

Aus der Universitätsklinik für Thorax-, Herz- und Gefäß-Chirurgie

Tübingen

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. Dr. G. Ziemer

**Prothrombotische und proinflammatorische Ereignisse  
im Herz-Lungen-Maschinen-Modell: Möglichkeiten der  
pharmakologischen Inhibition**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Ruben de Araújo Azevedo  
aus  
Ulm/ Söflingen

2008

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1.Berichterstatter: Professor Dr. Dr. G. Ziemer

2.Berichterstatter: Professor Dr. M. Gawaz

***Meinen Eltern  
gewidmet***

## **Abstract**

*Einleitung:* Systemische Hypothermie wird in der Herzchirurgie im Rahmen der extrakorporalen Zirkulation (EKZ) und des tief hypothermen Kreislaufstillstands (DHCA) eingesetzt, um die Ischämietoleranz des Patienten zu verlängern. Jedoch induzieren Hypothermie und die EKZ eine Thrombozytenaktivierung und -aggregation, welche zu Blutgerinnungsstörungen und lebensbedrohlichen Thrombembolien führen können. Darüber hinaus induziert die EKZ eine Interaktion und Bindung von Thrombozyten und Leukozyten, welche in eine systemische Entzündungsreaktion (SIRS) münden kann. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, eine pharmakologische Möglichkeit zur Protektion von Thrombozyten gegen Schädigung durch Hypothermie und EKZ-Oberflächen zu finden.

*Methode:* Mit Hilfe der Durchflußzytometrie wurde die Expression des thrombozytären Aktivierungsmarkers P-Selektin, die Bindung des für GP IIb/IIIa aktivierungsspezifischen PAC-1 Antikörpers, die Bildung von Thrombozytenaggregaten und deren Gehalt an Monozyten und Granulozyten analysiert. Zur Simulation der Bedingungen des DHCA wurde in Stase und bei 18°C der Effekt der kurzwirksamen GP IIb/IIIa-Blocker Tirofiban und Eptifibatide in voll-heparinisierten Frischblutproben untersucht. Im EKZ-Modell wurde bei 18°C und 28°C zusätzlich der Effekt des Phosphodiesterasehemmers Milrinon, des Adenosin-Uptake-Inhibitors Dipyridamol und des Serinproteaseninhibitors Aprotinin analysiert. Mittels multifaktorieller Varianzanalyse erfolgte die statistische Auswertung.

*Ergebnisse:* Beide GP IIb/IIIa-Blocker inhibieren die hypothermie- und EKZ-induzierte Thrombozytenaggregation und die PAC-1-Bindung. Die P-Selektin-Expression wird bei Hypothermie jedoch nur von Tirofiban inhibiert, während sie von Eptifibatide erhöht wird. Die Thrombozyten-Leukozyten Interaktion wurde unter EKZ-Bedingungen durch Tirofiban und Eptifibatide gehemmt, während sie bei Stillstand wenig beeinflusst wurde. Milrinon, Dipyridamol und Aprotinin zeigten keine Wirkung auf die untersuchten Parameter.

*Schlußfolgerung:* Während in vitro simulierter EKZ und DHCA verhindert der kurzwirksame GP IIb/IIIa Blocker Tirofiban die Thrombozytenaktivierung und -aggregation und verringert die EKZ-induzierte Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion. Deshalb sollte der in vivo Einsatz von Tirofiban zur Reduktion von EKZ und DHCA-assoziierten Komplikationen wie Mikroembolien und SIRS geprüft werden.

## Abkürzungsverzeichnis

ADP = Adenosindiphosphat	PMT = Photonen Multiplier Tube
ATP = Adenosintri-phosphat	PTR = Proben-temperaturgerät
BSA = Bovines Serum-Albumin	PVC = Polyvinylchlorid
CaCl <sub>2</sub> = Calciumchlorid	RNA = Ribonucleidacid
cAMP = zyklisches Adenosinmonophosphat	SSC = side scatter
CD = Cluster of differentiation	vWF = von Willebrand-Faktor
CPB = Cardiopulmonary bypass	
DHCA = Deep Hypothermic Circulatory Arrest	
DNA = Desoxyribonucleidacid	
EKZ = Extrakorporale Zirkulation	
FACScan = Fluorescence Activated Cell Scan	
FITC = Fluoresceiniso-thiocyanat	
FL = Fluoreszenz	
FSC = forward scatter	
GDP = Guanosindiphosphat	
GFB = Green Fluorescent Protein	
GP = Glykoprotein	
GTP = Guanosintri-phosphat	
HIPA = Hypothermia Induced Platelet Aggregation	
HLM = Herz-Lungen-Maschine	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Kaliumhydrogenperoxidat	
LVAD = Left Ventricular Assist Device	
MgCl <sub>2</sub> = Magnesiumchlorid	
MODS = Multiple Organ Dysfunction Syndrom	
NaHCO <sub>3</sub> = Natriumhydrogencarbonat	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> Natriumhydrogenperoxidat	
PDE = Phosphodiesteraseester	
PE = Phycoerythrine	
PTCA = Perkutane Transluminale Coronar-Angioplastie	

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Der Thrombozyt.....	1
1.1.1 Der Thrombozyt während der Hämostase.....	2
1.1.2 Intrathrombozytäre Vorgänge während der Aktivierungsphase.....	3
1.1.3 Wichtige Oberflächenrezeptoren.....	4
1.2 Der kardiopulmonale Bypass und die Folgen.....	6
1.2.1 Bedeutung der Hypothermie für den Organismus.....	7
1.2.2 Unerwünschte Effekte der Hypothermie.....	7
1.2.3 Der normotherme Bypass.....	8
1.3 Pharmakologische Beeinflussung der Thrombusentstehung und der inflammatorischen Ereignisse.....	8
1.3.1 GP IIb/IIIa-Antagonisten als wichtigstes Medikament dieser Studie.....	8
1.3.1.1 Tirofiban.....	10
1.3.1.2 Eptifibatide.....	10
1.3.1.3 Nebenwirkungen der GP IIb/IIIa-Antagonisten.....	10
1.3.2 Aprotinin.....	11
1.3.3 Milrinon.....	12
1.3.4 Dipyridamol.....	12
1.4 Aufbau der Studie.....	12
1.4.1 Studienziele und Fragestellung.....	13
<b>2. Material und Methodik.....</b>	<b>14</b>
2.1 Materialien.....	14
2.1.1 Geräte.....	14
2.1.2 Fluoreszenzfarbstoffe (Fluorochrome).....	22
2.1.3 Antikörper.....	23
2.1.4 Puffer.....	24
2.1.5 Chemikalien/Medikamente.....	24

2.1.6 Sonstiges.....	25
2.2 Methoden .....	26
2.2.1 Blutentnahme und Probandenauswahl.....	26
2.2.2 Untersuchungen bei Stase zur Simulierung des DHCA.....	26
2.2.2.1 Inkubationsprotokoll 1.....	27
2.2.2.2 Inkubationsprotokoll 2.....	27
2.2.3 Untersuchungen und Versuchsprotokoll zur Simulation normothermer und hypothermer extrakorporaler Zirkulation (Chandler-Loop).....	28
2.2.4 Durchflußzytometrische Analyse .....	29
2.2.4.1 Geräteeinstellungen des Durchflußzytometers.....	30
2.3 Statistische Auswertungen .....	31
2.3.1 Auswertung des Effektes von Tirofiban und Eptifibatide auf Thrombozyten unter DHCA-Bedingungen.....	31
2.3.2 Chandler-Loop Teil.....	32

### **3. Ergebnisse .....** **33**

3.1 Messungen unter den in-vitro Bedingungen des DHCA .....	33
3.1.1 Thrombozytenaggregation: Hypothermie-induzierte Thrombozyten- aggregation (HIPA) wird durch GP IIb/IIIa - Blockade gehemmt .....	33
3.1.2 Die Hypothermie-induzierte Thrombozytenaktivierung wird durch GP IIb/IIIa- Blockade gehemmt.....	34
3.1.3 Die Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion: Eptifibatide steigert die Thrombozyten-Granulozyten- Bindung bei Hypothermie.....	36
3.2 Messungen unter den in-vitro Bedingungen der extrakorporalen Zirkulation.....	38
3.2.1 Die Simulation der extrakorporalen Zirkulation (EKZ) bei Normothermie und Hypothermie im Chandler-Loop.....	38
3.2.1.1 Thrombozytenaggregation.....	38
3.2.1.2 Thrombozytenaktivierung (P-Selektin- Expression).....	40
3.2.1.3 Thrombozytenzahl im Vollblut .....	41
3.2.1.4 Thrombozyten- Granulozyten- Bindung.....	43

3.2.1 Der Vergleich der Temperaturen (37°C, 28°C und 18°C).....	44
---	----

## **4. Diskussion..... 46**

4.1 Die Thrombozytenfunktion unter den in-vitro Bedingungen des tief hypothermen Kreislaufstillstandes.....	46
---	----

4.2 Der Effekt von GP IIb/IIIa-Rezeptor Blockern unter den in-vitro Bedingungen des tief hypothermen Kreislaufstillstandes .....	47
--	----

4.2.1 Analyse Hypothermie-induzierter Thrombozytenaktivierung und .....	47
---	----

4.2.2 Differentielle Effekte der GP IIb/IIIa Blocker Tirofiban und Eptifibatide auf die thrombozytäre P-Selektin Expression.....	47
--	----

4.2.3 Wirkung auf die Thrombozyten-Leukozyten Interaktion .....	49
---	----

4.3 Der Effekt der extrakorporalen Zirkulation auf die plasmatische Blutgerinnung, inflammatorische Ereignisse und die Thrombozytenfunktion ...	50
---	----

4.4 Der Effekt von GP IIb/IIIa-Rezeptor-Blockern an der normo- und hypothermen extrakorporalen Zirkulation .....	51
--	----

4.4.1 Thrombozytenprotektion durch GP IIb/IIIa-Blockade.....	51
--	----

4.4.2 GP IIb/IIIa-Blocker sind anderen Thrombozyteninhibitoren überlegen ....	51
---	----

4.4.3 Differentieller Effekt von Tirofiban und Eptifibatide auf die Interaktion von Thrombo- und Leukozyten.....	53
--	----

4.5 Potentielle Konsequenzen für die klinische Anwendung von GP IIb/IIIa Blockern .....	54
---	----

4.5.1 Bedeutung für die Herzchirurgie.....	54
--	----

4.6 Ausblick .....	56
--------------------	----

4.6.1 Anwendung von GP IIb/IIIa Blockern zur Thrombozytenprotektion in der Herzchirurgie .....	56
--	----

4.6.2 Einschränkungen.....	56
----------------------------	----

## **5. Zusammenfassung ..... 57**

5.1 Einleitung.....	57
---------------------	----

5.2 Methode .....	57
-------------------	----

5.3 Ergebnisse .....	57
5.4 Schlußfolgerung .....	58
<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>59</b>
<b>7. Anhang .....</b>	<b>68</b>
7.1 Publikationen.....	68
7.2 Eidesstaatliche Erklärung.....	69
7.3 Danksagung.....	70
7.4 Lebenslauf.....	71

## 1. Einleitung

### 1.1 Der Thrombozyt

Die Blutplättchen werden im Knochenmark aus Megakaryozyten gebildet und haben als kleinstes zelluläres Element des Blutes eine Größe von 2-4  $\mu\text{m}$ . Die physiologische Überlebenszeit im peripheren Blut beträgt etwa 7 Tage. Dort erfüllen sie wichtige Aufgaben im Rahmen der Blutstillung, der Gefäßreparatur und der Entzündung. Auch bei der Genese der Arteriosklerose spielen Thrombozyten eine entscheidende Rolle.

Die Zone der Organellen befindet sich im Zytoplasma und besteht aus Mitochondrien, Glykogenspeicher und drei verschiedenen Formen von Speichergranula (Gawaz M 1999b):

- **$\alpha$ -Granula**

Die  $\alpha$ -Granula haben einen Anteil von 15 % (10 – 17%) am Thrombozytenvolumen. Die 150 bis 400 nm großen Organellen dienen als Speicher für eine Anzahl verschiedener Proteine. Nach ihrer Freisetzung sind diese Moleküle an einer Vielzahl von Reaktionen der Thrombozyten beteiligt (Holt JC 1985; Morgenstern E 1995; Gawaz M 1999b):

- Aggregation und Interaktion mit anderen Zellen und mit den Strukturen der bindegewebigen Matrix (Fibrinogen, Fibronectin, vWF,  $\beta$ -Thromboglobulin und PF 4).
- Gerinnung und Fibrinolyse (Faktor V und VIII, Fibrinogen und andere adhäsive Glykoproteine, Plasminogen, Plasminogenaktivatorinhibitor-1).
- Entzündungs- und Immunreaktionen („chemotactical factor“, „permeability factor“, „platelet derived growth factor“, Komplementfaktoren, Immunglobuline).
- **Dichte Granula** sogenannte „dense bodies“ enthalten ATP, ADP, GTP, GDP, anorganische Phosphate, Calcium und Serotonin.
- **Lysosomen** enthalten lysosomale Enzyme wie zum Beispiel saure Hydrolasen.

Außerdem beinhaltet die Membran der Thrombozyten wichtige Bestandteile, welche auch bei der Aktivierung der Thrombozyten freigesetzt werden können. Dazu gehören Plättchenfaktor 3 und Arachidonsäure. Letztere wird durch die enzymatische Aktivität der Cyclooxygenase in Thromboxan  $A_2$  umgewandelt.

### **1.1.1 Der Thrombozyt während der Hämostase**

Die Adhäsion von noch ruhenden Blutplättchen an die verletzte Gefäßwand ist der erste Schritt der primären Hämostase. Der Adhäsionsvorgang wird durch thrombozytäre Membranglykoproteine gesteuert. Thrombozyten besitzen eine Reihe von membranständigen Adhäsionsrezeptoren, die spezifische Strukturkomponenten der extrazellulären Matrix im Bereich des Subendothels und der Media erkennen. Neben den wichtigen Adhäsionsproteinen Fibronektin und Laminin findet sich auch der von-Willebrand-Faktor, der vom Endothel sezerniert wird und primär subendothelial liegt. Über die Interaktion des thrombozytären Rezeptors für den von-Willebrand-Faktor (GP Ib-V-IX) mit kollagenimmobilisiertem vWF wird der erste Kontakt zirkulierender Blutplättchen mit der Zellwandläsion hergestellt. Dies führt schließlich zur Ausbildung einer Thrombozytenschicht im Bereich des Gefäßwanddefektes (Gawaz M 1999b).

Über weitere membranständige Adhäsionsrezeptoren für Kollagen-, Fibrinogen, und Laminin erfolgt eine Stabilisierung der Plättchenadhäsion. Neben der Bindung des Kollagens an den Kollagenrezeptor induzieren auch die Agonisten ADP, Thrombin (Jamieson GA 1997), Thromboxan  $A_2$ , Adrenalin, Serotonin, Vasopressin und Plasmin eine Aktivierung des Thrombozyten. Dies führt zu einer Formveränderung (shape change) des bisher diskoiden Thrombozyts zu einem kugelförmigen Blutplättchens mit stachelartigen Fortsätzen. Dabei kommt es zu einer effektiven Abdichtung der Gefäßwandläsion.

Während der Adhäsion werden Granulainhaltsstoffe freigesetzt, welche autokrin den Aktivierungsvorgang verstärken. Dieselben Inhaltsstoffe führen durch parakrine Stimulation noch ruhender Thrombozyten zu deren Rekrutierung aus der Zirkulation und zur Aggregation mit schon adhärenen Plättchen. Die Interaktion von noch zirkulierenden Blutplättchen mit schon

adhärenten Thrombozyten erfolgt über aktivierte GP IIb/IIIa-Rezeptoren (Fareed J 1995). Neben der Aggregation ist dieses GP auch am Spreizungsprozess beteiligt, bei dem Lamellen eine Formveränderung des aktivierten Thrombozyten bedingen. Zur Stabilisierung des Plättchenthrombus wird Fibrin eingelagert. Zentrale Bedeutung bei der Entstehung von Fibrinogenbrücken hat der GP IIb/IIIa-Komplex auf der Thrombozytenoberfläche. Im ruhenden Zustand kann kein lösliches plasmatisches Fibrinogen an die Thrombozytenoberfläche binden. Erst nach Aktivierung des Blutplättchens kommt es im Bereich des GP IIb/IIIa-Komplexes zur Freilegung von Bindungsstellen für Fibrinogen. Die initiale Fibrinogenbindung an GP IIb/IIIa ist noch reversibel. Im Zeitverlauf von 10-30 Minuten kommt es schließlich zu einer irreversiblen Stabilisierung (Gawaz M 1999b).

### **1.1.2 Intrathrombozytäre Vorgänge während der Aktivierungsphase**

Neben dem Adhäsionsvorgang können durch lösliche Agonisten wie ADP oder Thrombin im Thrombozyten morphologische und funktionelle Veränderungen induziert werden, welche man als Aktivierung bezeichnet (Ruggeri ZM 1994; Jamieson GA 1997). Erst durch Aktivierung der Blutplättchen kann ein primärer hämostatischer Pfropf voll ausgebildet werden.

Eine Vielzahl von Substanzen können Thrombozyten aktivieren und metabolische Veränderungen im Thrombozyten hervorrufen. Jeder Agonist bindet an seinen spezifischen Rezeptor auf der Thrombozytenoberfläche und induziert über „second messenger“-Mechanismen einen Signaltransduktionsweg (Gawaz M 1999b). Bei der Bildung dieser „second messenger“ spielen drei Enzymkomplexe eine wesentliche Rolle: Die Phospholipase C, die Phospholipase A<sub>2</sub> und die Adenylatzyklase. Jedes dieser drei Enzyme ist an der Regulation des freien intrazellulären Calciums beteiligt. Es besteht eine direkte Korrelation zwischen intrazellulärer Calcium-Konzentration und Stimulierungsgrad. Die Phospholipase C spaltet PIP<sub>2</sub> unter Bildung von IP<sub>3</sub> und Diacyglyzerid. IP<sub>3</sub> führt zu einer Freisetzung von Calciumionen aus dem tubulären System. Diese Calciumfreisetzung stellt eine

elementare Voraussetzung für die Thrombozytenaktivierung dar. Unter der erhöhten intrazellulären Calciumkonzentration kommt es zu einer Aktivierung verschiedener calciumabhängiger Enzyme. Durch Diacylglycerid wird die Proteinkinase C aktiviert, die ihrerseits zu einer Phosphorylierung von Proteinen an Serin- und Thyreoninresten führt. Dies wird begleitet von einer Freisetzung granulärer Inhaltsstoffe sowie der Aktivierung und vermehrten Expression des Fibrinogenrezeptors (GP IIb/IIIa). Durch die erhöhte Calciumkonzentration wird zudem die Phospholipase A<sub>2</sub> aktiviert, welche die Freisetzung von Arachidonsäure (AA) aus den Membranphospholipiden katalysiert. AA ist der Vorläufer einer Reihe von Eikosanoiden wie zum Beispiel das Thromboxan A<sub>2</sub>. Nach Freisetzung letzterer kommt es zu einer Sekretion von Granulainhaltsstoffe (Gawaz M 1999b).

Die Adenylatzyklase wird stimuliert durch Antagonisten der Thrombozytenaktivierung wie Prostazyklin oder Theophyllin.

### **1.1.3 Wichtige Oberflächenrezeptoren**

Durch die Signaltransduktion des aktivierten Thrombozyten wird der Aggregationsrezeptor GP IIb/IIIa stimuliert. Auf der ruhenden Oberfläche bildet GP IIb/IIIa einen Komplex, der kein plasmatisches Fibrinogen binden kann. Durch Aktivierung erfährt dieser Rezeptor eine Formveränderung und bildet „Fibrinogentaschen“, welche die Bindung von Fibrinogen an GP IIb/IIIa steuern und die Aggregation auslösen (Gawaz M 1999b).

- **ADP-Rezeptor**

An der Thrombozytenoberfläche gibt es eine Reihe von ADP-Bindungssellen. Die wichtigsten sind P2X<sub>1</sub> und P2Y<sub>1</sub>. Der P2X<sub>1</sub>-Rezeptor vermittelt den ADP-induzierten Calcium-Einstrom und die Formveränderung der Thrombozyten. P2Y<sub>1</sub> vermittelt die ADP-induzierte Freisetzung von intrazellulärem Calcium, die Inhibierung der Adenylatzyklase, die Aktivierung des GP IIb/IIIa-Rezeptors und nachfolgend die Plättchenaggregation.

- **Kollagenrezeptor**

Während der Adhäsion treten Thrombozyten über spezifische Rezeptoren mit Kollagenfibrillen, die sich im Subendothel befinden, in Kontakt. Die Adhäsion von noch ruhenden Thrombozyten an Kollagen führt zu deren Aktivierung mit nachfolgender Sekretion und Aggregation.

- **GP IIb/IIIa-Rezeptor (CD41/CD61)**

Das Glykoprotein IIb/IIIa gehört zur Gruppe der Integrine. Es ist mengenmäßig das am häufigsten vorkommende Membranglykoprotein der Blutplättchen. 80% der Rezeptoren liegen konstitutiv auf der Oberfläche exprimiert vor, die restlichen 20% werden erst nach Thrombozytenaktivierung aus den intrazellulären Speichern an die Oberfläche freigegeben (Gawaz M 1999a).

Zentrale Aufgabe dieses Rezeptors ist die Bindung von löslichem Fibrinogen an die aktivierte Thrombozytenoberfläche. Dies ist der erste und wichtigste Schritt der Thrombozytenaggregation (Phillips DR 1988).

- **P-Selektin (CD62)**

P-Selektin gehört zur Gruppe der Selektine, die wiederum zur Gruppe der vaskulären Adhäsionsrezeptoren gehören. Ihre Aufgabe besteht darin die heterotypischen Interaktionen von Zellen zu vermitteln.

P-Selektin findet sich sowohl in Plättchen als auch in Endothelzellen und liegt gespeichert in den thrombozytären  $\alpha$ -Granula. P-Selektin wird nicht auf ruhenden Plättchen oder Endothelzellen exprimiert. Die Aktivierung führt zur raschen Freisetzung und Oberflächenexpression von P-Selektin und spielt deshalb eine zentrale Rolle bei der sekundären Hämostase und bei vaskulären Reparaturvorgängen. P-Selektin, welches auf aktiviertem Endothel oder auf adhätierenden Thrombozyten exponiert wird, fördert die Anlagerung von Leukozyten an die Endothelläsion. Weiterhin vermittelt P-Selektin durch Interaktion mit dem leukozytären Molekül PSGL-1 die Bindung von Thrombozyten an Leukozyten. Dies kann inflammatorische Reaktionen in Leukozyten nach sich ziehen (Gawaz M 2005).

