

**Der Effekt des volatilen Anästhetikums Sevofluran
auf inflammatorische Prozesse während
extrakorporaler Zirkulation**

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

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

**vorgelegt von
Bachmann, Daniel Philipp**

2014

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. P. Rosenberger

2. Berichterstatter: Juniorprofessor Dr. H. Langer

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Einleitende Worte.....	1
1.2 Überblick über die Entwicklung der extrakorporalen Zirkulation	2
1.3 Herz-Lungen-Maschine.....	3
1.4 Volatile Anästhetika.....	5
1.5 Nebenwirkungen der extrakorporalen Zirkulation	6
1.5.1 SIRS	7
1.6 Thrombozyten, Leukozyten und Zytokine	8
1.6.1 Thrombozyten.....	8
1.6.1.1 Morphologie der Thrombozyten	8
1.6.1.2 Thrombozytenaktivierung	9
1.6.1.2.1 P-Selektin.....	9
1.6.1.2.2 GPIIb/IIIa	10
1.6.2 Leukozyten.....	11
1.6.2.1 Morphologie und Funktion der Leukozyten	12
1.6.2.1.1 Granulozyten.....	13
1.6.2.1.1.1 Neutrophile Granulozyten	14
1.6.2.1.1.2 Eosinophile Granulozyten.....	14
1.6.2.1.1.3 Basophile Granulozyten.....	15
1.6.2.1.2 Lymphozyten.....	15
1.6.2.1.2.1 T-Lymphozyten.....	16
1.6.2.1.2.2 B-Lymphozyten	18
1.6.2.1.2.3 Natürliche Killerzellen	19
1.6.2.1.3 Monozyten.....	20
1.6.2.2.1 CD45	21
1.6.2.2.2 Mac-1	22
1.6.2.2.3 PMN-Elastase	23
1.6.3 Zytokine	23

1.6.3.1 TNF- α	25
1.6.3.2 IL-1 β	26
1.6.3.3 IL-8	27
1.7 Wissenschaftliche Zielsetzung	28
2 Material und Methoden.....	29
2.1 Materialien	29
2.1.1 Geräte.....	29
2.1.1.1 FACScan™	29
2.1.1.2 Mithras LB 940	34
2.1.1.3 ABX Micros 60.....	34
2.1.1.4 PTR	34
2.1.1.5 Das extrakorporale Zirkulationsmodell	35
2.1.2 Antikörper	35
2.1.3 ELISA-Kits	35
2.1.4 Verbrauchs- und Arbeitsmaterialien.....	36
2.1.5 Software	37
2.2 Methoden	37
2.2.1 Studienaufbau	37
2.2.2 Blutentnahme und Probandenauswahl.....	38
2.2.3 Ex-vivo EKZ.....	39
2.2.4 Blutentnahmen und Messzeitpunkte aus dem EKZ-Modell.....	41
2.2.4.1 Differentialblutbild	41
2.2.4.2 Blutgasanalyse	42
2.2.5 Durchflusszytometrische Analysen.....	42
2.2.5.1 Probenvorbereitung für die Messung der Leukozyten- Thrombozyten Aggregatbildung	42
2.2.5.2 Probenvorbereitung für die Bestimmung der Thrombozytenaktivierung	42
2.2.5.3 Probenvorbereitung für die Leukozyten-Analyse	43
2.2.5.4 Prinzipien der durchflusszytometrischen Bestimmungen.....	43
2.2.6 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	45
2.2.6.1 Probenvorbereitung für die quantitative Analyse von TNF- α ,	

IL-1 β , IL-8 sowie der PMN-Elastase mittels ELISA	46
2.2.6.2 Zytokinbestimmung mittels ELISA.....	47
2.2.6.2.1 Human TNF- α	48
2.2.6.2.2 Human CXCL8/IL-8.....	48
2.2.6.2.3 Human IL-1 β /IL-1F2.....	49
2.2.6.3 Bestimmung der PMN-Elastase mittels ELISA.....	50
2.2.6.3.1 PMN-Elastase	51
2.2.6.4 Analyse der ELISA-Proben mit dem Photometer	52
2.3 Statistische Auswertung.....	53
3 Ergebnisse.....	55
3.1 Auswirkungen der EKZ und Sevofluran auf das Blutbild.....	55
3.1.1 Hämatokrit	56
3.1.2 Erythrozyten	56
3.1.3 Thrombozyten.....	57
3.1.4 Leukozyten	57
3.2 Effekt von EKZ und Sevofluran auf die Expression von P-Selektin.....	58
3.2.1 P-Selektin Expression auf Einzelthrombozyten.....	59
3.2.2 P-Selektin Expression auf aggregatgebundenen Thrombozyten	59
3.3 Effekt von EKZ und Sevofluran auf die Leukozyten-Thrombozyten Aggregatbildung.....	60
3.4 Effekt von EKZ und Sevofluran auf die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine	61
3.4.1 IL-1 β	62
3.4.2 IL-8	63
3.4.3 TNF- α	63
3.5 Effekt von EKZ und Sevofluran auf die Mac-1 Expression	64
3.5.1 Mac-1 Expression auf neutrophilen Granulozyten.....	65
3.5.2 Mac-1 Expression auf Monozyten	66
3.6 Effekt von EKZ und Sevofluran auf die Freisetzung der PMN-Elastase.....	67
4 Diskussion.....	69
4.1 Diskussion der Methodik und verwendeten Materialien.....	69

4.2 Diskussion der Ergebnisse	70
4.2.1 Der Effekt der extrakorporalen Zirkulation auf das Blutbild	71
4.2.2 Thrombozytenaktivierung, respektive Thrombozyten-Leukozyten Konjugatbildung im Rahmen der EKZ	71
4.2.3 Sekretion von Zytokinen unter dem Einfluss der EKZ	73
4.2.4 Leukozytenaktivierung	74
4.2.5 PMN-Elastase Expression	75
4.2.6 Gesamtbewertung des Einflusses von EKZ und Sevofluran auf immunkompetente Zellen	76
4.2.7 Schlussfolgerung und Ausblick	80
5 Zusammenfassung	82
6 Literaturverzeichnis	85
7 Erklärungen zum Eigenanteil	95
8 Veröffentlichungen	96
9 Danksagung	97

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Prinzip der extrakorporalen Zirkulation (EKZ)
- Abbildung 2: Graphische Darstellung eines FSC/SSC-Dotplots zur Identifizierung der Leukozytensubspezies aus einer Vollblutprobe in einer repräsentativen durchflusszytometrischen Analyse
- Abbildung 3: Exemplarisches Histogramm-Overlay der CD11 Expression auf Granulozyten (Kontroll- vs. Sevofluran-Probe)
- Abbildung 4: Schematische Darstellung des Sandwich-ELISA-Prinzips
- Abbildung 5: Darstellung des Hämatokrit im zeitlichen Verlauf bei normothermer EKZ (Kontroll- vs. Sevofluran-Probe)
- Abbildung 6: Darstellung der Erythrozytenzahl im zeitlichen Verlauf bei normothermer EKZ (Kontroll- vs. Sevofluran-Probe)
- Abbildung 7: Darstellung der Thrombozytenzahl im zeitlichen Verlauf bei normothermer EKZ (Kontroll- vs. Sevofluran-Probe)
- Abbildung 8: Darstellung der Leukozytenzahl im zeitlichen Verlauf bei normothermer EKZ (Kontroll- vs. Sevofluran-Probe)
- Abbildung 9: P-Selektin (CD62P) Expression auf Einzelthrombozyten im zeitlichen Verlauf bei normothermer EKZ (Kontroll- vs. Sevofluran-Probe)
- Abbildung 10: P-Selektin (CD62P) Expression auf aggregatgebundenen Thrombozyten im zeitlichen Verlauf bei normothermer EKZ (Kontroll- vs. Sevofluran-Probe)
- Abbildung 11: Leukozyten-Thrombozyten Aggregatbildung im zeitlichen Verlauf bei normothermer EKZ (Kontroll- vs. Sevofluran-Probe)
- Abbildung 12: Vergleich des Konzentrationsverlauf des Zytokins IL-1 β zwischen der Kontrollgruppe und der mit Sevofluran behandelten Gruppe bei normothermer EKZ
- Abbildung 13: Vergleich des Konzentrationsverlauf des Zytokins IL-8 zwischen der Kontrollgruppe und der mit Sevofluran behandelten Gruppe bei normothermer EKZ

- Abbildung 14: Vergleich des Konzentrationsverlauf des Zytokins TNF- α zwischen der Kontrollgruppe und der mit Sevofluran behandelten Gruppe bei normothermer EKZ
- Abbildung 15: Mac-1 (CD11b) Expression auf Granulozyten im zeitlichen Verlauf bei normothermer EKZ (Kontroll- vs. Sevofluran-Probe)
- Abbildung 16: Mac-1 (CD11b) Expression auf Monozyten im zeitlichen Verlauf bei normothermer EKZ (Kontroll- vs. Sevofluran-Probe)
- Abbildung 17: Vergleich des Konzentrationsverlauf der PMN-Elastase zwischen der Kontrollgruppe und der mit Sevofluran behandelten Gruppe bei normothermer EKZ

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACVB	Aorto-Coronarer-Venen-Bypass
ADP	Adenosindiphosphat
ALI	<i>acute lung injury</i> akute Lungenschädigung
AP-1	Aktivator Protein-1
APC	<i>antigen-presenting cell</i> Antigen-präsentierende Zelle
ARDS	<i>acute respiratory distress syndrome</i> akutes Atemnotsyndrom
BCR	<i>B-cell receptor</i> B-Zell-Rezeptor
bzw.	beziehungsweise
CD	<i>cluster of differentiation</i> \triangleq <i>cluster of designation</i>
CD11b	<i>cluster of differentiation Antigen 11b</i> = 170 kDa Untereinheit von Mac-1
CD11b/CD18=	Mac-1
CD18	<i>cluster of differentiation Antigen 18</i> = 95 kDa Untereinheit von Mac-1
CD41	<i>cluster of differentiation Antigen 41</i> = 140 kDa Glykopeptid = GPIIb-Untereinheit von GPIIb/IIIa
CD41/CD61	= GPIIb/IIIa
CD54	<i>cluster of differentiation Antigen 54</i> = ICAM-1
CD45	<i>cluster of differentiation Antigen 45</i> = LCA = PTPRC
CD62P	<i>cluster of differentiation Antigen 62P</i> = P-Selektin = GMP-140
CD162	<i>cluster of differentiation Antigen 162</i> = PSGL-1 = SELPLG
CR3	<i>complement receptor 3</i> = Mac-1
CSF	<i>colony stimulating factor</i> koloniestimulierender Faktor
Da	Dalton = u
DHCA	<i>deep hypothermic circulatory arrest</i>

EKZ	extrakorporale Zirkulation
ELISA	<i>enzyme-linked immuno sorbent assay</i> Enzymimmunoassay
engl.	Englisch
etc.	<i>et cetera</i> und so weiter
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	<i>forward scatter</i> Vorwärtsstreulicht
GABA	<i>gamma-Aminobutyric acid</i> γ-Aminobuttersäure
G-CSF	<i>granulocyte colony-stimulating factor</i>
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GP	Glykoprotein
GPIIb/IIIa	Glykoprotein CD41/CD61 = Integrin $\alpha_{IIb}\beta_{III}$
h	Stunde
HLM	Herz-Lungen-Maschine
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule-1</i> = CD54
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IKET	Institut für Klinische und Experimentelle Transfusionsmedizin
IL	Interleukin
IL-1β	Interleukin-1β
IL-8	Interleukin-8
k	Kilo $\triangleq 10^3$
K _d	Dissoziationskonstante
LCA	<i>leucocyte common antigen</i> = CD45 = PTPRC
LFA-1	<i>lymphocyte function-associated antigen-1</i> Lymphozyten-funktionsassoziiertes Antigen-1
M	molare Masse
MAC	<i>minimum alveolar concentration</i> minimale alveoläre Konzentration (in Vol.-%)

Mac-1	<i>Macrophage-1 antigen</i> = CD11b/CD18 = Integrin α M β 2 = CR3 Makrophagen-assoziiertes Antigen-1
M-CSF	<i>macrophage colony-stimulation factor</i>
MGG	Pappenheim-Färbung (= Kombination der May-Grünwald- mit der Giemsa-Färbung)
min	Minute
MODS	<i>multiple organ dysfunction syndrome</i> Multiorgan-Dysfunktionssyndrom
mm ³	Mikroliter
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer = 10 ⁻⁶ m
mRNA	<i>messenger RNA</i> Boten-RNS
n	Fallzahl
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NMDA	<i>N-Methyl-D-aspartic acid</i> N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
NPSs	neutrophile Serinproteasen
O ₂	Sauerstoff
p	\triangleq p-Wert = Signifikanzwert
PAF	<i>platelet activating factor</i> plättchenaktivierender Faktor
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> phosphatgepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PMN	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
P-Selektin	= CD62P
PSGL-1	P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 = CD162 = SELPLG

PTPRC	<i>protein tyrosine phosphatase, receptor type, C = CD45 = LCA</i>
PaCO ₂	arterieller Kohlendioxidpartialdruck
ROS	<i>reactive oxygen species</i> reaktive Sauerstoffspezies
rpm	<i>revolutions per minute</i> Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SELPLG	<i>selectin P ligand = CD162 = PSGL-1</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i> Standardfehler
SIRS	<i>systemic inflammatory response syndrom</i> systemisches Entzündungssyndrom
sog.	sogenannt
SSC	<i>side scatter</i> Seitwärtsstreulicht
T _C	zytotoxische T-Zelle = T-Killerzelle
TCR	<i>T-cell receptor</i> T-Zell-Rezeptor
T _H	T-Helferzelle
TIVA	total intravenöse Anästhesie
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
T _{Reg}	regulatorische T-Zellen = Suppressor-T-Zelle
u	<i>unified atomic mass unit = Da</i> atomare Masseneinheit
u.a.	unter anderem
UKT	Universitätsklinikum Tübingen
vs.	<i>versus</i> gegenüber gestellt
vWF	Von-Willebrand-Faktor
WB	<i>whole blood</i> Vollblut
z.B.	zum Beispiel

ZNS Zentralnervensystem

1 Einleitung

1.1 Einleitende Worte

Extrakorporale Unterstützungssysteme, welche die Funktion von Herz und Lungen übernehmen, werden bei vielen herzchirurgischen Eingriffen benötigt um stabile Kreislauf-Parameter des Patienten zu gewährleisten. Die Anwendung einer extrakorporalen Zirkulation (EKZ) ist daher ein unabdingbares Instrument der modernen Herzchirurgie. 2011 wurden allein in den 78 herzchirurgischen Zentren Deutschlands 84.402 Operationen unter Zuhilfenahme der Herz-Lungen-Maschine (HLM) durchgeführt [1]. Allerdings ist der Einsatz der EKZ auch mit unerwünschten Nebenwirkungen für den Patienten assoziiert.

Dazu gehören die Induktion einer systemischen Entzündungsreaktion (SIRS), die durch den Kontakt der Blutbestandteile mit den künstlichen Oberflächen des extrakorporalen Kreislaufs verursacht werden kann. Die mit einer EKZ verknüpften Entzündungsreaktionen können potentiell lebensgefährliche Komplikationen wie z.B. eine Störung der Lungenfunktion, des Herzmuskels, der Nieren und der Leber verursachen, was zu einem Multi-Organversagen und einer damit einhergehenden signifikanten Erhöhung der Mortalität führen kann [2-5].

Die Mechanismen der durch die EKZ induzierten Entzündung sind multifaktoriell. So bewirkt die EKZ unter anderem eine Aktivierung der Leukozyten einschließlich der neutrophilen Granulozyten und resultiert in der Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie z.B. Zytokinen [4, 6].

Sowohl in klinischen als auch experimentellen Studien wurde beschrieben, dass volatile Anästhetika den Herzmuskel vor Ischämie- sowie Reperfusionsschäden schützen können [3, 7]. Des Weiteren wurden für das volatile Anästhetikum Sevofluran sowohl antiischämische als auch antiinflammatorische Wirkungen nachgewiesen [8]. Allerdings ist bisher unklar, ob die routinemässige Verabreichung von Sevofluran in klinisch gebräuchlichen Konzentrationen während der balancierten Anästhesie, die durch die EKZ verursachten inflammatorischen Prozesse reduzieren kann.

Vor diesem Hintergrund war das Ziel dieser experimentellen Studie zu untersuchen, ob Sevofluran die durch die EKZ ausgelöste Entzündungsreaktion während der ex vivo EKZ modulieren kann.

1.2 Überblick über die Entwicklung der extrakorporalen Zirkulation

Der britische Arzt und Anatom William Harvey beschrieb bereits 1628 die anatomischen Grundlagen der Blutzirkulation des Menschen [9]. Noch im selben Jahrhundert zeigte der Universalgelehrte Robert Hooke experimentell die theoretische Möglichkeit einer Oxygenierung des Blutes unter Umgehung des Lungenkreislaufes auf [10]. Dennoch sollte es noch bis in die 50er Jahre des 20. Jahrhunderts dauern, bis erstmals eine Operation am offenen Herzen beim Menschen unter Zuhilfenahme eines Blutzirkulations-Ersatzsystems, gelang.

Julien-Jean Cesar le Gallois hatte 1812 die Idee, das Herz durch eine Pumpe zu ersetzen, um ein Organ außerhalb des Körpers am Leben zu erhalten und seine Durchblutung zu gewährleisten [11]. Das für diesen Einsatz essentielle externe Anreichern von venösem Blut mit Sauerstoff gelang erstmalig 1868 Carl Ludwig und Alexander Schmidt, indem sie Blut gemeinsam mit Luft in einem Ballon schüttelten und damit künstlich oxygenierten. Den ersten Prototyp einer Herz-Lungen-Maschine stellten Max von Frey und Max Gruber 1885 in Leipzig vor. Er beinhaltete einen sogenannten Filmoxygenator, einen rotierenden Glaszylinder, an dessen Innenseite das Blut einer sauerstoffreichen Umgebung ausgesetzt wurde und damit die künstliche Anreicherung des Blutes mit Sauerstoff gewährleisten konnte [12]. Eine Aktivierung der Gerinnungskaskade und die damit einhergehende Koagulation des Blutes bei Kontakt mit körperfremden Oberflächen stellte jedoch ein unüberwindbares Hindernis der EKZ dar und verhinderte einen Einsatz von dieser in vitro. Im Jahr 1916 schuf der Medizinstudent Jay McLean mit der Entdeckung des Antikoagulans Heparin die Voraussetzung für den Einsatz der HLM zur EKZ [13].

Nach aufwendiger Forschung am Tiermodell gelang John Heysham Gibbon Jr. am 6. Mai 1953 erstmals erfolgreich der Verschluss eines Vorhofseptumdefektes unter Sicht mit Hilfe des kardiopulmonalen Bypass beim

Menschen [14, 15]. Die erste Herzoperation unter Einsatz der HLM in Deutschland wurde 1958 von Rudolf Zenker in Marburg durchgeführt. Am Universitätsklinikum Tübingen (UKT) wurde die neue Operationsmethode erstmals 1970 von Hans-Eberhard Hoffmeister eingesetzt [16].

Die Einführung der HLM gab dem Herzchirurgen neue operative Möglichkeiten, denn durch sie konnte die Funktion von Herz und Lunge zumindest zeitweise ersetzt werden. Die moderne Herzchirurgie ist heute ohne den Einsatz der EKZ nicht mehr vorstellbar. Sie ist Goldstandard für einen Großteil der Eingriffe am Herzen wie koronare Bypassoperationen, Klappenchirurgie, Eingriffe an den großen herznahen Gefäßen, für Korrekturen angeborener Herzfehler und nicht zuletzt der Herztransplantation. Basierend auf den Daten der Leistungsstatistik der Deutschen Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie ergibt sich für das Jahr 2011 bei 100.291 durchgeführten herzchirurgischen Eingriffen ein Anteil von 84 % der Operationen unter Einsatz der HLM [1].

1.3 Herz-Lungen-Maschine

Die moderne Herz-Lungen-Maschine (HLM) ist ein komplexes medizintechnisches Gerät, welches in der Lage ist, für einen beschränkten Zeitraum die Pumpfunktion des Herzens und die Gasaustauschfunktion der Lunge zu übernehmen. Hierdurch ist es möglich, das Herz und die Lunge aus dem Körperkreislauf auszuschalten; die lebensnotwendigen Funktionen der Organe übernimmt in der Zwischenzeit die externe HLM. Dieser beschriebene, außerhalb des Körpers stattfindende Kreislauf wird auch als extrakorporale Zirkulation (EKZ) oder kardiopulmonaler Bypass, bezeichnet. Eine EKZ wird zur Aufrechterhaltung der Herz-Kreislauf-Funktion bei einer Vielzahl an Herzoperationen aus operationstechnischen Gründen eingesetzt. Dies ermöglicht dem Operateur Eingriffe am offenen, nicht schlagenden und entlasteten Herzen oder den großen herznahen Gefäßen.

Bei einer Standard-HLM wird das Blut über venöse Kanülen im rechten Atrium cordis oder den Venae cavae drainiert und in einem Reservoir gesammelt. Von dort wird das Blut, nach Anreicherung von Sauerstoff (O₂) und Elimination von Kohlendioxid (CO₂) durch einen Oxygenator, über eine Kanüle in der Aorta

ascendens oder Arteria femoralis wieder dem arteriellen Kreislauf zugeführt. Neben dem Gasaustausch übernehmen die heute überwiegend verwendeten Membranoxygenatoren zusätzlich die Funktion als Wärmetauscher, die der Regulation von Bluttemperatur, und somit der Körpertemperatur, dienen. Die ebenfalls in die EKZ geschalteten Blutfilter vermindern systemische Embolien durch Mikropartikel und Luftbläschen. Über die Pumpen der HLM, zumeist Roller- oder Zentrifugalpumpen, wird der Blutfluss für die Kreislaufzirkulation aufrecht erhalten und die Durchblutung der Endorgane gewährleistet.

Die Überwachung der hochkomplexen EKZ obliegt dem Kardiotechniker, einem speziell ausgebildeten Mitarbeiter, der in enger Zusammenarbeit mit dem Herzchirurgen und dem Anästhesisten die HLM selbstständig steuert [17-19].

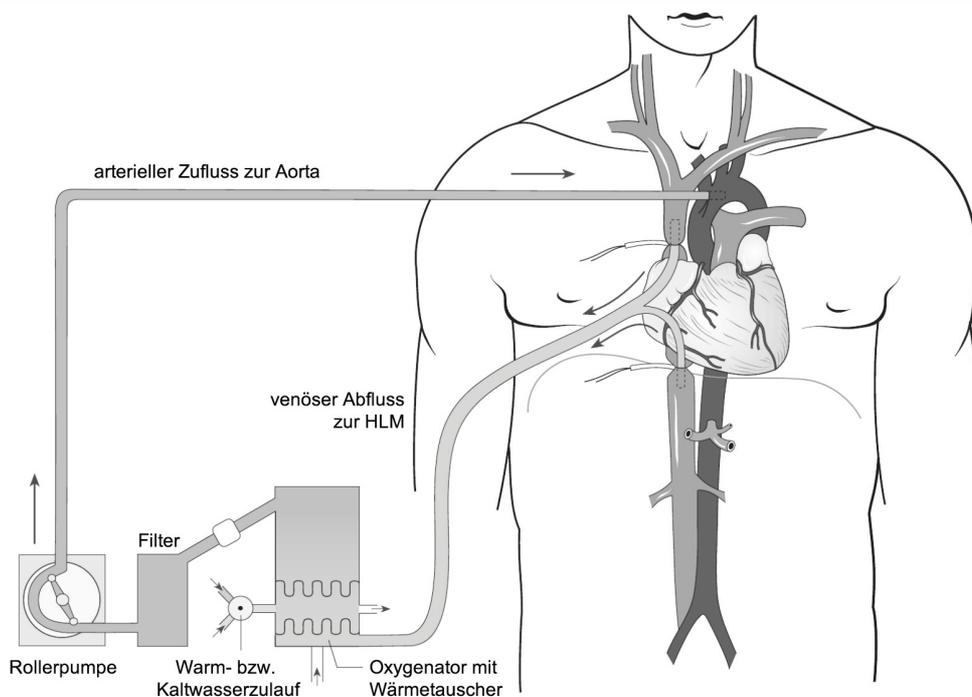


Abb. 1: Prinzip der extrakorporalen Zirkulation (EKZ) [nach 20]

1.4 Volatile Anästhetika

Volatile Anästhetika sind Narkosemittel aus der Gruppe der Inhalationsnarkotika, welche bei Raumtemperatur als Flüssigkeit vorliegen und in einen dampfförmigen (volatilen) Zustand überführt werden müssen, um über die Lungen aufgenommen werden zu können. Hierzu dienen spezielle Narkoseverdampfer (Vaporizer), über die das Anästhetikum dem Patienten in einer genau definierten Konzentration zugeführt wird.

Anästhesien unter Verwendung volatiler Anästhetika zählen zu den häufigsten Narkoseformen in Deutschland. Das im Rahmen der vorliegenden Studie verwendete Inhalationsanästhetikum Sevofluran ist ein halogenierter Fluoromethyl-Polyfluoroisoprophyläther.

Die anästhetische Potenz eines volatilen Anästhetikums wird durch die minimale alveoläre Konzentration (MAC) beschrieben. Der MAC-Wert ist definiert als die Konzentration eines Inhalationsanästhetikums, bei der 50 % der Patienten auf einen definierten Schmerzreiz (Hautinzision) keine Abwehrreaktion mehr zeigen. Je niedriger der MAC-Wert, desto potenter ist das Anästhetikum. Der MAC-Wert reduziert sich u.a. mit dem Lebensalter, bei Schwangeren sowie bei Anämie, Hypotension und Hypothermie. Im Gegensatz hierzu steigt er bei Hyperthermie (Fieber), Kinder und Jugendlichen sowie bei chronischem Alkoholabusus [17].

Nachfolgend die physikalisch-chemischen Eigenschaften, der Blut-Gas-Verteilungskoeffizient (VK) sowie der durchschnittliche MAC-Wert für Sevofluran [nach 21]:

Chemische Formel	$C_4H_3OF_7$
Siedepunkt (°C)	58,5
Dampfdruck (kPa/mmHg)	21,3/160
Blut-Gas-VK	0,7
MAC-Wert (Vol.-%)	2,05
Metabolisierungsrate (%)	3 - 5

Neben neuro- und kardioprotektiven Eigenschaften werden Sevofluran sowohl antiischämische als auch antiinflammatorische Effekte zugeschrieben [17, 22-24]. Die immunmodulatorische Wirkung der volatilen Anästhetika konnte in einer Vielzahl an Studien gezeigt werden. So beobachtete man u.a. eine supprimierende Wirkung auf Leukozyten, proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β , IL-8 und TNF- α [8, 25] sowie eine verminderte Produktion leukozytärer Zelloberflächenrezeptoren wie Mac-1 [7] und reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) [3, 26].

Trotz intensiver Forschung sind die genauen Wirkmechanismen der volatilen Anästhetika bisher nicht bekannt. Ein wesentlicher Grund hierfür dürfte einerseits in der hohen Komplexität und Redundanz des Gehirns, sowie andererseits in den noch wenig erforschten biochemischen Grundlagen des Bewusstseins, liegen.

Nach derzeitigem Wissensstand geht man davon aus, dass volatile Anästhetika die Wirkung inhibitorischer postsynaptischer Ionenkanäle verstärken und die exzitatorischer postsynaptischer Ionenkanäle inhibieren, wodurch die neuronale Reizweiterleitung gehemmt wird. So wird Sevofluran eine Verschiebung des GABA/NMDA-Gleichgewichtes zugunsten der GABAergen Hemmung zugeschrieben [17, 23, 27, 28].

1.5 Nebenwirkungen der extrakorporalen Zirkulation

Neben den vielseitigen Vorteilen der Verwendung einer extrakorporalen Zirkulation bringt der Einsatz der HLM auch unvermeidbare nachteilige Effekte mit sich [29]. Als wichtigster Faktor hierbei wird der Kontakt der Blutbestandteile mit den künstlichen Oberflächen des extrakorporalen Kreislaufs hervorgehoben [5]. Abnorme mechanische Scherkräfte, Hämodilution sowie die Vollheparinisierung stellen weitere unphysiologische Bedingungen für den menschlichen Organismus dar. Dies kann zu vielfältigen Veränderungen der Proteine und der zellulären Bestandteilen des Blutes, wie z.B. einer Aktivierung von Blutgerinnungskaskaden und Thrombozyten respektive Leukozyten etc. führen.

Die Stimulation der Gerinnungs- und Fibrinolysekaskade mit Thrombozytenfunktionsstörungen, Hämolyse, sowie die Initiierung einer inflammatorischen Reaktion stellen für den menschlichen Körper eine Belastungssituation dar, auf die der Organismus in vielfältiger Art und Weise reagiert. Diese Komplikationen manifestieren sich klinisch durch Funktionsstörungen des Herzens, wie z.B. Rhythmusstörungen oder eine verringerte myokardiale Kontraktilität. Aber auch Störungen der Lungen, des Gastrointestinaltraktes, der Nieren, neurologische Komplikationen sowie ausgeprägte Störungen der Blutgerinnung nach Durchführung einer koronaren Bypassoperation unter HLM-Einsatz sind beschrieben [30-33]. Nach derzeitigem Kenntnisstand sind viele dieser Organdysfunktionen auf eine generalisierte und überschießende Aktivierung des Immunsystems zurückführbar [4, 34-36]. Dieses Krankheitsbild der systemischen Ausbreitung eines inflammatorischen Geschehens, unabhängig von seiner Genese, wird als Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) bezeichnet [37].

1.5.1 SIRS

Auf der Konsensuskonferenz des American College of Chest Physicians (ACCP) und der Society of Critical Care Medicine (SCCM) im Jahre 1991 wurde die Manifestation eines SIRS durch das Vorliegen von mindestens zwei der folgenden vier klinischen Kriterien definiert:

- Körperkerntemperatur $> 38\text{ °C}$ oder $< 36\text{ °C}$
- Herzfrequenz > 90 Schläge/Minute
- Atemfrequenz > 20 Atemzüge/Minute, bzw. Hyperventilation mit $\text{PaCO}_2 < 32\text{ mmHg}$
- Leukozytenzahl $> 12.000\text{ Zellen/mm}^3$ oder $< 4.000\text{ Zellen/mm}^3$ oder $> 10\%$ unreife neutrophile Granulozyten im Differentialblutbild [nach 37]

Gelingt es dem Organismus nicht adäquat auf diese generalisierte Entzündungsreaktion mit gegenregulatorischen antiinflammatorischen

Kompensationsmechanismen zu reagieren, kann ein SIRS zu einem Multiorganversagen (MODS) führen, welches mit einer signifikant erhöhten postoperativen Morbidität und Mortalität assoziiert ist. Die Inzidenz eines MODS im Rahmen dieser systemischen Inflammation nach EKZ wird mit 11 % angegeben, wobei die Letalität bei 41 % liegt [38].

