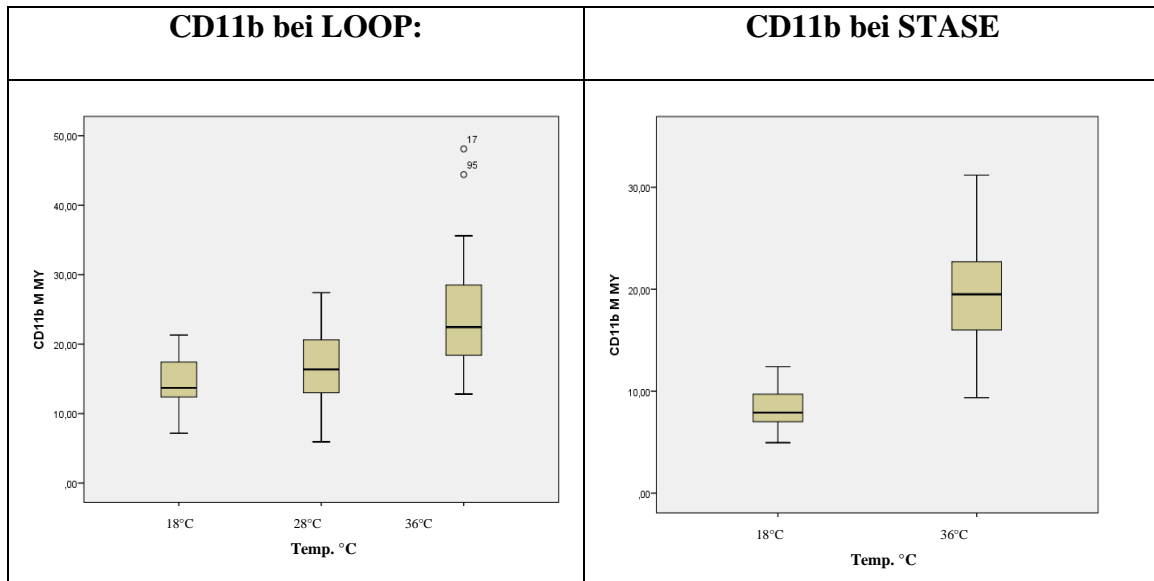
Die statistischen Berechnungen werden in dieser Aufgabe mit gepoolten Werten für die „Faktorstufe“ Medikation durchgeführt. Die abhängigen Variablen sind Temperatur und Behandlungsart. Verwendet wurde eine ANOVA mit Post Tests.

3.1.3.1 CD11b

Wir sehen in dieser Berechnung, dass in dem STASE Versuchsaufbau der Unterschied in der Expression von CD11b auf Monozyten zwischen 18°C und 36°C deutlich ist (Mittelwert Differenz: 11,4) ($p < 0,001$). Auch bei Simulation des Blutflusses im LOOP Versuchsaufbau können wir zeigen, dass CD11b signifikant ansteigt bei steigender Temperatur. Man sieht im unten gezeigten Boxplot, dass der Unterschied zwischen 18°C und 36°C (Mittelwert Differenz: 20.5) ($P < 0.01$) und zwischen 28°C und 36°C (Mittelwert Differenz: 26.3) ($P < 0.001$) signifikant ist. Die Expression auf den Monozyten ist bei CD11b demnach direkt temperaturabhängig und dies sowohl bei STASE, als auch bei LOOP.

CD11b	Temperatur	Mittelwerte	Standardabweichung
STASE	18°C	8,23	1,76
	36°C	19,67	4,89
LOOP	18°C	14,50	3,60
	28°C	16,24	5,95
	36°C	24,85	9,66

Tabelle 19: Mittelwerte und Standardabweichungen für CD11b bei LOOP und STASE im Vergleich.



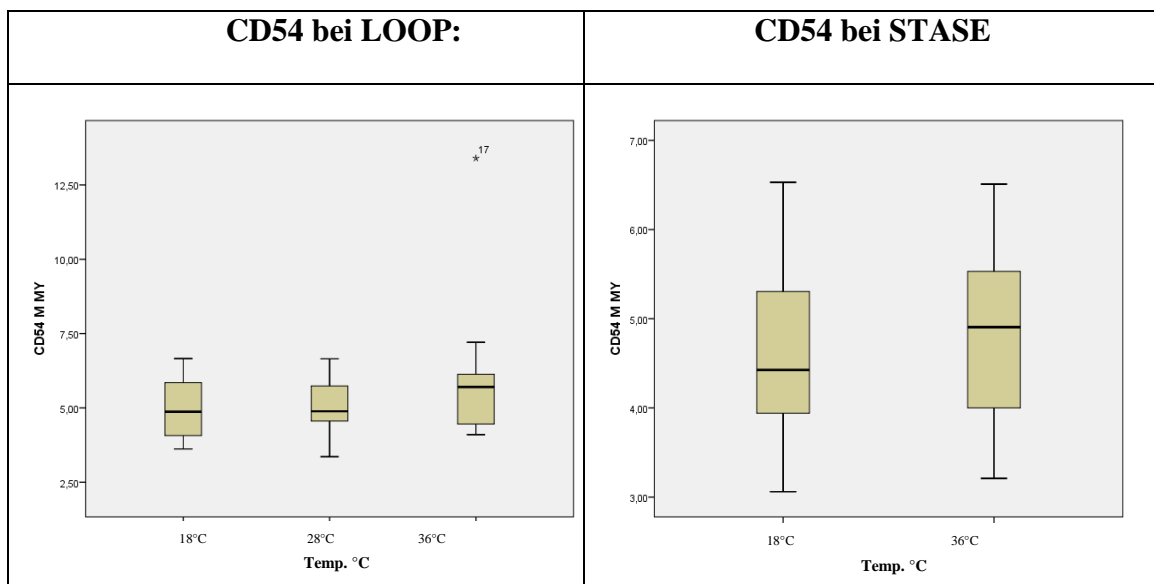
Boxplot 3 Einfluss der Temperatur auf die Expression der Adhäsionsrezeptoren CD11b bei LOOP und STASE.

3.1.3.2 CD54

Hier sehen wir in den Berechnungen zur Expression des monozytären Adhäsionsmoleküls CD54 bei LOOP oder STASE die Temperaturunabhängigkeit von CD54. Wir können dabei feststellen, dass weder bei LOOP noch bei STASE die Temperatur ausschlaggebend ist für die Expression des Adhäsionsmoleküls CD54. Es zeigen sich zwischen den verschiedenen Temperaturen bei STASE keine signifikanten Unterschiede in der Expression von CD54 ($p = 0,24$). Der Unterschied zwischen 18°C und 36°C (Mean Difference: 0,2) war nicht signifikant. Auch bei LOOP sind die p-Werte zwischen den Temperaturen 18°C, 28°C und 36°C nicht signifikant von einander unterschiedlich ($p > 0.05$). Zwischen 18°C und 36°C (Mittelwert Differenz: 8.1) ($p > 0.05$), zwischen 28°C und 36°C (Mittelwert Differenz: 6.3) ($p > 0.05$) und zwischen 18°C und 28°C (Mittelwert Differenz: 1.8) ($p > 0.05$) gibt es keinen signifikanten Unterschied. Der unten gezeigte Boxplot zeigt dies anschaulich.

CD54	Temperatur	Mittelwerte	Standardabweichung
STASE	18°C	4,56	0,92
	36°C	4,84	0,93
LOOP	18°C	4,96	1,02
	28°C	5,01	,918
	36°C	5,88	2,09

Tabelle 20: Mittelwerte und Standardabweichungen für CD54 bei LOOP und STASE im Vergleich.



Boxplot 4: Einfluss der Temperatur auf die Expression der Adhäsionsrezeptoren CD54 bei LOOP und bei STASE.

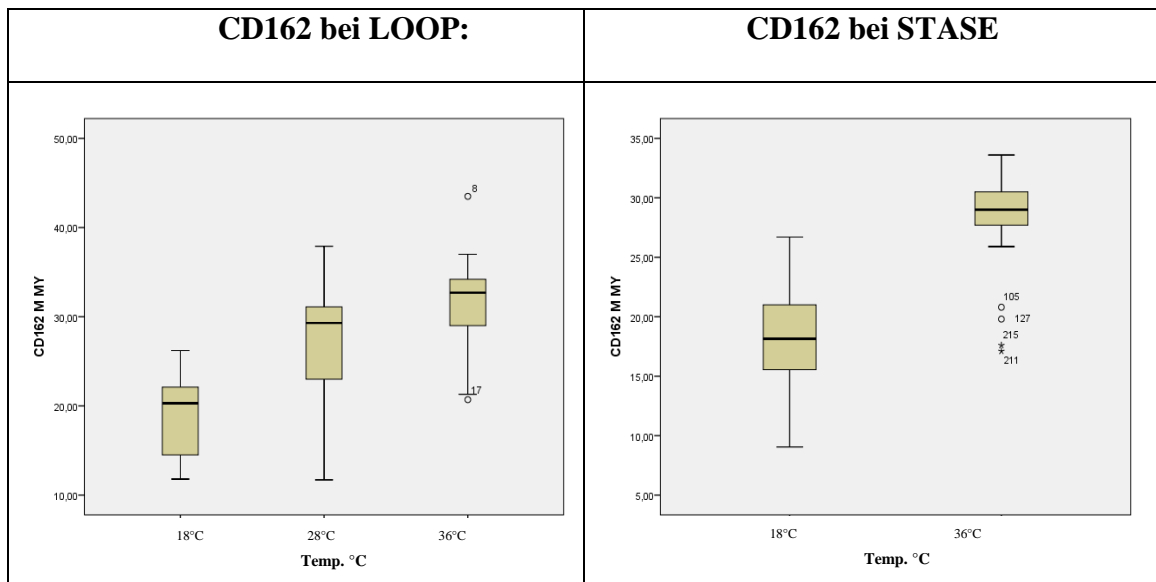
3.1.3.3 CD162

In den Berechnungen mittels ANOVA können wir sehen, wie die Temperatur verantwortlich ist für die Expression von CD162. Wir sehen, dass in dem STASE Versuchsaufbau der Unterschied in der Expression von CD162 auf Monozyten zwischen 18°C und 36°C signifikant ist (Mittelwert Differenz: 9,71) ($p < 0,001$). Auch bei Simulation des Blutflusses im LOOP Versuchsaufbau können wir zeigen, dass CD162 signifikant ansteigt bei steigender Temperatur. Man sieht deutlich in dem unten gezeigten Boxplot, dass der Unterschied zwischen 18°C und 36°C (Mittelwert Differenz: 12,24) ($p < 0,01$), zwischen 18°C und 28°C (Mittelwert Differenz: 8,11) ($p < 0,05$) und zwischen 28°C und 36°C (Mittelwert Differenz: 4,14) ($p < 0,001$)

signifikant ist. Die Expression auf den Monozyten ist bei CD162 also temperaturabhängig und zwar sowohl bei LOOP als auch bei STASE. Je geringer die Temperatur, desto geringer ist die Expression von CD162 auf den Monozyten.

CD162	Temperatur	Mittelwerte	Standardabweichung
STASE	18°C	18,39	3,97
	36°C	28,10	4,16
LOOP	18°C	19,24	4,65
	28°C	27,34	6,89
	36°C	31,48	5,72

Tabelle 21: Mittelwerte und Standardabweichungen für CD162 bei LOOP und STASE im Vergleich.



Boxplot 5: Einfluss der Temperatur auf die Expression der Adhäsionsrezeptoren CD162 bei LOOP und bei STASE.

3.1.4 Einfluss der Temperatur auf die Expression der monozytären Adhäsionsrezeptoren CD11b, CD54 und CD162 mit NaCl bei LOOP und bei STASE

Um die oben erfolgten Ergebnisse zu spezifizieren haben wir die Berechnungen nur mit der physiologischen Kochsalzlösung durchgeführt, da im Kapitel 3.1.1 festgestellt wurde, dass die Medikation keinen Einfluss auf die Expression der Adhäsionsmoleküle hat. Anhand des Student-Newman-Keuls Tests wurde die Expression der Adhäsionsmoleküle gemessen für LOOP und anhand eines parametrischen T-Tests die Expression des Adhäsionsmoleküle für STASE berechnet.

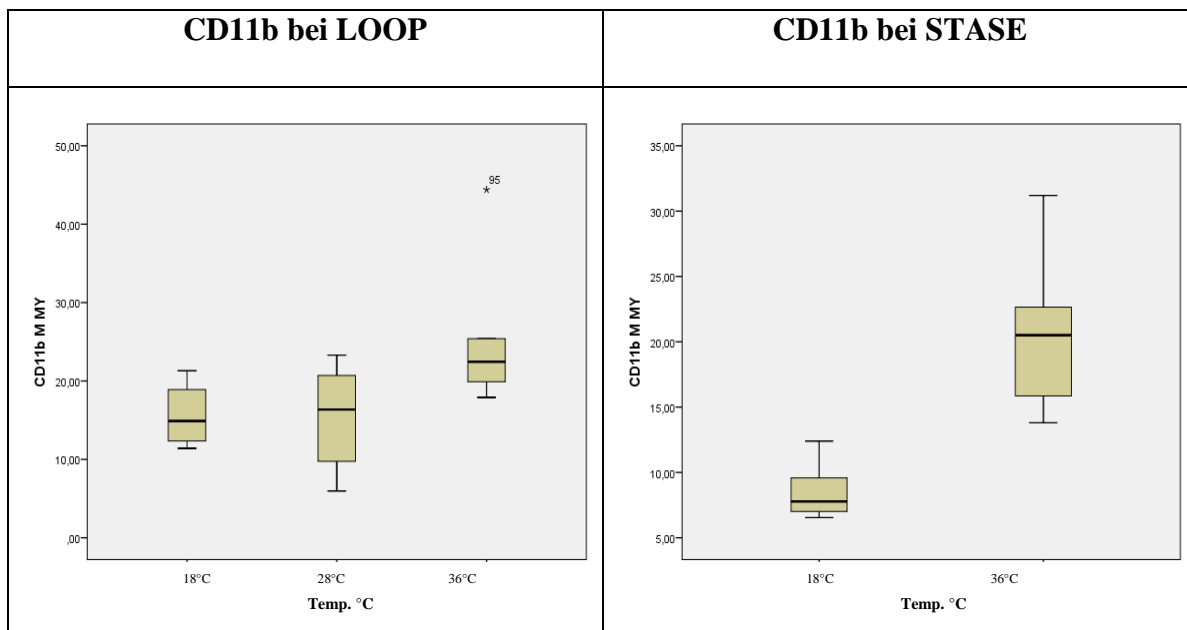
3.1.4.1 CD11b

Für LOOP zeigten 18°C im Vergleich zu 36°C (Mittelwert Differenz: 9,79) ($p < 0.05$) und 28°C im Vergleich zu 36°C (Mittelwert Differenz: 12,47) ($p < 0.01$) signifikante Unterschiede. Der Unterschied zwischen 18°C und 28°C wurde statistisch als nicht signifikant gewertet, es zeigt sich jedoch ein deutlicher Trend zu erhöhten Expressionswerten bei höherer Temperatur. Für den STASE Versuchsaufbau zeigten der Mann-Whitney Test ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen 18°C und 36°C (Mittelwert Differenz: 7,75) ($p = 0,0022$). CD11b ist temperaturabhängig bei der Expression auf Monozyten. Bei niedriger Temperatur ist die Expression vermindert, je höher die Temperatur ansteigt, desto mehr wird CD11b von Monozyten exprimiert.

Die Ergebnisse waren sowohl bei LOOP als auch bei STASE mit den Ergebnissen in Kapitel 3.1.2 und 3.1.3 vergleichbar.

Medikament	CD11b	Temperatur	Mittelwert	Standardabweichung
NaCl	STASE	18°C	7,77	1,15
		36°C	19,60	4,01
	LOOP	18°C	15,63	4,33
		28°C	12,95	5,89
		36°C	25,42	9,64

Tabelle 22: Mittelwerte und Standardabweichungen für CD11b für NaCl bei LOOP und STASE.



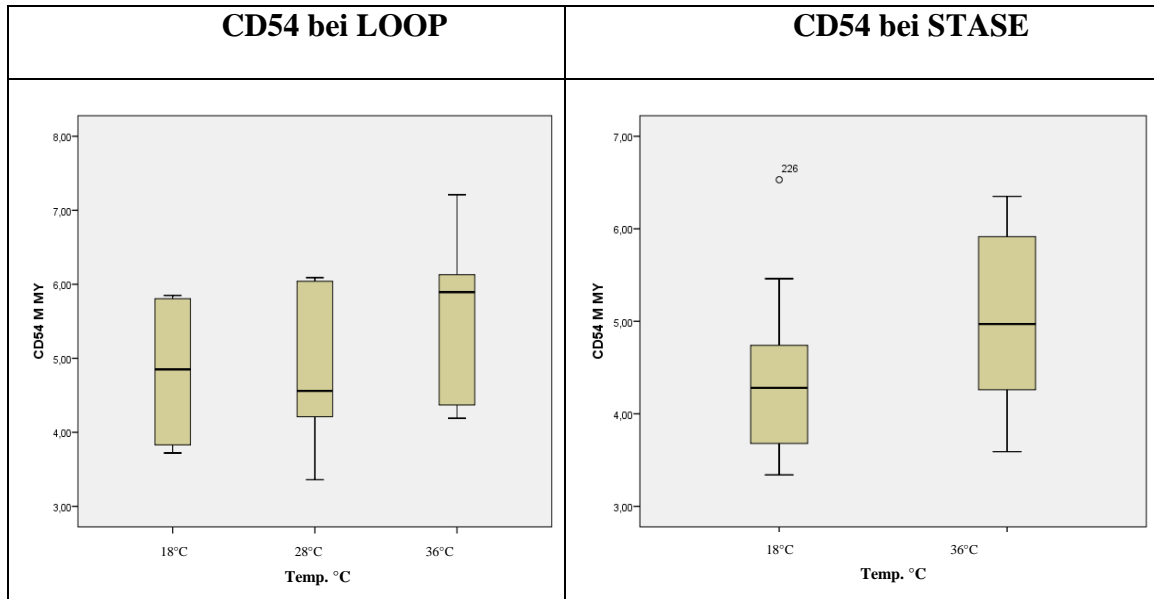
Boxplot 6: Wir konnten bei den Versuchsaufbauten LOOP und STASE eine direkte Temperaturabhängigkeit zeigen. Je höher die Temperatur, desto größer die Expression des Adhäsionsmoleküls CD11b.

