

Aus der Herzchirurgischen Klinik und Poliklinik
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. B. Reichart

**Effekte der Phospholipidbeschichtung eines extrakorporalen
Perfusionssystems auf die systemische inflammatorische Reaktion bei
Patienten zur koronarchirurgischen Revaskularisierung**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Christina Schulz

aus
Berlin
2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter: Privatdozent Dr. med. S.M. Wildhirt

Mitberichterstatter: Professor Dr. F. Krombach
Professor Dr. M. Schad
Privatdozent Dr. B. Heindl

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 27.07.2006

für GISELA UND KLAUS SCHULZ

Inhaltsverzeichnis	i
1 EINLEITUNG	1
1.1 “Systemic Inflammatory Response Syndrome” (SIRS)	1
1.1.1 Rolle der Zytokine	3
1.1.2 Rolle der Adhäsionsmoleküle	5
1.1.3 Rolle von Stickstoffmonoxid (NO)	6
1.2 Biokompatibilität der extrakorporalen Zirkulation	7
1.3 Beschichtungen extrakorporaler Zirkulationssysteme in der Herzchirurgie	8
1.3.1 Phosphorylcholinbeschichtung	9
1.4 Zielsetzung	11
2 MATERIAL UND METHODEN	12
2.1 Patientenrekrutierung	12
2.2 Einschlusskriterien	12
2.3 Ausschlusskriterien	12
2.4 Gruppeneinteilung	13
2.5 Aufbau der Herz-Lungen-Maschine	13
2.6 Anästhesiologisches und chirurgisches Vorgehen	14
2.7 Blutprobengewinnung	15
2.8 Klinische Parameter	15
2.9 Biochemische Parameter	16
2.9.1 Bestimmung von TNF- α , IL-10 und P-Selektin	16
2.9.2 Bestimmung von Nitrat/Nitrit (NO _x)	18
2.10 Statistik	19

3	ERGEBNISSE	20
3.1	Klinische Daten	20
3.1.1	Präoperative Daten	20
3.1.2	Intraoperative Daten	21
3.1.3	Postoperative Daten	21
3.2	Biochemische Parameter	23
3.2.1	TNF- α	23
3.2.2	P-Selektin	24
3.2.3	IL-10	25
3.2.4	Nitrat/Nitrit (NO x)	26
3.2.5	Creatinkinase	27
4	DISKUSSION	28
4.1	TNF- α	29
4.2	P-Selektin	31
4.3	IL-10	32
4.4	Nitrat/Nitrit (NO x)	33
4.5	Creatinkinase	35
4.6	Postoperativer Katecholaminbedarf	35
4.7	Limitationen und klinische Bedeutung	36
5	ZUSAMMENFASSUNG	37
6	LITERATURVERZEICHNIS	39
7	ABKÜRZUNGEN	50
8	DANKSAGUNG	52
9	LEBENS LAUF	53

1 Einleitung

Trotz zunehmender Etablierung der sogenannten “Off-Pump”-Technik in der Koronarchirurgie, d.h. die chirurgische Myokardrevaskularisierung am schlagenden Herzen unter Verzicht auf den Einsatz der Herz-Lungen-Maschine (HLM), werden bis heute die meisten koronarchirurgischen Eingriffe mit Hilfe der extrakorporalen Zirkulation (EKZ) durchgeführt.

Die koronare Bypassoperation ist die am häufigsten durchgeführte Operation in der Herzchirurgie. Im Jahre 2004 wurden in Deutschland insgesamt 71.387 Patienten (47,33 % der Gesamtzahl aller herzchirurgischen Operationen) bei koronarer Herzkrankheit operiert. Bei 67.216 Patienten (94,2 %) wurde die chirurgische Myokardrevaskularisierung hierbei an der Herz-Lungen-Maschine (HLM) durchgeführt [BRUCKENBERGER, 2004].

Die HLM wurde erstmalig zu Beginn der fünfziger Jahre eingeführt und unterliegt seitdem, aufgrund der bekannten unerwünschten Nebenwirkungen für den Patienten, einer stetigen Weiterentwicklung.

1.1 „Systemic Inflammatory Response Syndrome” (SIRS)

Zu den negativen Effekten der EKZ für den Patienten gehört u.a. die Ausbildung einer komplexen systemischen inflammatorischen Reaktion, dem sogenannten “Systemic Inflammatory Response Syndrome” (SIRS). Klinisch manifestiert das SIRS sich im wesentlichen durch einen Abfall des Gefäßtonus und des systemisch-vaskulären Widerstands mit konsekutiver perioperativer hämodynamischer Instabilität. Weitere durch das SIRS hervorgerufene Komplikationen sind postoperative myokardiale Dysfunktion, Lungenfunktionsstörungen, Nieren- und Leberversagen, Blutgerinnungsstörungen und auch neurologische Begleiterscheinungen. Ein ausgeprägtes SIRS kann zu einem Multiorganversagen führen [PAPARELLA et al., 2002].

Die Ursache dieser inflammatorischen Reaktion ist multifaktoriell bedingt und liegt hauptsächlich in der durch die Exposition des Patientenbluts mit der Fremdoberfläche des Perfusionssystems hervorgerufenen zellulären und humoralen Blutaktivierung. Zu den Material unabhängigen Faktoren, die ebenfalls zu der Entwicklung dieser komplexen Entzündungsreaktion beitragen, zählen das chirurgische Gewebetrauma, die Ischämie-Reperfusion, die Hypothermie und die Translokation bakterieller Endotoxine [PAPARELLA et al., 2002; WAN et al., 1997c; JANSEN et al., 1992].

Der Kontakt des Patientenbluts mit der Oberfläche des Perfusionssystems initiiert die Aktivierung zellulärer und humoraler Blutkomponenten mit der Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren ähnlich wie bei einer Sepsis. Die beim SIRS beobachtete inflammatorische Reaktion beinhaltet u.a. die Aktivierung des Komplementsystems [CHENOWETH et al., 1981], die Freisetzung von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen und die Aktivierung von Leukozyten, Monozyten und Makrophagen. Weiterhin ist das SIRS mit einer vermehrten Bildung von Adhäsionsmolekülen, Sauerstoffradikalen und Stickstoffmonoxid (NO) vergesellschaftet [WAN et al., 1997c].

In Abbildung 1 sind einige der durch den kardiopulmonalen Bypass hervorgerufenen inflammatorischen Prozesse schematisch dargestellt.

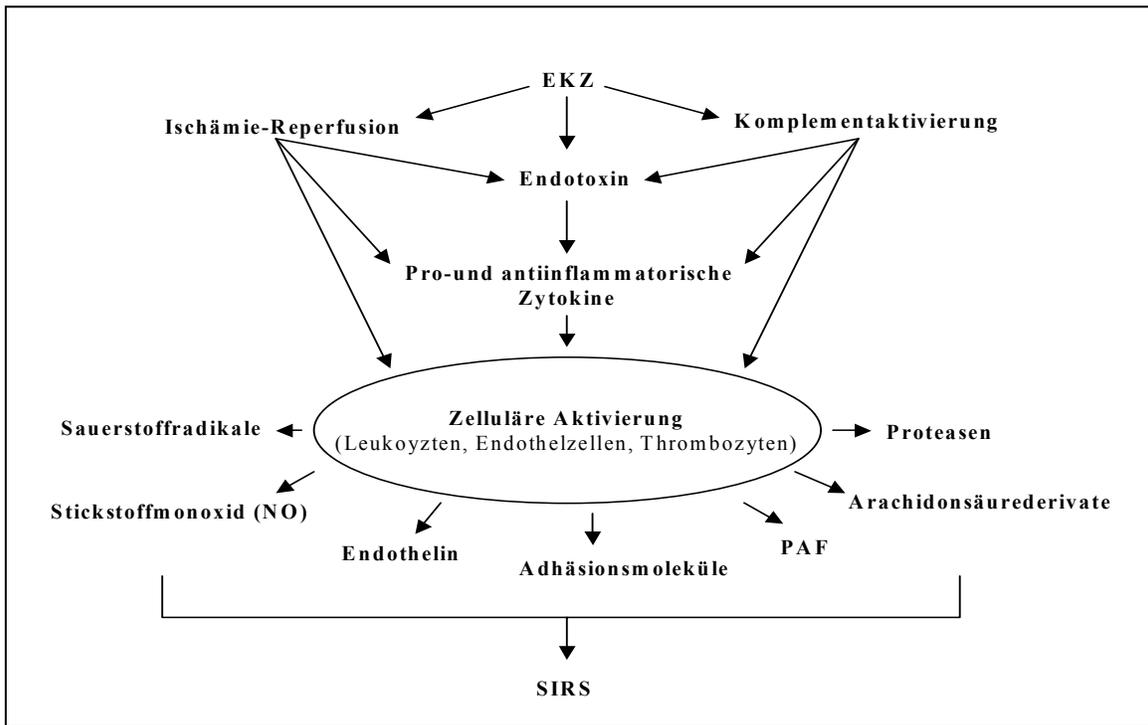


Abb.1: Schematische Darstellung der Inflammationskaskade des SIRS [modifiziert nach WAN et al., 1997c].

1.1.1 Rolle der Zytokine

Die Oberfläche des Perfusionssystems verfügt nicht über die physiologischen Eigenschaften des Endothels und somit auch nicht über die Endothel vermittelte Schutzfunktion, wie z.B. die Bildung physiologischer Inhibitoren. Diese fehlende Inhibitorenproduktion der Perfusionssystemoberfläche führt zur Formierung von immunmodulierenden Komplementanaphylatoxinen [CHENOWETH et al., 1981], welche u.a. die Synthese von Zytokinen induzieren [FISCHER et al., 1999]. Die Zytokinsynthese kann abgesehen davon aber auch durch eine Reihe weiterer Faktoren stimuliert werden, wie der Ischämie-Reperfusion [SHARMA et al., 2003], der Anwesenheit von Endotoxinen oder auch durch andere Zytokine. Als primäre Quelle der Zytokinausschüttung werden hierbei Leukozyten angesehen, jedoch können auch

aktivierte Endothelzellen [MANTOVANI et al., 1997], Thrombozyten [SOSLAU et al., 1997] und auch Zellen des Myokards [KAPADIA et al., 1995] Zytokine sezernieren. Die Rolle der Zytokine, bei der nach kardiopulmonalem Bypass beobachteten systemischen inflammatorischen Reaktion, wurde bereits ausgiebig untersucht [WAN et al., 1997c; STEINBERG et al., 1993; WEI et al., 2001]. Hohe Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine nach herzchirurgischen Eingriffen sind hierbei mit perioperativer kardialer Dysfunktion und hämodynamischer Instabilität assoziiert [CAIN et al., 1999; DENG et al., 1996].

In der Pathogenese der perioperativen hämodynamischen Instabilität nach Eingriffen an der HLM ist das proinflammatorische Zytokin Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) von besonderer Bedeutung. TNF- α wird hauptsächlich in Monozyten, Makrophagen, Lymphozyten, Endothelzellen und glatten Muskelzellen produziert und kommt in einer Zellmembran gebundenen und einer löslichen Form vor [VILCEK und LEE, 1991]. Die vielfältigen biologischen Effekte von TNF- α werden über die Interaktion mit zwei verschiedenen spezifischen TNF- α Rezeptoren vermittelt. Beide Rezeptorentypen konnten sowohl in einer Membran ständigen als auch in einer löslichen Form identifiziert werden, wobei die lösliche Form regulativ auf die biologische Verfügbarkeit des TNF- α wirkt [ADERKA, 1996]. Neben den Effekten auf die Differenzierung und Proliferation von Zellen ist TNF- α vorwiegend für seine proinflammatorischen Eigenschaften bekannt. TNF- α aktiviert u.a. neutrophile Granulozyten und Endothelzellen und stimuliert die Sekretion weiterer Mediatoren wie Interleukin-1 und Interleukin-6 [KOLLIAS et al., 1999]. Nach herzchirurgischen Eingriffen an der HLM ist TNF- α in gesteigerten Konzentrationen im Plasma nachweisbar, und die erhöhte Freisetzung von TNF- α wird u.a. begleitet von einer postoperativen myokardialen Dysfunktion [CAIN et al., 1999]. Darüberhinaus ist TNF- α involviert bei der Entstehung eines postoperativen Kapillarlecks insbesondere der Pulmonalgefäße [WORRALL et al., 1997] und trägt somit auch zu der Entwicklung von postoperativen Oxygenierungsstörungen bei.

Die proinflammatorischen Effekte der Zytokine werden zumindest teilweise durch die regulativen Eigenschaften des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 antagonisiert, und die Balance zwischen pro- und antiinflammatorischer Aktivität ist determinierend für das Ausmaß der Inflammation [DONNELLY et al., 1995]. IL-10 moduliert die Monozyten/Makrophagenfunktion und supprimiert die Ausschüttung verschiedener inflammatorischer Mediatoren wie IL-1, IL-6, IL-8 und TNF- α [FIORENTINO et al., 1991]. Weiterhin vermag IL-10 die Konzentration des löslichen TNF- α Rezeptors zu erhöhen [LEEUWENBERG et al., 1994]. Die antiinflammatorischen Eigenschaften von IL-10 haben protektive Effekte auf verschiedene Organsysteme, z.B. auf die myokardiale Funktion nach Ischämie-Reperfusionstrauma. Die Rekrutierung aktivierter Leukozyten in die Infarktzone erfolgt hierbei durch die Interaktion leukozytärer und endothelialer Adhäsionsmoleküle und ist in Anwesenheit von IL-10 vermindert [JONES et al., 2001]. IL-10 verfügt auch über antiinflammatorische Effekte in der Lunge indem es die intrapulmonale TNF- α Produktion supprimiert [ARMSTRONG et al., 1996].