Die Ursachen einer generalisierten Entzündungsreaktion sind multifaktoriell. Es handelt sich um ein komplexes Zusammenspiel humoraler und zellulärer Immunkomponenten. Neben einer vermehrten Synthese verschiedener proinflammatorischer Zytokine, sind weitere auslösende Faktoren wie die Aktivierung, Generierung beziehungsweise Expression zahlreicher Protein-Kaskade-Systeme, darunter die des Gerinnungs-, Fibrinolyse- und Komplement-Systems beschrieben. Eine entscheidende Rolle spielen ebenfalls eine Stimulierung der Leukozyten einschließlich der Expression von Adhäsionsmolekülen, sowie das Freisetzen verschiedener endogener Substanzen wie Stickstoffintermediate, Sauerstoffradikale, Arachidonsäuremetabolite und Endothelin [4, 5, 39].

1.6 Thrombozyten, Leukozyten und Zytokine

Die im Rahmen dieser Studie durchgeführten Untersuchungen wurden insbesondere in Bezug auf die Bildung von Thrombozyten-Leukozyten Aggregaten, die Aktivierung von Leukozyten sowie auf die Zytokinbildung während ex vivo EKZ vorgenommen. Aus diesem Grund werden diese Faktoren im Folgenden näher beschrieben.

1.6.1 Thrombozyten

1.6.1.1 Morphologie der Thrombozyten

Thrombozyten, auch Blutplättchen genannt, sind mit einem Durchmesser von 1-4 μm die kleinsten zellulären Elemente des Blutes. Im unstimulierten Zustand zirkulieren die Blutplättchen in ihrer diskoiden Ruheform. Die physiologische Thrombozytenzahl im Blut beträgt 165.000 bis 415.000 pro μl Blut [40]. Sie werden vom endoplasmatischen Retikulum der polyploiden Megakaryozyten im Knochenmark gebildet. Thrombozyten besitzen keinen Zellkern und werden aus

diesem Grund auch als „anukläre Zellen“ bezeichnet; dennoch verfügen sie über genetische Informationen in Form von Gentranskripten (Messenger RNA, mRNA). Mit Verlust der Reste an mRNA sind sie jedoch nicht mehr zur Proteinbiosynthese befähigt [41]. Die vielfältigen Funktionen der Thrombozyten bei der Blutstillung, der Gefäßreparatur und der Entzündung bedingen morphologische Veränderungen, die unter Punkt 1.6.1.2 detailliert aufgeführt werden. Thrombozyten werden im retikuloendotheliale System der Leber, Lunge und Milz abgebaut. Ihre durchschnittliche Lebensdauer beträgt 7 bis 10 Tage, wobei rund 70 % ihres Bestandes im Blut zirkuliert und 30 % in der Milz gespeichert ist [40, 42-44].

1.6.1.2 Thrombozytenaktivierung

Die Aktivierung der Thrombozyten durch lösliche Agonisten wie z.B. Adenosindiphosphat (ADP) oder Thrombin sowie auch Adhäsion führen zu einer Formveränderung aus den nichtaktivierten diskoiden Partikeln zu einem aktivierten Zustand der Thrombozyten. Dieser so genannte „shape change“ mit Ausbildung einer Kugelform durch Zusammenziehen des Zytoskeletts sowie der Bildung von Pseudopodien - welche Ausstülpungen der Plasmamembran darstellen - führt zu einer deutlichen Vergrößerung der Thrombozytenoberfläche von durchschnittlich $8 \mu\text{m}^2$ auf bis zu $13 \mu\text{m}^2$.

Die Thrombozytenaktivierung löst weitere Reaktionen aus: Exozytose bringt adhäsive Rezeptoren an die Oberfläche der Thrombozyten („release reaction“) und bewirkt durch die Sekretion von Agonisten die Aktivierung von Thrombozyten und Leukozyten in ihrer Umgebung.

Zu diesen thrombozytären Adhäsionsmolekülen zählen unter anderem die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Rezeptoren P-Selektin (CD62P, cluster of differentiation 62P) und Glykoprotein (GP) IIb/IIIa (CD41/CD61, $\alpha_{\text{IIb}}\beta_{\text{III}}$) [43, 44].

1.6.1.2.1 P-Selektin (CD62P)

P-Selektin befindet sich in den α -Granula von ruhenden Thrombozyten und in den Weibel-Palade-Körperchen von unstimulierten Endothelzellen [45, 46]. Die

Aktivierung von Thrombozyten führt zu einer Degranulierung der α -Granula und damit einhergehend zu einer Oberflächenexpression von P-Selektin.

P-Selektin ist bedeutend für den „cross-talk“ zwischen Thrombozyten und Leukozyten und vermittelt die initiale Interaktion verschiedener Leukozyten-Subtypen, besonders neutrophiler Granulozyten und Monozyten, mit Thrombozyten, Leukozyten und Endothelzellen. Es moduliert somit das Immunsystems und stabilisiert als lösliches sCD62P zudem arterielle Thromben [47-50].

P-Selektin dient als Standardparameter zur durchflusszytometrischen Bestimmung der Thrombozytenaktivierung in experimentellen Untersuchungen, da das Glykopeptid nicht auf ruhenden Blutplättchen exprimiert wird, sondern erst nach Aktivierung auf deren Oberfläche nachweisbar ist [43, 51-53].

Als Rezeptor für P-Selektin dient der leukozytäre P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 (PSGL-1, CD162), welcher nach Aktivierung an der Oberfläche von Monozyten, polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) und Lymphozyten exprimiert wird [54, 55].

1.6.1.2.2 GPIIb/IIIa (CD41/CD61, $\alpha_{IIb}\beta_{III}$)

Das thrombozytäre GPIIb/IIIa besteht aus einer α - (IIb) und einer nicht kovalent gebundenen β -Untereinheit (IIIa) und ist zahlenmäßig das am häufigsten vorkommende Membranglykopeptid des Thrombozyten. GPIIb/IIIa liegt zu 70 % exprimiert auf der Oberfläche des Blutplättchens vor, 30 % werden erst nach Thrombozytenaktivierung aus dem offenen kanalikulären System und den α -Granula zur Oberfläche transportiert und dort präsentiert.

Zentrale Aufgabe des GPIIb/IIIa-Rezeptors ist die Bindung von löslichem Fibrinogen an der Oberfläche aktivierter Thrombozyten und damit die Initiierung der Thrombozytenaggregation. Die bivalenten Fibrinogenmoleküle bilden Brücken zwischen den Thrombozyten und vermitteln auf diese Weise den Kontakt und die Vernetzung der Thrombozyten untereinander [43, 44].

In seinem nicht aktivierten, niedrig affinen Ruhezustand kann der GPIIb/IIIa-Rezeptor jedoch nur immobilisiertes, nicht aber lösliches plasmatisches Fibrinogen binden. Diese initiale Interaktion von Fibrinogen ist ein prinzipiell

reversibler Vorgang. Stimuliert man Thrombozyten, erfährt der GPIIb/IIIa-Rezeptor eine Konformationsveränderung von seinem niedrig affinen, in einen hoch affinen Funktionszustand, wodurch eine Bindung von löslichem Fibrinogen an die Thrombozytenoberfläche ermöglicht wird. Dieser durch „inside-out signaling“ vermittelter Aktivierung kommt eine zentrale Bedeutung zu [56, 57]. An dem nun aktivierten GPIIb/IIIa-Rezeptor kommt es durch die starke Bindung an Fibrinogen zu einer weiteren Konformationsänderung des Integrin-Rezeptors, mit folgender Aktivierungsverstärkung intrazellulärer Signale („outside-in signaling“) und der Freisetzung thrombozytärer Granula-Inhaltsstoffe, welche wiederum zu einer irreversiblen Fibrinogenbindung an den GPIIb/IIIa-Rezeptor führt [44, 56, 58-60]. Der GPIIb/IIIa-Rezeptor ist jedoch nicht selektiv für Fibrinogen, auch andere im Plasma oder Subendothel befindliche Adhäsionsproteine wie zum Beispiel der Von-Willebrand-Faktor (vWF), Fibronectin und Vitronectin, können an den aktivierten GPIIb/IIIa-Rezeptor binden [56, 61].

Auch im Rahmen der Interaktion von Thrombozyten und Leukozyten, beziehungsweise der Bildung von Thrombozyten-Leukozyten Aggregaten, spielt der GPIIb/IIIa-Rezeptor eine entscheidende Rolle. Die Wechselwirkung zwischen diesen zellulären Blutbestandteilen wird nicht nur direkt (z.B. über P-Selektin) vermittelt [49], sondern kann auch indirekt über das Brückenmolekül Fibrinogen zustande kommen. Die stabile Adhäsion der Leukozyten an die aktivierten Thrombozyten erfolgt, indem Fibrinogen sowohl an GPIIb/IIIa auf Blutplättchen, als auch an Mac-1 (Macrophage-1 antigen, CD11b/CD18, $\alpha M\beta 2$) der Leukozyten bindet. Diese Interaktion spielt eine besondere Rolle bei der Ausbildung von PMN-Thrombozyten Aggregaten [43, 62, 63].

1.6.2 Leukozyten

Im folgenden Abschnitt werden einige zentrale Komponenten des Immunsystems beschrieben. Die Immunologie (lateinisch immunis = frei sein von) befasst sich mit den Mechanismen, mit denen sich ein Organismus gegen ihn bedrohende körperfremde oder körpereigene Strukturen schützt.

Das humane Immunsystem ist aus einem komplexen Netzwerk von zellulären und humoralen Faktoren, welche sich wechselseitig regulieren, aufgebaut. Des Weiteren lässt sich die Immunität nach dem Entwicklungszeitpunkt und seiner Funktionsweise in eine angeborene (Antigen-unspezifisch) und eine erworbene, oder „adaptive“, Immunität (Antigen-spezifisch) einteilen.

Leukozyten, auch als weiße Blutkörperchen bezeichnet, stellen die im Blut zirkulierenden immunkompetenten Zellen des körpereigenen Abwehrsystems dar und sind als wesentlicher Bestandteil des Immunsystems sowohl an der spezifischen, als auch an der unspezifischen Abwehr beteiligt. Die Neubildung der Leukozyten wird als Leukopoese bezeichnet. Am Anfang der Leukopoese stehen omnipotente hämatopoetische Stammzellen. Aus diesen differenzieren sich die pluripotenten myeloischen und lymphoiden Stammzellen der Granulo-, Mono- und Lymphopoese.

Leukopoese ist ein komplexer Prozess und findet größtenteils im Knochenmark (Granulozyten, Monozyten und einige Lymphozyten) und teils im lymphatischen Gewebe von Milz, Thymus und Lymphknoten (Lymphozyten und Plasmazellen) statt [42, 64].

1.6.2.1 Morphologie und Funktion der Leukozyten

Die physiologischen Leukozytenwerte im Blut sind altersabhängig und liegen beim erwachsenen Menschen zwischen 3.500 und 9.000 pro μl Blut. Im Normalfall zirkuliert jedoch nur ein kleiner Teil der Leukozyten im Blutkreislauf. Die Mehrzahl der weißen Blutkörperchen befindet sich im Knochenmark sowie in den lymphatischen Organen. Ihr mittlerer Durchmesser schwankt zwischen 7 μm bei Lymphozyten und 20 μm bei Monozyten. Die Lebensdauer der weißen Blutkörperchen ist stark variabel und reicht von wenigen Stunden bis Tagen bei den Granulozyten bis hin zu Jahrzehnten bei den Gedächtniszellen der Lymphozyten [64, 65].

Aufgrund ihrer Abstammung, Morphologie, des Färbeverhaltens bei der Pappenheim-Färbung (MGG = Kombination der May-Grünwald- mit der Giemsa-Färbung) und ihrer Funktion lassen sich Leukozyten vereinfacht in unterschiedliche Klassen einteilen, was auch bei der Erstellung und

Interpretation des sogenannten Differentialblutbilds von Bedeutung ist. Diese Leukozytenarten sind (mit durchschnittlichen prozentualen Angaben der Anteile an der Gesamtleukozytenzahl) [nach 66] im folgenden:

- *Granulozyten*
 - neutrophile Granulozyten 55 - 65 %
 - eosinophile Granulozyten 2 - 4 %
 - basophile Granulozyten 0,5 - 1 %
- *Lymphozyten* 20 - 40 %
- *Monozyten* 4 - 7 %

Ihr jeweiliger prozentualer Anteil an der Gesamtzahl der Leukozyten ist trotz physiologischer Schwankungen recht charakteristisch. Im Rahmen von Erkrankungen und Entzündungsprozessen können allerdings erhebliche Verschiebungen im Zahlenverhältnis auftreten [64].

1.6.2.1.1 Granulozyten

Aufgrund des für sie charakteristischen gelappten Kerns und der reichhaltig im Zytoplasma lokalisierten Granula werden Granulozyten auch als polymorphkernige Leukozyten bezeichnet. Mit einem Anteil von über 60 % an der Gesamtpopulation aller weißen Blutkörperchen stellen sie den Hauptbestandteil der zellulären Abwehr des Menschen dar. Ihre Funktion liegt vor allem in der unspezifischen Abwehr von Bakterien, Parasiten und Pilzen.

Im Rahmen der akuten Entzündungsreaktion und Infektionen spielen sie eine vielseitige und essentielle Rolle. Die Granulopoese im Knochenmark steigert sich signifikant und durch ihre Fähigkeit der aktiven Migration verlassen die Granulozyten die Blutbahn und wandern in Gewebe ein, in denen ihre Abwehrfunktion benötigt wird.

An nach Pappenheim gefärbten Blutaussstrichen kann man nach Art der Anfärbung der Granula drei verschiedene Formen von Granulozyten unterscheiden. Im folgenden sind dies neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten [64, 66].

1.6.2.1.1.1 Neutrophile (polymorphkernige) Granulozyten

Der Zellkern der neutrophilen Granulozyten ist je nach Alter der Zellen stabförmig bis stark gelappt. Charakteristisch für ausgereifte Zellen sind drei bis fünf Kernsegmente, die nur durch fadenförmige Chromatinbrücken miteinander verbunden sind. Aufgrund dieses variabel gelappten Zellkerns werden sie auch als polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) bezeichnet und stellen die zahlenmäßig größte Subpopulation (etwa 90 % der Granulozyten oder 55 % der Gesamtleukozyten) der im Blut zirkulierenden weißen Blutkörperchen, dar [65]. Sie sind die bedeutendsten Zellen der angeborenen Immunantwort. Neutrophile Granulozyten sind zur Phagozytose befähigt und damit in der Lage, verschiedenste Mikroorganismen ins Zellinnere aufzunehmen und diese mithilfe degenerierender Enzyme, welche sich in ihren Granula befinden, abzutöten.

PMN besitzen drei Typen von Granula, deren Enzymausstattung die Grundlage ihrer Wirksamkeit gegen zahlreiche Mikroorganismen darstellt.

Primäre (azurophile) Granula machen etwa 1/3 der Granula aus und enthalten unter anderem verschiedene saure Hydrolasen, Glykosidasen, Lysozym, Defensine und Proteasen.

Sekundäre (spezifische) Granula beinhalten hauptsächlich Enzyme, welche an der Mobilisierung von Entzündungsmediatoren und der Komplementaktivierung beteiligt sind. Hierzu zählen Lysozym, Laktoferrin und Histaminase.

Tertiäre (Gelatinase-enthaltende) Granula enthalten unter anderem Matrixmetalloproteinasen, welche extrazelluläre Matrix abbauen können und damit die Migration der Leukozyten durch Gewebe ermöglichen [64, 65, 67].

1.6.2.1.1.2 Eosinophile (polymorphkernige) Granulozyten

Eosinophile Granulozyten machen im peripheren Blut 2 - 4 % der weißen Blutkörperchen aus und enthalten Zytoplasmagranula, die sich mit dem sauren Farbstoff Eosin intensiv rot anfärben lassen (Azidophilie). Die Granula liegen in der Regel sehr dicht und verdecken teilweise den meist aus zwei Segmenten aufgebauten Zellkern. Obwohl eosinophile Granulozyten, wie auch PMN, zur Phagozytose befähigt sind, neigen sie eher dazu nach Oberflächenkontakt (z.B. mit einer opsonisierten Zielzelle im Rahmen der antikörperabhängigen

Zytotoxizität) ihren Granulainhalt an das umgebende Milieu abzugeben (sog. Degranulation), wodurch sie in der Lage sind, größere extrazelluläre Organismen, wie z.B. Parasiten, abzutöten.

Neben dem von ihnen sezernierten Major Basic Protein finden sich noch weitere zytotoxische Substanzen wie das eosinophile kationische Protein sowie die Eosinophilenperoxidase in ihren Granula.

Darüber hinaus initiieren und verstärken eosinophile Granulozyten, durch die Freisetzung einer Vielzahl von Zytokinen, Prostaglandinen und Leukotrienen, Entzündungsreaktionen. Aufgrund dieser entzündungs- und immunmodulierenden Ausstattung sind Eosinophile die entscheidenden zellulären Elemente bei der allergischen Immunantwort [66, 67].

1.6.2.1.1.3 Basophile (polymorphkernige) Granulozyten

Mit einem Anteil von unter 1 % stellen basophile Granulozyten den geringsten Anteil der Leukozyten im peripheren Blut dar. Basophile Granulozyten besitzen einen meist hantelförmig segmentierten Kern und Granula, die sich nach Färbung mit basischen Farbstoffen tief blauschwarz präsentieren. Die Granula enthalten potente chemische Mediatoren wie Histamin, Heparin, Prostaglandine, Leukotriene und Zytokine, welche für eine Vielzahl von immunologischen und Entzündungsprozessen verantwortlich sind. Die Ausschüttung dieser Stoffe durch Degranulation wird über hoch affine Rezeptoren (FcεRI) für Immunglobulin E (IgE) an der Zelloberfläche vermittelt. Basophile Granulozyten des Blutes und gewebständige Mastzellen (Mastozyten) weisen vielfältige Ähnlichkeiten in Aufbau und Funktion auf. So spielen beide Zellarten eine zentrale Rolle in der Immunantwort des Körpers und der Entstehung allergischer und anaphylaktischer Reaktionen (Typ-1 nach Coombs und Gell) sowie eine komplementäre Rolle bei der Abwehr von Parasiten [66-68].

1.6.2.1.2 Lymphozyten

20 bis 40 % der Leukozyten des peripheren Blutes sind Lymphozyten. Sie stellen eine weitere Untergruppe der Leukozyten dar und üben vielfältige

Funktionen im Rahmen der körpereigenen, erworbenen (adaptiven) Immunabwehr aus. Lymphozyten sind diejenigen Zellen des Körpers, die Antigene spezifisch erkennen und unterscheiden können. Sie sind damit verantwortlich für die beiden kennzeichnenden Eigenschaften des adaptiven Immunsystems: Spezifität und Erinnerung. Entsprechend ihrer unterschiedlichen Aufgaben lassen sich Lymphozyten in verschiedene Typen unterteilen. Hierzu zählen die T- und B-Lymphozyten sowie die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). Die Initialen T und B leiten sich von den primären Organen der Zelldifferenzierung ab. Beim Menschen findet dies in Thymus (T-Zellen) sowie im Knochenmark und der fetalen Leber (B-Zellen) statt. Diese funktionelle Unterscheidung der heterogenen Gruppe der Lymphozyten bedarf jedoch aufwändiger immunzytologischer und/oder molekularbiologischer Methoden und gelingt nicht lichtmikroskopisch.

Im Differentialblutbild (lichtmikroskopisch) erscheinen Lymphozyten als rundkernige Zellen, die meist von einem nur sehr schmalen basophilen Zytoplasmasaum umgeben sind; wenige Zellen weisen einen etwas breiteren Saum auf. Nach ihrem Erscheinungsbild bei der Differenzierung werden sie daher häufig in kleine und große Lymphozyten eingeteilt, was die Abgrenzung von den Granulozyten, deren Kerne zumeist unregelmäßig, teils stäbchenförmig gelappt sind, und weiterer zellulärer Blutbestandteile, ermöglicht [66, 68].

1.6.2.1.2.1 T-Lymphozyten (T-Zellen)

Alle T-Lymphozyten tragen antigenspezifische T-Zell-Rezeptoren (TCR) an der Außenseite ihrer Plasmamembran. Die T-Zellen sind die Träger der spezifischen zellulären Immunität und erwerben ihre Immunkompetenz im Thymus. Im Unterschied zu den von den B-Lymphozyten gebildeten Antikörpern (AK), erkennt der Antigenrezeptor der T-Lymphozyten (TCR) körperfremde Strukturen jedoch nur, wenn deren Antigene auf spezifischen körpereigenen Rezeptoren, den vom Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) codierten Proteinkomplexen der Klasse I und II, auf der Zelloberfläche präsentiert werden (MHC-Restriktion). Nach dem Antigenkontakt erfolgt je nach Art und Präsentation des Antigens die Stimulation und Proliferation der vier

verschiedenen T-Zellsubpopulationen, welche dann unterschiedliche Aufgaben im Rahmen der zellulären Immunantwort übernehmen. Im Folgenden sind dies T-Helferzellen, zytotoxische T-Zellen (T-Killerzellen), T-Gedächtniszellen sowie regulatorische T-Zellen.

T-Helferzellen (T_H): Diese in der Regel CD4-positive ($CD4^+$) Subpopulation der T-Zellen spielt bei der Aktivierung und Regulation der Immunreaktion eine Schlüsselrolle. T-Helferzellen sezernieren nach Antigenpräsentation durch MHC-II-Moleküle verschiedene Zytokine und können in zwei funktionsspezifische Subgruppen eingeteilt werden. Je nachdem, ob diese Botenstoffe an der zellvermittelten Immunantwort beteiligt sind, oder ob die humorale Immunantwort der B-Lymphozyten stimuliert wird. Typ-1-Helferzellen (T_{H1}) sezernieren typischerweise IL-2 (Interleukin), IFN- γ (Interferon) und TNF- α (Tumornekrosefaktor), durch welche eine Aktivierung und Differenzierung von Makrophagen sowie der zytotoxischen $CD8^+$ Zellen erfolgt. T_{H1} sind somit an der zellulären Immunantwort beteiligt. Die Hauptfunktion der Typ-2-Helferzellen (T_{H2}) ist dagegen die B-Zell-Aktivierung und liegt damit im Bereich der humoralen Immunantwort. Besonders den Zytokinen IL-4, IL-5 und IL-6 kommt hierbei eine tragende Rolle zu.

Zytotoxische T-Zellen (T_C , T-Killerzellen): Sie gehören zur Gruppe der CD8-positiven ($CD8^+$) Zellen, welche Peptide an MHC-Klasse-I-Molekülen erkennen können. Nach Aktivierung der T_C setzt diese den zytotoxischen Inhalt ihrer Granula, unter anderem Perforin, Granenzym und Granulysin, durch Exozytose frei und bewirkt so den programmierten Zelltod (Apoptose) der infizierten Zelle. Des Weiteren tragen aktivierte T_C über die Produktion und Sekretion von Zytokinen (unter anderem IFN- γ , TNF- α und - β), zur Aktivierung auch unspezifischer Abwehrvorgänge bei.

T-Gedächtniszellen: Gedächtniszellen sind ausdifferenzierte T-Lymphozyten die eine Art „immunologisches Gedächtnis“ bilden, indem sie nach deren Aktivierung im Blut verbleiben. Im Falle einer erneuten Exposition gegenüber dem spezifischen Erreger sind die T-Gedächtniszellen in der Lage eine schnelle und effektive Immunreaktion zu initiieren. Bei einer Reinfektion mit demselben Antigen kann es so zu einer wirkungsvollen Sekundärantwort mit einer um das

10- bis 100fach gesteigerten Expression von spezifischen T-Zellen kommen. Diese Erinnerungsrolle kann sowohl von CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Gedächtniszellen ausgeübt werden.

Regulatorische T-Zellen (T_{Reg}): Diese, früher auch als Suppressor-T-Zellen bezeichnete, Subpopulation der T-Lymphozyten hat die Aufgabe die Aktivierung des Immunsystems in bestimmten Situationen zu unterdrücken und dadurch die Selbsttoleranz des Immunsystems zu regulieren. Sie sorgen für ein immunologisches Gleichgewicht zwischen der Bekämpfung von Pathogenen und der Toleranz des körpereigenen Gewebes. Sie senken somit das Risiko für die Entstehung von Autoimmunerkrankungen und Allergien. Andererseits können T_{Reg} bei viralen Infekten die inflammatorische Abwehr negativ beeinflussen und bei Tumoren die zytotoxische tumorabtötende Immunantwort bremsen [64, 66, 68, 69].

1.6.2.1.2.2 B-Lymphozyten (B-Zellen)

B-Lymphozyten sind Vorläuferzellen der Antikörper-sezernierenden Plasmazellen und somit essentiell für die Ausbildung des humoralen Zweiges der spezifischen Immunantwort. Aktivierte B-Zellen besitzen die Fähigkeit hoch affine B-Gedächtniszellen zu bilden, die bei erneutem Antigenkontakt rasch aktiviert werden können und somit maßgeblich am immunologischen Gedächtnis beteiligt sind.

Reife B-Lymphozyten exprimieren an ihrer Oberfläche transmembranöse Immunglobulinmoleküle, meist IgM und/oder IgD, die so genannten B-Zell-Rezeptoren (BCR) durch welche sie extrazelluläre Antigene spezifisch erkennen und binden können. Zur Aktivierung, also der Aufnahme der spezifischen Antikörperproduktion, reicht diese alleinige Bindung an den BCR in der Regel jedoch nicht aus, so dass ein zweites „Signal“ notwendig wird. Diese Stimulierung kann zum einen vom Antigen selbst (T-Zell-unabhängige Aktivierung), oder deutlich häufiger durch T-Helferzellen vermittelt (T-Zell-abhängige Aktivierung), erfolgen. Im Fall der T-Zell-abhängigen Stimulation wird das Antigen nach Bindung an den BCR internalisiert, dort zu einzelnen Peptiden hydrolysiert und anschließend gemeinsam mit MHC-Klasse-II-

Molekülen wieder als Komplex auf der B-Zell-Oberfläche präsentiert. Erkennt nun der CD4⁺-assoziierte TCR der Typ2-T-Helferzelle (T_H2-Lymphozyt) das Antigen, exprimiert diese nun stimulierende Moleküle wie den CD40-Liganden und verschiedenste Zytokine, welche wiederum den B-Lymphozyten aktivieren. Daraufhin vermehrt sich die B-Zelle (klonale Expansion) und differenziert sich zu einer Antikörper-produzierenden B-Zelle, welche auch als Plasmazelle bezeichnet wird [64, 68, 70].

1.6.2.1.2.3 Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)

Natürliche Killerzellen sind Zellen des angeborenen Immunsystems und gehören zur Gruppe der zytotoxischen Lymphozyten. Wie auch die T- und B-Lymphozyten entwickeln sich NK-Zellen aus lymphatischen Stammzellen im Knochenmark. Morphologisch haben sie das Aussehen großer granulärer Lymphozyten und ähneln den T-Lymphozyten; sie sind jedoch geringfügig größer. Immunhistochemisch sind sie durch die Oberflächenmarker CD56 und CD16 (FcγRIII) charakterisiert. NK-Zellen exprimieren als Bestandteil des angeborenen Immunsystems keine spezifischen Antigen-Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche.

Ihre Hauptfunktion ist es neoplastische und auch virusinfizierte Zellen zu erkennen und mittels zytotoxischer Effektormoleküle wie Perforin und den Granzymen A und B zu eliminieren. Des Weiteren nehmen sie über die Produktion und Sekretion von Zytokinen und Chemokinen, wie z.B. IFN-γ, TNF-α und -β, IL-1, Einfluss auf das angeborene Immunsystem und die Regulation, Entwicklung und den Verlauf der Immunantwort.

NK-Zellen unterscheiden normale, körpereigene Zellen von Tumorzellen und Zellen, die von intrazellulären Mikroorganismen befallen sind, über ein System aus aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren, die mit MHC-Klasse-I-Molekülen auf der Oberfläche der Zielzellen interagieren. Der MHC-I-Komplex kommt auf nahezu allen gesunden Körperzellen vor und inhibiert die NK-Zellaktivität, indem durch die Interaktion mit Rezeptoren auf der Oberfläche der NK-Zellen ein inhibitorischer Signalweg ausgelöst wird. Wird eine Zelle durch Viren infiziert oder entartet maligne, so geht unter Umständen der MHC-I-

Komplex auf der Zelloberfläche verloren. Unter anderem geschieht dies, um der Abwehr durch T-Lymphozyten zu entgehen. Diese verminderte Expression des MHC-I-Komplexes kann jedoch von NK-Zellen erkannt werden („Missing-self-Hypothese“). Das Gleichgewicht von inhibierenden und aktivierenden Rezeptorsignalen geht verloren und die erkrankte Zelle fällt einer durch NK-Zellen ausgelösten Immunreaktion anheim. Eine vorangehende Sensibilisierung ist hierzu nicht erforderlich [64, 68, 69].

1.6.2.1.3 Monozyten

Mit einem Durchmesser von 10 bis 20 µm zählen Monozyten (4 - 7 % der Leukozyten im Blutaussstrich) zu den größten Zellen des peripheren Blutes. Die Monopoese, aus im Knochenmark befindlichen myeloiden oligopotenten Stammzellen, verläuft unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren wie M-CSF (engl. macrophage colony-stimulating factor) und GM-CSF (engl. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) über Monoblasten und Promonozyten zum reifen Monozyten. Monozyten sind mononukleären Zellen die einen mäßig chromatinreichen und meist etwas exzentrisch gelegenen Zellkern besitzen. Er ist vielgestaltig und kann sich bohnen- bzw. nierenförmig präsentieren. Das schwach basophile Zytoplasma enthält feinste, lichtmikroskopisch kaum erkennbare, azurophilen Granula mit reichhaltiger enzymatischer Ausstattung (u.a. Lysozym, saure Phosphatase und Esterase). Zirkulierende Monozyten haben eine Halbwertszeit von 12 bis 100 Stunden. Auf den Reiz von Mediatorstoffen hin wandern sie, dank ihrer Fähigkeit zur aktiven Migration, in das Gewebe ein. Dort differenzieren sie sich mehrheitlich in Abhängigkeit von ihrer Umgebung zu gewebespezifischen Makrophagen. Zu diesem Monozyten/Makrophagen-System gehören unter anderem Alveolarmakrophagen in der Lunge, Kupffer-Sternzellen in der Leber, Langerhans-Zellen in der Haut sowie die Mikroglia des Gehirns. Nach ihrer Umwandlung in Makrophagen ist die Überlebenszeit von den spezifischen Aufgaben und der Funktion abhängig; im Durchschnitt beträgt sie nun 60 Tage [68]. Das Monozyten/Makrophagen-System spielt innerhalb des Immunsystems eine essentielle Rolle sowohl bei

der unspezifischen Sofortabwehr als auch für die Triggerung der spezifischen Immunabwehr.