3.1.4.2 CD54

Wir konnten, wie auch bereits in den Kapiteln 3.1.2.2 und 3.1.3.2 beschrieben, auch hier sehen, dass die Expression von CD54 nicht temperaturabhängig ist und sich auch in diesen Berechnungen bei STASE keine signifikanten Unterschiede finden lassen zwischen 18°C und 36°C (Mittelwert Differenz: 0,21) ($p=0.2$). Auch bei LOOP lassen sich keine signifikanten Unterschiede ($p=0.4$) finden zwischen den Temperaturen 18°C, 28°C und 36°C bei NaCl: 18°C im Vergleich zu 36°C (Mittelwert Differenz: 0,80) ($P>0.05$), 28°C im Vergleich zu 36°C (Mittelwert Differenz: 0,81) ($P>0.05$) und 18°C zu 28°C (Mittelwert Differenz: 0,01) ($P>0.05$) zeigten keine signifikante Unterschiede. Dennoch sieht man in den unten gezeigten Boxplots einen Trend für erhöhte Expressionswerte bei CD54 bei 36°C im Vergleich zu 18°C

Medikament	CD54	Temperatur	Mittelwerte	Standardabweichung
NaCl	STASE	18°C	4,44	0,97
		36°C	5,02	1,00
	LOOP	18°C	4,82	1,14
		28°C	4,80	1,07
		36°C	5,62	1,15

Tabelle 23: Mittelwerte und Standardabweichungen für CD54 für NaCl bei LOOP und STASE.



Boxplot 7: Wir konnten bei CD54 in den Versuchsaufbauten LOOP und STASE keine Temperaturabhängigkeit zeigen, wobei jedoch ein Trend sichtbar ist bezüglich erhöhter Werte bei höheren Temperaturen.

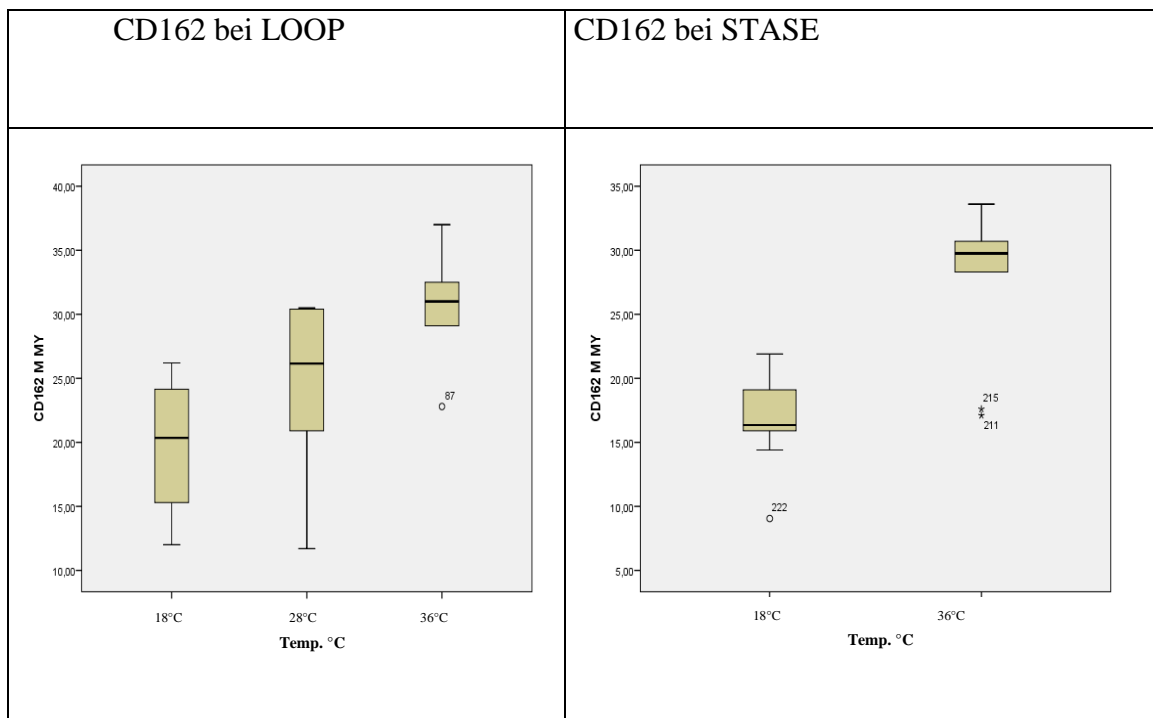
3.1.4.3 CD162

Für die Spezifizierung der bisher gefundenen Ergebnisse in den Kapiteln 3.1.2.3 und 3.1.3.3 CD162 haben wir die Berechnungen nur für die physiologische Kochsalzlösung durchgeführt. Wir konnten auch hier sehen, dass die Expression von CD162 temperaturabhängig ist und sich auch in diesem Vergleich bei STASE signifikante Unterschiede finden lassen zwischen 18°C und 36°C (Mittelwert Differenz: 11,66) ($p < 0.001$).

In der Frage inwieweit die Temperaturunterschiede mit der physiologischen Kochsalzlösung bei LOOP signifikant waren, lassen sich keine signifikanten Werte zwischen den Temperaturen 18°C, 28°C und 36°C bei NaCl finden ($p = 1,33$): 18°C im Vergleich zu 36°C (Mittelwert Differenz: 9.76) ($p > 0.05$), 28°C im Vergleich zu 36°C (Mittelwert Differenz: 7,72) ($p > 0.05$) und 18°C zu 28°C (Mittelwert Differenz: 2,04) ($p > 0.05$) zeigten keine signifikante Unterschiede. Es zeigt sich jedoch ein Trend zu ansteigenden Expressionsraten bei erhöhten Temperaturen, was sich auch mit den oben durchgeführten Berechnungen deckt, bei denen die Temperaturabhängigkeit von CD162 gezeigt wurde.

Medikament	CD162	Temperatur	Mittelwerte	Standardabweichung
NaCl	STASE	18°C	16,74	3,59
		36°C	27,61	5,60
	LOOP	18°C	19,73	6,01
		28°C	24,30	7,38
		36°C	30,56	4,71

Tabelle 24: Mittelwerte und Standardabweichungen für CD162 für NaCl bei LOOP und STASE.



Boxplot 8: Bei LOOP konnten keine statistisch signifikanten Ergebnisse bezüglich der Temperaturabhängigkeit von CD162 gefunden werden, Im Boxplot sticht man jedoch einen Anstieg der Expression von CD162 mit steigender Temperatur. Im STASE Versuchsaufbau konnte die Temperaturabhängigkeit statistisch bewiesen werden.

3.1.5 Einfluss und Vergleich von LOOP und STASE auf die Expression der monozytären Adhäsionsrezeptoren CD11b, CD54 und CD162

Desweiteren interessierte uns die Frage nach der Aktivierung von Monozyten durch unterschiedliche Behandlungsarten. Welchen Einfluss hat das Chandler Loop Modell auf die monozytäre Oberflächenrezeptor Expression. Mittels des Allgemeinen Linearen Modells (ALM) berechneten wir die Effektstärke der Behandlungsart LOOP und STASE auf die Expression der Adhäsionsrezeptoren.

Um den Einfluss der Behandlungsart zu bestimmen, wurden die Temperatur mit den 3 "Faktorstufen 18°C, 28°C, 37°C gepoolt ("unabhängig"), ebenso wie die Medikamente Tirofiban, Eptifibatid und NaCl. Abhängige Variable war die Behandlungsart mit den 2 "Faktorstufen" LOOP und STASE.

3.1.5.1 CD11b

Unsere Untersuchungen zeigen, dass die Expression des Adhäsionsrezeptors CD11b mit 20% Effektstärke deutlich von der Behandlungsart LOOP und STASE abhing. In den Boxplots des ALM sieht man, dass die CD11b Werte bei LOOP höher sind als bei STASE. Unsere Ergebnisse zeigen, dass es bei CD11b einen signifikanten ($p= 0.002$) Unterschied zwischen LOOP und STASE gibt. Die Expression von CD11b ist unter STASE deutlich niedriger, als unter LOOP

CD11b	Mittelwert	Standardabweichung
STASE	14,04	6,83
LOOP	18,85	8,32

Tabelle 25: Vergleich von LOOP und STASE mit Mittelwerte und Standardabweichung für den Oberflächenmarker CD11b.

3.1.5.2 CD54

Die Effektstärke für LOOP und STASE für CD54 ist mit 6% gering ($p=0,05$). Auch gibt es einen signifikanten ($p= 0.012$) Unterschied in der Expression zwischen STASE und LOOP. Die Expression von CD54 ist abhängig von der Behandlungsart und ist bei LOOP höher ausgeprägt als bei STASE.

Im unten dargestellten Boxplot ist dieser signifikante Unterschied nicht so deutlich zu erkennen, wobei dennoch ein Trend für erhöhte Werte unter LOOP auszumachen ist.

CD54	Mittelwert	Standardabweichung
STASE	4,70	0,93
LOOP	5,31	1,51

Tabelle 26: Vergleich von LOOP und STASE mit Mittelwerte und Standardabweichung für den Oberflächenmarker CD54.

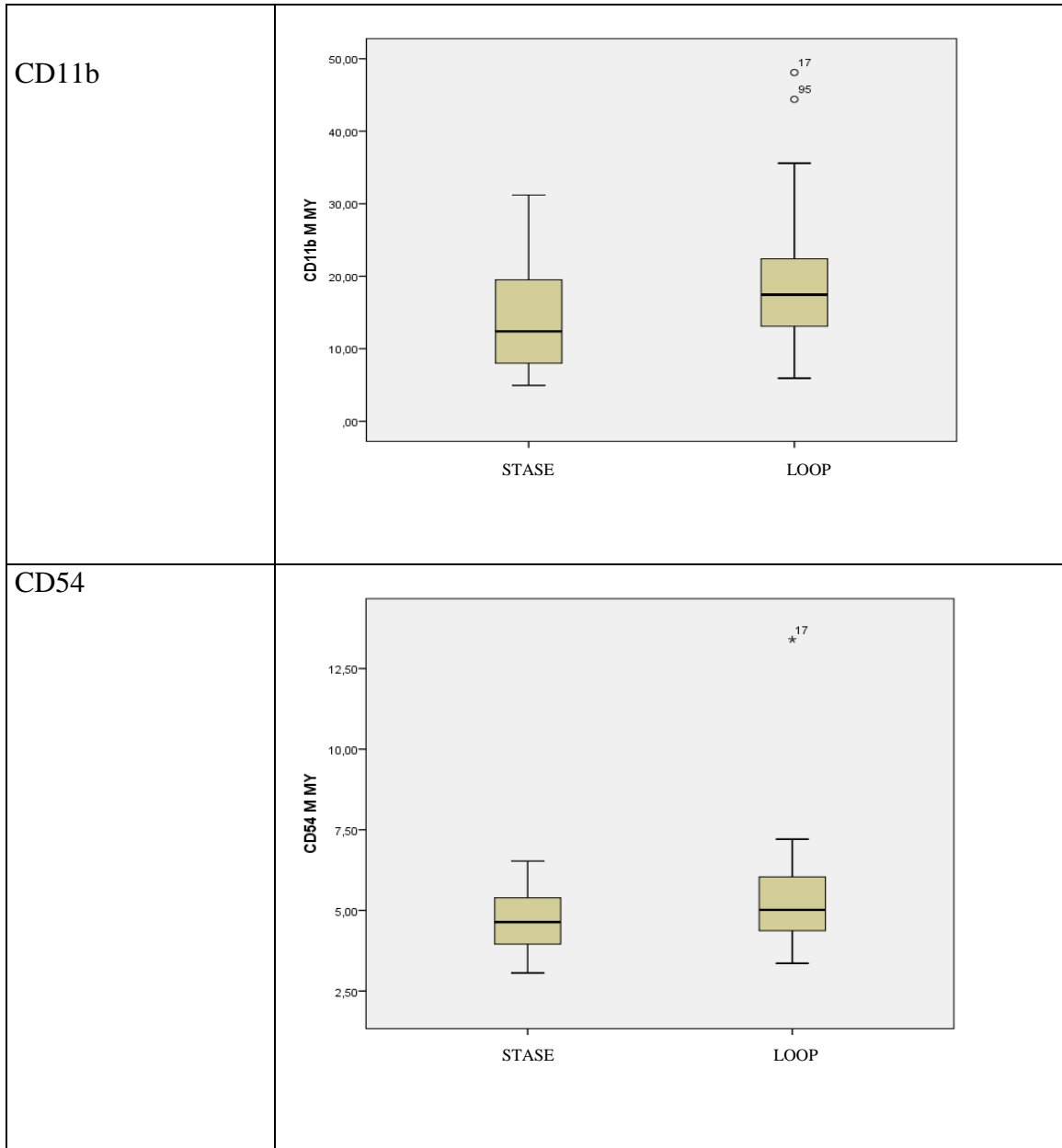
3.1.5.3 CD162

Letztendlich zeigt auch CD162 einen signifikanten ($p=0,008$) Unterschied zwischen STASE und LOOP. Die Expression von CD162 ist abhängig von der Behandlungsart und ist bei LOOP höher ausgeprägt als bei STASE. Die Effektstärke beträgt jedoch nur 4% ($p=0.05$). In dem Boxplot zu CD162 des ALM sieht man, dass bei LOOP mehr Oberflächenmarker exprimiert werden als bei STASE.

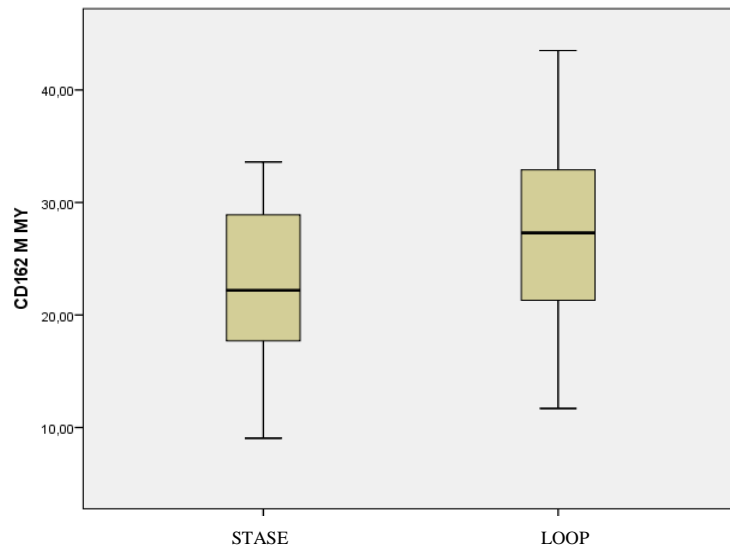
CD162	Mittelwert	Standardabweichung
STASE	23,01	6,34
LOOP	26,54	7,63

Tabelle 27: Vergleich von LOOP und STASE mit Mittelwerte und Standardabweichung für den Oberflächenmarker CD162.

Vor allem sieht man in den Boxplots bei CD11b und CD162 die Veränderung in der Expression des Rezeptors aufgrund der Behandlungsart:



CD162



Boxplot 9: Die vermehrte Expression der Oberflächenmarker CD11b und CD162 durch LOOP kann man deutlich erkennen. Bei CD54 ist ein statistischer Anstieg der Oberflächenmarker berechnet worden, der aber im Boxplot schwer zu sehen ist.

3.1.6 Vergleich zwischen der Behandlungsart LOOP und der Behandlungsart STASE bezüglich der Expression von monozytären Adhäsionsmolekülen CD11b, CD54, CD162 bei NaCl

Da die Medikamente keinen Einfluss auf die Expression der Adhäsionsrezeptoren zeigten (siehe Kapitel 3.1.1), wurden die Berechnungen bezüglich des Vergleiches zwischen LOOP und STASE auf die Expression der Adhäsionsrezeptoren anhand der Kontrollsubstanz NaCl vorgenommen. Wir vergleichen direkt LOOP mit STASE bei gleicher Temperatur. Verwendet wurde der Mann-Whitney Test.