Die Konzentration des antiinflammatorischen Zytokins Interleukin-10 (IL-10) ist nach herzchirurgischen Operationen am kardiopulmonalen Bypass gesteigert [WEI et al., 2001].

1.1.2 Rolle der Adhäsionsmoleküle

Eine weitere Gruppe inflammatorischer Proteine, die bei der Entstehung der postoperativen Komplikationen nach kardiopulmonalem Bypass von Bedeutung sind, ist die Familie der Adhäsionsmoleküle. Diese Moleküle vermitteln die Anlagerung von Leukozyten und Thrombozyten an Endothelzellen und werden als Markerproteine einer zellulären Aktivierung angesehen. In der vorliegenden Studie wurde das lösliche P-Selektin gemessen. P-Selektin wird in den Weibel-Palade Körperchen in Endothelzellen und den α -Granulae in Thrombozyten produziert und kann innerhalb von Minuten durch

verschiedene inflammatorische Faktoren, wie z. B. TNF- α und thrombogene Stimuli an die Zelloberfläche mobilisiert werden [TEDDER et al, 1995].

Das Adhäsionsmolekül P-Selektin ist für das „Rollen“ und die „Anbindung“ von Leukozyten entlang dem Endothel („Rolling and Tethering“) und schließlich die Formation von Thromben verantwortlich. Diese Effekte werden durch Bindung an ein spezifisches Glykoprotein (P-Selektin Glykoproteinligand-1) vermittelt [TEDDER et al., 1995]. Die durch P-Selektin vermittelte Formation von Leukozyten-Thrombozyten-Aggregaten in Zusammenhang mit einer reduzierten NO-Freisetzung aus Endothelzellen kann zu Obstruktionen in der Mikrozirkulation führen [ZÄHLER et al., 1999].

Erhöhte Konzentrationen von P-Selektin wurden bei Patienten nach Operationen am kardiopulmonalen Bypass gemessen [WILDHIRT et al., 2001; BLUME et al., 1997]. Die Autoren Hayashi et al. konnten die Rolle des P-Selektin bei der durch kardiopulmonalen Bypass induzierten systemischen Inflammation zeigen: Die Antagonisierung von P-Selektin führt hierbei zu einer Reduktion der Zytokinausschüttung und zeigt darüberhinaus einen protektiven Effekt auf die Lungenfunktion [HAYASHI et al., 2000a]. Niedrige P-Selektin Plasmakonzentrationen dagegen vermindern die Interaktion von Endothelzellen mit Leukozyten und Thrombozyten und wirken sowohl einer erhöhten Thrombogenität entgegen als auch protektiv auf die Regulation der Mikrozirkulation [LORANT et al., 1993].

1.1.3 Rolle von Stickstoffmonoxid (NO)

Stickstoffmonoxid (NO) ist neben seiner vielfältigen biologischen Funktionen auch in der Pathophysiologie des SIRS involviert. NO ist gekennzeichnet durch eine sehr kurze Halbwertszeit und wird nach Freisetzung rasch zu Nitrat und schließlich Nitrit umgewandelt [RODEBERG et al., 1995]. Die Bildung von NO wird von dem Enzym NO-Synthase (NOS) katalysiert. Unter physiologischen Bedingungen wird NO konstitutiv von der Calcium abhängigen NOS (cNOS) in Endothelzellen produziert und ist nicht nur ein potenter endogener Regulator des Gefäßtonus, sondern hemmt auch die

Thrombusformation durch seine inhibierenden Eigenschaften auf die Adhäsion von Leukozyten und Thrombozyten an das Endothel [MEHTA, 1995]. Nach Ischämie-Reperfusion ist die NO-Freisetzung durch die cNOS vermindert [ENGELMAN et al., 1995]. Bei Vorliegen einer systemischen Inflammation wird NO jedoch in hohen Konzentrationen auch in glatten Muskelzellen, neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Kardiomyozyten von der induzierbaren Isoform der NOS, der Calcium unabhängigen induzierbaren NOS (iNOS), synthetisiert. Die Aktivität der induzierbaren Form der NOS unterliegt dabei teilweise der Regulation durch proinflammatorische Zytokine [SHINDO et al., 1995]. Die Freisetzung von NO ist während und nach Operationen am kardiopulmonalen Bypass erhöht [RUVOLO et al., 1994]. Das hierbei hauptsächlich von der induzierbaren NO-Synthase in großen Mengen produzierte NO ist verantwortlich für eine Gefäßrelaxation und verminderte Empfindlichkeit gegenüber vasokonstriktorisches Substanzen [JULOU-SCHAEFFER et al., 1990] und ist beteiligt an der Ausbildung eines Kapillarlecks mit konsekutiver Ödemneigung [PAPARELLA et al., 2002]. Weiterhin spielt iNOS eine Rolle in der Pathophysiologie des myokardialen „Stunning“ [OYAMA et al., 1998]. NO ist ein Molekül mit großer Reaktionsfreudigkeit und reagiert mit Superoxidanion zu Peroxynitrit, welches ebenfalls nach CPB in erhöhten Konzentrationen auftritt und zu der Ausbildung eines SIRS beiträgt [HAYASHI et al., 2004b].

1.2 Biokompatibilität der extrakorporalen Zirkulation

Die durch den kardiopulmonalen Bypass verursachte komplexe inflammatorische Kaskade kann postoperativ zu der Ausbildung eines klinisch manifesten SIRS führen. Das Vollbild des SIRS wird im wesentlichen geprägt durch catecholaminpflichtige Vasodilatation und myokardiale Dysfunktion, Lungenfunktionsstörungen, aber auch durch Funktionsstörungen der Niere, der Leber und der Blutgerinnung. Aufgrund der klinischen Relevanz des SIRS nach herzchirurgischen Eingriffen besteht das Bemühen die Verträglichkeit des kardiopulmonalen Bypass für den Patienten zu verbessern.

Der Kontakt von Blut mit synthetischen Oberflächen bewirkt die Ablagerung von Plasmaproteinen wie Albumin, Fibrinogen, Immunglobulinen, Gerinnungsfaktoren und Faktoren des Komplementsystems. Letztendlich führt die Adsorption der Plasmaproteine zu einer Reihe von verschiedenen Prozessen wie Thrombozyten- und Leukozytenaktivierung, Aktivierung des Komplementsystems und Freisetzung verschiedener Entzündungsmediatoren.

Eine Möglichkeit die Verträglichkeit medizinischer Produkte die mit Blut in Kontakt kommen zu verbessern, besteht in der Modifikation der inneren Oberfläche dieser Systeme. Das Ziel der Oberflächenmodifikation ist die im Patienten hervorgerufene Immunreaktion zu mildern und somit die Biokompatibilität zu verbessern. Der Begriff „Biokompatibilität“ beschreibt hierbei inwiefern der Organismus die künstliche Oberfläche des Perfusionssystems als Fremdoberfläche erkennt und darauf mit der Ausbildung einer unspezifischen Immunantwort reagiert.

1.3 Beschichtungen extrakorporaler Zirkulationssysteme in der Herzchirurgie

Die Beschichtung der inneren Oberfläche von Perfusionssystemen mit immobilisierten Heparinmolekülen verfügt neben den antikoagulatorischen Effekten auch über weitere günstige biochemische Eigenschaften, wie z.B. der Hemmung der Komplementaktivierung in Verbindung mit einer reduzierten Leukozytenaktivierung [MOEN et al., 1997; FUKUTOMI et al., 1996]. Des Weiteren wird durch die Heparinbeschichtung die Ausschüttung inflammatorischer Mediatoren, wie TNF- α [YAMADA et al., 1996], IL-6 und IL-10 [GIOMARELLI et al., 2000] signifikant reduziert. Weitere in der Herzchirurgie verwendete Oberflächen modifizierte Perfusionssysteme sind Beschichtungen mit Poly-2-Methoxyethylacrylat [IZUHA et al., 2005] und Phosphorylcholin [DE SOMER et al., 2000b].

1.3.1 Phosphorylcholinbeschichtung

Ein neuer Ansatz die Biokompatibilität der EKZ zu verbessern besteht in dem Versuch, durch die Applikation von Phosphorylcholin (PC) auf die innere Oberfläche von Perfusionssystemen, die Eigenschaften der physiologischen äußeren Zellmembran zu imitieren. Hauptbestandteil der physiologischen Biomembran ist das Phospholipid Phosphatidylcholin. Phosphorylcholin bildet hierbei das äußerste Endteil der Phosphatidylcholins. Phospholipidmoleküle bestehen aus einem hydrophilen Kopf und einem hydrophoben Schwanz und sind in Biomembranen in einer Doppelschicht angeordnet. Negativ geladene Phospholipidmoleküle prädominieren auf der inneren zytoplasmatischen Seite, während die neutralen zwitterionischen phosphorylcholinhaltigen Lipide vornehmlich in der äußeren Schicht der Membran zu finden sind [ZWAAL und HEMKER, 1982]. Der Hauptunterschied zwischen innerer und äußerer Membranseite besteht in der chemischen Zusammensetzung der Endgruppen der Phospholipide. Die Endgruppe Phosphorylserin findet sich vornehmlich in der zytoplasmatischen Membranschicht, Phosphorylcholin dagegen in der dem Blut zugewandten Seite der Membran. Die in dieser Form dicht angeordneten Phospholipide weisen nur geringe Interaktionen mit anderen Proteinen und Zellen auf [SCHERPHOF et al., 1983]. Der Aufbau der physiologischen doppelschichtigen Biomembran ist in Abbildung 2 dargestellt.

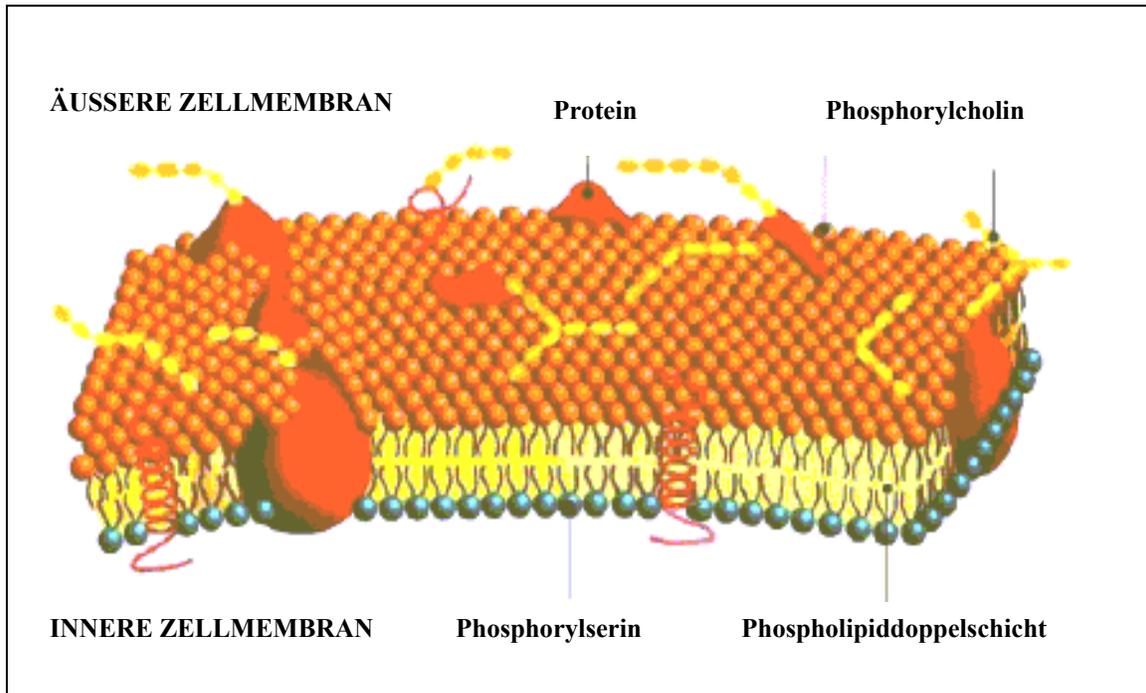


Abb. 2: Die Abbildung zeigt schematisch den physiologischen Aufbau der Biomembran. Die Phospholipidmoleküle sind in einer Doppelschicht angeordnet, wobei die hydrophilen Anteile der Phospholipidmoleküle nach außen und die hydrophoben Anteile nach innen gerichtet sind. Phosphorylcholinhaltige Phospholipide dominieren in der äußeren Schicht, während in der inneren Schicht vorwiegend phosphorylserinhaltige Phospholipide zu finden sind.

Die Beschichtung der inneren Oberfläche mit Phosphorylcholin von extrakorporalen Perfusionssystemen wurde bereits erfolgreich klinisch eingesetzt. De Somer et al. konnten bei der Verwendung einer phosphorylcholinbeschichteten extrakorporalen Zirkulation günstige Effekte auf die Thrombozytenaktivierung, klinisch repräsentiert durch sowohl verminderten Blutverlust als auch ein geringeres Auftreten thrombembolischer Komplikationen, feststellen [DE SOMER et al., 2000b; DE SOMER et al., 2002c; DE SOMER et al., 2002d]. Die Phospholipidbeschichtung ist weiterhin mit einer geminderten Aktivierung des Komplementsystems assoziiert [DE SOMER et al., 1999a].