So sind Monozyten schon vor der Differenzierung zu Makrophagen in der Lage, körperfremde Strukturen wie Mikroorganismen mittels Phagozytose oder Pinozytose aufzunehmen. Nach Prozessierung der Antigene werden diese auf MHC-II-Molekülen der Zellmembran präsentiert. Als typische Antigen-präsentierende Zelle (APC) aktivieren sie Lymphozyten und initiieren auf diese Weise die erworbene Immunabwehr. Des Weiteren sind Makrophagen potente Produzenten von inflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α und IFN- γ , Chemokinen, Wachstumsfaktoren und Komplementfaktoren [66-68].

Die im Rahmen der durchflusszytometrischen Analysen dieser Studie verwendeten humanen Leukozytenmarker werden im folgenden beschrieben.

1.6.2.2.1 CD45 (LCA, PTPRC)

Die transmembranöse Tyrosinphosphatase CD45 (auch LCA für engl. leucocyte common antigen) wird in allen kernhaltigen Zellen des hämatopoetischen Systems, sowie ihrer Vorläuferzellen, exprimiert und ist eines der am häufigsten vertretenen Zelloberflächenproteine. So kann CD45 bis zu 10 % der Oberfläche von T- und B-Zellen bedecken. Auf humanen Zellen können 5 verschiedene Isoformen mit einer molekularen Masse zwischen 180 kD und 240 kD identifiziert werden, die sich auf nahezu allen differenzierten Leukozyten finden [71]. CD45 fungiert daher als Pan-Leukozytenmarker.

Die Funktionen des CD45-Moleküls sind äußerst vielseitig. So stellt CD45 einen essentiellen Regulator der TCR und BCR vermittelten Aktivierung und Differenzierung der Lymphozyten dar. Des Weiteren erfolgt eine Modulation und Steuerung der Rezeptor-Signale unter anderem von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, sowie ein Einfluss auf die Degranulation, Chemotaxis und Phagozytose der immunkompetenten Zellen [72, 73].

1.6.2.2.2 Mac-1 (*Macrophage-1 antigen, CD11b/CD18, α M β 2, CR3*)

Der Mac-1-Rezeptor ist ein Zelloberflächenrezeptor, der zur Gruppe der Leukozyten-Integrine gehört. Das gemeinsame Merkmal, der als Heterodimäre aus einer alpha- und beta-Untereinheit aufgebauten Integrine, ist die gemeinsame invariante β 2-Untereinheit (CD18); sie unterscheiden sich jedoch in ihren variablen α -Ketten. Die α -Untereinheit des Mac-1 wird von CD11b gebildet. Der Mac-1-Oberflächenrezeptor wird spezifisch auf Leukozyten exprimiert. Hierbei sind besonders neutrophile Granulozyten, Monozyten sowie NK-Zellen hervorzuheben [64, 74].

Die konstitutionelle Oberflächenexpression von Mac-1 ist relativ gering, kann aber bei einer Aktivierung der weißen Blutkörperchen schnell auf das rund 5-fache gesteigert werden. Hierbei wird der physiologisch in spezifischen, intrazellulären Granula gespeicherte Rezeptor durch chemotaktische Stimuli, wie z.B. G-CSF und GM-CSF [75], an die Zelloberfläche transloziert. Aus diesem Grund wird die Mac-1 Expression auch als Aktivierungsmarker der Leukozyten genutzt [64, 76]. Mac-1 erfüllt vielfältige Aufgaben im Rahmen des Immun- sowie Gerinnungssystems. Verschiedene Liganden binden an den Rezeptor und aktivieren diesen. So bindet Mac-1 an ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1, CD54) und vermittelt über diese Interaktion eine Leukozytenadhäsion am Endothel [74]. Wie bereits zuvor beschrieben, erfolgt die stabile Adhäsion und Migration der Leukozyten an aktivierte Thrombozyten, indem Fibrinogen sowohl an GPIIb/IIIa auf Thrombozyten, als auch an Mac-1 auf Leukozyten, bindet [63]. Im Rahmen des Komplementsystems bindet der Mac-1-Rezeptor an iC3b (engl. inactivated C3b) auf opsonierten Fremdzellen und Mikroorganismen, was zu einer Komplementaktivierung und Phagozytose führt [77]. Darüber hinaus wird der Rezeptor mit weiteren immunologischen Geschehen wie Chemotaxis [78] und der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität [79] in Verbindung gebracht. Über die Bindung an Faktor X der Gerinnungskaskade kann Mac-1 einen alternativen Weg der Blutgerinnung einleiten [80].

1.6.2.2.3 PMN-Elastase (ELANE, NE)

PMN-Elastase aus humanen polymorphkernigen Granulozyten ist ein kationisches Glykoprotein von 30 kDa und gehört zur Gruppe der neutrophilen Serinproteasen (NSPs). Weitere Serinproteasen sind Cathepsin G (CG) und Proteinase 3 (PR3). NSPs erfüllen neben der Abwehr mikrobieller Pathogene eine Schlüsselrolle im Rahmen der immunologischen Regulation inflammatorischer Prozesse [81]. So führt die Aktivierung neutrophiler Granulozyten zu einer vermehrten Freisetzung der NSPs durch Degranulation aus den azurophilen Granula segmentkerniger neutrophiler Granulozyten oder beim Zerfall dieser Zellen in den extra- und perizellulären Raum. NSPs sind an der Aufarbeitung und Freisetzung spezifischer Zytokine, Chemokine sowie Wachstumsfaktoren beteiligt und modulieren deren biologische Aktivität. So kann PMN-Elastase u.a. die membrangebundene Form von TNF- α in die biologisch aktivere, lösliche Form überführen [82]. Über eine Modulation und Interaktion mit Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1, Mac-1 und weiterer E-Cadherine, sowie mit Oberflächenrezeptoren wie dem Thrombozyten-Integrin GPIIb/IIIa spielt die PMN-Elastase eine essentielle Rolle sowohl bei der Zelladhäsion und -migration als auch bei der Thrombozytenaggregation. PMN-Elastase kann sowohl über die Spaltung des nukleären Transkriptionsfaktors NF- κ B, sowie Caspase-unabhängig, eine Apoptose induzieren. Über eine Aktivierung der Lymphozyten durch NSPs kann die adaptive Immunantwort initiiert werden [81, 83].

Serinproteasen unterliegen einem komplexen Netzwerk interagierender Kaskaden und Inhibitoren, welche eine überschießende Reaktion, und damit nachteilige Effekte der NSPs für den Organismus, abwenden sollen. Zu diesen physiologischen Gegenspielern der NSPs zählen u.a. α_1 -Antitrypsin und α_2 -Makroglobulin [42, 83].

1.6.3 Zytokine

Zytokine sind lösliche regulatorische Polypeptide, die von den Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems, sowie von Endothel- und Epithelzellen, sezerniert werden. Sie werden als Antwort auf Mikroorganismen

oder Antigene zur Immunmodulation und zur Regulierung inflammatorischer Prozesse sowie als Antwort auf eine lokale Schädigung hin gebildet. Gemeinsam mit anderen Signalmolekülen nehmen sie eine essentielle Rolle bei der Regulation zellulärer und humoraler Immunreaktionen ein. So aktivieren sie im Rahmen des angeborenen Immunsystems Effektorfunktionen der NK-Zellen und Makrophagen. Darüber hinaus stimulieren Zytokine das Wachstum, die Aktivierung und die Differenzierung von Lymphozyten innerhalb des adaptiven Immunsystems. Neben den vielfältigen Aufgaben bei Immun- und Entzündungsreaktionen sind Zytokine auch an der Regulation der Hämatopoese beteiligt [64, 84].

Die Regulation der Zytokin-Synthese und -Sekretion erfolgt auf transkriptioneller und translationaler Ebene. In der Regel erfolgt die Sekretion auf ein spezifisches Signal hin und stellt einen kurzen und zeitlich befristeten Vorgang (sog. „cytokine burst“) dar. Einige Zytokine werden jedoch auch konstitutiv produziert und sezerniert [85]. Zytokine können ihrer Aktivität nach sowohl lokal auf in ihrer Umgebung befindliche Zellen (parakrin), auf die produzierende Zelle selbst (autokrin), sowie systemisch (endokrin) wirken, was in der Bildung komplexer homöostatischer Netzwerke mündet. Die Zytokin-Aktivitäten sind sowohl pleiotrop (ein Zytokin beeinflusst verschiedene Zellen) als auch redundant (verschiedene Zytokine zeigen den gleichen funktionellen Effekt). Bereits kleinste Konzentrationen (im nano- bis pikomolaren Bereich) genügen, um biologische Effekte zu erzielen. Zytokine binden mit hoher Affinität ($K_d = 10^{-10}$ bis 10^{-12} mol/L; d.h. bis zu 10^5 -mal höher als Antigen-Antikörperbindungen und bis zu 10^6 -mal höher als die Bindung immunogener Peptide an MHC-Moleküle) an spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche der Zielzellen und aktivieren Signaltransduktionskaskaden, die zu einer veränderten Genexpression, Stoffwechselaktivität, Zelldifferenzierung, Proliferation, Migration und Apoptose führen können. Nach ihrer Hauptaktivität werden Zytokine in fünf Klassen eingeteilt: Interleukine (IL), Interferone (IFN), koloniestimulierende Faktoren (CSF), Tumornekrosefaktoren (TNF) und Chemokine. Des Weiteren erfolgt eine Unterteilung in proinflammatorisch- und antiinflammatorisch-wirkende Zytokine. Zu den proinflammatorischen Zytokinen

zählen u.a. IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF- α , die eine Entzündungsreaktion in Gang setzen und/oder diese verstärken. TGF- β sowie IL-10 zählen zu den bedeutendsten antiinflammatorischen Zytokinen, welche einer Entzündungsreaktion entgegenwirken. Ein ausgewogenes Gleichgewicht von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen ist zur Aufrechterhaltung einer normalen Organfunktion essentiell [42, 64].

Im Nachfolgenden werden die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zytokine näher beschrieben.

1.6.3.1 TNF- α (Tumornekrosefaktor- α)

TNF- α ist ein proinflammatorisches Zytokin und stellt einen wichtigen Mediator der akuten Entzündungsreaktion im Rahmen der EKZ dar [5]. Seine Freisetzung erfolgt aufgrund verschiedenster Stimuli wie bakterieller, viraler oder parasitärer Antigene [86], hypoxischer oder ischämischer Zustände sowie durch den Kontakt des Blutes mit Fremdoberflächen [87]. Die Namensgebung beruht auf der Entdeckung als Serumfaktor, welcher eine Nekrose von entarteten Zellen initiieren kann. TNF- α wird hauptsächlich von aktivierten Makrophagen, in deutlich geringerem Maße aber auch von Monozyten, Lymphozyten, Endothelzellen sowie vom Myokard und neuronalem Gewebe gebildet und sezerniert [4, 84]. TNF wird als nicht glykolisiertes Transmembranprotein synthetisiert und exprimiert. Aus dieser membrangebundenen Form erfolgt durch eine gezielte Proteolyse der Metalloproteinase TACE (TNF- α converting enzyme) oder auch der PMN-Elastase [81] die Freisetzung des löslichen 51 kDa TNF- α Homotrimers. Sowohl die lösliche, als auch membrangebundene Form, sind biologisch aktiv [88]. TNF- α wirkt über die von nahezu allen kernhaltigen Zellen exprimierten TNF-Rezeptoren (TNF-R). Diese Bindung induziert über die Rekrutierung von TNF-Rezeptor-assoziierten Faktoren (TRAFs) und verschiedener Zwischenschritte eine Aktivierung der nukleären Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1. Dies führt unter anderem zu einer Zellaktivierung, Zelldifferenzierung sowie zur Ausschüttung weiterer Zytokine und einer Hemmung der Apoptose. Über die

Rekrutierung spezifischer apoptoseinduzierender Komplexe kann TNF- α durch die Aktivierung spezifischer Caspasen jedoch auch eine Apoptose auslösen. Auf neutrophile Granulozyten wirkt TNF- α migrationsfördernd und induziert die Expression von Adhäsionsmolekülen wie P-Selektin, E-Selektin und ICAM-1 auf Endothelzellen, als auch die Freisetzung von Chemokinen [5, 43]. Das Zytokin kann die Sekretion von Kortison, Somatotropin, Glukagon und Adrenalin, sowie die Bildung von sog. Akute-Phase-Proteinen (APPs) in der Leber, steigern [64, 84].

1.6.3.2 IL-1 β

IL-1 β gehört zur Gruppe der Interleukin-1-Familie und stellt eines der potentesten proinflammatorischen Zytokine dar. Aufgrund seiner Fähigkeit, Fieber zu induzieren, wird es gemeinsam mit TNF- α und IL-6 zu den endogenen Pyrogenen gezählt [84]. Der größte Anteil des Zytokins wird in mononukleären Phagozyten, also Monozyten und Makrophagen, produziert. Weitere, zur IL-1-Produktion befähigte Zellen sind polymorphkernige Granulozyten, T- und B-Lymphozyten, Epi- und Endothelzellen sowie Fibroblasten. Die Induktion von IL-1 erfolgt u.a. durch TNF- α und Lipopolysaccharide (LPS) aus der Zellmembran gramnegativer Bakterien [89]. IL-1 β wird zunächst als 33 kDa Vorläuferprotein transkribiert. In speziellen sekretorischen Lysosomen erfolgt die Aktivierung und anschließende Sekretion des nun biologisch aktiven 17 kDa IL-1 β durch die Procaspase-1 (ICE, IL-1 β converting enzyme) [84].

Über die Interaktion an Rezeptoren der Immunglobulin-Superfamilie aktiviert IL-1 β die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1, stimuliert die Bildung weiterer Zytokine wie IL-1, IL-6, TNF- α , IFN- γ ; triggert proinflammatorische Mediatoren wie Cyclooxygenase-2 (COX-2), Phospholipase A₂ (PLA₂) und induzierbare NO-Synthase (iNOS) zu einer gesteigerten Produktion und Sekretion weiterer immunstimulierender Faktoren wie Prostaglandin E₂ (PGE₂), plättchenstimulierender Faktor (engl. platelet activating factor, PAF) und Stickstoffmonoxid (NO). Des Weiteren aktiviert IL-1 β die Gewebemigration von neutrophilen Granulozyten und fördert die Proliferation von T- und B-Zellen mit

anschließender Immunglobulinbildung. Auch die Expression diverser Zelladhäsionsmoleküle wie P-, E- und L-Selektin sowie ICAM-1 wird durch IL-1 β gesteigert [5, 84, 89].

1.6.3.3 IL-8

Interleukin 8 ist ein nicht glykosiliertes Protein mit einem Molekulargewicht von 8 kDa und gehört zur Untergruppe der proinflammatorischen Chemokine, welche überwiegend von immunkompetenten Zellen wie Makrophagen, Monozyten, T-Zellen und Endothelzellen gebildet und sezerniert werden [90]. Die Proteinbiosynthese von IL-8 erfolgt über die Stimulation der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1. Zu diesen Aktivatoren zählen u.a. IL-1, TNF- α , IFN- γ sowie Lipopolysaccharide (LPS) und weitere zelluläre Stressfaktoren. Antiinflammatorische Zytokine wie IL-4 und IL-10 hemmen dagegen die Proteinbiosynthese von IL-8 [84]. Im Rahmen der Inflammation nimmt IL-8 eine Schlüsselrolle ein, indem es als Chemoattractant besonders für neutrophile Granulozyten dient [91]. IL-8 fördert die Chemotaxis und die Expression von Adhäsionsmolekülen, sowie die Leukozytenaktivierung mit Freisetzung reaktiver Sauerstoffradikale und Granula. Des Weiteren fördert IL-8 als chemotaktisches Zytokin die Zellmigration und steigert die Gefäßpermeabilität [92]. IL-8 besitzt eine pro-angiogenetische Wirkung auf Endothelzellen, die sowohl im Rahmen der Wundheilung und inflammatorischer Prozesse, aber auch für die Versorgung und damit das Wachstum von Tumoren, von entscheidender Bedeutung ist [64, 84, 93].

1.7 Wissenschaftliche Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden experimentellen Arbeit war die Analyse der Wirkung des volatilen Anästhetikums Sevofluran auf inflammatorische Prozesse während der normothermen extrakorporalen Zirkulation.

Hierzu wurden systematisch mittels durchflusszytometrischer und enzymimmunologischer Methoden die Expression der Oberflächenrezeptoren Mac-1 und P-Selektin, die Leukozyten-Thrombozyten Aggregatbildung, die Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-8 und TNF- α , die Konzentration der PMN-Elastase sowie das Blutbild im zeitlichen Verlauf der normothermen ex vivo EKZ analysiert.

Im Einzelnen wurden folgende Fragestellungen untersucht:

- Welchen Einfluss zeigt die normotherme ex vivo EKZ auf die oben genannten Versuchsparameter?
- Können Unterschiede hinsichtlich der Versuchsparameter zwischen der Kontroll- und Versuchsgruppe (\triangleq Sevofluran-Gruppe) detektiert werden?

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

2.1.1.1 FACScan™

Fluorescence activated cell scan, Durchflusszytometer (FACScan™, Becton Dickinson (BD) Biosciences, Heidelberg, Deutschland)

Die Durchflusszytometrie ist ein Testverfahren, das mit hoher Flexibilität die quantitative Vermessung und molekulare Charakterisierung von Zellen (und auch zellulärer Mikropartikel) einer Zellsuspension (z.B. Blut, Liquor), erlaubt. Die durchflusszytometrischen Analysen der vorliegenden Studie erfolgten mittels FACScan™ Durchflusszytometer (BD Biosciences). Zur Auswertung der Daten kam die Software CellQuest Pro™ (Version 4.0.2) (BD Biosciences) zum Einsatz.

Die Durchflusszytometrie wird u.a. in der klinischen Routinediagnostik eingesetzt. Hierbei sind besonders die Differenzierung von Leukozyten im Rahmen der Leukämie- und Lymphom-Diagnostik, bei der HIV-Immunophänotypisierung, zur Bestimmung des Hormonrezeptorstatus bei der allgemeinen Tumordiagnostik als auch vielfältige Anwendungsmöglichkeiten zur Diagnostik thrombozytärer Störungen, hervorzuheben. Des Weiteren wird die Durchflusszytometrie häufig zu Forschungszwecken eingesetzt. Hierbei besteht die wohl gebräuchlichste Anwendung darin, bestimmte Eigenschaften von Zellen oder Zellpopulationen, wie z.B. die Expression von Oberflächen- bzw. intrazellulären Molekülen, auf Einzelzelebene zu analysieren. Die Durchflusszytometrie ermöglicht jedoch eine Vielzahl an weiteren Analysemöglichkeiten. So sind u.a. die Untersuchung von Zellzyklus und Apoptose, die Bestimmung von intrazellulärem pH-Milieu sowie Ionengehalt, zu nennen.

Die durchflusszytometrische Analyse basiert auf der Messung von Fluoreszenz und Lichtstreuung einzelner Zellen in dem Moment, in dem diese einen rechtwinklig zum Probenfluss angeordneten fokussierten Lichtstrahl (= Laser) passieren. Hierzu erzeugt eine Trägerflüssigkeit (FACSFlow™, BD Biosciences) eine laminare Strömung (Hüllstrom), in welcher die Zellen oder Partikel einzeln

ein komplexes Messsystem, bestehend aus einem Argon-Ionen-Laser, Linsen, Spiegeln, Filtern und Detektoren, passieren. Die Analyse der Zellen besteht aus der Summe vieler schnell aufeinanderfolgender Einzelzellmessungen.

Mit Hilfe des FACScan™ lassen sich mehrere Parameter der Zellen bestimmen. Trifft der Laser auf eine Zelle, so streut diese aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften Licht mit unterschiedlicher Quantität und Qualität.

Die Vorwärts-Lichtstreuung (FSC, forward scatter) dient als Maß für die Beugung des Lichts in der Achse des Laserstrahls und korreliert mit der Zellgröße. Die seitliche Lichtstreuung (SSC, sideward scatter) - als Maß für die Lichtbrechung und Reflexion im Winkel von 90° zur Achse des einfallenden Lichts - wird im Gegensatz hierzu vor allem von der Zellkomplexität (u.a. Oberflächenbeschaffenheit, Granularität, Kern-Plasma-Relation) beeinflusst.

Neben den Streulichtdetektoren verfügt das FACScan™ zusätzlich über drei weitere Detektoren (FL1 - 3), die emittiertes Fluoreszenzlicht erfassen können. Dadurch können selektiv bestimmte Wellenlängenbereiche gemessen werden, die von den angeregten Fluoreszenz-Molekülen auf oder in den Zellen, ausgesandt werden. Die Fluoreszenzmessung ist abhängig von der Probenvorbereitung, da die Wellenlänge vom jeweils eingesetzten Fluorochrom abhängig ist. Durch den Einsatz von Antikörpern, die mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen (im Rahmen der vorliegenden Arbeit FITC (Fluoresceinisothiocyanat) und PE (Phycoerythrin)) markiert sind, kann innerhalb einer Probe die Präsenz mehrerer unterschiedlicher Oberflächenantigene auf den Zellen nachgewiesen werden.

Nachfolgend die spektralen Eigenschaften für FITC und PE:

	Spektralbereich des Filters	Fluoreszenzfarbstoff	Farbe	Emmissionsmaximum
FL1	515 - 545 nm	FITC (Fluoresceinisothiocyanat)	grün	520 nm
FL2	620 - 666 nm	PE (Phycoerythrin)	orange	576 nm

Hierbei ist zu beachten, dass die verwendeten Fluorochrome von der Wellenlänge des Argon-Ionen-Lasers ($\lambda = 488 \text{ nm}$) angeregt werden müssen und bei Mehrfarbenfluoreszenzanalysen in unterschiedlicher Wellenlänge das Licht emittieren.

Für die Auswertung der erhobenen Daten stehen im wesentlichen zwei Verfahren zur Verfügung:

- *Dotplot*: Zwei Parameter werden in einem Koordinatensystem gegeneinander aufgetragen, wobei jede einzelne Zelle als ein Punkt dargestellt wird. Der Dotplot eignet sich z.B. für die Darstellung von FSC und SSC, da einzelne Zellpopulationen gut anhand ihrer Größe (FSC) und/oder Granularität (SSC) abgegrenzt werden können.

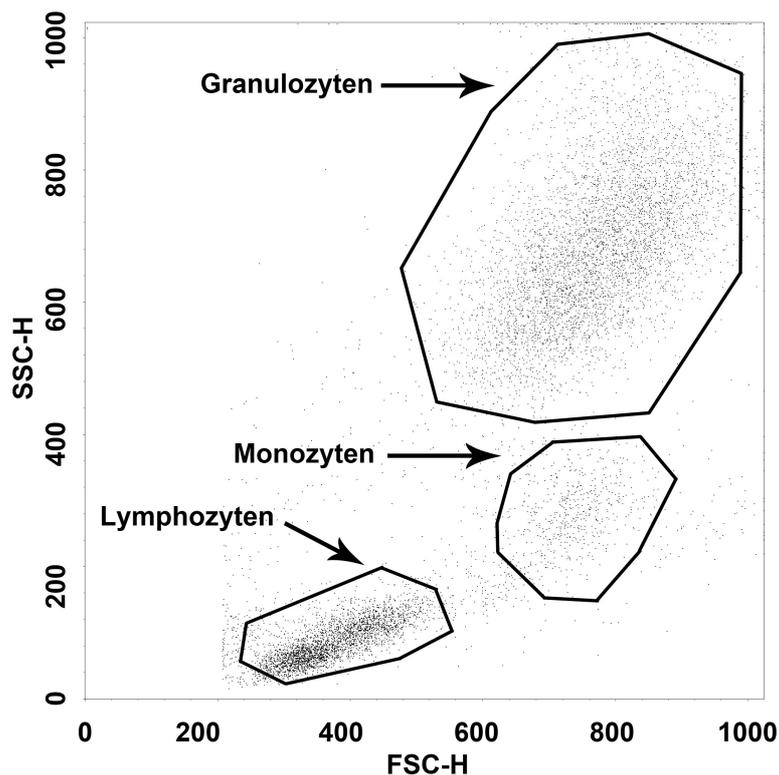


Abb. 2: Graphische Darstellung eines FSC/SSC-Dotplots zur Identifizierung der Leukozytensubspezies aus einer Vollblutprobe in einer repräsentativen durchflusszytometrischen Analyse

- **Histogramm:** Hierbei wird die Häufigkeitsverteilung der Zellen in einer Probe dargestellt. Auf der Y-Achse wird die Anzahl der gemessenen Zellen, auf der X-Achse die einzelnen Kanäle, also die Fluoreszenz, FSC oder SSC, aufgetragen. Für die weitere Auswertung kann entweder der arithmetische oder geometrische Mittelwert der Fluoreszenz bestimmt werden, oder der Prozentsatz der Zellen, die einen festgelegten relativen Wert übersteigt. Hierzu wird an der Schnittstelle zwischen Negativ- und Positivkontrolle ein Marker gesetzt.

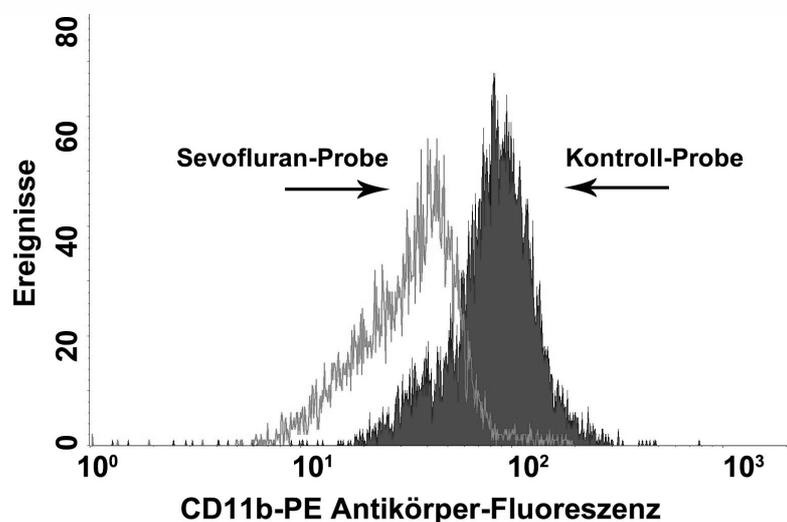


Abb. 3: Exemplarisches Histogramm-Overlay der Expression des Membranrezeptors CD11b auf Granulozyten (Kontroll- vs. Sevofluran-Probe); Kontrollprobe (dunkel schraffierte Fläche); Sevofluran behandelte Probe (unschraffierte Fläche, grau begrenzt)

Vor jeder Messung werden die Geräteeinstellungen (instrument settings) des FACScan™ festgesetzt. Durch Probemessungen mit Positiv- und Negativkontrollen für jede Zellart und für jeden verwendeten Antikörper bzw. Fluoreszenzfarbstoff werden vor jeder Versuchsreihe die günstigsten Einstellungen ermittelt.

Zur Geräteeinstellung des FACScan™ gehören folgende Parameter:

- *Threshold (Schwellenwert)*: Um Störsignale zu minimieren, wird ein Schwellenwert gesetzt, der eine bestimmte Intensität von FSC, SSC oder Fluoreszenz definiert. Diese Signalgrenze muss überschritten werden, damit die Daten der Zelle aufgezeichnet werden. So können z.B. durch die Einstellung des FSC-Schwellenwertes kleinste Partikel (Zelldebris) von der Messung ausgeschlossen werden.
- *Detectors (Detektoren)*: Hier wird das Lichtsignal des Lasers in ein elektrisches Signal konvertiert, welches über den Amplifier zusätzlich verstärkt wird und die Analyse der Zellen ermöglicht.
- *Amplifier (Verstärkereinstellungen)*: Die Verstärkung kann linear oder logarithmisch erfolgen, wobei die logarithmische Verstärkung besonders für die Messung eher schwacher Impulse geeignet ist.
- *Compensation (Kompensation)*: Bei Mehrfarbenfluoreszenzanalysen überschneiden sich die Emissionsspektren der Fluoreszenzen teilweise, so dass eine Korrektur der spektralen Überlappung erfolgen muss. Hierbei wird ein im Rahmen der Probemessungen ermittelter überlappender Fluoreszenzanteil elektronisch subtrahiert.
- *Gating (Definieren von Auswertefenstern)*: Über das Setzen eines Analysefensters (Gate) lässt sich der Messbereich einschränken. Dies ermöglicht die selektive Messung einer bestimmten Zellpopulation und deren Eigenschaften. Es finden also nur die Messdaten Berücksichtigung, die sich innerhalb dieses vordefinierten, eingegrenzten Bereiches befinden. Das Gate kann eine Fläche im Dotplot oder ein Bereich des Histogramms sein [nach 43, 64, 94].

In der vorliegenden Arbeit wurde die FACS-Analyse zur Beurteilung der Aktivierung von Thrombozyten und Leukozyten, sowie zum Nachweis einer Leukozyten-Thrombozyten Aggregatbildung, angewandt. Hierfür wurden Fluoreszenzfarbstoff-markierte Antikörper (FITC und PE) verwendet.

Bei allen durchflusszytometrischen Analysen dieser Studie wurden pro Messung genau 10.000 Ereignisse gezählt.

Im Rahmen der Analysen wurde das FACScan™ wöchentlich, entsprechend den Herstellervorgaben, mit fluoreszierenden Eichpartikeln (CaliBRITE™ beads, BD Biosciences) geeicht.

2.1.1.2 Mithras LB 940

Photometer (Mithras LB 940 Multitechnologie Mikroplattenleser, Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad, Deutschland)

Der multifunktionale Mikroplattenleser Mithras LB 940 wurde in der vorliegenden Arbeit zur Lumineszenzmessung der PMN-Elastase, sowie der Zytokine TNF- α , IL-1 β und IL-8, verwendet. Die Bestimmung der oben genannten Parameter erfolgte mittels spezifischer kommerziell erhältlicher ELISA-Kits, gemäß der vom Hersteller angegebenen Analysetechnik. Zur Auswertung der Messdaten wurde die Software MikroWin® 2000 (Version 4.4.1) (Mikrotek Laborsysteme GmbH, Overath, Deutschland) verwendet.