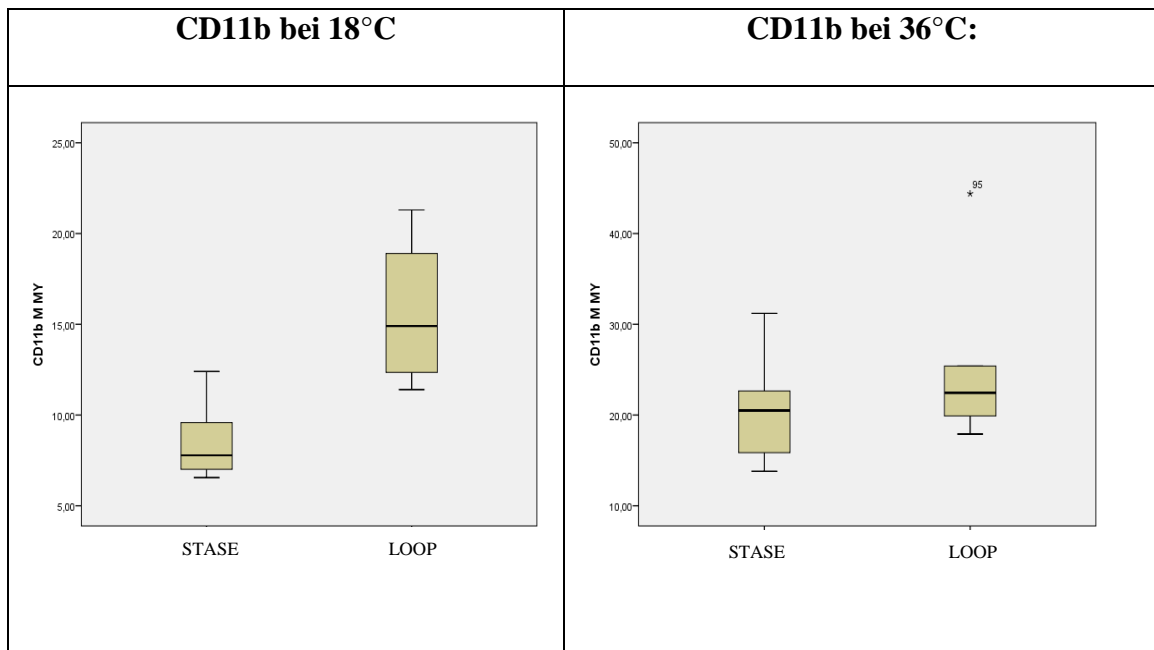
3.1.6.1 CD11b

Für die Expression von CD11b zeigte sich unter 18°C, dass die Aktivierung durch LOOP signifikant ($p=0.0095$) höher war als bei STASE. Der Unterschied der CD11b Expression zwischen 36°C LOOP und 36°C STASE zeigte sich nicht als signifikant ($p=0,39$).

CD11b	Temperatur	Mittelwert	Standardabweichung
LOOP	18°C	15,63	4,33
STASE		7,77	1,15
LOOP	36°C	25,42	9,64
STASE		19,60	4,01

Tabelle 28: Mittelwerte und Standardabweichung en für den Vergleich LOOP vs. STASE mit NaCl für CD11b.

Dieses statistische Ergebnis für 36°C erscheint fragwürdig, da in den Boxplots ein Trend für erhöhte Werte bei LOOP im Vergleich zu STASE zu sehen ist.



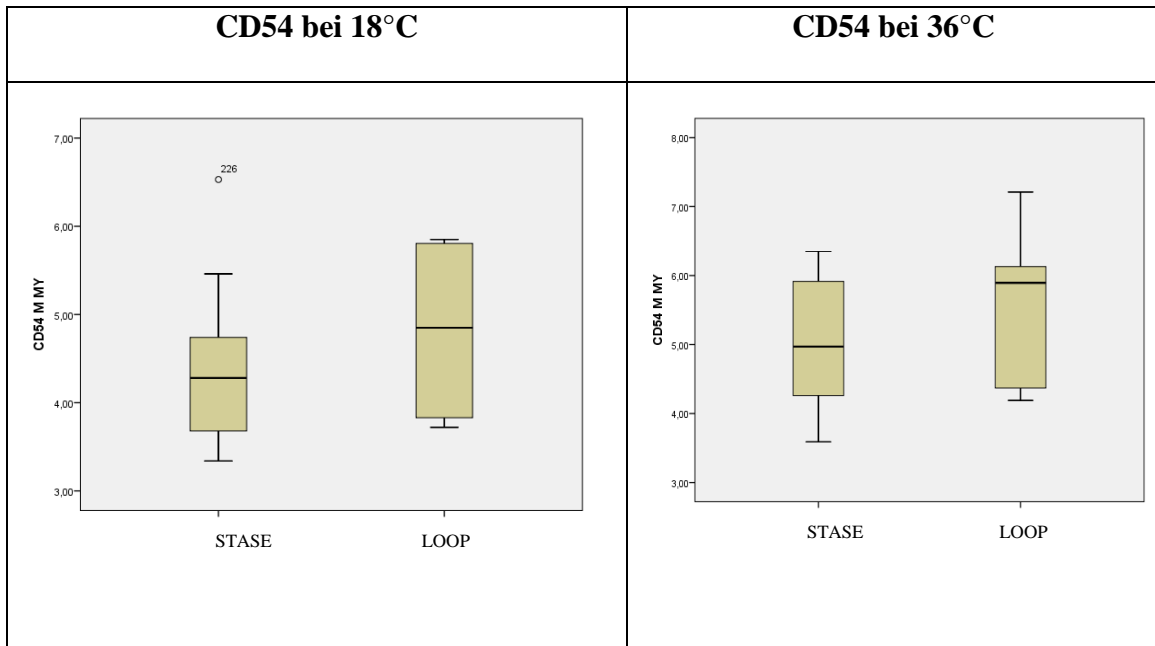
Boxplot 10: Direkter Vergleich zwischen den Behandlungsarten LOOP und STASE bei den Temperaturen 18°C und 36°C für CD11b.

3.1.6.2 CD54

Für die Expression von CD54 zeigte sich sowohl unter 18°C ($p=0,64$) als auch unter 36°C ($p=0,40$) keine signifikanten Unterschiede zwischen LOOP und STASE. Zwischen 18°C LOOP und 18°C STASE zeigte sich kein signifikanter Unterschied, ebenso wenig wie zwischen 36°C LOOP und 36°C STASE. Der Faktor LOOP oder STASE wirkt sich nicht auf die Expression des Oberflächenmoleküls CD54 aus.

CD54	Temperatur	Mittelwert	Standardabweichung
LOOP	18°C	4,82	1,14
STASE		4,44	9,72
LOOP	36°C	5,62	1,15
STASE		5,02	9,97

Tabelle 29: Mittelwerte und Standardabweichung en für den Vergleich LOOP vs. STASE mit NaCl für CD54.



Boxplot 11: Direkter Vergleich zwischen den Behandlungsarten LOOP und STASE bei den Temperaturen 18°C und 36°C für CD54.

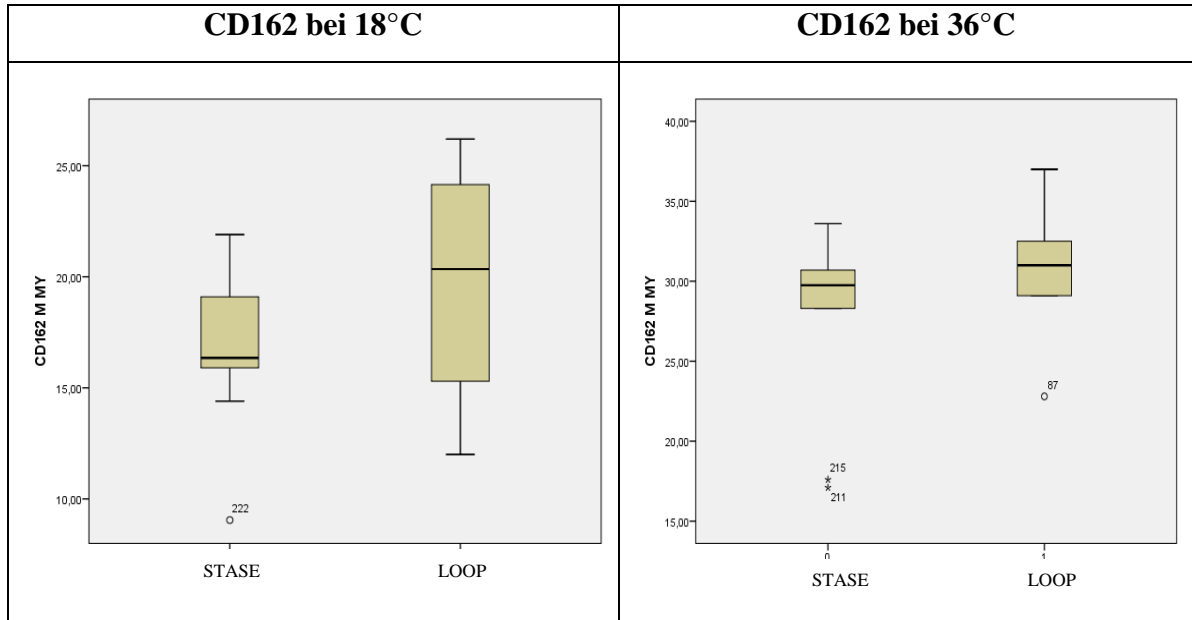
3.1.6.3 CD162

Auch für die Expression von CD162 zeigten sich sowohl unter 18°C ($p=0,304$) als auch unter 36°C ($p=0,29$) keine signifikanten Unterschiede zwischen LOOP und STASE. Ebenfalls konnte sowohl zwischen 18°C LOOP und 18°C STASE, als auch zwischen 36°C LOOP und 36°C STASE kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

CD54	Temperatur	Mittelwert	Standardabweichung
LOOP	18°C	19,73	6,01
STASE		16,74	3,60
LOOP	36°C	30,57	4,72
STASE		27,61	5,60

Tabelle 30: Mittelwerte und Standardabweichungen für den Vergleich LOOP vs. STASE mit NaCl für CD162.

In den Boxplots sieht man, dass der Oberflächenmarker CD162 bei der Behandlungsart LOOP im Vergleich zur STASE nicht vermehrt exprimiert wird. Auch hier kann jedoch anhand des Boxplots ein Trend zu erhöhten Werten bei LOOP festgestellt werden.



Boxplot 12: Direkter Vergleich zwischen den Behandlungsarten LOOP und STASE bei den Temperaturen 18°C und 36°C für CD162.

4 Diskussion

Unsere Studie wurde von drei Aufgabenstellungen geleitet:

- Inwieweit wirkt sich die Einnahme von GPIIb/ IIIa Inhibitoren auf die Aktivierung von monozytären Adhäsionsmolekülen aus?
- Inwieweit verändert sich die Monozytenexpression unter dem Einfluss der Temperatur?
- Inwieweit beeinflusst ein extrakorporaler Blutkreislauf die Expression von monozytären Adhäsionsmolekülen?

4.1 Einfluss der Medikamente auf die Expression der monozytären Adhäsionsrezeptoren CD11b, CD54 und CD162

4.1.1 Tirofiban und Eptifibatid - Allgemeines

Die GPIIb/IIIa Rezeptorantagonisten sind eine Gruppe von Medikamenten, die an der Endstrecke der Thrombozytenaggregation ansetzen. Zurzeit werden Tirofiban, Eptifibatid und Abciximab als parenterale Medikamente im klinischen Alltag eingesetzt. Alle drei Medikamente werden als intravenöse Dauerinfusion in Kombination mit Heparin und ASS verwendet (75) (76) (77). Eine orale Form der Glykoprotein-IIb/IIIa-Rezeptor-Inhibitoren (z. B. Xemilofiban, Orbofiban oder Sibrafiban) war mit einer erhöhten Mortalität verbunden und spielt aktuell keine Rolle mehr im klinischen Alltag (78). Allen GPIIb/IIIa Antagonisten ist gemeinsam, dass ihnen sowohl eine Bindung an den aktivierten als auch an den ruhenden Thrombozyten gelingt (79). Damit hemmen sie die Thrombozytenaggregation und fördern die Thrombozytendisaggregation. Für Hochrisikopatienten (z. B. Troponin-positive Patienten, Diabetiker oder bei Patienten mit ST-Senkung im EKG) wird das 30 Tage Risiko für Tod oder Herzinfarkt durch den Einsatz von GPIIb/IIIa Inhibitoren um 9% gesenkt (65).

Deshalb finden diese Substanzen ihre klinische Verwendung derzeit beim akuten Koronarsyndrom (ACS) und bei komplizierten perkutanen koronaren Interventionen (PCI) (23). Dabei sollten die GPIIb/IIIa Inhibitoren vor und während der PCI eingesetzt werden (80). Laut aktuellen Leitlinien zum ACS wird der Einsatz von GPIIb/IIIa Rezeptorantagonisten nicht genauer spezifiziert. Vor allem der präklinische Einsatz ist nicht geklärt. Die Studie On-TIME-2 zeigte die Überlegenheit der prähospitalen Gabe von höher dosiertem Tirofiban im Vergleich zur prähospitalen Gabe von Placebo (81). Jedoch zeigten andere Studien keinen Vorteil eingesetzter präklinischer GPIIb/IIIa Rezeptorantagonisten (82), so dass hier die Studien der nächsten Jahre Klärung bringen müssen. Laut Kommentar zu den Leitlinien 2010 zur kardiopulmonalen Reanimation ist die prähospital Gabe der Glykoprotein-IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten kritisch zu betrachten. Nachdem die Diagnose während des Rettungsdiensteinsatzes noch nicht sicher feststeht, könnte eine verfrühte Gabe lebensgefährlich sein. Wäre z.B. das Symptom „Thoraxschmerz“ auf eine Aortendissektion o. ä. zurück zu führen, dann könnte es nach Gabe eines GPIIb/IIIa Inhibitors zu schweren Blutungen kommen.

Unter ischämischen Bedingungen wie Schlaganfall, Blutung oder akutem Myokardinfarkt spielt die Thrombozytenaktivierung eine große Rolle. Zudem wird in ischämischem Gewebe eine vermehrte Leukozytenemigration in infarziertes Gewebe beschrieben. Lindemann et al. zeigten 2001, dass es zu einer verstärkten Thrombozytenaktivierung und Erhöhung der zirkulierenden Leukozyten bei akuter Myokardischämie kommt. Vermehrte Thrombozyten-Monozyten-Aggregate werden bei Patienten mit instabiler Angina pectoris (83) ebenso wie bei Patienten nach kardiopulmonaler Bypass Operation oder PTCA (84) (85) gefunden. Daraus folgt auch eine gesteigerte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (86) mit Bildung von Thrombozyten-Monozyten-Aggregaten und Aktivierung der Gerinnungskaskade.

Die Thrombozyten-Monozyten-Interaktion wird durch eine Verletzung der Endothelwand oder durch ein entzündliches Geschehen und in diesem Sinne auch durch die Arteriosklerose initiiert. Aber auch nach Adhäsion von Leukozyten an die dysfunktionale Endothelwand wird durch die Leukozyten eine Bindung an die Thrombozyten initiiert, die zur Plättchenadhäsion und zur lokalen Thrombusbildung führt.

Nach PTCA und während Operationen an der HLM werden Patienten mit tiefer und milder Hypothermie behandelt. Die Indikation für eine Thrombozytenaggregationshemmung mittels GPIIb/IIIa Inhibitoren ist dafür gegeben. Die RESTORE, EPIC und PURSUIT Studie konnten beweisen, dass unter Verwendung dieser Wirkstoffgruppe die Komplikationen unter PTCA reduziert waren (87) (66) (71).

Unter Hypothermie wird durch Eptifibatid die Thrombenbildung reduziert und verbessert so den zerebralen Blutfluss im Gehirn und die zerebrale Ischämie. Zudem kann eine Zellschädigung und die verbundene perivaskuläre Ödembildung reduziert werden (88).

4.1.2 Eptifibatid und Tirofiban - vorliegende Studie und Literaturübersicht

In der vorliegenden Studie wurden die Medikamente Eptifibatid und Tirofiban eingesetzt. Klären wollten wir die Frage, in wie weit die GPIIb/IIIa Rezeptorantagonisten Einfluss auf die Aktivierung von Monozyten haben. Dies wurde von uns mittels Durchflußzytometrie anhand der Adhäsionsmoleküle CD11b, CD54 und CD162 gemessen. Weder Eptifibatid noch Tirofiban zeigten einen Einfluss auf die Expression der Adhäsionsmoleküle CD11b, CD54 und CD162. Die Effektstärke der Medikamente auf die Expression der Adhäsionsmoleküle war bei CD11b, CD54 und CD162 äußerst gering und zeigen wie wenig Einfluss die Medikamente auf die Expression der monozytären Adhäsionsmoleküle haben.

Eptifibatid und Tirofiban wirken ausschließlich auf den thrombozytären GPIIb/IIIa Rezeptor. Studien konnten zeigen, dass aber - über die Interaktion zwischen Thrombozyten und Leukozyten - durch die beiden Medikamente auch Einfluss genommen werden kann auf die Ausbildung von Thrombozyten-Monozyten-Aggregate. In der Studie von Xiao und Theroux (89) über den Effekt des GPIIb/IIIa Rezeptorantagonisten Tirofiban auf Thrombozyten-Monozyten-Aggregate zeigte sich, dass Tirofiban eine Verminderung der Thrombozyten-Monozyten-Aggregate bewirkt. Dies geschieht durch die Verhinderung der Bindung von Fibrinogenbrücken zwischen Thrombozyten und Leukozyten.

Eine durch aktivierte Thrombozyten induzierte Bindung von Leukozyten an VCAM-1 (Vascular cell adhesion molecule-1) wurde von der Arbeitsgruppe um Huo et al. gezeigt (90), ebenso die durch aktivierte Thrombozyten geförderte Adhäsion von Leukozyten an entzündliches Endothel.

Von Hundelshausen et al. zeigten, dass das von aktivierten Thrombozyten exprimierte proinflammatorische Chemokin RANTES einen Einstrom von Monozyten in entzündetes Gewebe forciert (91) (92). Mittels GP-IIb/IIIa-Rezeptorblockade könnte dies unter Umständen verhindert werden. Die Folge wäre, dass weniger Wechselwirkungen zwischen Thrombozyten und Leukozyten stattfänden und sich weniger Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate ausbilden würden.