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten PC-beschichteten System ist die gesamte innere Oberfläche bezogen mit einem gleichmäßigen PC-haltigen Film, welcher den direkten Kontakt mit dem unphysiologischen Grundmaterial des Perfusionssystems verhindert.

1.4 Zielsetzung

Der kardiopulmonale Bypass bei herzchirurgischen Eingriffen ist durch die Fremdoberflächen induzierte inflammatorische Reaktion mit einer Reihe von möglichen Komplikationen verbunden. Die Beschichtung von Perfusionssystemen mit Phosphorylcholin imitiert die äußere Seite der physiologischen Biomembran und verbessert dadurch die Biokompatibilität der extrakorporalen Zirkulation.

In der vorliegenden Arbeit wurde bei Patienten mit koronarchirurgischen Eingriffen am kardiopulmonalen Bypass anhand der Bestimmung verschiedener inflammatorischer Parameter untersucht, ob die Verwendung eines phosphorylcholinbeschichteten Perfusionssystems zu einer reduzierten inflammatorischen Reaktion führt im Vergleich zu Patienten die unter Standardbedingungen mit einem unbeschichteten System operiert wurden.

2 Material und Methoden

2.1 Patientenrekrutierung

Zwischen August 2000 und April 2001 wurden nach schriftlicher Einverständniserklärung 36 Patienten mit koronarer Herzerkrankung unterschiedlichen Schweregrads prospektiv in die Studie eingeschlossen. Diese Patienten wurden aufgenommen und koronarchirurgisch am kardiopulmonalen Bypass operiert in der Herzchirurgischen Klinik und Poliklinik, Ludwig-Maximilians-Universität, München.

2.2 Einschlusskriterien

Es wurden Patienten mit isolierter koronarer Herzkrankheit zur konventionellen elektiven aortokoronaren Bypassoperation am kardiopulmonalen Bypass in die Studie eingeschlossen.

2.3 Ausschlusskriterien

- Patienten mit Kombinationseingriffen
- wiederholte Operation am Herzen
- eingeschränkte Nierenfunktion (Serumkreatinin > 1,6 mg/dl)
- eingeschränkte Leberfunktion
- Diabetes mellitus
- akute Infektion
- anamnestisch chronisch inflammatorische Erkrankung

2.4 Gruppeneinteilung

Die Patienten wurden in zwei Gruppen randomisiert:

- Phosphorylcholin (PC)-Gruppe
- Kontrollgruppe

Patienten der PC-Gruppe (n=18) wurden koronarchirurgisch versorgt unter der Verwendung eines phosphorylcholinbeschichteten Systems (Stöckert Instrumente, München). Die Patienten der Kontrollgruppe (n=18) wurden unter Verwendung eines unbeschichteten in allen anderen Merkmalen aber identischen Systems operiert.

2.5 Aufbau der Herz-Lungen-Maschine

In beiden Gruppen bestand das System der extrakorporalen Zirkulation aus einem Membranoxygenator, einem Kardiotomiereservoir, einem Schlauchsystem aus Polyvinylchlorid und dem arteriellen Filter. Das System wurde initial mit ca. 1200 ml kristalloider Lösung befüllt.

Das Schlauchsystem der PC-beschichteten extrakorporalen Zirkulation („phosphorylcholine inert surface system“ (ph.i.s.i.o), Stöckert Instrumente, München) bestand ebenso wie das unbeschichtete System aus Polyvinylchlorid. Die gesamte innere Oberfläche dieses Systems ist mit einem Film aus Phosphorylcholin beschichtet. Die beschichteten Anteile des Systems setzen sich aus den arteriellen und venösen Kanülen, der Kardioplegieleitung, den Filtern und dem Membranoxygenator zusammen.

Die gesamte innere Oberfläche des hier verwendeten Perfusionssystems ist gleichmäßig mit einem Film bildenden Polymer, bestehend aus einer Polymethylmethacrylatkette mit Phosphorylcholinaußengruppen, überzogen.

In Abbildung 3 ist die PC-Beschichtung schematisch dargestellt.

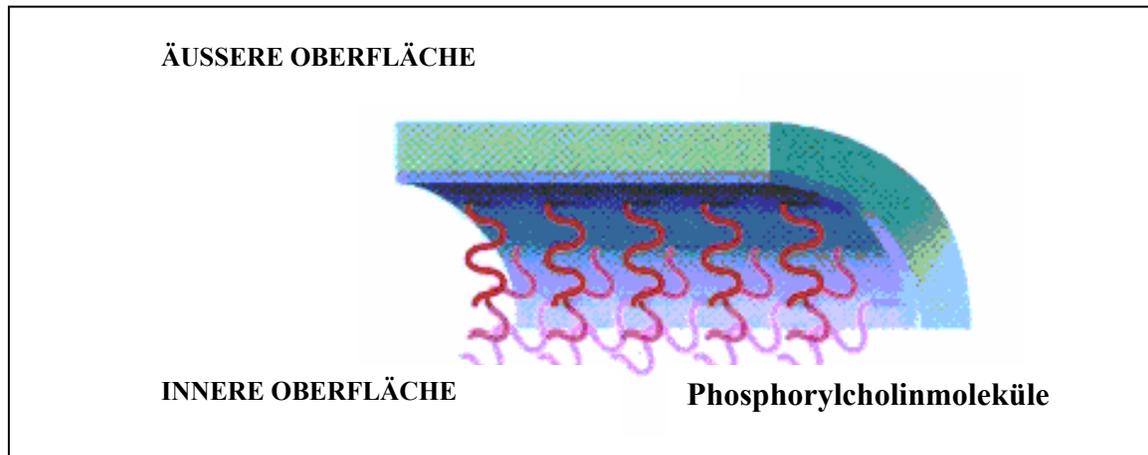


Abb. 3: Schematische Darstellung der PC-Beschichtung.

2.6 Anästhesiologisches und chirurgisches Vorgehen

Die Induktion der Anästhesie erfolgte in beiden Patientengruppen mit Propofol und Atracurium. Die Patienten wurden orotracheal intubiert, beatmet und in Rückenlage auf dem Operationstisch gelagert. Der Thorax wurde über eine mediane Sternotomie eröffnet. Danach wurden die linke Arteria mammaria und gleichzeitig, sofern indiziert, die Vena saphena magna für die weiteren Bypassgrafts präpariert. Nach Beendigung der Präparation der Arteria mammaria sinistra wurde das Perikard eröffnet und der rechte Vorhof und die Aorta kanüliert. Eine systemische Heparinisierung wurde durch die Gabe von 400 IE/kg Heparin erreicht und die „Activated Clotting Time“ (ACT) wurde für die Dauer der Operation am kardiopulmonalen Bypass bei > 400 sec gehalten. Der kardiopulmonale Bypass wurde initiiert mit einem nicht pulsatilen Fluss mit einer

Flussrate von 2,4 l/min/m². Die Aorta wurde proximal der Kanülierung abgeklemmt und ca. 600-700 ml Kardioplegielösung (Custodiol, Dr. Franz Köhler Chemie, Alsbach-Hahnlein) wurde über die Aortenwurzel instilliert. Die Operation erfolgte in moderater Hypothermie (34 °C). Zunächst wurden die distalen Anastomosen genäht. Anschließend wurde die Aortenklemme entfernt und die proximalen Anastomosen an der partiell ausgeklemmten Aorta konstruiert. Die venöse und arterielle Kanüle wurden nach Entwöhnung vom kardiopulmonalen Bypass entfernt und die systemische Heparinisierung wurde durch die Gabe von Protamin antagonisiert.

2.7 Blutprobengewinnung

Alle Blutproben wurden über einen zentralen Venenkatheter gewonnen, sofort nach Gewinnung bei 3000 g für 10 min zentrifugiert, und der Plasmaüberstand wurde abpipettiert. Die Plasmaproben wurden dann in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C aufbewahrt.

Die Proben wurden zu folgenden Zeitpunkten gewonnen:

- 30 min vor Hautschnitt
- 2 h postoperativ
- 24 h postoperativ
- 48 h postoperativ

2.8 Klinische Parameter

Präoperativ wurden das Alter, das Geschlecht, die Körpergröße und das Körpergewicht, die präoperative Ejektionsfraktion, Kreatininkonzentration und Risikofaktoren für die koronare Herzerkrankung erfasst. Zu den intraoperativ gewonnenen Daten zählen die

kardiopulmonale Bypasszeit, aortale Klemmzeit und die Anzahl der arteriellen bzw. venösen Bypassgrafts. Im postoperativen Verlauf wurden Leukozytenzahl, Thrombozytenzahl, Hämatokrit, Creatinkinase, Drainagemenge, Gabe von Blutprodukten und Katecholaminen, Zeitpunkt der Extubation und Aufenthaltsdauer auf der Intensivstation aufgezeichnet.

2.9 Biochemische Parameter

Es wurden die Plasmakonzentrationen von TNF- α , P-Selektin, IL-10 und Nitrat/Nitrit (NOx) im perioperativen Verlauf bestimmt.

2.9.1 Bestimmung von TNF-alpha, P-Selektin und IL-10

Die Zytokine IL-10 und TNF- α und die lösliche Form des Adhäsionsmoleküls P-Selektin wurden mittels „Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay“ (R&D Systems, Wiesbaden) gemessen. Die Plasmakonzentrationen von IL-10, TNF- α und P-Selektin wurde anhand der jeweiligen Standardkurve ermittelt.

TNF- α

Die vom Hersteller bereit gestellten Mikrotiterplatten sind beschichtet mit einem murinen monoklonalen Antikörper gegen TNF- α . Nach Pipettierung von 50 μ l Assaypuffer und Zugabe von 200 μ l der Standards und Patientenproben in die Probenfächer wurden die Mikrotiterplatten für zwei Stunden bei Raumtemperatur (RT) inkubiert, um alle vorhandenen TNF- α Moleküle durch den immobilisierten Antikörper zu binden. Danach wurden die Probenfächer mit Waschpuffer gewaschen und 200 μ l eines polyklonalen Antikörpers gegen TNF- α konjugiert mit Meerrettichperoxidase hinzugegeben. Nach

erneuter Inkubation für zwei Stunden bei RT wurde wiederholt der Waschschrift durchgeführt und 50 µl einer hydrogenperoxid- und tetramethylbenzidinhaltigen Substratlösung in die Probenfächer pipettiert. Durch Zugabe einer schwefligen Lösung wurde die Farbreaktion gestoppt. Die photometrische Bestimmung der optischen Densität der Proben und Standards erfolgte bei 450 nm und 540 nm. Die bei 540 nm gemessenen Werte wurden von den bei 450 nm gemessenen Werten zur Korrektur von optischen Verunreinigungen subtrahiert.

P-Selektin

Jeweils 100 µl der Standards bzw. Patientenproben (verdünnt im Verhältnis 1:20) wurden in die mit monoklonalem Maus-Antikörper gegen P-Selektin beschichteten Probenfächer pipettiert. Anschließend wurden 100 µl P-Selektin-Konjugat (polyklonaler Antikörper vom Schaf gegen P-Selektin konjugiert mit Meerrettichperoxidase) in die Probenfächer hinzugegeben und für eine Stunde bei RT inkubiert. Darauf folgte ein Waschschrift, um jegliche ungebundenen Antikörper zu entfernen. Durch Hinzugeben einer tetramethylbenzidinhaltigen Lösung wurde eine Farbreaktion gestartet, die nach 15 min durch die Zugabe einer schwefligen Lösung gestoppt wurde. Die optische Densität der Proben und Standards wurde bei 450 nm und 650 nm ermittelt. Die Werte bei 650 nm wurden dann von den bei 450 nm gemessenen Werten zur Korrektur von optischen Verunreinigungen subtrahiert.

IL-10

Die Mikrotiterplatten sind mit murinem monoklonalem Antikörper gegen IL-10 beschichtet. Die Probenfächer wurden zunächst mit 50 µl Assaypuffer befüllt und anschließend wurden 200 µl der Standards bzw. Patientenproben hinzugegeben. Nach Beendigung der Inkubation bei RT für zwei Stunden wurden die Probenfächer mit

Waschpuffer gespült. Es folgte dann die Befüllung mit 200 μl eines polyklonalen Antikörpers gegen IL-10 konjugiert mit Meerrettichperoxidase und eine erneute Inkubation für zwei Stunden bei RT. Nach wiederholtem Waschen wurde eine tetramethylbenzidinhaltige Lösung hinzugefügt, um die Farbreaktion zu initiieren. Die Farbreaktion wurde dann mit 50 μl einer schwefligen Stopplösung beendet. Die Bestimmung der optischen Densität der Proben und Standards erfolgte bei 450 nm und 540 nm. Die Werte bei 540 nm wurden von den bei 450 nm gemessenen Werten abgezogen zur Korrektur optischer Verunreinigungen.