Zu den theoretischen Hintergründen der ELISA-Messung siehe 2.2.6.

2.1.1.3 ABX Micros 60

Hämatologie-Analyse-Gerät ABX Micros 60 (Axon Lab AG, Reichenbach/Stuttgart, Deutschland)

Vollautomatischer Hämatologie Analyser, verwendet in der vorliegenden Arbeit zur Bestimmung des Differentialblutbildes (siehe 2.2.4.1).

2.1.1.4 PTR

Proben-Temperatur-Gerät (PTR, Sektion für Medizinische Werkstoffkunde & Technologie des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde des Universitätsklinikum Tübingen, Deutschland)

Das PTR enthält zehn Stahlblöcke, die jeweils acht Aufnahmevorrichtungen für Eppendorf Safe-Lock Tubes™ (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) enthalten. Diese Stahlblöcke sind unabhängig voneinander in ihrer Temperatur regulier- und programmierbar. Dies ermöglicht die Inkubation von Untersuchungsproben in einem Temperaturbereich zwischen 0 °C und 99 °C.

Die in der vorliegenden Arbeit verarbeiteten Proben wurden entweder bei Raumtemperatur (RT) oder bei 37 °C inkubiert.

2.1.1.5 Das extrakorporale Zirkulationsmodell

Das in der vorliegenden Arbeit angewandte ex vivo-EKZ-Modell besteht aus Komponenten, die im klinischen Alltag routinemäßig zum Einsatz kommen. Als Herz-Lungen-Maschine wurde das Perfusionssystem HL 20 mit Standard Polyvinylchlorid-Schlauchset (PVC) und MultiFlow-Roller-Pumpe der Firma MAQUET Cardiopulmonary AG (Rastatt, Deutschland) verwendet.

Als Membranoxygenator mit integriertem Wärmetauscher diente der QUADROX-i® Small Adult (MAQUET Cardiopulmonary AG, Hirrlingen, Deutschland), ein mit einer Polypropylen-Membran (PP) und biopassiver synthetischer Polymerbeschichtung (SOFTLINE®) ausgestatteter Membranoxygenator der neuesten Generation.

In das EKZ-Modell wurde das Blutentnahmesystem Blood-Pack™ PL146 (Fenwal Europe sprl, Mont Saint Guibert, Belgien (siehe 2.2.1)) integriert, welches zugleich als flexibles Reservoir diente.

Je nach Studiengruppe kam zusätzlich zur Applikation des volatilen Narkosemittels der Vapor® 2000 - Sevoflurane (Dräger Medical GmbH, Lübeck, Deutschland) als Verdunster und Verdampfer zum Einsatz.

2.1.2 Antikörper

- anti-CD11b PE mAb (Beckman-Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland)
- anti-CD41 FITC (SZ 22, Beckman-Coulter GmbH)
- anti-CD45 PE (BD Biosciences)
- anti-CD62P PE (BD Biosciences)
- anti-IgG1-FITC mAb (Beckman-Coulter GmbH)
- anti-IgG1-PE mAb (Beckman-Coulter GmbH)

2.1.3 ELISA-Kits

- Human TNF- α (R&D Systems Inc., Minneapolis, USA)
- Human CXCL8/IL-8 (R&D Systems Inc.)

- Human IL-1 β /IL-1F2 (R&D Systems Inc.)
- PMN-Elastase (Milenia Biotec GmbH, Gießen, Deutschland)

2.1.4 Verbrauchs- und Arbeitsmaterialien

- FACSRinse Solution (BD Biosciences)
- FACSClean Solution (BD Biosciences)
- Sterican[®]-Einmalkanülen (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)
- Injekt[®]-Einmalspritzen (B. Braun Melsungen AG)
- Original-Perfusor[®] Spritzen (B. Braun Melsungen AG)
- Mini-Spike[®] (B. Braun Melsungen AG)
- Discifix[®] C (B. Braun Melsungen AG)
- Combi Stopper (B. Braun Melsungen AG)
- Falcon[™] Round-Bottom Tubes (BD Biosciences)
- Falcon[™] Conical Tubes (BD Biosciences)
- Multipipette[®] plus (Eppendorf AG)
- SofTouch[®] Multipipette (HAMILTON Deutschland GmbH, Martinsried, Deutschland)
- Reference[®] Pipetten (Eppendorf AG)
- Research[®] Pipetten (Eppendorf AG)
- Combitips advanced[®] (Eppendorf AG)
- ep T.I.P.S.[®] Pipettenspitzen (Eppendorf AG)
- Stripette[®] (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)
- NaCl 0.9 % (Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland)
- Ampuwa[®] (Fresenius Kabi Deutschland GmbH)
- Peleusball (D&N, Berlin, Deutschland)
- Präzisionswaage (KERN & SOHN GmbH, Balingen, Deutschland)
- Vortex-Wirbelmischer
- Mikrotiterplatten-Schüttler
- Bechergläser
- Zellstoff

2.1.5 Software

- Adobe® Illustrator® (Version 14.0.0) (Adobe Systems Inc., San Jose, USA)
- Adobe® Photoshop® (Version 11.0.2) (Adobe Systems Inc.)
- EndNote® X4 (Version 4.0.2) (Thomson Reuters, New York City, USA)
- Mac OS X™ (Version 10.7.5) (Apple Inc., Cupertino, USA)
- Microsoft Excel™ 2008 für Mac (Version 12.3.5) (Microsoft Corporation, Redmond, USA)
- Pages '09™ (Version 4.3) (Apple Inc.)
- VirtualBox™ (Version 4.1.23) (ORACLE B.V. & Co. KG, München, Deutschland)
- Windows Vista™ Home Premium (SP 2) (Microsoft Corporation)

2.2 Methoden

2.2.1 Studienaufbau

In der vorliegenden experimentellen Arbeit wurden Erkenntnisse über die Induktion einer Thrombozyten- und Leukozyten-Aktivierung, die Bildung von Leukozyten-Thrombozyten Aggregaten, sowie die Freisetzung von potentiell proinflammatorisch wirkenden Zytokinen im Rahmen der extrakorporalen Zirkulation gewonnen.

Des Weiteren war es Ziel der Studie, systematisch den Einfluss des volatilen Anästhetikum Sevofluran auf die oben genannten Zellaktivierungen und Immunreaktionen unter Einsatz der EKZ zu untersuchen.

Hierzu wurden nach bereits beschriebenen Methoden [95, 96] die Expression der Oberflächenrezeptoren P-Selektin und Mac-1, sowie die Bildung von Leukozyten-Thrombozyten Aggregaten, durchflusszytometrisch bestimmt. Überdies wurden mittels ELISA Assays die PMN-Elastase als Granulozyten-Aktivierungsmarker, sowie stellvertretend für die proinflammatorische Zytokinantwort TNF- α , IL-1 β und IL-8, bestimmt.

Für jeden Versuch wurde frisch entnommenes und heparinisiertes humanes Vollblut für 90 Minuten in einem ex vivo-Modell eines extrakorporalen Kreislaufs bei Normothermie (37 °C) zirkuliert. In der Kontrollgruppe (n = 5) wurde über den Oxygenator des Modells ein Luft-Sauerstoff-Gemisch verabreicht. Der

zweiten Versuchsgruppe (n = 5), der sog. Sevofluran-Gruppe, wurde das Anästhetikum Sevofluran in einer Konzentration von 2 Vol.-% zugeführt.

Zu definierten Zeitpunkten wurden der EKZ Blutproben entnommen und entsprechend dem Studienprotokoll weiterverarbeitet.

Die Studiendurchführung sowie die Methoden zur Blutentnahme wurden von der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen geprüft und genehmigt (Projektnummer: 270/2010BO1; Datum der Zulassung: 31.05.2011).

Die Probanden wurden über den Inhalt der Studie gemäß den Anforderungen der Ethik-Kommission informiert und erteilten schriftlich ihr Einverständnis zur Teilnahme.

2.2.2 Blutentnahme und Probandenauswahl

Um eine Verfälschung der Messergebnisse durch eine fehlerhaft durchgeführte Blutentnahme zu minimieren, erfolgte die Blutentnahme so schonend als möglich durch das Institut für klinische und experimentelle Transfusionsmedizin (IKET) Tübingen:

- Punktion einer gestauten Antekubitalvene mit einer 16 Gauge Nadel (im unten genannten Blutentnahmesystem integriert).
- Lösen der Stauung und Abnehmen von rund 15 ml Blut für routinemäßige Laborkontrollen durch das IKET.
- Abnahme von genau 500 ml Vollblut (WB = whole blood) in ein handelsübliches Blutentnahmesystem mit integriertem Spenderschlauch (Blood-Pack™ PL146 600ml, Fenwal Europe sprl).
- Dem Blutentnahmesystem wurde zuvor eine genau berechnete Menge an Heparin (Liquemin® N 25000, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) zugegeben, um eine im klinischen Alltag der EKZ routinemäßig verwendete Heparin-Konzentration von 3 IE/ml zu erreichen.

- Direkt nach Beendigung der Blutentnahme wurden erste Blutproben aus dem nun gefüllten Blutentnahmesystem entnommen. Diese dienten als Ausgangswerte der Studie.
- Anschließend erfolgte ohne zeitlichen Verlust die Integration des Systems durch einen erfahrenen Kardiotechniker in das unter 2.1.1.5 beschriebene Modell der extrakorporalen Zirkulation.

Die Ausschlusskriterien zur Studienteilnahme entsprachen denen der allgemeinen Blutspende des IKET Tübingen und beinhalteten u.a.:

- Alter < 18 Jahren oder > 68 Jahre
- Körpergewicht < 50 kg
- Hämoglobin-Wert bei Frauen < 12,5 g/dl, bei Männern < 13,5 g/dl
- < 56 Tage (8 Wochen) seit der letzten Blutspende
- Einnahme von Medikamenten < 14 Tage vor der Blutspende, insbesondere Hämostase-beeinflussende Pharmaka wie nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR) und Hormonpräparate
- Infekt mit Fieber > 38,5 °C innerhalb der letzten 4 Wochen vor der Blutspende
- akute Erkrankung
- malignes Grundleiden
- durch Blutkontakt übertragbare Infektionskrankheiten (darunter HIV, Hepatitis B und C)

2.2.3 Ex vivo EKZ

Der Versuchsablauf an der EKZ erfolgte unter standardisierten Bedingungen mittels einer Checkliste unter enger Zusammenarbeit mit erfahrenen Kardiotechnikern im Operationstrakt der CRONA Kliniken des UKT.

Vor Versuchsbeginn erfolgte die Primärfüllung (engl. priming) des EKZ-Modells (siehe 2.1.1.5). Unter Priming versteht man das Füllen und Entlüften des Schlauchsets und des Oxygenators der HLM. Das Füllvolumen (Priming-Volumen) betrug 400 ml; als Lösung diente Natriumchlorid (NaCl) 0,9 %

(Isotone Kochsalz-Lösung 0,9 %, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland).

Das frisch entnommene und heparinisierte Vollblut (siehe 2.2.1) wurde dem Priming-Volumen innerhalb des extrakorporalen Kreislaufs zugefügt, wobei das Blutentnahmesystem zugleich als flexibles Reservoir des Modells fungierte.

Der Gasfluss des Membranoxygenators wurde auf 0,5 l/min mit 21 % Sauerstoff (O₂) und 5 % Kohlendioxid (CO₂) gehalten (beide medizinischen Gase: Linde Gas Therapeutics GmbH, Unterschleißheim, Deutschland).

Das Gasgemisch in der sog. Kontrollgruppe erhielt keine weiteren Zusätze. Der zweiten Versuchsgruppe, der sog. Sevofluran-Gruppe, wurde das volatile Anästhetikum Sevofluran (Sevorane[®], Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland) in einer routinemäßig im klinischen Alltag eingesetzten Konzentration von 2 Vol.-%, zugeführt [18, 97].

Die Zusammensetzung der Gasgemische wurde kontinuierlich mittels des volatilen Anästhesiemittel-Monitors Vamos[®] (Dräger Medical GmbH, Lübeck) sowohl im in- als auch expiratorischen Schenkel des Oxygenators kontrolliert. Während der gesamten Versuchsdauer erfolgte neben der Kontrolle der Zusammensetzung der Gasgemische auch die stetige Kontrolle und ggf. Korrektur der pH-, pCO₂- und pO₂-Werte durch einen erfahrenen Kardiotechniker des UKT innerhalb klinisch anerkannter Grenzwerte. Entsprechend der laborchemischen Kontrollen wurde nach Bedarf Natriumhydrogencarbonat-Lösung 8,4 % (Fresenius Kabi Deutschland GmbH) substituiert, um einen pH-Wert im Bereich zwischen 7,35 - 7,45 zu erhalten [97]. Die Blutgasanalysen wurden mit einem ABL800[®] (Radiometer GmbH, Willich, Deutschland) durchgeführt und kontinuierlich mit einem CDI[™] 500 Blutparameter-Monitor-System (Terumo GmbH, Eschborn, Deutschland) überwacht.

Über den integrierten Wärmetauscher des QUADROX-i[®] Small Adult - Oxygenator wurde die Temperatur des Perfusats stetig bei 37 °C gehalten. Der Leitungsdruck des EKZ-Modells wurde nach dem Oxygenator detektiert und während der gesamten Zirkulationsdauer zwischen 6,7 - 8 kPa gehalten; der Blutfluss durch das Modell betrug 2,5 l/min.

Pro Experiment zirkulierte das Perfusat für 90 Minuten innerhalb des EKZ-Modells.

2.2.4 Blutentnahmen und Messzeitpunkte aus dem EKZ-Modell

Zu vier definierten Zeitpunkten wurden aus dem EKZ-Modell, respektive Blutentnahmesystem, Blutproben entnommen, und ohne zeitlichen Verlust der weiteren Verarbeitung zugeführt.

Neben den Probenentnahmen für die durchflusszytometrischen und enzymimmunologischen Analysen wurde parallel eine Blutgasanalyse (siehe 2.2.4.2) sowie ein Differentialblutbild (siehe 2.2.4.1) erstellt.

- *Ausgangswert T0 (Baseline-Wert)*: Die ersten Versuchsproben wurden direkt nach Beendigung der Blutentnahme (siehe 2.2.1) aus dem Blutentnahmesystem entnommen und dienten als Ausgangswerte der Studie.
- *Messzeitpunkt T1 (30 min-Wert)*: Die zweiten Proben wurden nach 30 Minuten extrakorporaler Zirkulation aus dem Perfusat des ex vivo-Modells entnommen.
- *Messzeitpunkt T2 (60 min-Wert)*: Die dritten Blutproben wurden nach einer Versuchsdauer von 60 Minuten der EKZ entnommen.
- *Messzeitpunkt T3 (90 min-Wert)*: Die vierten Blutproben wurden 90 Minuten nach Beginn der EKZ entnommen.

2.2.4.1 Differentialblutbild

Die Bestimmung des Blutbildes (Leukozyten [$10^3/\text{mm}^3$], Erythrozyten [$10^6/\text{mm}^3$], Thrombozyten [$10^3/\text{mm}^3$], Hämoglobin [g/dl], Hämatokrit [%], Granulozyten [%], Monozyten [%], Lymphozyten [%]) erfolgte mit Hilfe des Hämatologie-Analyse-Gerätes ABX Micros 60 (Axon Lab AG) aus mit EDTA (Ethylendiamintetraacetat) antikoaguliertem Blut (S-Monovette® Kalium-EDTA, Größe 2,7 ml, Sarstedt AG & CO, Nümbrecht, Deutschland) innerhalb von 30 Minuten nach Ende der EKZ.

2.2.4.2 Blutgasanalyse

Mittels des Blutgasanalysators ABL800® (Radiometer GmbH) wurden zu allen Probeentnahmezeitpunkten die Blutgase pCO₂ [mmHg] und pO₂ [mmHg], sowie der pH-Wert, bestimmt.

2.2.5 Durchflusszytometrische Analysen

Nachfolgend die Schritte von der Blutentnahme (siehe 2.2.4) am EKZ-Modell bis zur durchflusszytometrischen Analyse der einzelnen Parameter mittels FACScan™:

2.2.5.1 Probenvorbereitung für die Messung der Leukozyten-Thrombozyten Aggregatbildung [nach 95]

- 12,5 µl WB wurde mit 5 µl PBS (phosphate buffered saline) (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland), 2,5 µl anti-CD41 FITC (SZ 22, Beckman-Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) und 2,5 µl anti-CD45 PE (BD Biosciences) versetzt.
- Anschließend wurde jede Probe für 20 min bei 37 °C im PTR inkubiert.
- 3 µl der jeweiligen Probe wurde danach mit 500 µl CellFIX™ solution (BD Biosciences) fixiert.
- Die Aufbewahrung der Proben bis zur weiteren Analyse erfolgte im Kühlschrank bei 8 °C.
- Die FACS-Analyse (siehe 2.2.5.4) wurde innerhalb von 6 h nach Fixierung der Proben durchgeführt.

2.2.5.2 Probenvorbereitung für die Bestimmung der Thrombozytenaktivierung [nach 95]

- 12,5 µl WB wurde mit 5 µl PBS (Invitrogen GmbH), 2,5 µl anti-CD41 FITC (SZ 22, Beckman-Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) und 2,5 µl anti-CD62P PE (BD Biosciences) versetzt.
- Anschließend wurde jede Probe für 20 min bei 37 °C im PTR inkubiert.
- 3 µl der jeweiligen Probe wurde danach mit 500 µl CellFIX™ solution (BD Biosciences) fixiert.

- Die Aufbewahrung der Proben bis zur weiteren Analyse erfolgte im Kühlschrank bei 8 °C.
- Die FACS-Analyse (siehe 2.2.5.4) wurde innerhalb von 6 h nach Fixierung der Proben durchgeführt.

2.2.5.3 Probenvorbereitung für die Leukozyten-Analyse [nach 96]

- 90 µl WB wurde mit 10 µl PBS (Invitrogen GmbH) sowie 20 µl anti-CD11b PE mAb (Beckman-Coulter GmbH) versetzt.
- Anschließend wurde jede Probe für 20 min bei 37 °C im PTR inkubiert.
- Zugabe von je 2 ml FACS Lysing Solution (BD Biosciences).
- Zentrifugation bei RT und 1.500 rpm für 5 min (Heraeus® Labofuge® 200 Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Deutschland).
- Verwerfen des Überstandes.
- Waschen der Probe mit je 2 ml PBS (Invitrogen GmbH).
- Fixation der Probe mit je 500 µl CellFIX™ solution (BD Biosciences).
- Die Aufbewahrung der Proben bis zur weiteren Analyse erfolgte im Kühlschrank bei 8 °C.
- Die FACS-Analyse (siehe 2.2.5.4) wurde innerhalb von 6 h nach Fixierung der Proben durchgeführt.

2.2.5.4 Prinzipien der durchflusszytometrischen Bestimmungen

Die durchflusszytometrischen Analysen der Untersuchungsproben erfolgte nach dem Prinzip einer von Jy et al. [51] beschriebenen Methode innerhalb von 6 Stunden nach Fixierung der Proben mit einem FACScan™ unter Verwendung der Software CellQuest Pro™ (beide BD Biosciences).

Mit Hilfe von Partikeln bekannter Größe, sogenannten Eichbeads, wurden in Vorversuchen Analysefenster (Gates) ermittelt und definiert, die für die zu bestimmenden zellulären Blutbestandteile charakteristisch sind.

Vor jeder Versuchsreihe wurden die Geräteeinstellungen (instrument settings) des FACScan™ festgesetzt und nach Messbeginn nicht mehr verändert.

Zu den Analysen der Untersuchungsproben der Leukozyten-Thrombozyten Aggregatbildung (siehe 2.2.5.1) wurden die Proben anhand der Fluoreszenz

des thrombozytenspezifischen Antikörpers anti-CD41 FITC - der an die GPIIb-Untereinheit des GPIIb/IIIa-Rezeptors bindet - beim Überschreiten eines festgesetzten Schwellenwertes als Blutplättchen identifiziert und in einem FSC/SSC-Dotplot dargestellt. Darüber hinaus wurde die Fluoreszenz des als Pan-Leukozytenmarker fungierenden Antikörpers anti-CD45 PE innerhalb der für Zellaggregate definierten Region - als Maß für den Leukozytenanteil der Thrombozyten-Leukozyten Aggregate - bestimmt. Die Fluoreszenz der Antikörper wurde in Histogrammen analysiert und als Prozentsatz der für den Leukozytenmarker CD45 positiven aggregatgebundenen Leukozyten angegeben.

Analog zu den Bestimmungen der Leukozyten-Thrombozyten Aggregatbildung erfolgte die Analyse der Versuchsproben zur Thrombozytenaktivierung (siehe 2.2.5.2) zunächst über die Identifikation der Einzelthrombozyten und in Aggregaten gebundenen Thrombozyten anhand des Antikörpers anti-CD41 FITC und zuvor bestimmter selektiver Analysefenster (Gates) in einem FSC/SSC-Dotplot des FACScan™. Die Fluoreszenz des als Thrombozytenaktivierungsmarker fungierenden Antikörpers anti-CD62P PE (P-Selektin) wurde in Histogrammen analysiert und in Prozent von P-Selektin exprimierenden Einzelthrombozyten bzw. aggregatgebundenen Thrombozyten angegeben.

Die durchflusszytometrischen Analysen zur Aktivierung der Leukozyten (siehe 2.2.5.3) erfolgte über die Detektion des Integrins CD11b, das gemeinsam mit CD18 den Mac-1 Komplex der Leukozyten bildet. Aufgrund der charakteristischen Eigenschaften der einzelnen Leukozytensubspezies bei durchflusszytometrischen Analysen, wurde die Mac-1 Expression durch die in einem FSC/SSC-Dotplot gewählten Gates separat für die Granulozyten- und Monozyten-Population bestimmt. Innerhalb dieser Regionen wurde mittels Histogrammen der geometrische Mittelwert der Fluoreszenz des Antikörpers anti-CD11b PE analysiert.

Bei allen durchflusszytometrischen Analysen dieser Studie wurden pro Messung genau 10.000 Ereignisse bestimmt.

Um eine Thrombozyten- bzw. Leukozytenfunktionsstörung auszuschließen wurden zu den Untersuchungszeitpunkten T0 und T2 - neben den eigentlichen Versuchsproben - zusätzlich stimulierte Kontrollproben angefertigt. Die Stimulation erfolgte im Rahmen des Leukozyten-Thrombozyten-Assays (siehe 2.2.5.1) sowie beim Thrombozyten-Assay (siehe 2.2.5.2) durch Zugabe von 5 μ l ADP (90 μ M) (möLab GmbH, Langenfeld, Deutschland); beim Leukozyten-Assay (siehe 2.2.5.3) durch Zugabe von 10 μ l PMA (c = 1,2 μ g/ml) (Phorbol-12-myristat-13-acetat; Sigma-Aldrich Chemie GmbH). Hierbei erfolgte die Zugabe der Stimulanzien jeweils im Austausch gegen die der PBS-Pufferlösung.

Zusätzlich erfolgte zur Quantifizierung einer unspezifischen Antikörperbindung eine Kontrolle und Einstellung sämtlicher Proben unter Verwendung ihrer jeweiligen Isotyp-Kontrollantikörper (anti-IgG1-FITC mAb und anti-IgG1-PE mAb, beide Beckman-Coulter GmbH).

2.2.6 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die Konzentrationen der Zytokine TNF- α , IL-1 β und IL-8, sowie der PMN-Elastase wurden mittels Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISA) gemessen. ELISA bezeichnet ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren, bei dem ein Reaktionspartner enzymatisch markiert ist.

Die in der vorliegenden Studie verwendeten kommerziell erhältlichen ELISA-Kits basierten auf dem sog. Sandwich-Prinzip (Sandwich-ELISA). Bei der Methode des Sandwich-ELISA wird das zu bestimmende Antigen zwischen zwei Antikörpern eingebettet.

Der erste, zum gesuchten Protein korrespondierende primäre Antikörper (engl. capture antibody) wird an eine Festphasenoberfläche (zumeist Mikrotiterplatte) gebunden. Nach Zugabe der Probe mit dem nachzuweisenden Antigen geht der an die feste Phase gebundene spezifische Capture-Antikörper eine Verbindung mit einem Epitop des Antigens ein. Aufgrund der Bindung des Antigen-Antikörperkomplexes an die Festphase ist es möglich, die ungebundenen Bestandteile der Probe durch Waschzyklen zu entfernen. Zurück bleibt nur das am Capture-Antikörper gebundene Antigen.

Im nächsten Schritt wird ein zweiter, enzymgekoppelter sekundärer Antikörper (engl. detection antibody) zugegeben, der ein weiteres Epitop des gesuchten Antigens erkennt und bindet. Es bildet sich das sog. Sandwich, der Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex. Durch erneutes Waschen der Probe wird der überschüssige Detection-Antikörper ausgewaschen.

Das an den Detection-Antikörper gekoppelte Enzym setzt nach Zusatz eines chromogenen Substrates dieses zu einem Reaktionsprodukt um, so dass die Enzymaktivität photometrisch erfasst werden kann. Diese ist proportional zur Menge des gebundenen Zielmoleküls der Probe (siehe Abb. 4).

Unter Verwendung einer entsprechenden Kalibrationskurve mit bekannten Antigenkonzentrationen (Standardreihe) kann der Gehalt des nachzuweisenden Antigens quantifiziert werden [64, 98].

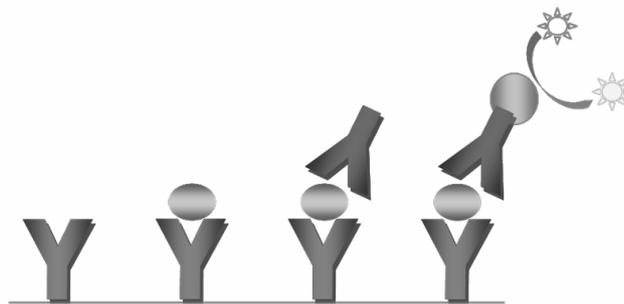


Abb. 4: Schematische Darstellung des Sandwich-ELISA-Prinzips [99]

Nachfolgend die Schritte von der Blutentnahme am EKZ-Modell (siehe 2.2.3) bis zur Analyse durch Enzymimmunoassays:

2.2.6.1 Probenvorbereitung für die quantitative Analyse von TNF- α , IL-1 β , IL-8 sowie der PMN-Elastase mittels ELISA

Die Bestimmung von TNF- α , IL-1 β und IL-8 erfolgte aus mit EDTA antikoaguliertem Blut. Die der PMN-Elastase dagegen aus mit Citrat antikoaguliertem Blut. Je nach Analyse richtete sich hiernach die Blutentnahme mittels S-Monovette® Kalium-EDTA, Größe 9,0 ml oder S-Monovette® Citrat 1:10, Größe 3,0 ml (beide Sarstedt AG & CO). Die nachfolgenden Schritte waren identisch.

- Schonendes Mischen der Proben durch mehrmaliges Über-Kopf-Schwenken.
- Zentrifugation bei RT und 4.500 rpm für 15 min (Heraeus® Labofuge® 400 R, Thermo Fisher Scientific).
- Anschließend wurde das überstehende Plasma in Portionen zu jeweils 250 µl aliquotiert und sofort schockgefroren.
- Die Lagerung der Proben bis zur weiteren Analyse erfolgte im Gefrierschrank bei -80 °C.

Alle Zytokinbestimmungen, sowie die Bestimmung der PMN-Elastase, wurden innerhalb von maximal sechs Monaten nach der Probeentnahme durchgeführt.

2.2.6.2 Zytokinbestimmung mittels ELISA

Die quantitative Messung der Zytokine TNF- α , IL-1 β und IL-8 erfolgte mittels spezifischer, kommerziell erhältlicher DuoSet® ELISA Kits (R&D Systems Inc., Minneapolis, USA). Die Durchführung erfolgte strikt nach Herstellerangaben.

Puffer und Lösungen für die Bestimmungen mittels der DuoSet® ELISA Kits:

PBS-Pufferlösung (für TNF- α , IL-1 β , IL-8)	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,2-7,4; kein Ca ²⁺ und Mg ²⁺
Wasch-Puffer (für TNF- α , IL-1 β , IL-8)	0,05 % Tween® 20 in PBS (R&D Systems Inc.; Katalognummer: # WA126)
Reagenz-Verdünnung 1 (für TNF- α , IL-1 β)	1 % BSA in PBS (R&D Systems Inc.; Katalognummer: # DY995)
Reagenz-Verdünnung 2 (für IL-8)	0,1 % BSA, 0,05 % Tween® 20 in TBS (Tris- buffered saline (20 mM Trizma®, 150 mM NaCl))
Block-Puffer (für IL-8)	1 % BSA in PBS mit 0,05 % NaN ₃
Substrat-Lösung (für TNF- α , IL-1 β , IL-8)	H ₂ O ₂ (Reagenz A) und Tetramethylbenzidin (Reagenz B); Mischverhältnis 1:1 (R&D Systems Inc.; Katalognummer: # DY999)

Stopp-Lösung (für TNF- α , IL-1 β , IL-8)	2 N H ₂ SO ₄ (R&D Systems Inc.; Katalognummer: # DY994)
--	--

2.2.6.2.1 Human TNF- α (R&D Systems Inc.; Katalognummer: DY210)

- **Capture-Antikörper:** Monoklonaler Antikörper gegen humanes TNF- α (Maus-Antikörper) (Part 840119); verdünnt in PBS-Pufferlösung auf eine Endkonzentration (c_{End}) von 4 $\mu\text{g/ml}$
- **Detection-Antikörper:** Monoklonaler Antikörper gegen humanes TNF- α , biotinyliert (Ziegen-Antikörper) (Part 840120); verdünnt mit der Reagenz-Verdünnung 1 auf $c_{\text{End}} = 250 \text{ ng/ml}$
- **Reporterenzym:** Streptavidin-HRP (Meerrettichperoxidase konjugiertes Streptavidin) (Part 890803); verdünnt 1:10 mit H₂O bidest.
- **Standard:** Rekombinantes humanes TNF- α (Part 840121); verdünnt mit der Reagenz-Verdünnung 1

Standardverdünnungsreihe:

180,6 pg/ml - 90,3 pg/ml - 45,2 pg/ml - 11,3 pg/ml - 2,8 pg/ml - 1,5 pg/ml - 0,7 pg/ml

2.2.6.2.2 Human CXCL8/IL-8 (R&D Systems Inc.; Katalognummer: DY208)

- **Capture-Antikörper:** Monoklonaler Antikörper gegen humanes IL-8 (Maus-Antikörper) (Part 890804); verdünnt in PBS-Pufferlösung auf $c_{\text{End}} = 4 \mu\text{g/ml}$
- **Detection-Antikörper:** Monoklonaler Antikörper gegen humanes IL-8, biotinyliert (Ziegen-Antikörper) (Part 890805); verdünnt mit der Reagenz-Verdünnung 2 auf $c_{\text{End}} = 20 \text{ ng/ml}$
- **Reporterenzym:** Streptavidin-HRP (Meerrettichperoxidase konjugiertes Streptavidin) (Part 890803); verdünnt 1:10 mit H₂O bidest.

