

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main
Klinik für Thorax-, Herz- und thorakale Gefäßchirurgie
Direktor: Prof. Dr. med. A. Moritz

Untersuchungen zur funktionellen
Leukozyteninhibition bei kardiochirurgischen
Patienten mit extrakorporaler Zirkulation

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von

Markus Berg

aus Bergneustadt (NRW)

Frankfurt am Main 2004

Abkürzungsverzeichnis	4
1 Einleitung	6
1.1 Funktion und Aufbau der extrakorporalen Zirkulation	7
1.2 Pathogenität der extrakorporalen Zirkulation.....	8
1.3 Reperfusionsschäden	9
1.4 Die Rolle der neutrophilen Granulozyten/des Endothels	12
1.4.1 Aktivierung neutrophiler Granulozyten.....	12
1.4.2 Endothelreaktion auf den Einsatz der EKZ	12
1.4.3 Gewebeschäden durch neutrophile Granulozyten	15
1.5 Thrombozyten–Neutrophilen Interaktion	16
1.6 Strategien zur Reduktion unerwünschter pathogener Eigenschaften der extrakorporalen Zirkulation	17
1.6.1 Pharmakologische Interventionen	17
1.6.2 Filtration in der arteriellen Linie	18
1.7 Zielsetzung dieser Arbeit.....	21
2 Material und Methode	23
2.1 Zellkulturmodelle	23
2.1.1 Isolierung und Kultivierung von Endothelzellen aus Nabelschnurvenen Neugeborener.....	23
2.1.2 Kultivierung und Präparation von CD95 Rezeptor positiven und CD95 Rezeptor negativen Jurkat Zellen.....	24
2.1.3 Isolierung, Kultivierung und Präparation von neutrophilen Granulozyten	24
2.2 Beschichtung von Dynal Microbeads mit anti TNF- α	25
2.3 Beschichtung von Pall LG-6 Filtermembran mit anti TNF- α , IL-1 und IFN- γ	25
2.4 Beschichtung von Pall LG-6 Filtermembranen mit anti CD95 IgM.....	27
2.5 Zytokine.....	28
2.6 Verwendete Messmethoden.....	28
2.6.1 Durchflusszytometrie.....	28

2.6.2	Enzymatische quantitative Nachweismethoden	32
2.7	Statistik	33
3	Ergebnisse	34
3.1	Auswirkungen von zytokinhaltigen Nährmedien auf die Expression von Zelladhäsionsmolekülen bei Endothelzellen	34
3.1.1	Endothelzellstimulation mit TNF- α	35
3.1.2	Endothelzellstimulation mit Tumornekrosefaktor α nach Filtration mittels anti TNF- α beschichteten Microbeads	35
3.1.3	Endothelzellstimulation mit Tumornekrosefaktor- α nach Filtration mittels anti TNF- α beschichtetem Leukozytenfilter	37
3.1.4	Endothelzellstimulation mit IL-1	40
3.1.5	Endothelzellstimulation mit IL-1 nach Filtration mittels anti IL-1 beschichtetem Leukozytenfilter.....	41
3.1.6	Endothelzellstimulation mit IFN- γ nach Filtration mittels anti IFN- γ beschichtetem Leukozytenfilter	43
3.2	Auswirkungen von Apoptose induzierenden Antikörpern auf Jurkatzellen.....	45
3.2.1	Jurkat Zell Stimulation mit/ohne Leukozytenfiltermembran	45
3.3	Auswirkungen von Apoptose induzierenden Antikörpern auf neutrophile Granulozyten	53
3.3.1	Stimulation neutrophiler Granulozyten mit anti CD95 IgM mit/ohne Leukozytenfiltermembran	53
4	Diskussion.....	56
5	Zusammenfassung und Schlussfolgerung	68
6	Literaturverzeichnis	70
7	Anhang.....	90

Abkürzungsverzeichnis

cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat (3',5'cyclo-AMP)
CK	Creatin Kinase
CK-MB	Creatin Kinase-Myocardial Band
CMV	Cytomegalievirus
ECGF	Endothelial Cell Growth Factor
EC	Endothelzellen
ECM	Endothelzellnährmedium
EDTA	Ethylenediaminetetracetic acid
EKZ	Extrakorporale Zirkulation
ELAM-1	Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule-1
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluoreszenz activated cell sorter
FAS-L	FAS-Ligand
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
FL	Fluorescence Light
5-HETE	5-hydroxy Eicosatetraenoidsäure
HLA DR II	HLA Moleküle der Klasse II, Untergruppe DR
HLM	Herz-Lungenmaschine
HUVECS	Endothelzellen aus Umbilikalvenen Neugeborener
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1
IFN- γ	Interferon gamma
IL-1	Interleukin-1
JCM	Jurkatzellnährmedium
LF	Leukozytenfilter
LIM	Leukozyten Inhibitionsmodul
LPO	Lipidperoxidation
LTB4	Leukotriene B4
MPO	Myeloperoxidase
MRT	Magnet Resonanz Tomographie
NSE	Neuronen spezifische Enolase

OP	Operation
PAF	Platelet Activating Factor
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PF4	Platelet Factor 4
PI	Propidiumiodid
PMN	Polymorphkernige Neutrophile Granulozyten
PMNE	PMN-Elastase
RFI	relative Fluoreszenzintensität
ROS	Reactive oxygen species
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TXA2	Thromboxan A2

1 Einleitung

Die Herz-Lungenmaschine (HLM) ist bei Operationen am offenen Herzen, z. B. Bypass- oder Herzklappenoperationen eine zumeist wichtige Grundvoraussetzung. Postoperative Dysfunktionen verschiedener Organsysteme nach Einsatz der Herz-Lungenmaschine und extrakorporaler Zirkulation (EKZ) stellen allerdings einen großen Anteil der Komplikationen bei Patienten mit kardiochirurgischen Eingriffen dar (1). Zerebrale Komplikationen beispielsweise treten bei nahezu 100% der Patienten auf (2, 3). Die Ursachen dieser Organschädigung bzw. Dysfunktion von Organen sind von multikausaler Natur. Die Gründe der Pathogenität der extrakorporalen Zirkulation (siehe Kapitel 1.1) sind vielschichtig und liegen im wesentlichen a) im Kontakt des Blutes mit Fremdoberflächen, b) im Blut- Gaskontakt, in der Aktivierung verschiedener Immunsystemmechanismen und -kaskaden bei Kontakt des Blutes mit dem Perikard und /oder der Pleura, c) im mechanischen Trauma der Blutbestandteile oder -zellen durch Pumpen, d) im sauerstoffvermittelten Schaden besonders bei hyperoxischer EKZ (4) sowie e) in der Bildung von Mikro- und Makroembolien durch gasförmige, thrombotische, oder andere partikuläre Emboli (5).

Dieses multifaktorielle Geschehen führt zu einer inflammatorischen Ganzkörperreaktion (6, 7) mit einer Aktivierung verschiedener biologischer Systeme wie dem Koagulations-, Komplement- und Fibrinolyse-System sowie zellulärer Blutbestandteile. Das Auftreten von kardialen, pulmonalen, renalen und zerebralen Dysfunktionen im Sinne von neuropsychologischen Komplikationen steht mit diesen Aktivierungsprozessen vermutlich in einem engen Zusammenhang.

Die Aktivierung von Leukozyten, insbesondere polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten (PMN) spielt eine zentrale Rolle bei den funktionellen, metabolischen und strukturellen Gewebeschäden (8). Aktivierte neutrophile Granulozyten setzen proteolytische Enzyme (Elastase, Kollagenase, Gelatinase) und humorale, proinflammatorische Zytokine (Interleukine, Tumornekrosefaktor) frei, die als die wesentlichsten Faktoren bei der Auslösung und Entwicklung der Zell- und

Gewebeschädigungen nach Ischämie und Reperfusion von Herz und Lungen angesehen werden (9, 10, 11).

Verschiedene Studien konnten bisher belegen, dass es durch modifiziertes Management der EKZ in der Vergangenheit bereits zur Reduktion der Pathogenität durch die HLM kam.

1.1 Funktion und Aufbau der extrakorporalen Zirkulation

Zahlreiche Eingriffe innerhalb des Herzens und an den großen Gefäßen sind nur am stillstehenden, nicht schlagenden Herzen durchführbar. Um dies zu gewährleisten werden die Blutgefäße bei Herz und Lungen abgeklemmt. Ihre Funktion übernimmt eine extern arbeitende Herz-Lungenmaschine. Dieser Vorgang wird als extrakorporale Zirkulation (EKZ) oder kardiopulmonaler Bypass bezeichnet. Die extrakorporale Zirkulation kommt in erster Linie bei Herzklappenersatz und -rekonstruktionen, Bypassoperationen der Koronargefäße, Herz- und Lungentransplantation sowie Korrektur angeborener Herzfehler zum Einsatz (12).

Nach Kanülierung und Ligatur beider Venae cavae fließt das gesamte systemische Venenblut über Kanülen und Schläuche aus den beiden Hohlvenen in ein Reservoir der Herz-Lungenmaschine (13). Von dort wird es nach Anreicherung mit Sauerstoff, Entfernung von Kohlendioxid und Passage mehrerer Filtersysteme wie Emboliefilter oder Leukozytenfilter in den arteriellen Kreislauf des Patienten über die Aorta (gängiges Verfahren) oder eine der großen Beinarterien zurückgepumpt, um die Versorgung der Körperorgane mit Sauerstoff zu gewährleisten.

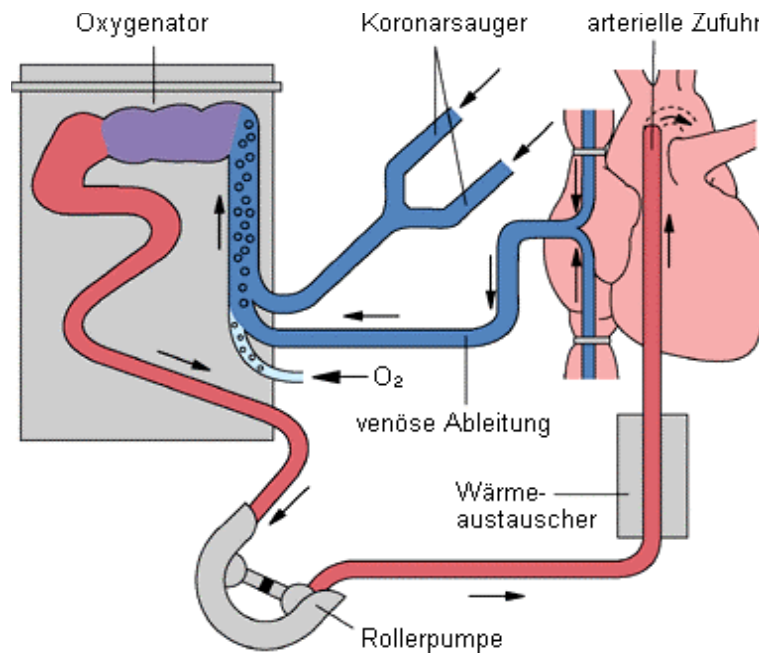


Abbildung 1: Schematische Darstellung der EKZ (14)

Zur primären Füllung der Herz-Lungenmaschine werden gewöhnlich annähernd plasmaisotone Elektrolytlösungen verwendet, oft unter Zusatz anderer Lösungen, die z.B. Glucose, Natriumhydrogencarbonat, Albumin und Hydroxyäthylstärke enthalten. Dies führt zu einer nicht unerheblichen Verdünnung des Patientenblutes, was unter Umständen die Notwendigkeit von Fremdblutgaben aus Blutkonserven zur Folge hat. Um eine Minderversorgung der einzelnen Organe mit Sauerstoff und eine daraus resultierende Schädigung zu verhindern, muss der Sauerstoffbedarf der Gewebe während der EKZ herabgesetzt werden (13). Hierzu bedient man sich der Unterkühlung des gesamten Körpers. Die Abkühlung des Patientenblutes mittels Wärmetauscher ist heute das Verfahren der Wahl, bei der der Patient auf eine Körpertemperatur von bis zu 18°C gebracht wird. Ebenfalls unerlässlich vor Inbetriebnahme der EKZ ist die Vollheparinisierung des Patientenblutes um einer durch thrombogene Fremdoberflächen wie Kunststoffschläuche oder den Membranoxygenator provozierten Blutgerinnungsbildung mit nachfolgenden Mikroembolien in den Patientenkreislauf vorzubeugen (15).

1.2 Pathogenität der extrakorporalen Zirkulation

Durch den Einsatz der EKZ kommt es häufig zu einer pathophysiologischen Ganzkörperentzündungsreaktion (16). Durch den mechanischen Bluttransport der

Pumpensysteme innerhalb der EKZ wird das Blut erhöhten Scherkräften ausgesetzt und es kommt zum Kontakt zwischen Blutzellen und nicht endothelialen Oberflächen, wie den Plastikschauchsystemen und dem Reoxygenierungssystem mit konsekutiver Erythrozytenhämolyse, Bildung von winzigen Luftblasen und Kumulation von Fibrinpartikeln im zirkulierenden Blut (17). Ein weiteres Resultat des Kontaktes der Blutbestandteile mit den Fremdoberflächen ist die Reduktion der Blutplättchen in ihrer Anzahl (Thrombozytopenie) und Funktion (Thrombozytopathie) sowie die Aktivierung verschiedener physiologischer humoraler Systeme wie das Gerinnungssystem, das Renin- Angiotensin System, das Kallikrein- Bradykinin System und die Fibrinolyse (18). Eine ebenfalls wichtige Rolle im Sinne einer Generierung der Immunantwort durch die EKZ spielt die Aktivierung des Komplementsystems innerhalb dessen die Anaphylatoxine C3a und C5a freigesetzt werden, welche die zelluläre und humorale Immunantwort des Organismus modulieren. Auf zellulärer Ebene sind Leukozyten, insbesondere neutrophile Granulozyten, die eine zentrale Rolle in der Pathogenese des septischen Schocks mit zum Teil konsekutivem Multiorganversagen spielen, von wesentlicher Bedeutung (9, 12, 21, 30), indem sie bestimmte Mediatoren wie Zytokine und Adhäsionsmoleküle (19, 20) exprimieren, proteolytische Enzyme freisetzen sowie oxidativen Stress generieren, was zu einer generalisierten Abwehrreaktion des Organismus, dem so genannten SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome) vergleichbar mit einer systemischen, aseptischen Entzündungsreaktion führt (6, 7). Klinischer Ausdruck dessen ist eine Erhöhung des relativen Anteils der Leukozyten im peripheren Blut (Leukozytose), Anstieg der Körpertemperatur und eine erhöhte Durchlässigkeit der kapillären Membranen („capillary leakage syndrome“, 21); was zu extravasaler Plasmaansammlung (Ödeme) innerhalb lebenswichtiger Organe wie Lungen, Niere, Gehirn (2) und Darm führt. Der letztlich entscheidende Faktor für die Quantität dieser aseptischen Entzündungsreaktion ist vor allem die Dauer der EKZ. Besonders betroffen sind Säuglinge Kleinkinder und ältere Menschen (22, 23).

1.3 Reperfusionsschäden

Die ischämischen Reperfusionsschäden sind Ausdruck einer akuten, aseptischen Entzündungsantwort die durch sowohl lokale als auch systemische immunaktivierende Kaskaden hervorgerufen wird, was zu multiplen Organdysfunktionen führt (24). Hiervon häufig betroffen sind Lunge, Gastrointestinaltrakt und Gehirn.

Nach Öffnung der Aortenklammer werden die ischämischen Gewebe wieder mit Sauerstoff versorgt. Dies führt zur schnellen Bildung von freien Sauerstoffradikalen (25), die ihrerseits wieder in der Lage dazu sind, Granulozyten zu stimulieren und zu aktivieren (26). Reperfusionbedingt entstehen in normalen Gewebezellen wie Endothelzellen (27) und Phagozyten (28, 29, 30), reaktive Sauerstoffmetabolite als Nebenprodukt von oxidativen Prozessen (31). Die Hauptquelle für freie Radikale im Zytoplasma ist die Xanthinoxidase- Reaktion, die Xanthin, O₂ und H₂O mittels des Enzyms Xanthinoxidase in Urat und H₂O im postischämischen Gewebe katalysiert. In den Mitochondrien spielt die Oxidation von H⁺ in der Atmungskette eine wesentliche Rolle (32). Durch ihre Aktivierung produzieren neutrophile Granulozyten Entzündungsmediatoren und proteolytische Enzyme und bilden mittels der NADPH-Oxidase Reaktion (siehe 1.3.2.) wiederum Sauerstoffradikale (33), die Reperfusionsschäden (Störung der Mikrozirkulation, mikrovaskuläre Verschlüsse, Lungenfunktionsschäden, Verringerung der Myokardkontraktilität) verursachen (Abb. 1, 2, 3).

Durch den Einfluss freier Radikale, die chemische Reaktionen wie die Lipidperoxidation initiieren, kommt es zu Aufbruch und Zerstörung von (Endothel-) Zellmembranen und damit zum Verlust der Membranintegrität und konsekutivem Insuffizienz der Endothelzellbarrierefunktion (33). Die beschriebenen Perfusionsschäden lassen sich im Detail in pulmonal, kardial und systemisch aufteilen.

Da die Lunge eine vergleichsweise große Endotheloberfläche mit einem durchschnittlichen Kapillardurchmesser von 5,5 µm besitzt, die Leukozyten allerdings einen durchschnittlichen Durchmesser von 7,03 µm aufweisen, stellen diese Kleinstgefäße ein enormes Passagehindernis während der kardiopulmonalen Perfusion für diese Zellgruppe dar (34). Dieser Effekt wird verstärkt durch das Phänomen, dass aktivierte gegenüber nicht aktivierten Leukozyten eine deutlich eingeschränkte Elastizität besitzen (33, 35), was folglich zu einer Störung der Mikrozirkulation führen kann und im schlimmsten Fall einen mikrovaskulären Verschluss herbeiführt (36, 37). Diese Leukozytenkumulation generiert eine erhöhte Anhäufung freier Radikale (34).

Unter Reperfusion des ischämischen Lungengewebes und Myokards kommt es außer den oben angeführten Auswirkungen zu Verstärkung der Ischämie assoziierten Leukozytenadhärenz an das aktivierte Gefäßendothel mit gesteigerter Plasmaexsudation

vom Intra- in den Extravasalraum (38, 39, 40) und konsekutiv zu einer Reduktion der Regenerationsfähigkeit des umliegenden Gewebes (z.B. durch freie Radikale) (41).

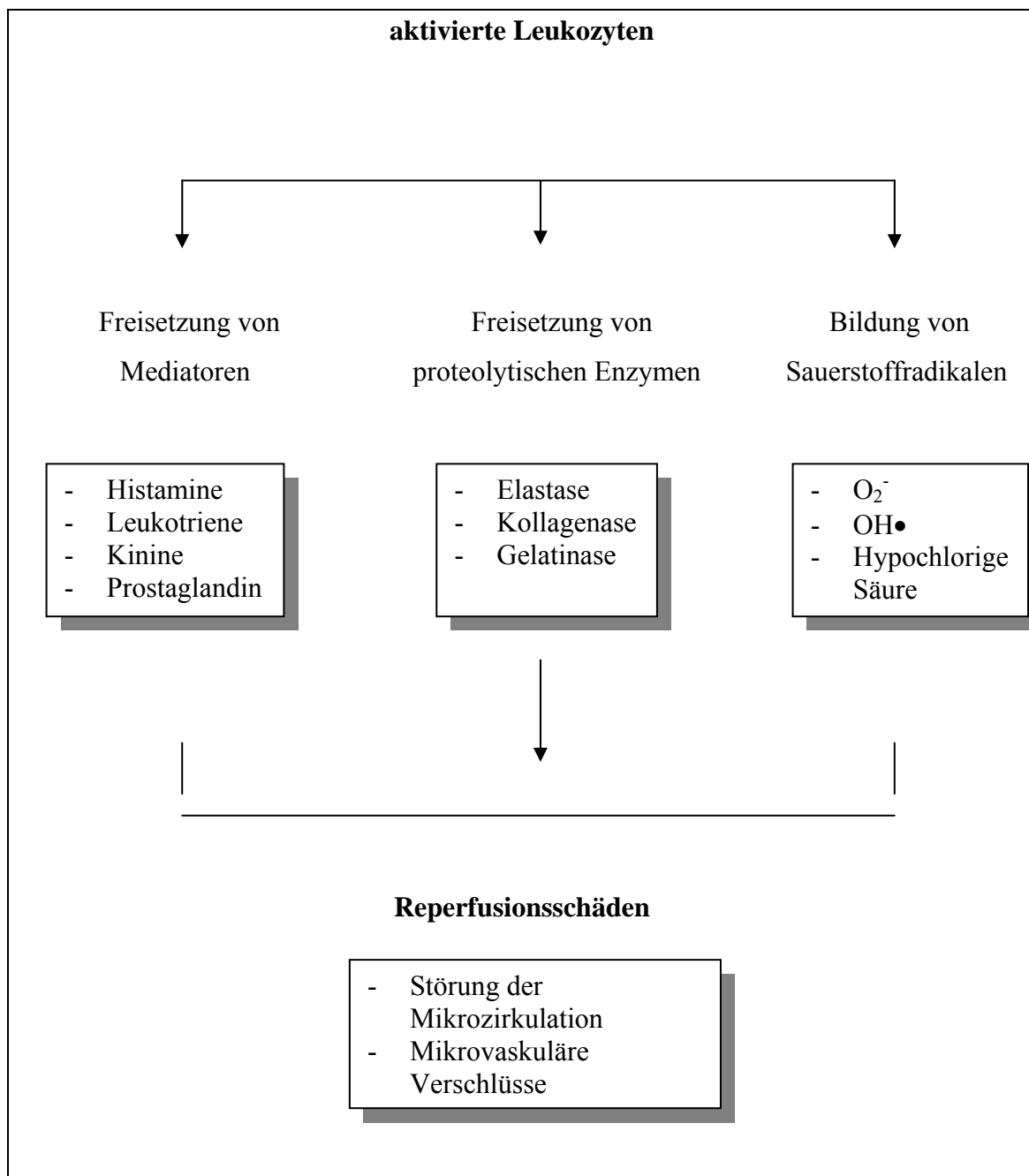


Abbildung 2: Ursachen und Folgen von Reperfusionsschäden (42)

1.4 Die Rolle der neutrophilen Granulozyten/des Endothels

1.4.1 Aktivierung neutrophiler Granulozyten

Kurz nach Beginn der EKZ vermindert sich der relative Anteil der zirkulierenden Leukozyten im peripheren Blut, die Patienten werden neutropen (43). Daraufhin reagiert das Knochenmark, das unter anderem für die Administration der im Blut zirkulierenden Zellen zuständig ist, mit einer raschen Mobilisierung von Leukozyten, die ins Blutvolumen ausgeschüttet werden, es resultiert eine Leukozytose. Komplementsystem abhängige und unabhängige Mechanismen führen innerhalb von aktivierten neutrophilen Granulozyten zu Sekretion von Zytokinen, Produktion und Ausscheidung von oxidativ wirksamen Metaboliten wie Superoxid Anionen, deren Metabolite hypochlorige Säure und Hydroxylionen sowie anderen gewebetoxischen Stoffwechselprodukten (44). Hypochlorige Säure z.B. ist in der Lage, die im Blutplasma physiologischerweise vorkommenden Antiproteasen zu inhibieren und die pathogenen Eigenschaften der proteolytischen Enzyme dadurch zu verstärken. Antiproteasen schützen das Gewebe vor lysierenden Enzymen wie der Elastase, die eine wichtige Rolle als Schrittmacherenzym bzgl. der Gewebeschäden bei EKZ spielt (45-48).

1.4.2 Endothelreaktion auf den Einsatz der EKZ

Endothelschaden durch Ischämie und Reperfusion fördert eine Adhäsion der Neutrophilen an Endotheloberflächen. Normalerweise produzieren Endothelzellen Substanzen, die die Adhäsion der Neutrophilen regulieren. Diese sind z.B. IL-1, PAF, Adenosin, Prostazyklin und cAMP (49). Leukozyten reagieren mit den aktivierten Endothelzellen auf verschiedenen Wegen. Durch die Expression der Adhäsionsmoleküle (ICAM-1, ELAM-1) und der Glykoproteine von Thrombozyten (GMP-140, CD62) wird die zelluläre Interaktion gefördert (50, 51). Ein Adhäsionsrezeptor der Leukozyten, Integrin CD11b, ein Mediator für die Stimulierung von Komplement- Anaphylatoxin, C5a, PAF und LTB₄, wird unreguliert gebildet (19, 52). TNF- α , IL-1 und Endotoxin erleichtern die Adhäsion der Leukozyten an Endothelzellen (53). Aktivierte Leukozyten produzieren TNF- α , welches die Bildung von IL-1 fördert. IL-1 stimuliert die Degranulation der Neutrophilen. Dieser Prozess führt zu einer Aktivierung der Endothelzellen und einem Anstieg der Adhäsionsfähigkeit der Leukozyten. Darüber hinaus führt die Aktivierung der

Neutrophilen durch Komplementproteine zu einer Reihe von biologischen Aktivitäten. Durch die Interaktion mit Arachidonsäuremetaboliten der Thrombozyten produzieren Neutrophile LTB₄ und 5-HETE, die die Anhäufung an Neutrophilen und Thrombozyten, die Degranulation der lysosomalen Enzyme der Neutrophilen und die Permeabilitätserhöhung des Endothels verursachen (54). Die von Neutrophilen gebildete Protease Kathepsin G aktiviert Thrombozyten zur Aggregation und Sekretion (55) (siehe auch Abb. 4).

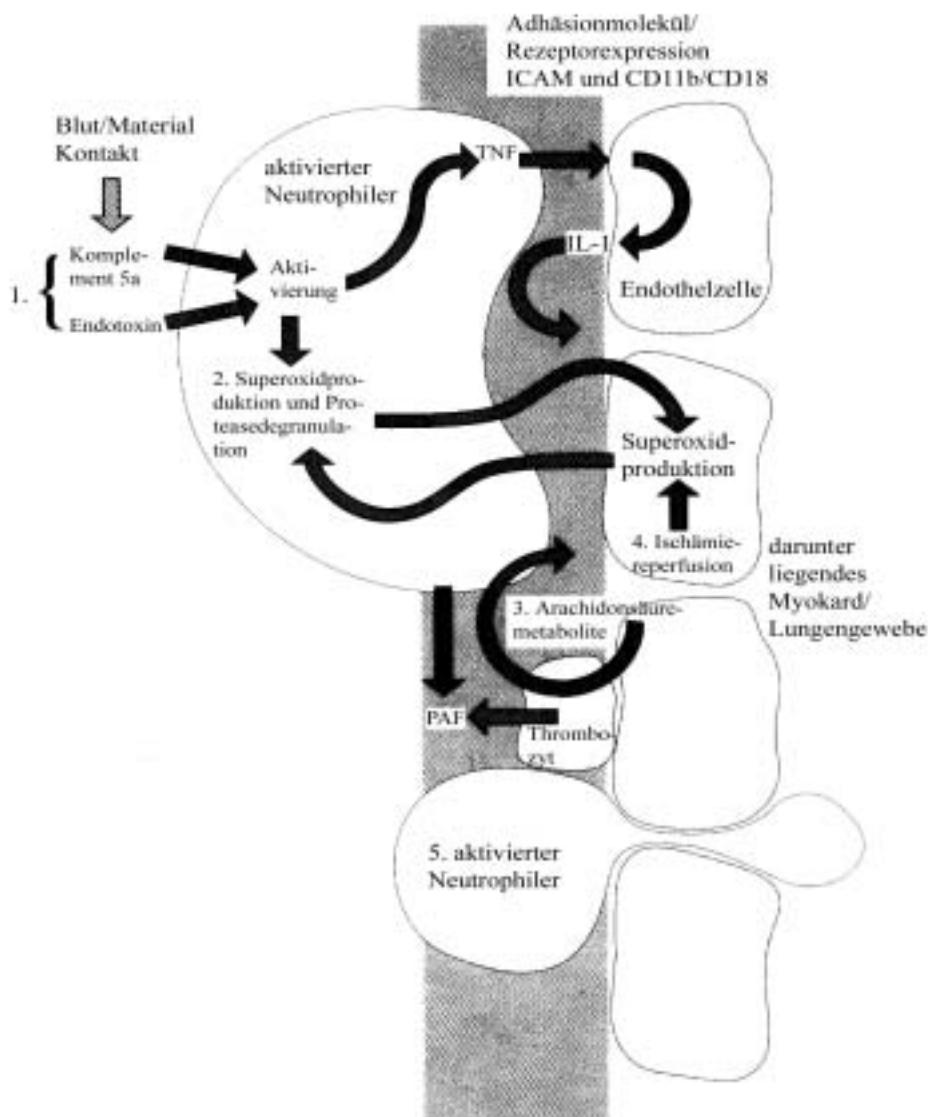


Abbildung 3: Neutrophiler Granulozyt (44)

Die EKZ führt zur Aktivierung von Blutbestandteilen, insbesondere neutrophiler Granulozyten, was in zwei voneinander unabhängigen Phasen stattfindet: (56-58)

a) Fremdmaterial vermittelte Aktivierung:

Die systemischen entzündlichen Reaktionen werden in der frühen Phase des kardiopulmonalen Bypasses durch den direkten Kontakt der extrakorporal zirkulierenden Blutbestandteile mit den nicht physiologischen Fremdoberflächen (Plastikschläuche der EKZ, Oxygenatorsysteme) hervorgerufen (7). Der Kontakt des Blutes mit den Fremdoberflächen ist hauptverantwortlich für die Adsorption von Plasmaproteinen (v.a. Fibrinogen und Albumin), Aktivierung des Blutgerinnungsfaktors Faktor XIIa sowie Freisetzung, Adhäsion, Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten (59), die ihrerseits wiederum Oberflächenintegrine wie das Glykoprotein IIb/ IIIa exprimieren und sich dadurch an Plasmaproteine binden. Das während der EKZ applizierte Heparin, welches auf pharmakologischem Weg die plasmatische Blutgerinnung im Sinne einer Antikoagulation moduliert und dadurch als sog. „high dose“ Heparin zur Thromboseprophylaxe innerhalb der extrakorporalen Zirkulation eingesetzt wird, vermag allerdings die Interaktion zwischen den betroffenen Blutbestandteilen und Fremdoberflächen nicht zu verhindern (60). Es kommt zu einer gleichzeitigen Aktivierung des Komplement-, Kinin- Kallikrein-, Gerinnungs- und Fibrinolysesystems sowie zur Freisetzung von chemotaktischen Faktoren der Leukozyten (61, 62).

b) Fremdmaterial unabhängige Aktivierung:

Nach Öffnen der Aortenklammer in der späten Phase der extrakorporalen Zirkulation werden eine Reihe von aseptischen entzündlichen Reaktionen hervorgerufen, dadurch, dass aus den in erster Linie ischämischen Organen Herz und Lunge, die ja in der Regel aufgrund stark verminderter Durchblutung über mehrere Stunden äußerst hypoxischen Bedingungen ausgesetzt waren, Endotoxine und Mediatoren freigesetzt werden. Diese sind ihrerseits wiederum dazu in der Lage, wichtige komplexe Systemkaskaden wie das Gerinnungs-, Komplement-, und Fibrinolysesystem in unphysiologischer Weise zu aktivieren und damit unerwünschte homöostatische Wirkungen zu generieren (57, 63-65). Im neutrophilen Granulozyten selbst kommt es als Reaktion auf den

Entzündungsreiz zu einem Anstieg des Sauerstoffverbrauches und Glukoseumsatzes im Hexomonophosphat Shunt der Glykolyse („respiratory burst“) (66), wodurch wiederum Sauerstoffradikale (v.a. Superoxidanionen) produziert werden (67). Die Leukozytensequestration findet man insbesondere in den Lungenkapillaren (68, 69) und im Myokard (70, 71).