2.9.2 Bestimmung von Nitrat/Nitrit (NO_x)

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein Molekül mit einer extrem kurzen Halbwertszeit und eine Messung der NO-Konzentration erfolgte in dieser Arbeit indirekt über die Bestimmung der beiden Abbauprodukte Nitrat und Nitrit mit der sogenannten Griess-Reaktion. Hierzu wurden die Plasmaproben durch Ultrazentrifugation deproteinisiert. Das in den Proben enthaltene Nitrat wurde zu Nitrit reduziert durch die Zugabe von 0,1 U/ml Nitratreduktase in 2,5 mM Phosphatpuffer (enthielt 5 μM FAD und 50 μM reduziertes Flavin-Adenin-Dinukleotid-Phosphat). Der Reaktionsmix wurde danach durch hinzufügen von 6,7 μl einer Reaktionslösung (60 μl 1:10 verdünnte Laktatdehydrogenase und 140 μl Pyruvat) oxidiert gefolgt von einer Inkubation bei 37 °C für 5 min. Nachfolgend wurde das Griess-Reagens (Sulfanilamid und N-1 (Naphthyl)ethylendiamin) hinzugefügt, welches Nitrit in einen violetten Azofarbstoff umwandelt. Die Extinktion wurde spektrophotometrisch bei 540 nm Wellenlänge bestimmt.

2.10 Statistik

Die hier dargestellten Daten sind angegeben als Mittelwerte \pm Standardabweichung. Dichotome Variable wurden mit dem Fisher's Test analysiert. Die Ergebnisse wurden als statistisch signifikant anerkannt bei einem p-Wert $< 0,05$.

Die unifaktorielle Varianzanalyse („One-Way Analysis of Variance“, ANOVA) mit anschließender Posthoc-Analyse nach Bonferroni wurde zur Beurteilung der biochemischen Parameter angewendet. Als statistisch signifikant wurden p-Werte $< 0,05$ akzeptiert.

3 Ergebnisse

3.1 Klinische Daten

3.1.1 Präoperative Daten

Die Mehrzahl der Patienten in beiden Patientengruppen war männlich (83% in der Kontrollgruppe, 85% in der PC-Gruppe). Das Patientenalter war in beiden Gruppen vergleichbar (60 ± 11 J. in der Kontrollgruppe und 67 ± 10 J. in der PC-Gruppe). Auch hinsichtlich der hier aufgeführten Körpermaße, wie Größe und Gewicht, ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Insbesondere war auch die präoperative Ejektionsfraktion in beiden Gruppen vergleichbar (Kontrollgruppe: 61 ± 11 % und PC-Gruppe : 63 ± 12 %).

Die präoperativen demographischen Daten der Patienten sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tab. 1

		Kontrollgruppe	PC-Gruppe	p
n		18	18	
Alter	(J)	60 ± 11	67 ± 10	ns
männl.	(%)	83	85	ns
Größe	(cm)	172 ± 9	168 ± 9	ns
Gewicht	(kg)	82 ± 11	77 ± 10	ns
KÖF	(m²)	1.9 ± 0.16	1.8 ± 0.16	ns
präoperative EF	(%)	61 ± 11	63 ± 12	ns
Krea. Konz.	(mg/dl)	1.1 ± 0.36	1.2 ± 0.36	ns
KHK Klasse		2.17 ± 0.72	2.71 ± 0.59	ns
Risikofaktoren	(n)	3.2 ± 1.1	3.3 ± 1.3	ns

KÖF: Körperoberfläche, KHK: Koronare Herzkrankheit, EF: Ejektionsfraktion, ns: nicht signifikant

3.1.2 Intraoperative Daten

Die beiden Gruppen waren sowohl hinsichtlich der Bypassdauer, der aortalen Klemmzeit als auch hinsichtlich der Art und Anzahl der verwendeten Bypassgrafts vergleichbar.

Die Tabelle 2 zeigt die intraoperativen klinischen Daten der PC-Gruppe und der Kontrollgruppe.

Tab. 2

		Kontrollgruppe	PC-Gruppe	p
Bypasszeit	(min)	68 ± 18	86 ± 27	ns
Aortenklammzeit	(min)	48 ± 12	58 ± 20	ns
<u>Bypassgrafts</u>				
Gesamtzahl	(n)	3 ± 1.3	3.3 ± 1.8	ns
Venen	(n)	1.8 ± 1	2.2 ± 0.9	ns
Arterien	(n)	1.2 ± 0.3	1.1 ± 0.9	ns

ns: nicht signifikant

3.1.3 Postoperative Daten

Die Leukozyten- und Thrombozytenzahlen und der Hämatokrit wurden am Operationstag zwei Stunden nach Aufnahme auf die Intensivstation bestimmt und wiesen keine signifikanten Unterschiede auf zwischen Patienten bei denen das PC-beschichtete System verwendet wurde und Patienten der Kontrollgruppe. Auch der Blutverlust über die Drainagen in den ersten 48 Stunden war in beiden Gruppen vergleichbar. Die Patienten der Kontrollgruppe benötigten postoperativ Blutprodukte, während in der PC-Gruppe keine Transfusionen gegeben wurden. Der Zeitpunkt der postoperativen Extubation, die Dauer des Aufenthalts auf der Intensivstation und die postoperative Gabe von

Katecholaminen zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Die postoperativen klinischen Daten sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tab. 3

	Kontrollgruppe	PC-Gruppe	p
n	18	18	
Leukozyten (x10⁹/l)	9 ± 2	10 ± 3	ns
Thrombozyten (x10⁹/l)	152 ± 32	147 ± 57	ns
Hämatokrit (%)	27	27	ns
Drainagemenge (ml/ 48 h)	863 ± 614	873 ± 346	ns
EK (ml)	108 ± 206	0	ns
FFP (ml)	33 ± 115	0	ns
Extubation (h)	10.9 ± 5.4	11.8 ± 4.6	ns
ITS (Tage)	1.75 ± 0.62	1.45 ± 0.54	ns
<u>Katecholamine</u>			ns
Epinephrin (mg/24 h)	0.05 ± 0.1	0.46 ± 1.5	ns
Norepinephrin (mg/24 h)	5.32 ± 5.9	2.77 ± 4.06	ns

FFP: „Fresh Frozen Plasma“, EK: Erythrozytenkonzentrat, Extubation: Zeitpunkt der Extubation postoperativ, ITS: Intensivstationsaufenthalt

3.2 Biochemische Parameter

3.2.1 TNF- α

Die Plasmakonzentration von TNF- α war präoperativ vergleichbar in den beiden Patientengruppen. In der Kontrollgruppe, in der ein unbeschichtetes Perfusionssystem verwendet wurde, beobachtete man zwei Stunden postoperativ einen signifikanten Anstieg der Plasmakonzentration von TNF- α . Die TNF- α Plasmakonzentration der PC-Gruppe dagegen blieb im gesamten Beobachtungszeitraum stabil und war zu allen Zeitpunkten postoperativ signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe. Die TNF- α Konzentration in der Kontrollgruppe sank im gesamten Beobachtungszeitraum nicht auf die präoperativen Ausgangswerte zurück.

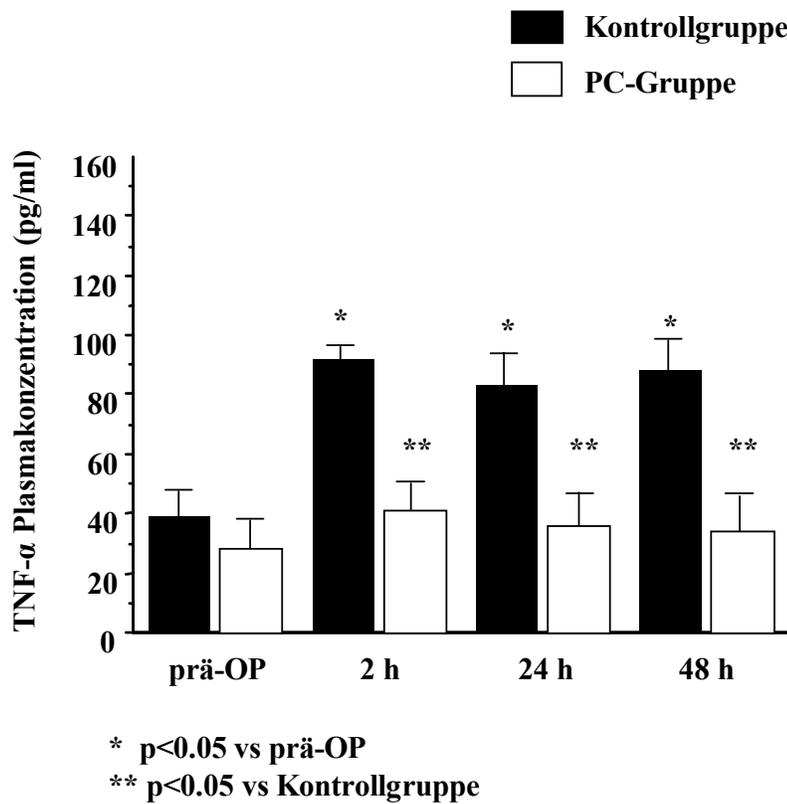


Abb. 4: TNF- α Plasmakonzentration in pg/ml im prä- und postoperativen Verlauf.

3.2.2 P-Selektin

In beiden Patientengruppen wurden präoperativ vergleichbare Plasmakonzentrationen von P-Selektin gemessen. Bei Patienten bei denen ein unbeschichtetes System verwendet wurde zeigte die P-Selektin Konzentration zwei Stunden postoperativ einen signifikanten Anstieg, während die Plasmakonzentration von P-Selektin in der PC-beschichteten Gruppe über den gesamten Beobachtungszeitraum unverändert blieb.

Die P-Selektin Plasmakonzentration in der Kontrollgruppe sank 24 h postoperativ auf präoperative Werte zurück.

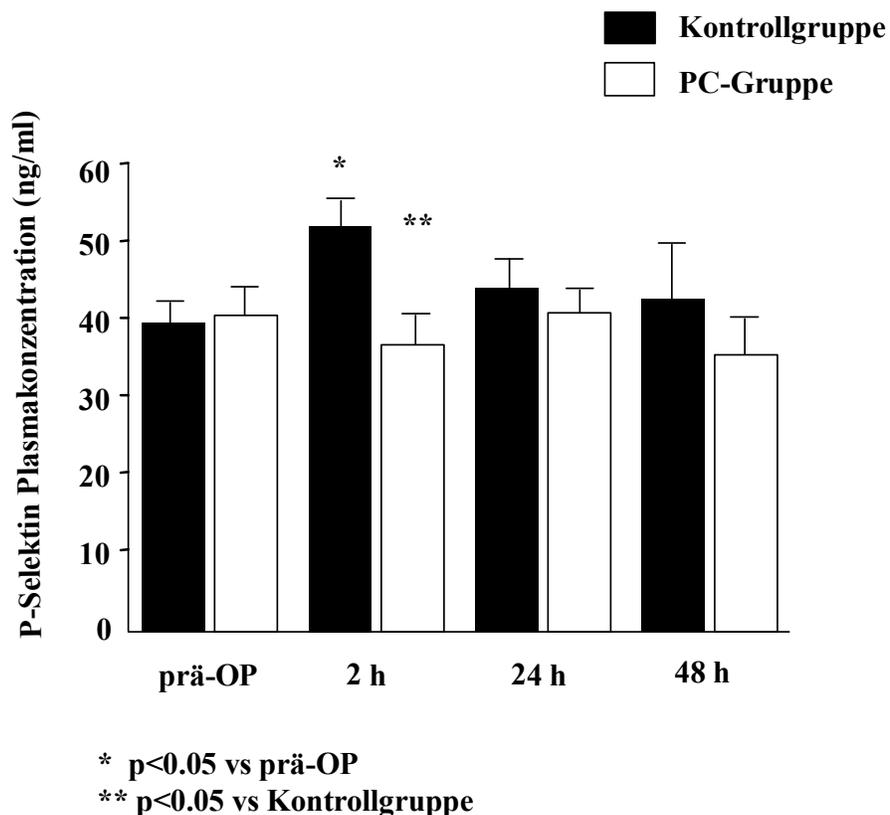


Abb. 5: P-Selektinkonzentration im Plasma in ng/ml im prä- und postoperativen Verlauf.

3.2.3 IL-10

Die Messung der Interleukin-10 Plasmakonzentration wies präoperativ keine signifikanten Unterschiede zwischen der PC-Gruppe und der Kontrollgruppe auf.

Zwei Stunden nach Beendigung der Operation kam es in beiden Patientengruppen zu einem signifikanten Anstieg der IL-10 Plasmakonzentration gegenüber den Ausgangswerten. Hierbei waren die IL-10 Konzentrationen in der PC-Gruppe signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe. Im postoperativen Verlauf waren diese Veränderungen bereits 24 Stunden nach der Operation nicht mehr nachweisbar. In beiden Patientengruppen sanken die IL-10 Konzentrationen auf die präoperativen Ausgangswerte zurück.