## 1.2 Der kardiopulmonale Bypass und die Folgen

Im Bereich der Herzchirurgie gehören die koronarchirurgischen Eingriffe zu den am häufigsten durchgeführten Eingriffen des höheren Alters. Der postoperative Verlauf ist bei der Mehrheit der Patienten komplikationslos, und kann mit relativ geringem operativem Risiko durchgeführt werden. Die operative Mortalität hängt von verschiedenen Begleitfaktoren ab, und liegt dabei zusammengefasst zwischen 1-2 Prozent (Ngaage DL 2007). Bei nahezu allen Patienten treten diskrete Organdysfunktionen auf, die sich häufig dem klinischen Nachweis entziehen (Harris DN 1993; Singh AK 1995).

Da der größte Teil der Herzoperationen nicht am schlagenden Herzen möglich ist, wird, zur temporären Überbrückung der Herzfunktion, eine Operationsphase benötigt, in der das Herz still steht. Während dieser Zeit übernimmt die Herz-Lungen-Maschine (HLM oder auch EKZ = Extrakorporale Zirkulation) sowohl die Pumpfunktion des Herzens, als auch die Oxygenierung des Blutes. Mit der HLM kann somit die Funktion von Herz und Lunge übernommen werden, was auch als „kardiopulmonaler Bypass“ bezeichnet wird. Weiterhin kann während des kardiopulmonalen Bypasses mit der HLM der Organismus zudem gekühlt und wieder aufgewärmt werden. Durch diesen gezielten Einsatz systemischer Hypothermie, der in der Herzchirurgie routinemäßig angewandt wird, kommt es zu einer Verlängerung der Ischämietoleranz des Organismus. Dadurch erreicht man eine Protektion der Organe, welche eine Verlängerung der OP-Zeit ermöglicht (Jonas 2002; Tassani P 2002; Di Eusanio M 2003). Trotz der eindeutigen Vorteile welche der Einsatz der hypothermen EKZ mit sich bringt, ist die EKZ dennoch mit verschiedenen Problemen assoziiert:

Die Interaktion des Blutes mit den Bestandteilen des extrakorporalen Kreislaufes und die Hypothermie selbst initiieren zum einen eine Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten (Scharbert G 2006), und zum anderen inflammatorische Kaskaden (Chenoweth DE 1981; Butler J 1993; Riddington DW 1996) die verschiedenste (Zhang JN 2004) Organdysfunktionen nach sich ziehen können.

Im schlimmsten Falle kann es unter dem Einsatz der HLM zu einem ausgedehnten Multiorganversagen (Multiple Organ Dysfunction Syndrome,

MODS) mit hoher Mortalität kommen, welches in ca. 2% der Fälle auftritt (Christenson JT 1994). Als Ursache für das MODS kommt unter anderem die Kontaktaktivierung und Mediatorenfreisetzung der Thrombozyten durch die Fremdoberfläche der HLM in Frage. Thrombembolien, die zu einer Minderperfusion der Organe führen, können ebenfalls ein Multiorganversagen auslösen (Kirklin JK 1983; Boldt J 1996).

### **1.2.1 Bedeutung der Hypothermie für den Organismus**

Hypothermie ist definiert als Körpertemperatur unter 35°C. Die Einteilung erfolgt im Allgemeinen in milde Hypothermie (32-35°C), mäßige Hypothermie (26-31°C), tiefe Hypothermie (20-25°C) und profunde Hypothermie (unter 20°C). Der tiefhypotherme Kreislaufstillstand (Englisch: Deep hypothermic circulatory arrest, DHCA), der bei Temperaturen unter 20°C erreicht wird, kommt vor allem bei ausgedehnten Operationen im Bereich des Aortenbogens bei Erwachsenen und bei Korrekturen angeborener kindlicher Herzfehler in Betracht (Ergin MA 1999).

Herzchirurgische Eingriffe am kardiopulmonalen Bypass werden in der Regel in Hypothermie durchgeführt, um den Organismus durch eine Reduktion des Stoffwechsels vor Schädigung infolge einer Gewebeischämie zu schützen (Norwood WI 1982).

Bei niedrigen Temperaturen sind biochemische Abläufe wie zum Beispiel enzymatische Reaktionen verlangsamt. Die Stoffwechselaktivität, der Sauerstoffverbrauch und die Kohlendioxidproduktion des Körpers nehmen ab. Dadurch kommt es, im Falle einer Ischämie, zu einer Minderung der generellen Organschädigung.

### **1.2.2 Unerwünschte Effekte der Hypothermie**

Neben der erwünschten protektiven Wirkung der Hypothermie gibt es auch einige ungünstige Einflüsse. Solche sind z.B. Störungen der Thrombozytenfunktion mit dadurch bedingter Gerinnungsstörung. Weiterhin kann die Hypothermie Herzrhythmusstörungen bis hin zum Kammerflimmern induzieren (Mora CT 1995).

Im Rahmen von Operationen, die unter Einsatz des tiefhypothermen Kreislaufstillstandes durchgeführt wurden, konnte postoperativ eine transiente oder permanente neurologische Schädigung nachgewiesen werden (Newburger JW 1993; Bellinger DC 1995). Auf diese Weise wurde in der Vergangenheit unter anderem gezeigt, dass der Verschluss der zerebralen Mikrozirkulation durch Mikroembolien bedingt sein kann (Taylor KM 1998).

Der hypotherme Bypass führt zu einer Freisetzung von ADH, Angiotensin II, Thromboxan A<sub>2</sub> sowie Adrenalin, welche zu einer Thrombozytenaktivierung und Aggregation führen kann (Langley SM 1999; Straub A 2005b, 2005c).

### **1.2.3 Der normotherme Bypass**

Auf Grund der unerwünschten Effekte des hypothermen Kreislaufes wird der Herz-Lungen-Bypass alternativ auch unter normothermen Konditionen durchgeführt (Lilly JK 1980; Singh AK 1993; Lancet 1994; Martin TD 1994; Singh AK 1995; Boldt J 1996; Rezagui I 1996). Hierbei treten Thrombozytenfunktionsstörungen seltener auf (Boldt J 1996) als unter Hypothermie.

Obwohl der normotherme Bypass im Vergleich zur Hypothermie Vorteile zu haben scheint, konnte nicht nachgewiesen werden, dass die Inzidenz des MODS durch die Normothermie gesenkt wird. Die Morbidität nach normothermem und hypothermem Bypass ist in ungefähr gleich groß (Tönz M 1993).

## **1.3 Pharmakologische Beeinflussung der Thrombusentstehung und der inflammatorischen Ereignisse**

### **1.3.1 GP IIb/IIIa-Antagonisten als wichtigstes Medikament dieser Studie**

In Anbetracht der zahlreichen Agonisten und Stoffwechselwege, die zur Thrombozytenaktivierung führen, sind pharmakologische Interventionen, die eine Endstrecke der Thrombozytenaktivierung blockieren, erfolgsversprechend (Coller BS 1995). GP IIb/IIIa-Rezeptor-Blocker inhibieren kompetitiv die

Fibrinogenbindung an den GP IIb/IIIa Rezeptor, welche die gemeinsame Endstrecke der Thrombozytenaktivierung darstellt (Coller BS 1995; Mousa SA 1996). Durch GP IIb/IIIa-Rezeptor-Blocker wird somit die Bindung einzelner Thrombozyten aneinander verhindert, was essentiell für die Ausbildung stabiler Thrombozytenaggregate ist.

Natürlich vorkommende Inhibitoren des GP IIb/IIIa, sogenannte Disintegrine, werden im Giftsekret bestimmter Schlangen gefunden. Coller et al. (Coller BS 1995) konnten als Erste zeigen, dass durch einen Antikörper, der gegen die Fibrinogenerkennungsregion von GP IIb/IIIa gerichtet ist, die Bindung von plasmatischem Fibrinogen an das Glykoprotein IIb/IIIa in vivo effektiv gehemmt wird, und somit die Thrombozytenaggregation.

Die Bindung von Fibrinogen an seinen Rezeptor stellt den zentralen Schritt der Thrombozytenaggregation dar (Gawaz M 1999b). Fibrinogen bindet vornehmlich über die RGD-Aminosäuresequenz innerhalb seines Moleküls an GP IIb/IIIa. Die Blockade der Fibrinogenbindungsstelle durch GP IIb/IIIa-Antagonisten führt deshalb, unabhängig von der Art der Aktivierung, zur effektiven Hemmung der Fibrinogenbindung an GP IIb/IIIa (Pedicord DL 1998; Keularts IM 1998; Madan M 1998).

Die in klinischen Studien am meisten untersuchten GP IIb/IIIa-Antagonisten (Adgey AA 1998), die für die parenterale Anwendung am Patienten entwickelt wurden, sind der monoklonale Antikörper Abciximab, das zyklische Peptid Eptifibatide und das Non-Peptid Tirofiban (Vorchheimer DA 1999; Dickfeld T 2001). Neumann et al. zeigen in ihrer Studie, dass sowohl Abciximab, als auch Tirofiban und Eptifibatide die Thrombozytenaggregation im Vergleich zur Kontrollgruppe wesentlich hemmen. Dabei wird bei den jeweiligen Behandlungsgruppen vor der Koronarangioplastie ein Bolus des Medikamentes gegeben, und daraufhin eine Dauerinfusion mit einer niedrigeren Dosierung des gleichen Medikamentes über mehrere Stunden (Neumann FJ 2001) verabreicht.

In dieser Studie wurden die Wirkungen von Eptifibatide und Tirofiban miteinander verglichen.

### **1.3.1.1 Tirofiban**

Tirofiban ist ein kleines, nicht-peptidisches Molekül mit tyrosinähnlicher Struktur. Tirofiban ist spezifisch für GP IIb/IIIa und beeinflusst andere Integrinrezeptoren nicht. Im Gegensatz zu Eptifibatide, welches durch seine RGD-ähnliche Molekülstruktur mit der Fibrinogenbindungsstelle kompetiert, imitiert der nicht-peptische Antagonist Tirofiban die geometrischen, stereotaktischen und oberflächlichen Ladungseigenschaften der RGD-Sequenz und hemmt dadurch die Fibrinogenbindung.

### **1.3.1.2 Eptifibatide**

Zum Schutz vor enzymatischem Abbau und zur Steigerung der Rezeptoraffinität und -spezifität wurden zyklische Peptide wie z.B. Eptifibatide entwickelt. Eptifibatide ist ein über Disulfid-Brücken verbundenes zyklisches Peptid mit 7 Aminosäuren. Es bindet kompetitiv im Bereich der RGD-Erkennungsregion des GP IIb/IIIa-Rezeptors.

### **1.3.1.3 Nebenwirkungen der GP IIb/IIIa-Antagonisten**

Die Hauptnebenwirkung der GP IIb/IIIa-Antagonisten besonders in Kombination mit weiteren Antithrombotika besteht im Auftreten von unerwünschten Blutungen (Aster RH 2004). Bei konservativ behandelten Patienten (keine koronare Intervention) sind die Blutungskomplikationen nicht wesentlich durch die Verabreichung intravenöser GP IIb/IIIa-Antagonisten im Vergleich zu Placebo gesteigert. Dagegen muss bei Patienten, bei denen unter laufender GP IIb/IIIa-Blocker-Therapie eine koronare Intervention oder ein chirurgischer Eingriff durchgeführt wird, mit erhöhten Blutungskomplikationen gerechnet werden. In der EPIC-Studie wiesen Abciximab-behandelte Patienten im Vergleich zur Placebo-Gruppe, unter gleichzeitiger Verabreichung von Heparin signifikant vermehrt Blutungskomplikationen auf (EPIC 1994). Ein Anstieg intrazerebraler Hämorrhagien wurde unter der Therapie mit GP IIb/IIIa-Inhibitoren nicht beobachtet (EPILOG 1997).

Eine weitere signifikante Nebenwirkung unter der Therapie mit Abciximab und auch der Therapie mit anderen GP IIb/IIIa-Inhibitoren ist die Entwicklung einer

Thrombozytopenie (Kereiakes DJ 1996; Giugliano RP 1998). Die Therapie mit Tirofiban oder Eptifibatide ist mit einem Anstieg der Inzidenz auf 0,2 % für das Auftreten einer schweren Thrombozytopenie (Thrombozytenzahl  $< 50000/\text{mm}^3$ ) assoziiert, wohingegen die Inzidenz einer schweren Thrombozytopenie unter der Therapie mit Abciximab mit 0,4% - 1,4 % etwas höher zu sein scheint. Darüber hinaus konnte in einer anderen Studie gezeigt werden, dass GP IIb/IIIa-Rezeptor-Blocker, nachdem sie vom GP IIb/IIIa Rezeptor auf dem Thrombozyt abdissoziiert sind, einen aktiven Funktionsstatus des Rezeptors hinterlassen, was wiederum einen anschließenden proaggregatorischen Effekt haben kann (Dickfeld T 2001).

### **1.3.2 Aprotinin**

Aprotinin, ein Serin-Protease-Inhibitor, ist ein natürliches Polypeptid, welches zur Reduktion der Blutungsneigung eingesetzt wird indem es die durch Plasmin vermittelte Fibrinolyse hemmt. Die inhibierende Wirkung des Serin-Protease-Inhibitors, beruht darüber hinaus auch auf der Hemmung der beiden Proteasen Kallikrein und Trypsin. So wird das Medikament z.B. während Operationen am offenen Herzen oder in der Leberchirurgie angewandt. Als Serin-Protease-Inhibitor wird es aus dem Lungengewebe von Kühen extrahiert.

Im Rahmen seiner Hauptwirkung, der Minderung des Blutverlustes bei herzchirurgischen Eingriffen schützt Aprotinin auch die Thrombozytenfunktion und hat parallel dazu einen antiinflammatorischen Effekt (Landis RC 2001). Nichtsdestotrotz wurde in einigen Studien gezeigt, dass auch dieses Medikament durchaus unerwünschte Nebenwirkungen besitzt.

In einer Studie aus dem Jahre 2006 wurde berichtet, dass Aprotinin zu einer gestörten Nierenfunktion bis hin zum Nierenversagen führen kann (Augoustides JG 2006). In anderen Studien werden zudem Nebenwirkungen wie thrombotische Ereignisse bis hin zu Todesfällen nach der Anwendung von Aprotinin beschrieben (Saffitz JE 1993; Westaby S 1994; Mangano DT 2006).

### **1.3.3 Milrinon**

Milrinon ist ein spezifischer Hemmer der Phosphodiesterase (PDE) III (Kittleson MD 1985; Adams HR 1995), welcher neben der positiv inotropen Wirkung auch eine Vasodilatation der Arteriolen und Venolen zur Folge hat, die dadurch eine Senkung der Nachlast induziert. Die positiv inotrope Wirkung am Herzen ist in erster Linie Folge der indirekten sympathomimetischen Wirkung. Außerdem wird der Natrium/Calcium-Austausch in hohen Konzentrationen beeinflusst. Milrinon verkürzt somit im normalen Myokard die Dauer des Aktionspotentials und die Refraktärzeit (Davidenko J 1985).

Darüber hinaus haben Studien gezeigt, dass Milrinon in der Lage ist ADP-, Kollagen- und Adrenalin-induzierte Thrombozytenaggregation zu verhindern (Anfossi G 1996).

### **1.3.4 Dipyridamol**

Bei Dipyridamol handelt es sich um einen Adenosin-Reuptake-Inhibitor, welcher darüber hinaus auch eine phosphodiesterasehemmende Funktion besitzt (Gresele P 1986). In Anwesenheit von Dipyridamol akkumuliert der Adenosingehalt im Blut und stimuliert über spezifische Membranrezeptoren die Adenylatcyclase. Dadurch steigt der intrathrombozytäre cAMP-Gehalt, wodurch die Thrombozytenaggregation geringer ausfällt.

## **1.4 Aufbau der Studie**

Zu den Komplikationen herzchirurgischer Eingriffe mit Einsatz der HLM zählen systemische Entzündungsreaktionen und neurologische Komplikationen. Letztere können durch eine embolische Okklusion der Mikrozirkulation mit Thrombozytenaggregaten und Thrombozyten-Leukozyten-Konjugaten verursacht sein. Hypothermie, wie sie im Rahmen herzchirurgischer Eingriffe zur Organprotektion und zur Verlängerung der Operationsdauer angewandt wird, kann zur Ausbildung solcher okklusiver Thrombozytenaggregate führen. In dieser Arbeit soll eine Möglichkeit zur pharmakologischen Inhibition der HIPA gefunden werden. Das Hauptaugenmerk wird auf die

Thrombozytenfunktion unter der Einwirkung kurzwirksamer GP IIb/IIIa Antagonisten gelegt. Weiterhin wird der Effekt anderer Inhibitoren, welche die Thrombozytenfunktion an unterschiedlichen Ansatzpunkten hemmen unter Simulation des DHCA und in einem HLM-Modell (Chandler-Loop) bei Normo- und Hypothermie untersucht.

#### **1.4.1 Studienziele und Fragestellung**

Das primäre Ziel dieser Studie ist es, zu ermitteln, in wieweit sich durch eine spezifische thrombozytäre Rezeptorblockade (z.B. mittels GP IIb/IIIa-Rezeptor-Blocker) und Enzyminhibition (z.B. durch einen Phosphodiesterase III-Inhibitor oder einem Serin-Protease-Inhibitor) die durch Hypothermie induzierte, potentiell pathogene Thrombozytenaggregation und -aktivierung inhibieren bzw. minimieren lassen. Mit einem entsprechenden Thrombozyteninhibitor könnten im Rahmen herzchirurgischer Eingriffe postoperative Komplikationen, wie thrombembolische Ereignisse, systemische Entzündungsreaktionen und neurologische Komplikationen, reduziert werden. Des Weiteren werden folgende Aspekte als weitere Studienziele mituntersucht:

- Untersuchung der Thrombozytenfunktion unter den in-vitro Bedingungen des DHCA inklusive der Berücksichtigung der pharmakologischen Inhibition
- Effekte der extrakorporalen Zirkulation auf die Thrombozytenfunktion
- Vergleich der GP IIb/IIIa-Inhibitoren Tirofiban und Eptifibatide auf die thrombozytäre P-Selektin-Expression und auf die Interaktion von Thrombo- und Leukozyten
- Vergleich der GP IIb/IIIa-Inhibitoren mit anderen Thrombozyteninhibitoren

## 2. Material und Methodik

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Geräte

##### **FACScan**

Fluorescence Activated Cell Scan, Durchflußzytometer (Becton Dickinson, Heidelberg).

Der Anwendungsbereich des Durchflußzytometers beinhaltet vor allem zwei große Bereiche: Zum einen wird es in der Routinediagnostik eingesetzt, die u.a. zur Differenzierung von Leukozyten bei der Lymphomdiagnostik, HIV-Diagnostik oder anderer Tumordiagnostik dient (Ruiz-Arguelles A 1992; McCoy JP Jr. 2002).

Zum anderen wird die Durchflußzytometrie auch in der Grundlagenforschung eingesetzt. Hier besteht die gebräuchlichste Anwendung darin, mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Antikörper und anderer Reagenzien bestimmte Eigenschaften von Zellen oder Zellpopulationen, wie z.B. die Expression von Oberflächen- bzw. intrazellulären Molekülen, auf Einzelzellebene zu analysieren. So lassen sich u.a. auch mit Hilfe von RNA/DNA-Farbstoffen Zellzyklus-Analysen und Apoptoseassays durchführen. Ebenso lassen sich durch den Einsatz von Farbstoffen, die direkt von den Zellen produziert werden, wie z.B. GFB (Green Fluorescent Protein), Transkriptionen eines Gens in der lebenden Zelle nachweisen.

Prinzipiell misst das Durchflußzytometer Signale einzelner Partikel, die nachdem sie von einem Laserlicht getroffen sind, ausgestrahlt werden. Die vereinzelt Partikel oder Zellen kreuzen in einem dünnen Flüssigkeitsstrahl (hydrodynamische Fokussierung) den monochromatischen Laserstrahl. Photomultiplikatoren (PMT = Photonen Multiplier Tube) messen die Streuung des Laserlichts und verstärken diese. Je nach Modell des FACScan werden pro Zelle oder Event bis zu fünf verschiedenen Signale erfasst. Zwei davon beschreiben die Morphologie der Zelle. Der FACScan arbeitet mit einem

Argonionen-Laser (Wellenlängen-Spektrum: 488nm, dieses entspricht dem Absorptionsmaximum der unten genannten Fluoreszenzfarbstoffe) an dem jede einzelne Zelle vorbeigeführt wird (Wilkerson MJ 1992).

Entlang der Achse des Laserstrahls wird das Licht durch eine Linse aufgefangen und in einer Photodiode in elektrischen Strom umgewandelt. Dieses Signal entspricht dem Vorwärtsstreulicht (FSC, forward scatter) welches proportional zur Größe ist. Das im Winkel von 90° zur Achse des Laserstrahls reflektierte Licht wird durch mehrere Brewsterspiegel, die das Licht zum Teil durchlassen und zum Teil reflektieren, aufgeteilt. Dieses Signal entspricht dem Seitwärtsstreulicht (SSC, side scatter), welches proportional zur Komplexität (Oberflächenbeschaffenheit, Granularität, Plasma/Kern-Verhältnis) einer Zelle ist. Auf diese Weise lassen sich große Zellen mit großer Plasma/Kern-Relation und granuliertem Zytoplasma (z.B. Granulozyten) von kleinen Zellen mit hohem Kernanteil (z.B. Lymphozyten) gut abgrenzen. Das von den Zellen reflektierte Licht wird durch Farbfilter zur PMT geleitet und in einen elektrischen Impuls umgewandelt. Dadurch können selektiv bestimmte Wellenlängenbereiche gemessen werden, welche von den angeregten Fluoreszenz-Molekülen, auf oder in der Zelle, ausgesandt werden. Um diese Fluoreszenz-Moleküle detektieren zu können besitzt das FACScan Durchflusszytometer neben den beiden Detektoren FSC und SSC noch drei weitere Detektoren (FL1 / FL2 / FL3), die Emissionen verschiedener Fluorochrome erkennen können. Verwendet man verschiedene Fluorochrome zur Markierung von Zellen, sollten sie so gewählt werden, dass sie von der Wellenlänge des Argon-Lasers (Wellenlänge = 488nm) angeregt werden, aber in unterschiedlicher Wellenlänge das Licht emittieren. Somit können die Signale von den Detektoren unterschieden werden.