1.4.3 Gewebeschäden durch neutrophile Granulozyten

Leukozyten, vor allem neutrophile Granulozyten, spielen die Hauptrolle bei funktionellen, metabolischen und strukturellen Gewebeschädigungen im Rahmen septischer und aseptischer akuter Entzündungsprozesse, da sie grundsätzlich ihrer physiologischen Bestimmung als phagozytierende und Fremdartigen zerstörende Zellen nachgehen. Nachdem die auslösende Agenzien, z.B. Fragmente des Komplementsystems, Faktor XII, Kallikrein oder die unterschiedlichen Fremdoberflächen der EKZ an die multiplen Oberflächenmoleküle und Rezeptoren der Neutrophilen gebunden haben, beginnt eine komplexe Aktivierungskaskade dieser Zellen, was sich z.B. im Verstopfen von Kapillaren durch Verminderung ihrer Elastizität („no reflow“ Phänomen) während der Reperfusionphase sowie in einer Aggregation untereinander oder einer Chemotaxis in Richtung der höchsten Komplementkonzentration äußert (72-74). Nach Leukozytenadhäsion am Gefäßendothel der am SIRS beteiligten Organe und Sekretion von TNF- α kommt es seitens der Endothelzellen zur Sekretion von chemotaktischen Molekülen und IL-1, die einerseits die Adhärenz der Neutrophilen am Endothel und Aggregation untereinander katalysieren und andererseits deren Degranulation mit Freisetzung von lysosomalen Enzymen sowie der Bildung reaktiver Sauerstoffradikale stimulieren (75-77).

Während der Reperfusionphase kommt es letztlich durch Infiltration von Leukozyten zu einem Subepikardschaden des Myokards und eine verminderter Regenerationsfähigkeit der Kontraktilitätseigenschaften des Myokards (33).

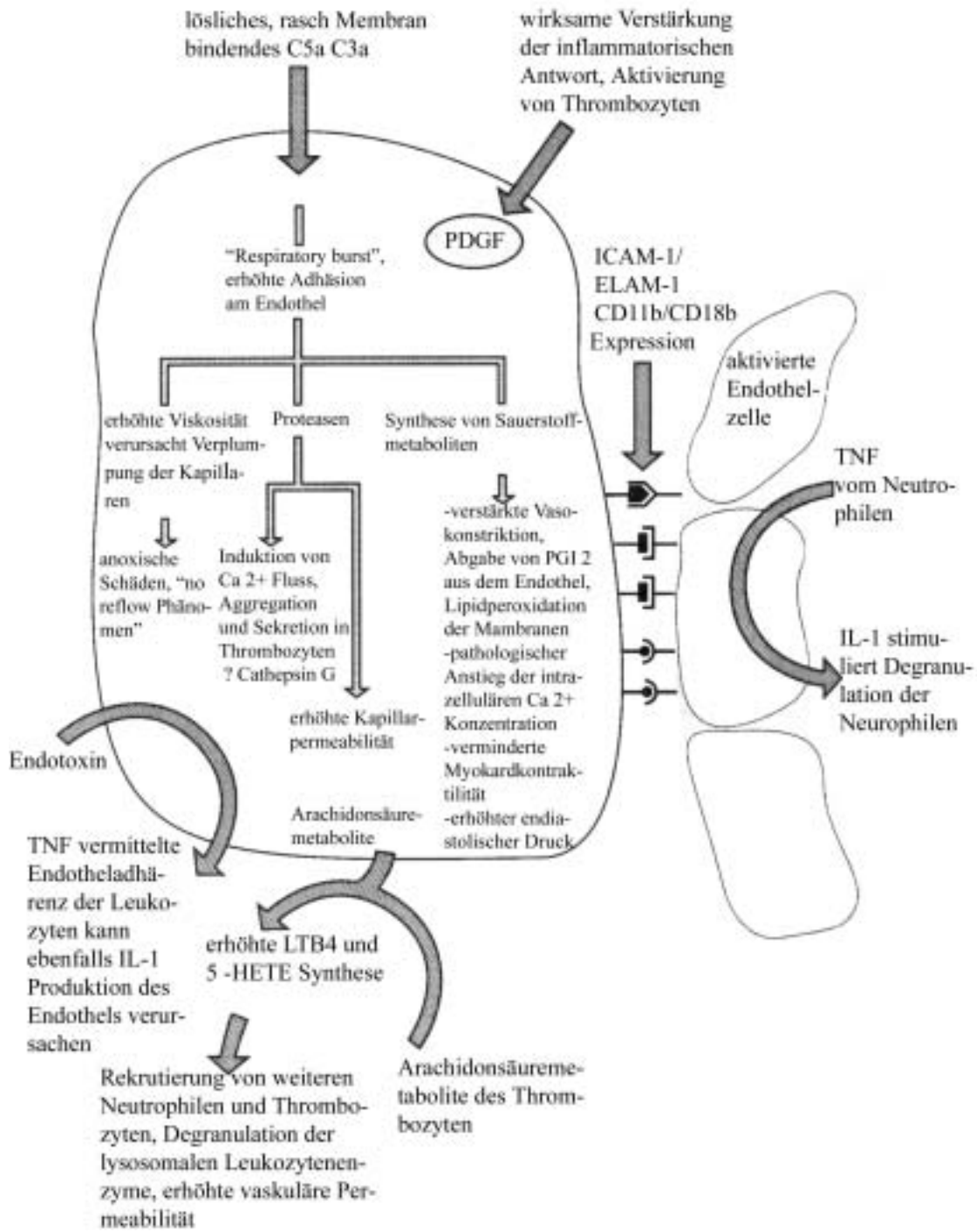


Abbildung 4: Aktivierter neutrophiler Granulozyt (44)

1.5 Thrombozyten– Neutrophilen Interaktion

Es gibt Hinweise, die darauf schließen lassen, dass die Präsenz von aktivierten Leukozyten während der akuten Phase der Entzündungsreaktion eine aktive Rolle bzgl. Modulation der Thrombozytenfunktion spielt und umgekehrt (78).

Thrombozyten setzen Arachidonsäuremetaboliten, PAF, PDGF und PF4, die die Adhäsion und chemotaktische Aktivität der Neutrophilen sowie die Generation der Superoxidanionen bewirken können, frei (79). Aktivierte Thrombozyten reagieren mit aktivierten Endothelzellen und können an Neutrophile adhären (80).

Das von geschädigten Blutelementen freigesetzte ADP stimuliert Thrombozyten zur Sekretion von TXA₂, PF₄, PDGF und PAF, die unterschiedliche entzündliche Reaktionen hervorrufen. Diese bestehen in einer Vasokonstriktion, einer Bronchokonstriktion und einer chemotaktischen Reaktion der Leukozyten und Thrombozyten am Endothel (78). Weiterhin wird aus dem Arachidonsäuremetabolismus eine Reihe von Substanzen, die von Neutrophilen metabolisiert werden können, gebildet.

1.6 Strategien zur Reduktion unerwünschter pathogener Eigenschaften der extrakorporalen Zirkulation

Bereits kurz nach Einführen der EKZ in den operativen Alltag im Jahre 1953 durch Gibbon wurde klar, dass ihr klinischer Nutzen auch von unerwünschten Wirkungen begleitet ist, die den Patienten schädigen. Bis zum Beginn der Neunziger Jahre des vergangenen Jahrhunderts wurden zahlreiche verschiedene Versuche unternommen, die durch die EKZ unerwünschten pathogenen Wirkungen, zu minimieren. Einerseits gab es Ansätze auf pharmakologischer Ebene (81-84). Andererseits wurde versucht der durch die EKZ verursachten Pathogenität auf mechanisch-technischem Wege gegenüber zu treten und die potentiell schädigenden Stoffe aus dem Kreislauf an verschiedenen Stellen heraus zu filtern. Auch diese Versuche blieben ihrerseits nicht ohne Nebenwirkungen (85).

1.6.1 Pharmakologische Interventionen

Durch die Vielzahl der an SIRS beteiligten Molekülen und Stoffwechselschritten bietet sich gleichzeitig eine breite Palette pharmakologischer Ansätze, um diese zu blockieren oder wenigstens in ihrer Auswirkung abzuschwächen. Allerdings zeigte sich, dass viele eingesetzte medikamentöse Präparate, die im Tierversuch viel versprechende

Ergebnisse lieferten, beim operierten Patienten selbst weitaus weniger effektiv waren (81).

Es wurden Versuche unternommen, die inflammatorische Antwort mit Kortikosteroiden zu blockieren, die die Produktion von TNF α und LTB₄ minimieren (86). Aprotinin sollte Thrombozyten vor ihrem Abbau und Wirkungsverlust schützen und als Protease Inhibitor die Wirkung des Fibrinolyse- und Kallikreinsystems abschwächen (87). Monoklonale Antikörper wurden gegen Granulozytenadhärenz vermittelnde Oberflächenmarker wie CD 11b/ CD 18 eingesetzt. Des Weiteren versuchte man die aseptische Entzündungsreaktion mit Elastase Inhibitoren (88), O₂ Radikalfängern (z.B. Vitamin C und E), Xanthinoxidaseinhibitoren wie Allopurinol (89) und Inhibitoren des Arachidonsäurezyklus bzw. PAFs zu kontrollieren (90).

1.6.2 Filtration in der arteriellen Linie

Die zu Beginn der siebziger Jahre eingeführte Filtration in der arteriellen Zufuhr der EKZ wurde zunächst kontrovers diskutiert, da ein arterieller Filter eine Vergrößerung der thrombogenen Oberfläche mit potentiell vergrößerter hämolytischer Wirkung der EKZ darstellte. Einige Jahre nach ihrer Einführung wurde teilweise über ihre Auswirkungen berichtet (88, 89). Dieses umstrittene Verfahren ist allerdings nicht in allen kardiochirurgischen Zentren gängig.

Die heute in der arteriellen Zufuhr der EKZ gebräuchlichen 40 μ m Filter verhindern wirkungsvoll die besonders in den ersten 5-10 Minuten der EKZ auftretenden Mikroembolien von Gasen und Partikeln, welche vor allem das Kapillarbett von Organen wie Lunge, Leber, Gehirn und Nieren belasten und damit zu klinisch relevanten Gewebedysfunktionen führen würden (5, 91, 92). In Abb. 5 sind die heutzutage in der EKZ eingesetzten Filtersysteme schematisch dargestellt.

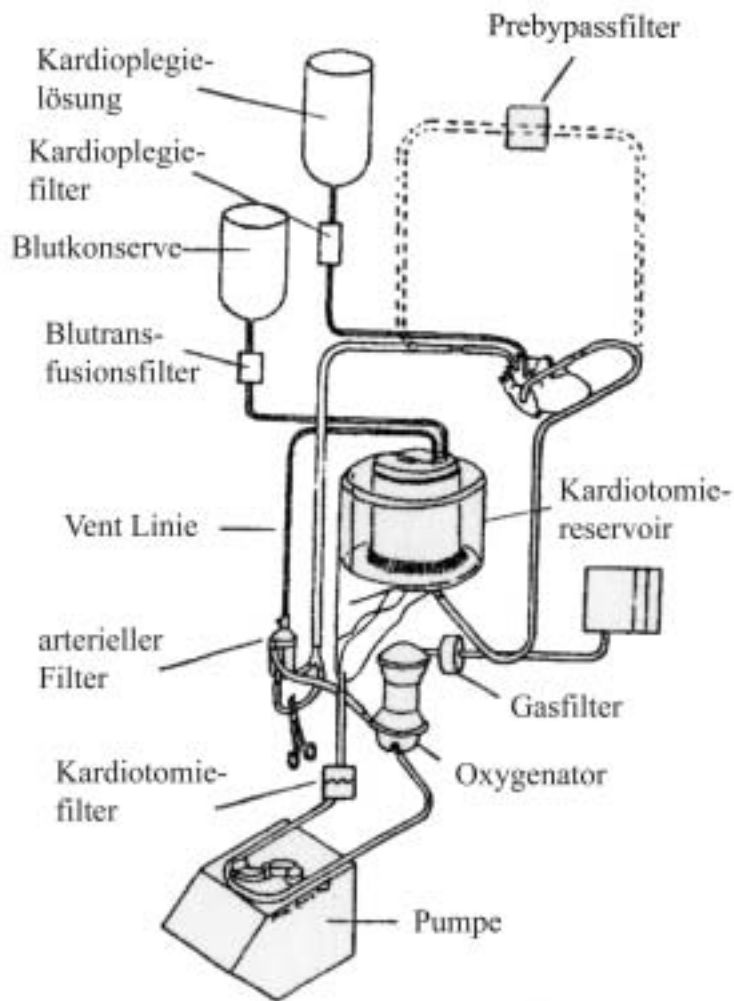


Abbildung 5: EKZ Filtersysteme (13)

Aufgrund der vermehrten Hinweise, dass sowohl homologe als auch autologe Leukozyten eine Reihe von klinisch relevanten Nebenwirkungen hervorrufen, gewann die Technologie der Leukozytendepletion in der Herzchirurgie in den letzten 10–15 Jahren immer mehr an Bedeutung (92-95). Seit Anfang der Neunziger Jahre des vergangenen Jahrhunderts kommen neue, leukozytenspezifische Filtersysteme zum klinischen Einsatz, da die zentrale Rolle der aktivierten neutrophilen Granulozyten bzgl. der Generierung des aseptischen Entzündungsgeschehens beim mit EKZ operiertem Patienten erkannt wurde. Diese Leukozytenfilter (LF) werden, ähnlich wie die arteriellen Filter, in der arteriellen Zufuhr der EKZ platziert. Ergänzend zu den oben angeführten, vor Embolie schützenden Mikropartikelfiltern in der Blutkardioplegie, dem Prebypass, der Retransfusion und der Kardiotomie werden Leukozytenfilter auch bei Gabe homologer Blutpräparate und autologem Blut während extrakorporaler Zirkulation angewandt, um auf mechanischem Wege aktivierte neutrophile

Granulozyten zu entfernen. Das in der Herz-Lungen-Maschine verbliebene autologe Blut mit den darin befindlichen Leukozyten wird häufig postoperativ retransfundiert. Es wurde bei Patienten nach Herzoperationen gezeigt, dass durch Filtration von 2 Litern Restblut aus der Herz-Lungenmaschine die periphere Zirkulation verbessert und die postoperativen Entzündungsreaktionen gegenüber nicht gefilterten Leukozyten, retransfundierten Restblutmengen gesenkt wurden. Weiterhin traten keine postoperativen Infektionen auf (96). Bzgl. Leukozytendepletion von homologen Blutpräparaten konnte nachgewiesen werden, dass sich postoperative Infektionsraten verringern und Cytomegalievirusübertragungs- bzw. -reaktivierungsraten deutlich reduziert werden (97, 8). Darüber hinaus ist die leukozytendepletierte Kardioplegielösung in der Lage, Reperfusionsschädigungen am Herzen zu reduzieren (98-100). Bluttransfusionen führen genau wie Traumen, Verbrennungen und größere Operationen zu erheblichen Modulationen innerhalb der verschiedenen Kaskaden des Immunsystems. Ausdruck dessen ist meistens eine deutliche Schwächung der T Zell-vermittelten Immunabwehr als Teil des erlernten Immunsystems (101) aber gleichzeitig eine überschießende Neutrophilenaktivität als Teil des angeborenen Immunsystems. Aus diesem immunsuppressiven Effekt von Bluttransfusionen ergeben sich vielschichtige klinische Konsequenzen. Insbesondere herzchirurgische Patienten leiden während und nach ihren Operationen an einer Immunsuppression, da der Kontakt des extrakorporal zirkulierenden Blutes mit Fremdoberflächen wie oben schon erwähnt eine zusätzlichen Störung bzw. Schwächung des Immunsystems herbeiführt (102). Die perioperativ erhöhte Aktivität der Neutrophilen gilt es zu beeinflussen. In diesem Zusammenhang scheint die verlängerte Lebensdauer der Neutrophilen durch verminderte Apoptoseinduktion eine wichtige Rolle für die inflammatorische Potenz im Rahmen der EKZ zu spielen (157).

Obwohl mehrere klinische Studien teilweise Vorteile der Leukozytenfiltration im arteriellen Schenkel aufgezeigt haben (103-105) fehlt jedoch noch immer ein Konsens zur Effektivität der heute verfügbaren Leukozytenfilter (106-109, 69). Bzgl. des Zeitpunkts für die Entfernung der Neutrophilen aus der EKZ wurde die so genannte Reperusionsphase als günstig diskutiert (110). Ein erheblicher Nachteil der Leukozytenfilter ist a) das Risiko eines möglichen Filterwechsels bei Verschluss oder Widerstandserhöhung im Leukozytenfilter und b) die bereits verminderte Effektivität des Leukozytenfilters zum Zeitpunkt der größten Leukozytenpathogenität während der

kardiopulmonalen Reperfusionsschädigungen gegen Ende der EKZ. Die Ergebnisse bzgl. eines postoperativen klinischen Vorteils durch Leukozytendepletion bzw. den Einsatz von LF während der extrakorporalen Zirkulation gegenüber einem ungefilterten Kreislauf sind allerdings aufgrund jüngster Studienlage als nicht überzeugend einzustufen. Ältere Studien belegen zwar, dass Leukozytendepletion zu einer Verringerung bzw. Vermeidung von Reperfusionsschädigungen nach extrakorporaler Zirkulation und Ischämie und damit zu einer optimierten Organprotektion (90, 111-117) führt. Im Rahmen diverser prospektiver Studien konnte allerdings in jüngster Zeit gezeigt werden, dass Leukozytenfiltration bei mit EKZ operierten Patienten keinen eindeutigen postoperativen klinischen Nutzen erbringt (108). Diesbezüglich wurde sowohl ein Hochrisikokollektiv als auch „herkömmliche“ kardiochirurgische Patienten untersucht (107). Als Endpunkte dienten unter anderem Parameter wie postoperative Beatmungszeiten und Aufenthalt auf der Intensivstation oder PMNE-, CK-MB-, NSE und MPO Serumkonzentrationen. Hierbei konnte kein eindeutiger klinischer Nutzen bzgl. der Anwendung von Leukozytenfiltersystemen im Rahmen der EKZ nachgewiesen werden. Interessanterweise zeigten sich sogar erhöhte Werte für die PMNE und MPO Serumkonzentrationen bei mit LF operierten Patienten verglichen mit Patienten, die ohne LF operiert wurden (107), so dass man möglicherweise sogar eine schädigende Wirkung von LF auf den postoperativen Verlauf der Patienten diskutieren muss (118).

1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Aufgrund der oben angeführten Feststellung, dass von aktivierten Leukozyten sezernierte Moleküle wie Zytokine, Sauerstoffradikale und Enzyme eine signifikante Rolle bei der Entstehung von pathogenen Folgeerscheinungen nach herzchirurgischen Eingriffen mit EKZ spielen, besteht die Hauptaufgabe dieser Arbeit darin, die bisher im Rahmen kardiochirurgischer Operationen mit EKZ benutzten Leukozytenfilter durch neue, antiinflammatorische Strategien abzulösen. Die seit Anfang der 90er Jahre des vergangenen Jahrhunderts etablierte Leukozytendepletion zeigt keine eindeutigen klinischen Vorteile. Zielsetzung dieser Arbeit war es, dahingehend eine Verbesserung zu schaffen, dass das gesundheitliche Management von kardiochirurgischen Patienten durch eine effiziente Leukozyteninaktivierung im Rahmen der EKZ im Sinne einer Minimierung des EKZ vermittelten immunogenen Traumas optimiert wird. Dies kann

entweder z.B. indirekt durch Bindung der proinflammatorischen Zytokine und deren Entfernung aus dem in der extrakorporalen Zirkulation befindlichen Blut oder direkt durch Inaktivierung von neutrophilen Granulozyten mittels biologischer Inaktivierung wie Apoptoseinduktion erreicht werden. Damit kommt es zu einer Reduktion der postoperativen Organdysfunktion und einer verkürzten Krankenhausverweildauer sowie einer Ökonomisierung der anfallenden Behandlungskosten.

2 Material und Methode

2.1 Zellkulturmodelle

2.1.1 Isolierung und Kultivierung von Endothelzellen aus Nabelschnurvenen Neugeborener

Humane Endothelzellen wurden aus Nabelschnurvenen Neugeborener nach einer von Jaffe et al., 1973 (119) beschriebenen und für die eigenen Versuche modifizierten Methode isoliert. Die Nabelschnurvenen wurden zunächst mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS; ICN, Meckenheim) durchgespült und danach mit α -Chymotrypsinlösung für 10 min. inkubiert. Die dabei aus der Nabelschnurvenenwand herausgelösten Zellen wurden in M199 Medium (Gibco, Eggenstein) mit 10 % humanem Serum, 10 % fetalem Kälberserum (FCS, Gibco), 100 μ g/ml Gentamycin (Gibco), 10 IE/ml Heparin (Hoffmann- La Roche, Basel, Schweiz), 200mM L-Glutamin (Seromed Biochrome, Berlin), 25 μ g/ml ECGF (Boehringer Mannheim), 1 M HEPES Puffer (Seromed Biochrome) bei 37° C und 5% CO₂ in befeuchteter Atmosphäre kultiviert. Hierbei wurden unbeschichtete Kunststoffkulturflaschen (Becton Dickinson, Heidelberg) mit einer Wachstumsfläche von 75 cm² und einem Gesamtvolumen von 300 ml benutzt. Der Medienwechsel und das Umsetzen der Zellen fanden in einem Rhythmus von durchschnittlich 2-3 Tagen statt. Hierzu werden bei einem Gesamtvolumen von 30 ml Zellsuspension nach Ablösen aus dem Monolayer je Kulturflasche 20 bis 28 ml entnommen, die verbleibenden 2 bis 10 ml werden anschließend mit entsprechender Menge Medium aufgefüllt.

Als Nachweis für die Reinheit der Endothelzellkulturen diente als standardisierte Kontrolle eine immunocytochemische Markierung des Faktor VIII –von Willebrand- verwandten Antigens (F-VIII-vWr). Die Spezifität des Antikörpers wurde in Vorversuchen an Gefrierschnitten von Nabelschnüren und an Lebergewebe getestet. Zusätzlich wurden die Kulturen als Gegenprobe auf das Vorhandensein von Monozyten/Makrophagen überprüft. Als Marker wurde dazu der monoklonale Antikörper MAC387 der Firma Camon (Wiesbaden) verwendet.

2.1.2 Kultivierung und Präparation von CD95 Rezeptor positiven und CD95 Rezeptor negativen Jurkat Zellen

Jurkat Zellen wurden bereitgestellt von Prof. Cinatl, Institut für Medizinische Virologie, Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main. Die Kultivierung erfolgte in RPMI 1640 Medium (Gibco) mit 5% fetalem Kälber Serum (Seromed Biochrome), 2 mM L-Glutamin, Penicillin (100 u/ml), und Streptomycin (100 mg/ml, Gibco) in befeuchteter Atmosphäre bei 37°C Umgebungstemperatur, 5% CO₂ und einer Dichte von ca. 10⁶ Zellen/ml. Hierbei wurden unbeschichtete Kunststoffkulturflaschen (Becton Dickinson, Heidelberg) mit einer Wachstumsfläche von 75 cm² und einem Gesamtvolumen von 300 ml benutzt. Der Medienwechsel und das Umsetzen der Zellen fanden in einem Rhythmus von durchschnittlich 3 Tagen statt. Hierzu werden bei einem Gesamtvolumen von 30 ml Zellsuspension je Kulturflasche 20 bis 28 ml entnommen, die verbleibenden 2 bis 10 ml werden anschließend mit entsprechender Menge Jurkatzellnährmedium (JCM) aufgefüllt. Die Zellen erscheinen im mikroskopischen Hellfeldbild rund und ohne besondere Kennzeichen.

2.1.3 Isolierung, Kultivierung und Präparation von neutrophilen Granulozyten

Neutrophile Granulozyten wurden aus dem peripheren venösen Blut des gesunden Erwachsenen isoliert. Peripheres venöses Blut wurde mit 9 ml- Heparinröhrchen (Monovette®; Sarstedt, Nümbrecht) abgenommen, im Verhältnis von 1:1 in PolymorphprepTM (Nycomed, Oslo, Norway) verdünnt und anschließend ohne Bremse für 30 – 45 Minuten zentrifugiert. Die neutrophilen Granulozyten wurden vorsichtig abpipettiert. Nach zweimaligem Waschen in PBS (ICN) wurden die Zellen abpipettiert und in 2ml M199-Medium (Gibco) mit 100 µg/ml Gentamycin (Gibco), 10 IE/ml Heparin (Hoffmann- La Roche), 200 mM L-Glutamin (Seromed- Biochrome) und 1M HEPES Puffer (Seromed- Biochrome) suspendiert. Für die experimentellen Untersuchungen wurden die neutrophilen Granulozyten in Endothelzellmedium zu 1 x 10⁵/ ml verdünnt.

2.2 Beschichtung von Dynal Microbeads mit anti TNF- α

Zur Beschichtung von Microbeads mit anti TNF- α wurden magnetische Dynabeads[®] M-450 Rat anti- Mouse IgG1 der Firma Dynal, Oslo- Norwegen mit monoklonalem anti TNF- α IgG (R&D Systems, Minneapolis USA) für 60 Minuten in Zentrifugenröhrchen inkubiert. Anschließend wurde das Röhrchen an einen Magneten gehalten, so dass die Antikörper beschichteten Dynabeads sich am Röhrchenrand, genauer gesagt auf Kontakthöhe des Magneten mit dem Röhrchen befanden und sich dadurch am inneren Rand des Zentrifugenröhrchens ansammeln konnten. So wurde das Abpipettieren des restliche Flüssigkeitsüberstandes ermöglicht, der anschließend verworfen wurde. Die Antikörper beschichteten Microbeads wurden danach für einen Versuch (siehe 3.1.2 in Abschnitt 3) wieder in Lösung gebracht.