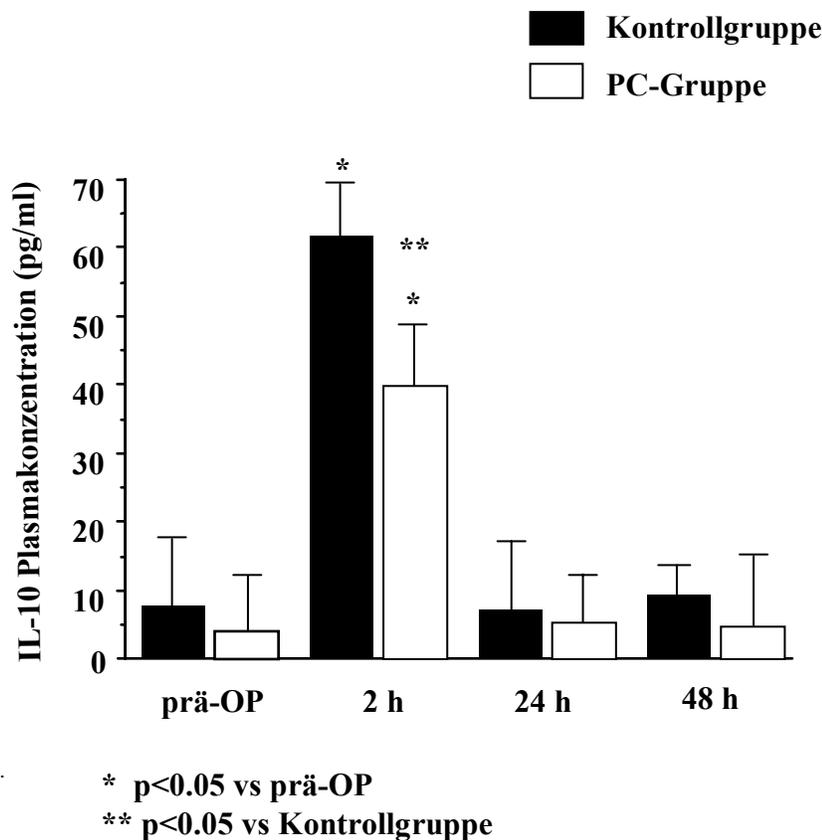


Abb. 6: Plasmakonzentration von IL-10 in pg/ml im prä- und postoperativen Verlauf.

3.2.4 Plasma Nitrat/Nitrit (NO_x)

Vergleichbare Werte bei der Bestimmung der Plasma Nitrat/Nitrit Konzentration (NO_x) wurden präoperativ in beiden Patientengruppen ermittelt. Auch zwei Stunden nach der Operation wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten, bei denen ein PC-beschichtetes System verwendet wurde im Vergleich zu den Patienten der Kontrollgruppe beobachtet. Signifikant höhere NO_x Konzentrationen in der PC-Gruppe im Vergleich mit der Kontrollgruppe wurden 24 Stunden nach der Operation gemessen. Weitere 24 Stunden später waren diese Unterschiede nicht mehr nachweisbar.

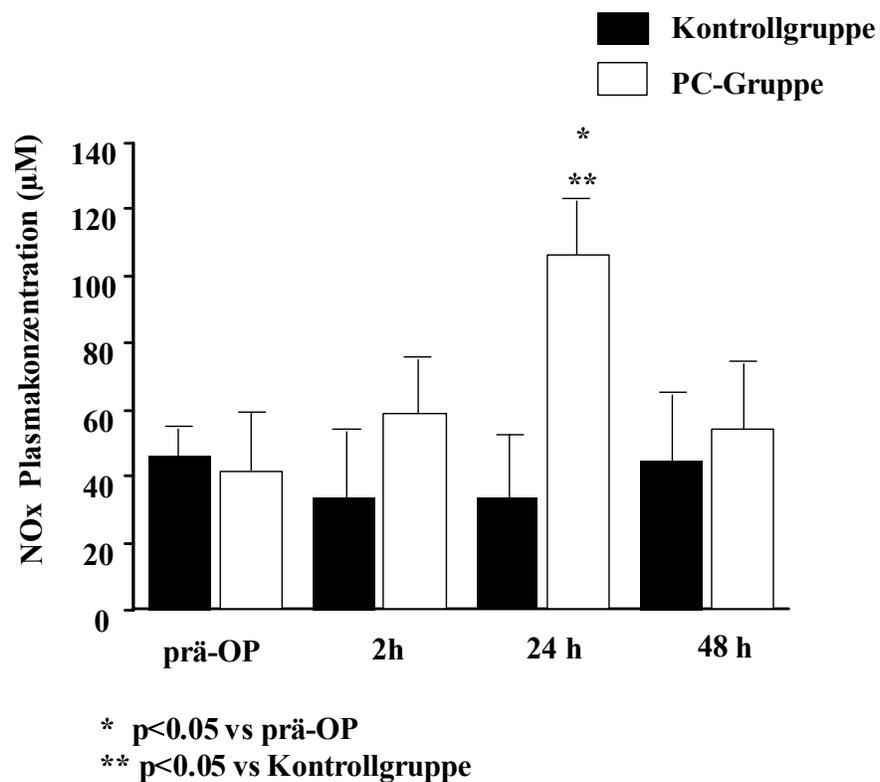


Abb. 7: Plasmakonzentration in µM von Nitrat/Nitrit (NO_x) im prä- und postoperativen Verlauf.

3.2.5 Creatinkinase

Die Konzentration der Creatinkinase (CK) wurde präoperativ nicht bestimmt. Zu keinem Zeitpunkt ergab die postoperative Bestimmung der Creatinkinase Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und der PC-Gruppe.

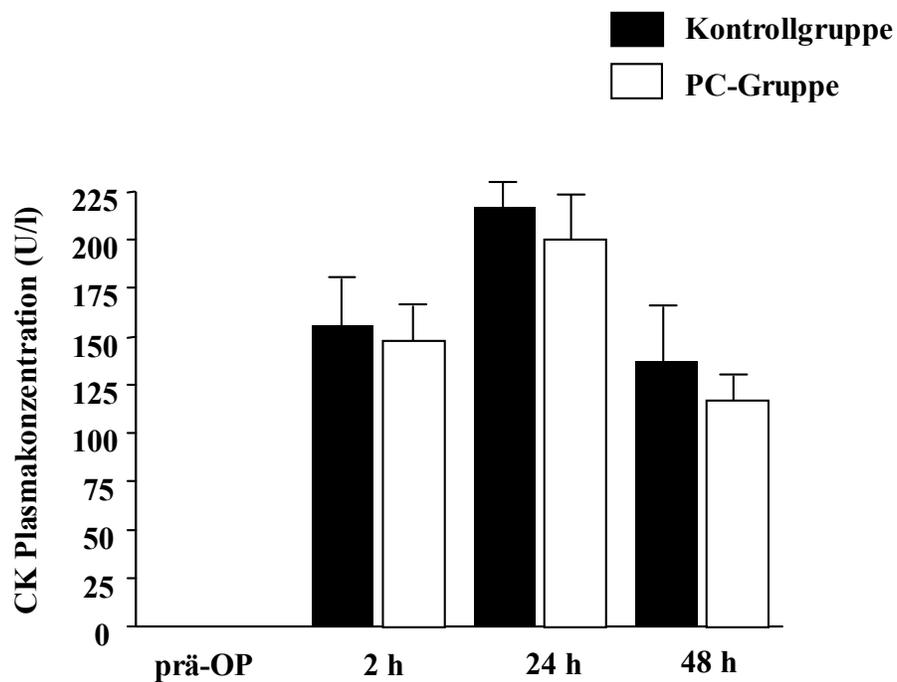


Abb. 8: Plasmakonzentration der Creatinkinase im postoperativen Verlauf.

4 Diskussion

Herzchirurgische Eingriffe unter Verwendung der extrakorporalen Zirkulation sind durch die häufig beobachtete systemische inflammatorische Reaktion (SIRS) mit einer erhöhten postoperativen Morbidität assoziiert [WAN et al., 1997c].

Die Beschichtung von Perfusionssystemen zur extrakorporalen Zirkulation in der Herzchirurgie mit Phosphorylcholin (PC) weist einen protektiven Effekt gegen die durch die Fremdoberfläche verursachte Blutaktivierung und somit auch eine verbesserte Biokompatibilität für den Patienten auf.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine signifikante Reduktion der inflammatorischen Reaktion bei Patienten zur koronarchirurgischen Revaskularisation unter Verwendung eines PC-beschichteten Perfusionssystems beobachtet. Die systemische inflammatorische Reaktion wurde in dieser Arbeit anhand der Bestimmung der Zytokine TNF- α , IL-10, des Adhäsionsmoleküls P-Selektin und der Plasmakonzentration von Nitrat/Nitrit (NO $_x$) gemessen. Die Konzentration des inflammatorischen Zytokins TNF- α und des Adhäsionsmoleküls P-Selektin waren hierbei bei Patienten bei denen ein PC-beschichtetes System eingesetzt wurde signifikant niedriger als bei Patienten der Kontrollgruppe. Hinsichtlich der Bestimmung des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 wurde postoperativ, im Vergleich zu den Patienten der Kontrollgruppe, ein geringerer Anstieg der IL-10 Konzentration in der PC-Gruppe festgestellt. Die Konzentration von (NO $_x$) hingegen war in der PC-Gruppe erhöht, während in der Kontrollgruppe keine Änderung der NO $_x$ -Konzentration auftrat.

Im Gegensatz zu den gewonnen Ergebnissen in Bezug auf die inflammatorischen Parameter, wurden bei der Bestimmung der Creatinkinase keine Unterschiede zwischen den Gruppen beobachtet.

Weiterhin konnten bei dem hier untersuchten Patientengut keine Unterschiede im postoperativen klinischen Verlauf festgestellt werden. Die Beschichtung des HLM Systems mit Phosphorylcholin führte insbesondere auch nicht zu einer Reduzierung der postoperativen Katecholamindosierung. Diese Daten decken sich mit den Ergebnissen der Autoren De Somer et al., die sowohl tierexperimentell als auch bei Kindern mit

kongenitalen Herzerkrankungen eine verminderte Thrombozytenaktivierung und eine verringerte Aktivierung des Komplementsystems mit vermindertem Blutverlust bei Verwendung eines mit Phosphorylcholin beschichteten HLM-Systems nachwiesen, nicht jedoch einen reduzierten Katecholaminbedarf [DE SOMER et al., 1999a; DE SOMER et al. 2000b].

4.1 TNF- α

Die Beschichtung der inneren Oberfläche mit Phosphorylcholin des in dieser Arbeit verwendeten Perfusionssystems, reduziert signifikant die Konzentration des proinflammatorischen Zytokins TNF- α bei Patienten die eine koronarchirurgische Myokardrevaskularisierung erhielten. Die Rolle von proinflammatorischen Zytokinen nach kardiopulmonalem Bypass wurde bereits intensiv untersucht. Insbesondere TNF- α wurde nach herzchirurgischen Operationen in erhöhten Konzentrationen nachgewiesen und trägt zu der Entwicklung eines postoperativen SIRS bei. Hauptbildungsort von TNF- α sind Zellen des Immunsystems, wie Makrophagen und Monozyten, jedoch wird TNF- α auch in verschiedenen Zellen des Myokards und auch in Myozyten produziert [WAN et al., 1996a]. Die Quelle des hier in der Kontrollgruppe in erhöhter Konzentration gemessenen TNF- α ist nicht bekannt. Entgegen der Ansicht, dass das nach herzchirurgischen Eingriffen in erhöhter Konzentration nachgewiesene TNF- α hauptsächlich in Makrophagen und Monozyten gebildet wird, beschrieben Meldrum et al. auch eine vermehrte Produktion dieses Zytokins im Myokard [MELDRUM et al., 2003]. Erhöhte Plasmakonzentrationen von TNF- α sind mit postoperativer akuter ventrikulärer Dysfunktion assoziiert [TE VELTHUIS et al., 1995]. Neben anderen Zytokinen spielt TNF- α nicht nur eine Rolle bei der Entwicklung der akuten ventrikulären Dysfunktion, sondern auch in der Pathophysiologie der chronischen Herzinsuffizienz. Hinsichtlich des Entstehungsmechanismus der TNF- α vermittelten linksventrikulären Funktionsstörung werden zwei mögliche Mechanismen diskutiert: 1. Die TNF- α induzierte Produktion von NO über die Stimulation der Calcium unabhängigen induzierbaren NO-Synthase (iNOS)

und dadurch negativ inotropen Effekte auf das Myokard [GULICK et al., 1989] und 2. die Aktivierung einer komplexen Kaskade und u.a. die Aktivierung der neutralen Sphingomyelinase [ORAL et al., 1997]. Während der NO vermittelte Mechanismus verzögerte Effekte (Stunden bis Tage) zeigt, handelt es sich bei dem Sphingomyelinase Prozess um einen akuten Vorgang. TNF- α scheint weiterhin auch an dem Prozess des „Left Ventricular Remodeling“ beteiligt zu sein durch seine Matrix modulierenden Effekte. Man nimmt an, dass das linksventrikuläre „Remodeling“, d.h. die Veränderung der linksventrikulären Dimensionen durch Umwandlungsprozesse in der extrazellulären Matrix, durch chronische Schädigung des Myokards verursacht wird. Jedoch gibt es Hinweise darauf, dass diese TNF- α vermittelten Veränderungen der extrazellulären Matrix sich auch akut manifestieren könnten [PAGANI et al., 1992].

Zusätzlich zu den Effekten auf das Myokard beeinflusst TNF- α auch die endotheliale Funktion und kann somit auch zu der Entwicklung weiterer häufig beobachteter Nebenwirkungen nach Einsatz der HLM beitragen, wie der Ausbildung eines pulmonalen Ödems und Störungen der Organperfusion. Diese Effekte können zum Teil auf die durch TNF- α bewirkte Downregulation der endothelialen NO Synthase zurückzuführen sein [AGNOLETTI et al., 1999]. Die Freisetzung von TNF- α wird nach kardiopulmonalem Bypass durch eine Reihe von Faktoren stimuliert. Abgesehen von der Exposition des Patientenbluts mit der Fremdoberfläche des Perfusionssystems wird die Zytokinproduktion auch durch Material unabhängige Stimuli gesteigert (Ischämie-Reperfusion, Komplement, Endotoxine, andere Zytokine) [WAN et al., 1997c]. Unter der Annahme, dass diese Material unabhängigen Faktoren in der PC-beschichteten und der Kontrollgruppe identisch waren, ist die hier beobachtete Reduktion des TNF- α in der PC-Gruppe am ehesten auf den protektiven Effekt der Phosphorylcholinbeschichtung zurückzuführen.