In einer Studie mit einem modifizierten Chandler-Loop-Modell zur Untersuchung des Einflusses auf die Thrombozytenaggregation bei Hypothermie unter GPIIb/IIIa Rezeptorantagonisten (93) zeigte sich, dass Eptifibatid und Tirofiban die Hypothermie induzierte Thrombozytenaggregation inhibieren. Auch wurde die durch den simulierten Blutfluss im Chandler-Loop-Modell induzierte Thrombozytenaggregation durch den Einsatz von Tirofiban und Eptifibatid verhindert. Zudem konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass die Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion im LOOP Modell durch Tirofiban und Eptifibatid gehemmt wurde, während sie bei STASE wenig beeinflusst wurde.

Frelinger et al. zeigten 2003 die additive Inhibition der GPIIb/IIIa Antagonisten auf die Plättchenaggregation durch Hypothermie. Es wurde dargestellt, dass die Wirkung von Eptifibatid und Tirofiban als Plättchen-Aggregationshemmer durch Hypothermie verstärkt werde. Dies traf jedoch nicht auf Abciximab zu. Zudem zeigten Frelinger et al., dass die Verminderung der Leukozyten-Plättchen-Aggregate durch Eptifibatid und Tirofiban durch Hypothermie reduziert wird (94). Eine direkte Auswirkung von Eptifibatid oder Tirofiban auf Monozyten wurde aber nicht untersucht.

Die Gruppe um Faraday fand heraus, dass Hypothermie die GPIIb/IIIa Rezeptoraktivität auf den Thrombozyten steigert (95) und dass zudem die Thrombozytenfähigkeit, auf aktivierende Stimuli zu reagieren, durch Hypothermie vermehrt wird.

Hochholzer (96) maß in seiner Studie mit den Medikamenten Tirofiban, Eptifibatid und Abciximab die Reduzierung der Mac-1-Expression auf den Aggregaten zwischen Plättchen und Leukozyten.

Neumann et al. fanden bereits 1999, dass über die Interaktion von Abciximab mit MAC-1 mittels GPIIb/IIIa Rezeptorantagonisten Interaktionen zwischen Thrombozyten und Leukozyten beim akuten Koronarsyndrom vermindert werden können (97).

All diese Studien haben sich mit der Interaktion zwischen Leukozyten und Thrombozyten befasst. Eine Aussage über den Einfluss von GPIIb/IIIa Rezeptorantagonisten auf die Aktivierung von Monozyten wurde jedoch nicht gemacht. Obwohl es eine Leukozyten-Thrombozyten-Interaktion gibt, konnten wir keinen Einfluss auf die Expression der Adhäsionsmoleküle CD11b, CD54 und CD162 auf Monozyten bei Normo- oder Hypothermie mit Einsatz von Tirofiban und Eptifibatid finden.

Dies könnte mehrere Ursachen haben. Am wahrscheinlichsten ist, dass es keine Interaktion zwischen Tirofiban oder Eptifibatid und den Monozyten gibt (98). Im Gegensatz zu Abciximab haben Eptifibatid und Tirofiban keine Bindungsmöglichkeit an Integrine. Der „Umweg“ über die Blockierung des GPIIb/IIIa Rezeptors durch die Medikamente und daraus folgend eine Hemmung der Fibrin-Bindungsstellen zwischen Thrombozyten und Leukozyten wurde belegt (93). Aber eine weitergehende Interaktion z. B. zwischen den Fibrin-Bindungsstellen der Monozyten mit einer Reduzierung der Monozytenaktivität erscheint unwahrscheinlich. Falls sie doch existiert, hat möglicherweise die Kraft von Tirofiban und Eptifibatid über die Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion auf die Expression nicht ausgereicht. Weitere Studien mit größeren Fallzahlen könnten hierüber möglicherweise Aufschluss geben.

In unserer Studie war der Einfluss der Medikamente verglichen mit der Kontrollsubstanz (physiologische Kochsalzlösung) nicht signifikant unterschiedlich. Aus diesem Grund beschränken sich die weiteren Berechnungen und statistischen Auswertungen auf die Proben mit dem Zusatz der Kontrollsubstanz (physiologische Kochsalzlösung). Die Proben mit den Zusätzen Eptifibatid und Tirofiban wurden auf Grund der fehlenden Signifikanz im Vergleich mit NaCl für die weiteren Berechnungen nicht berücksichtigt.

4.2 Einfluss der Temperatur auf die Expression der monozytären Adhäsionsrezeptoren CD11b, CD54 und CD162

4.2.1 Einfluss der Temperatur in der Medizin - Allgemeines

Im Falle einer Ischämie aufgrund eines akuten Myokardinfarkts oder von Angina pectoris kommt es zu einer Endothelschädigung mit konsekutiver Endothelaktivierung. Auch bei einer HLM oder einer PTCA ist dies der Fall. Dieser Reiz an der Oberfläche des Gefäßes und die erhöhten Scherkräfte haben eine gesteigerte Expression von Adhäsionsmolekülen zur Folge. Eine Interaktion zwischen Leukozyten, Thrombozyten und der Endothelwand findet statt. Zudem gibt es eine Thrombozyten-Monozyten-Interaktion, die von aktivierten Thrombozyten über P-Selektin (CD62L) initiiert wird (99). Eine Adhäsionskaskade wird gestartet, bei der es zu „rolling“, „sticking“ und zur Transmigration von Leukozyten kommt (44). Hypothermie vermag eine Hemmung dieses inflammatorischen Ereignisses zu vollbringen (12) (13) (100). Hypothermie hat seit einigen Jahren einen großen Stellenwert in der Behandlung ischämischer Folgen. Sowohl bei Schlaganfall, TIA, Angina pectoris oder Herzinfarkt wurde die therapeutische Hypothermie als Therapie diskutiert oder eingesetzt. Wie viele Studien belegten, konnten mit Hilfe der therapeutischen Hypothermie die OP-Zeiten so weit verlängert werden, dass immer komplexere Eingriffe durchgeführt werden konnten (101) (102) (103). Dabei waren die negativen Folgen der Ischämie unter hypothermen Verhältnissen äußerst gering. Die tiefe Hypothermie mit Temperaturen um 20°C wird regelmäßig bei neurochirurgischen Eingriffen nach ischämischen Insulten eingesetzt, wobei es gelingt die Operationszeiten von 3 Minuten auf 60 Minuten zu erhöhen (104) ohne dadurch die ischämische Schädigung im Rahmen der OP zu erhöhen (105). Auch bei kardiochirurgischen Eingriffen wie Operationen an der Aorta oder direkt am Herzen wird die tiefe Hypothermie eingesetzt (106) (107). Nach Reanimation von Patienten mit ACS wird seit einigen Jahren eine milde Hypothermie mit Werten zwischen 32°C und 34°C angewandt. Die Kühlung erfolgt extern über Kühlmatten, Coolpacks, und Kühlhauben und intrakorporal über kalte Infusionen oder ein Kathetersystem, an dem das Blut vorbeifließt und dabei gekühlt wird (z. B. CoolGard®). Durch die Hypoxie bei

Kreislaufstillstand wird die Gewebepерmeabilität gesteigert und es kommt zu einem Gewebsödem. Permeabilität und Ödem können durch die Hypothermie reduziert werden (108). Die Wirkung der Hypothermie bezieht sich aber auch auf die Reduzierung des intrakraniellen Drucks (109). Dies ist einer der Mechanismen, der das neurologische Outcome der Patienten nach Hypothermiebehandlung verbessert. Zudem fördert die Hypoxie die Ausschüttung von freien Radikalen und proinflammatorischen Mediatoren. Die Hypothermie vermag dies durch die Hemmung der Genexpression von Zytokinen (110) (111) (112) zu verhindern. Fairchild et al. zeigten, dass die Hypothermie die Genexpression von antiinflammatorischen und antiapoptotischen Enzymen und Mediatoren stimuliert (113), wodurch eine geringere Akkumulation von Leukozyten zu verzeichnen ist (13).

Die Studie von Xie und Li (114). zeigte, dass nach Okklusion der Zerebralarterie einer Ratte für 24 Stunden unter milder Hypothermie mit 33°C die Angiogenese gefördert worden sei. Dies ist einer der wichtigen Effekte, die zur Neuroprotektion beitragen.

Im Jahr 2002 zeigten zwei große Studien aus Europa (115) und aus Australien (116), dass reanimierte Patienten nach einem Herzstillstand einen deutlichen Überlebensvorteil gegenüber normothermen Patienten hatten, wenn die therapeutische Hypothermie eingesetzt wurde (Sterberate: 41% versus 55%; Verbesserung des neurologischen Outcomes 55% gegenüber 39%).

Aufgrund dieser beiden „Hypothermia after cardiac Arrest“ (HACA) Studien wurde im Jahr 2002 die therapeutische milde Hypothermie als Empfehlung in die ILCOR-Guidelines (International Liaison Committee on Resuscitation) zur Behandlung von bewusstlosen Patienten nach prähospitalen Herz-Kreislaufstillstand aufgenommen: „Bewusstlose erwachsene Patienten mit spontaner Zirkulation nach außerhospitalen Herzstillstand sollen für 12-24 Stunden auf 32°C bis 34°C gekühlt werden, wenn die initiale Rhythmusstörung Kammerflimmern war. Eine solche Kühlung könnte ebenfalls vorteilhaft für andere Rhythmusstörungen oder intrahospitalen Herzstillstand sein.“

Indem man dem narkotisierten Patienten eine 4°C kalte Infusionslösung infundiert und zusätzlich mit „Coolpacks“ extern kühlt, kann die „Zieltemperatur“ von 32-34° C erreicht werden. Diese gekühlten Infusionen werden in der Notaufnahme, der Intensivstation und dem Herzkatheterlabor bevorratet. Die therapeutische Hypothermie

sollt über 24 Stunden beibehalten werden. Nach dieser Zeit wird der Patient stufenweise wieder erwärmt (0,4°C/h) und dann die Narkose bei 37°C beendet.

Die Zusatzbemerkung über einen Benefit auch bei anderen Rhythmusstörungen oder intrahospitalem Herzstillstand bezog sich auf die engen Einschlusskriterien der HACA Studien. Studien wie die von Oddo et al. zeigten, dass Patienten nach Reanimation mit persistierendem Schock ein besseres Outcome durch die Hypothermiebehandlung hatten, als unter Normothermie (117). Zudem wurde die milde Hypothermie auch für intrahospitale Reanimationen eingesetzt. Die Number needed to treat (NNT) beträgt 6 (für die Klinikentlassung und für das 6-Monats-Überleben). Dies bedeutet, dass 6 Patienten mittels Hypothermie behandelt werden müssen, damit 1 Patient zusätzlich überlebt, was letztendlich ein sehr gutes Ergebnis darstellt. Die Forschungsgruppe um Kuboyama et al. konnte aufzeigen, wie wichtig die rechtzeitige Einleitung der Hypothermie ist. Bereits eine Verzögerung der Kühlung um 15 Minuten verzögere den positiven Effekt der Hypothermie signifikant (118). Eine retrospektive Studie aus dem Jahr 2004 bezüglich der Kühlung von Patienten nach Reanimation (ROSC) (119) zeigte, dass Patienten, wenn sie unter die Zieltemperatur von 32-34°C gekühlt wurden, ein schlechteres Outcome haben, als wenn sie im Zielbereich liegen. Zudem sind Kammer- und Vorhofflimmern unter 30°C Körpertemperatur zu beobachten, die auf Elektrolytveränderungen zurückzuführen sind. Reulers untersuchte dieses Phänomen und konstatierte ein deutlich geringeres Risiko für diese Veränderungen unter milder Hypothermie bei 32°C (120).

In der neusten S3 Leitlinie von 2010 „Infarkt-bedingter kardiogener Schock -Diagnose, Monitoring und Therapie“ (121) wird die milde Hypothermie bei komatösen Patienten nach kardiopulmonaler Reanimation (CPR) und bei Patienten nach Reanimation bei infarktbedingtem kardiogenen Schock sowohl wegen Kammerflimmerns, als auch nach Asystolie empfohlen. Die Zieltemperatur beträgt 32-34°C und sollte für 12-24 Stunden beibehalten werden. Die Empfehlung über Temperatur und Dauer der therapeutischen Hypothermie beruft sich auf Nolan et al. (122). Sagalyn et al. (123) konstatieren den Überlebensvorteil der Patienten durch therapeutische Hypothermie und ein verbessertes Outcome dank Neuroprotektion unter Hypothermie. Laut einer Studie von Weisser et al. (124) ergibt sich aus der Hypothermie auch eine Myocardprotektion. Ein positiver Effekt der milden Hypothermie wurde im Bezug auf Schlagvolumen, Herzindex und

Herzfrequenz in einer Studie von Schmidt-Schweda et al. (125) nachgewiesen. Da die Kühlung des Patienten bereits in der prähospitalen Situation durchgeführt werden kann (mittels Coolpacks und kalter Infusionen, Kühlmatten, Kühlhauben (126)) ist auch eine Verzögerung der PCI vermeidbar (127) (128).

Es konnte in klinischen Untersuchungen bewiesen werden, dass nicht nur das neurologische Outcome der Patienten nach Reanimation und Therapie mit Hypothermie signifikant verbessert wurde. Es zeigte sich auch sowohl eine kürzere Intensivbehandlungsdauer als auch eine reduzierte Beatmungszeit für die mit Hypothermie behandelten Patienten. Die Überlebenswahrscheinlichkeit nach 2 Jahren stieg signifikant an (127). Zurzeit wird jedoch die milde Hypothermie nur bei reanimierten Patienten durchgeführt. Die Studienlage konnte bis dato bei Herzinfarkt ohne CPR keine Verbesserung zeigen (129).

Es gibt jedoch auch Studien, die den Einsatz der Hypothermie kritisch diskutieren:

Bei Allgemein- und Regionalanästhesie kommt es regelhaft zur Unterkühlung des Patienten (130) was zur Folge hat, dass die Heilung verzögert wird und es häufiger zu Wundheilungsstörungen kommt. Laut Polderman würden jedoch im klinischen Alltag diese Komplikationen selten auftreten, zumal wenn eine milde Hypothermie angewandt würde (131). Hier ist der Angriffspunkt für den Einsatz von GPIIb/IIIa-Inhibitoren. Eine durch Hypothermie ausgelöste Thrombozytenaggregation kann durch den Einsatz von Tirofiban und Eptifibatid reduziert werden (93).

Die Blutungskomplikationen werden zurzeit heftig diskutiert. Schmied et al. und Weber et al. konstatieren, dass es unter therapeutischer milder Hypothermie zu einem vermehrten Blutverlust von bis zu 30% im Vergleich zu normothermen Patienten kommt (132) (133). Dies ist unter anderem auf die Reduzierung vieler enzymatischer Prozesse durch die Hypothermie und die damit verbundene Verminderung der Fibrinogenbindung (94) zurückzuführen. Bei Patienten, mit höherer Kernkörpertemperatur (36,1°C vs. 36,5°C) wurde von Winkler et al. eine intraoperativ verminderte Blutungskomplikationsrate nach Hüft Total Endoprothese (TEP) festgestellt als bei normothermen Patienten (134). Ursächlich dafür könnte eine bei Hyperthermie erhöhte Enzymaktivität sein, die die Gerinnungskaskade beschleunigt und es somit zu einer verminderten Blutungsneigung kommen lässt. Auch Reed et al. konnten diese Theorie bestätigen (135). Insofern wird die therapeutische Hypothermie

als Verursacher von vermehrten intra- oder postoperativen Blutungskomplikationen angesehen. Die Gruppe von Schefold et al. zeigt jedoch im Gegenzug dazu auf, dass eine Kombination aus therapeutischer Hypothermie und Reperfusion mittels PCI oder Thrombolyse kein erhöhtes Blutungsrisiko zur Folge hat (136). Auch in der Studie von Hasper konnte keine signifikante Zunahme von Blutungskomplikationen unter therapeutischer Hypothermie nach PTCA dokumentiert werden (127).

Speziale et al. (137) zeigten, dass es unter hypothermem CPB zu einer Erhöhung der Plättchen-Aktivierung kommt und damit zu erhöhter Thrombus Bildung.

Durch die Hypothermie werde in der Wiedererwärmungs- und Reperfusionphase die Komplementaktivierung deutlich gesteigert mit Aggregation der Granulozyten, was eine Gefahr für Mikroembolien und globale Entzündungsreaktionen darstellt (138) (139) (140).

Als weiterer Kritikpunkt wird festgestellt, dass durch die Hypothermie die Hemmung der proinflammatorischen Antwort gesteigert wird und dass damit die Infektanfälligkeit der Patienten steigt. Bei Kindern geben Studien Hinweise auf vermehrte Komplikationen nach Einsatz der HLM mit milder Hypothermie (141) (142). Hier waren vermehrte Infektanfälligkeit und verlängerte Beatmungszeiten zu beobachten. Poldermann konnte in seiner Studie an Erwachsenen die erhöhte Pneumonierate bestätigen, sah aber kein signifikant schlechteres Outcome als in der Kontrollgruppe (143).

4.2.2 Adhäsionsrezeptoren und Temperatur - vorliegende Studie und Literaturübersicht

Eine der Aufgaben die wir uns stellten war den Einfluss der Hypothermie auf die Expression der monozytären Adhäsionsrezeptoren CD11b, CD54 und CD162 zu untersuchen. Inwieweit ist der Faktor „Temperatur“ verantwortlich für die Expression von Oberflächenmolekülen? Kann durch den Einsatz von Hypothermie eine Inflammation vermindert werden?

4.2.2.1 CD11b

Wir konnten zeigen, dass die Temperatur eine wichtige Einflussgröße auf die Expression des Adhäsionsrezeptors CD11b ist. Die Effektstärke für den Faktor Temperatur betrug 48%. Sowohl bei LOOP, als auch bei STASE fiel die Expression von CD11b signifikant ab, je niedriger die Temperatur wurde.