In dieser Arbeit wird die FACS-Analyse zur funktionellen Beurteilung von Adhäsionsmolekülen und zur Differenzierung von Thrombozyten (Ginsberg MH 1990; Michelson AD 1996) sowie von Thrombozyten und Leukozyten enthaltenden Aggregaten angewandt. Dafür werden Fluoreszenzfarbstoffgekoppelte Antikörper verwendet. Beispiele verschiedener Fluoreszenzmessbereiche des FACScan sind in der Tabelle 1 aufgelistet.

*Tab 1: Auswahl von Absorptions- und Emissionsmaxima von häufig in der Durchflußzytometrie eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffen*

	<b>Spektralbereich des Filters</b>	<b>Farbe</b>	<b>Fluoreszenzmolekül</b>
<b>FL1</b>	515-545nm	grün	FITC (Fluoresceinisothiocyanat)
<b>FL2</b>	620-666nm	orange	PE (Phycoerythrine)

Nach der jeweiligen Messung werden die Daten auf dem am FACScan angeschlossenen Computer (Macintosh Typ: PowerMac G4) gespeichert. Im Rahmen der Messung und Auswertung werden elektronische Filter eingesetzt, um verschiedene Zellpopulationen einzugrenzen. Diesen Vorgang nennt man auch „Diskriminierung“ oder „Gating“.

Zur Darstellung der erhobenen Daten werden im Wesentlichen zwei Verfahren eingesetzt:

### **1.) Dotplot:**

Diese Darstellungsmethode eignet sich gut zur Präsentation des FSC und SSC. Hierbei können einzelne Zellgruppen an Hand ihrer Zellgröße und/oder ihres Plasma-/Kern-Verhältnisses voneinander abgegrenzt werden. Eine Zelle entspricht bei dieser Darstellung einem Punkt.

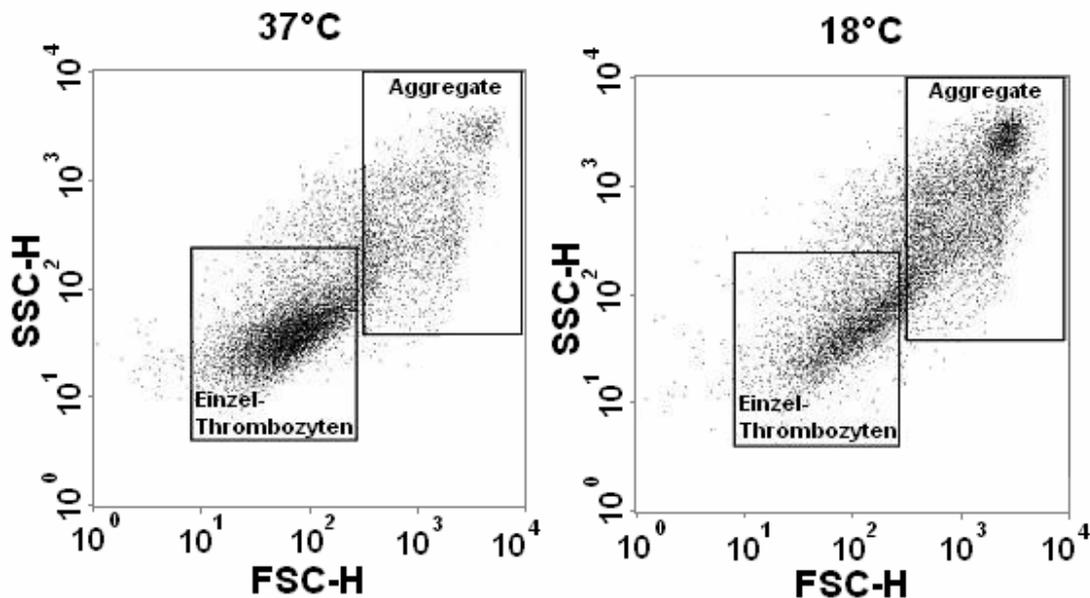


Abb.1: Zwei DotPlots einer FACS-Analyse bei den Temperaturen 37°C und 18°C: Region 1 = Einzel-Thrombozyten; Region 2 = Aggregate aus Thrombozyten und Leukozyten; zu sehen ist eine Zunahme der Aggregatpopulation bei Hypothermie.

## 2.) Histogramme:

Im Histogramm wird die Häufigkeitsverteilung der Zellen in einer Probe wiedergegeben. Auf der Y-Achse findet man die Häufigkeit, welche von der Zahl der gemessenen Zellen abhängt und somit relativ ist. Auf der X-Achse sind die einzelnen Kanäle, also die relative Fluoreszenz, FSC oder SSC aufgetragen. Des Weiteren kann der Prozentsatz der Zellen bestimmt werden, die einen festgelegten Wert übersteigt. Hierzu wird an der Schnittstelle zwischen Negativ- und Positivkontrolle ein Marker gesetzt.

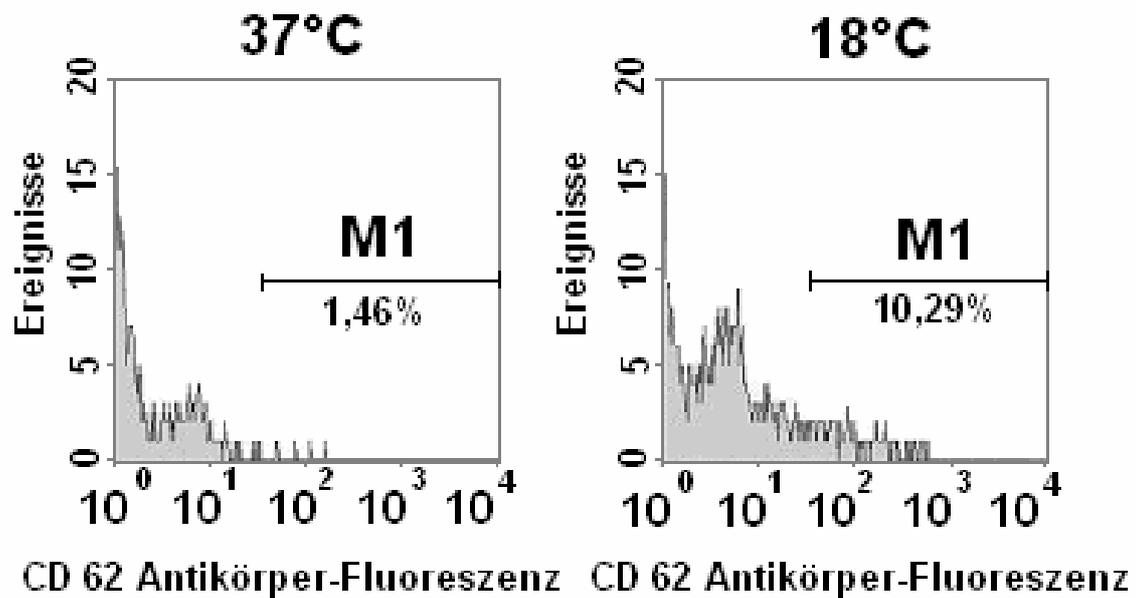


Abb.2: Beispielhistogramm zur Verdeutlichung der kälteinduzierten Thrombozytenaktivierung. Prozentzahl unter dem Marker M1 bei 37°C = 1,46 % vs. Prozentzahl unter dem Marker M1 bei 18 °C = 10,29 %

Vor jeder Messung müssen die Geräteeinstellungen festgesetzt werden. Die günstigsten Einstellungen werden vor jeder Versuchsreihe durch Probemessungen mit Positiv- und Negativkontrollen für jede Zellart und für jeden verwendeten Antikörper bzw. Fluoreszenzfarbstoff ermittelt.

Dies sind:

- **Threshold (Schwellenwert)**: Der Threshold ist der Schwellenwert, mit dessen Hilfe man Zelltrümmer und Verunreinigungen in der Probe ausblendet, die dadurch nicht gemessen werden. Hierbei orientiert man sich beispielsweise am FSC-Wert, der wie schon erwähnt ein Maß für die Zellgröße ist. Kleinere Objekte als beispielsweise Thrombozyten werden so von der Zählung ausgeschlossen.

- **Detectors (Detektoren)**: Die Detektoren wandeln das Lichtsignal des Lasers in ein elektronisches Signal um und verstärken es zusätzlich über den Amplifier.
- **Amplifier (Verstärker)**: Man kann zwischen linearer und logarithmischer Verstärkung wählen: Die logarithmische Verstärkung eignet sich besonders für die Messung eher schwacher Impulse und ist somit gut für Fluoreszenz-Messungen bei der FSC- und SSC- Erfassung von kleinen Zellen wie Thrombozyten geeignet.

**Kompensation**: Bei dem Einsatz von zwei Fluoreszenzfarbstoffen mit überlappenden Wellenlängenspektren können sich die Fluoreszenzen gegenseitig verstärken und zu falsch positiven Ergebnissen führen. Das bedeutet, dass ein Fluoreszenzfarbstoff, wenn auch in geringer Intensität, Licht innerhalb des Emissionsspektrums des anderen aussendet. Um einen dadurch möglichen Messfehler zu verhindern, wird jeweils ein in Probemessungen ermittelter Anteil der einen Fluoreszenz von der anderen Fluoreszenz elektronisch subtrahiert.

**Gating**: Es ist sinnvoll vor der Messung den Messbereich einzuschränken. Dadurch misst man nur die Eigenschaften einer bestimmten Zellpopulation. Dies ist durch Setzen eines Gates, welches beispielsweise eine Fläche im Dotplot sein kann, möglich. Die Messdaten einer Zelle werden nur dann gespeichert und der weiteren Auswertung zugänglich, wenn diese eine bestimmte Größe und Granularität aufweist und somit in das Gate fällt.

Die Auswertung der Fluoreszenz-Histogramme erfolgt mit der CellQuestPro - Software (Version 4.0.2) (Becton Dickinson, Heidelberg).

Das Durchflußzytometer wird im Rahmen der Messungen dieser Arbeit wöchentlich, entsprechend der Herstellervorschrift, mit Eichpartikeln (Cali Brite beads, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) geeicht.

### **PTR (=Probentemperaturgerät)**

Das PTR-Gerät, enthält zehn Stahl-Blöcke, die jeweils acht Steckplätze für Eppendorf-Küvetten enthalten. Jeder Stahlblock ist in seiner Temperatur regulierbar. In dieser Arbeit werden die Proben mit fixen Temperaturen von 18°C und 37°C inkubiert. (Das PTR-Gerät wurde in der Sektion für Medizinische Werkstoffkunde & Technologie des Zentrums für Zahn- Mund- und Kieferheilkunde der Uni-Klinik Tübingen konstruiert und hergestellt.)



*Foto.1: PTR-Gerät: Jeder einzelne Stahlblock konnte separat von den anderen gekühlt und beheizt werden.*

### **Chandler-Loop-Modell**

Der „Chandler-Loop“ ist ein in-vitro-Modell, welches zur Simulation einer extrakorporalen Zirkulation dient. Der Aufbau des Modells besteht aus einem Wasserbad, dessen Temperatur eingestellt werden kann, und einer Walze. In diesem Modell wird heparinisiertes Humanblut gesunder Probanden in einem zum Kreis geschlossenen Schlauchstück (Loop), bei zuvor eingestellter Temperatur (in dieser Studie: 18°C, 28°C und 37°C) und definierter Drehzahl zirkuliert. Dabei wird das Schlauchstück mit Schlauchmanschetten End zu End nahtlos verschlossen (Innenoberfläche: 150 cm<sup>2</sup>), Die Temperaturen werden konstant gehalten, indem eine Pumpe das Wasser fortlaufend über ein Thermostat und einen Erhitzer hinweg austauscht. Um einen optimalen Wärmeaustausch gewährleisten zu können, wird der Loop so auf der sich

drehenden Walze befestigt, dass er sich zu 80% unter Wasser befindet. Als Schlauchmaterial wird medical grade PVC verwendet (Schlauchdurchmesser: 3/8 Zoll, Wandstärke 3/32 Zoll, Länge 50 cm). Jeder Schlauch wird mit 20 ml heparinisiertem Vollblut gefüllt. Die Rotationsgeschwindigkeit wird dem normalen Blutstrom im arteriellen Schenkel der HLM angepasst. Für einen „Lauf“ werden die Schläuche für 30 Minuten der Rotation unterworfen. Durch die rotierende Walze wird das Schlauchmaterial um das im Schlauch befindliche Blut bewegt. Auf diese Weise wird die Strömung von Blut in der EKZ simuliert.

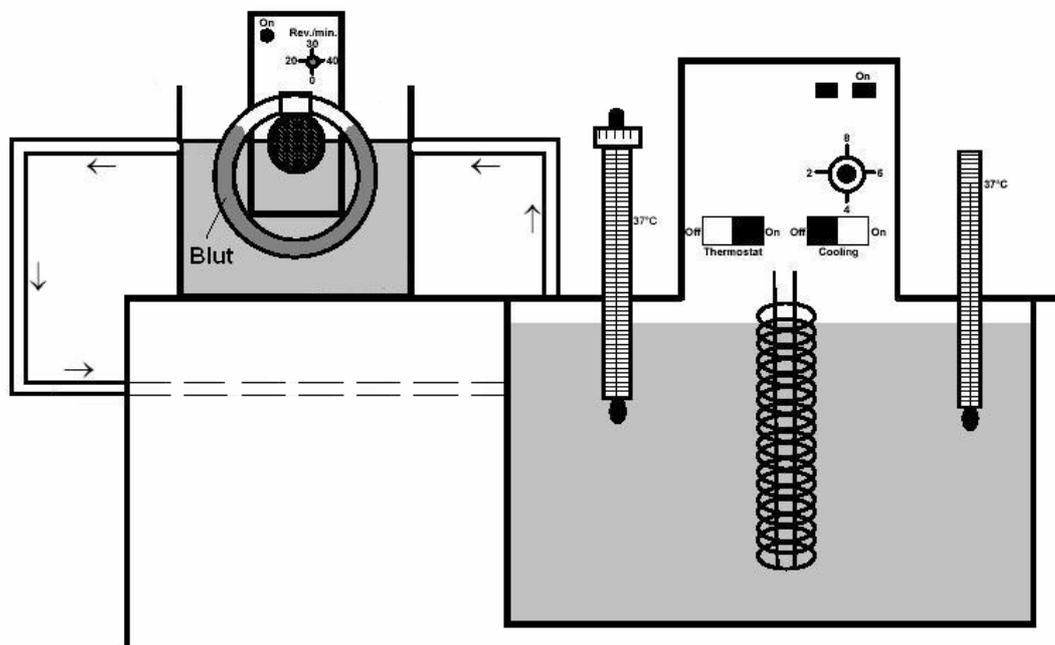


Abb.3: Tübinger-Loop Modell: Modifizierter Chandler-Loop zur Simulation der extrakorporalen Zirkulation bei verschiedenen Temperaturen.

### Vollblut-/Thrombozytenzählung

Sysmex K-1000 (Sysmex GmbH, Norderstedt, Deutschland)

Das Sysmex K-1000 besteht aus einem hydraulischen, elektronischen und pneumatischen System.

Das hydraulische System dient dem Ansaugen, Pipettieren, Verdünnen, Mischen und Lysieren. Die Analyse und Berechnung der Messsignale des hydraulischen Systems, sowie die Kontrolle der Ergebnisse wird vom

elektronischen System übernommen. Das pneumatische System ist verantwortlich für die Erzeugung von konstantem Druck und Vakuum für die Steuerung der Ventile und den Ablauf der Probenmessung im hydraulischen System.

Die Zellzählung erfolgt nach dem elektrischen Widerstandsprinzip. Zu der Zählung der Blutzellen wird die unterschiedliche elektrische Leitfähigkeit von Blut und Verdünnungslösung herangezogen.

Ein Teil der verdünnten Probe wird durch eine Messöffnung gesaugt, durch die ein konstanter Gleichstrom fließt. Beim Durchtritt einer Blutzelle durch diese Öffnung verdrängt sie eine ihrem Volumen entsprechende Menge an Verdünnungslösung und erzeugt so eine Widerstandsänderung. Diese ist proportional zu der daraufhin eintretenden Spannungsänderung. Das Volumen der Zelle ist zu der von ihr erzeugten Widerstandsänderung und somit zu der Spannungsänderung proportional. Die Spannungsänderung wird verstärkt und zur Beseitigung von Störimpulsen an einen Diskriminatorkreis übertragen.

## **Zentrifugen**

- Varifuge 3.2RS (Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland)
- Varifuge RF Inert (Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland)

### **2.1.2 Fluoreszenzfarbstoffe (Fluorochrome)**

Bei der Absorption von Licht einer bestimmten Wellenlänge (entspricht dem Anregungslicht) ist bei verschiedenen Molekülen eine gleichzeitige Emission von Licht mit größerer Wellenlänge beobachtbar. Dieses Verhalten, Absorption von kurzwelligem Licht, sowie Emission von längerwelligem Licht, wird als Fluoreszenz bezeichnet.

In der vorliegenden Arbeit wird mit zwei Fluorchromen gearbeitet:

- **FITC**

ist die Kurzform für Fluoresceinisothiocyanat. Es wird bei einer Wellenlänge von 492nm maximal angeregt, somit liegt sein Absorptionsmaximum nahe der Wellenlänge des Argonlasers (488nm) des FACScan. Das Emissionsmaximum dieses Farbstoffes liegt bei 520nm.

- **PE**

ist die Kurzform für Phycoerythrin. Es hat drei Absorptionsmaxima, nämlich bei 480, 546 und 565 nm und kann mit dem Argonlaser bei 488 nm sehr gut angeregt werden. Das Emissionsspektrum von R-PE hat sein Maximum bei 578 nm. Das „R“ von R-PE spiegelt dabei die Herkunft des Farbstoffes wieder, da es ein proteingebundenes rotes Pigment der Rotalge ist. Äquivalent zum R-PE der Rotalge gibt es auch ein B-PE aus der Blaualge, welches hier als Protein an blaues Pigment gebunden ist.

### 2.1.3 Antikörper

**Anti CD 41 - FITC (SZ22)** (Beckman-Coulter/ Immunotech, Hamburg, Deutschland)

FITC-gekoppelter Antikörper zur Thrombozyten (GP IIb) - Markierung; Dieser Antikörper bindet unabhängig davon, ob der GP IIb/IIIa-Rezeptor in einer aktivierten oder nicht aktivierten Konformation vorliegt. Seine Bindung wird durch GP IIb/IIIa-Blocker nicht inhibiert.

**Anti CD 62 - PE** (Becton Dickinson, Heidelberg)

PE-gekoppelter Antikörper zur Detektion des Aktivierungszustandes von Thrombozyten (über P-Selektin). Das Glykoprotein P-Selektin wird u.a. auf aktivierten Thrombozyten exprimiert, sofern eine Degranulation der thrombozytären  $\alpha$ -Granula stattgefunden hat. Dieses Molekül ist entscheidend für die Bindung der Thrombozyten an Leukozyten.

**Anti CD 14 - PE** (Becton Dickinson, Heidelberg)

PE-gekoppelter Antikörper zur Detektion des Monozytenmarkers CD 14.

**Anti CD 15** (Beckman-Coulter/ Immunotech, Hamburg)

PE-gekoppelter Antikörper zur Detektion des Granulozytenmarkers CD 15

**PAC-1 – FITC** (Becton Dickinson, Heidelberg)

FITC-gekoppelter Antikörper, welcher nur an aktivierte GP IIb/IIIa-Komplexe bindet.

#### 2.1.4 Puffer

##### **Modifizierter Tyrode-Puffer**

Zusammensetzung der Pufferlösung (pH 7,4): 150 mM NaCl (Roth, Karlsruhe), 2,5 mM KCl (Roth, Karlsruhe), 12 mM NaHCO<sub>3</sub> (Sigma, Deisenhofen), 2mM MgCl<sub>2</sub>, (Merck, Darmstadt, Deutschland), 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mg/ml BSA, 1 mg/ml Dextrose (Serva / Boehringer Ingelheim Bioproducts Partnership, Heidelberg). Die Pufferlösung wurde vor den jeweiligen Versuchsreihen frisch zubereitet.

##### **Modifizierter PBS-Puffer** (Gibco, Eggenstein)

Phosphate buffered saline, Zusammensetzung der Pufferlösung (pH 7,4): 138mM NaCl, 2,68 mM KCl, 7,3mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>

#### 2.1.5 Chemikalien/Medikamente

##### **ADP** (Mölab, Hilden)

Adenosindiphosphat, Thrombozytenagonist

##### **BSA** (Calbiochem, La Jolla, USA)

Bovine Serum Albumine, Rinder Albumin, Fraktion V

##### **Cellfix**<sup>®</sup> (Becton-Dickinson)

Vorgefertigte, Paraformaldehyd und Puffer (pH 7,4) enthaltende Lösung zur Fixation von Zellsuspensionen vor der FACS-Analyse

##### **NaOH** (Merck, Darmstadt)

Natronlauge,

##### **Heparin** (Braun, Melsungen)

##### **NaCl-Lösung** (0,9%ig) (Braun Melsungen AG, Melsungen)

##### **Ampuwa** (Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg)

Destilliertes Wasser

##### **Tirofiban** (Aggrastat<sup>®</sup>), GP IIb/IIIa-Rezeptor-Blocker (MSD SHARP & DOHME GMBH, Haar)

##### **Eptifibatide** (Integrilin<sup>®</sup>) GP IIb/IIIa-Rezeptor-Blocker (Essex-Pharma, München)

##### **Milrinon** (Corotrop<sup>®</sup>), Phosphodiesterase III-Inhibitor, (Sanofi Winthrop Industrie, Ambares, Frankreich)

**Dipyridamol**

Adenosine-reuptake Inhibitor (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

**Aprotinin (Trasylol®)**

Serin-Protease-Inhibitor (Bayer Vital GmbH, Leverkusen)

**2.1.6 Sonstiges****Eich-„Beads“**

Spezielle Moleküle mit einer Größe von 3 µm, die dazu dienen die DotPlot-Regionen des FACScan-Gerätes zu eichen. Dadurch wird eine Differenzierung zwischen Einzel-Thrombozyten (zu sehen unter Punkt 2.1.1; Abbildung 1, Region 1) und den Thrombozyten-Aggregaten (Punkt 2.1.1; Abbildung 1, Region 2) anhand ihrer Größe ermöglicht. (Polysciences, Eppelheim, Deutschland)

**Schlauchmaterial**

PVC-Schlauch, unsteril, medical grade 3/8“ Durchmesser x 3/32“ Wandstärke (Jostra, Hirrlingen)

**Pipettiergeräte/-Spitzen**

Es wurden Pipettiergeräte mit einem Pipettiervermögen von 1µl-10µl, 10-100µl und 100µl – 1000µl verwendet. (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)

**Monovetten**

Blutentnahme-Behälter (4,5 ml bzw. 9 ml) (Sarstedt, Numbrecht, Deutschland) mit Heparin als Antikoagulanzen (3 I.E. pro ml)

Blutentnahme-Behälter (2,7 ml) mit EDTA als Antikoagulanzen

Blutentnahme-Behälter (4,5 ml bzw. 9 ml) mit Natrium-Citrat als Antikoagulanzen

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Blutentnahme und Probandenauswahl

Da Thrombozyten durch eine fehlerhaft durchgeführte Blutentnahme aktiviert werden können, was zu einer Verfälschung der Messergebnisse führen kann, werden die Blutentnahmen so schonend wie möglich durchgeführt:

- Punktion einer gestauten Vene mit einer 21 Gauge Butterfly-Nadel.
- Lösen des Staus und Abnehmen von 3 ml Blut, welche verworfen werden.
- Abnahme von Blut in den entsprechenden Blutentnahme-Behälter.