4.2 P-Selektin

Die Plasmakonzentration von P-Selektin in der Patientengruppe, in der ein PC-beschichtetes System eingesetzt wurde, war signifikant reduziert gegenüber der Kontrollgruppe. Der Zusammenhang zwischen den Effekten der extrakorporalen Zirkulation und der erhöhten P-Selektinkonzentrationen nach kardiopulmonalem Bypass wurde bereits von Wildhirt et al. erkannt: Bei Patienten die in „Off-Pump“-Technik operiert wurden, zeigten sich signifikant niedrigere P-Selektinkonzentrationen als bei Patienten die konventionell an der HLM operiert wurden [WILDHIRT et al, 2001]. Das Protein P-Selektin gehört zu der Familie der Adhäsionsmoleküle und konnte in Leukozyten und in Thrombozyten nachgewiesen werden [LORANT et al., 1993]. Zu den Regulatoren der P-Selektinexpression gehört u.a. auch NO [ARMSTEAD et al., 1997]. Die Aufgabe dieses Proteins besteht in der Ermöglichung der Interaktion zwischen Endothelzellen auf der einen und Leukozyten und Thrombozyten auf der anderen Seite. P-Selektin ermöglicht die Anlagerung dieser Zellen an das Endothel und ist für die Rekrutierung weiterer Leukozyten verantwortlich. Die Adhäsion der Leukozyten-Thrombozyten-Aggregate an das Endothel wird über aktivierte Integrine der Endothelzelle vermittelt und führt schließlich zu deren Adhärenz an die Gefäßinnenwand. Letztendlich kann die Anlagerung dieser Aggregate in Verbindung mit weiteren Faktoren, wie Vasokonstriktion aufgrund einer verminderten NO Produktion, in der Mikrostrombahn zu Gefäßverschlüssen führen. Die auf P-Selektin zurückzuführenden Effekte auf die Mikrozirkulation könnten auch eine Rolle in der Pathogenese des sogenannten „No-Reflow“ Phänomens mit konsekutiver kardialer Dysfunktion spielen [OHNISHI et al., 1999], welches in der Herzchirurgie häufig nach Reperfusion des Herzens auftritt. Niedrigere P-Selektin Konzentrationen bei Patienten die mit der PC-beschichteten EKZ operiert wurden, könnten eine verminderte Interaktion von Thrombozyten und Leukozyten mit dem Endothel und somit eine herabgesetzte Thrombogenität und verbesserten Blutfluss in der Mikrozirkulation bedeuten. Interessanterweise scheinen erhöhte Werte des löslichen P-Selektins einen gewissen prädiktiven Wert zu haben bei der Risikoabschätzung kardiovaskulärer Erkrankungen.

Inflammatorische Reaktionen, wie die P-Selektin vermittelte Anlagerung von Leukozyten an das Endothel, sind vor allem in der Frühphase der Artheroskleroseentstehung von Bedeutung [RIDKER et al., 2001], und eine begünstigende Wirkung der durch den kardiopulmonalen Bypass induzierten erhöhten Konzentrationen des löslichen P-Selektins auf die Progredienz der Erkrankung wäre denkbar.

4.3 Interleukin-10

Um einen möglichen Einfluss der Phosphorylcholinbeschichtung auf eine gegenregulatorische antiinflammatorische Reaktion zu evaluieren, wurde in dieser Arbeit das antiinflammatorische Zytokin IL-10 bestimmt. Die nach herzchirurgischen Operationen mit EKZ auftretenden erhöhten IL-10 Konzentrationen [DIEGELER et al., 2000], könnten eine kompensatorische Gegenregulation als Antwort auf die hohe inflammatorische Aktivität bedeuten. IL-10 inhibiert die Produktion anderer Zytokine in Makrophagen und beeinflusst negativ deren Antigen präsentierenden Funktionen und somit ihre immunsupprimierenden Eigenschaften. Des Weiteren scheint IL-10 auch protektive Effekte hinsichtlich einer myokardialen Schädigung durch Ischämie-Reperfusionstrauma zu besitzen [LANE et al., 1997], und eine exogene Applikation von IL-10 vermag den myokardialen Schaden zu mildern [HAYWARD et al., 1997]. Diese protektiven Effekte beruhen auf einer IL-10 vermittelten reduzierten Adhäsion von neutrophilen Leukozyten an aktivierte Endothelzellen [KRAKAUER, 1995]. Ein Mangel an IL-10 hat andererseits, nach Ischämie-Reperfusionstrauma, eine verstärkte Infiltration des Myokards durch Leukozyten zufolge [JONES et al., 2001]. Die antiinflammatorischen Effekte von IL-10 erstrecken sich u.a. auch auf die negative Regulation der iNOS Expression und Inhibition der TNF- α Produktion [YANG et al., 2000].

Die in dieser Arbeit signifikant niedrigeren IL-10 Konzentrationen bei Patienten die mit dem PC-beschichteten System operiert wurden, könnten ein Hinweis sein auf eine generell verminderte systemische inflammatorische Reaktion durch die Verwendung des

PC-beschichteten Systems und somit als Ausdruck einer verbesserten Biokompatibilität gedeutet werden. Weiterführende Untersuchungen sind jedoch notwendig, um die Bedeutung von IL-10 auf den klinischen Verlauf von Patienten die an der HLM operiert werden zu charakterisieren.

4.4 Nitrat/Nitrit (NO_x)

Das freie Radikal Stickstoffmonoxid (NO) ist ein Molekül mit vielfältigen biologischen Effekten und ist u.a. durch seine potente vasodilatatorische Wirkung wesentlich bei der Regulation des Gefäßtonus involviert. Die Bildung von NO wird von der NO-Synthase (NOS) durch die Umwandlung von L-Arginin in L-Citrullin unter Verbrauch mehrerer Co-Faktoren katalysiert.

Bislang konnten drei verschiedene Isoformen der NO-Synthase identifiziert werden:

- nNOS: neuronale NO-Synthase
- eNOS: endotheliale NO-Synthase
- iNOS: induzierbare NO-Synthase

Die neuronale und die endotheliale NO-Synthase werden auch als konstitutive NOS (cNOS) aufgrund ihrer kontinuierlichen basalen NO-Generation zusammengefasst. Die konstitutive Produktion von NO ist hierbei von der Calciumionenkonzentration in der Zelle abhängig [GRIFFITH und STUEHR, 1995]. Die induzierbare NO-Synthase (iNOS) dagegen ist in ihrer katalytischen Aktivität unabhängig von der Calciumionenkonzentration. iNOS produziert NO in größeren Mengen als Antwort auf verschiedene Stimuli, wie z.B. bei Entzündungsreaktionen vermehrt freigesetzte Zytokine und bakterielle Lipopolysaccharide (Endotoxine) [NUSSLER und BILLIAR, 1993]. Die Calcium unabhängige iNOS konnte in Endothelzellen [RADOMSKI et al., 1990], Makrophagen [HIBBS et al., 1988] und neutrophilen Granulozyten [McCall et al., 1989],

in Zellen der glatten Gefäßmuskulatur [BUSSE und MULSCH, 1990] und auch in Herzmuskelzellen [SCHULZ et al., 1992] lokalisiert werden.

Die nach kardiopulmonalem Bypass erhöhte NO Produktion [RUVOLO et al., 1994] ist am ehesten auf eine verstärkte Aktivität der iNOS zurückzuführen. Dies könnte ein Anpassungsmechanismus des Organismus auf das durch kardiopulmonalen Bypass verursachte Trauma sein, mit dem Ziel eine adäquate Organperfusion aufrecht zu erhalten. Während die konstitutive NO-Produktion durch die endotheliale NO-Synthase protektive Effekte auf die Mikrozirkulation hat, werden die in großen durch iNOS produzierten Mengen für die postoperative Vasoplegie und erhöhte Kapillarpermeabilität verantwortlich gemacht [PAPARELLA et al., 2002]. Die durch iNOS bereitgestellte Menge NO wird darüberhinaus auch für die nach Reperfusion auftretende ventrikuläre myokardiale Dysfunktion („Stunning“) verantwortlich gemacht [OYAMA et al., 1998]. Die Ergebnisse, hinsichtlich einer erhöhten NO-Freisetzung nach kardiopulmonalem Bypass, sind jedoch in der Literatur nicht einheitlich. Entgegen den Ergebnissen von Ruvolo et al. konnte in einer Arbeit von Brett et al. keine gesteigerte NO-Produktion bei Patienten zur aortokoronaren Bypassoperation nachgewiesen werden [BRETT et al., 1998].

In der vorliegenden Arbeit wurden 24 Stunden nach der Operation signifikant höhere NO_x Werte in der PC-beschichteten Patientengruppe gemessen, während in der Kontrollgruppe keine Änderung der NO_x Konzentration im Beobachtungszeitraum gemessen wurde. Die zelluläre Quelle des hier bestimmten NO_x ist nicht bekannt. Die Aktivität der eNOS wird durch die extrakorporale Zirkulation supprimiert [EVORA et al., 1994; ENGELMAN DT et al., 1995; SATO H et al., 1997] und dies könnte zumindest teilweise für die nach EKZ beobachtete endotheliale Dysfunktion, erhöhte Thrombogenität und verschlechterte Regulation des Blutfluss verantwortlich sein.

NO ist ein Fänger freier Radikale [COOKE und TSAO, 1993]. Die reduzierte NO_x-Konzentration in der Kontrollgruppe könnte durch erhöhte Konzentrationen freier Sauerstoffradikale und dadurch bedingte Abnahme der NO-Verfügbarkeit zu erklären sein. Diese Annahme ist jedoch spekulativ, da in dieser Studie der Grad des oxidativen Stresses nicht Gegenstand der Untersuchung war.

Die in der PC-Gruppe gemessenen höheren NOx Konzentrationen in Verbindung mit der reduzierten inflammatorischen Komponente könnte aber auch auf die dadurch konservierte NOx Produktion hinweisen.

4.5 Creatinkinase

Die Creatinkinase wurde im Rahmen der postoperativen Routineblutentnahmen bestimmt. Koronarchirurgische Operationen am kardiopulmonalen Bypass sind mit einer myokardialen Zellschädigung assoziiert [CZERNY et al., 2000], während es unter Verzicht auf die EKZ bei koronarchirurgischen Operationen („Off Pump“-Technik) zu einer Reduktion der Plasmakonzentrationen von Troponin und der Creatinkinase kommt [PENTTILA et al., 2001; WILDHIRT et al., 2000a]. Beim Vergleich der hier untersuchten Patientengruppen konnte allerdings im postoperativen Verlauf kein Effekt der Phosphorylcholinbeschichtung, hinsichtlich einer verminderten Freisetzung der Creatinkinase, beobachtet werden.

4.6 Postoperativer Katecholaminbedarf

Die systemische inflammatorische Reaktion nach koronarchirurgischen Eingriffen an der HLM ist mit einer eingeschränkten Hämodynamik bedingt sowohl durch die Abnahme des systemischen Gefäßwiderstands als auch der verminderten myokardialen Kontraktilität verbunden und erfordert häufig den postoperativen Einsatz α - und β -adrenerger Substanzen, wie z.B. Norepinephrin und Epinephrin. Der postoperative Katecholaminbedarf korreliert hierbei u.a. mit der Plasmakonzentration von TNF- α und P-Selektin [WILDHIRT et al., 2001b]. In der vorliegenden Arbeit wies der postoperative Katecholaminbedarf keine Unterschiede auf zwischen Patienten die mit der PC-beschichteten HLM (PC-Gruppe) und Patienten die mit dem unbeschichteten System (Kontrollgruppe) operiert wurden trotz der signifikanten Reduktion der

Plasmakonzentrationen von TNF- α und P-Selektin durch die Verwendung des PC-beschichteten Systems.

4.7 Limitationen und klinische Bedeutung

In dieser Arbeit konnte eine Reduktion der inflammatorischen Reaktion durch die Verwendung eines PC-beschichteten Perfusionssystems ausschließlich hinsichtlich der biochemischen Parameter, nicht aber den klinischen Verlauf betreffend, festgestellt werden. Dies könnte auf die spezifische Auswahl der Patientenpopulation zurückzuführen sein. Patienten mit Begleiterkrankungen die den postoperativen Verlauf erschweren, wie z.B. Diabetes mellitus oder eine eingeschränkte Nierenfunktion, wurden nicht in die Studie eingeschlossen. Weiterhin wurden auch keine Patienten mit schwer eingeschränkter linksventrikulärer Funktion berücksichtigt. Deng et al. beobachteten bei Patienten nach Bypassoperation mit eingeschränkter linksventrikulärer Funktion (EF < 45 %) höhere Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine und ein gesteigertes Risiko postoperative Komplikationen zu entwickeln als bei Patienten mit normaler EF [DENG et al., 1996]. Die potentiellen günstigen Auswirkungen einer PC-beschichteten EKZ auf den postoperativen klinischen Verlauf könnten ausgeprägter sein bei Patienten mit einem höheren präoperativen Risikoprofil, insbesondere hierbei einer reduzierten linksventrikulären Funktion.