2.3 Beschichtung von Pall LG-6 Filtermembran mit anti TNF- α , IL-1 und IFN- γ

Zur Beschichtung einer sich im Modell LG-6 befindenden Leukozytenfiltermembran der Firma Pall Corporation (New York) wurde ein Modell einer extrakorporalen Zirkulation, bestehend aus einem 1/4 Zoll dicken sterilen Herz- Lungenmaschinen Schlauch (Jostra Medizintechnik GmbH, Hirrlingen), einer Original HLM Rollerpumpe und eines Pall LG-6 Leukozytenfilters entworfen:

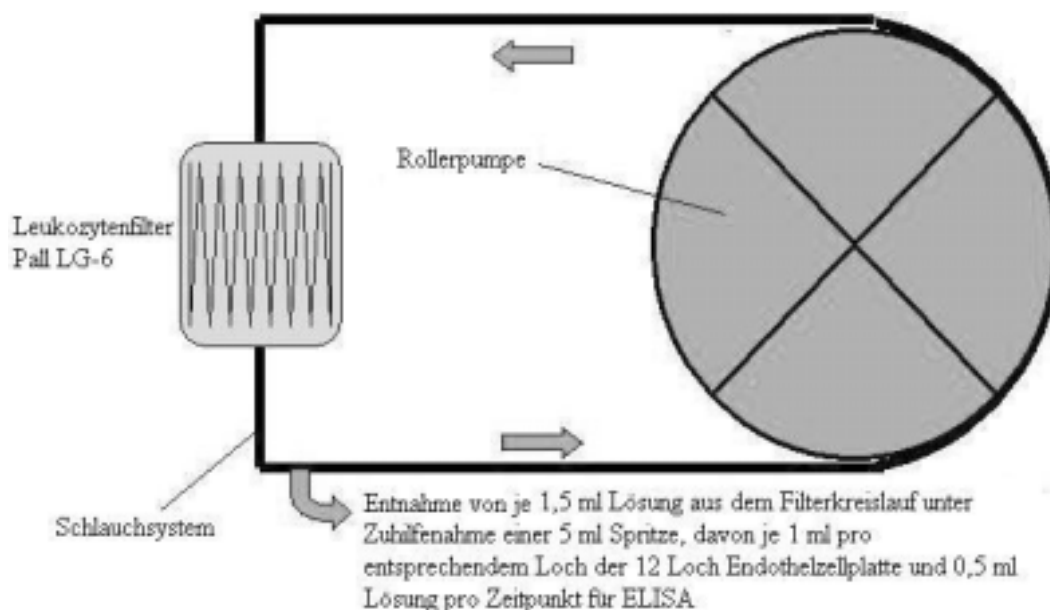


Abbildung 6: Zytokin-Kreislauf Schema

Das Füllvolumen des gesamten Kreislaufes betrug 250 ml, im einzelnen 200 ml Leukozytenfiltervolumen selbst und 50 ml Volumen im Schlauchsystem. Als Pumpe fungierte eine herkömmliche, heutzutage gängige HLM Rollerpumpe. Nach Konnektieren des Schlauchsystems mit dem Zufluss des Leukozytenfilters wurden Filter und Schlauchsystem mit dem Gesamtvolumen von 250 ml 0,9%iger NaCl Lösung aufgefüllt. In Lösung befanden sich 0,2 µg anti TNF- α (R&D Systems, Wiesbaden) /ml NaCl, bzw. 0,2 µg anti IL-1 (R&D Systems, Wiesbaden) /ml NaCl, bzw. 0,2 µg anti IFN- γ (R&D Systems, Wiesbaden) /ml NaCl. Nach Auffüllen des Kreislaufsystems mit der Antikörper haltigen, isotonen NaCl Lösung und Einlegen des geschlossenen Filter-Schlauchsystem in die EKZ Rollerpumpe wurde diese mit einer Flussgeschwindigkeit von 4l Volumen/min gestartet. Die Zirkulationsdauer der Antikörperlösung betrug 60 min. Nach Ablauf der 60 min wurde die Zirkulation der Rollerpumpe gestoppt, das Schlauchsystem an der Abflusseite des Leukozytenfilters dekonnektiert und das Füllvolumen durch Schwerkraft aus dem System abgeleitet. Nach Entleeren des Füllvolumens wurde das Schlauchfiltersystem an der Abflusseite erneut konnektiert und an der Zuflusseite dekonnektiert. Daraufhin erfolgte die Befüllung des Kreislaufes mit ECM: 10u TNF- α /ml ECM, 100u IL-1/ml ECM und 250u IFN- γ /ml ECM, entsprechend der jeweiligen Filterbeschichtung. Nach erneutem Konnektieren des Schlauchsystems mit der Filterzuflusseite und Einlegen des Schlauches in die Rollerpumpe erfolgte der Start des Systems mit einer Flussgeschwindigkeit von 4l/min. Nach einem Zeitraum von 5, 30 und 60 min erfolgte die Entnahme von 1,5 ml des Antigen haltigen zirkulierenden ECMs aus dem zirkulierenden System über einen am Filterkopf konnektierten Dreiwegehahn (siehe Abb.6). Anschließend wurde dieses Entnahmenvolumen sofort wieder durch entsprechendes antigenhaltiges ECM gleicher Konzentration über den Dreiwegehahn ersetzt. Mit 1ml des entnommenen ECMs wurden HUVECS für 24 h inkubiert. Anschließend erfolgte eine ICAM-1 Messung am FACscan für die mit TNF- α und IL-1 haltigem ECM inkubierten HUVECS und HLA-DR Messung (HLA Moleküle der Klasse II) für die mit IFN- γ haltigem ECM inkubierten HUVECS. Die restlichen verbliebenen 0,5ml in der Spritze wurden beim Durchlauf mit (anti) TNF- α für einen ELISA benutzt (siehe 3.1.3 in Abschnitt 3).

2.4 Beschichtung von Pall LG-6 Filtermembranen mit anti CD95 IgM

Für die in Abschnitt 3.2. und 3.3. beschriebenen Versuche wurden Leukozytenfiltermembranstücke des Modells Pall LG-6 (s. o.) mit monoklonalem Antikörper (Klon CH11, Fa. Immunotech, Marseille Cedex, Frankreich) per Sedimentation beschichtet. Hierfür wurde eine sterile Pall LG-6 Filtereinheit durch Aufsägen des Filtergehäuses soweit eröffnet, dass die Filtermembran entnommen werden konnte. Anschließend wurden aus der entnommenen Membran kreisförmige Stücke herausgeschnitten, die in ihrer Fläche der Bodenfläche einer Vertiefung einer 12-Lochplatte entsprachen. Nach Herausschneiden der Stücke aus der Filtermembran wurden diese auf dem Boden der 12-Lochplatten platziert, so dass anschließend der Beschichtungsvorgang in aqua dest. verdünnten anti CD95 IgM begonnen werden konnte. Es wurden Konzentrationen von 0-500 ng anti CD95 IgM/ml aqua dest. verwendet. Die Beschichtung wurde per Sedimentation für 2 Stunden durchgeführt. Anschließend wurden die potentiell am Innenrand des jeweiligen Loches verbliebenen Antikörperreste durch dreimaliges Waschen mit 500 µl aqua dest. (Eppendorfpipette) entfernt. Die Inkubation der 12 Lochplatten für die Kontrollmessungen ohne Filtermembranen erfolgte nach gleichem Prinzip. Nach dem oben beschriebenen Waschvorgang wurden dann entsprechend dem Aufbau entweder 1 ml Jurkatzelllösung (Abschnitt 3.2.) oder 1ml Granulozytenlösung (Abschnitt 3.4.) pro Plattenloch in einer Konzentration von 10^6 Zellen/ml Jurkatzellmedium bzw. ECM hinzugegeben. Die Inkubationsdauer erfolgte wie in Abschnitt 3 beschrieben entsprechend dem Versuchsaufbau. Nach Inkubation wurden die Zellen aus den 12-Lochplatten entnommen und mit PBS Waschpuffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit Propidiumiodid und Annexin V FITC zur Durchführung der Vitalitätsbestimmung und Detektion toter Zellen. Nach diesem Inkubationsvorgang wurde am FACscan eine Quadrantenanalyse im FL-1 FL-2 Dotplot zur Ermittlung des Vitalitäts- bzw. Apoptosezustands der Zellproben ermittelt: unterer linker Quadrant: vitale, nicht apoptotische Zellen, unterer rechter Quadrant: früh- apoptotische Zellen, oberer rechter Quadrant: spät- apoptotische + nekrotische Zellen, oberer linker Quadrant: nekrotische Zellen (siehe auch Abbildung 7 in Abschnitt 2.6).

2.5 Zytokine

Für die Standardisierung der Modulation von Zelladhäsionsmolekülen (ICAM-1) bzw. HLA Antigenen auf der Zellmembran humaner Endothelzellen wurden rekombinante Zytokine im Zellkulturmodell eingesetzt. Die gewählten Zytokine spielen bei der zellvermittelten Immunabwehr eine bedeutende Rolle. Stammlösungen der Zytokine wurden aliquotiert und bei -20°C oder -80°C bis zur Verwendung gelagert. Die Endkonzentrationen der jeweiligen Zytokine wurden durch weitere Verdünnung in Endothelzellkulturmedium erreicht. Verschiedene Konzentrationen der jeweiligen Zytokine wurden auf die Eigenschaft getestet, die Expression von Zelladhäsionsmolekülen bzw. HLA Antigenen auf der Zellmembran zu modulieren.

2.6 Verwendete Messmethoden

2.6.1 Durchflusszytometrie

„Fluorescence- activated cell sorter“ (FACS). Für die durchflusszytometrischen Messungen wurde ein FACScan der Firma Becton Dickinson benutzt, bei dem ein Argon Laser als Lichtquelle fungierte. Durch ein Prisma wird eine einzige Wellenlänge von 488nm ausgewählt. Die Grundeinstellung für die zu messenden Parameter (Zellgröße, Granularität, Fluoreszenz -1, - 2, -3) wurde in Vorversuchen für die Analyse von Endothelzellen angepasst. Einzelzellsuspensionen von Endothelzellen wurden mittels Immunfluoreszenzfärbungen gegen das für Endothelzellen spezifische Faktor VIII von Willebrand verwandte Antigen markiert. Die Immunfluoreszenzfärbung wurde in abgedunkelten Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen (Fa. Nunc, Wiesbaden) mit V förmigem Boden durchgeführt. Die markierten Zellen wurde für die FACScan Analyse in einem Endvolumen von 200 μl Waschpuffer resuspendiert. Durch einen Überdruck im Flüssigkeitssystem wird die Zellsuspension aus den Probenröhrchen in den Kreislauf der Trägerflüssigkeit des FACScan überführt. Die hydrodynamische Fokussierung des aufwärtsgerichteten Flüssigkeitsstromes gewährleistet, dass die suspendierten Zellen einzeln und hintereinander an dem Analysepunkt in der Messküvette vorbeigeleitet werden. Der Analysepunkt ist die Stelle, an der das Licht des Laserstrahles den Flüssigkeitsstrom mit den darin enthaltenen Zellen in einem rechten Winkel kreuzt. Gemäß dem Prinzip der Dunkelfeldmikroskopie wird bei der Durchflusszytometrie die Sichtbarmachung der Lichtstreuung ausgenutzt. Zur Lichtstreuung tragen

Zelleigenschaften wie Zellgröße, Zellmembran, Zellkern und intrazelluläre granuläre Bestandteile bei. Das Licht wird entlang des einfallenden Lichtstrahles gestreut und als Vorwärts Streulicht (FSC = forward light scatter) bezeichnet. FSC ist hauptsächlich ein Maß für die Zellgröße (kleine Zellen streuen weniger Licht als große). Das im rechten Winkel zum einfallenden Lichtstrahl gestreute Licht hängt von der Zelldichte und der Granularität, nur zum geringen Teil von der Zellgröße ab. Dieses Licht wird als Rechtwinkelstreulicht (SSC = sideward light scatter) bezeichnet.

Für die Messung der Fluoreszenz werden Fluorochrome mit einem Absorptionsmaximum in der Nähe der 488nm Linie verwendet. Der dafür am häufigsten verwendete Farbstoff ist FITC (Fluorescein-isothiocyanat). Das Absorptionsmaximum für FITC liegt bei 495 nm, das Emissionsmaximum bei 520 nm (FL1). In dieser Arbeit ebenfalls als Farbstoff verwendet wurde Propidiumjodid (PI). Beide Farbstoffe sind ebenso bei 488nm anregbar, die Emissionsmaxima liegen aber bei 576 nm (FL2) respektive 639 nm (FL3). Alle fünf Signale (FSC, SSC, FL1; FL2, FL3) werden für jede einzelne Zelle mittels elektronischer Schaltungen gemessen und quantifiziert. Der FACscan besitzt zwei Arten von Detektoren. Das Vorwärtsstreulicht wird von einer Photodiode in einen proportionalen elektrischen Strom umgewandelt, während die anderen vier Parameter von Photoröhren / PMT = photomultiplier tube) detektiert werden. Photodioden haben eine geringere Lichtempfindlichkeit als Photoröhren, die ein schwaches Lichtsignal um mehrere Größenordnungen verstärken können. Die Spezifität eines Detektors für jeden Farbstoff wird dadurch optimiert, dass vor den Detektor ein Bandpassfilter geschaltet ist, der einen engen spektralen Bereich in der Nähe des Emissionsmaximums des jeweiligen Farbstoffes durchlässt.

Die Intensität des Lichtsignals für jeden der fünf Parameter wird also in ein elektrisches Signal umgewandelt. Je nach Höhe der Amplitude wird das Signal einem bestimmten Kanal zugeordnet. Viele Signale (verschiedener Zellen) können demselben „Kanal“ zugeordnet werden. Das Intensitätsprofil eines gemessenen Parameters wird so als Häufigkeitshistogramm dargestellt. Die horizontale Achse bezeichnet den Bereich in Kanälen (0-1023), die vertikale Achse die Anzahl von Zellen je „Kanal“. Die mittlere, mediane und modale Verteilung der Fluoreszenzintensität konnte neben anderen statistischen Parametern bei jeder einzelnen Messung ermittelt werden. Bei den meisten Analysen wurden die Medianwerte der Verteilung der antikörperspezifischen (z.B. anti IACM-1 bzw. anti CD54) Fluoreszenzintensität von unbehandelten Kontrollen, z.B.

Endothelzellen mit den Werten behandelte Proben (z.B. Endothelzellen mit TNF- α) verglichen. Zunächst musste eine standardisierte Geräteeinstellung über die Empfindlichkeit der Photodetektoren für die eigenen Versuchsbedingungen etabliert werden. Durch die Variation des sekundären Antikörpers (FITC konjugiert) konnte eine optimale FACscan Einstellung für den Farbstoff bei der Messung von Endothelzellen definiert werden. Zum Ausgrenzen von Zelldebris wurde ein Fenster um die Endothelzellwolke definiert. Die Daten von 1×10^4 Zellen pro Messung wurden mittels eines direkt angeschlossenen Computers von Hewlett Packard auf Diskette gespeichert. Zur Messung und Auswertung der Messdaten wurde das Softwareprogramm „FACscan™ Research Software Version 3.1“ von Becton Dickinson verwendet.

2.6.1.1 Anfärbung und ICAM-1/HLA-DR II Bestimmung bei HUVECS

Protokoll der Färbemethode für die FACscan Analyse mit adhärent wachsenden Endothelzellen:

- Absaugen des Kulturmediums
- Dreimaliges Waschen der Einzelzellschicht mit Ca^{2+} freiem PBS, mit 0,02% EDTA
- Kontrollieren der Integrität des Zellverbandes unter dem Mikroskop. Bei beginnender Auflockerung der Zell-Zell Verbindung vorsichtig mehrfaches Pipettieren der Zellen, bis alle Zellen einzeln suspendiert sind
- Kontrolle unter dem Mikroskop
- Pipettieren der Proben in konische Zentrifugenröhrchen (passend für FACscan)
- Zentrifugieren der Zellen bei 200 x g in PBS mit 10% FCS
- Vorsichtiges Absaugen des Überstandes
- Fixierung der Zellen mit Methanol für 10min

-Zweimaliges Waschen in Waschpuffer mit 1% BSA, 0,1% Natriumazid und 0,2% Tween 20. Zugabe von Waschpuffer, Resuspension, Zentrifugation

-Inkubation mit dem fluoreszenzkonjugierten (FITC) Primärantikörper für eine Stunde

-zweimaliges Waschen in Waschpuffer (wie oben)

-Resuspendieren in 0,2ml Waschpuffer

-FACscan Messung

Bei Verwendung eines unkonjugierten Primärantikörpers wurde in einem zweiten Inkubationsschritt ein entsprechender fluoreszenzkonjugierter, sekundärer Antikörper (Ziege Anti Maus) für 45 Minuten auf Eis im Dunkeln inkubiert.

2.6.1.2 Vitalitätsfärbung/Apoptosemessung bei neutrophilen Granulozyten sowie CD95 positiven und negativen Jurkatzellen mit FITC Annexin/PI

Phosphatidylserin (PS) findet sich normalerweise auf der Innenseite der Zellmembran einer lebenden Zelle. Während der Apoptose ("programmierter Zelltod") wird PS auf die Außenseite der Membran transloziert. Annexin V bindet sich an PS. Durch Markierung von Zellen mit FITC-Annexin V kann man apoptotische Zellen durchflusszytometrisch nachweisen.

Werden Zellen nekrotisch und ihre Membran durchlässig, kann FITC-Annexin V in die Zellen eindringen und sich an die Innenseite der Membran binden. Daher können bei alleiniger Färbung von Zellen mit FITC-Annexin V apoptotische nicht von nekrotischen Zellen unterschieden werden. Man kombiniert daher die FITC-Annexin V Markierung mit einer Propidiumiodidfärbung. Das Propidiumiodid (PI) dringt nur in Zellen mit durchlässiger Membran, also in nekrotische Zellen ein, da es die Zellmembran vitaler Zellen nicht passieren kann, und interkaliert zwischen Basen doppelsträngiger Nukleinsäuren devitaler Zellen. Lebende Zellen sind daher Annexin negativ und PI negativ, apoptotische Zellen sind Annexin positiv und PI negativ, nekrotische Zellen sind Annexin positiv und PI positiv (siehe Abbildung 7).

Neutrophile wurden aus dem heparinisierten Blut wie oben beschrieben isoliert und mit 0,25µg/ml FITC konjugiertem Annexin V und 10 µl PI inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dann im Durchflusszytometer (FACScan, Becton Dickinson) analysiert. Analog wurde auch mit den kultivierten (s. o.) CD95 positiven und negativen Jurkatzellen verfahren. Im Rahmen der Analyse wurden, analog obiger Erklärung, drei Subpopulationen identifiziert: vitale Zellen (FITC-/PI-), apoptotische Zellen (FITC+/PI-) und nekrotische Zellen (FITC+/PI+).

Die Apoptosebestimmungen bei Neutrophilen Granulozyten sowie Jurkatzellen erfolgte mit einem "Apoptosis Detection Kit" (R&D Systems).

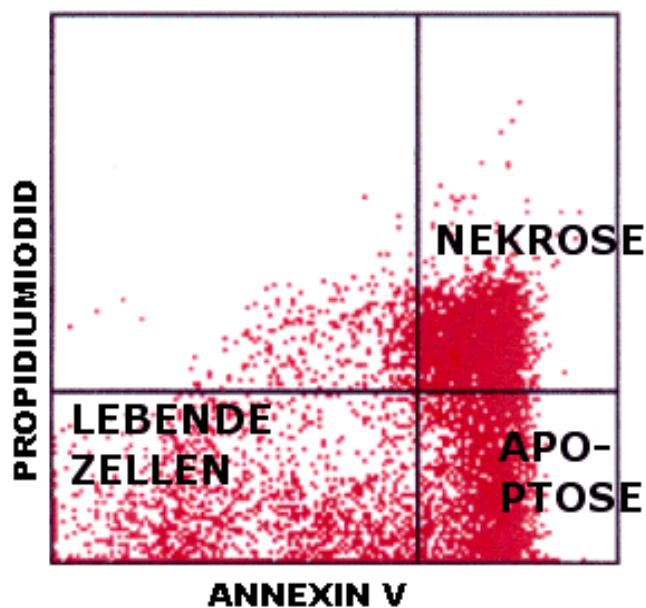


Abbildung 7: Quadrantenstatistik einer Annexin V/PI Vitalitätsfärbung (Dot blot)

2.6.2 Enzymatische quantitative Nachweismethoden

„Enzyme linked immuno sorbent assay“ (ELISA). Zum enzymatischen Nachweis bzw. Quantifizierung von Zytokinen in den Kulturmediumüberständen wurden ELISA Testkits der Firma Immunochemicals, Boston USA verwendet. Mediumüberstände wurden entnommen und bei 2000 x g zentrifugiert, um Zellreste zu entfernen. Die Proben wurden bei -20°C bis zur Messung aufbewahrt. Bei jeder Messung wurde eine Standardkurve mit definierten Konzentrationen des entsprechenden Zytokins erstellt. Die enthaltenen Fluoreszenzwerte der Proben wurden mit den Werten der Standardkurve verglichen. Für die Messung wurde ein ELISA Reader der Firma Ceres (UV 900C) verwendet.

2.7 Statistik

FACscan Messungen: Wie bereit im Abschnitt 2.6.1 „Durchflusszytometrie“ beschrieben, wurden die Medianwerte der relativen Fluoreszenzintensitäten der jeweiligen Zellpopulationen aus den Einzelhistogrammen statistisch verwertet.

Die Experimente wurden grundsätzlich in mindestens drei Parallelansätzen durchgeführt (Intraassay) und in mindestens drei unabhängigen Ansätzen wiederholt, so dass der Mittelwert

$$m = \frac{\sum x}{n}$$

und die Standardabweichung des Einzelwertes vom Mittelwert

$$S_e = \sqrt{\frac{n \sum x^2 - (\sum x)^2}{n^2}}$$

jeweils berechnet werden konnten. Verglichen wurden immer die Werte der unbehandelten Kontrollen mit den Werten der z.B. mit Zytokin inkubierten Proben. Die Differenz dieser Werte war somit ein relatives Maß für die erhöhte Antigendichte [z.B. ICAM-1 oder HLA-DR (Klasse II)]. Bei den Versuchsreihen mit Annexin V bzw. PI wurden ebenfalls die Werte der unbehandelten Kontrollen mit den Werten, die mit den verschiedenen anti CD95 Konzentrationen erzielt wurden, verglichen. Die Differenz dieser Werte war hierbei ein relatives Maß für die Änderung des Vitalitätszustandes der untersuchten Zellen. Bei einigen Versuchsreihen wurden schwache Differenzen beobachtet, die aber wiederholt auftraten. Bei diesen Versuchsreihen wurde der „Student's t Test“ durchgeführt. Die Unterschiede zwischen Datengruppen waren signifikant, wenn $p < 0,05$ war.

3 Ergebnisse

3.1 Auswirkungen von zytokinhaltigen Nährmedien auf die Expression von Zelladhäsionsmolekülen bei Endothelzellen

Zur Evaluierung von Verfahren zur Reduktion der Zytokinaktivität im Blut wurde zunächst ein *in vitro* Modell etabliert. Der Einfluss von Zytokinen auf die Expression von Zelladhäsionsmolekülen wurde anhand der Zytokine TNF- α , IL-1 und IFN- γ sowie menschlicher, venöser Nabelschnurgefäßendothelzellen (HUVECS) unter Anwendung durchflusszytometrischer Methoden untersucht. Die HUVECS dienten aufgrund ihrer Fähigkeit, Zytokin vermittelte Aktivierungsmoleküle *de novo* zu exprimieren. Die Veränderung der Expression des Zelladhäsionsmoleküls ICAM-1 (Inter Cellular Adhesion Molecule-1) vor und nach Zytokinstimulation mit TNF- α und IL-1 bzw. Expressionsänderung von HLA-DR (Gruppe II) Molekülen vor und nach Stimulation mit IFN- γ bei HUVECS zeigte für die drei untersuchten Zytokine vergleichbare Ergebnisse:

3.1.1 Endothelzellstimulation mit TNF- α :

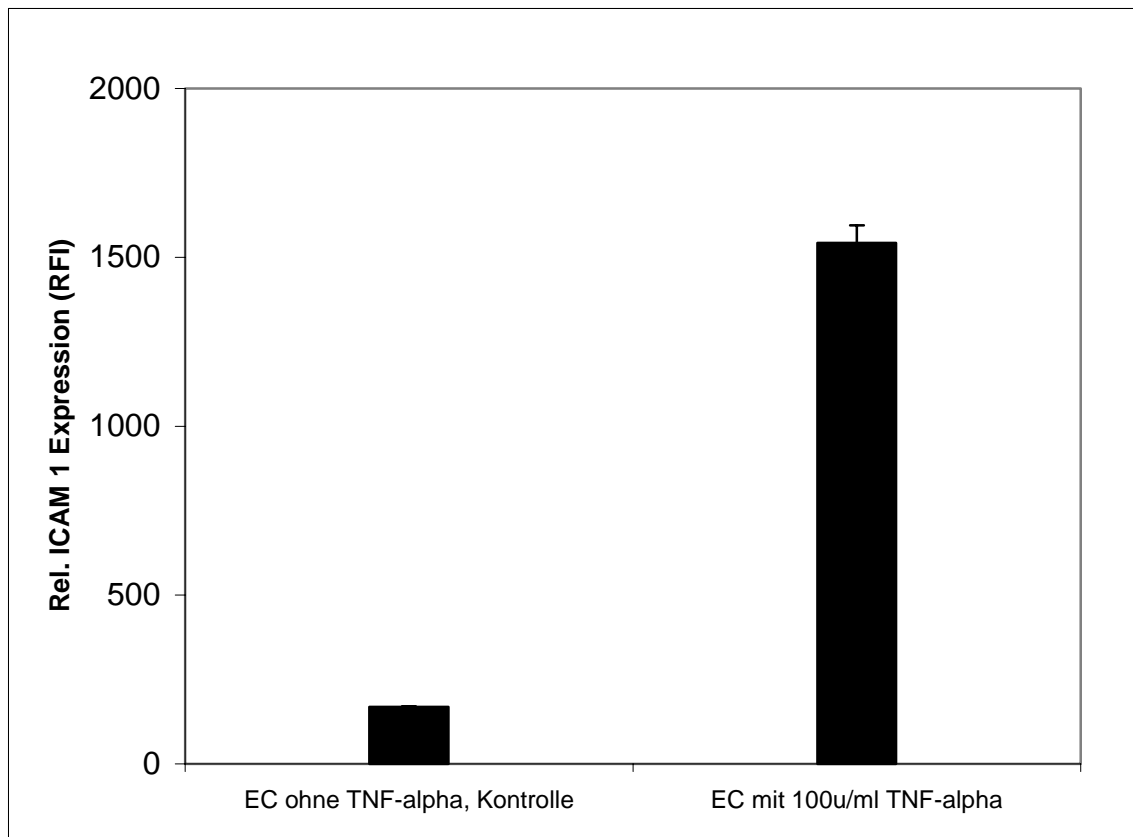


Abbildung 8:

Repräsentative Netto FACscan Werte (relative Fluoreszenzintensität, RFI) von einem aus drei unabhängigen Experimenten (Dreifachansatz) zur Bestimmung der Expression des Zelloberflächenmoleküls ICAM-1 auf HUVECS vor und nach zweistündiger Zellinkubation mit 100u TNF- α /ml ECM

Das Diagramm zeigt einen deutlichen Anstieg der ICAM-1 Expression nach zweistündiger Inkubation mit TNF- α um das 9,18 fache von 168,3 (RFI) auf 1542,73 (RFI).

3.1.2 Endothelzellstimulation mit TNF- α nach Filtration mittels anti TNF- α beschichteten Microbeads

Um die TNF- α Absolutmenge in einem definierten Flüssigkeitsvolumen zu reduzieren, wurden sogenannte Microbeads, kleine Kunststoffkügelchen ($\text{\O} 450\mu\text{m}$), mit anti TNF- α beschichtet (siehe Abschnitt 2.2 in "Material und Methode"). Anschließend wurde Endothelzellmedium mit verschiedenen TNF- α Konzentrationen hinzugegeben unter

der Vorstellung, dass sich die TNF- α Absolutmenge durch Abfangen der TNF- α Moleküle mittels der auf den Microbeads befindlichen Antikörpern reduziert. Als Nachweis diene die Abnahme der wiederum durchflusszytometrisch bestimmten ICAM-1 Expression (RFI) bei HUVECS vor und nach Inkubation des Mediums mit den Antikörper beschichteten Microbeads und anschließender HUVECS Stimulation. Die durchflusszytometrisch gewonnenen Daten zeigten, dass die ICAM-1 Expression durch den Einsatz von TNF- α inaktivierenden TNF- α Antikörpern im Vergleich zur Stimulation mit ungefiltertem Endothelzellmedium je nach anti TNF- α Konzentration quantitativ signifikant reduziert werden konnte (siehe Abb. 9):

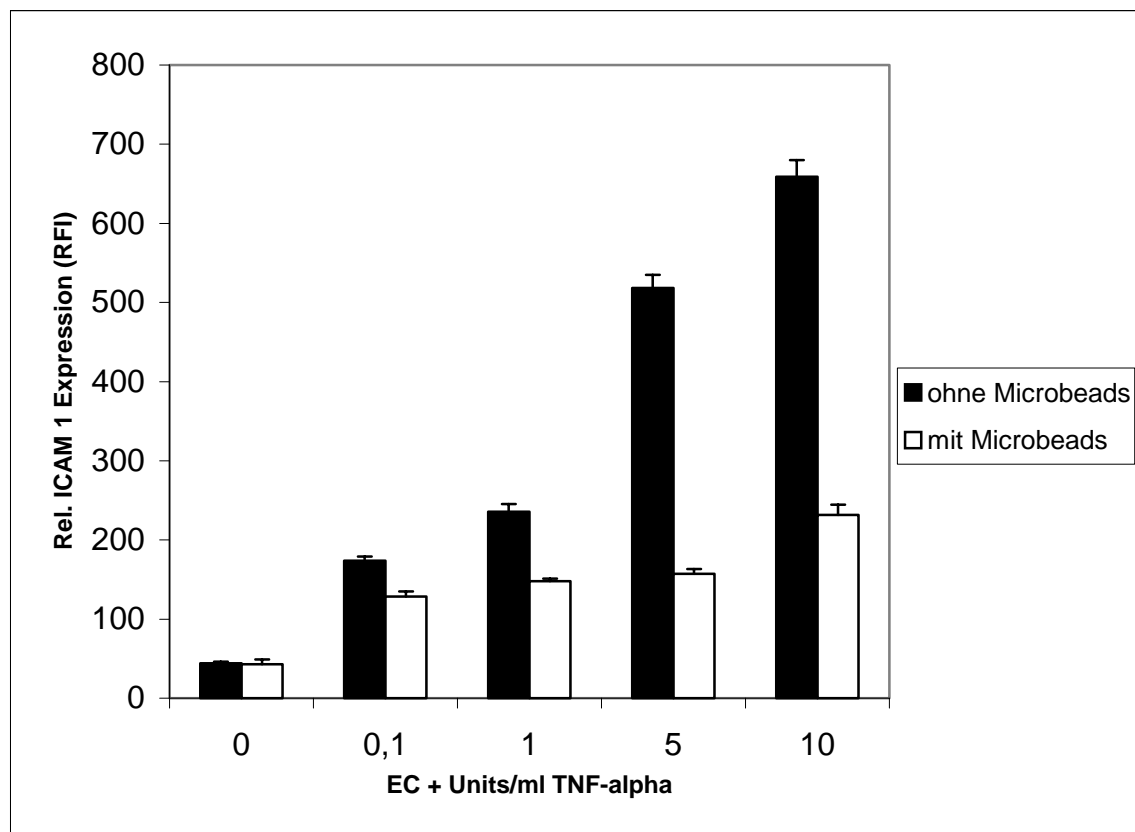


Abbildung 9:

Repräsentative Netto FACscan Werte (relative Fluoreszenzintensität) von einem aus drei unabhängigen Experimenten (Dreifachansatz) zur Bestimmung der Expression des Zelloberflächenmoleküls ICAM-1 auf HUVECS nach Zugabe von ECM mit den TNF- α Konzentrationen 0; 0,1; 0,5; 1; 5 und 10u TNF- α ./ml ECM.