Darüber hinaus wird längeres Stehen lassen des Blutes und Schütteln, welches die Thrombozyten ebenfalls aktiviert, vermieden.

Zur Durchführung der nachfolgend genannten Untersuchungen werden gesunden männlichen Probanden unter Vermeidung von Thrombozytenaktivierung Vollblut in mit Heparin (3 I.E./ml) versetzten Monovetten (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) entnommen.

Ausschlusskriterien zur Studienteilnahme waren:

- Raucher
- Einnahme von Medikamenten 14 Tage vor der Blutspende, insbesondere Hämostase-beeinflussende Pharmaka wie Acetylsalicylsäure (Aspirin)
- Nichtsteroidale Antiphlogistika

Das Einverständnis zur Blutentnahme und zur Untersuchung der beschriebenen Parameter wird von jedem Probanden schriftlich eingeholt. Die Durchführung der Studie sowie die Durchführung der Blutentnahmen ist vor Beginn der Studie von der Ethikkommission der Universitätsklinik Tübingen genehmigt worden (Ethik-Antrags-Nr.: 193/2002V).

### 2.2.2 Untersuchungen bei Stase zur Simulierung des DHCA

Dieser Abschnitt der Studie umfasst eine Versuchsanordnung mit heparinisiertem Vollblut (3 I.E./ml) zehn freiwilliger Probanden, welches nach Inkubation bei 37°C bzw. 18°C in Stase untersucht wird. Um eine mögliche

pharmakologische Inhibierung der kälteinduzierten Thrombozytenaggregation zu evaluieren, werden Medikamente mit verschiedenen Wirkmechanismen *in vitro* untersucht. Jeweils einer Monovette wird Tirofiban (Endkonzentration 150 ng/ml), Eptifibatide (Endkonzentration 2,5 µg/ml) oder physiologische NaCl-Lösung in gleichen Volumina (jeweils 20 µl) zugefügt. Anschließend werden die Proben durchflusszytometrisch untersucht.

Protokoll zur durchflusszytometrischen Analyse der Thrombozytenfunktion sowie von Thrombozyten-Leukozyten-Konjugaten:

**2.2.2.1 Inkubationsprotokoll 1**

- Je sechs Proben (50µl) aus jeder der Monovetten werden bei den Zieltemperaturen 37°C und 18°C im Proben temperaturgerät (kurz: PTR) inkubiert.
- Alle Proben wurden mit je 5 µl des Detektions-Antikörpers Anti-CD41-FITC versetzt. Aus den sechs Proben werden jeweils zwei Proben als Paare mit 5 µl weiterer Antikörpern inkubiert: Das erste Paar mit Anti-CD62, das zweite Paar mit Anti-CD14 und das dritte Paar mit Anti-CD15.
- Zur Thrombozytenstimulation wird je einer Probe eines Paares 10 µl ADP (Endkonzentration = 10 µM) zugegeben. Die verbleibenden Proben dienen als Kontrolle und werden mit 10 µl PBS-Puffer versetzt.
- Nach 30 min Inkubation werden die Proben mit Cell-Fix fixiert.
- Lagerung der Proben im Kühlschrank bis zur durchflußzytometrischen Analyse.

**2.2.2.2 Inkubationsprotokoll 2**

- Es werden dieselben Gruppen wie in 2.2.2.1 gebildet, wobei der im Folgenden beschriebenen Puffer-Vollblut-Lösung die Inhibitoren in derselben Konzentration wie im Vollblut zugegeben werden.
- Zu 20µl Vollblut wird 980µl Tyrode Puffer hinzugefügt

- Aus jeder der 4 Medikamentengruppen werden bei 18°C und 37°C jeweils zwei Proben (50µl) als Paare mit 10µl PAC1-Antikörper bei der entsprechenden Temperatur im PTR inkubiert.
- Zur Stimulation werden 10µl ADP (Endkonzentration = 10 µM) zugefügt, den unstimulierten Kontrollen zum Ausgleich je 10µl PBS-Puffer.
- Nach 30 min Inkubation werden die Proben jeweils mit 0,5ml Cell-Fix fixiert
- Lagerung der Proben im Kühlschrank bis zur durchflußzytometrischen Analyse.

In Vorversuchen wurde gezeigt, dass die CD41-Antikörperbindung an Thrombozyten nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C im Vergleich zu 18°C nahezu identisch ist. Eine signifikante Beeinflussung der Antikörperbindung durch die Inkubationstemperatur wird deshalb ausgeschlossen.

### **2.2.3 Untersuchungen und Versuchsprotokoll zur Simulation normothermer und hypothermer extrakorporaler Zirkulation (Chandler-Loop)**

In diesem Abschnitt der Studie werden bei den Temperaturen 37°C, 28°C und 18°C am Vollblut sechs freiwilliger Probanden die Thrombozytenfunktion nach Zirkulation des Blutes in einem EKZ-Modell (Chandler Loop) getestet.

Pro Lauf im Chandler-Loop werden sechs Schläuche mit Vollblut zirkuliert, wobei dem Vollblut in je einem Schlauch entweder Tirofiban (150ng/ml), Eptifibatide (2,5µg/ml), Aprotinin (300KIE/ml), Dipyridamol (15µg/ml) oder Milrinon (0,7µg/ml) zugegeben wird. Nach Beendigung eines 30-minütigen Laufes werden aus den Schläuchen Vollblutproben in denselben Untersuchungsgruppen wie unter 2.2.2 beschrieben nach den Inkubationsprotokollen 1 (2.2.2.1) und Inkubationsprotokollen 2 (2.2.2.2) untersucht. Pro Temperaturstufe (37°C, 28°C und 18°C) werden jeweils sechs Chandler-Loop-Läufe durchgeführt und somit pro Temperaturstufe Blut von sechs verschiedenen Probanden untersucht. Nach Entnahme des Blutes aus dem Schlauch erfolgt die Inkubation aller Proben, unabhängig von der Temperaturstufe, bei 37°C. Darüber hinaus wird direkt vor und nach dem

Chandler-Loop-Lauf in jeder Medikamentengruppe eine Bestimmung der Thrombozytenzahl durchgeführt.

#### **2.2.4 Durchflußzytometrische Analyse**

Nachdem die Blutproben gemäß den oben genannten Protokollen inkubiert und im letzten Schritt mit CellFix fixiert sind, wird die FACS-Analyse innerhalb von 24 Stunden durchgeführt.

##### **Analyse der Proben, die nach Protokoll 2.2.2.1 inkubiert wurden:**

Die durchflußzytometrische Analyse dieser Proben erfolgt nach dem Prinzip einer von Jy et al. (Jy W 1998) beschriebenen Methode. Die Identität der Thrombozytenpopulation wird durch einen voreingestellten Schwellenwert des SZ 22 - FITC-fluorisierenden Thrombozytenmarker ermittelt. Objekte mit positiver SZ 22-Bindung werden in einem FSC/SSC Dot Plot dargestellt. Die jeweiligen Regionen in einem Dotplot (siehe „Dotplot“ unter Punkt 2.1.1) werden nach Eichung mit 3 µm großen Latex-Beads anhand ihres FSCs (Größe der jeweiligen Moleküle) in eine Einzel-Thrombozytenregion (Abbildung 1, Region 1) und in Thrombozytenaggregate (Abbildung 1, Region 2) aufgeteilt. Bei jeder einzelnen Messung werden insgesamt 10000 Objekte gezählt. Die Anzahl von Thrombozytenaggregaten wird in Proben bestimmt, welche die Antikörper-Kombination CD 41/ CD 14 enthalten. Sie werden als Prozentsatz der Aggregate in Region 2 in Bezug auf die gesamte Thrombozytenpopulation dargestellt.

Die Antikörper-Fluoreszenz wird in den Histogrammen analysiert. Der Prozentsatz von aggregat-gebundenen Thrombozyten mit positiver Anti-CD 62 Antikörper-Bindung dient als Maß für die Thrombozyten-Degranulierung (Abrams CS 1990; Jy W 1998; Gawaz M 1999a). Der Prozentsatz der Aggregate mit positiver CD 14 und CD 15- Antikörper-Bindung dient als Maß für den Gehalt von Monozyten und Granulozyten in den Aggregaten.

**Analyse der Proben, die nach Protokoll 2.2.2.2 inkubiert werden:**

Der PAC-1 Antikörper bindet an den aktivierten GP IIb/IIIa Rezeptor und erkennt die Bindungsstelle für Liganden dieses Rezeptors (Gawaz M 1999a). In der vorliegenden Arbeit werden Thrombozyten nach dem Prinzip einer z. B. von Peter et al. (Peter K 2000) beschriebenen Methode anhand ihrer typischen FSC-/SSC-Eigenschaften detektiert und die PAC-1-FITC-Fluoreszenz dieser Population erfasst. Der Prozentsatz von Thrombozyten mit positiver PAC-1 Antikörper-Bindung dient als Maß für die GP IIb/IIIa-Aktivierung.

**2.2.4.1 Geräteeinstellungen des Durchflußzytometers**

Die Geräteeinstellungen werden in Vorversuchen ermittelt und während aller Versuche beibehalten.

*Tab.2: Instrumenteneinstellung des Durchflußzytometers zur gemeinsamen Erfassung und Analyse einzelner Thrombozyten und von Thrombozytenaggregaten*

<b><u>Detectors/Amps:</u></b>				
Parameter	Detector	Voltage	Amp-Gain	Mode
P1	FSC	E00	1.00	Log
P2	SSC	260	1.00	Log
P3	FL1	500	1.00	Log
P4	FL2	480	1.00	Log
<b><u>Threshold:</u></b>		<b><u>Compensation:</u></b>		
Parameter: FL1		FL1 - 3.0% FL2		
Value: 360		FL2 - 5.0% FL1		
		FL2 - 0.0% FL3		

Tab.3: Instrumenteneinstellung für die Untersuchungen der PAC-1 Antikörper-Bindung an Thrombozyten

<b><u>Detectors/Amps:</u></b>				
Parameter	Detector	Voltage	Amp-Gain	Mode
P1	FSC	E00	1.00	Log
P2	SSC	260	1.00	Log
P3	FL1	530	1.00	Log

<b><u>Threshold:</u></b>	<b><u>Compensation:</u></b>
Parameter: FSC	FL1 - 0.0%FL2
Value: 340	FL2 - 0.0%FL1
	FL2 - 0.0%FL3

### 2.3 Statistische Auswertungen

Diese Analysen werden zusammen mit Prof. K. Dietz (Institut für Medizinische Biometrie, Universität Tübingen) mit „JMP Statistical Software“ durchgeführt. Für die Irrtumswahrscheinlichkeit wird generell ein Alpha von 5% zugrundegelegt.

#### 2.3.1 Auswertung des Effektes von Tirofiban und Eptifibatide auf Thrombozyten unter DHCA-Bedingungen

Alle Werte sind ausschließlich in Prozent angegeben und werden zur Stabilisierung ihrer Varianz einer Log odds-Transformation unterzogen. Hierbei wird ein Ausreißer nicht in die Auswertung einbezogen. Da zwei Werte als 0 Prozent gemessen worden sind, wird eine kleine Konstante von 0,01 Prozent allen Werten hinzugefügt, um die „Log odds“- Transformation für alle Werte durchführen zu können und fehlende Werte zu vermeiden. Der Wert von 0,01 Prozent entspricht hierbei dem kleinsten beobachteten Wert sämtlicher

Versuche. Mit Hilfe dieses Ansatzes werden undefinierte Werte vermieden (Bartlett MS 1947). Desweiteren wird für jede der fünf Variablen [ (1)Thrombozytenaggregation, (2) PAC1- Bindung, (3) P-Selektin-, (4) CD14- und (5) CD15- Expression in den Aggregaten] ein multifaktorielle Varianzanalyse in Kombination mit dem Tukey-Kramer-Test durchgeführt. Mit der Methode der kleinsten Quadrate werden Mittelwerte und ihre 95% Konfidenzintervalle berechnet und diese zurücktransformiert.

### **2.3.2 Chandler-Loop Teil**

Um die Varianzen zu stabilisieren wird für die Parameter, welche in Prozentwerte angegeben sind (Aggregate, P-Selektin, Thrombozyten-Granulozyten-Bindung) ebenfalls eine Transformation in Log-odds durchgeführt sowie für die Thrombozytenanzahl eine Transformation in Logarithmen. Für jeden Parameter wird eine multifaktorielle Varianzanalyse in Kombination mit dem Tukey- Kramer- Test durchgeführt. Im Weiteren werden mit der Methode der kleinsten Quadrate Mittelwerte und ihre 95% Konfidenzintervalle berechnet und diese zurücktransformiert.

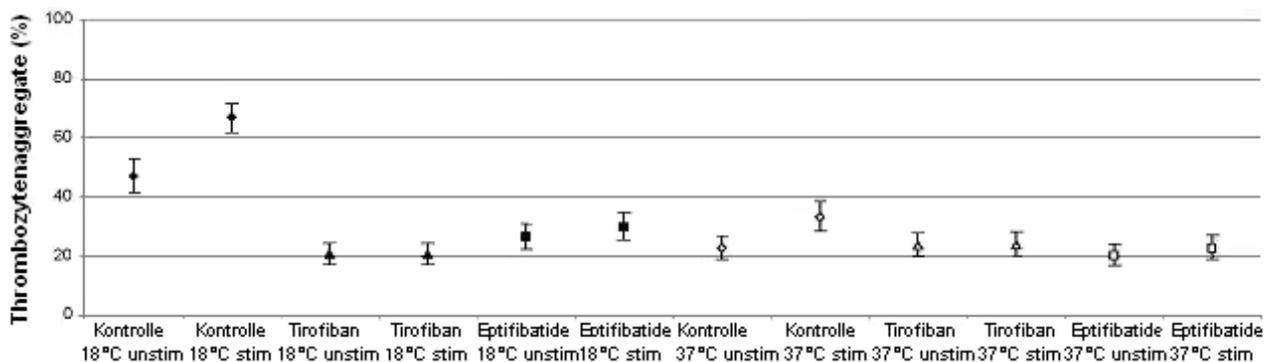
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Messungen unter den in-vitro Bedingungen des DHCA

##### 3.1.1 Thrombozytenaggregation: Hypothermie-induzierte Thrombozytenaggregation (HIPA) wird durch GP IIb/IIIa - Blockade gehemmt

Hypothermie induziert, im Vergleich zu 37°C-Proben, eine signifikante Erhöhung von Thrombozytenaggregaten in unstimulierten und ADP-stimulierten Proben.

Weiterhin wird HIPA durch die GP IIb/IIIa-Blockade mittels Tirofiban oder Eptifibatide signifikant gehemmt. In den ADP-stimulierten Proben ist der inhibierende Effekt von Tirofiban noch stärker als der Effekt von Eptifibatide. (Siehe Abbildung 4)



##### Der statistische Vergleich der Gruppen

Kontrolle-18°C-stim	A
Kontrolle-18°C-unstim	B
Kontrolle-37°C-stim	C
Eptifibatide-18°C-stim	C D
Eptifibatide-18°C-unstim	C D E
Tirofiban-37°C-stim	D E
Tirofiban-37°C-unstim	D E
Eptifibatide-37°C-stim	D E
Kontrolle-37°C-unstim	D E
Tirofiban-18°C-stim	E
Tirofiban-18°C-unstim	E
Eptifibatide-37°C-unstim	E

Abb.4: Prozentueller Anteil von Thrombozytenaggregaten innerhalb der gesamten Thrombozytenpopulation in 18°C und 37°C-Proben der Kontroll-, Tirofiban und Eptifibatide - Gruppen. Die Proben werden jeweils ohne

*(unstimuliert) und mit 10  $\mu$ M ADP (stimuliert) inkubiert. Die Ergebnisse sind in den Diagrammen als geschätzte Mittelwerte innerhalb ihrer 95%-Konfidenzintervallen eingezeichnet. Diejenigen Gruppen, die in der Liste unter dem Diagramm nicht mittels gleicher Buchstaben verbunden werden, sind signifikant verschieden ( $p < 0,05$ ). (Probandenzahl pro Gruppe:  $n = 10$ )*

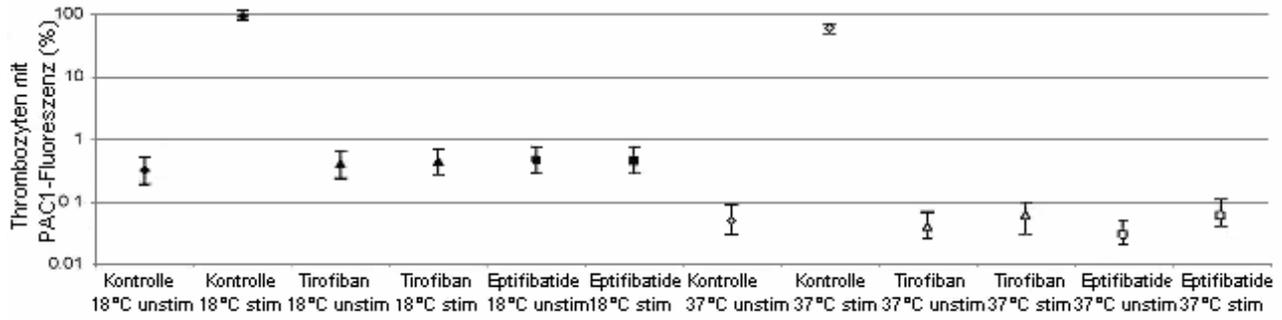
### **3.1.2 Die Hypothermie-induzierte Thrombozytenaktivierung wird durch GP IIb/IIIa- Blockade gehemmt**

Die Inkubation von Blut bei 18°C induziert eine Bindung des PAC-1 Antikörpers an aktivierte GP IIb/IIIa-Rezeptoren und verursacht gleichzeitig eine Erhöhung der thrombozytären P-Selektin-Expression. Diese Erkenntnisse verdeutlichen, dass die Hypothermie eine Thrombozytenaktivierung initiiert. Die Bindung von PAC-1 an aktivierte GP IIb/IIIa- Rezeptoren wird bei 18°C (Hypothermie) und bei 37°C durch die GP IIb/IIIa Blocker Tirofiban und Eptifibatide stark gemindert.

Die P-Selektin-Expression in den unstimulierten Proben wird bei 37°C weder durch Tirofiban noch durch Eptifibatide beeinflusst. In den stimulierten 37°C-Proben nimmt die P-Selektin-Expression unter Tirofiban und Eptifibatide ab.

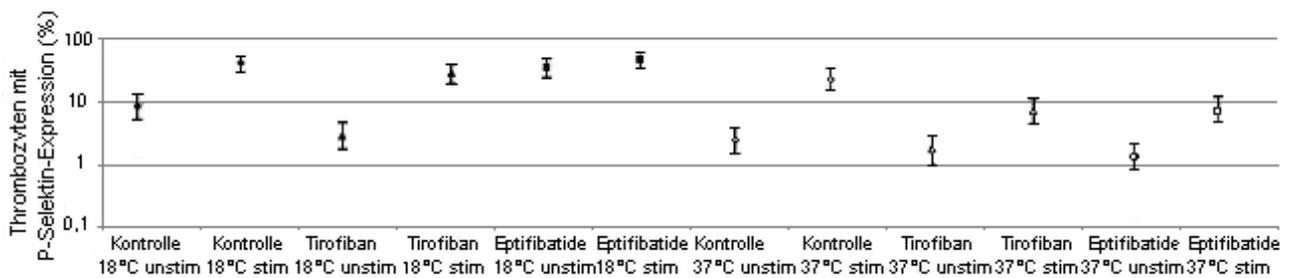
Bei Hypothermie haben Tirofiban und Eptifibatide einen gegensätzlichen Einfluss auf die P-Selektin-Expression von unstimulierten Thrombozyten: Im Vergleich zur Kontrollgruppe hemmt Tirofiban während Eptifibatide die P-Selektin-Expression erhöht.