In der Studie von Mowlavi et al. konnte in einem Tierversuch gezeigt werden, dass die Expression von CD11b auf neutrophilen Granulozyten bei Ischämie nicht signifikant sank. Jedoch zeigte sich bei einer Kombination von Ischämie und Hypothermie eine signifikante Verminderung von CD11b (144). Le Deist et al. (12) erwähnten schon 1995, dass unter milder Hypothermie die Expression von monozytärem MAC-1 unter CPB niedriger war, als unter Normothermie. Auch Hamsch et al. zeigten, dass eine Operation mit der Anlage eines CPB ein Abfallen der CD11b Werte aufwies (145). Weitere Studien belegen in Übereinstimmung mit unserem Ergebnis den Abfall der Expression von CD11b bei Hypothermie (146) (147) (148).

Im Gegensatz dazu gibt es jedoch auch Studien, die ein Ansteigen der Expression von CD11b unter Hypothermie und CPB nachwiesen. Greilich et al. beschäftigen sich mit Operationen am schlagenden Herzen (off pump coronary Bypass) ohne Einsatz einer HLM und stellten fest, dass die Expression von CD11b und von Monozyten-Plättchen-Aggregaten niedriger war unter normothermen off pump Bedingungen, als unter konventioneller hypothermer HLM (149). Kappelmeyer et al. (150) zeigt, dass bei einem in vitro Versuch mit monozytärem MAC-1 die Expression von CD11b mehr von der Temperatur abhing als von dem extrakorporalen Kreislauf. Auch in unserem Studiendesign fand sich beim Vergleich zwischen LOOP und STASE dieser Sachverhalt. Im Unterschied zu unseren Ergebnissen zeigte sich bei Kappelmeyer jedoch, dass in einem simulierten Blutflussmodell bei 37 °C ein minimaler Anstieg der Expression von CD11b in der HLM Simulation stattfindet. Bei 28°C zeigte sich sogar ein deutlicher Anstieg. Ob dieser Unterschied zwischen den Studien darauf zurückzuführen ist, dass die Messungen der Proben nach 2 Stunden Inkubationszeit stattfanden und es somit eine zeitliche Komponente gibt in der Expression der monozytären Adhäsionsrezeptoren bleibt fraglich.

Unter milder Hypothermie beim kardiopulmonalen Bypass zeigten Hill et al. (151) einen deutlichen Anstieg in der CD11b Expression. Diese Erhöhung der

Adhäsionsrezeptoren auf neutrophilen Granulozyten wird auf die Aktivierung durch die bei dem CPB freigesetzten Zytokine zurückgeführt. In der Studie von Parratt und Hunt zeigte sich ein Anstieg von CD11b bei Patienten mit CPB vom Beginn der Operation bis zum Schließen des Brustkorbes (152).

Es stellt sich die Frage, warum in der Literatur so unterschiedliche Ergebnisse zu finden sind. Wahrscheinlich ist der Unterschied multifaktoriell bedingt: Zum einen sind Studiendesign, statistische Auswertung, Patientenzahl und Ausrüstung bei den Studien unterschiedlich, zum anderen unterscheiden sich die Meßmethoden (FACS, ELISA) gravierend voneinander.

Fest steht, dass MAC-1 bei Arteriosklerose vermehrt exprimiert wird ebenso wie bei den Folgekrankheiten: KHK, pAVK, instabiler Angina Pectoris und beim Myokardinfarkt (14) (83) (15). Eine direkte Aktivierung von Faktor X, ausgelöst durch das monozytäre CD11b findet während eines kardiopulmonalen Bypasses statt. Somit wird die Gerinnungskaskade aktiviert.

Wir fanden in unserer Studie, dass durch das Absenken der Temperatur die Expression von CD11b auf Monozyten gesenkt wird und eine Verminderung der Inflammation und damit wahrscheinlich auch der Gerinnungsaktivierung die Folge ist. Demnach wirkt die Hypothermie antiinflammatorisch und dadurch möglicherweise auch antithrombotisch und vermindert die Arteriosklerose.

4.2.2.2 CD54

Die Expression von CD54 auf Monozyten ist in unserer Studie nicht temperaturabhängig. Die Effektstärken für den solitären Faktor „Temperatur“ betrug 6,5% und ist damit sehr gering, zudem konnte man weder bei LOOP, noch bei STASE eine Temperaturabhängigkeit feststellen.

In Klinischen Studien zeigte sich, dass bei Stroke Patienten eine erhöhte Anzahl an löslichem ICAM-1 im Blut gefunden werden kann. Diese vermehrte Expression von CD54 auf Endothelzellen ist auf ein Gefäßwandtrauma zurückzuführen (153). Die Expression von ICAM-1 und VCAM1 ist zudem in arteriosklerotischen Plaques besonders hoch. Es kommt nach inflammatorischen Prozessen zu einer verstärkten Expression dieser Moleküle, die sich für die transendotheliale Migration von Leukozyten verantwortlich zeigen (44). Zudem gibt es zwischen Thrombozyten und

Leukozyten eine Interaktion, die durch ein ACS gesteigert (83) und über ICAM-1 vermittelt wird (154) (155) (61). Viele Studien zeigen, dass Hypothermie die Expression von ICAM verhindern könne (153) (13) (145). Auch Deng et al. (13) fanden in ihren Studien, dass die therapeutische milde Hypothermie nach Schlaganfall einen antiinflammatorischen Effekt aufweist und die CD54 Expression vermindert. ICAM-1 ist bei Hypothermie vermindert festgestellt worden und damit auch die Entzündungsantwort des Körpers (156). Hamsch et al. zeigten, dass eine Operation mit der Anlage eines CPB ein abfallender CD54 Werte aufzeigte (145). Wang et al. beschreiben dass bei Versuchen an Ratten eine milde Hypothermie signifikant die ICAM-1 Expression und die Monozyten-Infiltration reduziert (157).

Hier stellt sich die Frage, wieso wir keine Veränderungen in der Expression von CD54 durch den Einsatz von milder oder tiefer Hypothermie feststellen konnten. Wang et al. nutzen die Immunhistochemie um die Adhäsionsrezeptoren auf Monozyten zu messen. In anderen Studien wurden ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) und LSCM (Laser scanning confocal microscopy) genutzt. Unser Messverfahren war die Durchflußzytometrie. Es ist möglich, dass sich hieraus Unterschiede in den Ergebnissen herleiten lassen. Des Weiteren können sich Unterschiede in den Ergebnissen durch unterschiedliche Versuchsaufbauten ergeben. Wang et al. hielten unter ischämischen Bedingungen an einer lebenden Ratte 2 Stunden lang eine milde Hypothermie bei 30°C (rektal gemessene Temperatur) aufrecht. In unserem Versuchsaufbau STASE hielten wir ca. 60 Minuten und beim LOOP Versuchsaufbau ca. 90 Minuten Hypothermie bei 18°C und 28°C aufrecht. Zudem war z. B. bei der Arbeit von Wang et al. eine weitere zeitliche Komponente beteiligt, indem dort am 1, 3, und 7 postischämischen/posthypothermen Tag Messungen vorgenommen wurden während unsere Messungen ca. 30 Minuten nach Beendigung der Versuche stattfanden.

Aufgrund all dieser Faktoren können wir unser Ergebnis nicht mit den anderer Studien direkt vergleichen. Eine immunologische Begründung für den in unserer Studie fehlenden Einfluss der Hypothermie auf CD54 können wir nicht finden.

4.2.2.3 CD162

Auch wenn die Ergebnisse unserer statistischen Analysen für die Expression von CD162 nicht ganz einheitlich sind, konnten wir bei fast allen Berechnungen zeigen, dass die Expression des monozytären CD162 direkt temperaturabhängig ist. Die Effektstärke betrug 51% und zeigt dass der Faktor „Temperatur“ ein starker Auslöser ist für die Expression des CD162. Je niedriger die Temperatur, umso niedriger die Expression des Oberflächenmarkers.

Es gibt relativ wenige Studien zum Einfluss von Hypothermie auf CD162, obwohl dieser Adhäsionsrezeptor immer wieder durch seine Interaktion mit Thrombozyten und der inflammatorischen Antwort des Organismus auf Stress auf sich aufmerksam macht. CD162 ist als monozytärer Marker für das „Rollen“ der Leukozyten auf dem Endothel verantwortlich. Zudem ist er ein wichtiger Faktor für die Thrombozyten-Leukozyten Interaktion, indem CD162 an CD62 bindet. McEver et al. berichten von der Wichtigkeit des PSGL-1 in der Leukozyt-Leukozyt, Leukozyt-Thrombozyt, und Leukozyt-Endothelzell Interaktionen (158). Damit kann CD162 auf eine Interaktion zwischen Inflammationsantwort und Gerinnungsgeschehen hinweisen. Frenette et al. zeigte auf, dass das alleinige Vorhandensein von PSGL-1-Rezeptoren keine Aussage über seine Funktionalität mache. Zuerst müsse dieser aktiviert werden, um wirken zu können (159). Nach zerebraler Ischämie bei TIA oder Schlaganfall wurden signifikant erhöhte Leukozyten-Thrombozyten-Aggregate via CD62 und CD162 gefunden (160). Faraday et al. fanden eine über CD162 vermittelte erhöhte Leukozyten-Thrombozyten-Aggregation bei instabiler Angina Pectoris und nach CPB (161), In der Studie von da Costa Martins et al. wurde die Bindung zwischen Monozyten und Thrombozyten betrachtet und gezeigt, dass über CD162 die Vernetzung von Monozyten an das Endothel stärker ist, wenn sie aus einem Monozyten-Thrombozyten Verband heraus geschieht, als wenn sie von einen einzelnen Monozyten ausgeht (162). In einer Studie der Universität Freiburg konnten bei Vergleichen nach Blutentnahmen von Patienten nach Reanimation und einer Kontrollgruppe ohne Reanimation keine erhöhte CD162 Expression gemessen werden (163). In all diesen Studien wurde der Einfluss der Temperatur nicht gesondert gemessen.

In einer bei ebenfalls unserem Patientenkollektiv durchgeführten Studie (93) zeigte sich, dass sich durch Hypothermie wie sie bei HLM oder nach Koronarangiographie

durchgeführt werden, eine Thrombozytenaktivierung mit einer gesteigerten Expression von P-Selektin ergibt. Durch Tirofiban und Eptifibatid wurde die Thrombozyten-Leukozyten Interaktion unter EKZ-Bedingungen (LOOP) gehemmt, während sie bei Stillstand (STASE) wenig beeinflusst wurde. Ebenso durch Hypothermie induziert wurde ein Anstieg der Thrombozytenaggregate mit gesteigerter GPIIb/IIIa Aktivität durch Hall et al. gefunden, der HIPA (Hypothermia induced platelet aggregation) genannt wird (164). Durch Tirofiban oder EDTA konnte diese HIPA gehemmt werden. Hauptmerkmal dieser Studien waren die Einflüsse der Hypothermie auf thrombozytäres CD162.

In unserer Studie zeigten sich vor allem eine durch Temperatureinfluss zustande kommende Änderungen in der Expression von monozytärem CD162. Unter hypothermen Bedingungen kam es zu erniedrigter CD162 Expression. Der Marker CD162 interagiert mit CD62 und schafft eine Leukozyt-Leukozyt und Thrombozyten-Monozyten-Aggregation. Die o.g. Studien beschreiben durch Hypothermie eine ansteigende Rate dieser Aggregate. Demzufolge kann nicht allein anhand der CD162 Expression auf Monozyten auf die Anzahl der Monozyten Thrombozyten-Aggregate geschlossen werden.

Die in unserer Studie gezeigte Reduzierung von CD162 auf Monozyten deutet darauf hin, dass die Hypothermie eine antiinflammatorische Wirkung hervorruft und somit möglicherweise zu einer Verminderung von kardialen Ereignissen führen kann.

4.3 Einfluss und Vergleich von LOOP und STASE auf die Expression der monozytären Adhäsionsrezeptoren CD11b, CD54 und CD162

4.3.1 Einfluss der Fremdkörperaktivierung - Allgemeines

Die Herz Lungen Maschine ist schon lange als Aggressor in der Immunologie bekannt, denn der Einsatz der HLM hat schwerwiegende Folgen für das Gerinnungs- und Entzündungssystem (165) (166): Es kommt zur Bildung und Freisetzung von Sauerstoffradikalen und Stickoxiden, zur Aktivierung des Endothels und Leukozytenaktivierung und Expression ihrer Adhäsionsmoleküle, zur Zytokinbildung, zur Aktivierung proteolytischer Enzyme sowie Stimulierung des Arachidonsäurezyklus mit nachfolgender Thrombozytenaktivierung, zur Freisetzung von Endotoxin und zur Aktivierung der Gerinnungskaskade und des fibrinolytischen Systems (167) mit zusätzlicher Aktivierung des Komplementsystems (168). Der mechanische Bluttransport bedingt für das Blut erhöhte Scherkräfte und den Kontakt des Blutes mit nicht endothelialen Oberflächen. Durch die unphysiologische Bewegung des Blutes in den Plastikschläuchen kommt es zu winzigen Luftbläschen und einer Kumulation von Fibrinpartikeln im zirkulierenden Blut (169). Durch den Einsatz der HLM kommt es deshalb zu einer Ganzkörperentzündungsreaktion (170), deren Ausmaß von der Dauer des Fremdkörperkontaktes abhängt (171). Aber auch der Einsatz einer intrakorporalen Kühlung mit Blutkontakt mit der Katheteroberfläche führt zu immunologischen und rheologischen Komplikationen: Nach Kontakt des Blutes mit künstlichen Oberflächen erfolgt eine Plättchenaktivierung, Start der Koagulationskaskade und eine Entzündungsreaktion durch Leukozytenaktivierung (172). Das körpereigene Plasma-mediatoren-system wird durch die HLM aktiviert, vor allem das Komplement-, Gerinnungs-, Fibrinolyse- und Kallikrein-Kinin-Kaskadensystem (173).

Die Faktoren C3b und C5a wirken auf die Thrombozyten ein und bewirken eine Thrombozytenaggregation, die Freisetzung von Serotonin und die Synthese von Arachidonsäuremetaboliten. Verletzungen der Endothelwand ziehen unter physiologischen Bedingungen eine Thrombozytenadhäsion und -aggregation nach sich. Durch die Freisetzung von Kollagen, vWF und weiteren Substanzen werden

Thrombozyten angelockt und über den GPIIb/IIIa Rezeptor gebunden. Aktivierte Thrombozyten binden Leukozyten und es entstehen Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate. Die Studie von Ferroni und Speziale hat gezeigt, dass ausgelöst durch die CPB-Operation eine Korrelation zwischen Plättchen Aktivierung und Zytokin Ausschüttung besteht (174).

4.3.2 Einfluss der Fremdkörperaktivierung - vorliegende Studie und Literaturübersicht

Eines der Probleme, die wir in unserer Studie betrachten wollen ist die Tatsache, dass der Kontakt des menschlichen Blutes mit der unphysiologischen Oberfläche der Plastikschläuche und die erhöhten Scherkräfte eine Entzündungsreaktion des Organismus ausübt (172). Durch die HLM werden über das Komplementsystem die Leukozyten aktiviert und es kommt zu einer Freisetzung von Zytokinen und Leukozytenadhäsionsmolekülen (175) (176) (177).

Eine wichtige Frage dieser Arbeit war: Kann die Aktivierung von Monozyten bei Hypothermie durch die „Behandlung“ des Blutes beeinflusst werden, das heißt: ändert sich die Aktivierung der Monozyten dadurch, dass das Blut in einem Schlauchsystem rotiert? In dem Versuchsaufbau der vorliegenden Studie wurde die Expression der Adhäsionsrezeptoren CD11b, CD54 und CD162 auf Monozyten durch den direkten Vergleich zwischen LOOP und STASE untersucht. Bei beiden Versuchsmodellen erfolgt ein Kontakt des Blutes mit einer Fremdoberfläche (Plastikschlauch), im LOOP Versuchsaufbau kommt aber eine Erhöhung der Scherkräfte hinzu, wie dies beispielsweise beim Einsatz der HLM erfolgt. Die Untersuchungen erfolgten zum einen bei Hypothermie zum anderen bei Normothermie.

Indem man Blut einer künstlichen Oberfläche aussetzt, gibt es eine Leukozytenaktivierung (178). Die Leukozytenadhäsion hat wiederum ihrerseits eine Reihe von Zell-Zell Kontakten, Wechselwirkung mit Thrombozyten sowie eine Entzündungsreaktion zur Folge. Es entsteht durch die Aussetzung des Blutes mit einer Fremdoberfläche eine inflammatorische Kaskade mit Thrombozytenaggregation (179) (170) (180) und Chemotaxis der Leukozyten in Richtung der höchsten Komplementkonzentration (181).

Das sogenannte „postperfusion syndrome“ oder „post-pump syndrome“ bezeichnet ein Symptomkomplex nach CPB und HLM Einsatz, der mit kognitiven Störungen und pulmonalen, renalen und kardialen Organdysfunktionen einhergehen kann. Freie Radikale werden als Schuldige für diese generalisierte inflammatorische Fehlfunktion angesehen. Oftmals steht ein Multiorganverfahren am Ende dieser Reaktion (182) (168).