Die schwarzen Säulen repräsentieren jeweils die durch das ungefilterte, TNF- α haltige ECM hervorgerufene ICAM-1 Expression auf HUVECS, während die weißen Säulen

die entsprechenden Messungen widerspiegeln, bei denen die mit anti TNF- α beschichteten Microbeads beteiligt waren. Die Zunahme der ICAM-1 Expression bei Maximalkonzentration 10u TNF- α /ml ECM beträgt das 14,92 fache des Ausgangswertes der Kontrollstimulation (44,18 \rightarrow 695,03 RFI) ohne den Einsatz von Microbeads. Bei der Messung mit Beteiligung der Antikörper beschichteten Microbeads lässt sich lediglich ein Anstieg der ICAM-1 Expression um das 5,49 fache (42,72 \rightarrow 231,82 RFI) nachweisen (10u TNF- α /ml ECM).

3.1.3 Endothelzellstimulation mit TNF- α nach Filtration mittels anti TNF- α beschichtetem Leukozytenfilter

Unter der Vorstellung, dass auf Leukozytenfiltermembranen fixierte Zytokinantikörper in der Lage dazu sind, ihre entsprechenden Antigene zu binden und dadurch zu inaktivieren, wurde ein Leukozytenfilter bzw. eine Leukozytenfiltermembran unter Einsatz eines Herz- Lungenmaschinen Pumpensystems auf seine Fähigkeit untersucht, Zytokinantikörper zu binden. Dazu wurde eine sterile Leukozytenfiltermembran in einem Original Leukozytenfiltergehäuse für zwei Stunden mit anti TNF- α bei geschlossenem Kreislaufsystem, siehe Abschnitt 2.3. in Abschnitt „Material und Methode“, beschichtet. Als Trägerflüssigkeit für die Antikörper diente herkömmliches Endothelzellnährmedium. Nach dem Beschichtungsvorgang sowie anschließender Kreislaufreinigung mit 250 ml 0,9%-iger NaCl Lösung wurde der Kreislauf mit TNF- α haltigem Endothelzellmedium aufgefüllt. 5 min, 30 min und eine Stunde nach Kreislaufbeginn wurden jeweils 2ml des TNF- α haltigen Nährmediums entnommen, um damit wiederum HUVECS zu inkubieren und dadurch die ICAM-1 Expression bei diesen Zellen zu stimulieren. Die Ergebnisse der anschließend durchgeführten Durchflusszytometrie und ELISA Messung (ICAM-1 Messung bzw. TNF- α Bestimmung) ergaben, dass die zirkulierende TNF- α Menge während der Zirkulation im Filterkreislauf quantitativ deutlich reduziert werden konnte (siehe Abb.10):

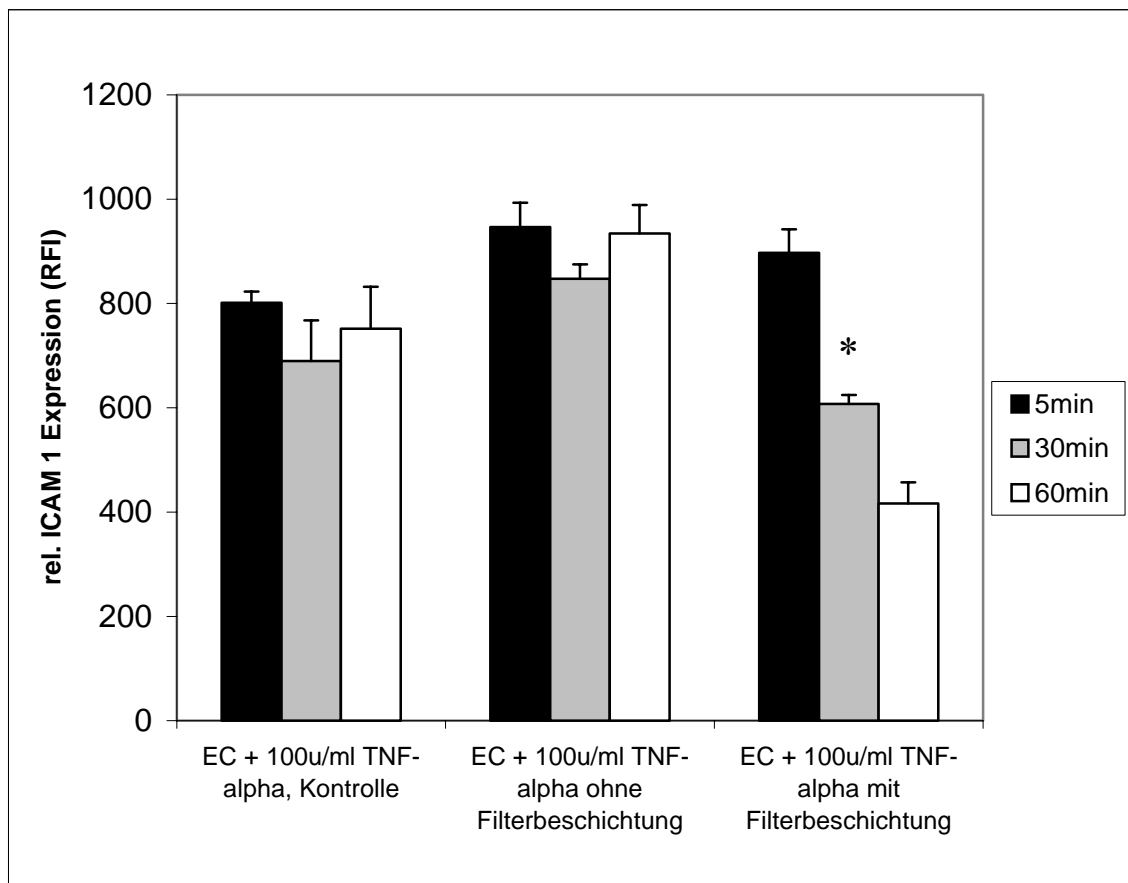


Abbildung 10:

Repräsentative Netto FACscan Werte (relative Fluoreszenzintensität) von einem aus drei unabhängigen Experimenten (Dreifachansatz) zur Bestimmung der Expression des Zelloberflächenmoleküls ICAM-1 auf HUVECS nach Zugabe von ECM in einer Konzentration von 100u TNF- α /ml ECM. * p< 0,05

Das Säulendiagramm zeigt die Auswirkung von TNF- α gefiltertem ECM nach den Entnahmezeitpunkten 5 min, 30 min und 60 min. Es erfolgte außerdem ein Kontrollversuch zur Bestimmung von gleichen Messwerten bei Zirkulation und Entnahme von TNF- α haltigem Medium im Filterkreislauf mit unbeschichteter Leukozytenfiltermembran sowie eine Kontrollstimulation mit direkter HUVECS Inkubation ohne Kreislaufsystem (analog zum Versuchsansatz in 3.1). Die Messergebnisse belegen, dass im Versuchsansatz mit anti TNF- α beschichtetem Leukozytenfilter nach 5 min Systemzirkulation ein geringfügiger Anstieg der ICAM-1 Expression von 11,98% gegenüber dem Kontrollwert (800,94→ 896,9 RFI) und nach 30 min eine Reduktion der IACM-1 Expression um 13,09% gegenüber dem Kontrollwert (698,61→ 607,17 RFI) zu verzeichnen war. Nach 60 min zeigte sich eine

deutliche Reduktion der ICAM-1 Expression auf 55,43% des Kontrollwertes (751,43→ 416,52 RFI). Demgegenüber kam es zu einem Anstieg der ICAM-1 Expression im Versuchsansatz mit baugleichem Leukozytenfilter ohne anti TNF- α Beschichtung um 24,35% bzgl. des 60 min Kontrollwertes (751,43→ 934,40 RFI).

Außerdem erfolgte analog zum Versuchsaufbau in Abb. 10 eine Kontrollversuchsreihe zur Bestimmung von gleichen Messwerten bei Zirkulation und Entnahme von TNF- α haltigem Medium im Filterkreislauf mit unbeschichteter Leukozytenfiltermembran, sowie einer Kontrollstimulation mit direkter HUVECS Inkubation ohne Kreislaufsystem (siehe Abb. 11).

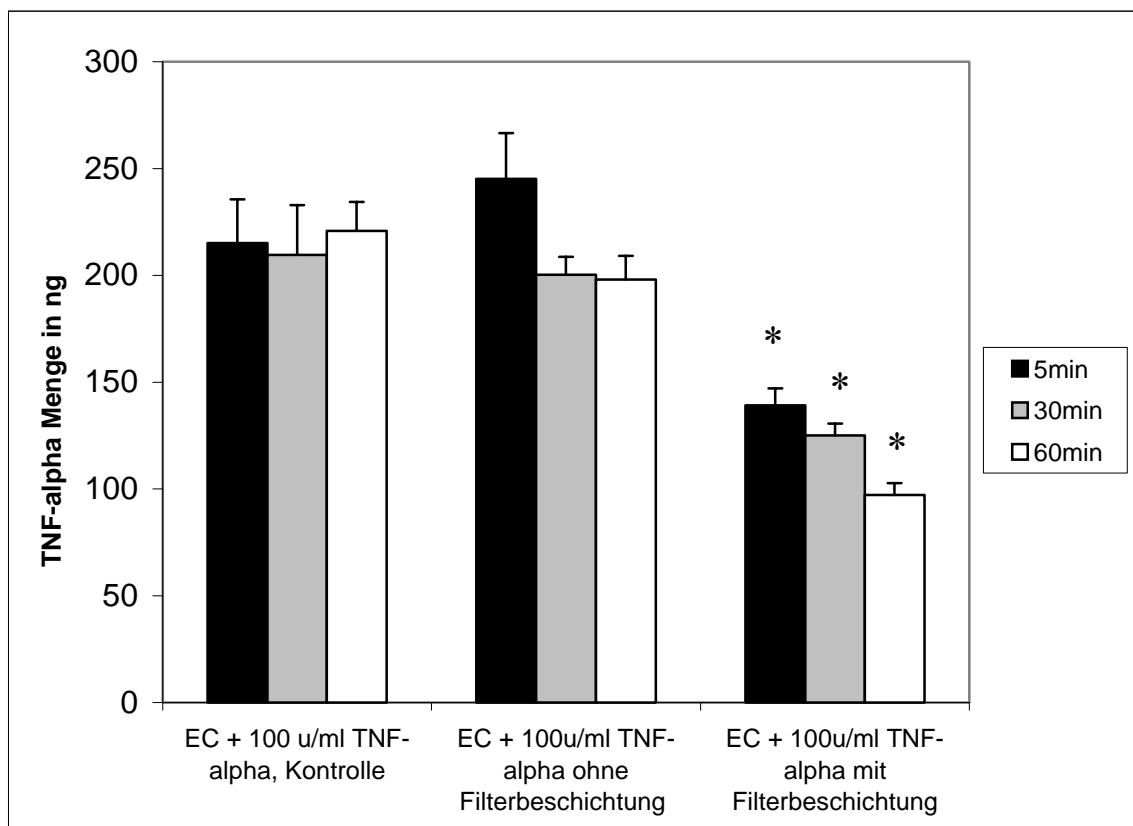


Abbildung 11:

Repräsentative TNF- α Absolutmengenwerte von einem aus drei unabhängigen Experimenten (Dreifachansatz) zur kausalen Bestätigung der ICAM-1 Reduktion nach Filtration mittels Antikörper beschichteter Leukozytenfiltermembran analog zu Abb. 10. TNF- α Absolutwerte wurden hierbei mit einer ELISA Messung analog zu Abb. 10 nach 5, 30 und 60 minütiger Filtration mittels anti TNF- α ermittelt. * p < 0,05

Wie bei den obigen Versuchsergebnissen (Abb. 10) lässt sich bei der TNF- α ELISA Messung ebenfalls eine Reduktion der TNF- α Absolutmengenwerte dokumentieren: Beim Versuchsansatz mit anti TNF- α beschichtetem Leukozytenfilter zeigte sich nach 5 min. Systemzirkulation eine Reduktion der TNF- α Absolutmenge um 35,36% gegenüber dem Kontrollwert (215,14 \rightarrow 139,07 ng TNF- α , die 30 min Messung ergab eine Reduktion um 40,30% gegenüber der Kontrolle (209,48 \rightarrow 125,04 TNF- α). Nach 60 min Zirkulation kam es zu einer Reduktion der TNF- α Absolutmenge um 55,99% des Kontrollwertes (220,78 \rightarrow 97,16 TNF- α). Bzgl. des Versuchsansatzes mit unbeschichtetem Leukozytenfilter lässt sich lediglich eine Reduktion des 60 min TNF- α Absolutmengenwertes auf 89,70 % des Kontrollwertes dokumentieren (220,78 \rightarrow 198,05 TNF- α).

3.1.4 Endothelzellstimulation mit IL-1

Analog zu den Versuchsaufbauten bzgl. TNF- α in Abschnitt 3.1.2 und 3.1.3 wurde hier mit gleichem Modell das Zytokin IL-1 untersucht, das ebenfalls inflammatorisches Potential besitzt und dadurch auch eine wichtige Rolle für die von Neutrophilen vermittelte Immunpathogenität im Zusammenhang mit der EKZ spielt. Auf gleiche Art und Weise wie in 3.1.2 wurden HUVECS zunächst mit IL-1 anstatt TNF- α für 2h stimuliert, anschließend erfolgte ebenfalls die durchflusszytometrische ICAM-1 Expressionsbestimmung am FACScan (siehe Abb. 12):

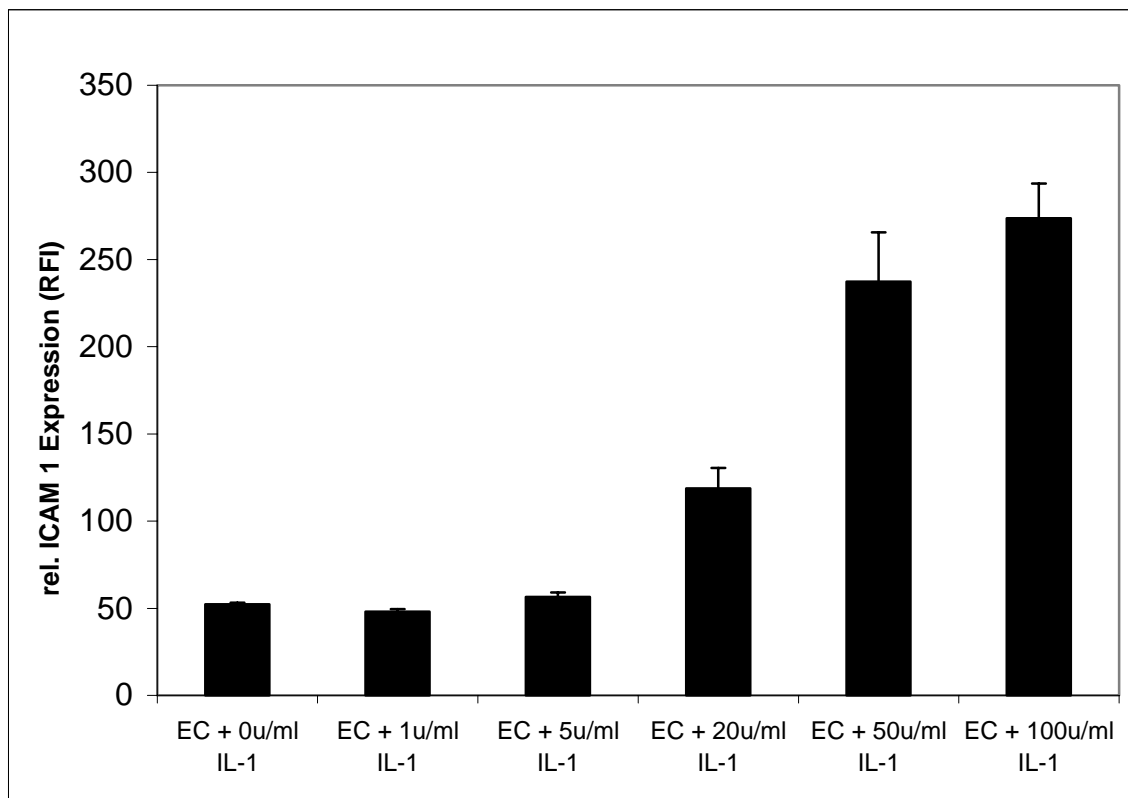


Abbildung 12:

Repräsentative Netto FACscan Werte (relative Fluoreszenzintensität) von einem aus drei unabhängigen Experimenten (Dreifachansatz) zur Bestimmung der Expression des Zelloberflächenmoleküls ICAM-1 auf HUVECS nach 2 stündiger Zellinkubation mit IL-1 haltigem ECM.

Das Diagramm zeigt in einer Konzentrationskinetik mit Konzentrationswerten von 0, 1, 5, 20, 50 und 100u IL-1/ml ECM einen deutlichen Anstieg der ICAM-1 Expression nach Inkubation (Dreifachansatz). Beim IL-1 Konzentrationsmaximum 100u IL-1/ml ECM kommt es zu einem Anstieg der ICAM-1 Expression um das 5,23 fache der Absolutwerte der Kontrollstimulation (52,32→ 273,60 RFI).

3.1.5 Endothelzellstimulation mit IL-1 nach Filtration mittels anti IL-1 beschichtetem Leukozytenfilter

Zum experimentellen Nachweis einer Zytokinreduktion anhand einer Zytokinantikörper beschichteten Leukozytenfiltermembran wurden die in diesem Abschnitt beschriebenen Ergebnisse für das Zytokin IL-1 mit dem gleichen Versuchsaufbau wie in Abschnitt

3.1.3 erzielt. Die Zytokinfiltration erfolgte allerdings mit einer anti IL-1 anstatt anti TNF- α Filtermembranbeschichtung (siehe Abb.13):

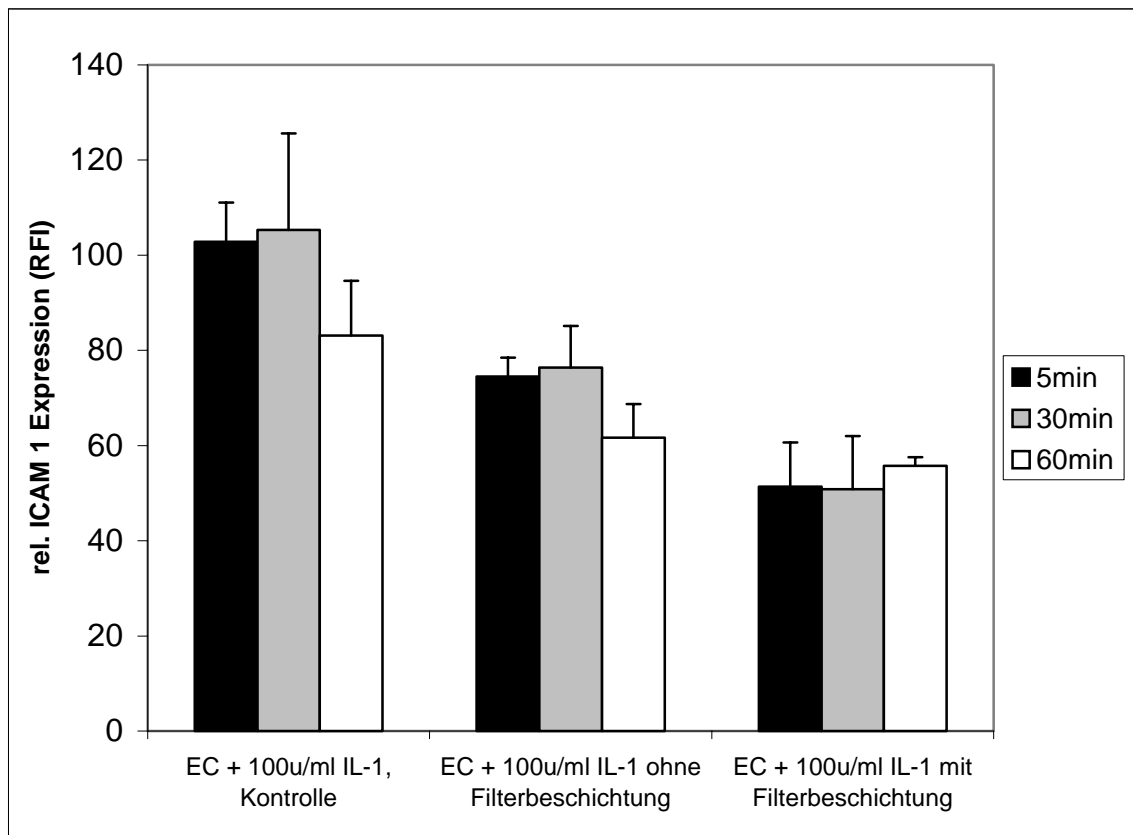


Abbildung 13:

Repräsentative Netto FACscan Werte (relative Fluoreszenzintensität) von einem aus drei unabhängigen Experimenten (Dreifachansatz) zur Bestimmung der Expression des Zelloberflächenmoleküls ICAM-1 auf HUVECS nach 2 stündiger Zellinkubation mit IL-1 haltigem ECM.

Es wurde eine ICAM-1 Messung durchgeführt nach Inkubation von HUVECS mit gefiltertem ECM in einer Konzentration von 100u IL-1/ml ECM. Das Säulendiagramm zeigt die Auswirkung von IL-1 gefiltertem ECM nach den Entnahmezzeitpunkten 5 min, 30 min und 60 min, einen Kontrollversuch zur Bestimmung von gleichen Messwerten bei Zirkulation und Entnahme von IL-1 haltigem Medium im Filterkreislauf mit unbeschichteter Leukozytenfiltermembran sowie einer Kontrollstimulation mit direkter HUVECS Inkubation ohne Kreislaufsystem.

Die Messergebnisse belegen, dass sich im Versuchsansatz mit anti IL-1 beschichteter Leukozytenfiltermembran nach 5 min Systemzirkulation eine Reduktion der ICAM-1

Expression um 49,99% des Ausgangswertes der Kontrollstimulation (102,78→ 51,40 RFI), verzeichnen lässt. Nach 30 min ergab sich eine Reduktion der ICAM-1 Expression um 51,72% der Kontrolle (105,31→ 50,84 RFI). Nach 60 min Systemzirkulation kam es zu einer Reduktion der ICAM-1 Expression um 32,88% des Kontrollwertes (83,10→ 55,77 RFI). Im Versuchsansatz mit baugleichem Leukozytenfilter ohne anti IL-1 Beschichtung zeigte sich nach 60 min eine Reduktion der ICAM-1 Expression um 25,78% des Kontrollwertes (83,10→ 61,75 RFI).

3.1.6 Endothelzellstimulation mit IFN- γ nach Filtration mittels anti IFN- γ beschichtetem Leukozytenfilter

Ähnlich wie TNF- α und IL-1 ist das Molekül IFN- γ ebenfalls ein proinflammatorisches Zytokin. IFN- γ führt allerdings nicht zu einer signifikanten *de novo* Expression von ICAM-1 bei HUVECS, sondern vielmehr zu einer Erhöhung der Expression von HLA Molekülen. Im Rahmen der Versuche, in denen IFN- γ als stimulierendes Zytokin benutzt wurde, wurde repräsentativ die *de novo* Expression von HLA-DR Molekülen (in diesem Fall HLA Moleküle Gruppe II) auf HUVECS gemessen. HLA-DR Moleküle spielen eine wichtige Rolle bei immunologischen Prozessen wie Antigenpräsentation, CD4- Lymphozytenantwort und Signaltransduktion. Analog zu den in 3.1.3-3.1.5 beschriebenen Versuchsaufbauten wurden Versuche zur Induktion der HLA-DR Expression bei HUVECS unter Einfluss von IFN- γ Inkubation bzw. unter IFN- γ Filtration mit einer anti IFN- γ Leukozytenfilterbeschichtung durchgeführt (siehe Abb.14):

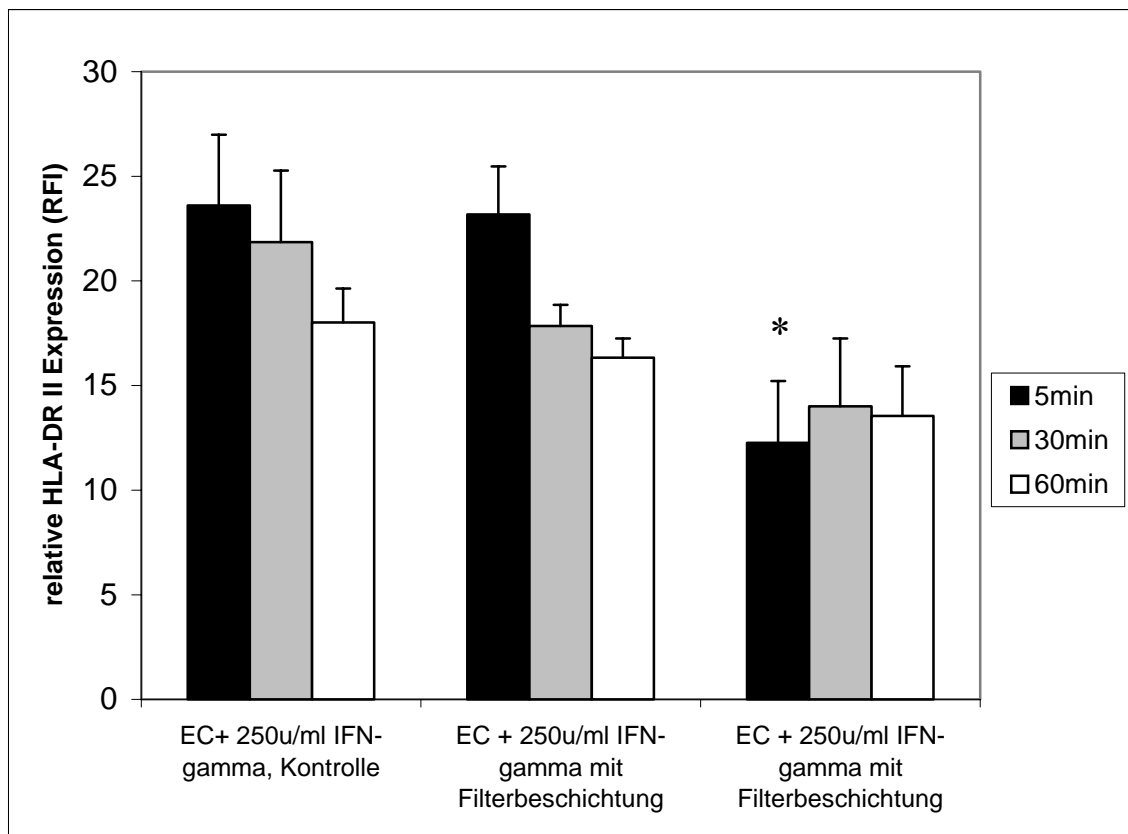


Abbildung 14:

Repräsentative Netto FACscan Werte (relative Fluoreszenzintensität) von einem aus drei unabhängigen Experimenten (Dreifachansatz) zur Bestimmung der Expression des Zelloberflächenmoleküls HLA-DR auf HUVECS nach Zellinkubation mit IFN- γ haltigem ECM. Es wurde eine HLA-DR Messung nach zweistündiger Inkubation von HUVECS mit gefiltertem ECM in einer Konzentration von 250u IFN- γ /ml ECM durchgeführt. * $p < 0,05$

Das Säulendiagramm zeigt die Auswirkung von IFN- γ gefiltertem ECM nach den Entnahmezeitpunkten 5 min, 30 min und 60 min sowie einen Kontrollversuch zur Bestimmung von gleichen Messwerten bei Zirkulation und Entnahme von IFN- γ haltigem Medium im Filterkreislauf mit unbeschichteter Leukozytenfiltermembran und einer Kontrollstimulationen mit direkter HUVECS Inkubation ohne Kreislaufsystem. Die Messergebnisse belegen, dass sich im Versuchsansatz mit anti IFN- γ beschichtetem Leukozytenfilter nach 5 min Systemzirkulation eine Reduktion der HLA-DR II Expression um 48,05 % des Ausgangswertes der Kontrollstimulation verzeichnen lässt (23,60 \rightarrow 12,26 RFI). Nach 30 min zeigte sich eine Reduktion der HLA-DR II Expression um 35,93 % der Kontrolle (21,85 \rightarrow 14,00 RFI). Nach 60 min

Systemzirkulation kam es zu einer Reduktion der HLA-DR II Expression um 24,83% des Kontrollwertes (18,01→ 13,54 RFI). Im Versuchsansatz mit baugleichem Leukozytenfilter ohne anti IFN- γ Beschichtung kam es lediglich zu einer Reduktion der ICAM-1 Expression um 9,34 % des 60 min Kontrollwertes (18,01→ 16,33 RFI).

3.2 Auswirkungen von Apoptose induzierenden Antikörpern auf Jurkatzellen

Die Einleitung von Apoptose bei Leukozyten limitiert die inflammatorische Reaktion auf physiologische Weise. Daher wurden Versuche zur Induktion von Apoptose auf Leukozyten durchgeführt

Aufgrund der zentralen Bedeutung der durch die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten vermittelten Induktion von diversen Immunmechanismen (Produktion von TNF- α , PAF, Stimulation von IL-1 Produktion in Endothelzellen, Degranulation und Sauerstoffradikalproduktion) im Sinne von Durchlässigkeitserhöhung des Blut-Hirnschrankenendothels und konsekutiver Funktionseinschränkung der Blut-Hirnschranke stellt sich die Frage der Notwendigkeit einer Inaktivierung der neutrophilen Granulozyten. Ein Ansatzpunkt zur Durchsetzung dieses Ziels ist die Induktion von Apoptose, dem programmierten Zelltod, den jede Körperzelle physiologischer Weise nach einer bestimmten Lebensdauer durchläuft. Tritt bei Neutrophilen beispielsweise dieser Zelltod frühzeitig ein, führt dies zur Annahme, dass es durch diese Prozessbeschleunigung gleichzeitig zur Reduktion der Stoffwechselaktivität innerhalb der Zelle kommt. Verschiedene Körperzellen besitzen spezielle Membranrezeptoren, die bei Stimulation von außen zu einer Apoptose induzierenden Signalkaskade führen. Dazu gehören in erster Linie CD95 Rezeptoren (Fas). Jurkatzellen sind Zellen, bei denen ebenfalls Apoptose durch Stimulation von CD95 Rezeptoren induziert werden kann, so dass diese Zellreihe als Modell für Apoptoseinduktion dienen:

3.2.1 Jurkat Zell Stimulation mit/ohne Leukozytenfiltermembran

Zur Bestätigung der Annahme, dass bei CD95 Rezeptor positiven Zellen mittels Antikörpern (im Rahmen unserer Versuche anti CD95 IgM) Apoptose induziert werden kann, wurden Fas positive Jurkatzellen, (Fas tragende, aktivierte T-Lymphozyten) zunächst mit IgM anti CD95 haltigem Endothellzellnährmedium 24h lang inkubiert.