Bei den ADP-stimulierten und bei 18°C inkubierten Proben verändert sich im Vergleich zur Kontrollgruppe die P-Selektin-Expression sowohl unter Tirofiban, als auch unter Eptifibatide kaum. (Siehe Abbildung 5 für den PAC1-Antikörper und Abbildung 6 für den Aktivierungsmarker P-Selektin)



**Der statistische Vergleich der Gruppen**

Kontrolle-18°C-stim	A
Kontrolle-37°C-stim	B
Eptifibatide-18°C-unstim	C
Eptifibatide-18°C-stim	C
Tirofiban-18°C-stim	C
Tirofiban-18°C-unstim	C
Kontrolle-18°C-unstim	C
Eptifibatide-37°C-stim	D
Tirofiban-37°C-stim	D
Kontrolle-37°C-unstim	D
Tirofiban-37°C-unstim	D
Eptifibatide-37°C-unstim	D



**Der statistische Vergleich der Gruppen**

Kontrolle-18°C-stim	A
Eptifibatide-18°C-stim	A
Eptifibatide-18°C-unstim	A B
Tirofiban-18°C-stim	A B
Kontrolle-37°C-stim	B
Kontrolle-18°C-unstim	C
Eptifibatide-37°C-stim	C
Tirofiban-37°C-stim	C
Tirofiban-18°C-unstim	D
Kontrolle-37°C-unstim	D
Tirofiban-37°C-unstim	D
Eptifibatide-37°C-unstim	D

Abb. 5 (oben) und Abb. 6 (unten): Prozentueller Anteil der Thrombozyten, die eine Fluoreszenz des PAC1-Antikörpers (Abb.5) und des P-Selektin-Antikörpers (Abb.6) unter dem Marker M1 (siehe Punkt 2.1.1 Methoden) in den

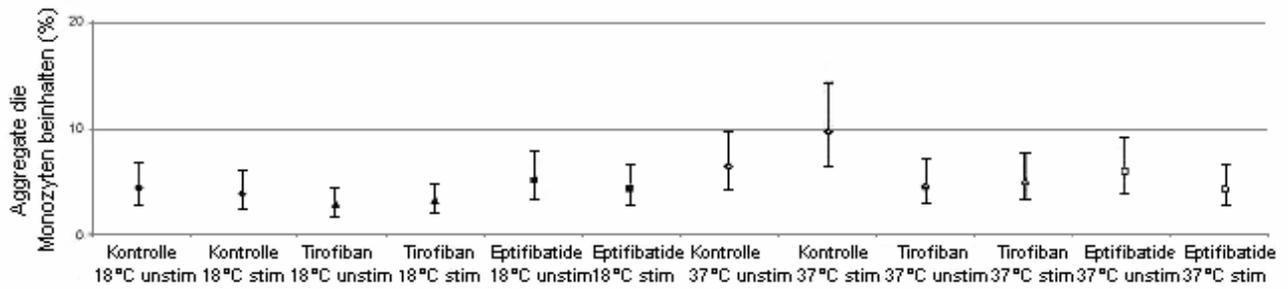
*18°C und 37°C-Proben der Kontroll-, Tirofiban und Eptifibatide - Gruppen aufweisen. Die Ergebnisse sind in den Diagrammen als geschätzte Mittelwerte mit den jeweiligen 95%-Konfidenzintervallen dargestellt. Diejenigen Gruppen, die in der Liste nicht mit den gleichen Buchstaben verbunden sind, sind signifikant verschieden ( $p < 0,05$ ); (Probandenzahl pro Gruppe:  $n = 10$ ).*

### **3.1.3 Die Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion: Eptifibatide steigert die Thrombozyten-Granulozyten-Bindung bei Hypothermie**

In allen Proben sind Thrombozyten-Leukozyten Aggregate vorhanden. Hypothermie vermindert den Monozytengehalt der Aggregate in ADP-stimulierten Kontroll-Proben.

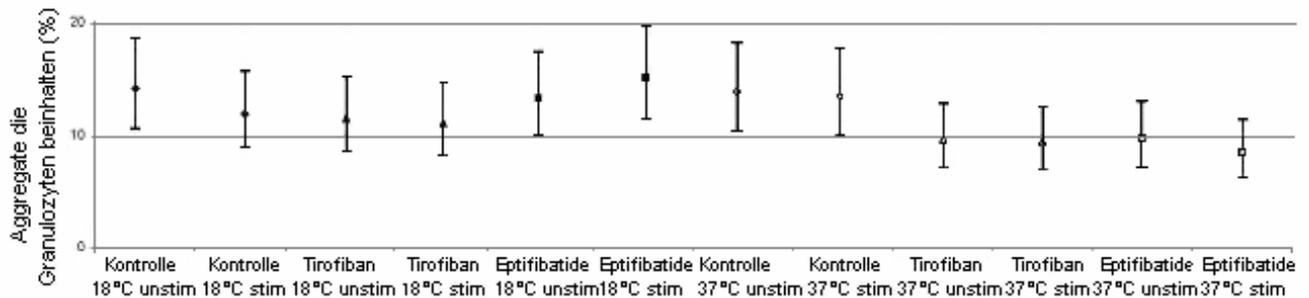
Darüber hinaus zeigt sich in den ADP-stimulierten und mit Eptifibatide inkubierten Proben eine Verminderung des Monozytengehaltes bei Normothermie.

Wenn man die ADP-stimulierten und mit Eptifibatide versetzten Proben bei Hypothermie mit denen bei Normothermie vergleicht, erkennt man, dass der Granulozytengehalt bei Hypothermie signifikant höher ist (siehe Abbildung 7 für Monozyten und Abbildung 8 für Granulozyten).



**Der statistische Vergleich der Gruppen**

Kontrolle-37°C-stim	A
Kontrolle-37°C-unstim	A B
Eptifibatide-37°C-unstim	A B
Eptifibatide-18°C-unstim	A B
Tirofiban-37°C-stim	A B
Tirofiban-37°C-unstim	B
Kontrolle-18°C-unstim	B
Eptifibatide-18°C-stim	B
Eptifibatide-37°C-stim	B
Kontrolle-18°C-stim	B
Tirofiban-18°C-unstim	B
Tirofiban-18°C-stim	B



**Der statistische Vergleich der Gruppen**

Eptifibatide-18°C-stim	A
Kontrolle-18°C-unstim	A B
Kontrolle-37°C-unstim	A B
Kontrolle-37°C-stim	A B C
Eptifibatide-18°C-unstim	A B C
Kontrolle-18°C-stim	A B C
Tirofiban-18°C-unstim	A B C
Tirofiban-18°C-stim	A B C
Eptifibatide-37°C-unstim	A B C
Tirofiban-37°C-unstim	A B C
Tirofiban-37°C-stim	B C
Eptifibatide-37°C-stim	C

Abb. 7 (oben) und Abb. 8 (unten): Prozentueller Anteil der Thrombozyten, die eine Fluoreszenz des Monozyten-Antikörpers (Abb. 7) und Granulozyten-Antikörpers (Abb. 8) in den 18°C und 37°C-Proben der Kontroll-, Tirofiban und Eptifibatide-Gruppen aufweisen. Die Ergebnisse sind in den Diagrammen als

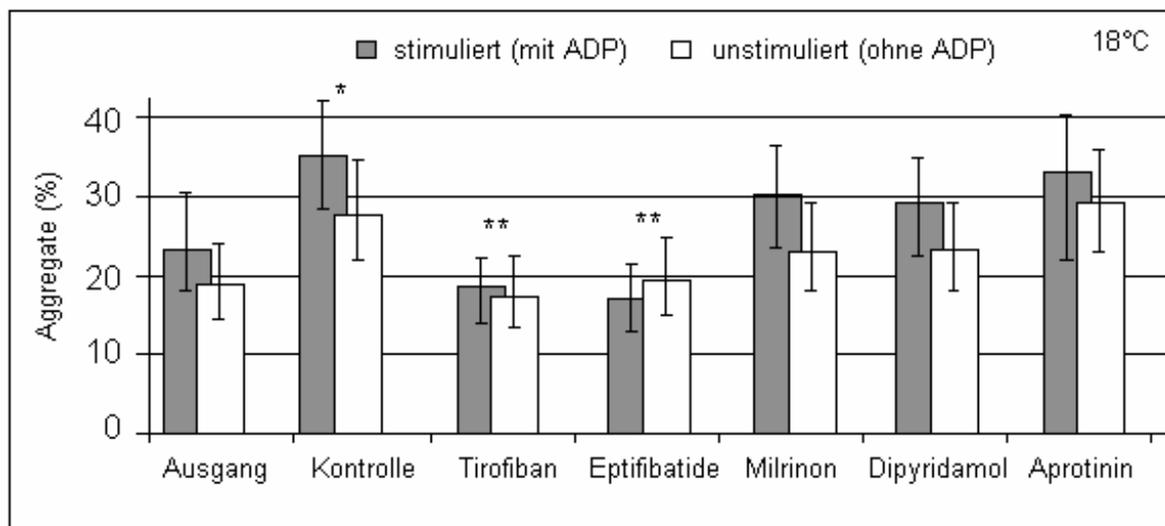
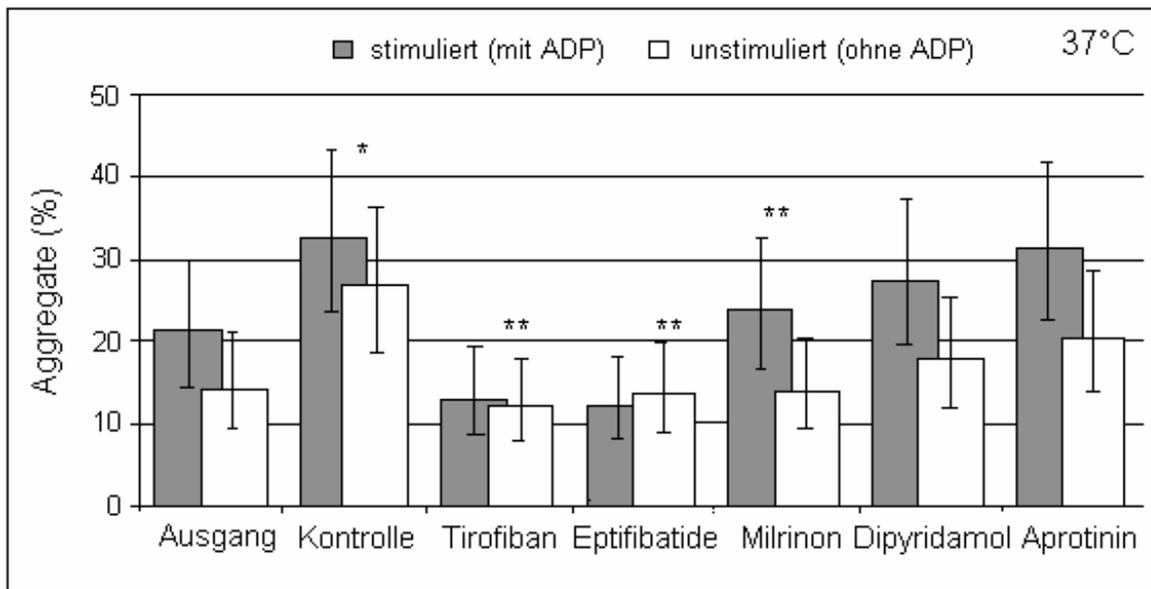
*Mittelwerte mit den jeweiligen 95%-Konfidenzintervallen eingezeichnet. Diejenigen Gruppen, die in der Liste nicht mit den gleichen Buchstaben verbunden sind, sind signifikant verschieden ( $p < 0,05$ ); (Probengröße in jeder Gruppe  $n = 10$ )*

## **3.2 Messungen unter den in-vitro Bedingungen der extrakorporalen Zirkulation**

### **3.2.1 Die Simulation der extrakorporalen Zirkulation (EKZ) bei Normothermie und Hypothermie im Chandler-Loop**

#### **3.2.1.1 Thrombozytenaggregation**

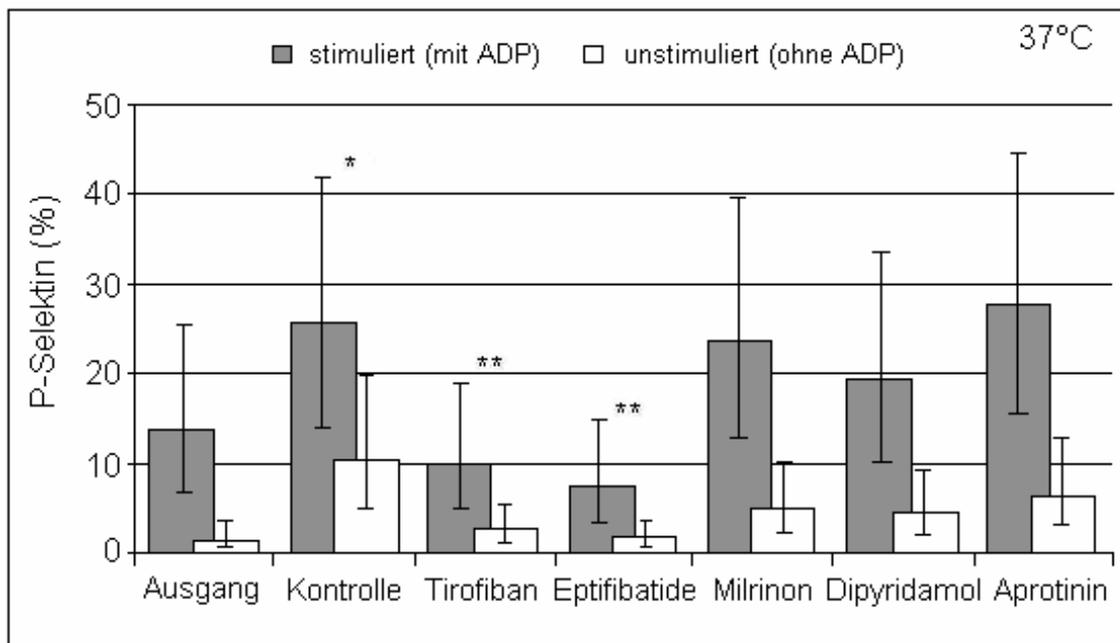
Verglichen mit den Ausgangswerten vor EKZ induziert die EKZ im Chandler-Loop eine signifikante Erhöhung der Thrombozytenaggregate (37°C/18°C - unstimuliert: 1,9-fach/1,48-fach, ADP-stimuliert: 1,5-fach/1,47-fach). Die EKZ-induzierte Thrombozytenaggregation wird im Vergleich zu den unbehandelten Proben durch folgende Substanzen signifikant inhibiert: Tirofiban (37°C/18°C - unstimuliert: 2,2-fach/1,6-fach, ADP-stimuliert: 2,46-fach/1,9-fach), Eptifibatide (37°C/18°C - unstimuliert: 1,96-fach/1,4-fach, ADP-stimuliert: 2,65-fach/2,0-fach) und Milrinon (37°C/18°C - unstimuliert: 1,87-fach/keine Inhibition bei Hypothermie, ADP-stimuliert: 1,37-fach/ keine Inhibition bei Hypothermie) (Siehe Abbildungen 9 und 10)

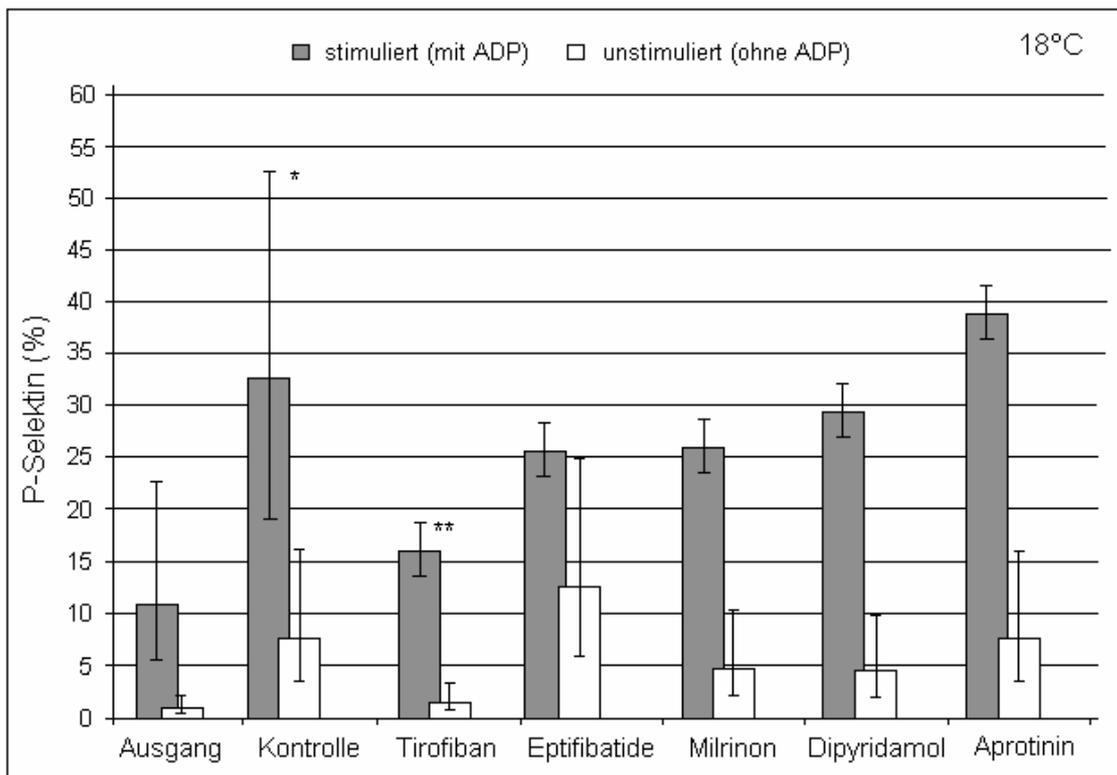


Thrombozytenaggregation Abb. 9 (oben bei 37°C) und 10 (unten bei 18°C) : Vergleicht man die Ausgangswerte vor dem Chandler-Loop-Lauf (hier: Ausgang) mit den Kontrollwerten nach dem Chandler-Loop-Lauf (hier: Kontrolle), erkennt man einen signifikanten Anstieg der Thrombozytenaggregation, welche durch die Zirkulation in dem EKZ-Modell bedingt ist. (\*  $p < 0,05$ ). Tirofiban, Eptifibatide und Milrinon hemmen diese EKZ-induzierte Aggregation signifikant (\*\*  $p < 0,05$ ).

### 3.2.1.2 Thrombozytenaktivierung (P-Selektin- Expression)

Verglichen mit den Ausgangswerten induziert die EKZ eine Erhöhung der thrombozytären P-Selektin-Expression (37°C/18°C - unstimuliert: 6,11-fach/7,7-fach, ADP-stimuliert: 1,83-fach/2,81-fach). Verglichen mit den unbehandelten Proben wird die EKZ-induzierte Thrombozytenaktivierung durch folgende Substanzen signifikant gehemmt: Tirofiban (37°C/18°C - unstimuliert: 3,95-fach/5,1-fach, ADP-stimuliert: 2,54-fach/2-fach), Eptifibatide (nur 37°C - unstimuliert 5,87-fach, ADP-stimuliert: nur 37°C: 3,28-fach); (siehe Abbildungen 11 und 12)

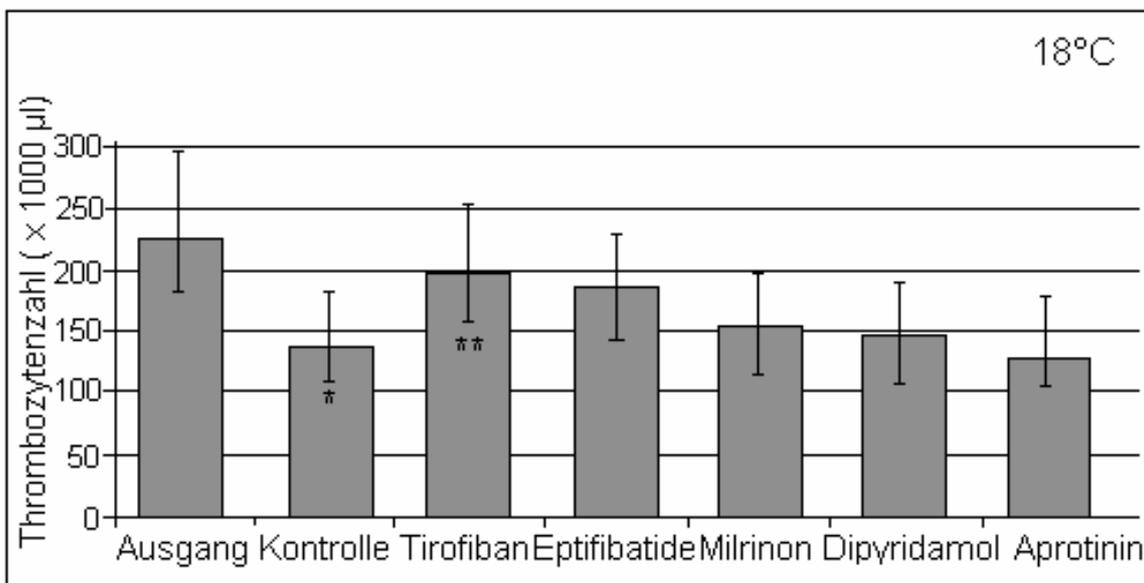
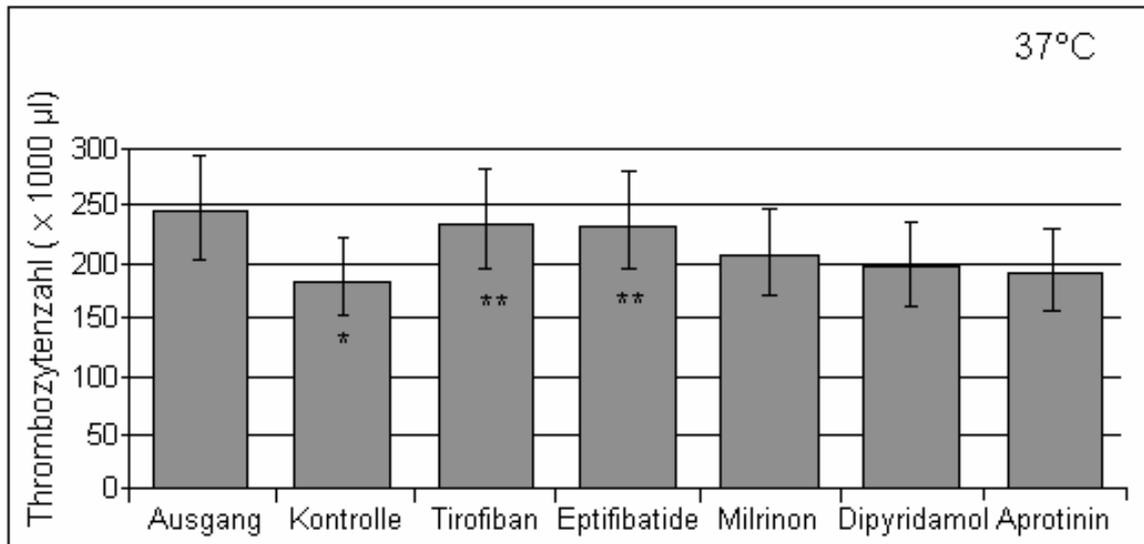




*Thrombozytenaktivierung - Abb. 11 (oben bei 37°C) und 12 (unten bei 18°C): Verglichen mit den Ausgangswerten vor dem Chandler-Loop wird die Thrombozytenaktivierung signifikant durch das EKZ-Modell erhöht (\*  $p < 0,05$ ). Tirofiban und Eptifibatide (nur bei 37°C) hemmen diese EKZ-induzierte Thrombozytenaktivierung signifikant (\*\*  $p < 0,05$ ).*

### 3.2.1.3 Thrombozytenzahl im Vollblut

Die EKZ im Chandler-Loop reduziert die Thrombozytenanzahl auf insgesamt 75,8% des Ausgangswertes bei 37°C und auf insgesamt 59,1% des Ausgangswertes bei 18°C. Verglichen mit den unbehandelten Proben, die im Chandler-Loop zirkulieren, wird in den Proben, die mit GP IIb/IIIa- Blockern inkubiert sind, durch Tirofiban eine signifikante Erhöhung (37°C/18°C 1,27-fach/1,5-fach), und ebenso auch bei den 37°C-Proben durch Eptifibatide eine signifikante 1,25-fache Erhöhung der Thrombozytenanzahl erreicht. Eptifibatide hat auf die Thrombozytenanzahl der 18°C- Proben keinen Einfluss (siehe Abbildungen 13 und 14).