4.3.2.1 CD11b

Wir konnten zeigen, dass die Expression des Adhäsionsrezeptors CD11b mit 20% Effektstärke deutlich von der Behandlungsart LOOP und STASE abhängt und, dass fast durchgängig signifikant erhöhte Werte für die Expression von CD11b im Chandler Loop Modell zu finden sind, verglichen mit dem Versuchsaufbau STASE. Die Aktivierung der Monozyten durch die Bewegung in den Schläuchen und die Oberflächenaktivierung durch das Plastik haben eine Erhöhung der CD11b Werte zur Folge. Die Literaturübersicht ergibt ähnliche Ergebnisse.

Laut Stent und Crowe (183) erhöhte die Isolierung mittels Plastikadhärenz die Expression von CD11b. Macey et al. beobachteten eine CD11b Erhöhung nach Dichte-Gradienten-Zentrifugation über Ficoll (184). Greilich et al. beschäftigen sich mit Operationen am schlagenden Herzen (off pump coronary Bypass). Sie stellten fest, dass die Expression von CD11b ohne Einschaltung einer HLM niedriger ist, als mit Nutzung der HLM (149). Dies beweist den zusätzlichen Aktivierungsstress durch die Fremdkörperaktivierung der HLM.

Interessant sind die Ergebnisse von Ott et al. (185) und Meisel et al. (186) die feststellten, dass nach AMI und PTCA die Expression von CD11b deutlich erhöht ist. Wohingegen die Kontrollgruppe ohne AMI aber mit elektiver PTCA keinen Anstieg von CD11b zu verzeichnen hatte. Der Einfluss der Ischämie durch den AMI ist also auf die Expression von CD11b wichtiger, als die Fremdkörperaktivierung durch die PTCA.

4.3.2.2 CD54

Der Einfluss der Behandlungsart LOOP oder STASE hatte mit 6% eine zwar signifikante, aber dennoch eher geringe Effektstärke. Obwohl es einen schwach sichtbaren Trend zu erhöhten Expressionswerten für CD54 unter LOOP gibt, konnten

wir keine signifikanten Ergebnisse beim direkten Vergleich zwischen LOOP und STASE finden.

ICAM-1 (CD54) ist für die Transmigration von Monozyten durch die Endothelwand zuständig (44). Zudem bindet ICAM-1 an Fibrinogen, wodurch eine Fibrinogen-Endothelzell Bindung an der Gefäßwand entsteht, die dadurch zur Thrombozytenadhäsion beiträgt (187). Im Gegenzug induzieren aktivierte Plättchen die Sekretion von ICAM-1 auf Endothelzellen *in vitro* (188). ICAM-1 spielt eine wichtige Rolle bei Entzündungsprozessen und in T-Zell vermittelten Abwehrreaktionen (189). Nach Trauma der Gefäßwand wird vermehrt ICAM-1 auf Monozyten exprimiert. Beispielsweise war ICAM-1 bei Patienten mit Subarachnoidalblutung signifikant erhöht (190). Bei *in vivo* und *in vitro* Studien zeigte sich, dass Scherkräfte an der Endothelwand zu einer vermehrten ICAM-1 Expression führten (191) (56). Auch in arteriosklerotischen Plaques findet sich diese gesteigerte Expression des Markers. Collard und Gelman beschreiben, dass durch Komplementfaktoren - wie sie z.B. durch die HLM aktiviert werden - die Transkription und Expression von Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, VCAM1 E und P Selektin) gesteigert wird (192) (193). Auch Stent und Crowe untersuchten (183) die Expression von CD54 und fanden eine Erhöhung des Adhäsionsrezeptors nach Plastikadhärenz. Die Studiengruppe von Xiao (194) konnte zeigen, dass es bei Durchführung eines kardiopulmonalen Bypasses zu erhöhten Werten von sICAM-1 kommt.

Im Gegenzug konnte eine Studie aus unserer Arbeitsgruppe aufzeigen, dass die Nutzung von koronaren Stents keinen aktivierenden Einfluss auf die c-ICAM-1 Expression der Leukozyten hat (195).

Obwohl in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der in der Literatur beschriebenen Untersuchungen der Einfluss der Behandlungsart LOOP oder STASE in der vorliegenden Studie mit 6% eine signifikante Effektstärke aufweist, konnte beim direkten Vergleich zwischen LOOP und STASE nur ein Trend zu einer erhöhten CD54 Expression auf Monozyten gefunden werden. Möglicherweise kam es nicht zu einem eindeutigeren Ergebnis aufgrund der geringen Probandenanzahl in unserer Studie. Vielleicht sind zudem die Ergebnisse durch die Messung *in vitro* unterschiedlich zu den in anderen Studien erfolgten Messungen *in vivo*. Vielleicht sind die unterschiedlichen Ergebnisse zu den Literaturangaben darauf zurück zu führen, dass in einigen Studien die

Expression von CD54 auf Leukozyten gemessen wurden. Studien von Kawamura et al. und Hoffman et al. verglichen die ICAM-1 Expressionen bei Patienten mit Koronarer Herzkrankheit und akutem Myokardinfarkt mit gesunden Kontrollprobanden. Es konnten erhöhte ICAM-1 Expressionen auf Monozyten gemessen werden, jedoch nicht auf Lymphozyten oder Granulozyten (196) (197). Die Expression des Adhäsionsrezeptors CD54 scheint sehr unterschiedlich auf den verschiedenen Zellreihen zu reagieren. Genaue Vergleiche der Ergebnisse fallen deshalb sehr schwer.

4.3.2.3 CD162

Bei den Ergebnissen zur Expression von CD162 auf Monozyten zeigte sich statistisch ein grenzwertig signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungsarten. Die Effektstärke war jedoch mit 4% sehr gering. Beim direkten Vergleich zwischen LOOP und STASE war ebenfalls ein Trend zur erhöhten Expression unter LOOP zu verzeichnen, wenngleich das Ergebnis nicht signifikant war.

Das „Rollen“ der Leukozyten auf dem Endothel wird über das Oberflächenmolekül CD162 vermittelt. Zudem hat CD162 eine wichtige Bedeutung in der Thrombozyt-Leukozyt und Leukozyt-Leukozyt Interaktion (158). Damit kann CD162 auf eine Interaktion zwischen Inflammationsantwort und Gerinnungsgeschehen hinweisen.

Die Datenlage ist zu diesem Thema sehr gering.

In der Studie von Sbrana et al. von 2007 konnte gezeigt werden, dass die Expression von CD162 auf Monozyten nach kardiopulmonalem Bypass mit extrakorporaler Zirkulation deutlich gesteigert war (198). Michelson beschreibt beim kardiopulmonalen Bypass und beim akuten Koronarsyndrom die Induzierung einer Plättchen-Leukozyten Adhäsion über CD162 (199). In Studien mit Endotoxin-Infusion an Patienten und bei in vitro Studien fanden Marsik et al. eine Herunterregulierung der CD162 Expression auf Monozyten und eine Erhöhung des löslichen CD162 im Blut vor (200). Kharazmi berichtet von einer durch die HLM induzierte Endotoxinfreisetzung (167), so dass man schließen könnte, dass durch die HLM die Expression von CD162 reduziert sei. Andererseits führt aber möglicherweise die ACB-OP an sich, unabhängig vom extrakorporalen Kreislauf der HLM, zu einer gesteigerten Expression von CD162 auf Monozyten

Insofern sind die Angaben in der Literatur äußerst spärlich und kontrovers. Bei unserer Studie konnten leicht erhöhte Werten der monozytären CD162 Expression im LOOP-System gefunden werden, als Zeichen einer erhöhten Expression bei Fremdoberflächenkontakt und erhöhtem Scherstress.

4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zuerst beschäftigten wir uns in unserer Studie mit der Frage nach dem Einfluss der GPIIb/IIIa Rezeptorantagonisten auf die Expression der Adhäsionsmoleküle CD11b, CD54 und CD162 auf Monozyten. Die Studienmedikamente Eptifibatid und Tirofiban wurden verwendet, ebenso wie NaCl als Kontrollsubstanz. Dabei zeigte sich, dass keine der zugefügten Substanzen einen signifikanten Effekt auf die Expression der gemessenen Adhäsionsmoleküle hatte. Der Einsatz der GPIIb/IIIa Antagonisten kann also im Bezug auf die Monozytenaktivierung problemlos angewandt werden. Einen Hinweis auf ein hierdurch hervorgerufenen proinflammatorischen Geschehen ergab sich nicht.

Des Weiteren untersuchten wir den Einfluss der Temperatur auf die Expression der monozytären Adhäsionsmoleküle CD11b, CD54 und CD162. Zusammenfassend lassen sich folgende Ergebnisse beschreiben. Durch den Einsatz der Hypothermie kann die Expression der Oberflächenmarker CD11b und CD162 temperaturabhängig moduliert werden. Je tiefer die Temperatur gewählt wurde, desto geringer war die Expression der Rezeptoren. Durch eine Minimierung der CD11b Rezeptoren ergeben sich eine verminderte Gerinnungsaktivierung und eine Reduzierung der Thrombozyten-Monozyten-Aggregate. Auch durch die Verminderte Expression von CD162 werden Thrombozyten-Monozyten-Aggregate vermindert. Dies könnte zu einer verminderten Thrombusbildung führen. Zudem wird das Inflammationsgeschehen reduziert indem CD11b und CD162 vermindert exprimiert werden. Die Rollbewegung der Monozyten auf der Endothelwand wird durch weniger Bindungspartner reduziert und somit wird die Transmigration der Monozyten vermindert. Durch die Hypothermie wird die Kaskade von Arteriosklerose-Plaques-Thrombus-Myokardinfarkt-Inflammation unterbrochen und wirkt somit antithrombotisch, antiinflammatorisch und dadurch möglicherweise kardioprotektiv.

Durch den Einsatz des Chandler Loop Modells simulierten wir eine extrakorporale Zirkulation. Dabei zeigten unsere Ergebnisse, dass die Expression von CD11b stark durch diese Stimulation aktiviert wird. Die Ergebnisse für die Parameter CD54 und CD162 lassen einen Trend zu erhöhten Werten im LOOP-System erkennen.

Folge dessen ist eine Aktivierung des Gerinnungsgeschehens, Vermehrung der Thrombozyten-Monozyten-Aggregate und der Start einer inflammatorischen Kaskade über die Monozytenadhäsion an die Endothelwand. Diese Ergebnisse belegen, dass die durch den Einsatz der HLM beschriebenen prothrombotischen und proinflammatorischen Effekte zumindest zum Teil durch eine Monozytenaktivierung hervorgerufen sind.

5 Anhang

Die Werte, die in unserer Studie zur Statistik herangezogen wurden, sind alle in MY (Median der Fluoreszenzintensität aus 10 000 gemessenen Zellen) angegeben.

Gezeigt werden die mittels des Programm JMP angegebenen Werte:

n= Anzahl der Probanden, Mean= Mittelwert, SD= Standardabweichung, SE= Standardfehler, Median= Median, Min= Minimum, Max= Maximum.

CD11b	LOOP							
NaCl		n	Mean	SD	SE	Median	Min	Max
	18°C	4	15,6	4,33	2,2	2,16	11	21
	28°C	6	12,95	5,89	2,7	16,35	6	23
	36°C	6	25,4	9,64	3,9	22,45	18	44
Tirofiban		n	Mean	SD	SE	Median	Min	Max
	18°C	4	16,2	2,4	1,2	17,1	13	18
	28°C	6	13,6	5,93	2,4	13,05	5,9	24
	36°C	6	21,7	8,21	3,4	20,05	13	36
Eptifibatid		n	Mean	SD	SE	Median	Min	Max
	18°C	6	12,6	3,35	1,4	12,7	7,2	17
	28°C	6	19,8	4,25	1,7	19,2	15	27
	36°C	6	27,5	11,7	4,8	25,8	16	48

CD11b	STASE							
NaCl		n	Mean	SD	SE	Median	Min	Max.
	18°C	10	7,77	1,15	0,6	7,78	6,6	12
	36°C	11	19,60	4,01	1,5	20,5	14	31
Tirofiban		n	Mean	SD	SE	Median	Min	Max.
	18°C	11	7,49	1,4	0,4	7,7	5,1	10
	36°C	11	18,4	3,9	1,2	18,5	9,4	24
Eptifibatid		n	Mean	SD	SE	Median	Min	Max.
	18°C	11	8,78	1,9	0,6	9,47	5	11
	36°C	11	20,5	5,7	1,7	22,1	13	29

CD54	LOOP							
NaCl		n	Mean	SD	SE	Median	Min	Max.
	18°C	4	4,82	1,14	0,6	4,85	3,7	5,9
	28°C	6	4,8	1,07	0,4	4,56	3,4	6,1
	36°C	6	5,62	1,15	0,5	5,9	4,2	7,2
Tirofiban		n	Mean	SD	SE	Median	Min	Max.
	18°C	11	4,54	1,04	0,3	4,47	3,1	6,2
	28°C	6	4,95	1,06	0,4	4,75	3,5	6,7
	36°C	6	5,26	0,99	0,4	5,24	4,1	6,8
Eptifibatid		n	Mean	SD	SE	Median	Min	Max.
	18°C	6	5,18	1,09	0,5	5,03	4,1	6,7
	28°C	6	5,3	0,66	0,3	5,01	4,7	6,4
	36°C	6	6,78	3,33	1,4	5,96	4,2	13

CD54	STASE							
NaCl		n	Mean	SD	SE	Median	Min	Max
	18°C	10	4,44	1	0,3	4,28	3,3	6,5
	36°C	11	5,02	1	0,3	4,97	3,6	6,4
Tirofiban		n	Mean	SD	SE	Median	Min	Max
	18°C	11	4,54	1	0,3	4,47	3,1	6,2
	36°C	11	4,8	0,9	0,3	4,96	3,6	6,1
Eptifibatid		n	Mean	SD	SE	Median	Min	Max
	18°C	11	4,7	0,8	0,3	4,76	3,5	6,3
	36°C	10	4,67	0,9	0,3	0,3	3,2	6,5

CD162	LOOP							
NaCl		n	Mean	SD	SE	Median	Min	Max.
	18°C	4	19,7	6,01	3	20,35	12	26
	28°C	6	24,3	7,38	3	26,15	12	31
	36°C	6	30,6	4,72	1,9	31	23	37
Tirofiban		n	Mean	SD	SE	Median	Min	Max.
	18°C	11	20	4,4	1,3	18,3	15	27
	28°C	5	28,2	6,07	2,7	27,3	20	35
	36°C	6	31,7	7,38	3	31,25	21	44
Eptifibatid		n	Mean	SD	SE	Median	Min	Max.
	18°C	6	18,5	4,4	1,8	20,3	12	22
	28°C	6	29,7	7,03	2,9	31,05	18	38
	36°C	6	32,2	5,74	2,3	33,8	21	36

CD162	STASE							
NaCl		n	Mean	SD	SE	Median	Min	Max.
	18°C	10	16,7	3,6	1,1	16,35	9,1	22
	36°C	10	27,6	5,6	1,8	29,75	17	34
Tirofiban		n	Mean	SD	SE	Median	Min	Max.
	18°C	11	20	4,4	1,3	18,3	15	27
	36°C	10	28,5	3	1	29,3	21	31
Eptifibatid		n	Mean	SD	SE	Median	Min	Max.
	18°C	11	18,3	3,5	1,1	18,2	13	24
	36°C	9	28,2	3,8	1,3	28,9	20	33

6 Literaturverzeichnis

1. **Holmes, DR, et al.** Difference in countries' use of resources and clinical outcome for patients with cardiogenic shock after myocardial infarction: results from the GUSTO trial. *Lancet* 1997; 349: 75-78.
2. **Atwood, C, et al.** Incidence of EMS-treated out-of-hospital cardiac arrest in Europe. *Resuscitation* 2005; 67: 75-80.
3. **de Vreede- Swagemakers, JJ, et al.** Out of hospital cardiac arrest in the 1990`s: a population- based in the Maastricht area on incidence, characteristics and survival. *Journal of the American College of Cardiology* 1997; 30: 1500-1505.
4. **Nolan, J.** European Resuscitation Council guidelines for resuscitation. *Resuscitation* 2005; 67: 3-6.
5. **Trappe, HJ.** Prä- oder intrahospitaler Herz-Kreislaufstillstand. Häufigkeit- Ergebnisse - Perspektiven. *Kardiologie* 2009; 3: 37-46.
6. **Andresen, D.** Epidemiologie des plötzlichen Herztodes: wer ist gefährdet? *Intensivmed* 2007; 44: 188-193.
7. **Killip, T.** Cardiogenic shock complicating myocardial infarction. *Cardio J Am Coll* 1989; 14: 47-48.
8. **Mills, P, et al.** Peripheral blood mononuclear cell CD62L and CD11a expression and soluble interstitial cell adhesion molecule-1 levels following infused isoproterenol in hypertension. *J Hypertension* 2002; 20: 311-316.
9. **Dörffel, Y, et al.** Preactivated monocytes from hypertensive patients as a factor for atherosclerosis? *Atherosclerosis* 2001; 157: 151-160.
10. **Dörffel, Y, et al.** Preactivated peripheral blood monocytes in patients with essential hypertension. *Hypertension* 1999; 34: 113-117.
11. **Scannell, G, et al.** Effects of trauma on leukocyte intercellular adhesion molecule-1, CD11b, and CD18 expressions. *J Trauma* 1995; 39: 641-644.
12. **Le Deist, F, et al.** Hypothermia during cardiopulmonary bypass delays but does not prevent neutrophilendothelial cell adhesion: A clinical study. *Circulation* 1995; 92: 354-358.
13. **Deng, H, et al.** Mild hypothermia inhibits inflammation after experimental stroke and brain inflammation. *Stroke* 2003; 34: 2495-2501.