Anschließend wurde am nächsten Tag ein Apoptose Assay mit durchflusszytometrischer Apoptosebestimmung angefertigt (siehe 2.6.1.2), der die Apoptoseinduktion in CD95 Rezeptor positiven Jurkatzellen widerspiegelt (siehe Abb. 16, 17). Als Kontrolle diente ein gleicher Versuchsansatz mit CD95 Rezeptor negativen Jurkatzellen (siehe Abb. 15).

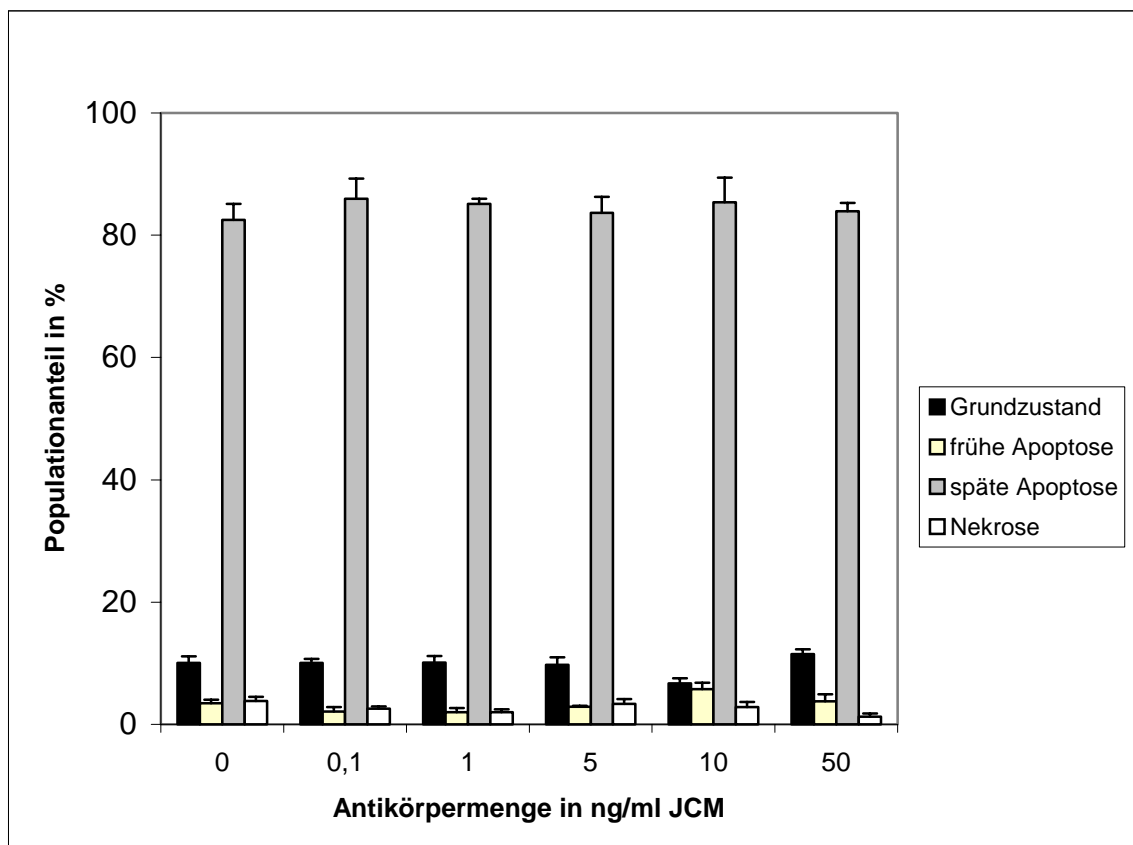


Abbildung 15:

Repräsentative Netto FACscan Werte (relative Fluoreszenzintensität) von einem aus drei unabhängigen Experimenten (Dreifachansatz) zur Apoptoseinduktion und Bestimmung des Vitalitätszustandes bei CD95 Rezeptor negativen Jurkatzellen nach 24 stündiger Dauerinkubation mit 0; 0,1; 1; 5; 10 und 50 ng anti CD95 IgM/ml Jurkatzellmedium (JCM) in 12 Loch-Platten.

Die Konzentrationskinetik ergab, dass sich der Anteil der CD95 Rezeptor negativen Jurkatzellen im Grundzustand von 10,07% der Gesamtpopulation (0ng anti CD95 IgM/ml JCM) um 1,45% auf 11,52% (50ng anti CD95 IgM/ml JCM) unwesentlich erhöhte. Der Anteil spät apoptotischer Jurkatzellen stieg von 82,55% (0ng anti CD 95 IgM/ml JCM) um 1,37% auf 83,92% (50ng anti CD95 IgM/ml JCM) an.

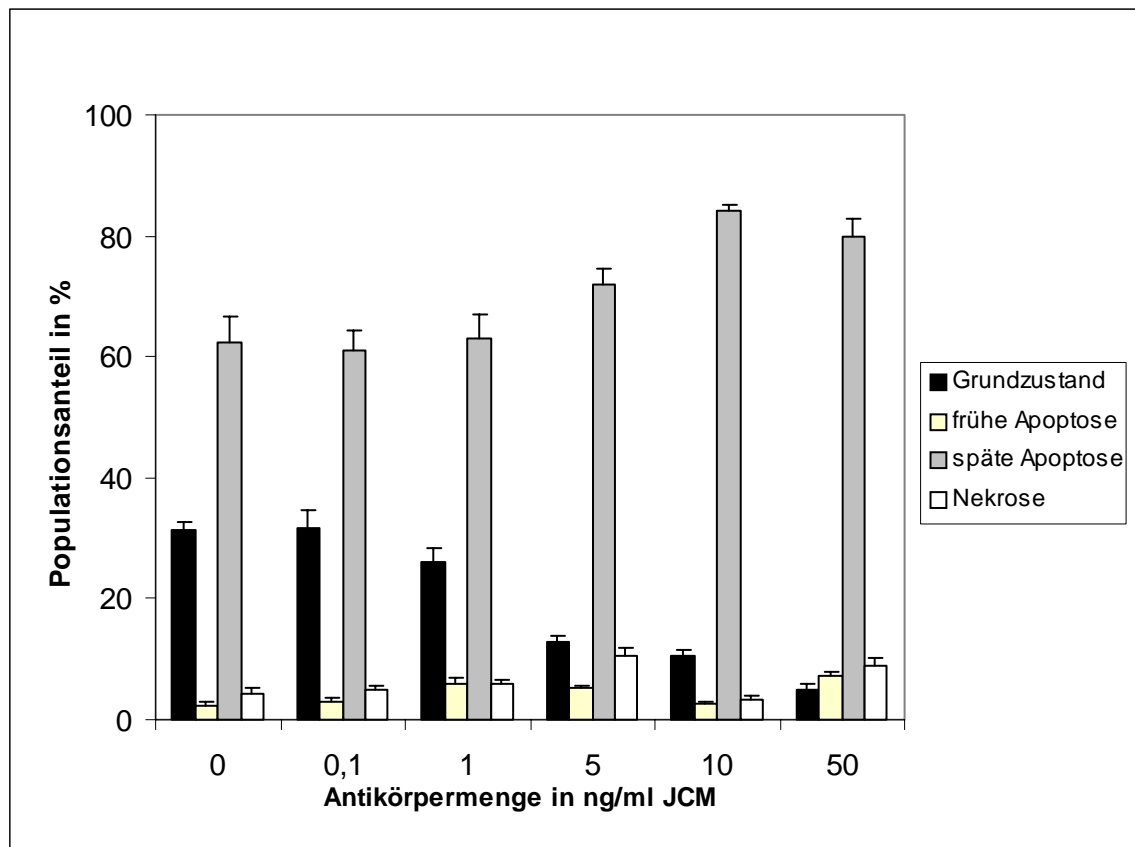


Abbildung 16:

Repräsentative Netto FACscan Werte (relative Fluoreszenzintensität) von einem aus drei unabhängigen Experimenten (Dreifachansatz) zur Apoptoseinduktion und Bestimmung des Vitalitätszustandes bei CD95 Rezeptor positiven Jurkatzellen nach 24 stündiger Dauerinkubation mit 0; 0,1; 1; 5; 10 und 50 ng anti CD95 IgM/ml Jurkatzellmedium anti CD95 IgM in 12 Loch-Platten.

Die Konzentrationskinetik (0-50 ng anti CD95 IgM/ml JCM) ergab, dass sich der Anteil der CD95 positiven Jurkatzellen im Grundzustand von 31,3% (0ng anti CD95 IgM/ml JCM) durch den Einfluss der anti CD95 IgM Antikörper in konzentrationsabhängiger Weise auf 4,81% (50ng anti CD95 IgM/ml JCM) reduzierte. Der Anteil spät apoptotischer Jurkatzellen stieg demgegenüber ebenfalls konzentrationsabhängig von 62,48% (0ng anti CD95 IgM/ml JCM) auf 79,93% (50ng anti CD95 IgM/ml JCM) an.

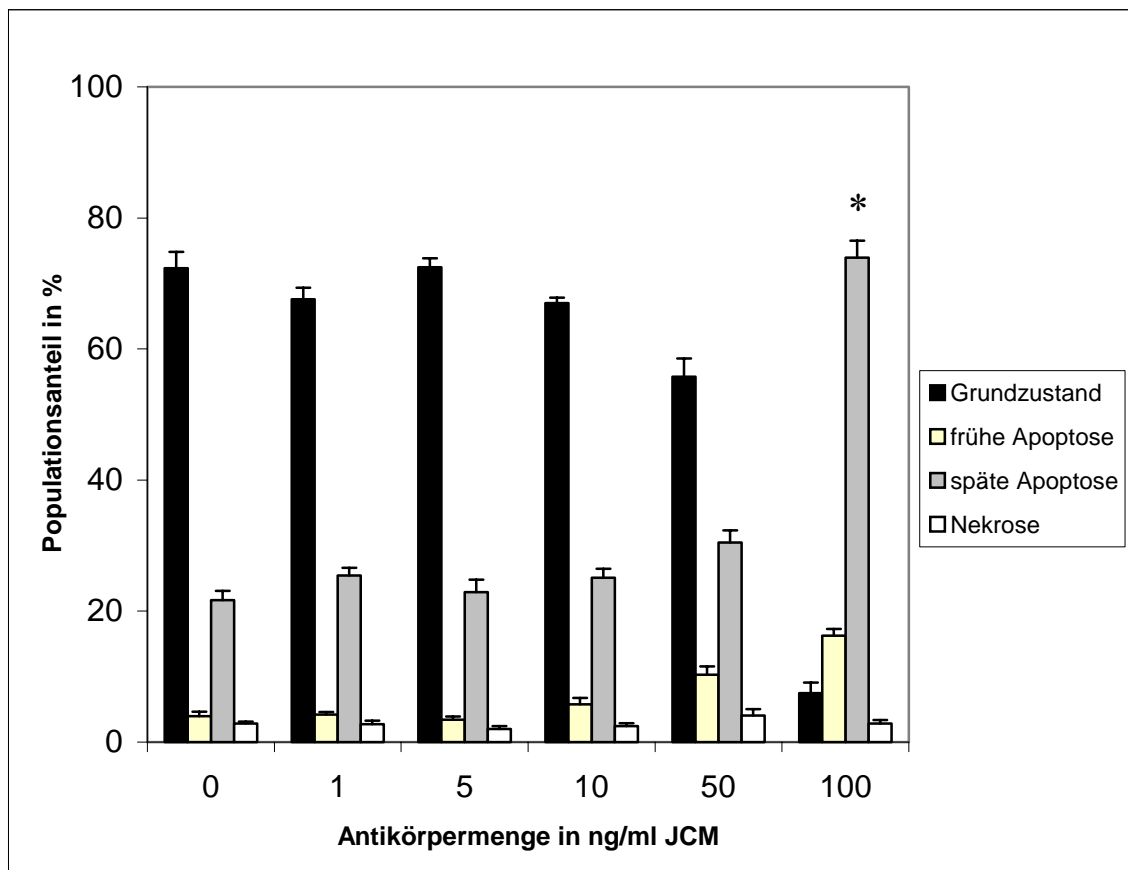


Abbildung 17:

Repräsentative Netto FACscan Werte (relative Fluoreszenzintensität) von einem aus drei unabhängigen Experimenten (Dreifachansatz) zur Apoptoseinduktion und Bestimmung des Vitalitätszustandes bei CD95 Rezeptor positiven Jurkatzellen nach 24 stündiger Dauerinkubation mit 0, 1, 5, 10, 50 und 100 ng anti CD95 IgM/ml JCM in 12 Loch-Platten mittels Annexin V. * $p < 0,05$

Die Konzentrationskinetik ergab, dass sich der prozentuale Anteil der im Grundzustand befindlichen Jurkatzellen in konzentrationsabhängiger Weise von 72,30% (0ng ml anti CD95 IgM/ml JCM) um 64,83% auf 7,47% (100 ng anti CD95 IgM/ml JCM) reduzierte. Der prozentuale Anteil der spät apoptotischen Jurkatzellen nahm hingegen ebenfalls konzentrationsabhängig von 21,70% (0ng anti CD95 IgM/ml JCM) um 52,25% auf 73,95% (100ng anti CD95 IgM/ml JCM) zu.

Um das Verhalten von Jurkatzellen bzgl. ihres Vitalitätszustandes mittels anti CD95 IgM beschichteten Leukozytenfiltermembranen zu untersuchen, wurden Pall LG-6 Filtermembranstücke in 12 Loch Platten mit anti CD95 IgM inkubiert, anschließend gewaschen und mit (in befindlichen JCM) Fas negativen und Fas positiven Jurkatzellen angereichert (siehe Abschnitt 2.4 in „Material und Methode“). Abb. 18-21 zeigen die Ergebnisse dieser Versuchsansätze:

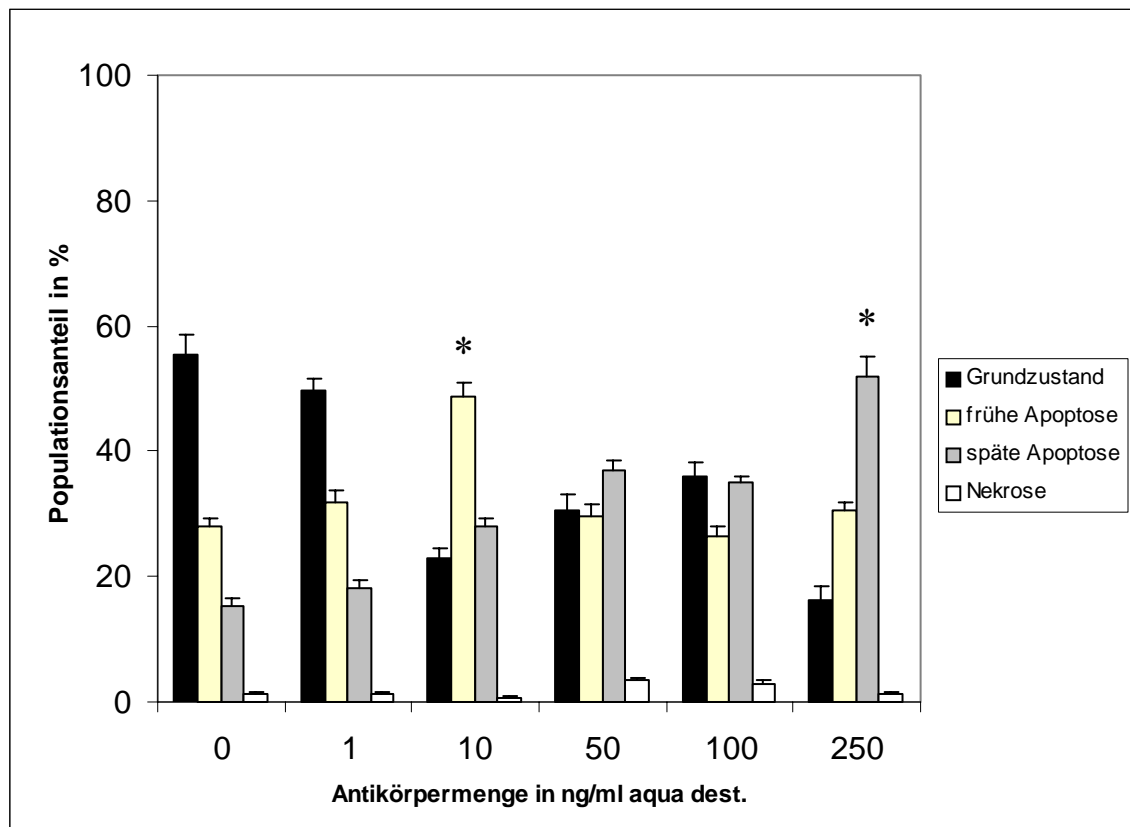


Abbildung 18:

Repräsentative Netto FACscan Werte (relative Fluoreszenzintensität) von einem aus drei unabhängigen Experimenten (Dreifachansatz) zur Apoptoseinduktion und Bestimmung des Vitalitätszustandes bei CD95 Rezeptor positiven Jurkatzellen.

* $p < 0,05$

Zunächst erfolgte eine zweistündige Inkubation von Pall LG-6 Leukozytenfilterstücken in 12 Loch Platten mit 0, 1, 10, 50, 100 und 200 ng anti CD95 IgM/ml aqua dest. und anschließender Waschung der 12 Lochplatten mit aqua dest., daraufhin Hinzugabe von CD95 Rezeptor positiven Jurkatzellen in JCM sowie 12 stündige Inkubation in der 12-Lochplatte mit Filterstücken, anschließend Apoptosebestimmung mittels Annexin V/PI.

Die Konzentrationskinetik ergab, dass sich der prozentuale Anteil der im Grundzustand befindlichen Jurkatzellen in konzentrationsabhängiger Weise von 55,51% (0ng anti CD95 IgM/ml aqua dest.) um 39,26% auf 16,25% (100 ng anti CD95 IgM/ml aqua dest.) reduzierte. Der prozentuale Anteil der spät apoptotischen nahm hingegen ebenfalls konzentrationsabhängig von 15,37% (0ng anti CD95 IgM/ml aqua dest.) um 36,67% auf 52,04% (100ng anti CD95 IgM/ml aqua dest.) zu.

Kontrollversuch zu Abb. 18 mit gleicher Versuchsanordnung, allerdings ohne Filtermembranstückchen:

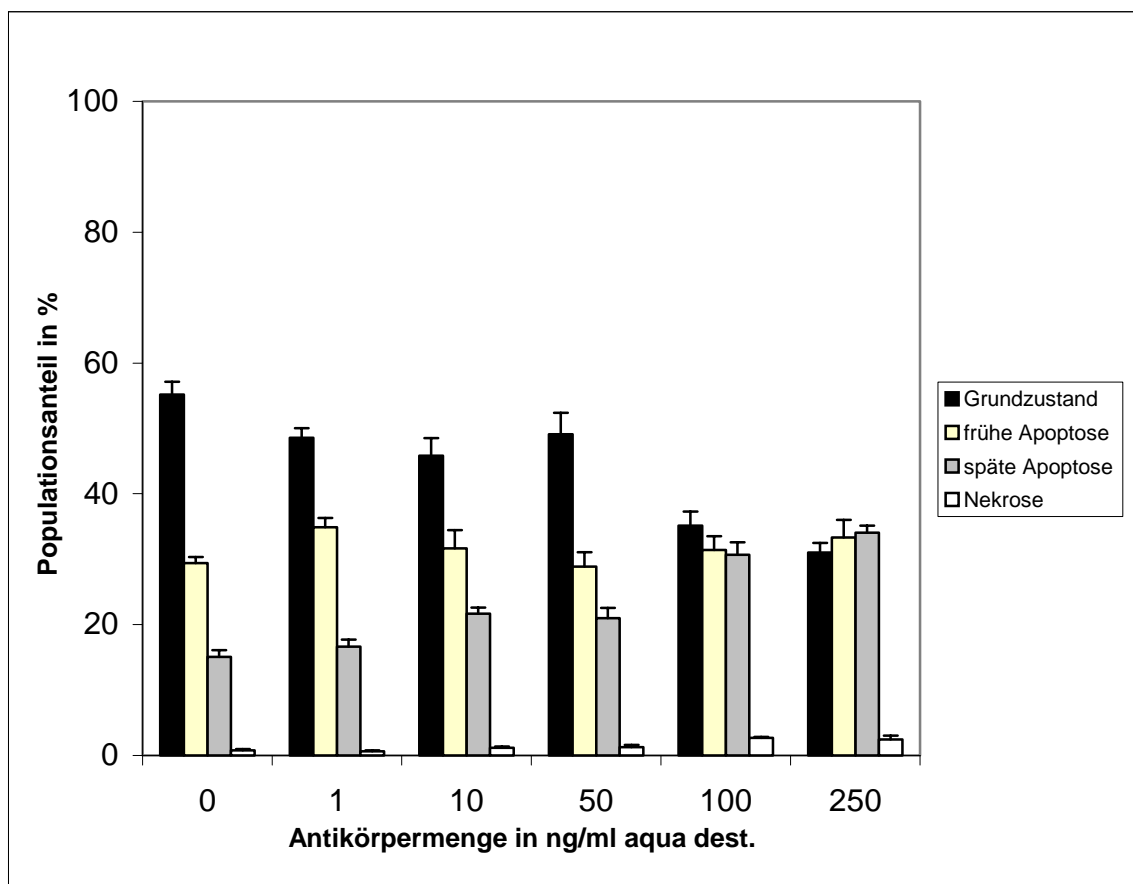


Abbildung 19:

Repräsentative Netto FACscan Werte (relative Fluoreszenzintensität) von einem aus drei unabhängigen Experimenten (Dreifachansatz) zur Apoptoseinduktion und Bestimmung des Vitalitätszustands bei CD95 Rezeptor positiven Jurkatzellen.

Zunächst erfolgte eine zweistündige Inkubation von 12-Lochplatten ohne Filtermembranstückchen mit 0, 1, 10, 50, 100 und 200 ng anti CD95 IgM/ml aqua dest.

Anschließend wurde Locher der 12-Lochplatten dreimalig mit aqua dest. gewaschen, daraufhin Hinzugabe von CD95 Rezeptor positiven Jurkatzellen in JCM sowie 12-stündige Inkubation in 12-Lochplatte, anschließend Apoptosebestimmung mittels Annexin V/PI. Die Konzentrationskinetik ergab, dass sich der prozentuale Anteil der im Grundzustand befindlichen Jurkatzellen von 55,2% (0ng anti CD95 IgM/ml aqua dest.) um 24,2% auf 31,0% (100 ng anti CD95 IgM/ml aqua dest.) reduzierte. Der prozentuale Anteil der spät apoptotischen nahm hingegen von 15,08% (0ng anti CD95 IgM/ml aqua dest.) um 18,97% auf 34,05% (100ng anti CD95 IgM/ml aqua dest.) zu.

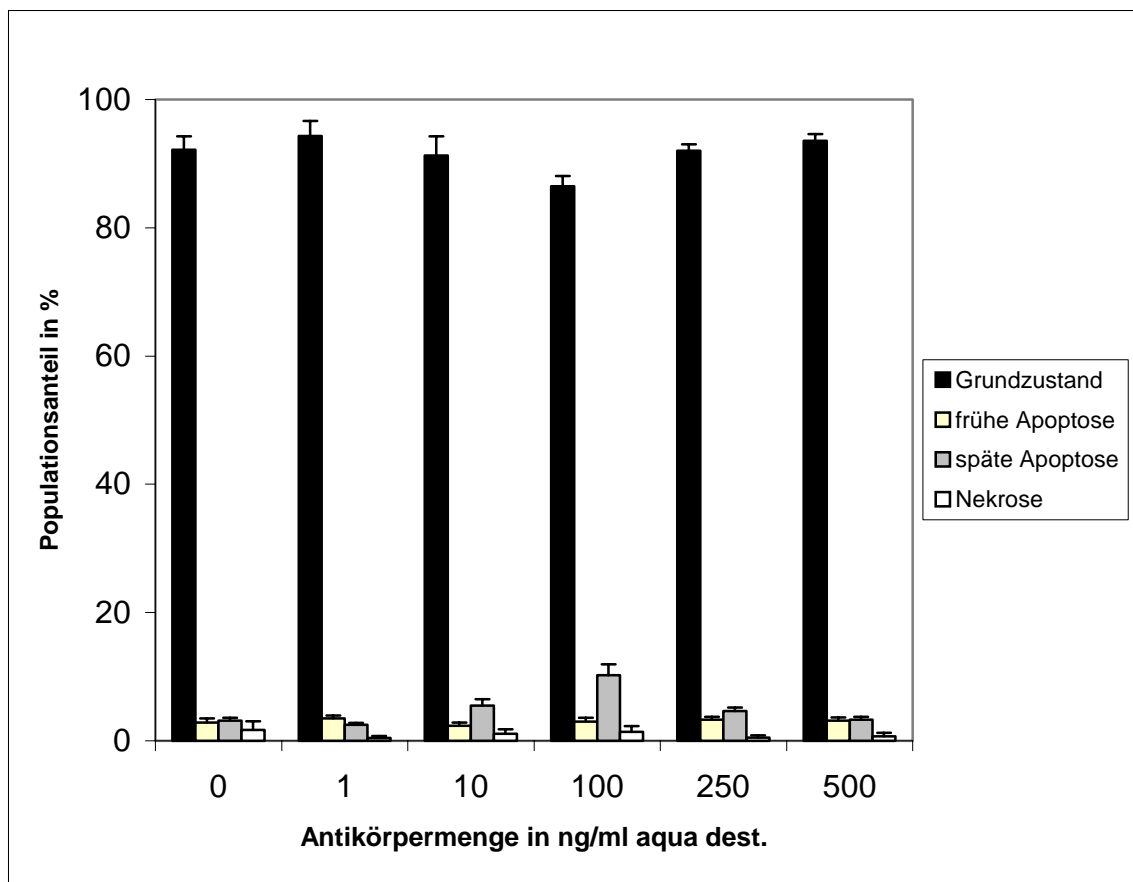


Abbildung 20:

Repräsentative Netto FACscan Werte (relative Fluoreszenzintensität) von einem aus drei unabhängigen Experimenten (Dreifachansatz) zur Apoptoseinduktion und Bestimmung des Vitalitätszustandes bei CD 95 Rezeptor negativen Jurkatzellen.

Zunächst erfolgte eine zweistündige Inkubation von Pall LG-6 Leukozytenfilterstücken in 12 Loch Platten mit 0, 1, 10, 50, 100 und 200 ng anti CD95 IgM/ml aqua dest. mit anschließender Waschung der 12 Lochplatten mit aqua dest., daraufhin Hinzugabe von

CD95 Rezeptor positiven Jurkatzellen in JCM sowie 12-stündige Inkubation in 12-Lochplatte mit Filterstücken, anschließend Apoptosebestimmung mittels Annexin V. Die Konzentrationskinetik ergab, dass sich der prozentuale Anteil der im Grundzustand befindlichen Jurkatzellen von 92,15% (0ng anti CD95 IgM/ml) um 1,39% auf 93,54% (100 ng anti CD95 IgM/ml aqua dest) erhöhte. Der prozentuale Anteil der spät apoptotischen nahm von 3,16% (0ng anti CD95 IgM/ml aqua dest) um 0,12% auf 3,28 % (100ng anti CD95 IgM/ml aqua dest) zu.

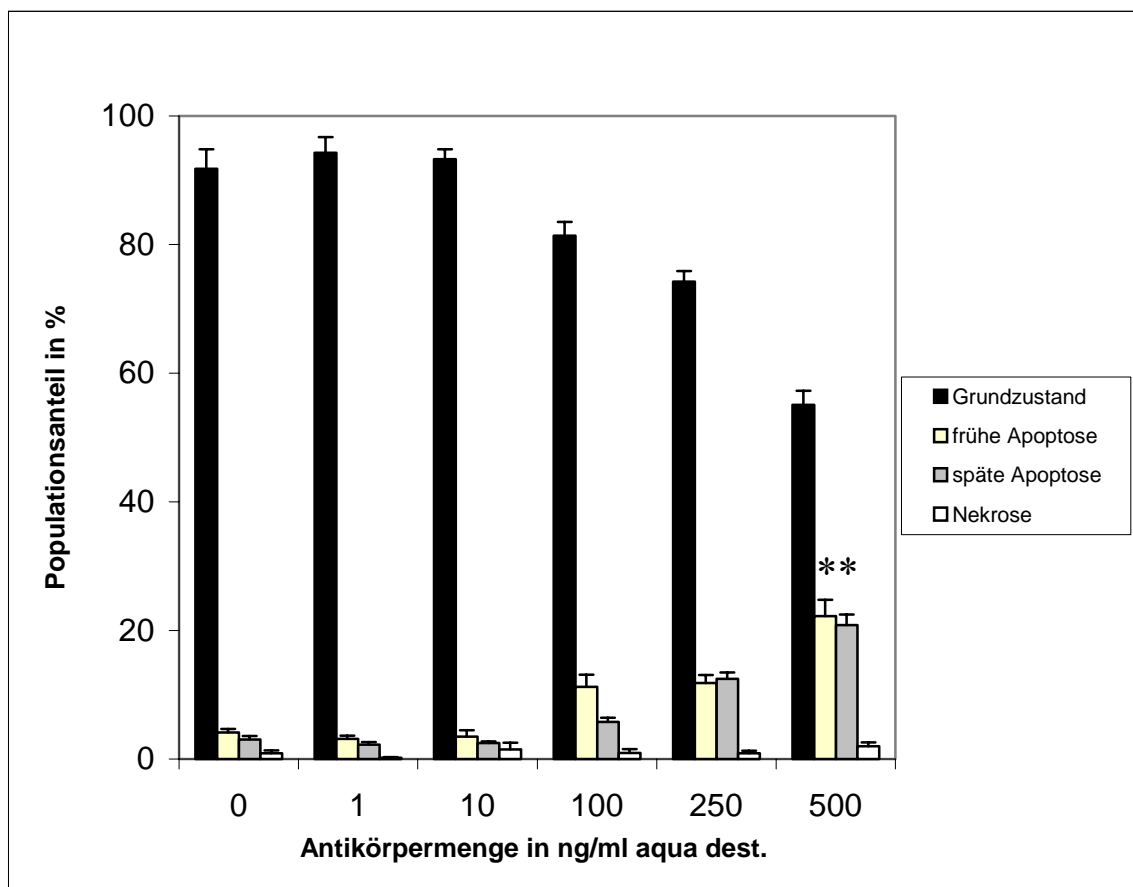


Abbildung 21:

Repräsentative Netto FACscan Werte (relative Fluoreszenzintensität) von einem aus drei unabhängigen Experimenten (Dreifachansatz) zur Bestimmung des Vitalitätszustandes bei CD95 Rezeptor positiven Jurkatzellen. * $p < 0,05$

Zunächst erfolgte eine zweistündige Inkubation von Pall LG 6 Leukozytenfilterstücken in 12-Lochplatten mit 0, 1, 10, 50, 100 und 200 ng anti CD95 IgM und anschließender Waschung der 12-Lochplatten mit aqua dest.; daraufhin Hinzugabe von CD95 Rezeptor positiven Jurkatzellen in JCM sowie 12-stündige Inkubation in 12-Lochplatte mit

Filterstücken, anschließend Apoptosebestimmung. Die Konzentrationskinetik ergab, dass sich der prozentuale Anteil der im Grundzustand befindlichen Jurkatzellen in konzentrationsabhängiger Weise von 91,78% (0ng anti CD95 IgM/ml aqua dest.) um 36,68% auf 55,10% (100 ng anti CD95 IgM/ml aqua dest.) abnahm. Der prozentuale Anteil der früh apoptotischen Jurkatzellen nahm hingegen konzentrationsabhängig von 4,11% (0ng anti CD95 IgM/ml aqua dest.) um 17,14 % auf 22,25 % (100ng anti CD95 IgM/ml aqua dest.) zu. Ähnliche Veränderungen zeigten sich beim prozentualen Anteil der spät apoptotischen Jurkatzellen Hier kam es ebenfalls konzentrationsabhängig zu einer des Populationsanteils von 3,03% (0ng anti CD95 IgM/ml aqua dest.) um 17,79 % auf 20,82 % (100ng anti CD95 IgM/ml aqua dest.).