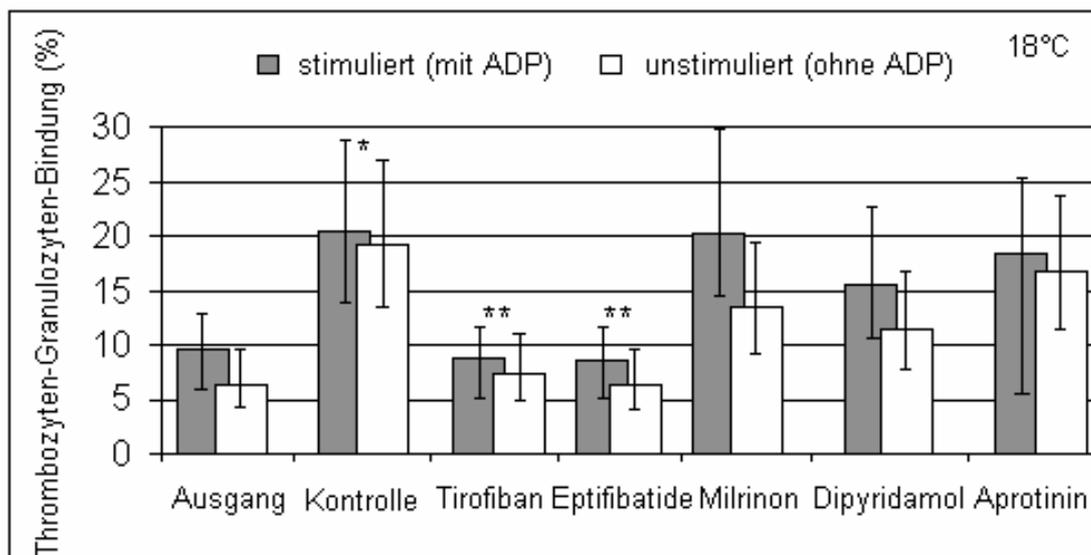
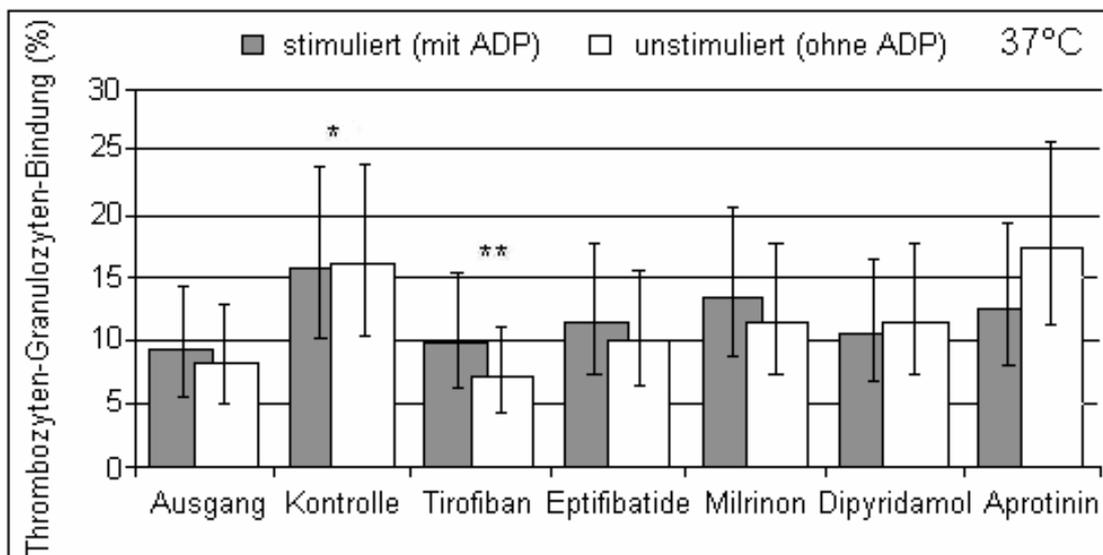


Thrombozytenanzahl - Abb. 13 (oben bei 37°C) und 14 (unten bei 18°C): Verglichen mit den Ausgangswerten vor dem Chandler- Loop- Lauf sank die Anzahl der Thrombozyten in der unbehandelten Kontrollprobe während des Laufes signifikant (\* $p < 0,05$ ). Tirofiban und Eptifibatide hemmen den EKZ-induzierten Thrombozytenverlust signifikant bei 37°C. Bei 18°C hemmt nur Tirofiban den EKZ-induzierten Thrombozytenverlust (\*\*  $p < 0,05$ )

### 3.2.1.4 Thrombozyten- Granulozyten- Bindung

Verglichen mit den Ausgangswerten induziert die EKZ einen Anstieg der Thrombozyten-Granulozyten-Bindung (37°C/18°C - unstimuliert: 1,92-fach/3-fach, ADP-stimuliert: 1,7-fach/2,26-fach).

Verglichen mit den unbehandelten Proben inhibiert Tirofiban die EKZ-induzierte Thrombozyten-Granulozyten-Bindung (37°C/18°C - unstimuliert: 2,25-fach/2,6-fach, ADP-stimuliert: 1,59-fach/2,4-fach). Eptifibatide dagegen hemmt ausschließlich bei 18°C die Thrombozyten-Granulozyten-Bindung (18°C - unstimuliert: 3-fach, ADP-stimuliert-18°C: 2,4-fach). (Siehe Abbildungen 15 und 16)



*Thrombozyten-Granulozyten-Bindung - Abb. 15 (oben bei 37°C) und 16 (unten bei 18°C): Während des Laufes steigt die Thrombozyten-Granulozyten-Bindung signifikant an (\* $p < 0,05$ ). Tirofiban hemmt die EKZ-stimulierte Thrombozyten-Granulozyten-Bindung signifikant (\*\* $p < 0,05$ ) bei 37°C und 18°C. Eptifibatide hemmt die Thrombozyten-Granulozyten-Bindung nur bei 18°C (\*\* $p < 0,05$ )*

### **3.2.1 Der Vergleich der Temperaturen (37°C, 28°C und 18°C) untereinander**

Um einen Einfluss der Temperatur auf Funktionen und Interaktionen von Thrombozyten und Leukozyten zu untersuchen, wurden die Ergebnisse der Chandler-Loop Versuche bei den Temperaturen 37°C, 28°C und 18°C miteinander verglichen. Für die Parameter Thrombozytenaggregation und -zahl, sowie für die Interaktion zwischen Thrombozyten und Leukozyten zeigte sich kein signifikanter Einfluss der Temperatur. Für den Parameter P-Selektin zeigte sich jedoch in der Eptifibatide-Gruppe bei Hypothermie folgende Wechselwirkung: Im Vergleich zur Zirkulation bei Normothermie (37°C) stieg die P-Selektin-Expression auf einzelnen Thrombozyten (28°C: um das 1,9-fache; 18°C um das 16,63-fache) und auf den Aggregat-gebundenen Thrombozyten (28°C: 1,68-fache; 18°C 7,31-fache) nur in den mit Eptifibatide inkubierten Proben an ( $p < 0,001$ ): (siehe Abbildungen 17 und 18)

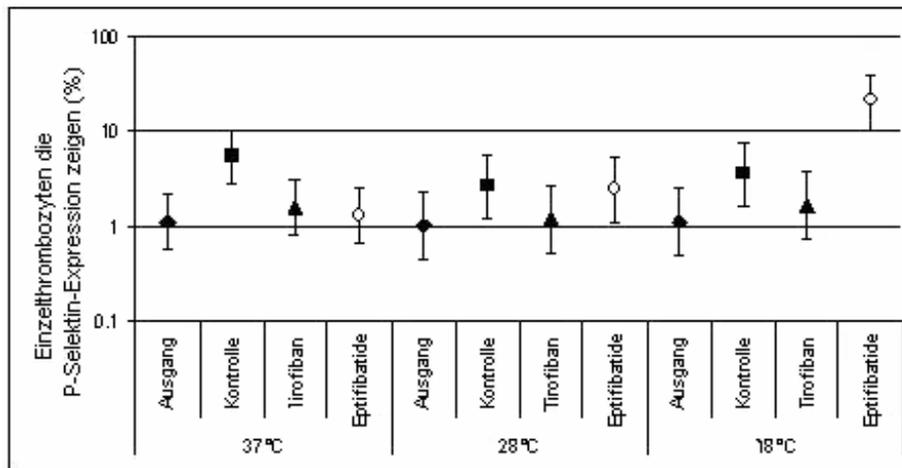


Abb.17: Gezeigt ist die P-Selektin-Expression auf den einzelnen Thrombozyten. Es sind jeweils Mittelwerte mit 95%-Konfidenzintervallen angegeben.

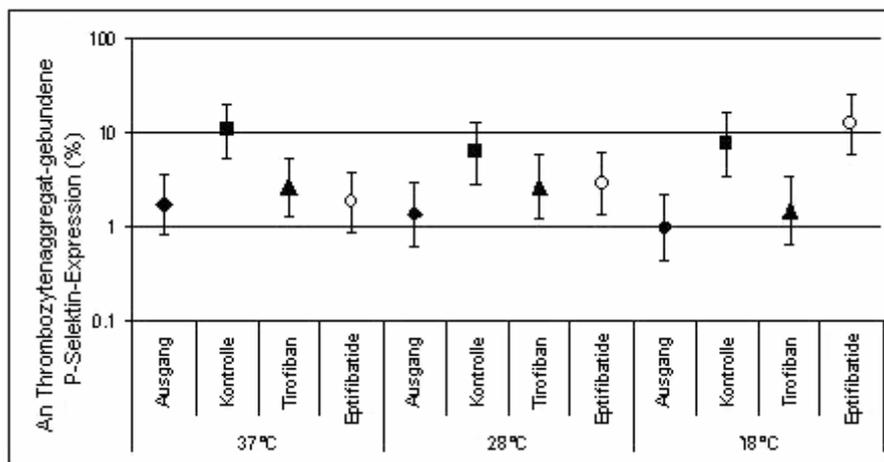


Abb. 18: Anzeigt ist die P-Selektin-Expression auf den Thrombozytenaggregaten. Es sind jeweils Mittelwerte mit 95%-Konfidenzintervallen angegeben.

## 4. Diskussion

### 4.1. Die Thrombozytenfunktion unter den in-vitro Bedingungen des tief hypothermen Kreislaufstillstandes

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die in-vitro- Simulation des tief hypothermen Kreislaufstillstandes eine Vielzahl an Veränderungen der Thrombozytenfunktion hervorruft. Die erhöhte Bindung des PAC-1-Antikörpers an den aktivierten GP IIb/IIIa Rezeptor und die gesteigerte Expression von P-Selektin bei 18°C zeigen, dass durch die Hypothermie eine deutliche Thrombozytenaktivierung induziert wird. Darüber hinaus kommt es zu einem massiven Anstieg der Thrombozytenaggregation. Ähnliche Ergebnisse werden auch in anderen Studien beobachtet. In diesen Studien werden gezeigt, dass Temperaturen im Bereich von 4°C bis 32°C die Bildung von Thrombozytenaggregaten fördern können. Dieses Phänomen, dessen genauer Mechanismus noch unklar ist, wird als Hypothermia induced platelet aggregation (HIPA) bezeichnet (Hall MW 2002). Faraday et al. zeigten, dass die Agonisten-induzierte Thrombozytenaggregation und die Fibrinogenbindung bei Temperaturen von 22°C und 33°C signifikant höher sind als bei Normothermie (37°C). Darüber hinaus zeigt sich auch bei Faraday et al. eine höhere PAC-1 und P-Selektin- Antikörperbindung bei Hypothermie (Faraday N 1998).

Eine Studie von Hall et al. zeigt, dass es u.a. abhängig von der Temperatur zu einer Thrombozytenaggregation und einer Zunahme der GP IIb/IIIa- Aktivität kommt. Die stärkste Ausprägung der HIPA wird hier bei einer Temperatur von 24°C festgestellt (Hall MW 2002).

## **4.2 Der Effekt von GP IIb/IIIa-Rezeptor Blockern unter den in-vitro Bedingungen des tief hypothermen Kreislaufstillstandes**

### **4.2.1 Analyse Hypothermie-induzierter Thrombozytenaktivierung und -aggregation**

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass sowohl die Hypothermie-induzierte Entstehung von Thrombozytenaggregaten, wie auch die GP IIb/IIIa-spezifische PAC-1-Bindung durch die GP IIb/IIIa-Blocker Tirofiban und Eptifibatide gehemmt werden. Dies legt nahe, dass der GP IIb/IIIa Rezeptor in die Hypothermie-induzierte Thrombozytenaggregation involviert ist. Dies bestätigt die Hypothese, dass Hypothermie-induzierte Thrombozytenaggregate durch Fibrinogen verbunden werden (Hall MW 2002; Straub A 2005a). Eine genaue Aussage über den Aktivierungszustand des GP IIb/IIIa Rezeptors ist unter diesen Versuchsbedingungen jedoch nicht möglich, da die Bindung des PAC-1-Antikörpers unabhängig vom Aktivierungszustand des Rezeptors durch GP IIb/IIIa-Blocker gehemmt wird (Faraday N 1998).

Um unter diesen Bedingungen einen Einblick in den thrombozytären Aktivierungsstatus zu erhalten, ist die durchflußzytometrische Analyse des thrombozytären P-Selektins, wie sie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde, besser geeignet. Die Bindung des fluoreszenzmarkierten Antikörpers gegen P-Selektin wird dadurch nicht, wie die von PAC-1 durch GP IIb/IIIa Blocker, inhibiert.

### **4.2.2 Differentielle Effekte der GP IIb/IIIa Blocker Tirofiban und Eptifibatide auf die thrombozytäre P-Selektin Expression**

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die P-Selektin Expression unstimulierter Thrombozyten bei Hypothermie durch Tirofiban gehemmt, durch Eptifibatide aber weiter verstärkt wird. Die P-Selektin Expression ADP-stimulierter Thrombozyten wird von den beiden GP IIb/IIIa Blockern nicht wesentlich beeinflusst. In einer Arbeit von Holmes et al. (Holmes MB 1999) wird von einem ähnlichem Ergebnis berichtet: Hier fällt auf, dass zwar Tirofiban keine Wirkung auf die agonisten-induzierte P-Selektin-Expression besitzt, Eptifibatide

jedoch zeigt bei seiner maximal getesteten Konzentration einen Anstieg der agonisten-induzierten P-Selektin-Expression. Im Unterschied zum vorliegenden Versuchsaufbau wird bei Holmes et al. eine Eptifibatide-Konzentration von 3,4µg/ml erzielt, während in der vorliegenden Arbeit durchgehend mit einer Eptifibatide-Konzentration von 2,5µg/ml gearbeitet wird.

Es stellt sich die Frage, welcher Mechanismus der Eptifibatide-assoziierten Verstärkung der P-Selektin Expression zugrunde liegt. In einer Arbeit von Schneider et al. (Schneider DJ 2000) wird gezeigt, dass das Antikörperfragment Abciximab in thrombozytäre  $\alpha$ -Granula aufgenommen wird und paradoxerweise die agonisten-induzierte Ausschüttung von  $\alpha$ -Granula steigern kann, obwohl es zeitgleich die Fibrinogenbindung hemmt. Es wird postuliert, dass eine erhöhte Menge von Proteinen in thrombozytären  $\alpha$ -Granula die Thrombozytendegranulation und somit die P-Selektin Expression verstärkt (Schneider DJ 2000). Diese Hypothese könnte auch die unterschiedlichen Effekte von Tirofiban und Eptifibatide in der vorliegenden Arbeit erklären, da es sich bei Tirofiban um ein Non-Peptid handelt, Eptifibatide aber ein zyklisches Heptapeptid ist (Schrör K 2003).

Eine andere mögliche Erklärung für den Anstieg der P-Selektin-Expression der durch Eptifibatide beobachtet wird, könnte die Existenz eines partiell agonistischen Effektes von Eptifibatide auf Thrombozyten sein. Solch eine intrinsisch aktivierende Eigenschaft wird bereits für Abciximab berichtet, welches die Fibrinogenbindung an Thrombozyten induzieren und insbesondere bei niedrigen Konzentrationen eine nachfolgende Thrombozytenaggregation auslösen kann (Peter K 1998). Folglich könnte die Bindung von Liganden an den GP IIb/IIIa-Rezeptor eine Thrombozytenaktivierung auslösen. Auch von Dickfeld et al. wurden proaggregatorische Eigenschaften von GP IIb/IIIa Blockern beschrieben, welche mit der Induktion von "ligand induced binding sites" auf dem GP IIb/IIIa Rezeptor vergesellschaftet sind (Dickfeld T 2001). Der genaue Mechanismus und die klinische Relevanz dieses Phänomens sind noch ungeklärt. Bei der Anwendung eines Thrombozyteninhibitors wie Eptifibatide sollte jedoch in Betracht gezogen werden, dass diese Substanz

eine Degranulation von Thrombozyten, die per se ein prothrombotisches Ereignis darstellt, auslösen kann.

#### **4.2.3 Wirkung auf die Thrombozyten-Leukozyten Interaktion**

P-Selektin, das bei der Degranulation freigesetzt wird, vermittelt über Interaktion mit dem Leukozyten-Liganden PSGL-1 die Bindung von Thrombozyten an Leukozyten. Die Interaktion von Thrombozyten an Leukozyten kann eine Leukozytenaktivierung sowie inflammatorische Kaskaden auslösen (Yeo EL 1994; Doré 1998, Gawaz M 2005). Von Davenpeck et al. wird berichtet, dass aktivierte Granulozyten und Monozyten die Expression von PSGL-1 auf ihrer Oberfläche reduzieren, und dass konsekutiv die Adhäsion neutrophiler Granulozyten an P-Selektin abnimmt (Davenpeck KL 2000).

Zwischen Aktivierungsvorgängen in Thrombozyten und inflammatorischen Vorgängen besteht somit ein direkter Zusammenhang (Gawaz M 2005).

In den Experimenten der vorliegenden Arbeit waren in allen Proben Thrombozyten-Leukozyten Aggregate vorhanden. Insgesamt gab es jedoch bis auf den Anstieg der Thrombozyten-Granulozyten Interaktion mit Eptifibatide keinen generellen und zu der gesteigerten P-Selektin-Expression passenden, hypothermie-assoziierten Anstieg der Thrombozyten-Granulozyten-Interaktion. In Anbetracht der Ergebnisse von Davenpeck et al. könnte man sich diese Ergebnisse dadurch erklären, dass PSGL-1 auf Leukozyten bei Hypothermie reduziert wird, was zu einer Abnahme der Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion führen würde. Nichtsdestotrotz bleibt der exakte Mechanismus dieser Hypothese unklar.

### **4.3. Der Effekt der extrakorporalen Zirkulation auf die plasmatische Blutgerinnung, inflammatorische Ereignisse und die Thrombozytenfunktion**

In der Phase während herzchirurgischer Operationen, in der das Blut via extrakorporalen Kreislaufes transportiert und oxygeniert wird, kommt es zu einer Interaktion von Blut mit den Fremdoberflächen der HLM, wodurch eine inflammatorische Kaskade initiiert wird (Chenoweth DE 1981; Curtis SE 1992; Butler J 1993), die verschiedenste Organdysfunktionen nach sich ziehen kann. Dadurch, dass die HLM die Kontaktaktivierungssysteme (Royston D 1996) triggert, kommt es auch zu einer Stimulation der intrinsischen Gerinnungskaskade und zur Fibrinolyse. Die Thrombinbildung wird gefördert, und somit kommt es zu einer Thrombozytenaggregation und dabei zu einer vermehrten Einlagerung von Leukozyten in die Thrombozytenaggregate (Boldt J 1996; Royston D 1996). Ebenso kommt es durch Anhaftung der Thrombozyten an die Fremdoberflächen der HLM und durch EKZ-induzierte Aggregation zu einer Thrombozytopenie. Aus diesem Grund kann die Thrombozytenprotektion gerade in der Phase der herzchirurgischen Operation, in der die EKZ eingesetzt wird, von großem Vorteil sein.

In etwa 2% der Fälle tritt nach Herzeingriffen, die unter Einsatz einer Herz-Lungen-Maschine durchgeführt werden, eine ausgedehnte Organdysfunktion im Sinne eines Multiorganversagens (Multiple Organ Dysfunction Syndrome, MODS) auf (Christenson JT 1994). Die damit einhergehende Mortalität liegt bei über 75%. Für das Entstehen des MODS nach diesen Eingriffen werden im Wesentlichen zwei Hauptursachen diskutiert. Einerseits eine Minderperfusion der Organsysteme während des CPB und andererseits eine Kontaktaktivierung und Mediatorenfreisetzung durch den Kontakt des Blutes mit den unphysiologischen Oberflächen der HLM (Kirklin JK 1983; Boldt J 1996).

#### **4.4. Der Effekt von GP IIb/IIIa-Rezeptor-Blockern an der normo- und hypothermen extrakorporalen Zirkulation**

##### **4.4.1 Thrombozytenprotektion durch GP IIb/IIIa-Blockade**

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die GP IIb/IIIa-Rezeptor-Blocker Tirofiban und Eptifibatide nicht nur die Thrombozytenaktivierung- und aggregation verringern, sondern auch den Thrombozytenverlust der während der EKZ entsteht, verhindern können (Straub A 2005c). Andere Studien, die GP IIb/IIIa-Rezeptor-Blocker anwenden, zeigen ähnliche Ergebnisse. Über den kurz-wirksamen GP IIb/IIIa-Rezeptor-Blocker FK 633 wird z.B. berichtet, dass er während der in-vitro Simulation der extrakorporalen Zirkulation sowohl die Thrombozytenaktivierung- und aggregation, als auch die Fibrinogenbindung an Thrombozyten und den Thrombozytenverlust hemmen kann (Kondo N 2004). Darüber hinaus wird über den GP IIb/IIIa-Rezeptor-Blocker Abciximab berichtet, dass er die EKZ-induzierte Aktivierung und Interaktion von Thrombozyten und Leukozyten und den Thrombozytenverlust ebenfalls hemmt (Straub A 2005a).