- **Standard:** Rekombinantes humanes IL-8 (Part 890806);
verdünnt mit der Reagenz-Verdünnung 2

Standardverdünnungsreihe:

2000 pg/ml - 1000 pg/ml - 500 pg/ml - 250 pg/ml - 125 pg/ml - 62,5 pg/ml - 31,25 pg/ml

2.2.6.2.3 Human IL-1 β /IL-1F2 (R&D Systems Inc.; Katalognummer: DY201)

- **Capture-Antikörper:** Monoklonaler Antikörper gegen humanes IL-1 β (Maus-Antikörper) (Part 840168); verdünnt in PBS-Pufferlösung auf $c_{\text{End}} = 4 \mu\text{g/ml}$
- **Detection-Antikörper:** Monoklonaler Antikörper gegen humanes IL-1 β , biotinyliert (Ziegen-Antikörper) (Part 840169); verdünnt mit der Reagenz-Verdünnung 1 auf $c_{\text{End}} = 300 \text{ ng/ml}$
- **Reporterenzym:** Streptavidin-HRP (Meerrettichperoxidase konjugiertes Streptavidin) (Part 890803); verdünnt 1:10 mit H₂O bidest.
- **Standard:** Rekombinantes humanes IL-1 β (Part 840170); verdünnt mit der Reagenz-Verdünnung 1

Standardverdünnungsreihe:

250 pg/ml - 125 pg/ml - 62,5 pg/ml - 31,25 pg/ml - 15,63 pg/ml - 7,81 pg/ml - 3,9 pg/ml

Für alle zu bestimmenden Zytokine ergaben sich folgende Arbeitsschritte:

- Beschichtung der 96-Well-Mikrotiterplatte (Nunclon® MicroWell 96 clear, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) mit je 200 μl /Well des entsprechenden Capture-Antikörpers.
- Abdichten der Mikrotiterplatte mit Klebefolie und anschließende Inkubation bei RT über Nacht.
- Absaugen der Wells und dreimaliges Waschen mit je 400 μl Wasch-Puffer pro Well. Zwischen den Waschungen Absaugen und anschließendes Ausklopfen der Platten, um evtl. Rückstände in den Wells zu minimieren.
- Zur Bestimmung von TNF- α und IL-1 β : Zugabe von je 300 μl Reagenz-Verdünnung 1 pro Well. Inkubation bei RT für 1 h.

- Zur Bestimmung von IL-8: Zugabe von je 300 µl Block-Puffer pro Well. Inkubation bei RT für 1 h.
- Erneutes Absaugen der Wells und dreimaliges Waschen mit je 400 µl Wasch-Puffer pro Well wie bereits zuvor beschrieben.
- Auftragen der Standardverdünnungsreihen sowie der zu analysierenden Proben (je 100 µl/Well). Inkubation bei RT für 2 h.
- Absaugen der Wells und dreimaliges Waschen mit je 400 µl Wasch-Puffer pro Well (siehe oben).
- Zugabe von je 100 µl/Well des entsprechenden Detection-Antikörpers. Inkubation bei RT für 2 h.
- Absaugen der Wells und dreimaliges Waschen mit je 400 µl Wasch-Puffer pro Well (siehe oben).
- Zugabe von je 100 µl/Well des Rezeptorenzyms Streptavidin-HRP. Lichtdichtes Abdecken der Mikrotiterplatte und Inkubation bei RT für 20 min. im Dunkeln.
- Absaugen der Wells und dreimaliges Waschen mit je 400 µl Wasch-Puffer pro Well (siehe oben).
- Zugabe von je 100 µl/Well Substrat-Lösung. Lichtdichtes Abdecken der Proben und Inkubation bei RT für 20 min. im Dunkeln.
- Zugabe von je 50 µl/Well Stopp-Lösung (2 N H₂SO₄) beendet die Enzymreaktion.
- Anschließend erfolgte die sofortige photometrische Messung der Proben (siehe 2.2.6.4).

2.2.6.3 Bestimmung der PMN-Elastase mittels ELISA

Bei dem Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung des Komplexes aus humaner PMN-Elastase und dem α_1 -Proteinase-Inhibitor (α_1 -PI) im Plasma handelte es sich um einen kommerziell erhältlichen Kit (PMN-Elastase ELISA, Katalognummer: MKEL 1) der Milenia Biotec GmbH (Gießen, Deutschland). Die Testdurchführung erfolgte nach den Herstellervorgaben.

Puffer und Lösungen für die Bestimmungen der PMN-Elastase:

Verdünnungspuffer	Katalognummer: MSEL
Wasch-Puffer	Verdünnt 1:10 mit H ₂ O bidest. Katalognummer: MCTWSN
Substrat-Lösung	TMB-Substrat-Lösung (3,3',5,5'-Tetra-Methyl-Benzidin) in gepufferter Peroxid-Lösung Katalognummer: MTPS1
Stopp-Lösung	enthält 2 M Salzsäure Katalognummer: MSTUN

2.2.6.3.1 PMN-Elastase (Milenia Biotec GmbH; Katalognummer: MKEL 1)

- **Capture-Antikörper:** Polyklonaler Antikörper gegen humane PMN-Elastase (Hühnereigelb); bereits beschichtete Mikrotiterplatte (Katalognummer: MELPL)
- **Detection-Antikörper:** Enzym-markierter polyklonaler anti- α_1 -PI Antikörper (Kaninchen-Antikörper); markiert mit Meerrettichperoxidase (Katalognummer: MEEL)
- **Kontrolle:** PMN-Elastase-Kontrollen in Serumpuffermatrix (Katalognummer: MELC1/2)
- **Standard:** PMN-Elastase Standard in Serumpuffermatrix enthält aufgereinigten PMN-Elastase/ α_1 -PI Komplex (Katalognummer: MEL9); verdünnt mit Verdünnungspuffer

Standardverdünnungsreihe:

1000 ng/ml - 500 ng/ml - 250 ng/ml - 125 ng/ml - 62,5 ng/ml - 31,3 ng/ml - 15,6 ng/ml

Die untere Nachweisgrenze (Sensitivität) des verwendeten PMN-Elastase ELISA Kits wurde nach Herstellerangaben mit 3 ng/ml ermittelt.

Für die Bestimmung der PMN-Elastase ergaben sich folgende Arbeitsschritte:

- Probenvorbereitung: Alle Untersuchungsproben vor Assaybeginn 1:100 mit Verdünnungspuffer verdünnen. Hierzu 10 µl Probe vorlegen und 990 µl Verdünnungspuffer hinzufügen. Anschließend mit dem Vortex mischen.
- Auftragen von je 100 µl/Well der Standardverdünnungsreihe, der Kontrollen sowie der zu analysierenden, vorverdünnten Untersuchungsproben auf die bereits mit dem Capture-Antikörper beschichtete Mikrotiterplatte (Katalognummer: MELPL). Inkubation bei RT für 60 min auf einem Schüttler bei 350 - 400 rpm.
- Absaugen der Wells und viermaliges Waschen mit je 300 µl Wasch-Puffer pro Well. Zwischen den Waschungen Absaugen und anschließendes Ausklopfen der Platten, um evtl. Rückstände in den Wells zu minimieren.
- Zugabe von je 150 µl/Well des Enzym-markierten Detection-Antikörpers (Katalognummer: MEEL). Inkubation bei RT für 60 min auf einem Schüttler bei 350 - 400 rpm.
- Absaugen der Wells und viermaliges Waschen mit je 300 µl Wasch-Puffer pro Well (siehe oben).
- Zugabe von je 200 µl/Well der Substrat-Lösung (Katalognummer: MTPS1). Lichtdichtes Abdecken der Mikrotiterplatte und Inkubation bei RT für 20 min im Dunkeln.
- Zugabe von je 50 µl/Well Stopp-Lösung (Katalognummer: MSTUN) beendet die Enzymreaktion.
- Anschließend erfolgte die sofortige photometrische Messung der Proben (siehe 2.2.6.4).

2.2.6.4 Analyse der ELISA-Proben mit dem Photometer

Die Detektion der optischen Dichte erfolgte sofort nach Beendigung der jeweiligen Assays bei einer Wellenlänge (λ) von 450 nm in einem Mithras LB 940 (Berthold Technologies GmbH & Co. KG) unter Verwendung der Software MikroWin® 2000 (Mikrotek Laborsysteme GmbH).

Die gemessenen Extinktionen der Ansätze wurden in Relation zu den Extinktionen der jeweiligen Standardverdünnungsreihen gesetzt. Dies

ermöglichte eine exakte Bestimmung der Zytokin-, respektive PMN-Elastase-Konzentrationen der Proben.

Sämtliche Analysen wurden in doppelter Ausfertigung zur Verifizierung der Messergebnisse angefertigt.

2.3 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse erfolgte in Kooperation mit Frau Beverley Balkau (Ph.D.) vom Baker IDI Heart and Diabetes Institute in Melbourne, Australien. Hierzu wurde die Software GraphPad Prism® 4 für Windows (Version 4.01) (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA) genutzt.

Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Aufgrund der durch das Priming-Volumen des extrakorporalen Kreislaufs bedingten Hämodilution wurde bei den ELISA-Messproben, welche während der EKZ entnommen wurden, eine sogenannte „Hämatokrit-Korrektur“ durchgeführt. Der Hämatokrit-Korrektur-Faktor wurde berechnet, indem der Ausgangswert-Hämatokrit von den Hämatokrit-Werten an den jeweiligen Probenentnahmezeitpunkten, dividiert wurde. Die während der EKZ bestimmten Messwerte wurden anschließend mit dem jeweiligen Hämatokrit-Korrektur-Faktor multipliziert, um die Hämodilution durch die Priming-Lösung der EKZ auszugleichen.

Die Ausgangswerte der Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten, P-Selektin Expression, Mac-1 Expression, PMN-Elastase, Leukozyten-Thrombozyten-Aggregaten, IL-1 β , IL-8 sowie TNF- α wurden auf 100 % transformiert, um die durch eine EKZ verursachten Effekte zwischen den mit Sevofluran behandelten Proben und der Kontrollgruppe, zu vergleichen. Für beide Gruppen werden die Daten nach extrakorporaler Zirkulation als prozentualer Anteil der transformierten Ausgangswerte angegeben.

Um statistisch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Datensätzen zu analysieren, wurden Varianzanalysen mit Messwiederholung (RM-ANOVA = repeated-measures analysis of variance) in Kombination mit dem Post-Hoc-Test nach Bonferroni (Bonferroni's multiple comparison test) durchgeführt.

Als Signifikanzwert wurde $p < 0,05$ definiert. Signifikante Werte sind in den Schaubildern mit einem * oder # gekennzeichnet.

3 Ergebnisse

3.1 Auswirkungen der EKZ und Sevofluran auf das Blutbild

Die Zugabe des Priming-Volumens der HLM (siehe 2.2.3) führte erwartungsgemäß zu einer Hämodilution des Vollblutes. Das Ausmaß der durch das ex vivo-EKZ-Modell hervorgerufenen Hämodilution im Rahmen der Experimente wurde mittels Blutbildern bestimmt.

Im Vergleich zu den unverdünnten Baseline-Werten wurden ähnliche Abfälle des Hämatokrit (Abb. 5), der Erythrozyten (Abb. 6), der Thrombozyten (Abb. 7) sowie der Leukozyten (Abb. 8) nach Beginn der EKZ für die Kontrollproben, als auch für die mit Sevofluran behandelten Proben, beobachtet.

Des Weiteren zeigte die Behandlung mit Sevofluran keinen signifikanten Einfluss auf das Blutbild.

Die Hämatokrit-Werte sowie die Anzahl der Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten wurden vor Versuchsbeginn (Baseline-Werte = T0) und an den definierten Zeitpunkten T1 - T3 (30-, 60- und 90 min) (siehe 2.2.4) in den Kontrollproben (graue Balken; n = 5), sowie den mit Sevofluran behandelten Proben (weiße Balken; n = 5), gemessen.

Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben. Die Mittelwerte der Baseline-Werte der Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten wurden auf 100 % transformiert und die Messergebnisse der im Rahmen der EKZ entnommenen Proben in Relation zu den transformierten Baseline-Werten der jeweiligen Gruppe (Kontroll- vs. Sevofluran-Gruppe) gesetzt. Der Vergleich der beiden Gruppen erfolgte mittels RM-ANOVA und dem Post-Hoc-Test nach Bonferroni (siehe 2.3) (**p < 0,001 und ****p < 0,0001 kennzeichnet eine statistische Signifikanz im Vergleich zu den entsprechenden Ausgangswerten der Gruppe).

3.1.1 Hämatokrit

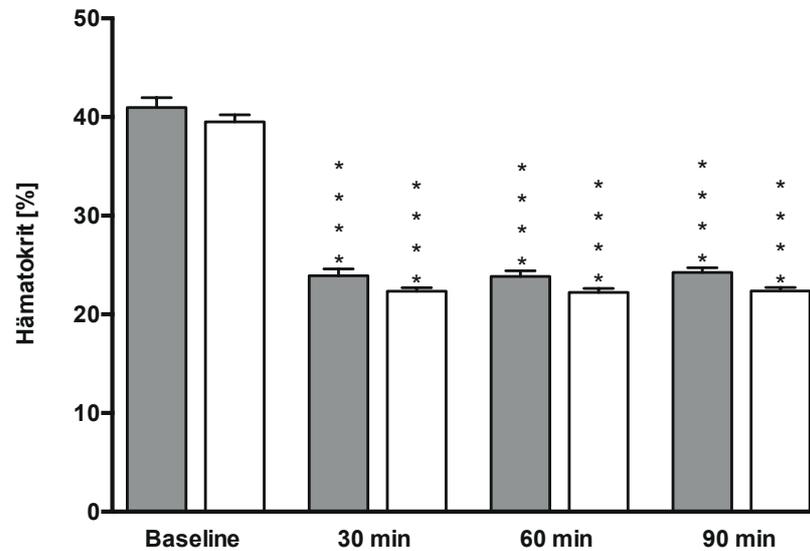


Abb. 5: Hämatokrit [%] (absolute Werte) im Zeitverlauf bei normothermer EKZ; Kontrollproben (graue Balken; n = 5); Sevofluran behandelte Proben (weiße Balken; n = 5); ****p < 0,0001 (im Vergleich zu den entsprechenden Ausgangswerten)

3.1.2 Erythrozyten

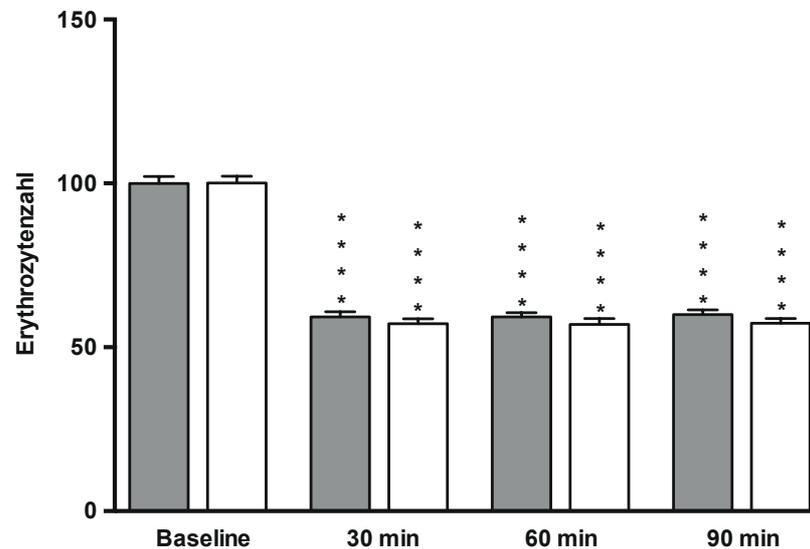


Abb. 6: Erythrozytenzahl (transformierte Werte) im Zeitverlauf bei normothermer EKZ; Kontrollproben (graue Balken; n = 5); Sevofluran behandelte Proben (weiße Balken; n = 5); ****p < 0,0001 (im Vergleich zu den entsprechenden Ausgangswerten)

3.1.3 Thrombozyten

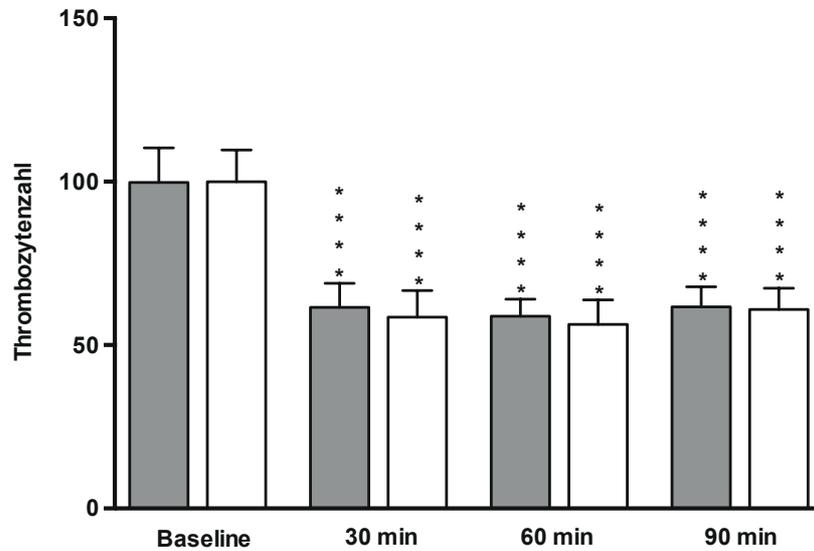


Abb. 7: Thrombozytenzahl (transformierte Werte) im Zeitverlauf bei normothermer EKZ; Kontrollproben (graue Balken; n = 5); Sevofluran behandelte Proben (weiße Balken; n = 5); ****p < 0,0001 (im Vergleich zu den entsprechenden Ausgangswerten)

3.1.4 Leukozyten

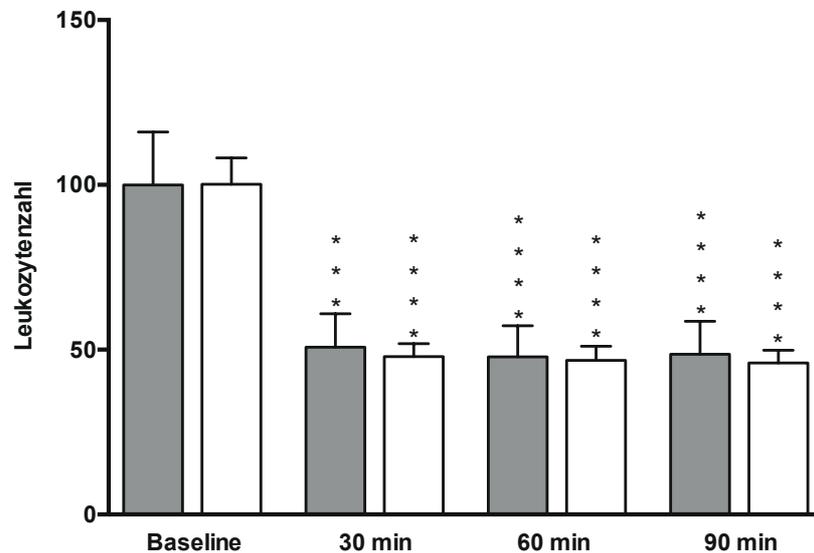


Abb. 8: Leukozytenzahl (transformierte Werte) im Zeitverlauf bei normothermer EKZ; Kontrollproben (graue Balken; n = 5); Sevofluran behandelte Proben (weiße Balken; n = 5); ***p < 0,001 und ****p < 0,0001 (im Vergleich zu den entsprechenden Ausgangswerten)

3.2 Effekt von EKZ und Sevofluran auf die Expression von P-Selektin

Die durchflusszytometrische Bestimmung einer Thrombozytenaktivierung im Studiensetting (siehe 2.2.1) erfolgte über die Analyse des thrombozytären Glykopeptids P-Selektin (CD62P) (siehe 1.6.1.2.1).

Es zeigte sich weder durch das in der vorliegenden Arbeit angewandte ex vivo-EKZ-Modell, noch durch die Applikation von Sevofluran ein statistisch signifikanter Effekt auf die Expression von P-Selektin. Tendenziell konnte jedoch eine Abnahme der Oberflächenexpression des Thrombozytenaktivierungsmarkers auf Einzelthrombozyten beobachtet werden (siehe Abb. 9). Im Gegensatz hierzu zeigt sich auf aggregatgebundenen Thrombozyten eine gesteigerte Freisetzung von P-Selektin im zeitlichen Verlauf der EKZ (siehe Abb. 10).

Entsprechend der charakteristischen Eigenschaften der anti-CD41 FITC markierten Thrombozyten bei der Vorwärts- (FSC) sowie seitlichen (SSC) Lichtstreuung des FACScan™, konnten die Versuchsproben anhand zuvor definierter Regionen, getrennt für Einzelthrombozyten und in Aggregat gebundenen Thrombozyten, bestimmt werden. Innerhalb dieser selektiven Regionen wurde die Präsenz von P-Selektin mittels des fluoreszenzmarkierten Antikörpers anti-CD62P PE detektiert und in Prozent von P-Selektin exprimierenden Einzelthrombozyten bzw. aggregatgebundenen Thrombozyten angegeben (siehe 2.2.5.4).

Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben. Die Mittelwerte der Baseline-Werte wurden auf 100 % transformiert und die Messergebnisse der im Rahmen der EKZ entnommenen Proben in Relation zu den transformierten Baseline-Werten der jeweiligen Gruppe (Kontroll- vs. Sevofluran-Gruppe) gesetzt. Der Vergleich der beiden Gruppen erfolgte mittels RM-ANOVA und dem Post-Hoc-Test nach Bonferroni (siehe 2.3).

3.2.1 P-Selektin Expression auf Einzelthrombozyten

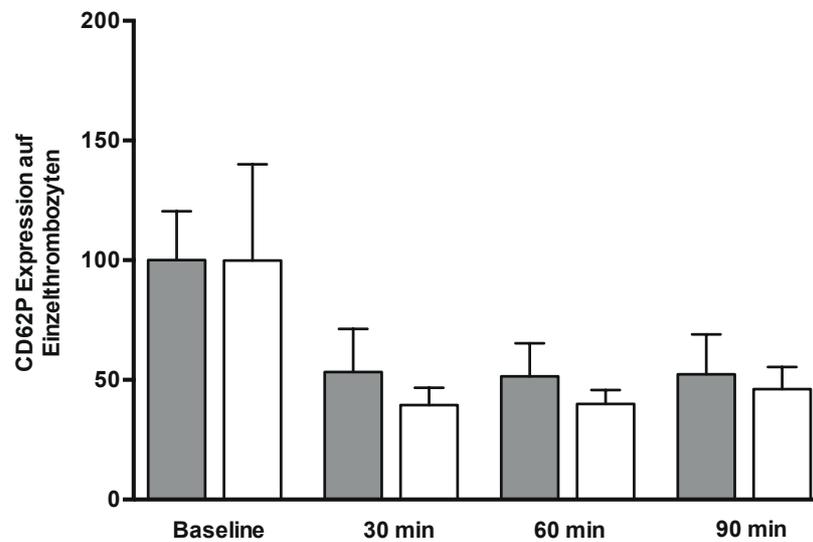


Abb. 9: CD62P (P-Selektin) positive Einzelthrombozyten (transformierte Werte) im Zeitverlauf bei normothermer EKZ; Kontrollproben (graue Balken; n = 5); Sevofluran behandelte Proben (weiße Balken; n = 5)

3.2.2 P-Selektin Expression auf aggregatgebundenen Thrombozyten

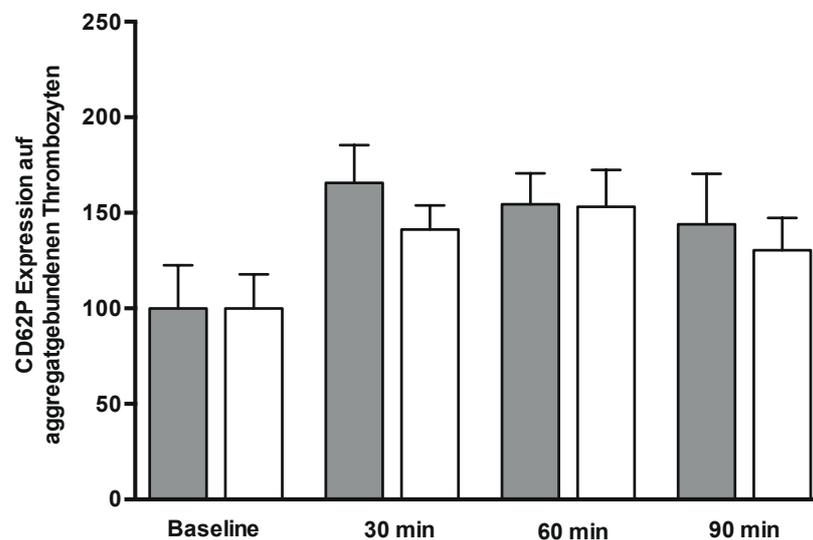


Abb. 10: CD62P (P-Selektin) positive aggregatgebundene Thrombozyten (transformierte Werte) im Zeitverlauf bei normothermer EKZ; Kontrollproben (graue Balken; n = 5); Sevofluran behandelte Proben (weiße Balken; n = 5)

3.3 Effekt von EKZ und Sevofluran auf die Leukozyten-Thrombozyten Aggregatbildung

Die Interaktion von aktivierten Leukozyten und Thrombozyten fördert die Entstehung inflammatorischer Prozesse [100]. Die Evaluation der Effekte der EKZ und des volatilen Anästhetikums Sevofluran auf die Leukozyten-Thrombozyten Aggregatbildung im Studiensetting (siehe 2.2.1) erfolgte mittels durchflusszytometrischer Verfahren.

Hinsichtlich der Leukozyten-Thrombozyten Aggregatbildung zeigte sich weder durch die EKZ, noch durch die Zugabe von Sevofluran ein statistisch signifikanter Effekt (siehe Abb. 11).

Entsprechend der charakteristischen Eigenschaften der anti-CD41 FITC markierten Thrombozyten bei der Vorwärts- (FSC) sowie seitlichen (SSC) Lichtstreuung des FACScan™, konnten die Versuchsproben anhand zuvor definierter Regionen, getrennt für Einzelthrombozyten und in Aggregaten gebundenen Thrombozyten, bestimmt werden. Innerhalb der für die Thrombozytenaggregate definierten Region wurde die Fluoreszenz des spezifischen Leukozytenmarkers anti-CD45 PE detektiert und als Prozentsatz der Leukozyten-Thrombozyten Aggregate innerhalb der Aggregatregion angegeben (siehe 2.2.5.4).

Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben. Die Mittelwerte der Baseline-Werte wurden auf 100 % transformiert und die Messergebnisse der im Rahmen der EKZ entnommenen Proben in Relation zu den transformierten Baseline-Werten der jeweiligen Gruppe (Kontroll- vs. Sevofluran-Gruppe) gesetzt. Der Vergleich der beiden Gruppen erfolgte mittels RM-ANOVA und dem Post-Hoc-Test nach Bonferroni (siehe 2.3).

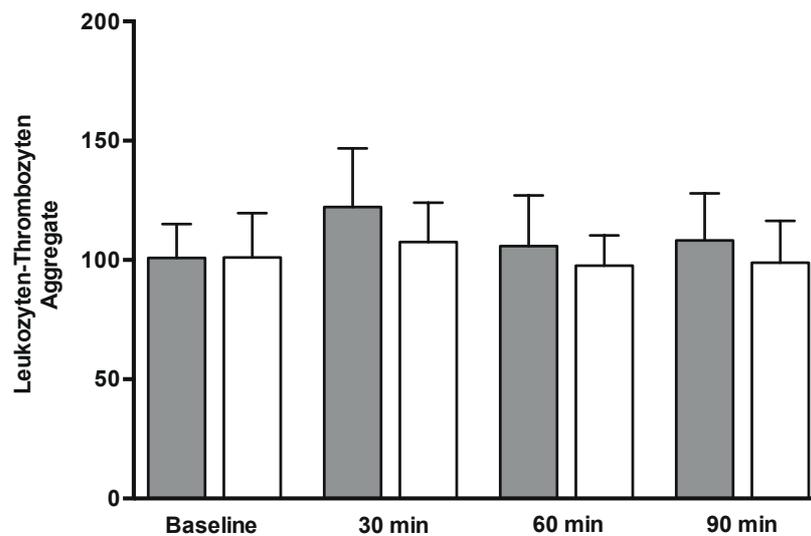


Abb. 11: Leukozyten-Thrombozyten Aggregate (transformierte Werte) im Zeitverlauf bei normothermer EKZ; Kontrollproben (graue Balken; n = 5); Sevofluran behandelte Proben (weiße Balken; n = 5)

3.4 Effekt von EKZ und Sevofluran auf die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine

Die Mediatorfunktion der potenten proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-8 sowie TNF- α auf die akute Entzündungsreaktion im Rahmen der EKZ wurde von Warren et al. [5] beschrieben. Mittels konventioneller ELISA-Kits wurde der Einfluss der EKZ, wie auch des Narkotikums Sevofluran, auf die Freisetzung der oben genannten Zytokine im angewandten Versuchsmodell (siehe 2.2.1 und 2.2.3), untersucht.

Die Zytokine IL-1 β (Abb. 12), IL-8 (Abb. 13) sowie TNF- α (Abb. 14) zeigten tendenziell, wenn auch statistisch nicht signifikant, einen Anstieg während der EKZ. Des Weiteren konnte kein statistisch signifikanter Effekt des Anästhetikums Sevofluran auf die Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine im Zuge des in den Experimenten verwendeten normothermen ex vivo-EKZ-Modells beobachtet werden.

Die Bestimmung der Plasma-Konzentrationen der entsprechenden Zytokine erfolgte zu den Probenentnahmezeitpunkten (siehe 2.2.4) streng nach

Herstellervorgaben (siehe 2.2.6.2). Die gemessenen Extinktionen der Versuchsproben wurden in Relation zu den Extinktionen einer korrespondierenden Standardverdünnungsreihe gesetzt. Dies ermöglichte eine exakte Bestimmung der Zytokin-Konzentrationen der Versuchsproben.

Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben. Aufgrund der durch das Priming-Volumen des ex vivo-EKZ-Modells bedingten Hämodilution wurde auch bei den Versuchsproben zur Analyse der Zytokine IL-1 β , IL-8 sowie TNF- α , welche während der Zirkulation aus dem Modell gewonnen wurden, eine Hämatokrit-Korrektur durchgeführt. Dies ermöglichte die mathematische Bereinigung des Verdünnungseffektes. Die Mittelwerte der Baseline-Werte wurden auf 100 % transformiert und die Messergebnisse der im Rahmen der EKZ entnommenen Proben (Hämatokrit korrigiert) in Relation zu den transformierten Baseline-Werten der jeweiligen Gruppe (Kontroll- vs. Sevofluran-Gruppe) gesetzt. Der Vergleich der beiden Gruppen erfolgte mittels RM-ANOVA und dem Post-Hoc-Test nach Bonferroni (siehe 2.3).

3.4.1 IL-1 β

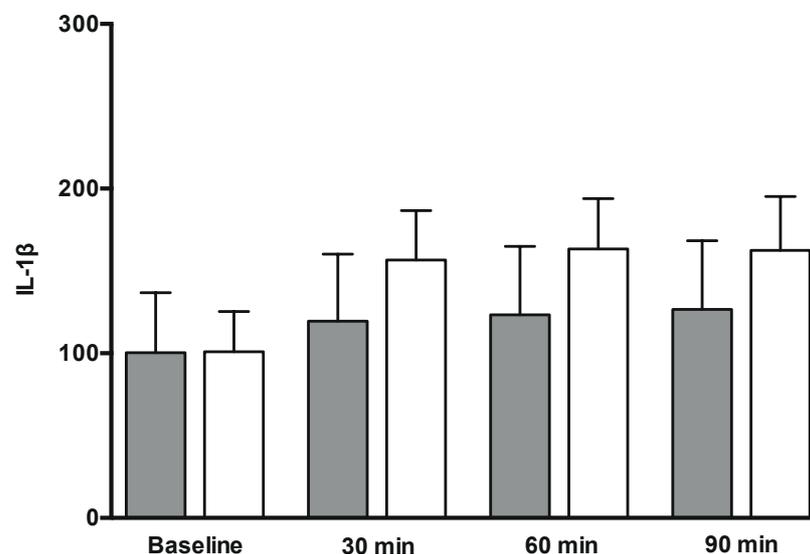


Abb. 12: IL-1 β (transformierte Werte) im Zeitverlauf bei normothermer EKZ; Kontrollproben (graue Balken; n = 5); Sevofluran behandelte Proben (weiße Balken; n = 5)

3.4.2 IL-8

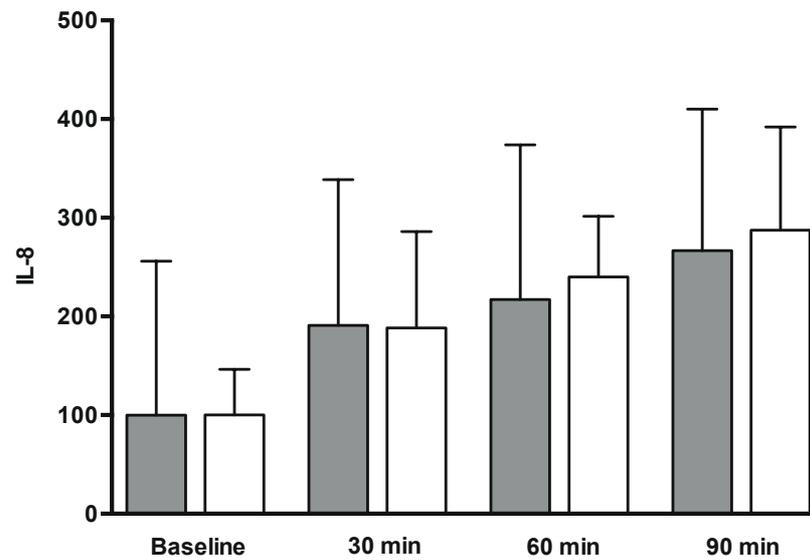


Abb. 13: IL-8 (transformierte Werte) im Zeitverlauf bei normothermer EKZ; Kontrollproben (graue Balken; n = 5); Sevofluran behandelte Proben (weiße Balken; n = 5)

3.4.3 TNF- α

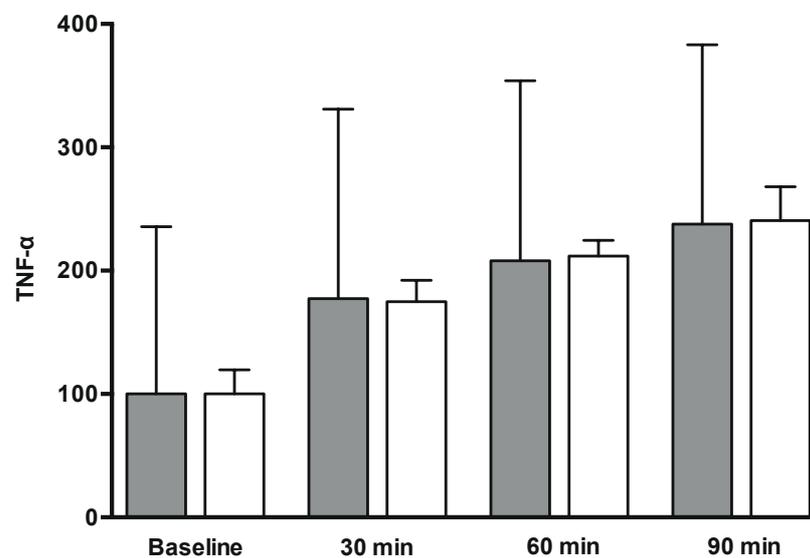


Abb. 14: TNF- α (transformierte Werte) im Zeitverlauf bei normothermer EKZ; Kontrollproben (graue Balken; n = 5); Sevofluran behandelte Proben (weiße Balken; n = 5)

3.5 Effekt von EKZ und Sevofluran auf die Mac-1 Expression

Das Leukozyten-Integrin Mac-1 (siehe 1.6.2.2.2) spielt eine essentielle Rolle bei inflammatorischen Prozessen [96]. In der vorliegenden Studie wurde mit Hilfe durchflusszytometrischer Methoden untersucht, ob die Behandlung mit Sevofluran eine Auswirkung auf die Mac-1 Oberflächenexpression der neutrophilen Granulozyten und Monozyten im Rahmen der EKZ zeigt.

Die Mac-1 Expression auf neutrophilen Granulozyten zeigte sich zu allen Untersuchungszeitpunkten im Vergleich zum Baseline-Ausgangswert um das 3,6-fache ($p < 0,001$) erhöht.

Das volatile Anästhetikum Sevofluran hemmt diese durch die EKZ induzierte Expression des Leukozyten-Integrins Mac-1 auf Granulozyten signifikant. In den mit Sevofluran behandelten Versuchsproben war die Mac-1 Expression zu allen Untersuchungszeitpunkten um das 1,5-fache ($p < 0,05$) niedriger im Vergleich zu denen der Kontrollproben (siehe Abb. 15).

Ein statistisch signifikanter Anstieg der Mac-1 Expression auf Monozyten durch die EKZ konnte nicht beobachtet werden. Des Weiteren zeigte sich im Rahmen des in der vorliegenden Studie verwendeten normothermen extrakorporalen Zirkulationsmodells kein Einfluss des volatilen Anästhetikums auf die Oberflächenexpression von Mac-1 auf Monozyten (siehe Abb. 16).

Die durchflusszytometrischen Analysen zur Detektion von Mac-1 auf der Zelloberfläche der Leukozyten erfolgte mit Hilfe des Integrins CD11b, welches gemeinsam mit CD18 den Mac-1 Komplex bildet, der als Aktivierungsmarker der weißen Blutkörperchen fungiert.

Gemäß des Studienprotokolls (siehe 2.2.1 und 2.2.3) wurde humanes Vollblut in zwei Gruppen (Kontrollproben (graue Balken; $n = 5$), sowie den mit Sevofluran behandelten Proben (weiße Balken; $n = 5$)) für 90 Minuten in einem ex vivo-EKZ-Modell (2.1.1.5) zirkuliert. Zu den Probenentnahmezeitpunkten (siehe 2.2.4) erfolgte die Detektion des Oberflächenmarkers CD11b, um diesen im zeitlichen Verlauf zu analysieren.

Mittels zuvor bestimmter selektiver Analysefenster (Gates) in einem FSC/SSC-Dotplot des FACScan™ wurde die CD11b Expression separat für die

Granulozyten- und Monozyten-Population bestimmt (siehe Abb. 2). Innerhalb dieser Regionen wurde mittels Histogrammen der geometrische Mittelwert der Fluoreszenz des Antikörpers anti-CD11b PE analysiert (siehe 2.2.5.4).

Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben. Die Mittelwerte der Baseline-Werte wurden auf 100 % transformiert und die Messergebnisse der im Rahmen der EKZ entnommenen Proben in Relation zu den transformierten Baseline-Werten der jeweiligen Gruppe (Kontroll- vs. Sevofluran-Gruppe) gesetzt. Der Vergleich der beiden Gruppen erfolgte mittels RM-ANOVA und dem Post-Hoc-Test nach Bonferroni (siehe 2.3) (* $p < 0,05$ und *** $p < 0,001$ kennzeichnet eine statistische Signifikanz im Vergleich zu den entsprechenden Ausgangswerten der Gruppe; # $p < 0,05$ kennzeichnet eine statistische Signifikanz im Vergleich zur jeweiligen Vergleichsgruppe).

3.5.1 Mac-1 Expression auf neutrophilen Granulozyten

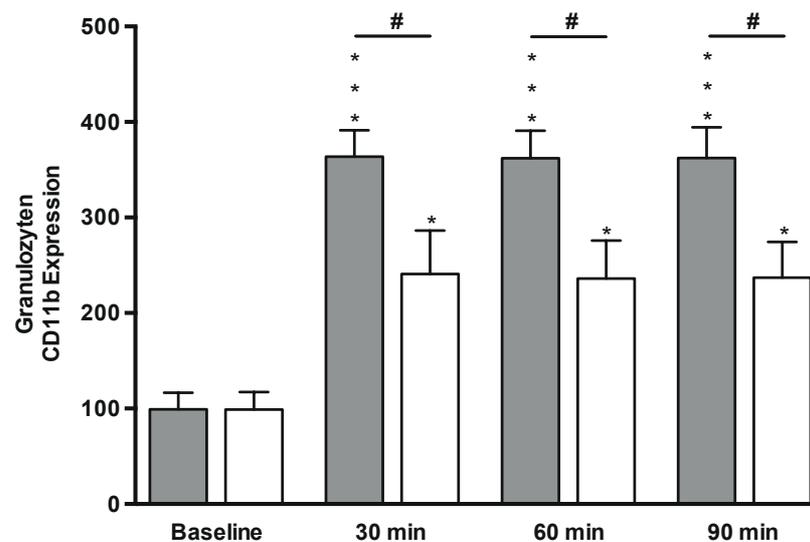


Abb. 15: CD11b positive Granulozyten (transformierte Werte) im Zeitverlauf bei normothermer EKZ; Kontrollproben (graue Balken; $n = 5$); Sevofluran behandelte Proben (weiße Balken; $n = 5$); * $p < 0,05$ und *** $p < 0,001$ (im Vergleich zu den entsprechenden Ausgangswerten); # $p < 0,05$ (im Vergleich zur jeweiligen Vergleichsgruppe)

3.5.2 Mac-1 Expression auf Monozyten

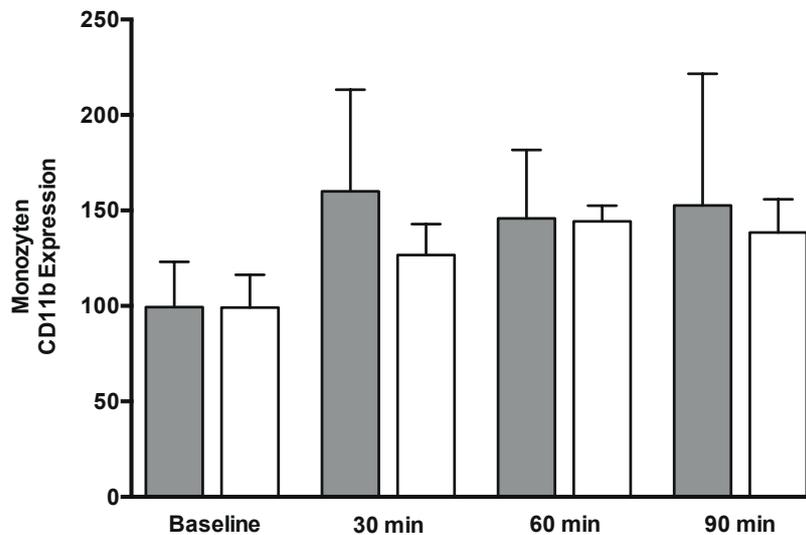


Abb. 16: CD11b positive Monozyten (transformierte Werte) im Zeitverlauf bei normothermer EKZ; Kontrollproben (graue Balken; n = 5); Sevofluran behandelte Proben (weiße Balken; n = 5)

3.6 Effekt von EKZ und Sevofluran auf die Freisetzung der PMN-Elastase

Das zytotoxisch wirkende Enzym PMN-Elastase wird von neutrophilen Granulozyten nach deren Aktivierung freigesetzt. Die PMN-Elastase spielt eine Schlüsselrolle der immunologischen Regulation inflammatorischer Prozesse [81]. Die Quantifizierung des Einflusses der EKZ sowie des Anästhetikums Sevofluran auf die Freisetzung der PMN-Elastase im verwendeten Studienmodell (siehe 2.2.1 und 2.2.3) erfolgte mittels kommerziell erhältlicher Enzymimmunoassays.

Die PMN-Elastase zeigte zu allen Untersuchungszeitpunkten im Vergleich zum Baseline-Ausgangswert eine signifikant gesteigerte Freisetzung. Die Konzentration der PMN-Elastase erhöhte sich nach einer Zirkulationsdauer von 30 Minuten auf das 2,7-fache ($p < 0,001$), nach 60 Minuten auf das 3,3-fache ($p < 0,001$) und nach 90 Minuten auf das 3,7-fache ($p < 0,001$) des Ausgangswertes.

Das volatile Anästhetikum Sevofluran minimierte diesen durch die EKZ induzierten Konzentrationsanstieg der PMN-Elastase signifikant. In den mit Sevofluran behandelten Versuchsproben war die Freisetzung der PMN-Elastase zu allen Untersuchungszeitpunkten im Vergleich zur jeweiligen Vergleichsgruppe um das 1,8-fache reduziert. Dies entspricht einem Signifikanzwert von $p < 0,05$ nach 30 Minuten, $p < 0,01$ nach 60 Minuten und von $p < 0,001$ nach 90 Minuten der extrakorporalen Zirkulation (siehe Abb. 17).

Zu den Probenentnahmezeitpunkten (siehe 2.2.4) erfolgte die Bestimmung der Plasma-Konzentration der PMN-Elastase streng nach Herstellervorgaben (siehe 2.2.6.3). Die gemessenen Extinktionen der Versuchsproben wurden in Relation zu den Extinktionen einer Standardverdünnungsreihe gesetzt. Dies ermöglichte eine exakte Bestimmung der PMN-Elastase-Konzentrationen der Versuchsproben.

Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben. Aufgrund der durch das Priming-Volumen des ex vivo-EKZ-Modells bedingten Hämodilution wurde bei den Versuchsproben zur Bestimmung der PMN-Elastase, die während der Zirkulation aus dem Modell entnommen wurden, eine Hämatokrit-Korrektur durchgeführt. Dies ermöglichte die mathematischen Bereinigung des Verdünnungseffektes. Die Mittelwerte der Baseline-Werte wurden auf 100 % transformiert und die Messergebnisse der im Rahmen der EKZ entnommenen Proben (Hämatokrit korrigiert) in Relation zu den transformierten Baseline-Werten der jeweiligen Gruppe (Kontroll- vs. Sevofluran-Gruppe) gesetzt. Der Vergleich der beiden Gruppen erfolgte mittels RM-ANOVA und dem Post-Hoc-Test nach Bonferroni (siehe 2.3) (***) $p < 0,001$ kennzeichnet eine statistische Signifikanz im Vergleich zu den entsprechenden Ausgangswerten der Gruppe; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ und ### $p < 0,001$ kennzeichnet eine statistische Signifikanz im Vergleich zur jeweiligen Vergleichsgruppe).

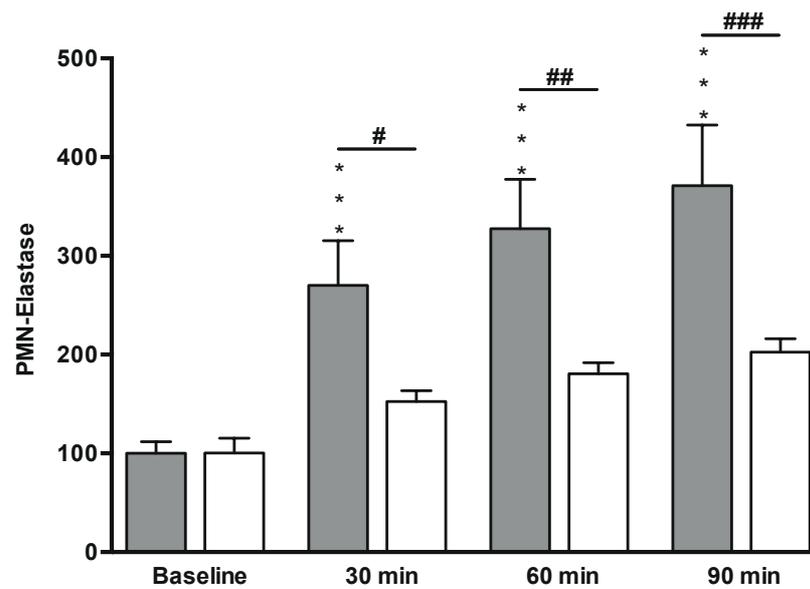


Abb. 17: PMN-Elastase (transformierte Werte) im Zeitverlauf bei normothermer EKZ; Kontrollproben (graue Balken; n = 5); Sevofluran behandelte Proben (weiße Balken; n = 5); ***p < 0,001 (im Vergleich zu den entsprechenden Ausgangswerten); #p < 0,05, ##p < 0,01 und ###p < 0,001 (im Vergleich zur jeweiligen Vergleichsgruppe)

4 Diskussion

Die extrakorporale Zirkulation (EKZ) ist ein unabdingbares Instrument der modernen Herzchirurgie und wird bei einer Vielzahl komplexer Herzoperationen zur Aufrechterhaltung stabiler Kreislaufparameter und des Gasaustausches aus operationstechnischen Gründen eingesetzt.

Der Einsatz der EKZ ist allerdings auch mit unerwünschten und potentiell lebensgefährlichen Nebenwirkungen für den Patienten assoziiert [29]. So zählt die EKZ zu einer der Hauptursachen des systemischen Inflammationssyndroms (SIRS), welches zu einem Multi-Organversagen und einer damit einhergehenden signifikanten Erhöhung der Mortalität führen kann [2, 4, 5, 31].

Dem volatilen Anästhetikum Sevofluran werden neben kardioprotektiven Effekten auch immunmodulierende und antiinflammatorische Wirkungen zugeschrieben [3, 7, 8, 22]. In der Literatur finden sich bisher allerdings keine Daten, ob die routinemässige Verabreichung von Sevofluran in klinisch gebräuchlichen Konzentrationen während der balancierten Anästhesie, die durch eine EKZ verursachte Entzündungsreaktion reduzieren kann.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von Sevofluran auf inflammatorische Prozesse im Rahmen der extrakorporalen Zirkulation untersucht. Hierzu wurde systematisch das Blutbild, die Expression der Oberflächenrezeptoren Mac-1 und P-Selektin, die Leukozyten-Thrombozyten Aggregatbildung, die Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-8, TNF- α , sowie die Konzentration der PMN-Elastase im zeitlichen Verlauf der normothermen ex vivo EKZ analysiert.

4.1 Diskussion der Methodik und verwendeten Materialien

Um klinische Bedingungen während der EKZ realistisch zu imitieren, war das angewandte ex vivo-EKZ-Modell aus routinemässig im klinischen Alltag zum Einsatz kommenden Komponenten einer Herz-Lungen-Maschine aufgebaut. Die Steuerung der komplexen Schaltung erfolgte durch einen erfahrenen Kardioelektroniker gemäß den örtlichen Standards.

Humanes, heparinisierendes Vollblut gesunder Probanden wurde für jeden Versuch frisch durch qualifiziertes Personal des IKET Tübingen entnommen

und ohne zeitlichen Verlust, mechanische oder thermische Belastungen in das Studienmodell integriert. Es ist somit von realistischen und nahe am klinischen Alltag befindlichen Bedingungen auszugehen.

Der in den Experimenten verwendete Studienaufbau stellt ein bewährtes Modell zur Analyse von durch die EKZ induzierten entzündlichen Ereignissen und Untersuchungen zur Thrombozytenfunktion dar. Vergleichbare EKZ-Modelle kamen in einer Vielzahl von Studien zum Einsatz, um eine durch die EKZ hervorgerufene Leukozyten- und Thrombozytenaktivierung zu analysieren [101-103], sowie Wirkstoffe für eine potentiell therapeutische Inhibition dieser nachteiligen Effekte zu untersuchen [95, 104-107].

Die durchflusszytometrischen Untersuchungen der Oberflächenrezeptoren P-Selektin und Mac-1, sowie die Analysen der Leukozyten-Thrombozyten Aggregate, erfolgten nach bereits etablierten Verfahren [51, 95, 96]. Um eine Thrombozyten-, respektive Leukozytenfunktionsstörung auszuschließen, wurden neben den eigentlichen Versuchsproben zusätzlich stimulierte Kontrollproben angefertigt. Des Weiteren erfolgte zur Quantifizierung einer unspezifischen Antikörperbindung eine Kontrolle und Einstellung sämtlicher durchflusszytometrischer Proben unter Verwendung ihrer jeweiligen Kontrollantikörper.

Die Bestimmung der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-8, TNF- α sowie der PMN-Elastase erfolgte mittels kommerziell erhältlicher Sandwich-ELISA-Kits.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Ergebnisse zeigen deutlich, dass die extrakorporale Zirkulation die Mac-1 Expression auf neutrophilen Granulozyten sowie die Freisetzung der PMN-Elastase aus polymorphkernigen Granulozyten induziert. Hervorzuheben ist, dass diese beiden durch das ex vivo-Modell der EKZ hervorgerufenen Effekte, durch die Applikation des volatilen Anästhetikums Sevofluran in einer routinemäßig im klinischen Alltag verwendeten Konzentration von 2 Vol.-%, signifikant minimiert werden.

Gleichwohl werden die Mac-1 Expression auf Monozyten, die Leukozyten-Thrombozyten Aggregatbildung, die thrombozytäre P-Selektin Expression sowie die getesteten proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-8 und TNF- α nicht statistisch signifikant durch die EKZ und die Behandlung mit Sevofluran beeinflusst.

4.2.1 Der Effekt der extrakorporalen Zirkulation auf das Blutbild

Neben dem Hämodilutionseffekt, der dem Priming-Volumen des extrakorporalen Zirkulationsmodells zuzuschreiben ist, zeigt sich kein direkter Einfluss der EKZ auf die Blutbildparameter Hämatokrit, Erythrozyten-, Thrombozyten- und Leukozytenzahl. Dies steht im Einklang mit den Studienergebnissen einer Arbeitsgruppe um Finn et al. [108], welche ebenfalls keinen durch die EKZ bedingten Abfall der Zellzahl, abgesehen von dem der Hämodilution bedingten, festgestellt haben. Im Gegensatz hierzu berichten andere Autoren von einer signifikanten Abnahme der Leukozyten- und Thrombozytenzahl [102] im Rahmen der ex vivo EKZ [104-107]. Als Ursache gilt der Kontakt und die Adhäsion der zellulären Bestandteile des Blutes mit den künstlichen Oberflächen des extrakorporalen Kreislaufs.

Die, aufgrund der Arbeitsweise und des Bauprinzips der Herz-Lungen-Maschine unabdingbare Vermengung des Blutes mit dem aus kristalloider und/oder kolloidaler Flüssigkeit bestehendem Füllvolumen (Priming-Volumen), führt zu einer Hämodilution. Dieser werden, je nach Ausmaß der Hämodilution, zahlreiche negative Auswirkungen auf die Morbidität und Mortalität zugeschrieben [109, 110]. Allerdings gibt es bisher keine Evidenz-basierten, gesicherten Daten zu einem kritischen Hämatokrit im Rahmen der EKZ.

4.2.2 Thrombozytenaktivierung, respektive Leukozyten-Thrombozyten Konjugatbildung im Rahmen der EKZ

Die durchflusszytometrische Bestimmung einer Thrombozytenaktivierung erfolgte über die Analyse des Glykopeptids P-Selektin (CD62P) gesondert für Einzelthrombozyten und in Aggregaten gebundenen Thrombozyten. P-Selektin dient als Standardparameter zur Bestimmung einer Thrombozytenaktivierung in

experimentellen Untersuchungen [44, 51-53]. Weitere Studien postulieren jedoch, dass die alleinige Bestimmung des externalisierten P-Selektins das Ausmaß der gesamten Thrombozytenaktivierung unterschätzt, da ein erheblicher Teil der aktivierten Blutplättchen an zirkulierenden Leukozyten oder Endothelzellen adhärirt. Aufgrund dessen stellt die Analyse der Leukozyten-Thrombozyten Konjugate eine sinnvolle Ergänzung der Thrombozytendiagnostik dar und gilt als sensitiverer Marker für eine in vivo Aktivierung der Thrombozyten [43, 111, 112]. Darüber hinaus besteht eine enge Vernetzung zwischen Hämostase und Inflammation. So berichten u.a. Gawaz et al. sowie Rondina et al. von einem direkten Zusammenhang zwischen den Aktivierungsvorgängen in Thrombozyten und inflammatorischen Ereignissen [53, 113]. P-Selektin fungiert als wichtiger Adhäsionsrezeptor und kann die Interaktion verschiedener Leukozyten-Subtypen mit Thrombozyten, Leukozyten und Endothelzellen vermitteln. Das nach einer Aktivierung der Blutplättchen freigesetzte P-Selektin stellt dadurch möglicherweise ein wichtiges Bindeglied inflammatorischer Vorgänge dar [43, 48, 50, 114].

Die in der vorliegenden Studie gewonnenen Daten zeugen von einer verhältnismäßig schonenden Behandlung der Blutplättchen durch die EKZ. Weder bei den Bestimmungen der Leukozyten-Thrombozyten Aggregate, noch bei den Analysen zur Expression des Thrombozytenaktivierungsmarkers P-Selektin auf Einzelthrombozyten sowie in Aggregaten gebundenen Thrombozyten, zeigt sich ein statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zum Ausgangswert.

In einer Vielzahl an in vitro Studien mit vergleichbarem Versuchsaufbau zeigte sich, im Gegensatz zu den in der vorliegenden Arbeit ermittelten Ergebnissen, eine teils massiv gesteigerte Thrombozytenaktivierung. Im Unterschied zu dem in dieser Arbeit verwendeten Studiendesign bei Normothermie (37 °C) erfolgte ein Großteil dieser Untersuchungen jedoch bei Hypothermie. So zeigte sich bei Temperaturen im Bereich der tiefen Hypothermie (< 20 °C) eine gesteigerte P-Selektin Expression auf Thrombozyten sowie die Entstehung von Thrombozytenaggregaten [95, 115-117]. Des Weiteren wird von einer reduzierten Thrombozytenzahl unter hypothermen Bedingungen berichtet [118,

119]. Die klinische Relevanz des Ausmaß der Beeinträchtigung des Gerinnungssystems unter der Bedingung der EKZ und des tief hypothermen Kreislaufstillstandes (DHCA), sowie seine Auswirkung auf den postoperativen Verlauf, wird in der Literatur unterschiedlich bewertet. Einige Studiengruppen berichten über einen deutlich gesteigerten Blutverlust mit hieraus resultierendem vermehrtem Transfusionsbedarf [120], andere Autoren verneinen dies [121, 122].

Die Erkenntnisse der hier vorliegenden Studie basieren auf Versuchen bei Normothermie (37 °C) und ermöglichen daher keinerlei Rückschlüsse auf eine eventuell temperaturabhängige Aktivierung der Blutplättchen. Festzuhalten ist jedoch, dass sich durch das normotherme ex vivo-Studienmodell keine signifikante Thrombozytenaktivierung, bzw. Leukozyten-Thrombozyten Konjugatbildung, nachweisen lässt.

4.2.3 Sekretion von Zytokinen unter dem Einfluss der EKZ

Warren et al. zeigen in ihrer Arbeit, dass die EKZ eng mit der Sekretion proinflammatorisch wirkender Zytokine assoziiert ist [5]. Die in der vorliegenden Studie bestimmten Zytokine IL-1 β , IL-8 sowie TNF- α zeigten zwar tendenziell einen Anstieg über die gesamte Zirkulationsdauer, dieser fällt jedoch statistisch nicht signifikant aus. Diese Erkenntnis stimmt mit der Beobachtung eines fehlenden Einflusses des verwendeten Modells der EKZ auf die Mac-1 Oberflächenexpression der Monozyten überein. Aktivierte Monozyten und Makrophagen sind wesentlich an der Produktion und Freisetzung der oben genannten Zytokine beteiligt [42, 64]. Aus diesem Grund ist bei einer fehlenden Aktivierung dieser Zellspezies auch nicht von einer gesteigerten Freisetzung, der besonders in der Frühphase der Immunantwort gebildeten Entzündungsmediatoren, auszugehen [123].

Die Ergebnisse weiterer Arbeitsgruppen zu diesem Thema sind ebenfalls kontrovers. So zeigt sich in einigen Arbeiten unter der Bedingung der EKZ eine signifikant gesteigerte Produktion der Mediatoren [124-126]. Andere Studien konnten die Zytokine gar nicht, bzw. nur bei einem geringen Prozentsatz der Probanden nachweisen [127-129].