3.3 Auswirkungen von Apoptose induzierenden Antikörpern auf neutrophile Granulozyten

3.3.1 Stimulation neutrophiler Granulozyten mit anti CD95 IgM mit/ohne Leukozytenfiltermembran

Um zu untersuchen, ob Apoptoseinduktion mittels anti CD95 IgM bei neutrophilen Granulozyten wie auch bei CD95 positiven Jurkatzellen möglich ist, wurden humane, polymorphkernige neutrophile Leukozyten (neutrophile Granulozyten) aus menschlichem Blut gesunder Spender isoliert. Die Apoptoseinduktionsmethodik erfolgte analog den Versuchsaufbauten mit pos. bzw. neg. Jurkatzellen (Abschnitt 3.2)

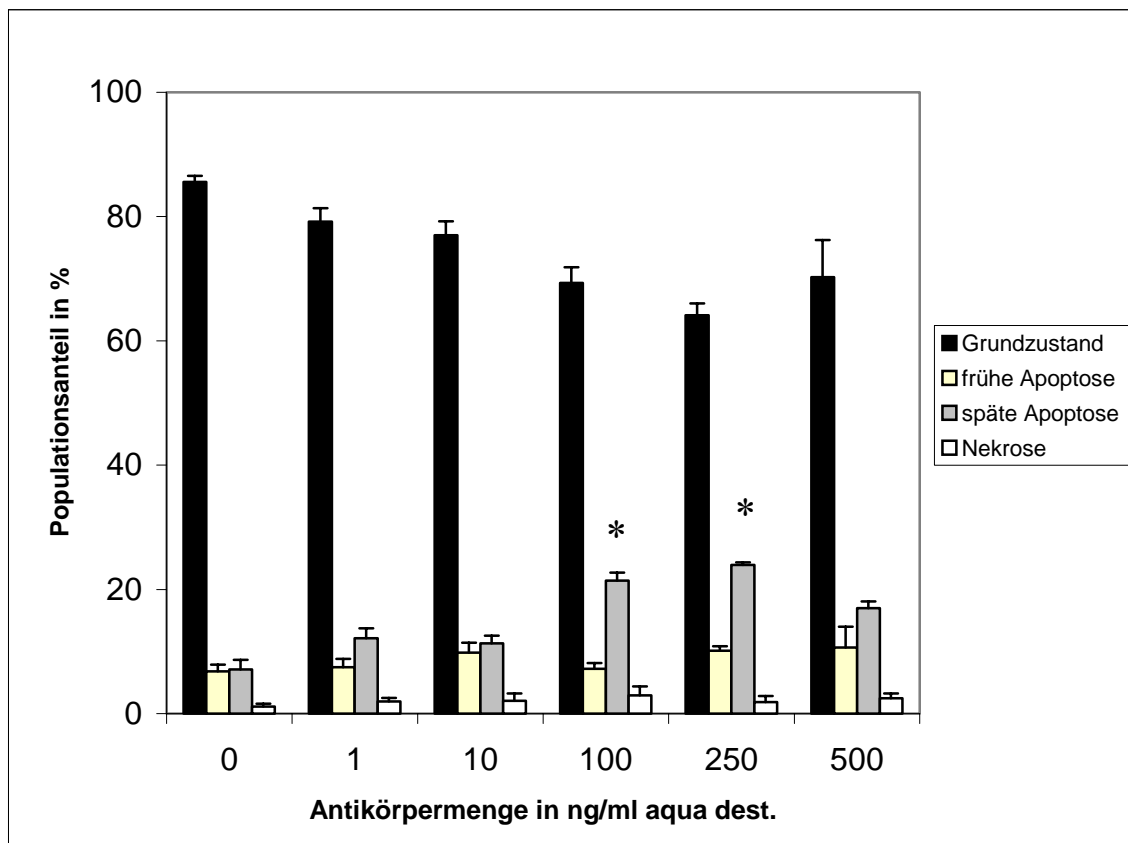


Abbildung 22:

Repräsentative Netto FACscan Werte (relative Fluoreszenzintensität) von einem aus drei unabhängigen Experimenten (Dreifachansatz) zur Apoptoseinduktion und Bestimmung des Vitalitätszustandes bei humanen neutrophilen Granulozyten gesunder Probanden. * $p < 0,05$

Zunächst erfolgte eine zweistündige Inkubation von Pall LG-6 Leukozytenfilterstücken in 12-Lochplatten mit 0, 1, 10, 50, 100 und 200 ng anti CD95 IgM/ml aqua dest. und anschließender Waschung der 12 Lochplatten mit aqua dest., daraufhin Hinzugabe von neutrophilen Granulozyten in ECM sowie 12-stündige Inkubation in 12-Lochplatte mit Filterstücken, anschließend Apoptosebestimmung mittels Annexin V/PI. Die Konzentrationskinetik ergab, dass sich der prozentuale Anteil der im Grundzustand befindlichen Neutrophilen in konzentrationsabhängiger Weise von 85,56% (0 ng anti CD95 IgM/ml aqua dest.) um 15,31% auf 70,25% (100 ng anti CD95 IgM/ml aqua dest.) abnahm. Der prozentuale Anteil der früh apoptotischen neutrophilen Granulozyten nahm hingegen konzentrationsabhängig von 6,77% (0 ng anti CD95 IgM/ml aqua dest.) um 3,90 % auf 10,67 % (100 ng anti CD95 IgM/ml aqua dest.) zu. Ähnliche Veränderungen zeigten sich beim prozentualen Anteil der spät apoptotischen

neutrophilen Granulozyten. Hier kam es ebenfalls konzentrationsabhängig zu einem Anstieg des Populationsanteils von 7,08% (0ng anti CD95 IgM/ml aqua dest.) um 9,91 % auf 16,99% (100ng anti CD95 IgM/ml aqua dest.).

4 Diskussion

Filtration von Blut bzw. Blutbestandteilen spielt eine wichtige Rolle in vielen Bereichen der modernen Medizin wie Herzchirurgie, Transfusionsmedizin, Blutbanken etc. Unterstützend zu der im Vordergrund stehenden medikamentösen Therapie wird sie neuerdings auch bei Patienten mit körpereigenen, aseptischen Entzündungsprozessen wie der rheumatoiden Arthritis, der Colitis ulcerosa und dem M. Crohn als sogenannte Zytapherese angewendet (120). An dieser Stelle soll nun noch einmal aufgezeigt werden welchen Stellenwert die Filtrationstechnik des zirkulierenden Blutes im Rahmen der Herz-Lungen Maschine unterstützen kardiochirurgischen Eingriffe besitzt und wie diese für den Patienten grundsätzlich nützlichen Errungenschaften (121-123) weiter verbessert werden müssen. In diesem Zusammenhang muss man an die vier wesentlichen Einsatzorte der Filter wie arterielle Linie, Blutkardioplegie, Reperfusionblut EKZ- Residualblut, und deren Einsatzzeitpunkt denken (124).

Wie in den vorangestellten Kapiteln schon gezeigt wurde, gab es in den vergangenen Jahrzehnten bereits einige Innovationen zur Eindämmung und Abschwächung des EKZ induzierten SIRS. Insbesondere wurden in den letzten 10 bis 20 Jahren die vermeintlich wichtigsten gewebeprotektiven Innovationen für den kardiochirurgischen Patienten hervorgebracht. Auf mechanisch technischem Gebiet haben sich die technisch verfeinerten Leukozytenfilter zur Eindämmung der Reperfusionsschäden und der sich für den Patienten daraus ergebenden körperlichen Defizite durch Studien teilweise bewährt. Angefangen vom herkömmlichen arteriellen- Linie Filter bis hin zum relativ spezifischen Leukozytenfilter sind diese Systeme nicht nur in der Lage, die für den Patienten teilweise lebensbedrohlichen morphologisch- funktionellen Organschäden zu reduzieren (103, 104 , 91). LF minimieren auch in geringem Maße die durch erhöhte Liegedauer und ausgedehnten Materialbedarf des Patienten anfallenden Kosten (125) in der postoperativen Therapie, ein Gesichtspunkt, der aufgrund immer teurerer Therapiemethoden und schwindender Gelder im Gesundheitswesen eine wichtige Rolle spielt.

Angefangen mit einer Entwicklung, die ihren Beginn in den 20er Jahren des 20. Jahrhunderts mit der Erfindung eines Baumwoll-Filters hatte, der unspezifisch Zellen einer bestimmten Größe rein mechanisch filtert, wobei hier hohe Drücke im

zirkulierenden System nötig waren, ist man heute bei einer Filtrationstechnik angelangt, die bzgl. Leukozytenfiltration zwar auch noch physikalisch- mechanisch filtert, jedoch mehr oder minder spezifisch Leukozyten und zwar fast ausschließlich aktivierte Neutrophile aus dem fließenden externen Blutkreislauf extrahieren kann. Dies liegt weniger am Vorhandensein der mechanischen Filterbarriere im Sinne eines Filternetzes, als an der Tatsache, dass die biologisch aktivierten Leukozyten in Interaktion mit den speziellen Filteroberflächen treten und auf deren beschriebene Eigenschaften reagieren (128). Da sich im Rahmen der Reperfusionsschäden multiple Immunaktivierungsprozesse abspielen, bei denen die Neutrophilen als zelluläre Bestandteile im Immunsystem zwar die wesentliche Rolle spielen, jedoch vom Zusammenspiel komplizierter Molekülinteraktionen in ihrer Pathogenität unterstützt werden, ist anzunehmen, dass man die Kontrollmöglichkeiten im Rahmen des durch EKZ vermittelten SIRS sicherlich nicht gänzlich ausgeschöpft hat (108). Es sollte nun vielmehr darum gehen, bei der Bekämpfung dieser Prozesse die zum Teil vorteilhaften, allerdings nicht als gänzlich effektiv einzuschätzenden gegenwärtigen Filtrationsmethoden von verschiedenen Seiten aus weiter zu verbessern bzw. neue Methoden zu entwickeln, die einen antiinflammatorischen Effekt bzgl. des „Traumas EKZ“ besitzen und nicht ausschließlich auf der Basis einer reinen mechanischen Filtration von pathogenen Blutbestandteilen arbeiten.

Einschränkung moderner Filtrationstechniken in der Kardiochirurgie:

Es ist sehr wahrscheinlich, dass Leukozyten trotz Hängen bleiben in den synthetischen Filtermaschen weiterhin immunaktive Stoffe sezernieren oder sogar durch das Hängen bleiben selbst noch mehr aktiviert werden (167). In den vergangenen Jahren wurde in diversen Studien belegt, dass der größte Schaden am Gewebe durch massive Neutrophilenaktivierung während der so genannten Reperfusionsphase (127, 25, 32) der herzchirurgischen Eingriffe stattfindet und daher entsprechend als ein günstiger Zeitpunkt für die Entfernung dieser immunkompetenten Zellen aus der EKZ diskutiert wurde (110). Neuesten Studien zufolge scheint es keinen klinischen Unterschied bezogen auf Filtrationszeitpunkte bzw. -dauer im Rahmen der EKZ zu geben (126). Die PMNE und MPO Serumkonzentrationen, die als inflammatorische Marker gelten, sind sogar gegenüber ohne LF operierten Patienten postoperativ eher erhöht, so dass hier keine günstigen Auswirkungen der Leukozytenfiltration zu verzeichnen waren (126). Im

Rahmen einer Studie mit Hochrisikopatienten zeigte sich für die mit LF operierten Patienten sogar ein schlechteres postoperatives Ergebnis verglichen mit dem Kollektiv, das ohne LF operiert wurde (107). Da man auch am Anfang des 21. Jahrhunderts immer noch Lungen- und Hirnödeme, verminderte Nierenleistung, meist vorübergehende kognitive Defizite und andere Organdysfunktion als Ausdruck des „Traumas EKZ“ bei Patienten mit kardiochirurgischen Eingriffen beobachtet, kann man zwar erwähnen, dass die Ausprägung dieser Schäden durch den Einsatz von diversen Filtrationstechniken oder einer Vollheparinisierung im Rahmen der EKZ (129, 130) leicht vermindert wird. Andererseits muss man jedoch feststellen, dass eine koronare Bypassoperation, die meistens eine elektive Operation ist, den Patienten nach wie vor in einen lebensgefährlichen Zustand erst nach der eigentlichen Operation bringen kann.

Die Qualität der inflammatorischen Prozesse wird nicht nur allein durch Interaktionen von Blutzellen mit dem Gefäßendothel bestimmt, sondern in gleicher Intensität von humoralen, sich auf molekularer Ebene abspielenden Prozessen mit beeinflusst (131). So sollte die Forschungsmaxime der nächsten Jahre dahingehend ausgerichtet werden, möglichst alle Komponenten der Immunkaskade zu kontrollieren, da vor allem so die für den Patienten relevanten körperlichen Schäden noch weiter reduziert werden können.

Am Leukozytenfilter bzw. in der EKZ selbst bieten sich eine Reihe von Möglichkeiten, verschiedene Parameter, die sich günstig auf den postoperativen Zustand des Patienten auswirken können, zu verändern und damit das Filtrationsergebnis bzw. den postoperativen Zustand zu verbessern. Leukozyten reagieren unterschiedlich bezüglich ihres Anhaftens an Filteroberflächen, wenn man Oberflächenladung und Oberflächenchemie der Filtermedien verändert. Auch in der Interaktion der Leukozyten (insbes. Neutrophile und Makrophagen) mit dem Gefäßendothel kann man einen Ansatzpunkt sehen, die inflammatorische Antwort des Immunsystems auf den „Stress“ zu modulieren und zu unterbrechen. Ein weiterer wichtiger Angriffspunkt liegt darin, das Zusammenspiel der verschiedenen immunkompetenten Zellen, vermittelt durch die oben angesprochenen Moleküle (Chemokine, Enzyme des oxidativen Stoffwechsels, Elastase, Zytokine, Endothel-Peptide usw.) bzw. die Aktivität dieser Moleküle selbst zu bremsen und zu unterbrechen.

Diese einzeln kurz aufgeführten Möglichkeiten einer Modulation EKZ vermittelter Pathogenität lassen sich wie folgt konkretisieren:

Da für die Gefäßendothelnäherung durch neutrophile Granulozyten der Oberflächenmarker Selectin (ELAM-1) nötig ist („slow rolling“), sie selbiges über die Integrine penetrieren („firm adhesion“) und schließlich durch dieses hindurchwandern („transmigration“) können, kann man nun versuchen über eine Blockade dieser Vorgänge mit Hilfe von Antikörpern gegen diese Rezeptoren die Zell- Zell Kontakte zu verhindern, um eine Penetration des Extravasalraumes und die sich daran anschließende Degranulation der Neutrophilen zu unterdrücken (45).

So ist eine Verbesserung bzw. Ergänzung der bisher eher mechanischen Filtration durch eine bioaktiv- inhibitorisch funktionelle Methode anzustreben, bei der unter Umständen nicht nur an eine Modifikation der heute verwendeten Leukozytenfilter (z.B. Modell LG-6 der Firma Pall GmbH) zu denken ist, sondern ein zweiter, eben bioaktiver Filter zusätzlich in dieses Filtersystem integriert wird, indem dieser zum gängigen, herkömmlichen Leukozytenfiltersystem in Reihe geschaltet wird. Abb. 23 stellt diesen Gedanken schematisch dar.

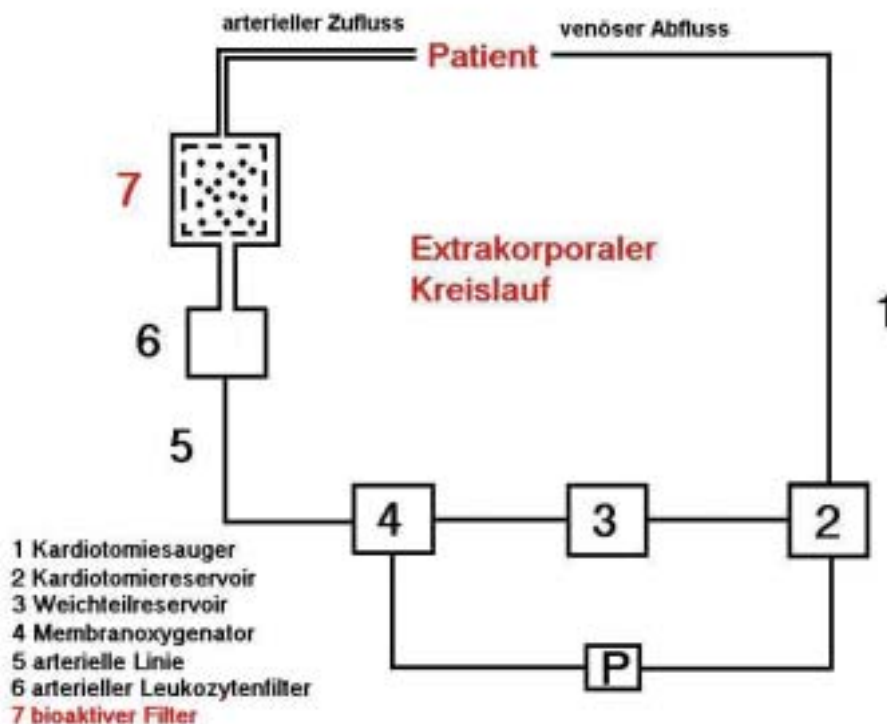


Abbildung 23: Übersicht EKZ mit bioaktivem Filter

Im Blut frei zirkulierende Mediatorstoffe, insbesondere Zytokine und Chemokine wie TNF- α , IL-8 oder IL-1 spielen bei der Expression von Adhäsionsmolekülen (z.B. ICAM-1) auf den Gefäßendothelzellen und Induktion von Chemotaxis eine entscheidende, initiale Rolle. Hier ergibt sich ein weiterer Angriffspunkt, um an eine spezifische, gezielte Inaktivierung dieser Stoffe mit einem für sie spezifischen Antikörper zu denken, wodurch zum einen eine Quantitätsreduktion der einzelnen Moleküle im zirkulierenden Blutvolumen und zum anderen die damit verbundene Reduktion von Leukozytenadhärenz vermittelnden Endothelzellrezeptoren erreicht werden kann. Diese Eigenschaft von Antikörpern könnte in den nächsten Jahren von Bedeutung bei der Verbesserung der Filtrationstechniken in der Herzchirurgie werden. Ein bereits bei schweren Erkrankungsfällen der rheumatoiden Arthritis und chronisch entzündlicher Darmerkrankungen eingesetzter TNF- α Antikörper (Infliximab) konnte hierbei bereits deutliche klinische Erfolge bzgl. der Eindämmung der inflammatorischen Potenz dieser Krankheiten erzielen (132, 133). Der Einsatz dieser Substanz bietet allerdings außer den hohen Therapiekosten weitere klinische Nachteile. Generell ist zu beachten, dass Substanzen, die TNF- α hemmen, damit auch die körpereigene Abwehr gegen Infektionen und Krebszellen schwächen. Ein vermehrtes Auftreten von Infektionen und Krebserkrankungen ist daher nicht ausgeschlossen. Unter der Behandlung mit Infliximab kommt es beispielsweise nicht selten zu Infektionen der oberen Atemwege oder Infektionen durch Herpesviren (134, 135). Außerdem reagieren einige Patienten auf die Therapie mit der Bildung von Auto-Antikörpern (Antikörper gegen körpereigene Antigene). Damit steigt eventuell das Risiko für Autoimmunerkrankungen an. Der Einsatz von Infliximab oder Ethanercept (löslicher TNF- α Rezeptor) wurde im Rahmen der EKZ bislang noch nicht erprobt. Eine Bindung von z.B. diesen Substanzen auf eine Matrix bei extrakorporalem Einsatz könnte die Kosten und Toxizität möglicherweise deutlich reduzieren.

Da dem so genannten oxidative burst, an dem viele verschiedene Ionenverbindungen und oxidativ wirksame Substanzen beteiligt sind, eine Schlüsselrolle als Pathogenitätsfaktor bei herzchirurgischen Eingriffen zukommt, muss hier ebenfalls ein Ansatzpunkt für Pathogenitätsminderung gesucht werden. Die entstehenden Produkte des oxidative bursts sind die ROS (reactive oxygen species). Das bedeutet, dass ein modifiziertes Filtersystem mit einer pharmakologischen Zusatzkomponente ausgestattet werden könnte, die diese Produkte abfängt. Zum einen, um den direkten Schaden, den

diese Stoffe am Gewebe hervorrufen zu vermeiden und zum zweiten durch ein quantitatives Eindämmen dieser Stoffe die Stimulation von Transkriptionsfaktoren, wie NF- κ B, die ihrerseits für eine vermehrte Produktion von proinflammatorisch wirksamen Zytokinen sorgen (136, 137), zu minimieren. Ähnlich wie die ROS, die wie oben schon erwähnt zelltoxische Metabolite darstellen, produzieren Neutrophile diverse Enzyme und schütten diese in den Extrazellulärraum, in den sie „emigriert“ sind, aus und hinterlassen sie darüber hinaus anscheinend auch dort (138). Zu diesen Enzymen gehört z.B. auch Elastase, ein Faserprotein spaltendes Enzym, das in der Lage ist, Zell- Zell Kontakte zu „durchtrennen“ (45, 54). Im Rahmen der EKZ vermittelt Elastase zwar nicht direkt eine erhöhte Endotheldurchlässigkeit, indirekt wird allerdings die Extravasation der Neutrophilen vorangetrieben (45). Proteaseinhibitoren wiederum sind in der Lage, die pathogene Wirkung der erhöhten Leukozytenelastase Konzentrationen abzuschwächen, dadurch dass sie gebunden und inaktiviert wird (139).

Für die Verbesserung steht uns außerdem noch ein uns bekannter und gut erforschter humoraler Immunabwehrmechanismus, das Komplementsystem, zur Verfügung. Das gleiche Prinzip, wie bei den vorangestellten Angriffspunkten einer Filterverbesserung gilt auch hier: Eindämmung des morphologischen, klinischen Schadens durch Neutralisation bzw. Inhibition der jeweiligen immunologischen Reaktionskomponente. Auch hier ist erneut an eine Leukozytenfilterzusatzbeschichtung mit spezifischem Komplementrezeptorantikörper zu denken, was auch in klinischen Studien zu einem messbaren Ergebnis geführt hat, wenn die Rezeptoren von Komplementfaktor C5a mit Antikörper spezifisch blockiert werden (140). Nun stellt sich jedoch die Frage, wie die technische Umsetzung der oben angeführten Verbesserungsvorschläge aussehen könnte. Es gilt zu klären, ob z. B. eine schlichte direkte Beschichtung der Polyesterfilteroberflächen mit den relevanten Antikörpern ausreicht, um damit eine signifikante Reduktion der einzelnen pathogenen, molekularen Strukturen zu erreichen oder ob diese Beschichtung eines komplexeren Trägermechanismus bedarf, der in den Leukozytenfilter integriert wird und so den mechanisch physikalischen Aspekt der bestehenden Techniken mit der oben angeführten bioaktiven funktionellen Komponente komplettiert. Z.B. gibt es die Möglichkeit kleine Kunststoffkügelchen, so genannte Microbeads, mit einem Durchmesser von 50-100 μ m mit Antikörpern zu beschichten und dann in den Leukozytenfilter zu integrieren. Durch Zirkulieren dieser mit Antikörpern beschichteten Microbeads, die ihr jeweiliges (inflammatorische Aktivität förderndes) Antigen abfangen und inaktivieren können, wird eine ständige Reduktion

der pathogenen Substanzen erreicht. Dadurch wird eine deutlich reduzierte Rückgabe dieser Moleküle (z.B. TNF- α oder IL-1) in den Patientenkreislauf bzw. in die Patientengewebe gewährleistet, was in Abschnitt 3 dieser Arbeit bereits in Ansätzen gezeigt werden konnte. Abb. 24 gibt diesen Gedanken schematisch wieder:

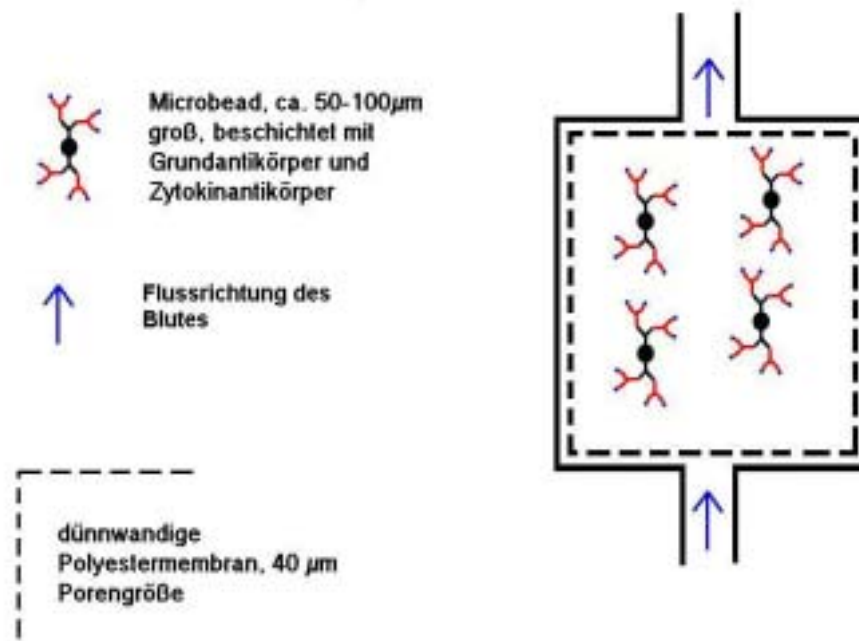


Abbildung 24: bioaktiver Filter/Zytokinfiler Detailansicht

Eine klinisch anscheinend bedeutende Alternative zur Minimierung der Pathomechanismen ist die Möglichkeit zur funktionellen Inhibierung aktivierter neutrophiler Granulozyten auf einem grundlegenden Niveau, nämlich in ihrer Stoffwechsel- und Syntheseaktivität, um es gar nicht erst zur Aktivierung und Produktion schädigender Metabolite kommen zu lassen. Der Vorgang der Apoptose, der unter physiologischen Bedingungen zum programmierten Zelltod führt, spielt hierbei eine wichtige Rolle (141). In Teil 3 dieser Dissertation werden Ergebnisse gezeigt, die belegen, dass eine mit anti-CD95 IgM beschichtete LF Membran in der Lage dazu ist, Apoptose bei Zellen auszulösen, die CD95 Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. So konnte diese Arbeit wichtige *in vitro* Vorversuche für die Entwicklung eines so genannten Leukozyteninhibitionsmoduls (LIM, Leukocare Medizintechnik GmbH, München) liefern. An unter EKZ Bedingungen operierten Schweinen konnte gezeigt werden (142), dass nicht die herkömmlichen Leukozytenfiltersysteme sondern ein so genanntes LIM in der Lage war, Aktivität neutrophiler Granulozyten während