Tierversuche haben gezeigt, dass Tirofiban und Eptifibatide während der EKZ die Thrombozytenzahl- und funktion sozusagen „konservieren“, indem sie diese gegen die aktivierenden Faktoren der HLM schützen. Dieser Effekt, der als „Thrombozyten-Anästhesie“ bezeichnet (Hiramatsu Y 1997; Suzuki Y 1998) wird und dessen genauerer Mechanismus noch unklar ist, weist auf einen möglichen Benefit von GP IIb/IIIa-Rezeptor-Blocker-Applikation während herzchirurgischer Operationen hin (Dyke CM 2000; Bizzarri F 2001; Genoni M 2001; Koster A 2003).

##### **4.4.2 GP IIb/IIIa-Blocker sind anderen Thrombozyteninhibitoren überlegen**

Der Phosphodiesterasehemmer Milrinon, der die Hydrolyse des zyklischen Adenosinmonophosphates im Myokard verlangsamt (Anfossi G 1996) wird in der Herzchirurgie als positiv inotroper Wirkstoff angewandt. Milrinon hemmt jedoch auch die Thrombozytenfunktion, indem es den cyclischen Adenosinmonophosphat-Gehalt (cAMP) im Blutplättchen, welches ein Hemmer

der Thrombozytenaktivierung darstellt, erhöht (Anfossi G 1996). In unseren Experimenten vermindern sowohl die GP IIb/IIIa-Rezeptor-Blocker Tirofiban und Eptifibatide, als auch Milrinon die EKZ-induzierte Thrombozytenaggregation. Die EKZ-induzierte P-Selektin-Expression, die Thrombozyten-Granulozyten-Bindung und der Thrombozytenverlust werden jedoch durch Milrinon nicht beeinträchtigt. Diese Resultate suggerieren, dass Milrinon zwar die Aktivierung der Signaltransduktionswege, die im Thrombozyten stattfinden und somit zur Aggregation führen, hemmt, aber die P-Selektin-Expression nicht verhindern kann.

Das Medikament Dipyridamol hemmt die thrombozytäre Aufnahme von Adenosin. Bei Patienten, die mit dem linksventrikulären mechanischen „Kunstherz“ (*Left Ventricular Assist Device - LVAD*) „Novacor“ versorgt werden, konnte gezeigt werden, dass Dipyridamol in Kombination mit Aspirin die Inzidenz von Thromboembolien vermindert (Schmid C 2000). Dipyridamol bewirkt eine extrazelluläre Akkumulation von Adenosin durch Hemmung der Adenosin-Desaminase und stimuliert über spezifische Membranrezeptoren die Adenylatcyclase. Dadurch wird der thrombozytäre cAMP-Gehalt durch Dipyridamol erhöht, was den Effekt erklären würde, wieso sich weniger Aggregate bilden (Gresele P 1986).

Der Proteaseninhibitor Aprotinin vermindert im Rahmen herzchirurgischer Eingriffe unter Anwendung der Herz-Lungen Maschine effektiv Blutungskomplikationen. Aprotinin hemmt selektiv den proteolytisch aktivierten Thrombinrezeptor PAR1 auf Thrombozyten und inhibiert EKZ-induzierte inflammatorische Ereignisse (Landis RC 2001).

In den Experimenten der vorliegenden Arbeit zeigen Dipyridamol und Aprotinin während der EKZ keinen Effekt auf die Funktion der Thrombozyten und Granulozyten. Diese Ergebnisse suggerieren, dass diese Substanzen auf die Thrombozytenfunktion und die thrombozytenvermittelten proinflammatorischen Ereignisse während der EKZ *in vivo* einen eher geringen Effekt haben (Straub A 2005b).

Neutrophile Granulozyten, welche während der EKZ-assozierten inflammatorischen Antwort in das Interstitium auswandern, setzen

gewebsschädigende Toxine frei (Miller BE 1997). P-Selektin, welches auf Thrombozyten, die an Gefäßläsionen anhaften, exprimiert wird, kann die Anhaftung neutrophiler Granulozyten, vermitteln (Weerashinghe A 1998; McEver RP 2001). P-Selektin ist dadurch möglicherweise ein wichtiger Vermittler inflammatorischer Vorgänge. Es wurde berichtet, dass die EKZ-verbundene inflammatorische Antwort durch Tirofiban in vivo gehemmt werden kann. Dies wird in der Studie von Koster et al. an Hand des Akute-Phase-Proteins Interleukin 6 und dem Entzündungsindikator Leukozyten-Elastase gezeigt. Für Tirofiban konnte hier gezeigt werden, dass es unter seiner Anwendung zu einem bedeutenden Abfall dieser Parameter kommt (Koster A 2003).

#### **4.4.3 Differentieller Effekt von Tirofiban und Eptifibatide auf die Interaktion von Thrombo- und Leukozyten**

Sowohl Tirofiban wie auch Eptifibatide vermindern die thrombozytäre P-Selektin-Expression in den EKZ-simulierten Versuchen der vorliegenden Arbeit. Jedoch wird die Thrombozyten-Granulozyten Interaktion nur durch Tirofiban gehemmt (Straub A 2006), nicht aber durch Eptifibatide. Obwohl der genaue Mechanismus dieser Beobachtung ungeklärt bleibt, könnten sich beim in-vivo Einsatz dieser Medikamente entsprechende Konsequenzen ergeben: Tirofiban könnte dadurch, dass es die Bindung zwischen Thrombozyten und Granulozyten hemmt, die thrombozytenvermittelte extravaskuläre Wanderung von Granulozyten reduzieren und nachfolgend auch eine inflammatorische Organschädigung. Im Gegensatz dazu ist Eptifibatide, welches in einer weiteren in vitro Studie (Scholz T 2002) die Entstehung von Aggregaten aus Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten und in kleinerem Ausmaß auch die Entstehung von Thrombozyten-Monozyten-Aggregate verstärkt, eher nicht geeignet proinflammatorische Ereignisse, die durch die Thrombozyten vermittelt werden, zu vermindern.

In der vorliegenden Arbeit hatten die untersuchten Inhibitoren keinen wesentlichen Einfluss auf die Thrombozyten-Monozyten Interaktion. Lediglich

bei Normothermie wurde durch Eptifibatide, wie unter 3.1.3 zu sehen ist, eine Inhibition erzielt.

## **4.5 Potentielle Konsequenzen für die klinische Anwendung von GP IIb/IIIa Blockern**

### **4.5.1 Bedeutung für die Herzchirurgie**

Die in vitro-Ergebnisse der vorliegenden Arbeit können eine wichtige Bedeutung im Rahmen herzchirurgischer Operationen haben, bei denen Hypothermie insbesondere im Sinne des tiefhypothermen Kreislaufstillstandes angewandt wird: Ein Verschluss der Mikrozirkulation durch Hypothermie-induzierte Aggregate und ein nachfolgender ischämischer Organschaden erscheint möglich. Weiterhin könnte die Auswanderung von Leukozyten aus Hypothermie-induzierten Thrombozyten-Leukozyten Aggregaten in das umliegende Gewebe eine daraus resultierende Entzündungsreaktion begünstigen. Durch den gezielten Einsatz von GP IIb/IIIa-Blockern können derartige Ereignisse reduziert werden. GP IIb/IIIa-Blocker können somit nicht nur wegen ihres antithrombotischen, sondern auch wegen eines antiinflammatorischen Effektes eingesetzt werden. Diese Hypothese wird auch dadurch unterstützt, dass für die GP IIb/IIIa-Rezeptor-Blocker Tirofiban und Abciximab nachgewiesen wurde, dass sie die Aktivierung und Interaktion von Thrombozyten und Leukozyten während der EKZ sowohl in vitro als auch in vivo hemmen können (Koster A 2003; Straub A 2005a).

Jedoch muss beachtet werden, dass insbesondere im Rahmen herzchirurgischer Eingriffe die Hemmung von GP IIb/IIIa, und damit der Thrombozytenfunktion, zu einer erhöhten Blutungsneigung führen könnte. Klinische Studien haben in diesem Zusammenhang interessanterweise gezeigt, dass herzchirurgische Operationen nach Verabreichung von Tirofiban und Eptifibatide mit der Herz-Lungen Maschine sicher durchgeführt werden können. Bizzarri et al. (Bizzarri F 2001) berichten, dass bei Patienten an denen eine Myokardrevaskularisierung unter Anwendung von Tirofiban durchgeführt wird,

postoperativ der Blutverlust geringer ist und somit auch die Anzahl von Bluttansfusionen abnimmt. Es kommt dabei ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion des durch den HLM-Einsatz bedingten Thrombozytenverlustes. In einer Studie von Koster et al. (Koster A 2003) kommt es durch die Tirofiban-Anwendung während Operationen mit der Herz-Lungen-Maschine zu einer effektiven Senkung der Aktivierung biochemischer Marker des Hämostase- und Entzündungssystems, ohne eine Zunahme von Blutungskomplikationen. Eine Studie von Dyke et al. (Dyke CM 2000) zeigt, dass die Anwendung von Eptifibatide direkt vor einer Bypass-Operation zu einer signifikanten Abnahme der Inzidenz perioperativer Myokardinfarkte führt. Ähnlich zu den Auswirkungen die durch Bizarri et al. (Bizzarri F 2001) beobachtet werden, ist die postoperative Thrombozytenzahl bei den Patienten, die Eptifibatide erhalten höher, als bei den Patienten die Placebo erhalten, was einen thrombozytenschützenden Effekt durch die GP IIb/IIIa-Hemmung während Operation unter Einsatz der HLM vermuten lässt.

Eine mögliche Erklärung für die genannten Phänomene könnte darin liegen, dass durch die vorübergehende Blockade des für die Thrombozytenfunktion essentiellen GP IIb/IIIa Rezeptors die Thrombozytenfunktion gegen Aktivierung und Schädigung durch die Fremdoberflächen der HLM geschützt wird (Hiramatsu Y 1997). Dieser Mechanismus könnte auch während der Phase des tiefhypothermen Kreislaufstillstandes nützlich sein und unter diesen Bedingungen die Thrombozyten gegen Schädigung durch Hypothermie schützen. Am aussichtsvollsten für eine Anwendung von GP IIb/IIIa Blockern während Operationen unter Anwendung des tiefhypothermen Kreislaufzustandes, wäre ein kurzwirksamer GP IIb/IIIa-Rezeptor-Blocker, welcher die Thrombozyten nur während der Anwendung der extrakorporalen Zirkulation inklusive des tief hypothermen Kreislaufstillstandes schützen würde, um so voll funktionsfähige Thrombozyten am Ende der Operation zur Verfügung zu stellen. Eptifibatide hat zwar eine kürzere HWZ als Tirofiban, erscheint jedoch in Anbetracht seiner Induktion der P-Selektin Expression bei Hypothermie weniger vorteilhaft für einen Einsatz zur Thrombozytenprotektion.

## **4.6 Ausblick**

### **4.6.1 Anwendung von GP IIb/IIIa Blockern zur Thrombozytenprotektion in der Herzchirurgie**

GP IIb/IIIa Blocker haben das Potential EKZ-assoziierte Komplikationen wie Thromboembolien und inflammatorisch bedingte Organdysfunktion zu hemmen. Es wurde bereits diskutiert, dass das optimale Medikament zur klinischen Anwendung in der Herzchirurgie ein kurzwirksamer oder reversibler GP IIb/IIIa-Rezeptor-Blocker mit einer HWZ von wenigen Minuten wäre (Straub A 2005a; Straub A 2006). Solch ein Medikament, welches momentan noch nicht verfügbar ist, könnte nur während der EKZ-Phase verabreicht, einen temporären Thrombozytenschutz aufbauen, ohne dabei das Risiko der Post-EKZ-Blutung zu erhöhen. Sogar der kurzwirksame GP IIb/IIIa-Rezeptor-Blocker Tirofiban (HWZ: 1,5-2 Stunden (Schrör K 2003)) ist, trotz der genannten Vorteile, nicht optimal für die Herzchirurgie (Topol EJ 1999). Darum müsste ein ultrakurzwirksamer GP IIb/IIIa-Rezeptor-Blocker entwickelt werden, der die Thrombozyten nur während der EKZ-Phase schützen würde.

### **4.6.2 Einschränkungen**

Da die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit durch in vitro-Experimente entstanden sind, ist eine exakte Übertragung auf die in vivo-Situation nur eingeschränkt möglich. Es wäre erstrebenswert Thrombozyten von Patienten, die unter Anwendung von Hypothermie operiert werden, zu untersuchen. Allerdings ist in der Herzchirurgie die Hypothermie fest mit der Anwendung der EKZ verknüpft, welche selber durch ihre Fremdoberfläche und die mechanischen Scherkräfte eine Thrombozytenaktivierung und einen Thrombozytenverlust induzieren. Falls somit Thrombozytenaktivierung und -aggregation während einer hypothermen EKZ nachgewiesen würden, könnte man keine klare Aussage darüber machen, ob dieses Phänomen durch die Hypothermie oder durch den kardiopulmonalen Bypass entstanden ist. Somit ist ein in-vitro Modell zur Untersuchung der Thrombozytenfunktion unter definierten Bedingungen, wie in dieser Arbeit beschrieben, essentiell.

## **5. Zusammenfassung**

### **5.1 Einleitung**

Systemische Hypothermie wird in der Herzchirurgie im Rahmen der extrakorporalen Zirkulation (EKZ) und des tief hypothermen Kreislaufstillstands (DHCA) eingesetzt, um die Ischämietoleranz des Patienten zu verlängern. Jedoch induzieren Hypothermie und die EKZ eine Thrombozytenaktivierung und -aggregation, welche zu Blutgerinnungsstörungen und lebensbedrohlichen Thrombembolien führen können. Darüber hinaus induziert die EKZ eine Interaktion und Bindung von Thrombozyten und Leukozyten, welche in eine systemische Entzündungsreaktion (SIRS) münden kann. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, eine pharmakologische Möglichkeit zur Protektion von Thrombozyten gegen Schädigung durch Hypothermie und EKZ-Oberflächen zu finden.

### **5.2 Methode**

Mit Hilfe der Durchflußzytometrie wurde die Expression des thrombozytären Aktivierungsmarkers P-Selektin, die Bindung des für GP IIb/IIIa aktivierungsspezifischen PAC-1 Antikörpers, die Bildung von Thrombozytenaggregaten und deren Gehalt an Monozyten und Granulozyten analysiert. Zur Simulation der Bedingungen des DHCA wurde in Stase und bei 18°C der Effekt der kurzwirksamen GP IIb/IIIa-Blocker Tirofiban und Eptifibatide in voll-heparinisierten Frischblutproben untersucht. Im EKZ-Modell wurde bei 18°C und 28°C zusätzlich der Effekt des Phosphodiesterasehemmers Milrinon, des Adenosin-Uptake-Inhibitors Dipyridamol und des Serinproteaseninhibitors Aprotinin analysiert. Mittels multifaktorieller Varianzanalyse erfolgte die statistische Auswertung.

### **5.3 Ergebnisse**

Beide GP IIb/IIIa-Blocker inhibieren die hypothermie- und EKZ-induzierte Thrombozytenaggregation und die PAC-1-Bindung. Die P-Selektin-Expression wird bei Hypothermie jedoch nur von Tirofiban inhibiert, während sie von Eptifibatide erhöht wird. Die Thrombozyten-Leukozyten Interaktion wurde unter EKZ-Bedingungen durch Tirofiban und Eptifibatide gehemmt, während sie bei Stillstand wenig beeinflusst wurde. Milrinon, Dipyridamol und Aprotinin zeigten keine Wirkung auf die untersuchten Parameter.

#### **5.4 Schlußfolgerung**

Während in vitro simulierter EKZ und DHCA verhindert der kurzwirksame GP IIb/IIIa Blocker Tirofiban die Thrombozytenaktivierung und -aggregation und verringert die EKZ-induzierte Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion. Deshalb sollte der in vivo Einsatz von Tirofiban zur Reduktion von EKZ und DHCA-assoziierten Komplikationen wie Mikroembolien und SIRS geprüft werden.

## 6. Literaturverzeichnis

- Abrams CS, Ellison N, Budzynski AZ, Shattil SJ. Direct detection of activated platelets and platelet-derived microparticles in humans. Blood. 1990;**75**(1):128-138.
- Adams HR. Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 7<sup>th</sup> ed., 1995, Iowa States University Press, Ames (USA).
- Adgey AA. An overview of the results of clinical trials with glycoprotein IIb/IIIa inhibitors. Am Heart J. 1998;**135**(4):43-55.
- Anfossi G, Massucco P, Piretto V, Mularoni E, Cavalot F, Mattiello K, Trovati M. Interplay between milrinone and adenosine in the inhibition of human platelet response. Gen Pharmacol. 1996;**27**(7):1149-54.
- Aster RH, Curtus BR, Bougie DW. Thrombocytopenia resulting from sensitivity to GPIIb/IIIa inhibitors. Semin Thromb Hemost. 2004;**30**(5):569-577.
- Augoustides JG, Pochettino A, Ochroch EA, Cowie D, Weiner J, Gambone AJ, Pinchasik D, Bavaria JE, Jobes DR. Renal dysfunction after thoracic aortic surgery requiring deep hypothermic circulatory arrest: definition, incidence and clinical predictors. J Cardiothorac Vasc Anesth. 2006;**20**(5):673-677.
- Bartlett MS. The use of transformations. Biometrics. 1947;**3**:39-52.
- Bellinger DC, Jonas RA, Rappaport LA, Wypij D, Wernovsky Kuban KC, Barnes PD, Holmes GL, Hickey PR, Strand RD, et al . Developmental and neurologic status of children after heart surgery with hypothermic circulatory arrest or low-flow cardiopulmonary bypass. N Engl J Med. 1995;**332**(9):549-555.
- Bizzarri F, Scolletta S, Tucci E, Lucidi M, Davoli G, Toscano T, Neri E, Muzzi L, Frati G. Perioperative use of tirofiban hydrochloride (Aggrastat) does not increase surgical bleeding after emergency or urgent coronary artery bypass grafting. J Thorac Cardiovasc Surg. 2001;**122**(6):1181-1185.
- Boldt J, Knothe CH, Welters I, Dapper FL, Hempelmann G. Normothermic versus hypothermic cardiopulmonary bypass: Do changes in coagulation differ? Ann Thorac Surg. 1996;**62**(1):130-135.
- Butler J, Rocker GM, Westaby S. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass. Ann Thorac Surg. 1993;**55**(2):552-559.

- Chenoweth DE, Cooper SW, Hugli TE, Stewart RW, Blackstone EH, Kirklin JW. Complement activation during cardiopulmonary bypass: evidence for generation of C3a and C5a anaphylatoxins. N Engl J Med. 1981;**304**(9):497-503.
- Christenson JT, Schmuziger M, Maurice J, Simonet F, Velebit V. Gastrointestinal complications after coronary bypass grafting. J Thorac Cardiovasc Surg. 1994;**108**(5):899-906.
- Coller BS. Blockade of platelet GPIIb/IIIa receptors as an antithrombotic strategy. Circulation. 1995;**92**(9):2373-2380.
- Curtis SE, Cain SM. Regional and systemic delivery/uptake relations and lactate flux in hyperdynamic, endotoxin-treated dogs. Am Rev Respir Dis. 1992;**145**(2 Pt 1):348-354.
- Davenpeck KL, Brummet ME, Hudson SA, Mayer RJ, Bochner BS. Activation of human leukocytes reduces surface P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1, CD162) and adhesion to P-selectin in vitro. J Immunol. 2000;**165**(5):2764-2772.
- Davidenko J, Antzelevitch C. The effects of milrinone on action potential characteristics, conduction, automaticity and reflected reentry in isolated myocardial fibers. J Cardiovasc Pharmacol. 1985;**7**(2):341-349.
- Di Eusanio M, Wesselink RM, Morshuis WJ, Dossche KM, Schepens MA. Deep hypothermic circulatory arrest and antegrade selective cerebral perfusion during ascending aorta-hemiarch replacement: a retrospective comparative study. J Thorac Cardiovasc Surg. 2003;**25**(4):849-854.
- Dickfeld T, Ruf A, Pogatsa-Murray G, Müller I, Engelmann B, Taubitz W, Fischer J, Meier O, Gawaz M. Differential antiplatelet effects of various glycoprotein IIb-IIIa antagonists. Thromb Res. 2001;**101**(2):53-64.
- Dyke CM, Bhatia D, Lorenz TJ, Marso SP, Tardiff BE, Hogeboom C, Harrington RA. Immediate coronary bypass surgery after platelet inhibition with eptifibatid: results from PURSUIT. Platelet Glycoprotein IIb/IIIa in Unstable Angina: Receptor Suppression Using Integrilin Therapy. Ann Thorac Surg. 2000;**70**(3):866-871.
- EPIC. Use of a monoclonal antibody directed against the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor in high-risk coronary angioplasty. The EPIC Investigators. N Engl J Med. 1994;**330**: 956-961.
- EPILOG. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade and low-dose heparin during percutaneous coronary revascularization. The EPILOG Investigators. N Engl J Med. 1997;**336**(24):1689-1696.