Wan et al. vermuten, dass der Ursprung der IL-8 und TNF- α Produktion während der EKZ kardiogener Natur ist [130]; Kawamura et al. bekräftigen diesen Verdacht für IL-6 und IL-8 [8]. Durch das im Studiensetting verwendete ex vivo-Modell kann die Hypothese des kardiogenen Ursprungs weder bestätigt noch entkräftet werden.

Zur klinischen Relevanz der Zytokin-Antwort nach EKZ existieren extrem konträre Ergebnisse. So korrelieren in einigen Studien erhöhte Spiegel der proinflammatorischen Interleukine mit einer erhöhten Inzidenz von Multiorganversagen und perioperativer Letalität, andere Untersuchungen zeigen keine klinische Konsequenz der unterschiedlichen Zytokin-Antwort [131].

4.2.4 Leukozytenaktivierung

Der als Aktivierungsmarker der Leukozyten fungierende Rezeptor Mac-1 (CD11b/CD18) erfüllt vielfältige Aufgaben im Rahmen des Immun- sowie Blutgerinnungssystems [64, 76]. Die Oberflächenexpression, des im physiologischen Zustand in intrazellulären Granula gespeicherten Rezeptors, wurde durchflusszytometrisch separat für Monozyten und neutrophile Granulozyten bestimmt.

Hierbei zeigt sich zu allen Untersuchungszeitpunkten eine um das 3,6-fache ($p < 0,001$) gesteigerte Mac-1 Oberflächenexpression auf neutrophilen Granulozyten im Vergleich zum Baseline-Ausgangswert. Diese durch die EKZ induzierte Aktivierung der neutrophilen Granulozyten wird durch das volatile Anästhetikum Sevofluran signifikant gehemmt. So zeigt sich die Mac-1 Expression zu allen Untersuchungszeitpunkten der mit Sevofluran behandelten Proben um das 1,5-fache ($p < 0,05$) verringert im Vergleich zu denen der Kontrollproben. Ein statistisch signifikanter Einfluss der ex vivo EKZ auf die Leukozytensubpopulation der Monozyten zeigt sich hingegen nicht.

Diese Beobachtung stimmt mit den Resultaten einer Studie von Kappelmayer et al. überein, die analog zu den Ergebnissen dieser Studie berichten, dass sich bei normothermer EKZ die Mac-1 Oberflächenexpression auf Monozyten, im Gegensatz zu der auf polymorphkernigen Leukozyten, nicht signifikant ändert [132]. Die Arbeitsgruppe kann in der gleichen Forschungsarbeit zwar auch

einen Anstieg der monozytären Mac-1 Expression nachweisen, dieser wird jedoch nicht der extrakorporalen Zirkulation, sondern vielmehr der in diesem Fall zugrundeliegenden Temperatur von 28 °C, zugeschrieben.

Nader et al. zeigen in einer klinischen Studie im Rahmen ACVB-Operationen unter Zuhilfenahme der EKZ ebenfalls einen potentiell antiinflammatorischen Effekt von Sevofluran und seine suppressive Wirkung auf CD11b/CD18. So lässt sich in dieser Untersuchung u.a. eine minimierte Expression von Mac-1 auf neutrophilen Granulozyten nach Applikation des volatilen Anästhetikums beobachten [7]. Allerdings erfolgte die eigentliche Allgemeinanästhesie der Studienteilnehmer in Form einer total intravenösen Anästhesie (TIVA); Sevofluran wurde zusätzlich zur kardioplegischen Lösung im Sinne einer Myokardprotektion in gelöster Form appliziert.

4.2.5 PMN-Elastase Expression

Die PMN-Elastase spielt gemeinsam mit anderen neutrophilen Serinproteasen (NSPs) eine Schlüsselrolle in der immunologischen Regulation inflammatorischer Prozesse [81, 83]. Eine gesteigerte Freisetzung der PMN-Elastase durch die EKZ ist in klinischen [128, 133, 134] als auch experimentellen Studien [105, 108] belegt. Die in der vorliegenden Arbeit im Rahmen der normothermen ex vivo EKZ gewonnenen Daten bestätigen dies. So zeigt sich zu allen Untersuchungszeitpunkten eine im Vergleich zum Ausgangswert signifikante und im Umfang konstant gesteigerte Freisetzung der PMN-Elastase. Die Konzentration korreliert mit der Zirkulationsdauer und erreicht nach 90 Minuten das 3,7-fache ($p < 0,001$) des Ausgangswertes. Sevofluran minimiert diesen durch die EKZ verursachten Konzentrationsanstieg der PMN-Elastase signifikant. So zeigt sich zu allen Untersuchungszeitpunkten eine im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe um das 1,8-fache verringerte Freisetzung der PMN-Elastase.

Eine medikamentöse Modulation der PMN-Elastase ist in einer Vielzahl an Publikationen beschrieben. Allerdings befinden sich darunter bisher keine, die sich mit dem Einfluss volatiler Anästhetika auf die PMN-Elastase befassen.

Ein Großteil der Studien bezieht sich auf den Wirkstoff Sivelestat (Elaspol[®], Ono Pharmaceutical Company Ltd., Osaka, Japan), einen selektiven Inhibitor der neutrophilen Elastase [135]. In experimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass Sivelestat den Plasmaspiegel der PMN-Elastase im Rahmen der extrakorporalen Zirkulation effektiv reduziert [105, 107]. Sivelestat besitzt in Japan die Arzneimittelzulassung zur Therapie der akuten Lungenschädigung (ALI, acute lung injury), bzw. des akuten Atemnotsyndrom (ARDS, acute respiratory distress syndrome) [136] in Kombination mit einem systemischen Inflammationssyndrom (SIRS) und wird dort bei geeigneter Indikation routinemäßig im Therapieregime eingesetzt [137, 138]. Die Studienlage zum Nutzen der Therapie ist jedoch uneinheitlich. So konnten einige klinische Studien eine minimierte Verweildauer auf der Intensivstation, eine verringerte Anzahl an Beatmungstagen sowie eine gesteigerte 180-Tage Überlebensrate bei Patienten mit ALI/ARDS und SIRS unter Therapie mit Sivelestat nachweisen [137, 139]. Andere Untersuchungen, zum Beispiel eine Metaanalyse von Iwata et al. aus dem Jahr 2010, können dies jedoch nicht bestätigen [140, 141].

Aktuellste Studienergebnisse schreiben jedoch weiteren, auch in Deutschland fest und routinemäßig im klinischen Alltag verwendeten Medikamenten, einen potentiell protektiven Effekt zu. So scheinen unter anderem die gebräuchlichen intravenösen Anästhetika Propofol [142] und Ketamin [143] die neutrophile Elastase signifikant zu minimieren. In Zusammenschau mit den durch unsere Arbeitsgruppe ermittelten Daten für das volatile Anästhetikum Sevofluran, zeugen diese Erkenntnisse von einer einfachen und effektiven Möglichkeit die Freisetzung der PMN-Elastase zu reduzieren, und damit nachteilige Effekte in der Regulation inflammatorischer Prozesse zu minimieren.

4.2.6 Gesamtbewertung des Einflusses von EKZ und Sevofluran auf immunkompetente Zellen

Die alleinige Betrachtung eines einzelnen Parameters zur Bewertung des Einflusses des Anästhetikums Sevofluran während extrakorporaler Zirkulation erscheint aufgrund der Vielzahl an sich wechselseitig beeinflussenden und

miteinander interagierenden Mechanismen nicht sinnvoll [43, 53, 100, 144, 145].

So vermittelt unter anderem P-Selektin die Thrombozyten-Leukozyten Interaktion und stellt somit ein wichtiges Bindeglied der Verknüpfung des Hämostase- und Immunsystems dar [48-50, 100]. Das Integrin Mac-1 spielt insbesondere bei der Ausbildung vom PMN-Thrombozyten Konjugaten eine entscheidende Rolle. Die stabile Adhäsion und Migration der Leukozyten an aktivierte Thrombozyten erfolgt, indem Fibrinogen sowohl an den Rezeptor GPIIb/IIIa auf Blutplättchen, als auch an Mac-1 der Leukozyten, bindet [43, 62, 63]. Darüber hinaus vermittelt Mac-1 über die Interaktion mit ICAM-1 eine Leukozytenadhäsion am Endothel [74] und kann einen alternativen Weg der Blutgerinnung einleiten [80]. Zudem wird Mac-1 mit weiteren immunologischen Geschehen wie Chemotaxis [78] und der antikörperabhängigen Zytotoxizität [79] in Verbindung gebracht.

Die in Studien beschriebene Expression von Zytokinen während der EKZ stellt einen weiteren Mediator der akuten Entzündungsreaktion dar [5, 124-126]. So bewirken die im Rahmen dieser Untersuchung bestimmten proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 β und IL-8 u.a. eine Aktivierung der nukleären Transkriptionsfaktoren NF κ B und AP-1. Daraus resultiert eine Zellaktivierung, Zelldifferenzierung sowie die Freisetzung weiterer Zytokine und anderer immunstimulierender Faktoren wie PGE₂, PAF und NO [42, 64, 84]. Neben ihrer mutmaßlichen Hauptaufgabe innerhalb des Immunsystems induzieren die oben genannten Zytokine jedoch auch eine gesteigerte Expression diverser Zelladhäsionsmoleküle wie P-Selektin, E-Selektin und ICAM-1, und sorgen somit ebenfalls für eine enge Verknüpfung des Immun- mit dem Hämostasesystem [5, 64, 84, 146].

Die im Rahmen der vorliegenden ex vivo-Studie gewonnenen Daten zeugen von einer minimierten Aktivierung der untersuchten Marker und damit einer verhältnismäßig schonenden und protektiven Behandlung. Somit stehen sie teils im Widerspruch zu den Studienergebnissen anderer Arbeitsgruppen [2, 5, 95, 102, 115-117]. Eine Erklärung hierfür dürfte in der verbesserten Hämokompatibilität des in der vorliegenden Arbeit eingesetzten, und mit einer

synthetischen Polymerbeschichtung (SOFTLINE®) ausgestatteten, Membranoxygenators begründet liegen. Laut Herstellerangaben handelt es sich bei der SOFTLINE®-Beschichtung um ein Polymer, das sich aus hydrophilen und hydrophoben Bereichen zusammensetzt und für eine Reduzierung der Oberflächenspannung der Kontaktflächen sorgt. Die Beschichtung minimiert die Zelladhäsion und -aktivierung, sowie die Aktivierung des Gerinnungs- und Komplementsystems [147]. Verschiedene Studien belegen, dass mit SOFTLINE® oder vergleichbaren Oberflächenbeschichtungen modifizierte extrakorporale Kreisläufe, die durch die EKZ hervorgerufenen Aktivierungsprozesse signifikant verringern und somit zum Schutz der zellulären Blutkomponenten beitragen [148-152].

Ein weiterer Grund für den vergleichsweise geringen Effekt der EKZ auf das Immun- und Hämostasesystem ist auf die in der vorliegenden Studie gewählte Perfusatemperatur von 37 °C ($\hat{=}$ Normothermie) zurückzuführen.

Die temperaturabhängige Aktivierung von Thrombozyten [95, 115-117, 153] und Leukozyten [132, 154] ist in einer Vielzahl von Studien beschrieben. Diese berichten teilweise schon bei moderater Hypothermie (< 32 °C) von einem signifikanten Anstieg der Aktivierungsmarker. Mit Abnahme der Temperatur zu tiefer (< 26°C), respektive profunder (< 20 °C) Hypothermie zeigt sich eine teils exponentiell gesteigerte Expression der Aktivierungsmarker.

Klinisch relevante Komplikationen perioperativer Hypothermie stellen u.a. ein erhöhtes Blutungsrisiko mit einem daraus resultierendem gesteigerten Transfusionsbedarf [120], Wundheilungsstörungen sowie einer verlängerten Beatmungs- und Krankenhausverweildauer [155] dar. Der Stellenwert der systemischen und topischen Hypothermie bei herzchirurgischen Eingriffen wird daher heute zunehmend kritisch diskutiert und infrage gestellt [156, 157].

Trotz des gewählten schonenden und protektiven Versuchsaufbaus mit oberflächenbeschichteten extrakorporalen Kreisläufen und Normothermie, lässt sich die Induktion einer immunologischen Reaktion während der EKZ nicht gänzlich verhindern. So zeigt sich auch in der hier vorliegenden Analyse im Rahmen der EKZ eine im Vergleich zum Ausgangswert signifikant gesteigerte

Mac-1 Oberflächenexpression auf neutrophilen Granulozyten sowie ein Anstieg der PMN-Elastase. Diese Ergebnissen stimmen mit denen anderer Arbeitsgruppen überein [105, 108, 128, 132-134]. Neu ist allerdings die Erkenntnis, dass diese nachteiligen Effekte der EKZ durch die Applikation des volatilen Anästhetikums Sevofluran in einer klinisch gebräuchlichen Konzentration von 2 Vol.-%, signifikant vermindert werden können.

Es gibt zunehmend wissenschaftliche Belege dafür, dass neutrophile Serinproteasen (NSPs) - wie die PMN-Elastase aus polymorphkernigen Granulozyten - eng in die Regulation der Zytokinfreisetzung sowie der Feinabstimmung der Immunantwort involviert sind [81, 83].

So zeigen sich in einer klinischen Studie signifikant gesteigerte Elastasespiegel in Bronchoskopieproben, welche während der EKZ unter TIVA gewonnen wurden [158]. Diese durch die EKZ ausgelösten, von den neutrophilen Granulozyten vermittelten, entzündlichen Lungenveränderungen können zu einer postoperativen respiratorischen Insuffizienz beitragen. Diese ist eine häufige und gefürchtete Komplikation nach chirurgischen Eingriffen am Herzen unter Zuhilfenahme der HLM. Eine Minimierung der granulozytären Aktivierung stellt daher einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz dar, um der durch die EKZ hervorgerufenen systemischen Entzündungsreaktion vorzubeugen.

Der in Kapitel 4.2.5 erwähnte Wirkstoff Sivelestat reduziert in experimentellen Studien als selektiver Inhibitor der neutrophilen Elastase zwar effektiv deren Freisetzung während der extrakorporalen Zirkulation [105, 107], eine Auswirkung des Agens auf die Mac-1 Expression konnte bisher jedoch nicht nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass das volatile Anästhetikum Sevofluran in einer klinisch gebräuchlichen Konzentration von 2 Vol.-% sowohl die Freisetzung der PMN-Elastase, als auch die Expression von Mac-1 auf der Oberfläche neutrophiler Granulozyten, signifikant minimiert. Dieser bisher nicht beschriebene antiinflammatorische Effekt von Sevofluran mag daher in vivo mit dazu beitragen, die mit einer EKZ verknüpfte systemische Entzündungsreaktion, sowie die damit assoziierten, potentiell lebensgefährlichen Komplikationen für den Organismus, zu reduzieren.

Die zugrundeliegenden Mechanismen der beobachteten antiinflammatorischen Wirkung - als auch anderer organprotektiver Effekte - des volatilen Anästhetikums Sevofluran bleiben bisher unbeantwortet. Studien berichten jedoch von einer gezielten Interaktion zwischen Sevofluran und spezifischen Ionenkanälen, wie sie sich auch in der Membran der PMN-Elastase enthaltenen intrazellulären Granula segmentkerniger neutrophiler Granulozyten, befinden [159]. Durch eine Modulation dieser Ionenkanäle könnte Sevofluran die vermehrte Freisetzung der PMN-Elastase durch Degranulation aus den azurophilen Granula reduzieren und somit generalisierte Entzündungsreaktionen minimieren, bzw. ein Auftreten dieser verhindern.

Ein weiterer potentiell antiinflammatorisch wirkender Effekt von Sevofluran dürfte dem hemmenden Einfluss des Anästhetikums auf die nukleäre Translokation der proinflammatorischen Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 zuzuschreiben sein. In einer in vitro-Studie konnte gezeigt werden, dass die Risiken von Entzündungsprozessen sowie Nekrosen in renalen Tubuluszellen signifikant durch diese spezifische Eigenschaft von Sevofluran minimiert werden [160].

Darüber hinaus inhibiert Sevofluran die Ligandenbindung des Integrins LFA-1 (engl. lymphocyte function-associated antigen-1) der Leukozyten, indem es seine allosterische Bindungsstelle besetzt und somit blockiert [161]. LFA-1 spielt eine entscheidende Rolle bei der Adhäsion und Migration von Leukozyten. Ein wichtiger Bindungspartner für LFA-1 stellt - wie auch schon für Mac-1 - das Adhäsionsmolekül ICAM-1 dar. Des Weiteren vermittelt das Integrin u.a. die Aktivierung und Proliferation immunkompetenter Zellen sowie deren Interaktion mit ihren Zielzellen [64, 162, 163]. Auch dies könnte einen weiteren Mechanismus der immunmodulatorischen Wirkung des volatilen Anästhetikums Sevofluran darstellen.

4.2.7 Schlussfolgerung und Ausblick

Das volatile Anästhetikum Sevofluran hemmt in einer klinisch relevanten Konzentration von 2 Vol.-% die Aktivierung neutrophiler Granulozyten während der simulierten normothermen extrakorporalen Zirkulation. Sowohl die

Expression des leukozytären Oberflächenrezeptors Mac-1, als auch die Freisetzung der PMN-Elastase, werden statistisch signifikant minimiert.

Systemische Entzündungsreaktionen stellen bedeutsame Komplikationen bei herzchirurgischen Eingriffen mit und ohne extrakorporale Zirkulation dar. Sie tragen entscheidend zur postoperativen Morbidität und Mortalität bei [2, 4, 5, 31].

Die im Rahmen dieser Arbeit neu gewonnenen Erkenntnisse über die antiinflammatorischen Effekte des Anästhetikums Sevofluran lassen in Kombination mit den Forschungsergebnissen anderer Arbeitsgruppen den Schluss zu, dass Sevofluran ein vielversprechendes Therapeutikum mit günstiger Wirkweise für den Einsatz während extrakorporaler Zirkulation darstellt.

Die Tatsache, dass einerseits die Verabreichung eines Anästhetikums - nicht nur in der Herzchirurgie - unabdingbarer Bestandteil einer Vielzahl an Interventionen ist, sowie andererseits der zunehmende Einsatz der inhalativen Sedierung auf Intensivstationen nach Aufnahme dieser in die S3-Leitlinie: *Analgesie, Sedierung und Delirmanagement in der Intensivmedizin*, machen das volatile Anästhetikum Sevofluran mit seinen potentiell entzündungshemmenden Effekten zu einem spannenden Forschungsobjekt mit direktem klinischen Bezug [164-166].

Die klinische Relevanz für den Patienten kann aufgrund des experimentellen Studiendesign jedoch nicht zweifelsfrei abgeleitet werden. Die Untersuchungsergebnisse und die darin gewonnenen Erkenntnisse rechtfertigen jedoch weitere Studien unter klinischen Bedingungen.

5 Zusammenfassung

Extrakorporale Unterstützungssysteme, welche die Funktion von Herz und Lunge übernehmen, werden bei vielen herzchirurgischen Eingriffen benötigt um stabile Kreislauf-Parameter des Patienten zu gewährleisten. Die Anwendung der extrakorporalen Zirkulation (EKZ) ist daher ein essentieller Bestandteil der modernen Herzchirurgie. Allerdings ist der Einsatz der EKZ auch mit unerwünschten und potentiell lebensgefährlichen Nebenwirkungen für den Patienten assoziiert.

So zählt die EKZ zu einer der Hauptursachen des systemischen Inflammationssyndroms (SIRS), welches zu einem Multi-Organversagen und einer damit einhergehenden signifikanten Erhöhung der Mortalität herzchirurgischer Eingriffe führen kann. Die Mechanismen der durch die EKZ induzierten Entzündung sind multifaktoriell. So bewirkt die EKZ unter anderem eine Aktivierung der Leukozyten und resultiert in der Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie z.B. Zytokinen.

Sowohl in klinischen als auch experimentellen Studien wurden für das volatile Anästhetikum Sevofluran neben kardioprotektiven Effekten auch immunmodulierende und antiinflammatorische Wirkungen beschrieben. Allerdings finden sich in der Literatur bisher keine Daten, ob die routinemäßige Verabreichung von Sevofluran in klinisch gebräuchlichen Konzentrationen während der balancierten Anästhesie, die durch eine EKZ verursachte Entzündungsreaktion reduzieren kann.

Das Ziel der vorliegenden experimentellen Arbeit war die Analyse der Wirkung des volatilen Anästhetikums Sevofluran auf inflammatorische Prozesse während der normothermen EKZ. Hierzu wurde systematisch mittels durchflusszytometrischer und enzymimmunologischer Methoden sowie Blutbildanalysen die Expression der Oberflächenrezeptoren Mac-1 und P-Selektin, die Leukozyten-Thrombozyten Aggregatbildung, die Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-8 und TNF- α , die Konzentration der PMN-Elastase, sowie Blutbildparameter im zeitlichen Verlauf der normothermen ex vivo EKZ analysiert.

Für jeden Versuch wurde frisch entnommenes und heparinisiertes humanes Vollblut für 90 Minuten in einem ex vivo-EKZ-Modell bei Normothermie (37 °C) zirkuliert. In der Kontrollgruppe (n = 5) wurde über den Oxygenator des Modells ein Luft-Sauerstoff-Gemisch verabreicht; der anderen Gruppe (n = 5) wurde das Anästhetikum Sevofluran in einer klinisch gebräuchlichen Konzentration von 2 Vol.-% zugeführt. Zu vier definierten Zeitpunkten - Ausgangswert, nach 30-, 60- und 90-Minuten Zirkulation - wurden der EKZ Blutproben entnommen und die entsprechenden Inflammationsmarker analysiert.

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Ergebnisse zeigen, dass die EKZ die Mac-1 Expression auf neutrophilen Granulozyten ($p < 0,001$), sowie die Freisetzung der PMN-Elastase aus polymorphkernigen Granulozyten ($p < 0,001$) induziert. Durch die Applikation des volatilen Anästhetikums Sevofluran werden diese durch das ex vivo-EKZ-Modell hervorgerufenen proinflammatorischen Effekte signifikant minimiert.

Sevofluran hemmt die Expression des Leukozyten-Integrins Mac-1 auf neutrophilen Granulozyten zu allen Untersuchungszeitpunkten um das 1,5-fache ($p < 0,05$) im Vergleich zu denen der Kontrollproben.

Auch der durch die EKZ induzierte Konzentrationsanstieg des zytotoxisch wirkenden Enzyms PMN-Elastase, welches nach einer Aktivierung von neutrophilen Granulozyten durch diese freigesetzt wird, ist in den mit Sevofluran behandelten Versuchsproben zu allen Untersuchungszeitpunkten im Vergleich zur jeweiligen Vergleichsgruppe um das 1,8-fache reduziert ($p < 0,05$).

Gleichwohl werden die Mac-1 Expression auf Monozyten, die Leukozyten-Thrombozyten Aggregatbildung, die thrombozytäre P-Selektin Expression sowie die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-8 und TNF- α nicht statistisch signifikant durch die EKZ und die Behandlung mit Sevofluran beeinflusst. Auch zeigt sich kein direkter Einfluss der EKZ auf die Blutbildparameter Hämatokrit, Erythrozyten-, Thrombozyten- und Leukozytenzahl.

Die erhobenen Daten zeigen auch, dass sich trotz des im Rahmen der vorliegenden ex vivo-Studie gewählten EKZ-Versuchsaufbaus mit

oberflächenbeschichteten extrakorporalen Kreisläufen der neusten Generation und Normothermie, die Induktion einer inflammatorischen Reaktion während der EKZ nicht verhindern lässt. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch, dass das volatile Anästhetikum Sevofluran in einer klinisch relevanten Konzentration die Aktivierung neutrophiler Granulozyten während der simulierten normothermen EKZ signifikant minimiert. Diese neu gewonnenen Erkenntnisse über die antiinflammatorischen Effekte des Anästhetikums Sevofluran lassen in Kombination mit den Forschungsergebnissen anderer Arbeitsgruppen den Schluss zu, dass Sevofluran ein vielversprechendes Anästhetikum mit günstigen antiinflammatorischen Effekten für den Einsatz während der EKZ darstellt.

Die klinische Relevanz für den Patienten lässt sich aufgrund des experimentellen Studiendesign jedoch nicht zweifelsfrei ableiten. Die Untersuchungsergebnisse und die darin gewonnenen Erkenntnisse rechtfertigen jedoch weitere Studien bezüglich des antiinflammatorischen Effektes von Sevofluran unter klinischen Bedingungen.

6 Literaturverzeichnis

1. Funkat, A.K., et al., *Cardiac surgery in Germany during 2011: a report on behalf of the German Society for Thoracic and Cardiovascular Surgery*. Thorac Cardiovasc Surg, 2012. **60**(6): p. 371-82.
2. Edmunds, L.H., Jr., *Inflammatory response to cardiopulmonary bypass*. Ann Thorac Surg, 1998. **66**(5 Suppl): p. S12-6; discussion S25-8.
3. Suleiman, M.S., K. Zacharowski, and G.D. Angelini, *Inflammatory response and cardioprotection during open-heart surgery: the importance of anaesthetics*. Br J Pharmacol, 2008. **153**(1): p. 21-33.
4. Wan, S., J.L. LeClerc, and J.L. Vincent, *Inflammatory response to cardiopulmonary bypass: mechanisms involved and possible therapeutic strategies*. Chest, 1997. **112**(3): p. 676-92.
5. Warren, O.J., et al., *The inflammatory response to cardiopulmonary bypass: part 1--mechanisms of pathogenesis*. J Cardiothorac Vasc Anesth, 2009. **23**(2): p. 223-31.
6. Nilsson, L., et al., *Activation of inflammatory systems during cardiopulmonary bypass*. Scand J Thorac Cardiovasc Surg, 1988. **22**(1): p. 51-3.
7. Nader, N.D., et al., *Anesthetic myocardial protection with sevoflurane*. J Cardiothorac Vasc Anesth, 2004. **18**(3): p. 269-74.
8. Kawamura, T., et al., *Effects of sevoflurane on cytokine balance in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery*. J Cardiothorac Vasc Anesth, 2006. **20**(4): p. 503-8.
9. Schultz, S.G., *William Harvey and the circulation of the blood: the birth of a scientific revolution and modern physiology*. News Physiol Sci, 2002. **17**: p. 175-80.
10. Baskett, T.F., *Robert Hooke and the origins of artificial respiration*. Resuscitation, 2004. **60**(2): p. 125-7.
11. Stammers, A.H., *Historical aspects of cardiopulmonary bypass: from antiquity to acceptance*. J Cardiothorac Vasc Anesth, 1997. **11**(3): p. 266-74.
12. Lim, M.W., *The history of extracorporeal oxygenators*. Anaesthesia, 2006. **61**(10): p. 984-95.
13. McLean, J., *The thromboplastic action of cephalin*. Am J Physiol, 1916. **41**(2): p. 250-257.
14. Gibbon, J.H., Jr., *The development of the heart-lung apparatus*. Am J Surg, 1978. **135**(5): p. 608-19.
15. Gibbon, J.H., Jr., *Application of a mechanical heart and lung apparatus to cardiac surgery*. Minn Med, 1954. **37**(3): p. 171-85; passim.
16. Leitz, K., *Entstehung der herzchirurgischen Kliniken in Deutschland*. Z Herz Thorax Gefasschir, 2009. **23**(1): p. 27-32.
17. Larsen, R., *Anästhesie*. 9. Auflage, 2010. Elsevier, Urban & Fischer, München. ISBN 978-3-437-22502-4
18. Schmid, C. und A. Philipp, *Leitfaden extrakorporale Zirkulation*. 2011. Springer DE, Heidelberg. ISBN 978-3-642-17002-7

19. Ziemer, G. und A. Haverich, *Herzchirurgie: Die Eingriffe am Herzen und an den herznahen Gefäßen*. 3. Auflage, 2010. Springer DE, Berlin. ISBN 978-3-540-79712-8
20. Henne-Bruns, D., *Duale Reihe Chirurgie*. 4., überarbeitete Auflage, 2012, Georg Thieme Verlag, Stuttgart. p. 895. ISBN 978-3-131-25294-4
21. Kretz, F.-J. und F. Teufel, *Anästhesie und Intensivmedizin*. 2006. Springer DE, Heidelberg. ISBN 978-3-540-62739-5
22. Landoni, G., et al., *Cardiac protection by volatile anesthetics. A review*. *Minerva Anesthesiol*, 2009. **75**(5): p. 269-73.
23. Miller, R.D., *Miller's anesthesia*. 7th Edition, 2010. Churchill Livingstone/ Elsevier, Philadelphia, PA. ISBN 978-1-416-06624-8
24. De Hert, S.G., et al., *Sevoflurane but not propofol preserves myocardial function in coronary surgery patients*. *Anesthesiology*, 2002. **97**(1): p. 42-9.
25. Cho, E.J., et al., *The effects of sevoflurane on systemic and pulmonary inflammatory responses after cardiopulmonary bypass*. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 2009. **23**(5): p. 639-45.
26. Sedlic, F., et al., *Differences in production of reactive oxygen species and mitochondrial uncoupling as events in the preconditioning signaling cascade between desflurane and sevoflurane*. *Anesth Analg*, 2009. **109**(2): p. 405-11.
27. Tonner, P.H. und L. Hein, *Pharmakotherapie in der Anästhesie und Intensivmedizin*. 1. Auflage, 2011. Springer DE, Berlin. ISBN 978-3-540-79155-3
28. Campagna, J.A., K.W. Miller, and S.A. Forman, *Mechanisms of actions of inhaled anesthetics*. *N Engl J Med*, 2003. **348**(21): p. 2110-24.
29. Murphy, G.J. and G.D. Angelini, *Side effects of cardiopulmonary bypass: what is the reality?* *J Card Surg*, 2004. **19**(6): p. 481-8.
30. Sniecinski, R.M. and W.L. Angelini, *Activation of the hemostatic system during cardiopulmonary bypass*. *Anesth Analg*, 2011. **113**(6): p. 1319-33.
31. Levy, J.H. and K.A. Tanaka, *Inflammatory response to cardiopulmonary bypass*. *Ann Thorac Surg*, 2003. **75**(2): p. S715-20.
32. Newman, M.F., et al., *Longitudinal assessment of neurocognitive function after coronary-artery bypass surgery*. *N Engl J Med*, 2001. **344**(6): p. 395-402.
33. Rodriguez, R., et al., *Gastrointestinal complications following cardiac surgery: a comprehensive review*. *J Card Surg*, 2010. **25**(2): p. 188-97.
34. Asimakopoulos, G., *Systemic inflammation and cardiac surgery: an update*. *Perfusion*, 2001. **16**(5): p. 353-60.
35. Westaby, S., *Organ dysfunction after cardiopulmonary bypass. A systemic inflammatory reaction initiated by the extracorporeal circuit*. *Intensive Care Med*, 1987. **13**(2): p. 89-95.
36. Clive Landis, R., et al., *Consensus statement: minimal criteria for reporting the systemic inflammatory response to cardiopulmonary bypass*. *Heart Surg Forum*, 2010. **13**(2): p. E116-23.
37. Bone, R.C., et al., *Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest*

- Physicians/Society of Critical Care Medicine*. Chest, 1992. **101**(6): p. 1644-55.
38. Kollef, M.H., T. Wragge, and C. Pasque, *Determinants of mortality and multiorgan dysfunction in cardiac surgery patients requiring prolonged mechanical ventilation*. Chest, 1995. **107**(5): p. 1395-401.
 39. Koch, A., et al., *Das Immunsystem während extrakorporaler Zirkulation*. Kardiotechnik, 2005. **2/2005**: p. 32-42.
 40. Longo, D.L. and T.R. Harrison, *Harrison's principles of internal medicine*. 18th Edition, 2012. McGraw-Hill, New York; London. ISBN 978-0-071-74889-6
 41. Weyrich, A.S., et al., *Protein synthesis by platelets: historical and new perspectives*. J Thromb Haemost, 2009. **7**(2): p. 241-6.
 42. Hall, J.E. and A.C. Guyton, *Guyton and Hall textbook of medical physiology*. 12th Edition, 2011. Saunders/Elsevier, Philadelphia, PA. ISBN 978-8-131-22703-9
 43. Pötzsch, B. und K. Madlener, *Hämostaseologie: Grundlagen, Diagnostik, Therapie*. 2. Auflage, 2010. Springer DE, Berlin. ISBN 978-3-642-01543-4
 44. Gawaz, M., *Das Blutplättchen*. 1. Auflage, 1999. Thieme Verlag, Stuttgart; New York. ISBN 978-3-131-18221-0
 45. Furie, B., B.C. Furie, and R. Flaumenhaft, *A journey with platelet P-selectin: the molecular basis of granule secretion, signalling and cell adhesion*. Thromb Haemost, 2001. **86**(1): p. 214-21.
 46. McEver, R.P., *Adhesive interactions of leukocytes, platelets, and the vessel wall during hemostasis and inflammation*. Thromb Haemost, 2001. **86**(3): p. 746-56.
 47. André, P., et al., *CD40L stabilizes arterial thrombi by a beta3 integrin-dependent mechanism*. Nature medicine, 2002. **8**(3): p. 247-52.
 48. Dole, V.S., et al., *Activated platelets induce Weibel-Palade-body secretion and leukocyte rolling in vivo: role of P-selectin*. Blood, 2005. **106**(7): p. 2334-9.
 49. Evangelista, V., et al., *Platelet/polymorphonuclear leukocyte interaction in dynamic conditions: evidence of adhesion cascade and cross talk between P-selectin and the beta 2 integrin CD11b/CD18*. Blood, 1996. **88**(11): p. 4183-94.
 50. Gawaz, M., H. Langer, and A.E. May, *Platelets in inflammation and atherogenesis*. J Clin Invest, 2005. **115**(12): p. 3378-84.
 51. Jy, W., et al., *Platelet aggregates as markers of platelet activation: characterization of flow cytometric method suitable for clinical applications*. Am J Hematol, 1998. **57**(1): p. 33-42.
 52. Lu, Q. and R.A. Malinauskas, *Comparison of two platelet activation markers using flow cytometry after in vitro shear stress exposure of whole human blood*. Artif Organs, 2011. **35**(2): p. 137-44.
 53. Villmow, T., B. Kemkes-Matthes, and A.C. Matzdorff, *Markers of platelet activation and platelet-leukocyte interaction in patients with myeloproliferative syndromes*. Thromb Res, 2002. **108**(2-3): p. 139-45.