Operationen am offenen Schweineherzen im Tiermodell messbar abzuschwächen. Die Leukozytenfunktion konnte sogar unter Blutflussbedingungen moduliert werden. Die theoretische Grundlage für die Entwicklung des LIM war die *in vitro* nachgewiesene Tatsache, dass Neutrophile, die an CMV infizierten Epithelzellen adhären innerhalb von Minuten Ihre Zell- Zell Kontakte verlieren und nicht mehr in der Lage dazu sind, die Epithelbarriere im Sinne von Transmigration zu überwinden (143). Dieses unerwartete Phänomen ist allerdings als unabhängig von der Fas/FasL getriggerten Apoptose anzusehen, die eine wichtige physiologische Rolle bzgl. der Regulation von angeborenen/eigenen Immunantworten spielt (144). FasL gehört zur Tumornekrosefaktor Familie und ist der Ligand von Fas (CD95), welcher auf aktivierten Leukozyten und anderen Gewebezellen exprimiert wird und zwar häufig bei solchen, die Einfluss auf das Immunsystem ausüben bzw. Teil dessen sind (145). Die Interaktion zwischen FasL und Fas aktiviert u. a. das Apoptosesignal in Zellen und führt dadurch zum programmierten Zelltod. Dys- bzw. fehlregulierte Fas/FasL abhängige Mechanismen sind involviert bei diversen Autoimmunerkrankungen, wie z.B. der Hashimoto Thyreoiditis (146), Hepatitis (147) oder Myasthenia gravis (148). Lösliches Fas wurde bereits zu therapeutischen Zwecken bei Mäusen angewandt, um bei ihnen Hepatitis zu verhindern (147) und außerdem bei der Behandlung des systemischen Lupus erythematoses (SLE) eingesetzt (149). Darüber hinaus wurden bereits monoklonale anti CD95 IgM Antikörper benutzt, um bei Tumorzellen (150) und HIV infizierten Zellen (151) Apoptose zu in Gang zu setzen. Unglücklicherweise gibt es allerdings auch andererseits Patienten, bei denen die lokale Apoptoseinduktion oder Administration von CD95 Antikörpern, z.B. in Lungengewebe zu ernsten entzündlichen oder fibrotischen Veränderungen führte (152, 153). Im Gegensatz hierzu handelt es sich bei den Effekten, die sich in der obigen tierexperimentellen Arbeit zeigten, um anti CD95 induzierte Effekte, die auf ein extrakorporales Filtersystem beschränkt waren. Experimente mit radioaktiv markierten Antikörpern konnten belegen, dass die Bindung zur LIM Oberfläche sogar unter adäquaten Blutflussbedingungen stabil ist. Folglich erlaubt LIM die Inaktivierung der im Fluss befindlichen Neutrophilen nach kurzem, vorübergehendem Kontakt mit der Fas stimulierenden Polyester- Fibreroberfläche ohne andere Gewebe durch Apoptose induzierte Entzündung zu beeinflussen bzw. zu schädigen. Die Inaktivierung wird innerhalb von Minuten beobachtet und inaktivierte Neutrophile werden von Makrophagen erkannt und phagozytiert (154). Experimentell ist Apoptose nach Fas/FasL Interaktion normalerweise frühestens nach vier Stunden

nachweisbar (143). Die funktionelle Inhibierung der Neutrophilen, die im Rahmen verschiedener *in vivo* Studien beobachtet wurde, ist also höchstwahrscheinlich nicht über den oben genannten Apoptoseweg zu erklären. Bei oben genannter LIM Studie wurden in vier Gruppen eingeteilte Schweine einer Herzoperation unterzogen: Gruppe I ohne EKZ, Gruppe II mit EKZ ohne LF und ohne LIM, Gruppe III mit EKZ und LF und Gruppe IV mit EKZ und LIM. Ex vivo wurden die prozentualen Anteile der Neutrophilen, die spontaner Apoptose unterliegen innerhalb der Gruppen 4 Stunden nach Isolation der Neutrophilen verglichen. Diese Experimente zeigten, dass die chirurgische Manipulation (Gruppen I-III) den prozentualen Anteil der spontan apoptotischen Neutrophilen im Vergleich zu den Neutrophilen, die vor dem Eingriff isoliert wurden, reduzierte. Bei zwei von fünf Tieren konnte LIM den Abfall der apoptotischen Zellanzahl minimieren, so dass man annehmen kann, dass LIM frühe Apoptose über CD95 generiert. Es ist bekannt, dass gestörte und/oder späte Apoptose mit diversen proinflammatorischen Erkrankungen, wie dem Kawasaki Syndrom (155) oder SIRS (156) vergesellschaftet ist. Bei herzchirurgischen Eingriffen ist die späte Apoptose von neutrophilen Granulozyten dementsprechend mit inflammatorisch bedingten Gewebedysfunktionen verbunden (157) und folglich könnte die Stimulation vom CD95 Rezeptor die geeignete Intervention zur Minimierung dieser Gewebedysfunktionen sein. Allerdings zeigen vorausgehende, mit Annexin V/PI gewonnene Daten im Vollblut sofort nach Sammlung gegenwärtig keinen Hinweis, dass für LIM getriggerte, schnelle Apoptoseinduktion nachweisbar ist. Deswegen lässt sich aus diesen im Tierversuch gewonnenen Daten vermuten, dass die beobachtete Fas verwandte Inhibierung der neutrophilen Aktivität der Apoptose vorangeht, ein Phänomen, das kürzlich beschrieben wurde (143). Weiterführende Studien müssen jetzt im Detail quantitativ klären, wie sich die Passage der neutrophilen Granulozyten durch das LIM auf sie auswirkt. Zusätzlich sind weiterführende Untersuchungen bzgl. der molekularen Mechanismen und Kaskaden von Nöten. Man vermutet, dass auf Fas Signalen beruhende, phenotypische Zellveränderungen (158) unter Umständen zu einer schnellen Abräumung und Beseitigung von inaktiven und frühapoptotischen Zellen führen können (154). Dies würde die Reduktion der Leukozytenzahlen im LIM verglichen mit den herkömmlichen Leukozytenfiltern erklären, da in den Filtermaschen des Leukozytenfilters gefangene Leukozyten gefunden wurden, weitaus weniger jedoch im LIM. Der zeitliche Anstieg der weißen Blutzellen bzw. Neutrophilen (Leukozytose) in den Gruppen I und II aber auch in der Leukozytenfiltergruppe lässt sich durch die

Erkenntnis erklären, dass intraoperativ Vorläufer der Neutrophilen (sog. Linksverschiebung) aus dem Knochenmark ausgeschwemmt werden (159). Die Leukozytenfilter reduzieren die Leukozytenanzahl lediglich zwischenzeitlich während der frühen Phase der extrakorporalen Zirkulation, was sich mit Ergebnissen aus klinischen Studien deckt (110). In der LIM Gruppe war allerdings eine deutlich reduzierte Lymphozytenpopulation verglichen mit der LF Gruppe nachweisbar, was sich ebenfalls durch die anti CD95 vermittelte Inaktivierung erklären lässt (143).

Es gibt Erkenntnisse darüber, dass chirurgische Traumata und der Einsatz der extrakorporalen Zirkulation die Leukozytenanzahl und -funktion verändert, was wahrscheinlich zur mit EKZ in Verbindung stehenden Immunsuppression und erhöhtem Auftreten von postoperativen Infektionskomplikationen führt (160). Die gewonnenen Daten belegen, dass LIM die Lymphozytenpopulation bezüglich der Lymphozytenanzahl am Ende des chirurgischen Eingriffs stabilisiert. Zudem wurde herausgefunden, dass mitogen induzierte Lymphozytenproliferation zu jedem Zeitpunkt in beiden Gruppen vorkommt, was dafür spricht, dass LIM die funktionelle Aktivität der Lymphozyten nicht beeinträchtigt. Im Gegensatz dazu limitiert LIM die Plasmakonzentrationen des proinflammatorischen Zytokins TNF- α signifikant, das bekannter Weise zur Entwicklung des SIRS (161) und Dysfunktion bei Epithelbarrieren (162) beiträgt. Daher kann LIM ein wichtiges Mittel zur Verhinderung von TNF- α induzierter Pathogenese ohne pharmakologische Intervention (163) werden und Anwendung in der Herzchirurgie aber auch anderen klinischen Bereichen wie Transplantation, Trauma oder Sepsis finden (161). Vorhergehende Resultate in einem ähnlichen experimentellen Rahmen zeigten außerdem, dass zusätzlich zur Reduktion der TNF- α Konzentrationen im Plasma ebenfalls eine Verringerung des Anstieges der Zytokine IL-6 und IL-8 unter LIM Bedingungen zu verzeichnen war. Dazu kommt, dass die Undichtigkeit des Gefäßendothels und der extrazellulären Matrix durch Adhäsion der Neutrophilen und transendothelialen Transmigration verursacht wird (17, 164, 165). In Transwell Kammer Assays konnte ein signifikanter, EKZ vermittelter Anstieg der hauptsächlich IL 8 verursachten neutrophilen Transmigrationsaktivität im Zeitablauf beobachtet werden (142). Überraschenderweise verloren die Neutrophilen aus der LIM Gruppe ihre Fähigkeit, in diesem Modell zu transmigrieren. In Verbindung mit der Tatsache, dass im Inneren des LIM so gut wie keine adhärenenten Neutrophilen zu finden waren, bestätigt diese Erkenntnis zuletzt publizierte *in vitro* Daten, die die Inaktivierung

der Neutrophilen nach kurzem Kontakt mit FasL exprimierenden Epithelzellen zeigten (143). Die zugrunde liegenden biochemischen Signaltransduktionswege, die Fas nachgeschaltet sind und zum schnellen funktionellen Verlust der Zellen führen, sind bis jetzt nicht geklärt. Insgesamt wurden Hinweise dafür gefunden, dass LIM vor EKZ assoziierter Pathogenese und Gewebeschädigung schützt, weil die CK und CK-MB Werte, verglichen mit EKZ allein, deutlich reduziert waren. Obwohl auch ähnliche Ergebnisse in der LF Gruppe beobachtet wurden, fand man in einer früheren klinischen Studie mit Hochrisikopatienten unter Einsatz von LF deutlich erhöhte CK und CK-MB Werte in Verbindung mit signifikant erhöhten PMN Elastase Mengen (105). Leider ist es gegenwärtig nicht möglich, standardisiert Schweine PMN Elastase zu messen, da hierfür kein kommerzieller PMNE ELISA Test erhältlich ist. Die Gründe für die eher negativen Effekte, die in dieser Studie für die Leukozytenfilter beobachtet wurden sind unklar, lassen sich aber unter Umständen mit folgender Theorie erklären: Neutrophile, die von den Filtermaschen gefangen werden, sind noch immer immunaktiv und produzieren weiterhin proinflammatorische Zytokine, die im weiteren Verlauf unerwünschte bekannte Effekte hervorrufen. Die Erkenntnis, dass herkömmliche Leukozytenfilter trotz der Tatsache, dass die Gesamtleukozytenanzahl durch sie nicht, CK und CK-MB Mengen allerdings doch reduziert werden, rührt andererseits daher, dass eine nicht unerhebliche Menge aktivierter Neutrophiler durch die Filtermaschen aufgehalten werden, die das Endothel nicht penetrieren und dadurch keine pathogenen Effekte wie Transmigration und Gewebedefekte hervorrufen können. Überraschend ist, dass LIM diese Effekte ebenfalls zu verhindern vermag, jedoch ohne Leukozyten in den Filtermaschen zu fangen, was das CD95 basierte Wirkprinzip des LIM unterstreicht. Laufende Studien in gleichen Experimentkonstellationen legen nahe, dass LIM außerdem noch positive Auswirkungen auf die postoperative Herzfunktion auszuüben vermag (166). Es konnte allerdings nicht gezeigt werden, ob LIM positive Effekte auf die Nieren- oder Lungenfunktion hat, weil in diesem Modell die EKZ vermittelte Verminderung der postoperativen Organfunktion nicht gemessen werden konnte. Die Funktion der Leber wurde allerdings nicht beeinträchtigt. Auf zerebralem Niveau konnte LIM die EKZ vermittelte Erhöhung der Durchlässigkeit der Blut- Hirnschranke des Schweins nicht vermindern, was durch die Injektion von Evans Blue Lösung postoperativ histologisch sowie photometrisch nachgewiesen werden konnte. Die Relevanz dieses Ergebnisses ist allerdings unklar, weil durch anschließend durchgeführte MRT Messungen kein Hirnödeme nachweisbar war.

Schlussendlich präsentiert sich LIM, bezogen auf das zitierte Schweinemodell, als eine effektive Methode, mit der sich funktionelle Leukozytenaktivität inhibieren und dadurch die pathogenetische Folge der mit EKZ durchgeführten kardiochirurgischen Eingriffe limitieren lässt (166). LIM erlaubt die Inaktivierung der Neutrophilen durch CD95 Rezeptor Stimulation ohne andere Organsysteme durch Apoptose vermittelte Entzündungsreaktionen zu beeinträchtigen. Nun müssen weitere Studien durchgeführt werden, um den postoperativen Profit und die Effektivität des LIM in klinischen Studien zu evaluieren.

Diese Arbeit leistet die Vorarbeit für ein neues, bioaktives Modell, dass eine Überarbeitung der bisher entwickelten Filter bzw. Filtrationstechniken mittels einer Kombination aus den oben genannten Blockierungsmechanismen auf immunologischer Ebene, Inhibierung von intrazellulären Signaltransduktionswegen sowie anderer Mechanismen, die Leukozytenaktivität und -pathogenität auf Signalkaskadenebene inhibieren bzw. die bestehenden Methoden optimieren und dadurch den gewünschte Erfolg erbringen. Dies hätte einen erheblichen klinischen Vorteil für den kardiochirurgischen Patienten zur Folge, so dass sich die bisher bestehenden Grenzen in diesem Bereich sich weiter zu Gunsten des herzchirurgischen Patientenklintels verschieben könnten. Aber nicht allein die Filtration gilt es zu verbessern, auch adjuvante pharmakologische Interventionen können in den nächsten Jahren unter Umständen eine klinische Zustandsbesserung des Patienten herbeiführen.

5 Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Operative Eingriffe am offenen Herzen wie die häufig durchgeführten Bypass- und Herzklappenersatzoperationen bedürfen fast immer der Unterstützung durch die Herz Lungenmaschine bzw. extrakorporale Zirkulation. Durch den Kontakt des Blutes mit nichtorganischen Fremdoberflächen der EKZ kommt es zur Induktion einer transienten Hyperaktivität neutrophiler Granulozyten. Nachdem Herz und Lunge nach Öffnung der Aortenklemme ihre physiologische Funktion wieder aufnehmen und reperfundiert werden, werden aus diesen ischämischen Organen darüber hinaus pathogene Moleküle wie freie Sauerstoffradikale freigesetzt. Von aktivierten Neutrophilen freigesetzte, immunkompetente Moleküle (z.B. Zytokine) führen zusammen mit diesem oxidativen Stress zu Organdysfunktionen durch Ödembildung in Körpergeweben wie Myokard, Lunge, Gehirn und Gastrointestinaltrakt und dadurch zu typischen Folgeerscheinungen wie z.B. verlängerter postoperativer Beatmungszeit oder (meist transienten) neuropsychologischen Dysfunktionen im Sinne von kognitiven Defiziten. Andere Pathomechanismen wie Mikroembolien durch z.B. Kleinstteilchen und Gasbildungen aus dem OP Gebiet verstärken diese pathogenen Effekte. Resultat ist eine verlängerte Regenerationsdauer und ein verlängerter Krankenhausaufenthalt der operierten Patienten.

Zur Minimierung dieser unerwünschten Wirkungen der EKZ wurden in den letzten 20 Jahren diverse Techniken zur Filtration der unterschiedlichen Kreislaufbestandteile innerhalb der EKZ entwickelt. Von besonderem Interesse ist die seit ca. 8 bis 10 Jahren etablierte Filtration aktivierter neutrophiler Granulozyten, die die Hauptverantwortung für das aseptische Entzündungsgeschehen unter Anwendung der EKZ tragen. Entwicklung und Einsatz dieser leukozytenspezifischen Filtersysteme führt zwar zu einer deutlichen Reduktion der zirkulierenden immunaktiven Zellen und zu einer geringgradigen Verringerung der pathogenen EKZ Folgeerscheinungen, die Effektivität der gegenwärtigen Leukozytenfiltration stellt sich allerdings nur in einzelnen Berichten als positiv dar. Die Daten, die einen deutlichen klinischen Vorteil der Leukozytenfiltration zeigen, sind nicht vorhanden. Die unterstützende Anwendung antiinflammatorischer, systemisch angewandter Pharmaka führte zwar bei den meisten

Präparaten zu Erfolg versprechenden Ergebnissen im Tierversuch, konnte aber beim operierten Patienten selbst zu keiner deutlichen Verminderung der unerwünschten EKZ Wirkungen beitragen.

Unter der Vorstellung, dass gefilterte, aktivierte Leukozyten zum Großteil zwar nicht in den Patientenkreislauf zurückgepumpt werden, jedoch immer noch immunaktive Stoffe von ihnen synthetisiert und sezerniert werden können, liegt es auf der Hand, dass die aktuell zum klinischen Einsatz kommenden Filtersysteme zum Zwecke der Filtrationsoptimierung und konsekutiver Pathogenitätsminimierung durchaus verbesserungsbedürftig sind.

Die in Abschnitt 3 angeführten Ergebnisse belegen, dass antikörperbeschichtete Leukozytenfiltermembranen durchaus in der Lage sind, in einem Kreislaufmodell ihre entsprechenden Antigene herauszufiltern und damit zu inaktivieren. Als klinische Anwendung ist dieses Modell allerdings nur unter einem immensen Technik- sowie Kostenaufwand umsetzbar, so dass sich die Frage nach alternativen Lösungsstrategien stellt.

Diese Arbeit leistete die theoretische Grundlage zur Entwicklung eines in naher Zukunft möglicherweise klinisch praktikablen Moduls zur Leukozyteninaktivierung. Da anti CD95 IgM in der Lage sind, Apoptose in CD95 Rezeptor tragenden Zellen zu induzieren und diese damit bzgl. ihrer Stoffwechselaktivität zu limitieren bzw. zu inaktivieren, konnte ein ebenfalls in Abschnitt 3 vorgestelltes Modell zeigen, dass in CD 95 Rezeptor tragenden Zellen über ihren Kontakt mit anti CD95 IgM beschichteten Leukozytenfiltermembranen Apoptose induziert werden kann. Ein detailverbessertes, anti CD95 IgM beschichtetes Leukozytenfiltersystem (Leukozyteninhibitionsmodul, „LIM“) zeigte bereits im Schweineversuch eine deutliche Verbesserung der postoperativen Herzfunktion gegenüber der Tiergruppe, die mit herkömmlichem Leukozytenfiltersystem operiert wurde. Außerdem konnte eine deutlich reduzierte Transmigrationsfähigkeit (als Maß des Aktivierungszustandes) der aus dieser EKZ isolierten Neutrophilen nachgewiesen werden, so dass Grund zur Annahme besteht, dass dieses Modell in Zukunft den herkömmlichen Leukozytenfilter ablösen könnte. Mit dieser Arbeit wurde eine Möglichkeit aufgezeigt, wie die Problematik der EKZ induzierten Immunpathogenese grundlegender bekämpft werden kann.

6 Literaturverzeichnis

1

Ando H.; Matsui K.; Kohno H. et al
Effects of open heart surgery on renal function
Nippon Kyobu Geka Gakkai Zasshi 1989; 37 (7): 1311-1316

2

Harris, DNF, Bailey, SM, Smith, PLC, Tayler, KM, Oatridge, A, Bydder, GM
Brain swelling in first hour after coronary artery bypass surgery
Lancet 1993; 342: 586-587

3

Harris DN, Oatridge A, Dob D, Smith PL, Taylor KM, Bydder GM.
Cerebral swelling after normothermic cardiopulmonary bypass
Anesthesiology 1998 Feb; 88(2):340-5.

4

Morita K, Ihnken K, Buckberg GD, Ignarro LJ.
Oxidative insult associated with hyperoxic cardiopulmonary bypass in the
infantile heart and lung
Jpn Circ J. 1996 Jun; 60(6):355-63.

5

Kaza AK, Cope JT, Fiser SM, Long SM, Kern JA, Kron IL, Tribble CG
Elimination of fat microemboli during cardiopulmonary bypass
Ann Thorac Surg. 2003 Feb; 75(2):555-9; discussion 559

6

Chenoweth, D.E., Cooper, S.W., Hugli, T.E., Stewart, R.W., Blackstone, E.H., Kirklin,
J.K.
Complement Activation During Cardiopulmonary Bypass; Evidence for Generation of
C3a and C5a Anaphylatoxins
N. Engl. J. Med. 1981; 304: 497-503

7

Kirklin, J.K., Westaby, S., Blackstone, E.H., Kirklin, J.W., Chenoweth, D.E., Pacifico,
A.D.
Complement and the Damaging Effects of Cardiopulmonary Bypass
J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 1983; 86: 845-857

8

Semb AG, Vaage J, Mjos OD.
Oxygen free radical producing leukocytes cause functional depression of isolated rat
hearts: role of leukotrienes.
J Mol Cell Cardiol. 1990 May; 22(5):555-63.

9

Weiss, S.J.

Tissue Destruction by Neutrophils

N. Engl. J. Med. 1989; 320: 365-376

10

Inauen, W., Granger, D.N., Meininger, C.J., Schelling, M.E., Granger, H.J., Kviety, P.R.

An in Vitro Model of Ischemia/ Reperfusion-Induced Microvascular Injury

Am. J. Physiol. 1990; 259: G134-G139

11

Rommelsheim, K., Schlebusch, H., Orellano, L., Schwidetzky, F., Klehr, U.

PMN-Elastase unter extrakorporalen Zirkulationsverfahren

Anästh. Intensivther. Notfallmed. 1987; 22: 3-7

12

Herausgeber: Bayerisches Staatsministerium für Arbeit und Sozialordnung, Familie, Frauen und Gesundheit, Winzererstraße 9, 80797 München

Stationäre Versorgung im Freistaat Bayern ; Versorgung herzkranker Patienten

<http://www.stmas.bayern.de/krankenhaus/versorg/herzchirurgie/herzranke.pdf>

13

Tschaut, R

Extrakorporale Zirkulation in Theorie und Praxis

Pabst Science Publishers, Lengerich 1999

14

Roche Lexikon Medizin, 5.Auflage

© Urban & Fischer Verlag 2003

<http://www.gesundheit.de/roche/index.html?c=http://www.gesundheit.de/roche/ro15000/r15843.html>

15

de Vroeghe R, van Oeveren W, van Klarenbosch J, Stooker W, Huybregts MA, Hack CE,

van Barneveld L, Eijssman L, Wildevuur CR

The impact of heparin-coated cardiopulmonary bypass circuits on pulmonary function and the release of inflammatory mediators.

Anesth Analg. 2004 Jun; 98(6):1586-94, table of contents.

16

Butler J, Rucker GM, Westaby S.

Inflammatory response to cardiopulmonary bypass

Ann Thor Surg 1993; 55:552-559

17

Vaage J.

Microvascular injury induced by intravascular platelet aggregation. An experimental study

Scand J Thorac Cardiovasc Surg. 1994; 28(3-4):127-33.

18

Valen G, Eriksson E, Risberg B, Vaage J.
Fibrinolysis during cardiac surgery. Release of tissue plasminogen activator in arterial and coronary sinus blood.
Eur J Cardiothorac Surg. 1994;8(6):324-30.

19

Ilton, M.K., Langton, P.E., Taylor, M.L., Misso, N.L.A., Newman, M., Thompson, Ph.J., Hung, J.
Differential Expression of Neutrophil Adhesion Molecules during Coronary Artery Surgery with Cardiopulmonary Bypass
J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 1999; 118: 930-937

20

Gando, S., Nanzaki, S., Morimoto, Y., Kobayashi, S., Kemmotsu, O.
Out-of-Hospital Cardiac Arrest Increases Soluble Vascular Endothelial Adhesion Molecules and Neutrophil Elastase Associated with Endothelial Injury
Intensive Care Med. 2000; 26 (1): 38-44

21

Killackey, J.J.F., Killackey, B.A.
Neutrophil-Mediated Increased Permeability of Microcarrier-Cultured Endothelial Monolayers: A Model for the in Vitro Study of Neutrophil-Dependent Mediators of Vasopermeability
Can. J. Physiol. Pharmacol. 1990; 68: 836-844

22

Stocker CF, Shekerdemian LS, Visvanathan K, Skinner N, Brizard CP, Carlin JB, Horton SB, Penny DJ.
Cardiopulmonary bypass elicits a prominent innate immune response in children with congenital heart disease.
Thorac Cardiovasc Surg. 2004 May; 127(5):1523-5.

23

Ashraf SS, Tian Y, Zacharrias S, Cowan D, Martin P, Watterson K.
Effects of cardiopulmonary bypass on neonatal and paediatric inflammatory profiles.
Eur J Cardiothorac Surg. 1997 Dec;12(6):862-8.

24

Krishnadasan B.; Griscavage-Ennis J.;Aldea G.S.; Verrier E.D.
Reperfusion injury during cardiopulmonary bypass
Leucocyte depletion in cardiac surgery and cardiology 2002, Karger

25

Granger, D.
Role of Xanthineoxidase and Granulocytes in Ischämia-Reperfusion Injury
Am. J. Physiol. 1988; 255: H1269-H1275

26

Petrone WF, English DK, Wong K, McCord JM.
Free radicals and inflammation: superoxide-dependent activation of a neutrophil chemotactic factor in plasma.
Proc Natl Acad Sci U S A 1980 Feb; 77(2):1159-63

27

McCord, J.M.
Oxygen Derived Free Radicals in Postischemic Tissue Injury
N. Engl. J. Med. 1985; 312: 159-163

28

Crapo, J.D., Barry, B.E., Foscue, H.A., Shelburne, J.
Structural and Biochemical Changes in Rat Lungs Occurring During Exposures to Lethal and Adaptive Doses of Oxygen
Am. Rev. Respir. Dis. 1980; 122: 123-143

29

Fantone, J.C., Ward, P.A.
Oxygen-Derived Radicals and Their Metabolites: Relationship to Tissue Injury
In: Current Concepts. Kalamazoo, MI: Upjohn, 1985

30

Repine, J.E.
Neutrophils, Oxygen Radicals and the Adult Respiratory Distress Syndrome
In: The Pulmonary Circulation and Acute Lung Injury, Said, S.I.(Hrsg.) Mount Kisco, NY: Futura, 1985, S. 249-281

31

Hashimoto, Y., Itok, K., Nishida, K., Okano, T., Miyazawa, Y., Okinaga, K.
Rapid Superoxide Production by Endothelial Cells and Their Injury upon Reperfusion
J. Surg. Research 1994; 57: 693-697

32

Grace, P.A.
Ischaemia-Reperfusion Injury
Brit. J. Surg. 1994; 81: 673-647

33

Kraemer, R., Mullane, K.M.
Neutrophils Delay Functional Recovery of the Post-Hypoxic Heart of the Rabbit
J. Pharmacology & Experimental Therapeutics 1989; 251: 620-626

34

Downey, G.P., Worthen, G.S.
Neutrophil Retention in Model Capillaries: Deformability, Geometry and Hydrodynamic Forces
J. Appl. Physiol. 1988; 65: 1861-1871

35

Romson, J.L., Hook, B.G., Kunkel, S.L., Abrams, G.D., Schork, M.A., Lucchesi, B.R.
Reduction of the Extent of Ischemic Myocardial Injury by Neutrophil Depletion in the
Dog
Circulation 1983; 67: 1016-1023

36

Fountain, S.W., Martin, B.A., Muselow, C.E., Cooper, J.D.
Pulmonary Leukostasis and its Relationship to Pulmonary Dysfunction in Sheep and
Rabbits
Circ. Res. 1980; 46: 175-180

37

Welsh, C.H., Lien, D., Worthen, G.S., Weil, J.V.
Pentoxifylline Decreases Endotoxin-Induced Pulmonary Neutrophil Sequestration and
Extravascular Protein Accumulation in the Dog
Am. Rev. Respir. Dis. 1988; 138: 1105-1114

38

Hernandez, L.A., Grisham, M.B., Twohig, B., Arfors, K.E., Harlan, J.M., Granger, D.N.
Role of Neutrophils in Ischemia-Reperfusion-Induced Microvascular Injury
Am. J. Physiol. 1987; 253: H699-H703

39

Korthuis, R.J., Grisham, M.B., Granger, D.N.
Leukocyte Depletion Attenuates Vascular Injury in Postischemic Skeletal Muscle
Am. J. Physiol. 1988; 254: H823-H827

40

Macgregor, R.R.
Granulocyte adherence
The Cell Biology of Inflammation, Weissman, G. (Hrsg.), New York: Elsevier/ North-
Holland, 1989, S. 267-298

41

Granger, D.N., Benoit, J.N., Suzuki, M., Grisham, M.B.
Leukocyte Adherence to Venular Endothelium during Ischemia-Reperfusion
Am. J. Physiol. 1989; 257: 683-688

42

Vogel, M.
Der Einsatz leukozytendepletierender Filter in der Herz-Thorax-Chirurgie
Sonderdruck aus Kardiotechnik Heft 3/1994

43.

Hammerschmidt DE, Stroncek DF, Bowers TK, Lammi-Keefe CJ, Kurth DM, Ozalins
A, Nicoloff DM, Lillehei RC, Craddock PR, Jacob HS
Complement activation and neutropenia occurring during cardiopulmonary bypass J
Thorac Cardiovasc Surg. 1981 Mar; 81(3):370-7.

44

Allen, S

The role of leucocyte in the systemic inflammatory response and the potential impact of leucocyte depletion

Cardiovascular engineering 1997; Volume 2, No 1: 34-54

45

Scholz M., Wimmer Greinecker G., Simon A. et al

Perioperative elastase activity in cardiac surgery and its role in endothelial leakage

Inflammation Res. 52 (2003) 433-438

46

Weiss SJ, Regiani S.

Neutrophils degrade subendothelial matrices in the presence of

alpha-1-proteinase inhibitor. Cooperative use of lysosomal proteinases and oxygen metabolites

J Clin Invest. 1984 May; 73(5):1297-303

47

Tang M, Gu YJ, Wang WJ, Xu YP, Chen CZ.

Effect of cardiopulmonary bypass on leukocyte activation: changes in membrane-bound elastase on neutrophils.

Perfusion. 2004 Mar;19(2):93-9.

48

Boeken U, Feindt P, Schulte HD, Gams E.

Elastase release following myocardial ischemia during extracorporeal circulation (ECC) marker of ongoing systemic inflammation ?

Thorac Cardiovasc Surg 2002 Jun; 50(3):136-40.

49

Hale, S.L., Kloner, R.A.

Role of Leukocytes in Reperfusion Injury

In: Piper, H.M., Preusse, C.J. (Hrsg.). Ischemia-reperfusion in cardiac surgery

Develops in Cardiovasc. Med. 1993; 142: 67-80

50

Marlin, S.D., Springer, T.A.