Das Ausmaß der inflammatorischen Reaktion ist außerdem ein zeitabhängiger Prozess [WAN et al., 1997b; DENG et al., 1996], und das Risiko postoperative Organdysfunktionen zu entwickeln ist von der Dauer des Kontakts des Patientenbluts mit der Fremdoberfläche der EKZ abhängig. Auch die eventuellen positiven Effekte der PC-beschichteten EKZ auf die Entwicklung klinisch apparenter Symptome einer systemischen Reaktion, könnten durch die Dauer der Operation beeinflusst werden. Es erscheint möglich, dass die positiven Effekte der PC-Beschichtung erst klinisch relevant werden bei Operationen mit längeren Bypasszeiten.

5 Zusammenfassung

Der Einsatz der extrakorporalen Zirkulation bei koronarchirurgischen Eingriffen führt durch den Kontakt des Patientenbluts mit der Fremdoberfläche des Perfusionssystems zu einer systemischen inflammatorischen Reaktion (SIRS). Inflammatorische Mediatoren, wie Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α), Interleukin-10 (IL-10), P-Selektin und Stickstoffmonoxid (NO) treten nach kardiopulmonalem Bypass in erhöhten Konzentrationen im Plasma auf. Abhängig vom Schweregrad der durch die extrakorporale Zirkulation ausgelösten systemischen inflammatorischen Reaktion (SIRS) kann diese bei dem Patienten zu der Ausbildung von Funktionsstörungen verschiedener Organsysteme bis hin zum Multiorganversagen führen.

Die Beschichtung der inneren Oberfläche der in der Herzchirurgie verwendeten Perfusionssysteme mit Phosphorylcholin (PC) imitiert die Eigenschaften der physiologischen Zellmembran und reduziert die Aktivierung zellulärer und humoraler Bestandteile des Bluts.

In der vorliegenden Arbeit wurde in einer prospektiv randomisierten Studie untersucht, ob durch die Beschichtung der inneren Oberfläche des Perfusionssystems mit PC eine reduzierte systemische inflammatorische Reaktion und somit verbesserte Biokompatibilität für den Patienten erreicht werden kann. Hierzu wurden Patienten zur koronarchirurgischen Revaskularisation am kardiopulmonalen Bypass prospektiv in die Studie eingeschlossen und in 2 Gruppen randomisiert. In der einen Gruppe wurde ein mit PC-beschichtetes Perfusionssystem verwendet (PC-Gruppe), während in der Kontrollgruppe ein herkömmliches unbeschichtetes System zum Einsatz kam. In beiden Patientengruppen wurden perioperativ die Plasmakonzentrationen von TNF- α , IL-10 und P-Selektin mittels „Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) gemessen. Die Plasmakonzentrationen von Nitrat/Nitrit (NO_x) wurden mit Hilfe der Griess-Reaktion bestimmt.

Die Plasmakonzentrationen von TNF- α und P-Selektin waren bei Patienten bei denen ein unbeschichtetes System verwendet wurde signifikant höher im Vergleich zu den Patienten bei denen ein PC-beschichtetes System verwendet wurde. In der

Kontrollgruppe wurde postoperativ ein Anstieg der IL-10 Plasmakonzentration gemessen, während die Interleukin-10 Konzentration in der PC-Gruppe unverändert blieb. Am ersten postoperativen Tag war die Konzentration von Plasma NOx in der PC-beschichteten Gruppe signifikant erhöht, während sich keine Änderungen der NOx Plasmakonzentration in der Kontrollgruppe feststellen ließen. Im Hinblick auf die prä- und postoperativen klinischen Daten ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der PC-Gruppe und der Kontrollgruppe.

Die hier gewonnenen Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Beschichtung des Perfusionssystems mit Phosphorylcholin die Biokompatibilität erhöht und zu einer Reduktion der postoperativen systemischen inflammatorischen Reaktion bei Patienten zur koronarchirurgischen Revaskularisierung am kardiopulmonalen Bypass führt.

6 Literaturverzeichnis

ADERKA D (1996) The potential biological and clinical significance of the soluble tumor necrosis factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*, 7:231-240

AGNOLETTI L, Curello S, Bachetti T, Malacarne F, Gaia G, Comini L, Volterrani M, Bonetti P, Parrinello G, Cadei M, Grigolato PG, Ferrari R (1999) Serum from patients with severe heart failure downregulates eNOS and is proapoptotic: role of tumor necrosis factor-alpha. *Circulation*, 100:1983-1991

ARMSTEAD VE, Minchenko AG, Schuhl RA, Hayward R, Nossuli TO, Lefer AM (1997) Regulation of P-selectin expression in human endothelial cells by nitric oxide. *Am J Physiol*, 273:740-746

ARMSTRONG L, Jordan N, Millar A (1996) Interleukin-10 (IL-10) regulation of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) from human alveolar macrophages and peripheral blood monocytes. *Thorax*, 51:143-149

BLUME ED, Nelson DP, Gauvreau K, Walsh AZ, Plumb C, Neufeld EJ, Hickey PR, Mayer JE, Newburger JW (1997) Soluble adhesion molecules in infants and children undergoing cardiopulmonary bypass. *Circulation*, 96:352-357

BRETT SJ, Quinlan GJ, Mitchell J, Pepper JR, Evans TW (1998) Production of nitric oxide during surgery involving cardiopulmonary bypass. *Crit Care Med*, 26:272-278

BRUCKENBERGER E (2004) Herzbericht 2004 mit Transplantationschirurgie, 17. Bericht, Hannover

BUSSE R und MULSCH A (1990) Induction of nitric oxide synthase by cytokines in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett*, 275:87-90

CAIN BS, Meldrum DR, Dinarello CA, Meng X, Joo KS, Banerjee A, Harken AH (1999) Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta synergistically depress human myocardial function. *Crit Care Med*, 27:1309-1318

McCALL TB, Boughton-Smith NK, Palmer RM, Whittle BJ, Moncada S (1989) Synthesis of nitric oxide from L-arginine by neutrophils. Release and interaction with superoxide anion. *Biochem J*, 261:293-296

CHENOWETH DE, Cooper SW, Hugli TE, Stewart RW, Blackstone EH, Kirklin JW (1981) Complement activation during cardiopulmonary bypass: evidence for generation of C3a and C5a anaphylatoxins. *N Engl J Med*, 304:497-503

COOKE JP und TSAO PS (1993) Cytoprotective effects of nitric oxide. *Circulation*, 88:2451-2454

CZERNY M, Baumer H, Kilo J, Lassnigg A, Hamwi A, Vukovich T, Wolner E, Grimm M (2000) Inflammatory response and myocardial injury following coronary artery bypass grafting with or without cardiopulmonary bypass. *Eur J Cardiothorac Surg*, 17:737-742

DENG MC, Dasch B, Erren M, Mollhoff T, Scheld HH (1996) Impact of left ventricular dysfunction on cytokines, hemodynamics, and outcome in bypass grafting. *Ann Thorac Surg*, 62:184-190

DE SOMER F, Van Belleghem Y, Foubert L, Francois K, Dubrulle F, De Wolf D, Van Nooten G (1999a) In vivo evaluation of a phosphorylcholine coated cardiopulmonary bypass circuit. *J Extra Corpor Technol*, 31:62-66

DE SOMER F, Francois K, van Oeveren W, Poelaert J, De Wolf D, Ebels T, Van Nooten G (2000b) Phosphorylcholine coating of extracorporeal circuits provides natural protection against blood activation by the material surface. *Eur J Cardiothorac Surg*, 18:602-606

DE SOMER F, Van Bellegham Y, Caes F, Francois K, Arnout J, Bossuyt X, Taeymans Y, Van Nooten G (2002c) Phosphorylcholine coating offers natural platelet preservation during cardiopulmonary bypass. *Perfusion*, 17:39-44

DE SOMER F, Van Bellegham Y, Caes F, Francois K, Van Overbeke H, Arnout J, Taeymans Y, Van Nooten G (2002d) Tissue factor as the main activator of the coagulation system during cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 123:951-958

DIEGELER A, Doll N, Rauch T, Haberer D, Walther T, Falk V, Gummert J, Autschbach R, Mohr FW (2000) Humoral immune response during coronary artery bypass grafting: A comparison of limited approach, "off-pump" technique, and conventional cardiopulmonary bypass. *Circulation*, 102:95-100

DONNELLY RP, Freeman SL, Hayes MP (1995) Inhibition of IL-10 expression by IFN-gamma up-regulates transcription of TNF-alpha in human monocytes. *J Immunol*, 155:1420-1427

ENGELMAN DT, Watanabe M, Engelman RM, Rousou JA, Flack JE 3rd, Deaton DW, Das DK (1995) Constitutive nitric oxide release is impaired after ischemia and reperfusion. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 110:1047-1053

EVORA PR, Pearson PJ, Schaff HV (1994) Impaired endothelium-dependent relaxation after coronary reperfusion injury: evidence for G-protein dysfunction. *Ann Thorac Surg*, 57:1550-1556

FIORENTINO DF, Zlotnik A, Molsmann TR, Howard M, O'Garra A (1991) IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol*, 147:3815-3822

FISCHER WH, Jagels MA, Hugli TE (1999) Regulation of IL-6 synthesis in human peripheral blood mononuclear cells by C3a and C3a(desArg). *J Immunol*, 162:453-459

FUKUTOMI M, Kobayashi S, Niwaya K, Hamada Y, Kitamura S (1996) Changes in platelet, granulocyte, and complement activation during cardiopulmonary bypass using heparin-coated equipment. *Artif Organs*, 20:767-776

GIOMARELLI P, Naldini A, Biagioli B, Borrelli E (2000) Heparin coating of extracorporeal circuits inhibits cytokine release from mononuclear cells during cardiac operations. *Int J Artif Organs*, 23:250-255

GRIFFITH OW und STUEHR DJ (1995) Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu Rev Physiol*, 57:707-736

GRYGLEWSKI RJ, Palmer RM, Moncada S (1986) Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature*, 320:454-456

GULICK T, Chung MK, Pieper SJ, Lange LG, Schreiner GF (1989) Interleukin 1 and tumor necrosis factor inhibit cardiac myocyte beta-adrenergic responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 86:6753-6757

HAYASHI Y, Sawa Y, Nishimura M, Tojo SJ, Ichikawa H, Satoh H, Yamaguchi T, Suhara H, Ohtake S, Matsuda H (2000a) P-selectin monoclonal antibody may attenuate the whole body inflammatory response induced by cardiopulmonary bypass. *ASAIO J*, 46:334-337

HAYASHI Y, Sawa Y, Nishimura M, Fukuyama N, Ichikawa H, Ohtake S, Nakazawa H, Matsuda H (2004b) Peroxynitrite, a product between nitric oxide and superoxide anion, plays a role in the development of post-bypass systemic inflammatory response. *Eur J Cardiothorac Surg*, 26:276-280

HAYWARD R, Nossuli TO, Scalia R, Lefer AM (1997) Cardioprotective effect of interleukin-10 in murine myocardial ischemia-reperfusion. *Eur J Pharmacol*, 334:157-163

HIBBS JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z, Rachlin EM (1988) Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Comm*, 157:87-94

IZUHA H, Hattori M, Igari T, Wakamatsu D, Watanabe M, Yokoyama H (2005) Changes in platelet aggregation during cardiopulmonary bypass: comparison of poly-2-methoxyethylacrylate and heparin as a circuit coating material. *J Artif Organs*, 8:41-46

JANSEN NJ, van Oeveren W, Gu JY, van Vliet MH, Eijssman L, Wildevuur CR (1992) Endotoxin release and tumor necrosis factor formation during cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg*, 54:744-747

JONES SP, Trocha SD, Lefer DJ (2001) Cardioprotective actions of endogenous IL-10 are independent of iNOS. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 281:48-52

JULOU-SCHAEFFER G, Gray GA, Fleming I, Schott C, Parratt JR, Stoclet JC (1990) Loss of vascular responsiveness induced by endotoxin involves L-arginine pathway. *Am J Physiol*, 259:1038-1043

KAPADIA S, Lee J, Torre-Amione G, Birdsall HH, Ma TS, Mann DL (1995) Tumor necrosis factor- α gene and protein expression in adult feline myocardium after endotoxin administration. *J Clin Invest*, 96:1042-1052

KOLLIAS G, Douni E, Kassiotis G, Kontoyiannis D (1999) The function of tumor necrosis factor and receptors in models of multi-organ inflammation, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and inflammatory bowel disease. *Ann Rheum Dis*, 58:32-39

KRAKAUER T (1995) IL-10 inhibits the adhesion of leukocytic cells to IL-1-activated human endothelial cells. *Immunol Lett*, 45:61-65

LANE JS, Todd KE, Lewis MP, Gloor B, Ashley SW, Reber HA, McFadden DW, Chandler CF (1997) Interleukin-10 reduces the systemic inflammatory response in a murine model of intestinal ischemia/reperfusion. *Surgery*, 122:288-294

LEEUWENBERG JF, Dentener MA, Buurman WA (1994) Lipopolysaccharide LPS-mediated soluble TNF receptor release and TNF receptor expression by monocytes. Role of CD14, LPS binding protein, and bactericidal/permeability-increasing protein. *J Immunol*, 152:5070-5076

LORANT DE, Topham MK, Whatley RE, McEver RP, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA (1993) Inflammatory roles of P-selectin. *J Clin Invest*, 92:559-570