54. Carlow, D.A., et al., *PSGL-1 function in immunity and steady state homeostasis*. Immunol Rev, 2009. **230**(1): p. 75-96.
55. Zimmerman, G.A., *Two by two: the pairings of P-selectin and P-selectin glycoprotein ligand 1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(18): p. 10023-4.
56. Ruggeri, Z.M., *Platelets in atherothrombosis*. Nat Med, 2002. **8**(11): p. 1227-34.
57. Woodside, D.G., S. Liu, and M.H. Ginsberg, *Integrin activation*. Thromb Haemost, 2001. **86**(1): p. 316-23.
58. Phillips, D.R., et al., *The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex*. Blood, 1988. **71**(4): p. 831-43.
59. Shattil, S.J. and M.H. Ginsberg, *Integrin signaling in vascular biology*. J Clin Invest, 1997. **100**(11 Suppl): p. S91-5.
60. Shattil, S.J., H. Kashiwagi, and N. Pampori, *Integrin signaling: the platelet paradigm*. Blood, 1998. **91**(8): p. 2645-57.
61. Jang, E.K., et al., *Roles for both cyclic GMP and cyclic AMP in the inhibition of collagen-induced platelet aggregation by nitroprusside*. Br J Haematol, 2002. **117**(3): p. 664-75.
62. Spangenberg, P., et al., *The platelet glycoprotein IIb/IIIa complex is involved in the adhesion of activated platelets to leukocytes*. Thromb Haemost, 1993. **70**(3): p. 514-21.
63. Zarbock, A., R.K. Polanowska-Grabowska, and K. Ley, *Platelet-neutrophil-interactions: linking hemostasis and inflammation*. Blood reviews, 2007. **21**(2): p. 99-111.
64. Murphy, K.M., et al., *Janeway Immunologie*. 7. Auflage, 2009. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. ISBN 978-3-827-42047-3
65. Hahn, H., et al., *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. 6. Auflage, 2008. Springer DE, Berlin. ISBN 978-3-540-46359-7
66. Schiebler, T.H. und H.-W. Korf, *Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie*. 10. Auflage, 2007. Springer DE, Berlin. ISBN 978-3-798-51770-7
67. Aumüller, G., et al., *Duale Reihe Anatomie*. 2. Auflage, 2010. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. ISBN 978-3-131-36042-7
68. Kiefel, V., *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie: Grundlagen - Therapie - Methodik*. 4. Auflage, 2010. Springer DE, Berlin. ISBN 978-3-642-12764-9
69. Delves, P.J. and I.M. Roitt, *The immune system. Second of two parts*. N Engl J Med, 2000. **343**(2): p. 108-17.
70. Delves, P.J. and I.M. Roitt, *The immune system. First of two parts*. N Engl J Med, 2000. **343**(1): p. 37-49.
71. Hermiston, M.L., Z. Xu, and A. Weiss, *CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 107-37.
72. Dahlke, M.H., et al., *The biology of CD45 and its use as a therapeutic target*. Leuk Lymphoma, 2004. **45**(2): p. 229-36.
73. Holmes, N., *CD45: all is not yet crystal clear*. Immunology, 2006. **117**(2): p. 145-55.

74. Hynes, R.O., *Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines*. Cell, 2002. **110**(6): p. 673-87.
75. Yong, K.L. and D.C. Linch, *Differential effects of granulocyte- and granulocyte-macrophage colony-stimulating factors (G- and GM-CSF) on neutrophil adhesion in vitro and in vivo*. Eur J Haematol, 1992. **49**(5): p. 251-9.
76. Arnaout, M.A., *Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18*. Blood, 1990. **75**(5): p. 1037-50.
77. Ueda, T., et al., *Identification of the complement iC3b binding site in the beta 2 integrin CR3 (CD11b/CD18)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(22): p. 10680-4.
78. Wong, C.H., B. Heit, and P. Kubes, *Molecular regulators of leucocyte chemotaxis during inflammation*. Cardiovasc Res, 2010. **86**(2): p. 183-91.
79. Taborda, C.P. and A. Casadevall, *CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18) are involved in complement-independent antibody-mediated phagocytosis of Cryptococcus neoformans*. Immunity, 2002. **16**(6): p. 791-802.
80. Plescia, J. and D.C. Altieri, *Activation of Mac-1 (CD11b/CD18)-bound factor X by released cathepsin G defines an alternative pathway of leucocyte initiation of coagulation*. Biochem J, 1996. **319** (Pt 3): p. 873-9.
81. Pham, C.T., *Neutrophil serine proteases fine-tune the inflammatory response*. Int J Biochem Cell Biol, 2008. **40**(6-7): p. 1317-33.
82. Mezyk-Kopec, R., et al., *Effects of elastase and cathepsin G on the levels of membrane and soluble TNFalpha*. Biol Chem, 2005. **386**(8): p. 801-11.
83. Kessenbrock, K., T. Dau, and D.E. Jenne, *Tailor-made inflammation: how neutrophil serine proteases modulate the inflammatory response*. J Mol Med (Berl), 2011. **89**(1): p. 23-8.
84. Abbas, A.K., A.H. Lichtman, and S. Pillai, *Cellular and molecular immunology*. 6th Edition, 2010. Saunders/Elsevier, Philadelphia, PA. ISBN 978-8-131-21034-5
85. Keller, M., et al., *A circadian clock in macrophages controls inflammatory immune responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(50): p. 21407-12.
86. Grundmann, U., et al., *Endotoxin desensitization of human mononuclear cells after cardiopulmonary bypass: role of humoral factors*. Anesthesiology, 2000. **93**(2): p. 359-69.
87. Lappegard, K.T., et al., *Artificial surface-induced cytokine synthesis: effect of heparin coating and complement inhibition*. Ann Thorac Surg, 2004. **78**(1): p. 38-44; discussion 44-5.
88. Horiuchi, T., et al., *Transmembrane TNF-alpha: structure, function and interaction with anti-TNF agents*. Rheumatology, 2010. **49**(7): p. 1215-28.
89. Dinarello, C.A., *Biologic basis for interleukin-1 in disease*. Blood, 1996. **87**(6): p. 2095-147.
90. Laffey, J.G., J.F. Boylan, and D.C. Cheng, *The systemic inflammatory response to cardiac surgery: implications for the anesthesiologist*. Anesthesiology, 2002. **97**(1): p. 215-52.

91. Nyhlen, K., et al., *Corticosteroids and interferons inhibit cytokine-induced production of IL-8 by human endothelial cells*. Cytokine, 2000. **12**(4): p. 355-60.
92. Brix-Christensen, V., *The systemic inflammatory response after cardiac surgery with cardiopulmonary bypass in children*. Acta Anaesthesiol Scand, 2001. **45**(6): p. 671-9.
93. Li, A., et al., *IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis*. J Immunol, 2003. **170**(6): p. 3369-76.
94. Sack, U., A. Tárnok, und G. Rothe, *Zelluläre Diagnostik: Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*. 2006. Karger, Basel. ISBN 978-3-805-57928-5
95. Straub, A., et al., *Glycoprotein IIb/IIIa inhibition reduces prothrombotic events under conditions of deep hypothermic circulatory arrest*. Thromb Haemost, 2005. **94**(1): p. 115-22.
96. Eisenhardt, S.U., et al., *Generation of activation-specific human anti-alphaMbeta2 single-chain antibodies as potential diagnostic tools and therapeutic agents*. Blood, 2007. **109**(8): p. 3521-8.
97. Larsen, R., *Anästhesie und Intensivmedizin in Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie*. 8. Auflage, 2012. Springer DE, Berlin. ISBN 978-3-642-21020-4
98. Matissek, R., G. Steiner, und M. Fischer, *Lebensmittelanalytik*. 4. Auflage, 2010. Springer DE, Berlin. ISBN 978-3-540-92204-9
99. Lener, B., *TKFI Innsbruck für ÖAW Young Science*, 2012.
100. May, A.E., P. Seizer, and M. Gawaz, *Platelets: inflammatory firebugs of vascular walls*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(3): p. s5-10.
101. Asberg, A.E. and V. Videm, *Activation of neutrophil granulocytes in an in vitro model of a cardiopulmonary bypass*. Artif Organs, 2005. **29**(12): p. 927-36.
102. Rinder, C.S., et al., *Selective blockade of membrane attack complex formation during simulated extracorporeal circulation inhibits platelet but not leukocyte activation*. J Thorac Cardiovasc Surg, 1999. **118**(3): p. 460-6.
103. Rinder, C.S., et al., *Leukocyte effects of C5a-receptor blockade during simulated extracorporeal circulation*. Ann Thorac Surg, 2007. **83**(1): p. 146-52.
104. Lahtinen, M., et al., *Nitric oxide and inflammatory response in simulated extracorporeal circulation*. Thorac Cardiovasc Surg, 2003. **51**(3): p. 130-7.
105. Matsuzaki, K., et al., *Sivelestat reduces inflammatory mediators and preserves neutrophil deformability during simulated extracorporeal circulation*. Ann Thorac Surg, 2005. **80**(2): p. 611-7.
106. Saravanan, P., et al., *Impact of xenon anaesthesia in isolated cardiopulmonary bypass on very early leucocyte and platelet activation and clearance: a randomized, controlled study*. Br J Anaesth, 2009. **103**(6): p. 805-10.

107. Yoshimura, Y., et al., *ONO-6818, a novel, potent neutrophil elastase inhibitor, reduces inflammatory mediators during simulated extracorporeal circulation*. *Ann Thorac Surg*, 2003. **76**(4): p. 1234-9.
108. Finn, A., et al., *Effects of inhibition of complement activation using recombinant soluble complement receptor 1 on neutrophil CD11b/CD18 and L-selectin expression and release of interleukin-8 and elastase in simulated cardiopulmonary bypass*. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1996. **111**(2): p. 451-9.
109. Ferraris, V.A., et al., *2011 update to the Society of Thoracic Surgeons and the Society of Cardiovascular Anesthesiologists blood conservation clinical practice guidelines*. *Ann Thorac Surg*, 2011. **91**(3): p. 944-82.
110. Swaminathan, M., et al., *The association of lowest hematocrit during cardiopulmonary bypass with acute renal injury after coronary artery bypass surgery*. *Ann Thorac Surg*, 2003. **76**(3): p. 784-91; discussion 792.
111. Michelson, A.D., et al., *Circulating monocyte-platelet aggregates are a more sensitive marker of in vivo platelet activation than platelet surface P-selectin: studies in baboons, human coronary intervention, and human acute myocardial infarction*. *Circulation*, 2001. **104**(13): p. 1533-7.
112. Michelson, A.D. and M.I. Furman, *Laboratory markers of platelet activation and their clinical significance*. *Curr Opin Hematol*, 1999. **6**(5): p. 342-8.
113. Rondina, M.T., A.S. Weyrich and G.A. Zimmermann, *Platelets as cellular effectors of inflammation in vascular diseases*. *Circ Rec*, 2013. **112**(11): p. 1506-19.
114. Evangelista, V., et al., *Platelet/polymorphonuclear leukocyte interaction: P-selectin triggers protein-tyrosine phosphorylation-dependent CD11b/CD18 adhesion: role of PSGL-1 as a signaling molecule*. *Blood*, 1999. **93**(3): p. 876-85.
115. Krajewski, S., et al., *Short-acting P2Y12 blockade to reduce platelet dysfunction and coagulopathy during experimental extracorporeal circulation and hypothermia*. *Br J Anaesth*, 2012. **108**(6): p. 912-21.
116. Straub, A., et al., *Evidence of platelet activation at medically used hypothermia and mechanistic data indicating ADP as a key mediator and therapeutic target*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011. **31**(7): p. 1607-16.
117. Straub, A., et al., *Platelet anaesthesia during extracorporeal circulation: differential effects of GP IIb/IIIa blockers on platelet activation marker P-selectin expression at hypothermia*. *Thromb Res*, 2008. **122**(3): p. 383-9.
118. Polderman, K.H. and I. Herold, *Therapeutic hypothermia and controlled normothermia in the intensive care unit: practical considerations, side effects, and cooling methods*. *Crit Care Med*, 2009. **37**(3): p. 1101-20.
119. Valeri, C.R., et al., *Effects of temperature on bleeding time and clotting time in normal male and female volunteers*. *Crit Care Med*, 1995. **23**(4): p. 698-704.
120. Rajagopalan, S., et al., *The effects of mild perioperative hypothermia on blood loss and transfusion requirement*. *Anesthesiology*, 2008. **108**(1): p. 71-7.

121. Gaudino, M., et al., *Normothermia does not improve postoperative hemostasis nor does it reduce inflammatory activation in patients undergoing primary isolated coronary artery bypass*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2002. **123**(6): p. 1092-100.
122. Iwata, Y., et al., *Postoperative hypothermia and blood loss after the neonatal arterial switch procedure*. Ann Thorac Surg, 2007. **84**(5): p. 1627-32.
123. Cavaillon, J.M., et al., *Cytokine cascade in sepsis*. Scand J Infect Dis, 2003. **35**(9): p. 535-44.
124. Bernhard, M., et al., *MIF and markers of the inflammatory response following cardiac surgery under extracorporeal circulation*. Appl Cardiopulm Pathophysiol, 2010. **14**: p. 115-123.
125. McBride, W.T., *Mediators of inflammation at cardiac surgery*. Appl Cardiopulm Pathophysiol, 2007. **11**: p. 3-13.
126. McBride, W.T. and S.J. McBride, *The balance of pro- and anti-inflammatory cytokines in cardiac surgery*. Curr Opin Anaesthesiol, 1998. **11**(1): p. 15-22.
127. Abacilar, F., et al., *The changes and effects of the plasma levels of tumor necrosis factor after coronary artery bypass surgery with cardiopulmonary bypass*. Heart Surg Forum, 2006. **9**(4): p. E703-9.
128. Butler, J., G.M. Rucker, and S. Westaby, *Inflammatory response to cardiopulmonary bypass*. Ann Thorac Surg, 1993. **55**(2): p. 552-9.
129. Greiner, T.O., et al., *DEHP and its active metabolites: leaching from different tubing types, impact on proinflammatory cytokines and adhesion molecule expression. Is there a subsumable context?* Perfusion, 2012. **27**(1): p. 21-9.
130. Wan, S., et al., *Myocardium is a major source of proinflammatory cytokines in patients undergoing cardiopulmonary bypass*. J Thorac Cardiovasc Surg, 1996. **112**(3): p. 806-11.
131. Boeken, U. und P. Feindt, *Ist das SIRS/Sepsis-Syndrom in der Herzchirurgie Folge der extrakorporalen Zirkulation und damit unvermeidlich?* Z Herz- Thorax- Gefäßschir, 2008. **22**(2): p. 110-118.
132. Kappelmayer, J., et al., *Upregulation of Mac-1 surface expression on neutrophils during simulated extracorporeal circulation*. J Lab Clin Med, 1993. **121**(1): p. 118-26.
133. Boeken, U., et al., *Elastase release following myocardial ischemia during extracorporeal circulation (ECC) -- marker of ongoing systemic inflammation?* Thorac Cardiovasc Surg, 2002. **50**(3): p. 136-40.
134. Welters, I.D., et al., *Aktivierung von Granulozyten und Antiproteasen bei herzchirurgischen Eingriffen mit extrakorporaler Zirkulation*. Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther, 2005. **40**(3): p. 164-72.
135. Kawabata, K., et al., *ONO-5046, a novel inhibitor of human neutrophil elastase*. Biochem Biophys Res Commun, 1991. **177**(2): p. 814-20.
136. Ranieri, V.M., et al., *Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition*. JAMA, 2012. **307**(23): p. 2526-33.
137. Aikawa, N., et al., *Reevaluation of the efficacy and safety of the neutrophil elastase inhibitor, Sivelestat, for the treatment of acute lung*

- injury associated with systemic inflammatory response syndrome; a phase IV study.* Pulm Pharmacol Ther, 2011. **24**(5): p. 549-54.
138. Miyoshi, S., et al., *Usefulness of a selective neutrophil elastase inhibitor, sivelestat, in acute lung injury patients with sepsis.* Drug Des Devel Ther, 2013. **7**: p. 305-16.
139. Iba, T., et al., *Pretreatment of sivelestat sodium hydrate improves the lung microcirculation and alveolar damage in lipopolysaccharide-induced acute lung inflammation in hamsters.* Shock, 2006. **26**(1): p. 95-8.
140. Iwata, K., et al., *Effect of neutrophil elastase inhibitor (sivelestat sodium) in the treatment of acute lung injury (ALI) and acute respiratory distress syndrome (ARDS): a systematic review and meta-analysis.* Intern Med, 2010. **49**(22): p. 2423-32.
141. Zeiher, B.G., et al., *Neutrophil elastase inhibition in acute lung injury: results of the STRIVE study.* Crit Care Med, 2004. **32**(8): p. 1695-702.
142. Yang, S.C., et al., *Propofol inhibits superoxide production, elastase release, and chemotaxis in formyl peptide-activated human neutrophils by blocking formyl peptide receptor 1.* J Immunol, 2013. **190**(12): p. 6511-9.
143. Craciun, E.M., et al., *Anti-inflammatory effects of selected drugs on activated neonatal and adult neutrophils.* Scand J Clin Lab Invest, 2013. **73**(5): p. 407-13.
144. Esmon, C.T., *The impact of the inflammatory response on coagulation.* Thromb Res, 2004. **114**(5-6): p. 321-7.
145. May, A.E., et al., *Platelet-leukocyte interactions in inflammation and atherothrombosis.* Semin Thromb Hemost, 2007. **33**(2): p. 123-7.
146. Dinarello, C.A., *Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases.* Blood, 2011. **117**(14): p. 3720-32.
147. *Flyer Beschichtungssysteme SOFTLINE® Coating: MAQUET Cardiopulmonary AG, Hirrlingen, Deutschland.* URL: http://www.maquet.com/content/Cardiopulmonary/Documents/Brochures/SOFTLINE_BROCHU_02_Maquet_MCVSB40000210DE02_0904_final_DE_NONUS.pdf [zitiert am 23.05.2013]
148. Palatianos, G.M., et al., *A prospective, double-blind study on the efficacy of the bioline surface-heparinized extracorporeal perfusion circuit.* Ann Thorac Surg, 2003. **76**(1): p. 129-35.
149. Reser, D., et al., *Retrospective analysis of outcome data with regards to the use of Phisio(R)-, Bioline(R)- or Softline(R)-coated cardiopulmonary bypass circuits in cardiac surgery.* Perfusion, 2012. **27**(6): p. 530-4.
150. Thiara, A.S., et al., *Comparable biocompatibility of Phisio- and Bioline-coated cardiopulmonary bypass circuits indicated by the inflammatory response.* Perfusion, 2010. **25**(1): p. 9-16.
151. Wendel, H.P. and G. Ziemer, *Coating-techniques to improve the hemocompatibility of artificial devices used for extracorporeal circulation.* Eur J Cardiothorac Surg, 1999. **16**(3): p. 342-50.
152. Zimmermann, A.K., et al., *Effect of biopassive and bioactive surface-coatings on the hemocompatibility of membrane oxygenators.* J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2007. **80**(2): p. 433-9.

153. Grunenfelder, J., et al., *Expression of adhesion molecules and cytokines after coronary artery bypass grafting during normothermic and hypothermic cardiac arrest*. Eur J Cardiothorac Surg, 2000. **17**(6): p. 723-8.
154. Sakao, Y., et al., *Hypothermia augments polymorphonuclear leukocyte degranulation and interleukin-8 production from human umbilical vein endothelial cells and increases lipopolysaccharide-induced polymorphonuclear leukocyte-endothelial cell interaction when followed by normothermia*. J Cardiothorac Vasc Anesth, 2002. **16**(5): p. 561-6.
155. Kurz, A., D.I. Sessler, and R. Lenhardt, *Perioperative normothermia to reduce the incidence of surgical-wound infection and shorten hospitalization. Study of Wound Infection and Temperature Group*. N Engl J Med, 1996. **334**(19): p. 1209-15.
156. Schirmer, U., *Hypothermie in der Herzchirurgie*. Anaesthesist, 2007. **56**(9): p. 930-935.
157. Benk, C., C. Schlensak, und T. Doenst, *Aspekte zur praktischen Anwendung von Hypothermie in der Herzchirurgie*, in *Empfehlungen zum Einsatz und zur Verwendung der Herz-Lungen-Maschine*. 1. Auflage, 2006. Steinkopff Verlag, Darmstadt. p. 147-156. ISBN 978-3-798-51504-8
158. Kotani, T., et al., *Activation of a neutrophil-derived inflammatory response in the airways during cardiopulmonary bypass*. Anesth Analg, 2006. **103**(6): p. 1394-9.
159. Franks, N.P., *Molecular targets underlying general anaesthesia*. Br J Pharmacol, 2006. **147 Suppl 1**: p. S72-81.
160. Lee, H.T., et al., *Anti-inflammatory and antinecrotic effects of the volatile anesthetic sevoflurane in kidney proximal tubule cells*. Am J Physiol Renal Physiol, 2006. **291**(1): p. F67-78.
161. Yuki, K., et al., *Sevoflurane binds and allosterically blocks integrin lymphocyte function-associated antigen-1*. Anesthesiology, 2010. **113**(3): p. 600-9.
162. Plow, E.F., et al., *Ligand binding to integrins*. J Biol Chem, 2000. **275**(29): p. 21785-8.
163. Shimizu, Y., *LFA-1: more than just T cell Velcro*. Nat Immunol, 2003. **4**(11): p. 1052-4.
164. *AnaConDa® - Anaesthetic Conserving Device / Inhalative Sedierung auf der Intensivstation - Handbuch für den klinischen Einsatz*: Sedana Medical AB, Geretsried - Gelting, Deutschland. URL: http://www.sedanamedical.com/pdf/AnaConDa_kitteltaschenbuch.pdf [zitiert am 04.06.2013]
165. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften, *S3-Leitlinie: Analgesie, Sedierung und Delirmanagement in der Intensivmedizin*, 12/2009. URL: http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/001-012l.pdf [zitiert am 04.06.2013]
166. Meiser, A., et al., *Funktionsweise des „Anaesthetic Conserving Device“ - Besonderheiten beim Einsatz zur inhalativen Sedierung*. Anaesthesist, 2010. **59**(11): p. 1029-1040.

7 Erklärungen zum Eigenanteil

Daniel Philipp Bachmann: Unter wissenschaftlicher Leitung von Prof. Dr. med. Peter Rosenberger, Dr. med. Eckhard Schmid, Dr. med. Andreas Straub (Universitätsklinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin Tübingen) und Prof. Dr. rer. nat. Hans Peter Wendel (Klinisches Forschungslabor der Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie, Universitätsklinikum Tübingen) beteiligt an der Planung der Studie. Er war verantwortlich für die Datenaufnahme, die Literaturrecherche, die Interpretation sowie das Verfassen der vorliegenden Arbeit. Weiterhin federführend beteiligt an der Probenvorbereitung und -verarbeitung der im Rahmen der Versuche gewonnenen Proben mittels ELISA und durchflusszytometrischer Methoden.

Dr. rer. nat. Stefanie Krajewski und Julia Kurz (Chemisch-technische Assistentin) (Klinisches Forschungslabor der Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie, Universitätsklinikum Tübingen): Beteiligt an der Probenvorbereitung sowie -verarbeitung. Darüber hinaus technische Unterstützung bei den FACS-Messungen und ELISA-Bestimmungen.

Karin Beck, Robert Kind, Reiner Seidler und Jürgen Kocok (Kardiotechniker/in) (MAQUET Cardiopulmonary AG, Rastatt): Steuerung und Bedienung der Herz-Lungen-Maschine, sowie Überwachung der Gaszusammensetzung während der extrakorporalen Zirkulation im Rahmen der experimentellen Versuche der Studie.

Beverley Balkau (Ph.D.) (Baker IDI Heart and Diabetes Institute in Melbourne, Australien): Beteiligt an der statistischen Auswertung und Analyse der erhobenen Datensätze.

Prof. Dr. med. Peter Rosenberger, Prof. Dr. rer. nat. Hans Peter Wendel, Dr. med. Eckhard Schmid und Dr. med. Andreas Straub: Verantwortlich für die initiale Konzeption der Studie, das Studiendesign und die Bereitstellung von Mitteln. Sie betreuten die Analyse der Daten und die Interpretation der Ergebnisse.

8 Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Schmidt, E., Krajewski, S., Bachmann, D., Kurz, J., Wendel, H.P., Rosenberger, P., Balkau, B., Peter, K., Unertl, K., Straub, A., *The volatile anesthetic sevoflurane inhibits activation of neutrophil granulocytes during simulated extracorporeal circulation*. Int Immunopharmacol, 2012. **14**(2): p. 202-208.

9 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Peter Rosenberger danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, die freundliche Zusammenarbeit während des gesamten Projektes und die Möglichkeit an seiner Klinik zu promovieren.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Eckhard Schmid und Herrn Dr. med. Andreas Straub für die intensive Betreuung und kontinuierliche Unterstützung. Danke für all die Anregungen, motivierenden Worte, Problemlösungen und Verbesserungsvorschläge. Außerdem danke ich für die sorgfältige Durchsicht und Besprechung der Arbeit, sowie den geduldigen Schriftverkehr, welcher der Fertigstellung der Arbeit in den letzten Jahren geholfen hat. Sie haben es verstanden, mir an vielen Stellen die Zuversicht und Gewissheit zu schenken, dass diese Arbeit in ihrer jetzigen Form entstehen konnte.

Besonders danken möchte ich außerdem Frau Dr. rer. nat. Stefanie Krajewski und Frau Julia Kurz, die mich in die Laborarbeit eingewiesen haben und mit ihrer freundlichen und angenehmen Art stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. Hans Peter Wendel und den Mitarbeitern des klinischen Forschungslabors der Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie, die nicht nur durch ihre Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, sondern es mir vor allem ermöglicht haben, während dieser Zeit in einer sehr angenehmen Atmosphäre tätig zu sein.

Karin Beck, Robert Kind, Reiner Seidler und Jürgen Kocok aus der Abteilung für Kardiotechnik danke ich für die Bereitschaft - parallel zum stressigen Arbeitsalltag - mir für die klinischen Versuche an der Herz-Lungen-Maschine mit Einsatz und Elan zur Verfügung zu stehen.

Frau Beverley Balkau (Ph.D.) und Herrn Prof. Dr. med. Karlheinz Peter vom Baker IDI Heart and Diabetes Institute in Melbourne, Australien, danke ich für die wertvollen und hilfreichen Rückmeldungen, sowie die Unterstützung bei der Darstellung statistischer Zusammenhänge.

Von ganzem Herzen bedanke ich mich bei meiner Familie, die mich auf meinem Lebensweg stets in jeder Hinsicht liebevoll unterstützt und begleitet hat. Ich danke für eure Geduld, den Glauben an mich und die Liebe die ihr mir gebt.

Tobi, vielen lieben Dank für das geduldige Zuhören, Motivieren und all die Zeit, die du dir für die Durchsicht dieser Arbeit genommen hast. Schön dich als Bruder zu haben!