- Ergin MA, Uysal S, Reich DL, Apaydin A, Lansman SL, McCullough JN, Griep RB. Temporary neurological dysfunction after deep hypothermic circulatory arrest: a clinical marker of long-term functional deficit. Ann Thorac Surg. 1999;**67**(6):1887-1894.
- Faraday N, Rosenfeld BA. In vitro hypothermia enhances platelet GPIIb-IIIa activation and P-selectin expression. Anesthesiology. 1998;**88**(6):1579-1585.
- Fareed J, Bick RL, Hoppensteadt DA, Walenga JM, Messmore HL, Bermes EW Jr. Molecular markers of hemostatic activation. Implications in the diagnosis of thrombosis, vascular and cardiovascular disorders. Clinics in Lab Med. 1995;**15**(1):39-61.
- Gawaz M. Das Blutplättchen. 1999b; Thieme, Stuttgart.
- Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. J Clin Invest. 2005;**115**(12):3378-3384.
- Gawaz M, Neumann FJ, Schomig A. Evaluation of platelet membrane glycoproteins in coronary artery disease. Consequences for diagnosis and therapy. Circulation. 1999a;**99**(1):1-11.
- Genoni M, Zeller D, Bertel O, Maloigne M, Turina M. Tirofiban therapy does not increase the risk of hemorrhage after emergency coronary surgery. J Thorac Cardiovasc Surg. 2001;**122**(3):630-32.
- Ginsberg MH, Frelinger AL, Lam SCT, Forsyth J, McMillan R, Plow EF, Shattil SJ (1990). "Analysis of platelet aggregation disorders based on flow cytometric analysis of membrane glycoprotein IIb-IIIa with conformation-specific monoclonal antibodies." Blood **76**: 2017-2023.
- Giugliano RP. Drug-induced Thrombocytopenia: Is it a Serious Concern for Glycoprotein IIb/IIIa Receptor Inhibitors?" J Thromb Thrombolysis. 1998;**5**(3):191-202.
- Gresele P, Arnout J, Deckmyn H and Vermeylen J. Mechanism of the antiplatelet action of dipyridamole in whole blood: modulation of adenosine concentration and activity. Thromb Haemost. 1986;**55**(1):12-18.
- Hall MW, Goodman PD, Alston SM, Solen KA. Hypothermia-induced platelet aggregation in heparinized flowing human blood: identification of a high responder subpopulation. Am J Hematol. 2002;**69**(1):45-55.
- Harris DN, Bailey SM, Smith PL, Taylor KM, Oatridge A, Bydder GM. Brain swelling in first hour after coronary artery bypass surgery. Lancet. 1993;**342**(8871):586-587.

- Hiramatsu Y, Gikakis N, Anderson HL 3<sup>rd</sup>, Gorman JH 3<sup>rd</sup>, Marcinkiewicz C, Gould RJ, Niewiarowski S, Edmunds LH Jr. Tirofiban provides "platelet anesthesia" during cardiopulmonary bypass in baboons. J Thorac Cardiovasc Surg. 1997;**113**(1):182-193.
- Holmes MB, Sobel BE, Schneider DJ. Variable responses to inhibition of fibrinogen binding induced by tirofiban and eptifibatide in blood from healthy subjects. Am J Cardiol. 1999;**84**(2):203-207.
- Holt JC, Niewiarowski S. Biochemistry of alpha-granule proteins. Semin Hematol. 1985;**22**(2):151-163.
- Jamieson GA. Pathophysiology of platelet thrombin receptors. Thromb and Haemost. 1997;**78**(1):242-246.
- Jonas RA. Deep hypothermic circulatory arrest: Current status and indications. Semin Thorac Cardiovasc Surg Pediatr Card Annu. 2002;**5**(1):76-88.
- Jy W, Horstman LL, Park H, Mao WW, Valant P, Ahn YS. Platelet aggregates as markers of platelet activation: characterization of flow cytometric method suitable for clinical applications. Am J Hematol. 1998;**57**(1):33-42.
- Kereiakes DJ, Essell JH, Abbottsmith CW, Broderick TM, Runyon JP. Abciximab-associated profound thrombocytopenia: therapy with immunoglobulin and platelet transfusion. Am J Cardiol. 1996;**78**(10):1161-1163.
- Keularts IM, Beguin S, de Zwaan C, Hemker HC. Treatment with GP IIb/IIIa antagonist inhibits thrombin generation in platelet rich plasma from patients. Thromb Haemost. 1998;**80**(3):370-371.
- Kirklin JK, Westaby S, Blackstone EH, Kirklin JW, Chenoweth DE, Pacifico AD. Complement and the damaging effects of cardiopulmonary bypass. J Thorac Cardiovasc Surg. 1983;**86**(6):845-857.
- Kittleson MD, Pipers FS, Knauer KW, Keister DM, Knowlen GG, Miner WS. Echocardiographic and clinical effects of milrinone in dogs with myocardial failure. Am J Vet Res. 1985;**46**(8):1659-1664.
- Kondo N, Wakayama F, Suzuki Y, Fukui K, Takaya S, Fukuda I. The state of platelets preserved in extracorporeal circulation with a glycoprotein II/IIIa inhibitor. Thromb Res. 2004;**113**(5):303-310.
- Koster A, Chew DP, Kuebler W, Habazettl H, Bauer M, Hausmann H, Hetzer R, Kuppe H, Hamm CW. Effects of tirofiban on hemostatic activation and inflammatory response during cardiopulmonary bypass. Am J Cardiol. 2003;**91**(3):346-347.

- Lancet. The Warm Heart Investigators. Randomized trial of normothermic versus hypothermic coronary bypass surgery. Lancet. 1994;**343**(8897): 559-563.
- Landis RC, Haskard DO, Taylor KM. New antiinflammatory and platelet-preserving effects of aprotinin. Ann Thorac Surg. 2001;**72**(5):1808-1813.
- Langley SM, Chai PJ, Jaggars JJ, Ungerleider RM. Platelet-activating factor receptor antagonism improves cerebral recovery after circulatory arrest. Ann Thorac Surg. 1999;**68**(5):1578-1585.
- Lilly JK, Boland JP, Zekan E. Urinary bladder temperature monitoring: a new index of body core temperature. Crit Care Med. 1980;**8**(12):742-744.
- Madan M, Berkowitz SD, Tchong JE. Glycoprotein IIb/IIIa integrin blockade. Circulation. 1998;**98**(23):2629-2635.
- Mangano DT, Tudor IC, Dietzel C; Multicenter Study of Perioperative Ischemia Research Group; Ischemia Research and Education Foundation. The Risk associated with aprotinin in cardiac surgery. N Engl J Med. 2006;**354**(4):353-365.
- Martin TD, Craver JM, Gott JP, Weintraub WS, Ransay J, Mora CT, Guyton RA. Prospective, randomized trial of retrograde warm blood cardioplegia: myocardial benefit and neurologic threat. Ann Thorac Surg. 1994;**57**: 298-304.
- McCoy JP Jr. Basic principles of flow cytometry. Hematol Oncol Clin North Am. 2002;**16**(2): 229-243.
- McEver RP. Adhesive interactions of leukocytes, platelets, and the vessel wall during hemostasis and inflammation. Thromb Haemost. 2001;**86**(3): 746-756.
- Michelson AD. Flow cytometry: a clinical test of platelet function. Blood. 1996;**87**(12):4925-4936.
- Miller BE, Levy JH. The inflammatory response to cardiopulmonary bypass. J Cardiothorac Vasc Anesth. 1997;**11**(3): 355-366.
- Mora CT. Cardiopulmonary Bypass. Principles and techniques of extracorporeal circulation. 1995; Springer-Verlag, New-York.
- Morgenstern E. The formation of compound granules from different types of secretory organelles in human platelets. Eur J Cell Biol. 1995; **68**(2):183-190.

- Mousa SA, Bennett JS. Platelets in health and disease: Platelet GP IIb/IIIa structure and function: Recent advances in antiplatelet therapy. Drugs Future. 1996;**21**:1141-1154.
- Neumann FJ, Hochholzer W, Pogatsa-Murray G, Schömig A, Gawaz M. Antiplatelet effects of abciximab, tirofiban and eptifibatide in patients undergoing coronary stenting. J Am Coll Cardiol. 2001;**37**(5): 1323-1328.
- Newburger JW, Jonas RA, Wernovsky G, Wypij D, Hickey PR, Kuban KC, Farrell DM, Holmes GL, Helmers SL, Constantinou J, et al.. A comparison of the perioperative neurologic effects of hypothermic circulatory arrest versus low-flow cardiopulmonary bypass in infant heart surgery. N Engl J Med. 1993;**329**(15):1057-1064.
- Ngaage DL, Schaff HV, Mullany CJ, Sundt TM 3rd, Dearani JA, Barnes S, Daly RC, Orszulak TA. Does preoperative atrial fibrillation influence early and late outcomes of coronary artery bypass grafting? J Thorac Cardiovasc Surg. 2007;**133**(1):182-189.
- Norwood WI, Norwood CR. Influence of hypothermia on intracellular pH during anoxia. Am J Physiol. 1982;**243**(1):62-65.
- Pedicord DL, Thomas BE, Mousa SA, Dicker IB. Glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonists inhibit the development of platelet procoagulant activity. Thromb Res. 1998;**90**(6):247-258.
- Peter K, Kohler B, Straub A, Ruef J, Moser M, Nordt T, Olschewski M, Ohman ME, Kübler W, Bode C. Flow cytometry monitoring of glycoprotein IIb/IIIa blockade and platelet function in patients with acute myocardial infarction receiving reteplase, abciximab, and ticlopidine: continuous platelet inhibition by the combination of abciximab and ticlopidine. Circulation. 2000;**102**(13):1490-1496.
- Peter K, Schwarz M, Ylänne J, Kohler B, Moser M, Nordt T, Salbach P, Kübler W, Bode C. Induction of fibrinogen binding and platelet aggregation as a potential intrinsic property of various glycoprotein IIb/IIIa (alpha2bbeta3) inhibitors. Blood. 1998;**92**(9):3240-3249.
- Phillips DR, Charo IF, Parise LV, Fitzgerald LA. The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. Blood. 1988;**71**(4):831-843.
- Regragui I, Birdi I, Izzat MB, Black AM, Lopatatzidis A, Day CJ, Gardner F, Bryan AJ, Angelini GD. The effects of cardiopulmonary bypass temperature on neurophysiologic outcome after coronary artery operations: a prospective randomized trial. J Thorac Cardiovasc Surg. 1996;**112**(4):1036-1045.

- Riddington DW, Venkatesh B, Boivin CM, Bonser RS, Elliott TS, Marshall T, Mountford PJ, Bion JF. Intestinal permeability, gastric intramucosal pH, and systemic endotoxemia in patients undergoing cardiopulmonary bypass. JAMA. 1996;**275**(13):1007-1012.
- Royston D. Systemic inflammatory responses to surgery with cardiopulmonary bypass. Perfusion. 1996;**11**(3):177-189.
- Ruggeri ZM. New insights into the mechanisms of platelet adhesion and aggregation. Semin Hematol. 1994;**31**(3):229-239.
- Ruiz-Arguelles A. Flow cytometry in clinical laboratory. Principles, applications and problems. Ann Biol Clin. 1992;**50**:735-753.
- Saffitz JE, Stahl DJ, Sundt TM, Wareing TH, Kouchoukos NT. Disseminated intravascular coagulation after administration of aprotinin in combination with deep hypothermic circulatory arrest. Am J Cardiol. 1993;**72**(14):1080-1082.
- Scharbert G, Kalb M, Marschalek C, Kozek-Langenecker SA. The effect of test temperature and storage temperature on platelet aggregation: a whole blood on vitro study. Anesth Analg. 2006;**102**(4):1280-1284.
- Schmid C, Wilhelm M, Rothenburger M, Nabavi D, Deng MC, Hammel D, Scheld HH. Effect of high dose platelet inhibitor treatment on thromboembolism in Novacor patients. Eur J Cardiothorac Surg. 2000;**17**(3):331-335.
- Schneider DJ, Taatjes DJ, Sobel BE. Paradoxical inhibition of fibrinogen binding and potentiation of alpha-granule release by specific types of inhibitors of glycoprotein IIb-IIIa. Cardiovasc Res. 2000;**45**(2):437-446.
- Scholz T, Zhao L, Temmler U, Bath P, Heptinstall S, and Lösche W. The GPIIb/IIIa antagonist eptifibatid markedly potentiates platelet-leukocyte interaction and tissue factor expression following platelet activation in whole blood in vitro. Platelets. 2002;**13**(7):401-406.
- Schrör K, Weber AA. Comparative pharmacology of GP IIb/IIIa antagonists. J Thromb Thrombolysis. 2003;**15**(2):71-80.
- Singh AK, Bert AA, Feng WC, Rotenberg FA. Stroke during coronary artery bypass grafting using hypothermic versus normothermic perfusion. Ann Thorac Surg. 1995;**59**(1):84-89.
- Singh AK, Feng WC, Bert AA, Rotenberg FA. Warm body, cold heart: myocardial revascularization in 2383 consecutive patients. J Cardiovasc Surg Torino. 1993;**34**(5):415-421.

- Straub A, Azevedo R, Beierlein W, Wendel HP, Dietz K, Ziemer G. Glycoprotein IIb/IIIa inhibition reduces prothrombotic events under conditions of deep hypothermic circulatory arrest. Thromb Haemost. 2005c;**94**(1):115-122.
- Straub A, Azevedo R, Beierlein W, Wendel HP, Dietz K, Ziemer G. Tirofiban (Aggrastat) protects platelets and decreases platelet-granulocyte binding in an extracorporeal circulation model. Thorac Cardiovasc Surg. 2006;**54**(3):162-167.
- Straub A, Azevedo R, Beierlein W, Wendel HP, Scheule AM, Ziemer G. Hypothermia Induced Platelet Aggregation: No Effect of Aprotinin (Trasylol) but Inhibition by Eptifibatide (Integrilin). Thorac Cardiovasc Surg. 2005b;**53**(2):80-84.
- Straub A, Wendel HP, Azevedo R, Ziemer G. The GP IIb/IIIa inhibitor Abciximab (ReoPro) decreases activation and interaction of platelets and leukocytes during in vitro cardiopulmonary bypass simulation. Eur J Cardiothorac Surg. 2005a;**27**(4):617-621.
- Suzuki Y, Hillyer P, Miyamoto S, Niewiarowski S, Sun L, Rao AK, Hollenbach S, Edmunds LH Jr. Integrilin prevents prolonged bleeding times after cardiopulmonary bypass. Ann Thorac Surg. 1998;**66**(2):373-381.
- Tassani P, Barankay A, Haas F, Paek SU, Heilmaier M, Hess J, Lange R, Richter JA. Cardiac surgery with deep hypothermic circulatory arrest produces less systemic inflammatory response than low-flow cardiopulmonary bypass in newborns. J Thorac Cardiovasc Surg. 2002;**123**(4):648-654.
- Taylor KM. Brain damage during cardiopulmonary bypass. Ann Thorac Surg. 1998;**65**(4):20-28.
- Tönz M, Mihaljevic T, Pasic M, von Segesser LK, Turina M. Is normothermic cardiopulmonary bypass associated with increased morbidity?" Helv Chir Acta. 1993;**60**(3):387-391.
- Topol EJ, Byzova TV, and Plow EF. Platelet GPIIb-IIIa blockers. Lancet. 1999;**353**(9148):227-231.
- Vorchheimer DA, Badimon JJ, Fuster V. Platelet Glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonists in cardiovascular disease. JAMA. 1999;**281**(15): 1407-1414.
- Weerashinghe A, Taylor KM. The platelet in cardiopulmonary bypass. Ann Thorac Surg. 1998;**66**(6):2145-2152.
- Westaby S, Forni A, Dunning J, Giannopoulos N, O'Regan D, Drossos G, Pillai R. Aprotinin and bleeding in profoundly hypothermic perfusion. Eur J Cardiothorac Surg. 1994;**8**(2): 82-86.

Wilkerson MJ. Principles of Flow Cytometry and Cell Sorting. 1992; Middletown WI, USA, American College of Veterinary Pathologists & American Society for Veterinary Clinical Pathology.

Zhang JN, Wood J, Bergeron AL, McBride L, Ball L, Yu Q, Pusiteri AE, Holcomb JB, Dong JF. Effects of low temperature on shear-induced platelet aggregation and activation. J Trauma. 2004;**57**(2):216-223.

## 7. Anhang

### 7.1 Publikationen

**Straub A, Azevedo R, Beierlein W, Wendel HP, Dietz K, Ziemer G.**

Tirofiban (Aggrastat) protects platelets and decreases platelet-granulocyte binding in an extracorporeal circulation model  
Thorac Cardiovasc Surg. 2006 Apr; 54(3): 162-7.

**Straub A, Azevedo R, Beierlein W, Wendel HP, Dietz K, Ziemer G.**

Glycoprotein IIb/IIIa inhibition reduces prothrombotic events under conditions of deep hypothermic circulatory arrest.  
Thromb Haemost. 2005 Jul; 94(1):115-22.

**Straub A, Azevedo R, Beierlein W, Wendel HP, Scheule AM, Ziemer G.**

Hypothermia-induced platelet aggregation: no effect of aprotinin (Trasylol) but inhibition by eptifibatid (Integrilin).  
Thorac Cardiovasc Surg. 2005 Apr; 53(2):80-4

**Straub A, Wendel HP, Azevedo R, Ziemer G.**

The GP IIb/IIIa inhibitor Abciximab (ReoPro) decreases activation and interaction of platelets and leukocytes during in vitro cardiopulmonary bypass simulation.  
Eur J Cardiothorac Surg. 2005 Apr; 27(4):617-21

## 7.2 Eidesstaatliche Erklärung

„Ich erkläre hiermit, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen zur Promotion eingereichte Arbeit mit dem Titel:

**„*Prothrombotische und proinflammatorische Ereignisse im Herz-Lungen-Maschinen-Modell: Möglichkeiten der pharmakologischen Inhibition*“**

selbständig ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Ich versichere an Eides statt, dass diese Angaben wahr sind und dass ich nichts verschwiegen habe. Mir ist bekannt, dass die falsche Abgabe einer Versicherung an Eides statt mit einer Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit einer Geldstrafe bestraft wird.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

1. Dr. med. Andreas Straub; Klinik für Thorax-, Herz- und Gefäß-Chirurgie der Eberhard-Karls-Universitätsklinik Tübingen
2. Professor Dr. K. Dietz; Institut für Medizinische Biometrie der Eberhard-Karls- Universität Tübingen

Die vorgelegte Dissertation wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt. Mit der Arbeit wurde weder ein akademischer Grad erworben noch eine staatliche Prüfung absolviert.

Den Grad eines Dr. med. habe ich noch nicht erhalten.

Mir ist bekannt, dass falsche oder unvollständige Angaben zur Folge haben können, dass die Fakultät ein Verfahren zur Entziehung eines eventuell verliehenen akademischen Titels einleitet.

-----  
Ort, Datum, Name

### 7.3 Danksagung

Zum Abschluss meiner Arbeit möchte ich mich ganz besonders bei meinem Doktorvater Professor Dr. med. Dr. h. c. G. Ziemer recht herzlich für das Ermöglichen dieser wissenschaftlichen Arbeit bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich bei meinem Mentor, Betreuer und Vorbild Dr. med. Andreas Straub über die Einarbeitung und ständige Hilfestellung bedanken. Er hat diese Arbeit mit seinen Ideen, seiner Geduld und Erfahrung und vielen interessanten Diskussionen immer wieder vorangetrieben, und darüber hinaus hatte er stets ein offenes Ohr für alle anfallenden Probleme. Er gab mir immer wieder die Gelegenheit meine eigenen Vorstellungen umzusetzen. Für diese Freiheiten bin ich dir sehr dankbar. Ich wünsch deiner kleinen Familie und dir für eure gemeinsame Zukunft nur das Beste!

Meinen Eltern und Großeltern, aber auch dem Rest meiner großen Familie danke ich für die langjährige Unterstützung, die mein Studium und damit auch diese Arbeit überhaupt erst ermöglichten.

Meinen Freunden, und hier speziell Martin und Vasco, danke ich für die mentalen Unterstützungen.

Sehr viel Dank schulde ich dem kompletten Team des Forschungslabors der Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie in Tübingen.

Ein spezielles Dankeschön möchte ich dem vor kurzem verstorbenen Dr. med. Wolfram Beierlein widmen. Er war derjenige, der mein Interesse an dem Fachgebiet der Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie weckte, und der mir darüber hinaus zeigen konnte, dass der Weg den ich gehe, der richtige sein wird....Vielen Dank! Du wirst mir immer in Erinnerung bleiben.

All den Personen die meine Arbeit Korrektur gelesen haben danke ich zutiefst!

Zum Schluss sind noch alle freiwilligen Probanden zu erwähnen, ohne die keine Forschungsarbeit möglich gewesen wäre. Danke.

## 7.4 Lebenslauf

### Persönliche Daten

---

Geburtsdatum	31.05.1981
Geburtsort	Ulm/Söflingen
Staatsangehörigkeit	portugiesisch
Familienstand	ledig, keine Kinder
Religion	katholisch

### Schulbildung

---

07.1987 - 06.1991	Grundschule Mittelstadt
08.1991 - 06.2000	Gymnasium Rommelsbach, Abschluss mit dem Abitur, Note: 1,9
07.1987 - 07.1996	Parallel zur deutschen Schule Besuch der portugiesischen Schule Reutlingen, Abschluss mit der Note 1

### Studium

---

10.2000 – 11.2006	Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
09.09.2002	Physikum nach alter AO
14.11.2006	2. Ärztliche Prüfung nach neuer AO, Abschluss mit der Note 2

### Famulaturen

---

02.2003	Innere Medizin, Klinikum am Steinenberg, Reutlingen
03.2004	Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie, Universitätsklinikum Tübingen
08.2004	Allgemein-, Unfall- und Gefäßchirurgie, Praxis- und Klinik im Kronprinzenbau, Reutlingen
02.2005	Innere Medizin, Krankenhaus Porz am Rhein, Köln

**Praktisches Jahr**

---

08.2005	Chirurgie, Klinikum am Steinenberg, Reutlingen
12.2005	Orthopädie, Universitätsklinikum Tübingen
04.2006	Innere Medizin, Klinikum am Steinenberg, Reutlingen

**Dissertation**

---

02.2004 - 01.2008	Prothrombotische und proinflammatorische Ereignisse im Herz-Lungen-Maschinenmodell – Möglichkeiten der pharmakologischen Inhibition Doktorvater: Prof. Dr. med. Dr. h.c. G. Ziemer Betreuer: Dr. A. Straub
-------------------	--

**Sonstige fachspezifische Tätigkeiten**

---

06.2001 - 12.2001	Krankenpflege-Aushilfskraft im Krankenhaus Reutlingen
07.2003 - 06.2004	wissenschaftliche Hilfskraft im Forschungslabor der Klinik für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie (Universitätsklinikum Tübingen)

**Beruflicher Werdegang**

---

01.2007 - 09.2007	Assistenzarzt in der St.Anna-Klinik in 44649 Herne; Zentrum für Unfallchirurgie und Orthopädie unter der Leitung von Professor Dr. med. G. Godolias
Seit 10.2007	Assistenzarzt im Klinikum am Steinenberg in 72764 Reutlingen; Im Rahmen des Common Trunk derzeit in der Gefäßchirurgie unter der Leitung von Chefarzt Dr. med. R. Claußnitzer tätig.