Purified Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) is a Ligand for Lymphocyte Function – Associated Antigen

Cell 1987; 51: 813-819

51

Staunton, D.E., Marlin, S.D., Stratowa, C., Dustin, M.L., Springer, T.A.

Primary Structure of ICAM-1 Demonstrates Interaction between Members of the Immunoglobulin and Integrin Supergene Families

Cell 1988; 52: 925-933

52

Asimakopoulos, G., Kohn, A., Stefanou, D.C., Haskard, D.O., Landis, R.C., Taylor, K.M.

Leukocyte Integrin Expression in Patients Undergoing Cardiopulmonary Bypass
Ann. Thorac. Surg. 2000; 69 (4): 1192-1197

53

Moser, R., Schleiffenbaum, B., Groscurth, P., Fehr, J.

Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor Stimulate Human Vascular Endothelial Cells to Promote Transendothelial Neutrophil Passage
J. Clin. Invest. 1989; 83: 444-455

54

Ginzberg H.H.; Cherapanov V.; Dong Q. et al.

Neutrophil- mediated epithelial injury during transmigration: role of elastase
Am J Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 2001; 281 (3): G705-717

55

Adams, D.H., Shaw, S.

Leucocyte – Endothelial Interactions and Regulation of Leucocyte Migration
Lancet 1994; 343: 831-836

56

Jansen, N.J.G.

Blood Activation by Cardiopulmonary Bypass and Endotoxin
PhD Thesis 1991, University Hospital, Groningen, The Netherlands'

57

Gu, Z.J.

Inhibition of the Inflammatory Response Initiated During Cardiopulmonary Bypass
PhD Thesis 1992, University Hospital, Groningen, The Netherlands

58

Courtney, J.M., Sundaram, S., Matata, B.M., Gaylor, J.D.S.

Biomaterials in Cardiopulmonary Bypass
Perfusion 1994; 9: 3-10

59

Baumgartner, H.R., Muggli, R., Tschopp, T.B., Turitto, V.T.

Platelet Adhesion, Release and Aggregation in Flowing Blood: Effects of Surface Properties and Platelet Funktion
Throm. Haemost 1976; 35: 124-138

60

Brash, J.L.

Role of Plasma Protein Adsorption in the Response of Blood to Foreign Surface
In: Sharma, C.P., Szycher, M (Hrsg.) 1991, Blood compatible Materials and Devices, Lancaster PA: Technomic 3-24

61

Oeverev, W.V., Wildevuur, C.R.H.
Biocompatibility of Extracorporeal Circuits in Heart Surgery
Transf. Sssci. 1990; 11: 5-33

62

Pekna, M., Borowiec, J., Fagerhol, M.K., Venge, P., Thelin, S.
Biocompatibility of Heparin-Coated Circuits Used in Cardiopulmonary Bypass
Scand. J. Thor. Cardiovasc. Surg. 1994; 28: 5-11

63

Coleman, S.M., Demastrie, L.
Leukocyte Depletion Reduces Postoperative Oxygen Requirements
Ann. Thor. Surg. 1994; 58: 1567-1568

64

Lohrer, R.M., Trammer, A.R., Dietrich, W., Hagl, S. Linderkamp, O.
The Influence of Extracorporeal Circulation and Hemoseparation on Red Cell
Deformability and Membrane Proteins in coronary Artery Disease
J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 1990; 99: 735-740

65

de Palma, L., Yu, M., McIntosh, C.L., Swain, J.A., Davey, R.J.
Changes in Lymphocyte Subpopulations as a Result of Cardiopulmonary Bypass: the
Effect of Blood Transfusion
J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 1991; 101: 240-244

66

Greiling, GG., Gressner, A.M.
Lehrbuch der klinischen Chemie und Pathobiochemie, 3. Auflage
Schattauer 1995, Stuttgart, New York

67

Babior, B.M.
The Respiratory Burst of Phagocytes
J. Clin. Invest. 1984; 73: 599-601

68

Royston, D., Fleming, J.S., Dddesai, J.B., Westaby, S., Tayler, K.M.
Increased Production of Peroxidation Products Associated with Cardiac Operations:
Evidence for Free Radical Generation
J. Thor. Cardiovasc. Surg. 1986; 91: 759-766

69

Howard, R.J., Crain, C., Franzini, D.A., Hood, C.I., Hugli, T.E.
Effects of Cardiopulmonary Bypass on Pulmonary Leukostasis and Complement
Activation
Arch. Surg. 1988; 123: 1496-1501

70

Forman, M.B., Virmani, R., Puett, D.W.
Mechanisms and Therapy of Myocardial Reperfusion Injury
Circulation 1990; 81: 69-78

71

Semb, A.G., Vaage, J., Mjos, O.D.
Oxygen Free Radical Producing Leukocytes Cause Functional Depression of Isolated Rat Hearts: Role of Leukotrienes
J. Mol. Cell Cardiol. 1990; 22: 555-563

72

Dahlen, S.E., Bjork, J., Hedqvist, P., Arfors, K.E., Hammarstrom, S., Lindgren, J.A., Samuelsson, B.
Leukotrienes Promote Plasma Leakage and Leukocyte Adhesion in Postcapillary Venules: in Vivo Effects with Relevance to the Acute Inflammatory Response
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1981; 78: 3887-3891

73

Gimbrone Jr., M.A., Brock, A.F., Schafer, A.I.
Leukotriene B₄ Stimulates Polymorphonuclear Leukocyte Adhesion to Cultured Vascular Endothelial Cells
J. Clin. Invest. 1984; 74: 1552-1555

74

Hoover, R.L., Karnovsky, M.J., Austen, K.F., Corey, E.J., Lewis, R.A.
Leukotriene B₄ Action on Endothelium Mediates Augmented Neutrophil/ Endothelial Adhesion
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1984; 81: 2191-2193

75

Kloner, R.A.
Do Neutrophils Mediate the Phenomenon of Stunned Myocardium?
J. American College of Cardiology 1989; 13: 1164-1166

76

Butler, J., Boijric, R.J., Parker, D., Chong, J.I., Shale, D.J., Pillai, R., Westaby, S., Rocher, G.M.
Inflammatory Response to Cardiopulmonary Bypass
Ann. Thorac. Surg. 1993; 55: 552-559

77

Kirklin, J.W., Barrat-Boyes, S.
Cardiac Surgery Vol. 1, Second Edition Ch. 2
Churchill Livingstone Inc. 1993, New York, Edinburgh, London, Madrid, Melbourne, Tokyo

78

Faint, R.W.
Platelet-Neutrophil Interactions: their Significance
Blood Rev. 1992; 6: 83-91

79

Wesler, B.B.

Platelets

In: Gallin, J.I., Snyderman, R. (Hrsg.). Inflammation: basic principles and clinical correlates. Raven Press 1988, New York. S. 543-557

80

Larsen, E., Celi, A., Gilbert, G.E., Furie, B.C., Erban, J.K., Bonfanti, R., Wagner, D.D., Furie, B.

PADGEM protein – a Receptor that Mediates the Interaction of activated Platelets with Neutrophils and Monocytes

Cell 1989; 59: 305-312

81

Fosse E, Mollnes TE, Osterud A, Aasen AO.

Effects of methylprednisolone on complement activation and leukocyte counts during cardiopulmonary bypass.

Scand J Thorac Cardiovasc Surg. 1987; 21(3):255-61.

82

Gott J.P.; Cooper W.A.; Schmidt F.E. jr. et al.

Modifying risk for extracorporeal circulation: trial of four antiinflammatory strategies

Ann Thoracic Surg. 1998; 66 (3): 747-753

83

Fitch JC, Rollins S, Matis L et al.

Pharmacology and biological efficacy of a recombinant, humanized, single-chain antibody C5 complement inhibitor in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery with cardiopulmonary bypass.

Circulation. 1999 Dec 21-28; 100(25):2499-506.

84

El zab SR, Rosseel PM, de Lange JJ, Groeneveld AB, van Strik R, van Wijk EM, et al. Dexamethasone decreases the pro- to anti-inflammatory cytokine ratio during cardiac surgery.

Br J Anaesth 2002;88:496-501.

85

Pangburn MK, Schreiber RD, Muller-Eberhard HJ.

C3b deposition during activation of the alternative complement pathway and the effect of deposition on the activating surface.

Pangburn MK, Schreiber RD, Muller-Eberhard HJ

J Immunol. 1983 Oct; 131(4):1930-5.

86

O Flaherty J.T., Craddock P.R., Jacob H.S.

Mechanisms of anti- complementary activity of corticosteroids in vitro: possible relevance in endotoxine shock

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1977; 154: 206-209

87

Blauhut B.; Gross.; Necek S. et al.

Effects of high dose aprotinin on blood loss, platelet function, fibrinolysis, complement, and renal function after cardiopulmonary bypass

J Thorac Cardiovasc Surg 1991; 101: 958-967

88

Nicolini F.A.; Mehta J.L., Nichols W.W. et al

Leukocyte elastase inhibition and t-PA induced coronary artery thrombosis in dogs, beneficial effects on myocardial histology

Am Heart J 1991; 122: 1245-1251

89

Sisto T.; Paajanen H.; Metsa-Ketela T. et.al

Pretreatment with antioxidants and allopurinol diminishes cardiac onset events in coronary artery bypass grafting

Ann Thorac Surg. 1995; 59: 1519-1523

90

Semb A.G.; Vaage J.; Mjos O.D.

Oxygen free radical producing leukocytes cause functional depression of isolated rat hearts: Role of leukotrienes

J Mol. Cell Cardiol 1990; 22: 555-563

91

Mitchell S, Gorman D.

The pathophysiology of cerebral arterial gas embolism.

J Extra Corpor Technol. 2002 Mar; 34(1):18-23

92

Whitaker DC, Newman SP, Stygall J, Hope-Wynne C, Harrison MJ, Walesby RK.

The effect of leucocyte-depleting arterial line filters on cerebral microemboli and neuropsychological outcome following coronary artery bypass surgery.

Eur J Cardiothorac Surg. 2004 Feb; 25(2):267-74.

93

Chiba Y., Morioka K.; Muraoka R. et al.

Effects of depletion of leucocytes and platelets on cardiac dysfunction after cardiopulmonary bypass

Ann Thorac Surg. 1998; 65 (1): 107-113

94

Sievert A.

Leucocyte depletion as a mechanism for reducing neutrophil-mediated ischemic-reperfusion injury during transplantation

J Extracorp. Techno. 2003; 35(1): 48-52

95

de Vries AJ, Gu YJ, Post WJ, Vos P, Stokroos I, Lip H, van Oeveren W.

Leucocyte depletion during cardiac surgery: a comparison of different filtration strategies. Perfusion 2003; 18:31-38.

96

Gu, Y.G., Obster, R., Gallandat Huet, R.C.G., Ejjelaar, A., van Oeveren, W.
Leukocyte Depletion Reduces the Postoperative Inflammatory Response in Patients
Following Open Heart Surgery
Intensive Care Med. 1992; 18(Suppl. 2): 51(Abstract 52)

97

Adler, S.P., Baggett, J., Mcvov, M.
Transfusion-associated CMV infections in Seropositive Cardiac Surgery Patients
The Lancet 1985; 5: 743-746

98

Chiba, Y., Morioka, K., Muraoka, R., Ihaya, A., Kimura, T., Uesaka, T., Tsuda, T.,
Matsuyama, K.
Effects of Depletion of Leukocytes and Platelets on Cardiac Dysfunction after
Cardiopulmonary Bypass
Ann. Thorac. Surg. 1998; 65(1): 107-114

99

Gourlay, T., Fleming, J., Tayler, K.M.
Laboratory Evaluation of the Pall LG6 Leukocyte Depleting Arterial Line Filter
Perfusion 1992; 7: 131-140

100

Gourlay, T., Fleming, J., Tayler, K.M.
The Effects of Pulsatile Flow on the Leukocyte Depleting Qualities of the Pall LG6
Leukocyte Depleting Arterial Line Filter. A Laboratory Investigation
Perfusion 1992; 7: 227-232

101

Kirklin JK, Westaby S, Blackstone EH, Kirklin JW, Chenoweth DE, Pacifico AD.
Complement and the damaging effects of cardiopulmonary bypass.
J Thorac Cardiovasc Surg 1983; 86:845

102

Markewitz, A., Faist, E., Lang, S., Endres, S., Fuchs, D., Reichart, B.
Successful Restoration of Cell Mediated Immune Response after Cardiopulmonary
Bypass by Immunomodulation
J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 1993; 105: 1092-1099

103

Olivencia Yurvati A.H.; Ferrara C.A.; Tierney N. et al.
Strategic leukocyte depletion reduces pulmonary microvascular pressure and improves
pulmonary status post-cardiopulmonary bypass
Perfusion 2003; 1:23-31

104

Di Salvo C.; Louca L.L.; Pattichis K. et al.
Does activated neutrophil depletion on bypass by leukocyte filtration reduce myocardial
damage
J Cardiovasc Surg. 1996; 37(1): 93-100

105

Matheis G.; Scholz M.; Gerber J. et al.

Leukocyte filtration in the early reperfusion phase on cardiopulmonary bypass reduces myocardial injury

Perfusion 2001; 16: 43-49

106

Scholz M, Simon A, Matheis G, Dzemali O, Henrich D, Kleine P, et al.

Leukocyte filtration fails to limit functional neutrophil activity during cardiac surgery.

Inflammation Res 2002; 51:363-368.

107

Simon A, Scholz M, Whöleke T, Bakhtiary F, Wimmer-Greinecker G, Moritz A

Leukocyte filtration fails to prevent neutrophil-mediated pathogenicity during cardiac surgery in high-risk patients

The Thoracic Cardiovascular Surgeon 2003, P40

108

Baksaas S.T., Videm V., Mollnes T.E. et al.

Leucocyte filtration during cardiopulmonary bypass hardly changed leucocyte counts and did not influence myeloperoxidase, complement cytokines or platelets

Perfusion 1998 Nov; 13 (6): 429-36

109

Samankatiwat P, Samartzis I, Lertsithichai P, Stefanou D, Punjabi PP, Taylor KM, Gourlay T.

Leucocyte depletion in cardiopulmonary bypass: a comparison of four strategies.

Perfusion 2003 Apr; 18(2):95-105.

110

Matheis G., Scholz, M.; Simon A, Henrich D, Wimmer- Greinecker G, Moritz A.

Timing of leucocyte filtration during cardiopulmonary bypass

Perfusion 2001; 16: 31-37

111

Guidon R.; Laperche Y.; Martin L. et al.

Disposable filters for microaggregate removal from extracorporeal circulation

Jcardiovasc Thorac Surg 1976; 4: 502-516

112

Skagseth E.; Froysaker T.; Refsum S.B. et al.

Disposable filter for microemboli in cardiopulmonary bypass

Thorac cardiovasc. Surgeon 1974; 15: 3-7

113

Gu, Y.J., Obster, R., Gallandat Huet, R.C.G., Eijgelaar, A., van Oeveren, W.

Leukocyte Depletion Reduces the Postoperative Inflammatory Response in Patients Following Open-Heart Surgery

Intensive Care Med. 1992; 18(Suppl.): 51

114

Hachida, M., Hanayama, N., Okamura, T., Akasawa, T., Maeda, T., Bonkohara, Y., Endo, M., Hashimoto, A., Koyanagi, H.
The Role of Leukocyte Depletion in Reducing Injury to Myocardium and Lung During Cardiopulmonary Bypass
Asaio J. 1995; 41(3): M291-M294

115

Gu YJ, de Vries AJ, Boonstra PW, van Oeveren W
Leukocyte Depletion Results in Improved Lung Function and Reduced Inflammatory Response after Cardiac Surgery
J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 1996; 112(2): 494-500

116

Gu YJ, de Vries AJ, Boonstra PW, van Oeveren W
Leukocyte Depletion Results in Improved Lung Function and Reduced Inflammatory Response after Cardiac Surgery
J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 1992; 112: 494-500

117

Tang, A.T.; Alexiou C.; Hsu, J et al.
Leukodepletion reduces renal injury in coronary revascularization; a prospective randomized study
Ann Thorac Surg. 2002; 74 (2): 372-377

118

Gu Y. J., Van Oeveren W.
Activation of plasma components by leukocyte removal filters
Asaio J 1994; 40 (3); 598-601

119

Jaffe, E.A., Nachman, R.L., Becker, C.G., Minick, C.R.
Culture of Human Endothelial Cells Derived from Umbilical Veins: Identification by Morphology and Immunological Criteria.
J. Clin. Invest. 1973; 52: 2745-2756

120

Bosch T, Braun N, Fassbinder W et al.
Apherese- Standard der Deutschen Arbeitsgemeinschaft für Klinische Nephrologie e.V.
Deutsche Arbeitsgemeinschaft für Klinische Nephrologie,
www.nephrologie.de/172Apharese.htm, 11.01.2003

121

Heggie, A.J., Corder, J.S., Crichton, P.R., Hesford, J.W., Bingham, H., Jeffries, S.
Clinical Evaluation of the New Pall Leukocyte-Depleting Blood Cardioplegia Filter (BC1)
Perfusion 1998; 13: 17-25

122

Hachida M., Hanayama N.; Okamura T., et al.

The role of leukocyte depletion in reducing injury to myocardium and lung during cardiopulmonary bypass

Asaio Journal 1995; Vol 41, No 3: 291-294

123

Smit J.J.; de Vries A.J.; Gu Y.J. et al.

Efficiency and safety of leukocyte filtration during cardiopulmonary bypass for cardiac surgery

Transfusion Science 1999; 20 (3): 151-165

124

Ichihara, T., Yasuura, K., Maseki, M., Matsuura, A., Miyahara, K., Ito, T., Kato, S., Mizuno, S., Tamaki, S., Seki, A., Takashi, W., Tanoru, M., Abe, A.

The Effects of Using a Leukocyte Removal Filter during Cold Blood Cardioplegia

Surg. Today, Tpn. J. Surg. 1994; 24: 966-972

125

Palanzo D.A.; Manley, N.J.

Cost effectiveness of using a leuko-depleting arterial line filter

Proceedings of the american academy of cardiovascular perfusion 1994, Vol. 15:124-7

126

Simon A, Scholz M, Moraru J et al.

Modified Leukocyte Filtration Timing Strategies during cardiac surgery with extracorporeal circulation: no evidence for clinical benefit

Zur Publikation eingereicht, 2004

127

Zimmerman, B.J., Granger, D.H.

Reperfusion-induced Leukocyte Infiltration: Role of Elastase

Heart Circ. Physiol. 1990; 28: H390-H394

128

Bruil A.; Beugeling T.; Feijen J.; van Aken W.G

The mechanisms of leukocyte removal by filtration

Transfusion medicine reviews 1995; Vol 9, No 2: 145-166

129

Gu Y.J., van Oeveren W.; Akkerman C., Boonstra P.W.; Huyzen R.J., Wildevuur C.R

Heparin coated circuits reduce the inflammatory response to cardiopulmonary bypass

Ann Thorac Surg. 1993; 55 (3): 917-922

130

Heyer E.J, Lee K.S., Manspeizer H.E. et al.

Heparin bonded cardiopulmonary bypass circuits reduce cognitive dysfunction

J Cardiothorac Vasc. Anaesth. 2002; 16 (1): 37-42

131

Gourley T., Asimakopoulos G., Taylor K.M.
Leukocyte Biology and Pathogenicity in cardiac surgery and cardiology: the need for leukocyte depletion
Leukocyte depletion in cardiac surgery and cardiology; Basel Karger; 2002

132

Labarca C, Massardo L, Garcia PI, Jacobelli S.
Effectiveness of infliximab in patients with inflammatory arthritis refractory to conventional treatment
Rev Med Chil. 2003 Oct; 131(10):1157-64.

133

Ljung T, Karlen P, Schmidt D, Hellstrom PM, Lapidus A, Janczewska I, Sjoqvist U, Lofberg R.
Infliximab in inflammatory bowel disease: clinical outcome in a population based cohort from Stockholm County
Gut. 2004 Jun; 53(6):849-53

134

Kinder A, Stephens S, Mortimer N, Sheldon P
Severe herpes zoster after infliximab infusion
Postgrad. Med J 2004 Jan; 80(939):26

135

Tai TL, O'Rourke KP, McWeeney M, Burke CM, Sheehan K, Barry M.
Pneumocystis carinii pneumonia following a second infusion of infliximab
Rheumatology (Oxford) 2002 Aug;41(8):951-2

136

Skurk T, Van Harmelen V, Hauner H.
Angiotensin II Stimulates the Release of Interleukin-6 and Interleukin-8 From Cultured Human Adipocytes by Activation of NF- κ B
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004 May 6 [Epub ahead of print]

137

Nemeth ZH, Deitch EA, Szabo C, Hasko G
Hyperosmotic stress induces nuclear factor- κ B activation and interleukin-8 production in human intestinal epithelial cells.
Am J Pathol. 2002 Sep; 161(3):987-96

138

Ginzberg HH, Shannon PT, Suzuki T, Hong O, Vachon E, Moraes T, Abreu MT, Cherepanov V, Wang X, Chow CW, Downey GP.
Leukocyte elastase induces epithelial apoptosis: role of mitochondrial permeability changes and Akt
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2004 Jul; 287(1):G286-98

139

Grano V, Tasco G, Casadio R et al.
Reduction of Active Elastase Concentration by Means of Immobilized Inhibitors: A Novel Therapeutic Approach
Biotechnol. Prog. 2004 Jun 4; 20(3):968-974.

140

Woodruff TM, Arumugam TV, Shiels IA, Reid RC, Fairlie DP, Taylor SM
Protective effects of a potent C5a receptor antagonist on experimental acute limb ischemia-reperfusion in rats.
J Surg Res. 2004 Jan; 116(1):81-90

141

Greenstein S., Barnard J., Zhou K. et al.
Fas activation reduces neutrophil adhesion to endothelial cells
J. of Leukocyte biology 2000; 68:715-722

142

M.Scholz, A. Simon, M. Berg, et al.
In vivo inhibition of neutrophil activity by a Fas (CD 95) stimulation module: arterial in line application in a porcine cardiac surgery model
J Thorac Cardiovasc Surg. 2004 Jun; 127(6):1735-42

143

Cinatl J. Jr., Blaheta R, Bittoova M, Scholz M, Margraf S, Vogel JU, et al.
Decreased neutrophil adhesion to human cytomegalovirus-infected retinal pigment epithelial cells is mediated by virus-induced up-regulation of Fas ligand independent of neutrophil apoptosis.
J Immunol 2000; 165: 4405-4413

144

Rowe PM.
Glimmers of clinical relevance for Fas
Lancet 1996; 347:1398.

145

Gregory MS, Repp AC, Holhbaum AM, et al.
Membrane Fas ligand activates innate immunity and terminates ocular immune privilege.
J Immunol 2002;169:2727-2735.

146

Giordano C, Stassi G, De Maria R, Todaro M, Richiusa P, Papoff G, et al.
Potential involvement of Fas and its ligand in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis
Science 1997; 275:960-963

147

Kondo T, Suda T, Fukuyama H, Adachi M, Nagata S.
Essential roles of the Fas ligand in the development of hepatitis
Nature Med 1997; 3:409-413

148

Moulian N, Bidault J, Truffault F, Yamamoto AM, Levasseur P, Berrih-Aknin S.
Thymocyte Fas expression is dysregulated in myasthenia gravis patients with anti-acetylcholine receptor antibody.
Blood 1997; 89: 3287-3295.

149

Cheng J, Zhou T, Liu C, Shapiro JP, Brauer MJ, Kiefer MC, et al.
Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule
Science 1994; 263: 1759-1762

150

Trauth BC, Klas C, Peters AM, Matzku S, Moller P, Falk W, et al.
Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis
Science 1989; 245: 301-305

151

Kobayashi N, Hamamoto Y, Yamamoto N, Ishii A, Yonehara M, Yonehara S.
Anti-Fas monoclonal antibody is cytotoxic to human immunodeficiency virus-infected cells without augmenting viral replication.
Proc Natl Acad Sci USA. 1990; 87: 9620-9624.

152

Cox G, Crossley J, Xing Z.
Macrophage engulfment of apoptotic neutrophils contributes to the resolution of acute pulmonary inflammation in vivo.
Am J Respir Cell Mol Biol 1995; 12: 232-237

153

Hagimoto N, Kuwano K, Miyazaki H, Kunitake R, Fujita M, Kawasaki M, et al
Induction of apoptosis and pulmonary fibrosis in mice in response to ligation of Fas antigen
Am J Respir Cell Mol Biol 1997; 17 :272-278.

154

Vandivier RW, Fadok VA, Hoffmann PR, Bratton DL, Penvari C, Brown KK, et al.
Elastase-mediated phosphatidylserine receptor cleavage impairs apoptotic cell clearance in cystic fibrosis and bronchiectasis.
J Clin Invest 2002; 109: 661-670.

155

Tsujimoto H, Takeshita S, Nakatani K, Kawamura Y, Tokutomi T, Sekine I.
Delayed apoptosis of circulating neutrophils in Kawasaki disease
Clin Exp Immunol 2001; 126: 355-364.

156

Jimenez MF, Watson RW, Parodo J, Evans D, Foster D, Steinberg M et al.
Dysregulated expression of neutrophil apoptosis in the systemic inflammatory response syndrome
Arch Surg 1997; 132:1263-1269.

157

Chello M, Mastroroberto P, Quirino A, Cuda G, Perticone F, Cirillo F, et al.
Inhibition of neutrophil apoptosis after coronary bypass operation with cardiopulmonary
bypass
Ann Thorac Surg 2002; 73: 123-129.

158

Barker RN, Erwig LP, Hill KS, Devine A, Pearce WP, Rees AJ.
Antigen presentation by macrophages is enhanced by the uptake of necrotic, but not
apoptotic, cells.
Clin Exp Immunol 2002, 127:220-225.

159

Gourlay T, Asimakopoulos G, Taylor KM
Leukocyte Biology and Pathogenicity in Cardiac Surgery and Cardiology: The Need for
Leukocyte Depletion
In Matheis G, Moritz A, Scholz M. (eds): pp1-13 Leukocyte depletion in cardiac
surgery and cardiology
Karger Verlag, Basel 2002

160

Markewitz A, Faist E, Lang S, Endres S, Fuchs D, Reichart B.
Successful restoration of cell-mediated immune response after cardiopulmonary bypass
by immunomodulation
J Thorac Cardiovasc Surg 1993; 105:15-24

161

Graninger W, Wensch C
Pentoxifylline in severe inflammatory response syndrome
J Cardiovasc Pharmacol 1995; 25 Suppl 2:S134-S138.

162

Sunaert P, Bulteel V, Lemmens L, Noman M, Geypens B, Van Assche G, et al.
Anti-tumor necrosis factor treatment restores the gut barrier in Crohn's disease.
Am J Gastroenterol 2002; 97:2000-2004.

163

Sack M.
Tumor necrosis factor-alpha in cardiovascular biology and the potential role for anti-
tumor necrosis factor- alpha therapy in heart disease
Pharmacol Ther 2002; 94:123-135.

164

Garden D, Xiao F, Moak C, Willis BH, Robinson-Jackson S, Alexander S.
Neutrophil elastase promotes lung microvascular injury and proteolysis of endothelial
cadherins.
Am J Physiol 1998;275:H385-H392.

165

Welbourn CR, Goldman G, Paterson IS, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB.
Neutrophil elastase and oxygen radicals: synergism in lung injury after hindlimb
ischemia.
Am J Physiol 1991; 260: H1852-H1856.

166

Moreno JB, Margraf S, Schuller AM, Simon A, Moritz A, Scholz M
Inhibition of neutrophil activity in cardiac surgery with cardiopulmonary bypass: a
novel strategy with the leukocyte inhibition module.
Perfusion. 2004 Jan; 19(1):11-6.

167

Berg M, Scholz M, Matheis G
Future perspectives to Limit the Pathogenicity of Leukocytes in Cardiac Surgery and
Cardiology; in Matheis G, Moritz A, Scholz M.(eds): pp147-153
Leukocyte depletion in cardiac surgery and cardiology
Karger Verlag, Basel 2002

7 Anhang

Danksagung

Diese Arbeit ist meinen Eltern gewidmet, die durch ständige Unterstützung mein Medizinstudium ermöglicht haben.

Die Anregung zum Thema gab *Herr Prof. Dr. rer. nat. Martin Scholz*, dem ich an dieser Stelle besonders für die Betreuung der Arbeit und seine bereitwillig gewährten Ermutigungen danken möchte.

Ich danke insbesondere auch *Frau Tabib*, *Frau Beinrucker* und *Frau Oppermann* für ihre labortechnische Unterstützung.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Untersuchungen zur funktionellen Leukozyteninhibition bei kardiochirurgischen Patienten mit extrakorporaler Zirkulation“ in der Klinik für Thorax-, Herz- und thorakale Gefäßchirurgie unter der Betreuung und Einleitung von *Herrn Prof. Dr. rer. nat. Martin Scholz* ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht.

Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Frankfurt am Main, den 15.09.2004

Lebenslauf

Name : Markus Berg

Geburtsdatum: 26.06.1975 in Bergneustadt

Familienstand: ledig

Schulbildung:

1981-1985 Kath. Grundschule Bergneustadt

1985-1994 St. Franziskusgymnasium Olpe, Abitur

Studium/Berufsausbildung:

04/1996-03/2003 Studium der Humanmedizin an der Johann Wolfgang Goethe- Universität ,Frankfurt am Main

04/2002-03/2003 Praktisches Jahr:
Krankenhaus Bad Soden, Kantonspital Winterthur, Universitätsklinikum Frankfurt am Main, Wahlfach: Radiologie

11/99 Beginn der Promotion in der Klinik für Thorax-, Herz- und thorakale Gefäßchirurgie des Universitätsklinikum Frankfurt am Main; Direktor Prof. Dr. A. Moritz
Arbeitstitel der Promotion: „Untersuchungen zur funktionellen Leukozyteninhibition bei kardiochirurgischen Patienten mit extrakorporaler Zirkulation“

Seit 10/2003 Arzt im Praktikum, Städt. Klinikum Darmstadt;
Abteilung: Innere Medizin II, Gastroenterologie, Infektiologie, Diabetologie, Direktor Prof. Dr. med. Wietholtz