14. **de Servi, S, et al.** Expression of neutrophil and monocyte CD11B/CD18 adhesion molecules at different sites of the coronary tree in unstable angina pectoris. *Am J Cardiol* 1996; 78: 564-568.
15. **Mazzone, A, et al.** Increased expression of CD11b/CD18 on phagocytes in ischaemic disease: a bridge between inflammation and coagulation. *Eur J Clin Invest* 1997; 27: 648-652.
16. **Libby, P, Aikawa, M und Jain, MK.** Vascular endothelium and atherosclerosis. *Handb Exp Pharmacol* 2006; 176 : 285-306.
17. **Nakashima, Y, et al.** Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 842-851.
18. **Steffel, J, Luscher, TF und Tanner, FC.** Tissue factor in cardiovascular diseases: molecular mechanisms and clinical implications. *Circulation* 2006; 113: 722-731.
19. **Erdmann, E.** *Klinische Kardiologie*. Heidelberg: Springer Verlag, 2011. 650 Seiten.
20. **Eltchaninoff, H, et al.** Early and 1-year survival rates in acute myocardial infarction complicated by cardiogenic shock: A retrospective study comparing coronary angioplasty with medical treatment. *Am Heart J* 1995; 130: 459-464.
21. **GUSTO Study.** Global Utilization of Streptokinase & t-PA for Occluded Coronary Arteries- comparison of four therapeutic strategies in acute myocardial infarction. *Internist* 1993; 34: 1-12.
22. **Krakau, I und Lapp, H.** *Das Herzkatheterbuch*. Stuttgart: Thieme Verlag, 2009. 448 Seiten.
23. **Gerok, W (Her.).** *Die innere Medizin*. Stuttgart: Schattauer Verlag, 2007. 1679 Seiten.
24. **Arntz, HR.** Prähospitale Versorgung von Patienten mit akutem ST-Streckenhebungsinfarkt. *Z Kardiol* 2004; 93: 915-916.
25. **Silber, S, et al.** Guidelines for percutaneous coronary interventions. *Eur Heart J* 2005; 26: 804–847.
26. **Gemeinsamer Bundesausschuss, Berlin.** *Qualitätsreport* Herausgeber: QUA–Institut für angewandte Qualitätsförderung und Forschung im Gesundheitswesen GmbH, 2009. 164 Seiten.

27. **Kirklin, JK und Blackstone, EH.** Cardiopulmonary Bypass: Studies on its damaging effects. *Blood Purif* 1987; 5: 168-178.
28. **Wan, S, et al.** Heparincoated circuits reduce myocardial injury in heart or heart-lung transplantation: a prospective, randomized study. *Ann Thorac Surg* 1999; 68: 1230-1235.
29. **Chello, M, et al.** Pressure distension stimulates the expression of endothelial adhesion molecules in the human saphenous vein graft. *Ann Thorac Surg* 2003; 76: 453-458.
30. **Homepage des Universitätsspitals Zürich, Abteilung Kardiotechnik.**
<http://www.herzgefassschirurgie.usz.ch>. [Online] 11. August 2011.
31. **Gregory, RT und Paton, JF.** Treatment after exposure to cold. *Lancet* 1972; 1: 377-378.
32. **Biegelow, WG, Lindsay, WK und Greenwood, WF.** Hypothermia; its possible role in cardiac surgery: an investigation of factors governing survival in dogs at low body temperatures. *Ann Surg* 1950; 132: 849-866.
33. **Egger, G.** *Die akute Entzündung*. Wien: Springer Verlag, 2005. 328 Seiten.
34. **Rump, G.** *Transfusionsmedizin compact*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2003. 190 Seiten.
35. **Janeway, CA und Travers, P.** *Immunologie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 1997. 597 Seiten.
36. **van Furth, R und Gallin, J.** Phagocytotic cells: development and distribution of mononuclear phagocytosis in normal steady state and inflammation: Basis Principles and Clinical Correlates. *Eds Raven Press* 1988; 1: 218-283.
37. **Müller-Eckhardt, C.** *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie*. [Hrsg.] V Kiefel. Heidelberg: Springer Verlag, 2010. 642 Seiten.
38. **Robbins, SL, et al.** *Robbins Pathologic Basis of Disease*. London: W. B. Saunders, 1999. 1425 Seiten.
39. **Hoffbrand, AV.** *Grundkurs Hämatologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2002. 359 Seiten.
40. **Zettl, UK, Mix, E und Lehmitz, R.** *Klinische Liquordiagnostik*. Berlin: Walter de Gruyter Verlag, 2005. 517 Seiten.

41. **Siegenthaler, W.** *Klinische Physiologie und Pathologie des Wasser- und Salzhaushaltes mit besonderer Berücksichtigung der Beziehungen Aldosteron, Ödeme, Diuretica.* Heidelberg: Springer Verlag, 1961. 175 Seiten.
42. **Ley, K, et al.** Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Reviews Immunology* 2007; 7: 6786-89.
43. **Andrian, UH und Mackay, CR.** T-Cell Function and Migration. *NEJM* 2000: 343: 1020-1034.
44. **Carlos, TM und Harlan, JM.** Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 1994; 84: 2068-2101.
45. **Bendas, G.** Adhäsionsrezeptoren: Selektine als neue Zielstrukturen für die Pharmaforschung. *Pharm Ztg* 1999; 46: 10-16.
46. **Wimmer, W, et al.** Origin of the integrin-mediated signal transduction. Functional studies with cell cultures from the sponge *Suberites domuncula*. *Eur J Biochem* 1999; 260: 156-165.
47. **Hynes, RO.** Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992; 69: 11-25.
48. **Larson R, Springer T.** Structure and function of leukocyte integrins. *Immunol Rev* 1990; 114: 181–217.
49. **Inoue, T, et al.** Lower expression of neutrophil adhesion molecule indicates less vessel wall injury and might explain lower restenosis rate after cutting balloon angioplasty. *Circulation* 1998; 97: 2511-2518.
50. **Gumbiner, BM.** Cell adhesion: Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6: 622-634.
51. **Trowbridge, IS und Thomas, M. L.** CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosph. *Annu Rev Immunol* 1994; 12: 85-116.
52. **Solovjov D, Pluskota E, Plow E.** Distinct roles for the alpha and beta subunits in the functions of integrin alphaMbeta2. *J Biol Chem* 2005; 280: 1336-1345.
53. **Dudeck, A und Leist, M.** Immature mast cells exhibit rolling and adhesion to endothelial cells and subsequent diapedesis triggered by E- and P-selectin, VCAM-1 and PECAM-1. *Experimental Dermatology* 2010; 19: 424-434.
54. **Yang, L., et al.** ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF-alpha-activated vascular endothelium under flow. *Blood* 2005; 106: 584-592.

55. **Moore, KL.** Structure and Funktion of P-Selektin Glycoprotein Ligand-1. *Leukemia and Lymphoma* 1998; 29: 1-15.
56. **Colman, RW, et al.** *Overview of Hemostasis: basic principles and clinical practice in Hemostasis and thrombosis.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Verlag, 2001. 1578 Seiten.
57. **Ghebrehiwet, B und Müller-Eberhard, HJ.** C3e: An acidic fragment of human C3 with leukocytosisinducing activity. *J Immunol* 1979; 123: 616-621.
58. **Kirklin, JK, George, JF und Holman, W.** *Cardiopulmonary Bypass – Principles and practice: The inflammatory response to cardiopulmonary bypass.* Philadelphia: Williams & Wilkins Verlag, 1993. 768 Seiten.
59. **Stiller, B.** *Mechanische Kreislaufunterstützung im Kindesalter.* Berlin: Habilitationsschrift der Humboldt-Universität, 2004.
60. **Weber, C und Springer, TA.** Neutrophil accumulation on activated, surface-adherent platelets in flow is mediated by interaction of MAC-1 with fibrinogen bound to alphaIIb beta3 and stimulated by platelet-activating factor. *J Clin Invest* 1997; 100: 2085-2093.
61. **Gawaz, M, et al.** Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells. *Circulation* 1998; 98: 1164-1171.
62. **Viktor, A, Schulte, DM, Guoni-Berthold, I und Berger, HJ.** Diabetes mellitus ist assoziiert mit einer erhöhten Plättchenaggregation: Pathophysiologische Aspekte und Rolle der antithrombotischen Therapie. *Austrian Journal of Cardiology* 2011; 18: 126-133.
63. **Topol, EJ, Byzova, TV und Plow, EF.** Platelet GPIIb-IIIa blockers. *Lancet* 1999; 353: 227-231.
64. **Co, GlaxoSmithKline GmbH &.** Therapiemanagement mit Eptifibatid: leitliniengetreu, gut dokumentiert und bewährt. *Beilage in „Zeitschrift für Kardiologie“.* 2005, Bd. 94.
65. **Deutsche Gesellschaft für Kardiologie.** *Pocket Leitlinien Akutes Koronarsyndrom ohne ST-Hebung Update.* 2009. 44 Seiten.

66. **RESTORE Investigators.** Effects of platelet glycoprotein IIb/IIIa blockade with tirofiban on adverse cardiac events in patients with unstable angina or acute myocardial infarction undergoing coronary angioplasty. *Circulation* 1997; 96: 1445-1453.
67. **Investigators, PRISM.** A comparison of aspirin plus tirofiban with aspirin plus heparin for unstable angina. *N Engl J Med* 1998; 338: 1498-1504.
68. **PRISM-PLUS Investigators.** Inhibition of the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor with tirofiban in unstable angina and non-q-wave myocardial infarction. *N Engl J Med* 1998; 338: 1488–1497.
69. **Kereiakes, DJ, et al.** Time course, magnitude, and consistency of platelet inhibition by abciximab, tirofiban, or eptifibatide in patients with unstable angina pectoris undergoing percutaneous coronary intervention. *American Journal of cardiology* 1999; 84: 391-395.
70. **Investigators, ESPRIT.** Novel dosing regimen of eptifibatide in planned coronary stent implantation: a randomized, placebo controlled trial. *Lancet* 2000; 356: 2037-2044.
71. **PURSUIT Investigators.** Inhibition of the platelet glycoprotein IIb/IIIa with Eptifibatide in patients with acute coronary syndromes without persistent ST-segment elevation. *N Engl J Med* 1998; 339: 436-443.
72. **Rothe, G.** *Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik.* [Hrsg.] G Schmitz. Stuttgart: Schattauer Verlag, 1994. 559 Seiten.
73. **Tárnok, A. und Rothe, G.** *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie.* [Hrsg.] U Sack. Basel: Karger Verlag, 2007. 800 Seiten.
74. **Hilgers, RD, Bauer, P und Scheiber, V.** *Einführung in die medizinische Statistik.* Berlin/Heidelberg: Springer Verlag, 2006. 346 Seiten.
75. **Anderson, JL, et al.** ACC/AHA 2007 guidelines for the management of patients with unstable angina/non-ST-elevation myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2007; 50: 1-157.
76. **Bassand, JP, et al.** Guidelines for the diagnosis and treatment of non-STsegment elevation acute coronary syndromes. *Eur Heart J* 2007; 28: 1598-1660.
77. **Mukherjee, D und Roffi, M.** Glycoprotein IIb/IIIa receptor inhibitors in 2008: Do they still have a role? *J Interven Cardiol* 2008; 21: 118-121.

78. **Chew, DP, et al.** Increased mortality with oral platelet glycoprotein IIb/IIIa antagonists: a meta-analysis of phase III multicenter randomized trials. *Circulation* 2001; 103: 201-206.
79. **Topol, EJ, Byzova, TV und Plow, EF.** Platelet GPIIb-IIIa blockers. *Lancet* 1999; 353: 227-231.
80. **Zeymer, U, et al.** Einsatz von Eptifibatid bei der perkutanen koronaren Intervention im klinischen Alltag Ergebnisse eines prospektiven Registers. *Herz* 2004; 29: 651-655.
81. **Van't Hof, AW, et al.** Prehospital initiation of tirofiban in patients with ST-elevation myocardial infarction undergoing primary angioplasty (On-TIME 2): a multicentre, double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 2008; 372: 372-375.
82. **Tousek, P, et al.** Routine upfront abciximab vs. standard peri-procedural therapy in patients undergoing primary PCI for cardiogenic shock. The PRAGUE-7 Study. *Acute Card Care* 2011 Apr 28., [Epub ahead of print] PMID: 21526919.
83. **Ott, I, et al.** Increased neutrophil-platelet adhesion in patients with unstable angina. *Circulation* 1996; 94: 1239-1246.
84. **Mickelson, JK, et al.** Leukocyte activation with platelet adhesion after coronary angioplasty: A mechanism for recurrent disease? *J Am Coll Cardio* 1996; 28: 345-353.
85. **Katopodis, JN, et al.** Platelet microparticles and calcium homeostasis in acute coronary ischemias. *Am J Hematol* 1997; 54: 95-101.
86. **Lindemann, S, et al.** Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1beta synthesis. *J Cell Biol* 2001; 154: 485-490.
87. **EPIC Investigators.** Use of a monoclonal antibody directed against the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor in high-risk coronary angioplasty. *N Engl J Med* 1994; 330: 956-961.
88. **Ben Mime, L, et al.** Pharmacologic cerebral capillary blood flow improvement after deep hypothermic circulatory arrest: An intravital fluorescence microscopy study in pigs. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005; 130: 670-676.
89. **Xiao, Z, Theroux, P und Frojmovic, M.** Modulation of platelet-neutrophil interaction with pharmacological inhibition of fibrinogen binding to platelet GPIIb/IIIa receptor. *Thromb Haemost* 1999; 81: 281-285.
90. **Huo, Y, et al.** Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient apolipoprotein. *E. Nat Med* 2003; 9: 61-67.

91. **von Hundelshausen, P, et al.** RANTES deposition by platelets triggers monocyte arrest on inflamed and atherosclerotic endothelium. *Circulation* 2001; 103: 1772-1777.
92. **von Hundelshausen, P, et al.** Heterophilic interactions of platelet factor 4 and RANTES promote monocyte arrest on endothelium. *Blood* 2005; 105: 924-930.
93. **de Araújo Azevedo, R.** *Prothrombotische und proinflammatorische Ereignisse im Herz-Lungen-Maschinen-Modell: Möglichkeiten der pharmakologischen Inhibition.* Tübingen: Dissertationsschrift der Eberhard Karls Universität, 2008.
94. **Frelinger, AL, et al.** Combined Effects of Mild Hypothermia and Glycoprotein IIb/IIIa Antagonists on Platelet–Platelet and Leukocyte–Platelet Aggregation. *Am J Cardiol* 2003; 92: 1099-1101.
95. **Faraday, N und Rosenfeld, BA.** In vitro hypothermia enhances platelet GPIIb-IIIa activation and P-selectin expression. *Anesthesiology* 1998; 88: 1579-1585.
96. **Hochholzer, W.** *Antithrombozytärer Effekt von Abciximab, Tirofiban und Eptifibatide bei Patienten nach koronarer Stentimplantation.* München: Dissertationsschrift der Technischen Universität, 2003.
97. **Neumann, FJ, et al.** Effect of glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade on platelet-leucocyte interaction and surface expression of the leucocyte integrin Mac-1 in acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34: 1420-1426.
98. **Simon, DI, et al.** 7E3 monoclonal antibody directed against the platelet glycoprotein IIb/IIIa cross-reacts with the leukocyte integrin Mac-1 and blocks adhesion to fibrinogen and ICAM-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 528-535.
99. **Weerasinghe, A, et al.** Platelet—monocyte pro-coagulant interactions in on-pump coronary surgery. *European Journal of Cardio-thoracic Surgery* 2006; 29: 312-318.
100. **Gahmberg, CG, et al.** Leukocyte integrins and inflammation. *Cell. Mol. Life Sci* 1998; 54: 549-555.
101. **Jonas, RA.** Deep hypothermic circulatory arrest: current status and indications. *Seminar in Thoracic and Cardiovascular Surgery Pediatric Cardial Surgery Annual Review* 2002; 1: 76-88.
102. **Tassani, P, et al.** Cardiac surgery with deep hypothermic circulatory arrest produces less systemic inflammatory response than low-flow cardiopulmonary bypass in newborns. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 2002; 123: 648-654.

103. **Di Eusanio, M, et al.** Deep hypothermic circulatory arrest and antegrade selective cerebral perfusion during ascending aorta-hemiarch replacement: a retrospective comparative study. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003; 125: 849-854.
104. **Rothörl, RD und Brawanski, A.** The history and present status of deep hypothermia and circulatory arrest in cerebrovascular surgery. *Neurosurg Focus* 2006; 20: E5.
105. **Olsen, T, Weber, UJ und Kammersgaard, LP.** Therapeutic hypothermia for acute stroke. *Lancet Neurol* 2003; 2: 410-416.
106. **Laffey, JG, Boylan, JF und Cheng, CD.** The systemic inflammatory response to cardiac surgery: implications for the anesthesiologist. *Anesthesiology* 2002; 97: 215-252.
107. **Haverich, A und Ziemer, G.** *Herzchirurgie: Die Eingriffe am Herzen und an den herznahen Gefäßen.* Berlin/Heidelberg: Springer Verlag, 2009. 902 Seiten.
108. **Krantis, A.** Hypothermia-induced reduction in the permeation of radiolabelled tracer substances across the blood-brain barrier. *Acta Neuropathol* 1983; 60: 61-69.
109. **Polderman, KH, Menon, DK und Girbes, ARJ.** Treating intracranial hypertension in traumatic brain injury: keep it cool! *Intensiv Care Med* 2008; 34: 1738-1739.
110. **Fukui, O, et al.** Post-ischemic hypothermia reduced IL-18 expression and suppressed microglial activation in the immature brain. *Brain Res* 2006; 1121: 35-45.
111. **Schmitt, KR, et al.** Hypothermia suppresses inflammation via ERK signaling pathway in stimulated microglial cells. *J Neuroimmunol* 2007 189: 7-16.
112. **Matsui, T und Kakeda, T.** IL-10 production is reduced by hypothermia but augmented by hyperthermia in rat microglia. *Neurotrauma* 2008; 25: 7009-7015.
113. **Fairchild, KD, et al.** Hypothermia prolongs activation of NF- κ B and augments generation of inflammatory cytokines. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 287: 422-431.
114. **Xie, Yan-chun und Li, Cheng-yan.** Effect of mild hypothermia on angiogenesis in rats with focal cerebral ischemia. *Neuroscience Letters* 2007; 422: 87-90.
115. **The Hypothermia After Cardiac Arrest Study Group.** Mild therapeutic hypothermia to improve the neurologic outcome after cardiac arrest. *NEJM* 2002; 346: 549-556.
116. **Gray, SA, Buist, TW und et al.** Treatment of comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest with induced hypothermia. *NEJM* 2002; 346: 557-563.