MANTOVANI A, Sozzani S, Vecchi A, Introna M, Allavena P (1997) Cytokine activation of endothelial cells: new molecules for an old paradigm. *Thromb Haemost*, 78:406-414

MEHTA JL (1995) Endothelium, coronary vasodilation, and organic nitrates. *Am Heart J*, 129:382-391

MELDRUM DR, Partrick DA, Cleveland JC Jr, Shenkar R, Meldrum KK, Raiesdana A, Ayala A, Brown JW, Harken AH (2003) On-pump coronary artery bypass surgery activates human myocardial NF-kappaB and increases TNF-alpha in the heart. *J Surg Res*, 112:175-179

MOEN O, Hogasen K, Fosse E, Dregelid E, Brockmeier V, Venge P, Harboe M, Mollnes TE (1997) Attenuation of changes in leukocyte surface markers and complement activation with heparin-coated cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg*, 63:105-111

NUSSLER AK und BILLIAR TR (1993) Inflammation, immunoregulation and inducible nitric oxide synthase *J Leukocyte Biol* 54:171-178

OHNISHI M, Yamada K, Morooka S, Tojo SJ (1999) Inhibition of P-Selectin attenuates neutrophil-mediated myocardial dysfunction in isolated rat heart. *Eur J Pharmacol*, 366:271-279

ORAL H, Dorn GW 2nd, Mann DL (1997) Sphingosine mediates the immediate negative inotropic effects of tumor necrosis factor-alpha in the adult mammalian cardiac myocyte. *J Biol Chem*, 272:4836-4842

OYAMA J, Shimokawa H, Momii H, Cheng X, Fukuyama N, Arai Y, Egashira K, Nakazawa H, Takeshita A (1998) Role of nitric oxide and peroxynitrite in the cytokine-induced sustained myocardial dysfunction in dogs in vivo. *J Clin Invest*, 101:2207-2214

PAGANI FD, Baker LS, Hsi C, Knox M, Fink MP, Visner MS (1992) Left ventricular systolic and diastolic dysfunction after infusion of tumor necrosis factor-alpha in conscious dogs. *J Clin Invest*, 90:389-398

PALMER RM, Ferrige AG, Moncada S (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327:524-526

PAPARELLA D, Yau TM, Young E (2002) Cardiopulmonary bypass induced inflammation: pathophysiology and treatment. An update. *Eur J Cardiothorac Surg*, 21:232-244

PENTTILA HJ, Lepojarvi MV, Kiviluoma KT, Kaukoranta PK, Hassinen IE, Peuhkurinen KJ (2001) Myocardial preservation during coronary surgery with and without cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg*, 71:565-571

RADOMSKI MW, Palmer RM, Moncada S (1990) Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 87:10043-10047

RIDKER PM, Buring JE, Rifai N (2001) Soluble P-selectin and the risk of future cardiovascular events. *Circulation*, 103:491-495

RODEBERG DA, Chaet MS, Bass RC, Arkovitz MS, Garcia VF (1995) Nitric oxide: an overview. *Am J Surg*, 170:292-303

RUVOLO G, Greco E, Speziale G, Tritapepe L, Marino B, Mollace V, Nistico G (1994) Nitric oxide formation during cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg*, 57:1055-1057

SATO H, Zhao ZQ, Todd JC, Riley RD, Taft CS, Hammon Jr JF, Li P, Ma X, Vinten-Johansen J (1997) Basal nitric oxide expresses endogenous cardioprotection during reperfusion by inhibition of neutrophil-mediated damage after surgical revascularization. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 113:399-409

SCHERPHOF G, Van Leeuwen B, Wilschut J, Damen J (1983) Exchange of phosphatidylcholine between small unilamellar liposomes and human plasma high-density lipoprotein involves exclusively the phospholipid in the outer monolayer of the liposomal membrane. *Biochim Biophys Acta*, 732:595-599

SCHULZ R, Nava E, Moncada S (1992) Induction and potential biological relevance of a Ca (2+)-independent nitric oxide synthase in the myocardium. *Br J Pharmacol*, 105:575-580

SHARMA M, Ganguly NK, Chaturvedi G, Thingnam SK, Majumdar S, Suri RK (2003) Release of pro-inflammatory mediators during myocardial ischemia/reperfusion in coronary artery bypass graft surgery. *Mol Cell Biochem*, 247:23-30

SHINDO T, Ikeda U, Ohkawa F, Kawahara Y, Yokoyama M, Shimada K (1995) Nitric oxide synthesis in cardiac myocytes and fibroblasts by inflammatory cytokines. *Cardiovasc Res*, 29:813-819

SOSLAU G, Morgan DA, Jaffe JS, Brodsky I, Wang Y (1997) Cytokine mRNA expression in human platelets and a megakaryocytic cell line and cytokine modulation of platelet function. *Cytokine*, 9:405-411

STEINBERG JB, Kapelanski DP, Olson JD, Weiler JM (1993) Cytokine and complement levels in patients undergoing cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 106:1008-1016

TEDDER TF, Steeber DA, Chen A, Engel P (1995) The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J*, 9:866-873

TE VELTHUIS H, Jansen PG, Oudemans-van Straaten HM, Sturk A, Eijssman L, Wildevuur CR (1995) Myocardial performance in elderly patients after cardiopulmonary bypass is suppressed by tumor necrosis factor. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 110:1663-1669

VILCEK J und LEE TH (1991) Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. *J Biol Chem*, 266:7313-7316

WAN S, DeSmet JM, Barvais L, Goldstein M, Vincent JL, LeClerc JL (1996a) Myocardium is a major source of proinflammatory cytokines in patients undergoing cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 112:806-811

WAN S, LeClerc JL, Vincent JL (1997b) Cytokine responses to cardiopulmonary bypass: lessons learned from cardiac transplantation. *Ann Thorac Surg*, 63:269-276

WAN S, LeClerc JL, Vincent JL (1997c) Inflammatory response to cardiopulmonary bypass: mechanisms involved and possible therapeutic strategies. *Chest*, 112:676-692

WEI M, Kuukasjarvi P, Laurikka J, Pehkonen E, Kaukinen S, Laine S, Tarkka M (2001) Cytokine Responses in Low-Risk Coronary Artery Bypass Surgery, *Int J Angiol* 10:27-30

WILDHIRT SM, Schulze C, Conrad N, Sreejayan N, Reichenspurner H, von Ritter C, Reichart B (2000a). Reduced myocardial cellular damage and lipid peroxidation in off-pump versus conventional coronary artery bypass grafting. *Eur J Med Res*, 23:222-228

WILDHIRT SM, Schulze C, Schulz C, Egi K, Brenner P, Mair H, Schütz A, Reichart B (2001b) Reduction of systemic and cardiac adhesion molecule expression after off-pump versus conventional coronary artery bypass grafting. *Shock*, 16:55-59

WORRALL NK, Chang K, JeJeune WS, Misko TP, Sullivan PM, Ferguson TB Jr, Williamson JR (1997) TNF-alpha causes reversible in vivo systemic vascular barrier dysfunction via NO-dependent and -independent mechanisms. *Am J Physiol*, 273:2565-2574

YAMADA H, Kudoh I, Hirose Y, Toyoshima M, Abe H, Kurahashi K (1996) Heparin-coated circuits reduce the formation of TNF-alpha during cardiopulmonary bypass. *Acta Anaesthesiol Scand*, 40:311-317

YANG Z, Zingarelli B, Szabo C (2000) Crucial role of endogenous interleukin-10 production in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation*, 101:1019-1026

ZÄHLER S, Massoudy P, Hartl H, Hahnel C, Meisner H, Becker BF (1999) Acute cardiac inflammatory responses to postischemic reperfusion during cardiopulmonary bypass. *Cardiovasc Res*, 41:722-730

ZWAAL RF, Hemker HC (1982) Blood cell membranes and haemostasis. *Haemostasis*, 22:12-39

7 Abkürzungen

µg	:	Mikrogramm
µl	:	Mikroliter
°C	:	Grad Celsius
CK	:	Creatinkinase
dl	:	Deziliter
EF	:	Ejektionsfraktion
EK	:	Erythrozytenkonzentrat
EKZ	:	Extrakorporale Zirkulation
eNOS	:	endotheliale NO-Synthase
FAD	:	Flavin-Adenin-Dinukleotid
h	:	Stunden
IL-10	:	Interleukin-10
iNOS	:	induzierbare NO-Synthase
J	:	Jahre
kg	:	Kilogramm
KHK	:	Koronare Herzkrankheit
KÖF	:	Körperoberfläche
min	:	Minuten
ml	:	Milliliter
m²	:	Quadratmeter
n	:	Anzahl
ng	:	Nanogramm
nm	:	Nanometer
NO	:	Stickstoffmonoxid
NOS	:	Stickstoffmonoxidsynthase, NO-Synthase
NO_x	:	Nitrat/Nitrit
PAF	:	„Platelet Activating Factor“
PC	:	Phosphorylcholin

RT	:	Raumtemperatur
sec	:	Sekunden
SIRS	:	„Systemic Inflammatory Response Syndrome“

8 Danksagung

Die hier vorgelegte Arbeit wurde erstellt während meiner Tätigkeit als Ärztin im Praktikum von Januar 2000 bis Juli 2001 in der Klinik für Herzchirurgie der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Leitung von Prof. Dr. med. B. Reichart.

Danken möchte ich Herrn PD Dr. med. S.M. Wildhirt für die freundliche Überlassung des Themas, der Betreuung und seinem Engagement die hier erzielten Ergebnisse zu veröffentlichen.

Besonderer Dank gilt auch Frau Dr. N. Conrad für die labortechnische Unterstützung.

Die Arbeit ist meinen Eltern, Gisela Schulz und Klaus Schulz gewidmet, die mich in meinem Leben und allen meinen Vorhaben stets unterstützt haben.

9 Lebenslauf

Name: Christina Gisela Schulz
Adresse: Donnersbergerstraße 44
80634 München
Tel.: 089 12021296
e-mail: christ_schulz@gmx.de

Geburtsdatum: 03. Mai 1971

Geburtsort: Berlin

Familienstand: ledig

Nationalität: deutsch

Schulbildung

1977-1983 Kronach-Grundschule, Berlin

1983-1990 Goethe-Oberschule, Berlin

1990 Abitur

Berufsausbildung

1991-1993 Ausbildung zur Krankenschwester
Universitätsklinikum Benjamin-Franklin, Berlin

Hochschulausbildung

1993-1999 Humanmedizinstudium
Humboldt-Universität, Berlin

Oktober 1999 Drittes Staatsexamen

Juli 2001 Erhalt der Approbation als Ärztin

Klinischer und wissenschaftlicher Werdegang

- 10.01.00-02.07.01 AiP in der Herzchirurgischen Klinik und Poliklinik,
Leitung Prof. Dr. B. Reichart
Ludwig-Maximilians-Universität,
Klinikum Großhadern, München
- August 2001-
März 2003 Postdoctoral Research Fellow mit Dr. R. Schulz und
Dr. P-Y. Cheung, Departments of Pediatrics and Pharmacology,
University of Alberta, Edmonton, Canada
- Juni 2003-
März 2006 Assistenzärztin in der Klinik für Kardiochirurgie,
Leitung Dr. K. Matschke und Dr. M. Knaut
Herzzentrum Dresden GmbH Universitätsklinik
- Seit März 2006 Assistenzärztin in der Klinik für Herz-und Gefäßchirurgie
Leitung Prof. Dr. R. Lange
Deutsches Herzzentrum München
Klinik an der Technischen Universität München

Veröffentlichungen

Wildhirt SM, Schulze C, **Schulz C**, Egi K, Brenner P, Mair H, Schütz A, Reichart B
REDUCTION OF SYSTEMIC AND CARDIAC ADHESION MOLECULE
EXPRESSION AFTER OFF-PUMP VERSUS CONVENTIONAL CORONARY
ARTERY BYPASS GRAFTING
Shock 2001;16:55-59

Schulz C, Pritisanac A, Brenner P, Mair H, Lamm P, Kilger E, Platzer H, Schütz A,
Reichart B, Wildhirt SM
EFFECTS OF PHOSPHOLIPID-COATED EXTRACORPOREAL CIRCUITS ON
CLINICAL OUTCOME PARAMETERS AND SYSTEMIC INFLAMMATORY
RESPONSE IN CORONARY ARTERY BYPASS GRAFT PATIENTS
Heart Surg Forum 2002;6: 47-52

Schulz CG, Sawicki G, Lemke RP, Roeten BM, Schulz R, Cheung PY
MMP-2 AND MMP-9 AND THEIR TISSUE INHIBITORS IN THE PLASMA OF
PRETERM AND TERM NEONATES
Pediatri Res 2004;55:794-801

Kappert U, **Schulz C**, Waldow T, Tugtekin SM, Alexiou K, Matschke K
PERFORATION OF THE ASCENDING AORTA: LATE COMPLICATION OF
SUPERIOR VENA CAVA STENTING
Thorac Cardiovasc Surg 2005; 51:53:1-2

M Sung, **CG Schulz**, W Wang, G Sawicki, R Schulz
MATRIX METALLOPROTEINASE-2 DEGRADES THE CYTOSKELETAL
PROTEIN α -ACTININ IN PEROXYNITRATE MEDIATED MYOCARDIAL INJURY
eingereicht 2005 J Mol Cell Cardiol

C. Schulz