117. **Oddo, M, et al.** From evidence to clinical practice: effective implementation of therapeutic hypothermia to improve patient outcome after cardiac arrest. *Crit Care Med* 2006; 34: 1865-1873.
118. **Kuboyama, K, et al.** Delay in cooling negates the beneficial effect of mild resuscitative cerebral hypothermia after cardiac arrest in dogs: a prospective, randomized study. *Crit Care Med* 1993; 21: 1348-1358.
119. **Merchant, RM, et al.** Therapeutic hypothermia after cardiac arrest: Unintentional overcooling is common using ice packs and conventional cooling blankets. *Critical Care Medicine* 2006; 34: 490-494.
120. **Reuler, JB.** Hypothermia: pathophysiology, clinical settings, and management. *Ann Intern Med* 1978; 89: 519-527.
121. **Werdan, K (Koordinator).** *S3-Leitlinie „Infarktbedingter kardiogener Schock - Diagnose, Monitoring und Therapie“*. 2010.
122. **Nolan, JP, et al.** Executive summary on behalf of the ERC Guidelines Writing Group. European Resuscitation Council Guidelines for Resuscitation 2010 - Section 1. *Resuscitation* 2010; 81: 1219-1276.
123. **Sagalyn, E, et al.** Therapeutic hypothermia after cardiac arrest in clinical practice: review and compilation of recent experiences. *Crit Care Med* 2009; 37: 223-226.
124. **Weisser, J, et al.** Influence of mild hypothermia on myocardial contractility and circulatory function. *Basic Res Cardiol* 2001; 96: 198-205.
125. **Schmidt-Schweda, S, et al.** Cool-Shock I Study: Mild hypothermia as positive inotropic intervention in cardiogenic shock. *Circulation* 2004; 110: 1639.
126. **Storm, C, et al.** Prehospital cooling with hypothermia caps (PreCoCa): a feasibility study. *Clin Res Cardiol* 2008; 97: 768-772.
127. **Hasper, D.** *Klinische Anwendung der therapeutischen Hypothermie nach Herz-Kreislaufstillstand*. Berlin: Habilitationsschrift der Charité, 2010.
128. **Nolan, JP, et al.** Therapeutic hypothermia after cardiac arrest. An advisory statement by the Advanced Life Support Task Force of the International Liaison Committee on Resuscitation. *Resuscitation* 2003; 57: 231-235.
129. **Parham, W, et al.** Therapeutic hypothermia for acute myocardial infarction: past, present, and future. *Crit Care Med* 2009; 37: 234-237.
130. **Sessler, DI.** Mild perioperative hypothermia. *N Engl J Med* 1997; 336: 1730-1737.

131. **Polderman, KH.** Hypothermia and neurological outcome after cardiac arrest: state of the art. *Eur J Anaesthesiol Suppl* 2008; 42: 23-30.
132. **Schmied, H, et al.** Mild hypothermia increases blood loss and transfusion requirements during total hip arthroplasty. *Lancet* 1996; 347: 289-292.
133. **Weber, EW, et al.** Perioperative blood transfusions and delayed wound healing after hip replacement surgery: effects on duration of hospitalization. *Anesth Analg* 2005; 100: 1416-1421.
134. **Winkler, M, et al.** Aggressive warming reduces blood loss during hip arthroplasty. *Anesth Analg* 2000; 91: 978-984.
135. **Reed, RL, et al.** Hypothermia and blood coagulation: dissociation between enzyme activity and clotting factor levels. *Circ Shock* 1990; 32: 141-152.
136. **Schefold, JC, et al.** Mild therapeutic hypothermia after cardiac arrest and the risk of bleeding in patients with acute myocardial infarction. *Int J Cardio* 2009; 132: 387-391.
137. **Speziale, G, et al.** Effect of normothermic versus hypothermic cardiopulmonary bypass on cytokine production and platelet function. *J Cardiovasc Surg* 2000; 41: 819-827.
138. **Moore, FD, et al.** The effects of complement activation during cardiopulmonary bypass. Attenuation by hypothermia, heparin, and hemodilution. *Ann Surg* 1988; 208: 95-103.
139. **Chello, M, et al.** Complement and neutrophil activation during cardiopulmonary bypass: a randomized comparison of hypothermic and normothermic circulation. *Eur J Cardiothorac Surg* 1997; 11: 162-168.
140. **Sorensen, HR, et al.** Brain microvascular function during cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1987; 94: 727-732.
141. **Honore, PM, et al.** Effects of normothermia versus hypothermia on extravascular lung water and serum cytokines during cardiopulmonary bypass: a randomized, controlled trial. *Crit Care Med* 2001; 29: 1903-1909.
142. **Eggum, R, et al.** Effect of perfusion temperature on the inflammatory response during pediatric cardiac surgery. *Ann Thorac Surg* 2008; 85: 611-617.
143. **Polderman, KH.** Induced hypothermia and fever control for prevention and treatment of neurological injuries. *Lancet* 2008; 371: 1955-1969.

144. **Mowlavi, A, et al.** Local hypothermia during early reperfusion protects skeletal muscle from ischemia-reperfusion injury. *Plast Reconstr Surg* 2003; 111: 242-250.
145. **Hambusch, J, et al.** Neutrophil adhesion molecule expression and serum concentration of soluble adhesion molecules during and after pediatric cardiovascular surgery with or without cardiopulmonary bypass. *Anesthesiology* 2002; 96: 1078-1085.
146. **Okubo, N, et al.** Comparison of m-RNA expression for inflammatory mediators in leukocytes between on-pump and off-pump coronary artery bypass grafting. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 2003; 9: 43-49.
147. **Fink, R, et al.** Monocyte activation markers during cardiopulmonary bypass. *Perfusion* 2003; 18: 83-86.
148. **Sbrana, S, et al.** Monitoring of monocyte functional state after extracorporeal circulation: A flow cytometry study. *Cytometry B Clin Cytom* 2004; 588: 17-24.
149. **Greulich, PE, et al.** Monocyte activation in on-pump versus off-pump coronary artery bypass surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2008; 22: 361-368.
150. **Kappelmayer, J, et al.** Upregulation of Mac-1 surface expression on neutrophils during simulated extracorporeal circulation. *J Lab Clin Med* 1993; 121: 118-126.
151. **Hill, GE, et al.** Glucocorticoids blunt neutrophil CD11b surface glycoprotein upregulation during cardiopulmonary bypass in humans. *Anesth Analg* 1994; 79: 23-27.
152. **Parratt, R and Hunt, BJ.** Direct activation of factor X by monocytes occurs during cardiopulmonary bypass. *British Journal of Haematology* 1998; 101: 40-46.
153. **Ishikawa, M, et al.** Inflammatory responses to ischemia and reperfusion in the cerebral microcirculation. *Frontiers in Bioscience* 2004; 9: 1339-1347.
154. **Bombeli, T, Schwartz, BR and Harlan, JM.** Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIb/IIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), alpha5beta1 integrin, and GPIIb/IIIa. *J Exp Med* 1998; 187: 329-339.
155. **Gawaz, M, et al.** Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. Implications for atherogenesis. *Atherosclerosis* 2000; 148: 75-85.
156. **Kawamura, N, et al.** Multiple effects of hypothermia on inflammatory response following ischemia-reperfusion injury in experimental ischemic neuropathy. *Exp Neurol* 2006; 202: 487-496.

157. **Wang, GJ, et al.** Mild hypothermia reduces ICAM-1 expression, neutrophil infiltration and microglia/monocyte accumulation following experimental stroke. *Neuroscience* 2002; 114: 1081-1090.
158. **McEver, RP und Cummings, RD.** Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J. Clin. Invest* 1997; 100: 97-103.
159. **Frenette, PS, et al.** P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo. *JExp Med* 2000; 191: 1413-1422.
160. **Htun, P, et al.** Course of platelet activation and plateletleukocyte interaction in cerebrovascular ischemia. *Stroke* 2006; 37: 2283-2287.
161. **Faraday, N, et al.** Leukocytes can enhance platelet-mediated aggregation and thromboxane release via interaction of P-selectin glycoprotein ligand 1 with P-selectin. *Anesthesiology* 2001; 94: 145-151.
162. **da Costa Martins, PA, et al.** Platelet binding to monocytes increases the adhesive properties of monocytes by up-regulating the expression and functionality of β 1 and β 2 integrins. *Journal of Leukocyte Biology* 2006; 79: 499-507.
163. **Horst, C.** *Untersuchung systemischer Inflammations- und Gerinnungsaktivierung bei Patienten nach überlebtem Herz-Kreislaufstillstand.* Freiburg: Dissertationsschrift der Medizinischen Universitätsklinik , 2010.
164. **Hall, MW, et al.** Hypothermia-induced platelet aggregation in heparinized flowing human blood: identification of a high responder subpopulation. *Am J Hematol* 2002; 69: 45-55.
165. **Seghaye, MC.** The clinical implications of the systemic inflammatory reaction related to cardiac operations in children. *Cardiol Young* 2003; 13: 228-239.
166. **Brix-Christensen, V.** The systemic inflammatory response after cardiac surgery with cardiopulmonary bypass in children. *Acta Anaesthesiol Scand* 2001; 45: 671-679.
167. **Kharazmi, A, et al.** Endotoxemia and enhanced generation of oxygen radicals by neutrophils from patients undergoing cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1989; 98: 381-385.
168. **Kirklin, JK, Westaby, S und Blackstone, EH.** Complement and the damaging effects of cardiopulmonary bypass. *JThorac Cardiovasc Surg* 1983; 86: 845-857.

169. **Vaage, J.** Microvascular injury induced by intravascular platelet aggregation. An experimental study. *Scand J Thorac Cardiovasc Surg* 1994; 28: 127-133.
170. **Butler, J, Rucker, GM und Westaby:** Inflammatory response to cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1993; 55: 552-559.
171. **Stocker, CF, et al.** Cardiopulmonary bypass elicits a prominent innate immune response in children with congenital heart disease. *Thorac Cardiovasc Surg* 2004; 127: 1523-1525.
172. **Tanaka, M, et al.** Blood compatible aspects of poly(2-methoxyethylacrylate) (PMEA)—relationship between protein adsorption and platelet adhesion on PMEA surface. *Biomaterials* 2000; 21: 1471-1481.
173. **Sroka, J.** *Die Rolle der Zytokine in der Pathophysiologie der Extrakorporalen Zirkulation.* Gießen: Dissertationsschrift der Justus-Liebig-Universität, 2002.
174. **Ferroni, P und Speziale, G.** Platelet activation and cytokine production during hypothermic cardiopulmonary bypass- a possible correlation? *Thromb Haemost* 1998; 80: 58-64.
175. **Borowiec, JW, et al.** 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: 167-174.
176. **Hattler, BG, et al.** Cytokine induction during cardiac surgery: analysis of TNF-alpha expression pre- and postcardiopulmonary bypass. *J Card Surg* 1995; 10: 418-422.
177. **Finkel, MS, et al.** Interleukin-6 (IL-6) as a mediator of stunned myocardium. *Am J Cardio* 1993; 71: 1231-1232.
178. **Ueyama, K, et al.** PMEA coating of pump circuit and oxygenator may attenuate the early systemic inflammatory response in cardiopulmonary bypass surgery. *ASAIO J* 2004; 50: 369-72.
179. **Chenoweth, DE, et al.** Complement activation during cardiopulmonary bypass: evidence for generation of C3a and C5a anaphylatoxins. *N Engl J Med* 1981; 304: 497-503.
180. **Riddington, DW, et al.** Intestinal permeability, gastric intramucosal pH, and systemic endotoxemia in patients undergoing cardiopulmonary bypass. *JAMA* 1996; 275: 1007-1012.

181. **Gimbrone Jr., MA, Brock, AF und Schafer, AI.** Leukotriene B4 Stimulates Polymorphonuclear Leukocyte Adhesion to Cultured Vascular Endothelial Cells. *J. Clin. Invest* 1984; 74: 1552-1555.
182. **Moat, NE, Shore, DF und Evans, TW.** Organ dysfunction and cardiopulmonary bypass: the role of complement and complement regulatory proteins. *Eur J Cardiothorac Surg* 1993; 7: 563-573.
183. **Stent, G und Crowe, SM.** Effects of monocyte purification and culture on integrin expression. *APMIS* 1997; 105: 663-670.
184. **Macey, M, et al.** Effects of cell purification methods on CD11b and L-Selektin expression as well as the adherence and activation of leucocytes. *J Immunol Methods* 1995; 181: 211-219.
185. **Ott, I, et al.** Procoagulant inflammatory responses of monocytes after direct balloon angioplasty in acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1998; 82: 938-942.
186. **Meisel, SR, et al.** Increased expression of neutrophil and monocyte adhesion molecules LFA-1 and Mac-1 and their ligand ICAM-1 and VLA-4 throughout the acute phase of myocardial infarction: possible implications for leukocyte aggregation and microvascular plugging. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31: 120-125.
187. **Altieri, DC, Plescia, J und Plow, EF.** The structural motif glycine 190-valine 202 of the fibrinogen gamma chain interacts with CD11b/CD18 integrin and promotes leukocyte adhesion. *J Biol Chem* 1993; 268: 1847-1853.
188. **Gawaz, M und Neumann, FJ.** Platelet-induced activation of the NF-kB system might contribute to early inflammatory events in atherogenesis. *Circulation* 1998; 98: 1164-1171.
189. **van de Stolpe, A und van der Saag, PT.** Intercellular adhesion molecule-1. *J Mol Med* 1996; 74: 13-33.
190. **Frijns, CJ und Kappelle, LJ.** Inflammatory cell adhesion molecules in ischemic cerebrovascular disease. *Stroke* 2002; 33: 2115-2122.
191. **Kraiss, LW, et al.** Acute reductions in blood flow and shear stress induce platelet-derived growth factor- A expression in baboon prosthetic grafts. *Circ Res* 1996; 79: 45-53.
192. **Collard, CD und Gelman:** Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology* 2001; 94: 1133-1138.

193. **Shernan, SK und Collard, CD.** Role of the complement system in ischaemic heart disease: potential for pharmacological intervention. *BioDrugs* 2001; 15: 595-607.
194. **Xiao, X, Zhang, C und 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: 81-84.
195. **Lemanczyk, M.** *Beeinflussung der Gerinnungsaktivierung sowie der Leukozytenaktivierung durch Koronarendoprothesen in An- und Abwesenheit von Abciximab und nichtionischem Kontrastmittel.* Tübingen: Dissertationsschrift der Eberhard Karls Universität, 2007.
196. **Kawamura, A, et al.** Increased expression of monocyte CD11a and intracellular adhesion molecule-1 in patients with initial atherosclerotic coronary stenosis. *Circ J* 2004; 68: 6-10.
197. **Hoffman, M, et al.** Leukocytes and coronary heart disease. *Atherosclerosis* 2004; 172: 1-6.
198. **Sbrana, S, et al.** Granulocyte-and monocyte-platelet adhesion index in coronary and peripheral blood after extracorporeal circulation and reperfusion. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry* 2007; 72B: 215-222.
199. **Michelson, AD.** *Platelets.* London: Academic Press Verlag, 2007. 1376 Seiten .
200. **Marsik, C; Mayr, F, et al.** Endotoxin down-modulates P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1, CD162) on neutrophils in humans. *J Clin Immunol* 2004; 24: 62-65.

7 Danksagung

Mein Dank gilt PD Dr. Beyer, der es mir ermöglicht hat diese Dissertation durchzuführen. Ebenso bedanke ich mich herzlich bei meinem Betreuer Dr. Thomas Walter, der die Anregung zu dieser Arbeit gegeben und den Weg gewiesen hat und mich trotz großer Distanz und zeitlicher Engpässe über eine lange Zeit unterstützt hat.

Ich bedanke mich bei Prof. Wendel und seinem Team der Klinik für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie Tübingen für die kollegiale und hilfsbereite Zusammenarbeit. Zudem bedanke ich mich für die statistische Betreuung durch Prof. Diez (Universität Tübingen), der die Vorarbeit zu dieser Arbeit geleistet hat und für die statistische Betreuung durch Dr. Lang (Universität Mannheim), der sich der kompletten und komplexen Datenauswertung mit viel Hingabe und Akkuratessse angenommen hat.

Besonderer Dank gilt Herbert Klement aus der Transfusionsmedizin, der mir bei der durchflusszytometrischen Labortätigkeit jederzeit zur Seite stand und der mich hilfreich und manchmal sogar rettend unterstützte.

Des Weiteren möchte ich mich bei meiner Mutter bedanken, ohne die ein Studium und somit diese Dissertation niemals möglich geworden wäre.

Jedoch ohne die liebevolle Hartnäckigkeit und Geduld meines Mannes, seine tatkräftige Hilfe bei der Betreuung unserer Tochter und den rücksichtsvollen Verzicht auf viel Freizeit, hätte es diese Arbeit wohl so nie gegeben.