Aus der Universitätsklinik für Thorax-, Herz- und
Gefäß- Chirurgie der Universität Tübingen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. Dr. h. c. G. Ziemer

Genexpressionsanalysen zur Hämokompatibilität von Fremdoberflächen bei Operationen mit extrakorporaler Zirkulation

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
der Eberhard Karls Universität zu Tübingen

vorgelegt von
JOERG SEEBURGER, geb. Weinmann
aus Bisidimo/ Äthiopien
2005

Dekan:	Professor Dr. C. D. Claussen
1. Berichterstatter:	Professor Dr. H. Aebert
2. Berichterstatter:	Privatdozent Dr. C. Herdeg

Gewidmet
meiner Frau Verena
und meinen Kindern.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung ---------- 1
1.1 Fragestellung ---------- 2

2 Patienten und Methoden ---------- 3
2.1 Studiendesign ---------- 3
2.2 Erfassung klinischer, laborchemischer und biochemischer Daten ---------- 4
2.2.1 Klinische Daten ---------- 4
2.2.2 Laborchemische und biochemische Daten ---------- 4
2.2.3 Statistische Auswertung der klinischen, laborchemischen und biochemischen Daten ---------- 5
2.3 DNA-Microarrays zur Genexpressionsanalyse in Leukozyten ---------- 5
2.3.1 Isolation leukozytärer Gesamt-RNA, cDNA-Synthese und Biotin-Markierung --- 5
2.3.2 Microarray Hybridisierung und Signal Auswertung ---------- 6
2.3.3 Statistische Auswertung der Microarray-Daten ---------- 6
2.3.3.1 „Present-Call“ Filter ---------- 6
2.3.3.2 „Signal-to-Noise Ratio“ ---------- 6
2.3.3.3 Statistische Auswertung innerhalb der Gruppen ---------- 6
2.3.3.4 Statistische Auswertung zwischen den Gruppen ---------- 7
2.3.3.5 MAPPFinder ---------- 7
2.3.3.6 Software ---------- 8
2.4 RealTime-PCR zur Analyse monozytärer Zytokinexpression und Verifizierung der Microarray-Daten ---------- 8
2.4.1 Isolation monozytärer Gesamt-RNA und cDNA-Synthese ---------- 8
2.4.2 Isolation leukozytärer Gesamt-RNA und cDNA-Synthese ---------- 9
2.4.3 Primer für die RealTime-PCR ---------- 9
2.4.4 RealTime-PCR ---------- 10
2.4.5 Statistische Auswertung der RealTime-PCR-Daten ---------- 10
2.4.6 Software ---------- 10

2.5 Funktionelle Zuordnung und Klassifikation der Gene ---------- 10
2.6 Sprache und Nomenklatur ---------- 10

3 Ergebnisse ---------- 12
3.1 Klinische Ergebnisse ---------- 12
3.2 Laborchemische und biochemische Ergebnisse ---------- 12
3.3 DNA-Microarray-Ergebnisse ---------- 13
3.3.1 „Present-Call“ Filter ---------- 13
3.3.2 „Signal-to-Noise Ratio“ ---------- 13
3.3.3 Perioperative Expressionsveränderung einzelner Gene in Leukozyten ---------- 14
3.3.3.1 Veränderung der Genexpression innerhalb der Gruppen ---------- 14
3.3.3.2 Veränderung der Genexpression zwischen den Gruppen ---------- 14
3.3.4 Perioperative Veränderung der Expression von „Gene Pathways“ in Leukozyten 15
3.3.5 Verifizierung der Microarray-Ergebnisse ---------- 15
3.4 Ergebnisse der monozytären Zytokinexpression ---------- 16

4 Diskussion ---------- 17
4.1 Diskussion der eigenen Ergebnisse ---------- 19
4.1.1 Klinische Befunde ---------- 20
4.1.2 Laborchemische und biochemische Befunde ---------- 20
4.1.3 Befunde der Genexpressionsanalysen ---------- 21
4.1.3.1 Einzelne Gene ---------- 21
4.1.3.2 „Gene Pathways“ ---------- 23
4.2 Diskussion der Methoden ---------- 24
4.3 Bedeutung der eigenen Ergebnisse ---------- 25
4.4 Ausblick ---------- 26

5 Zusammenfassung ---------- 28

6 Tabellen und Abbildungen ---------- 29

7 Literaturverzeichnis ---------- 58

Publikation und Präsentation

Danksagung

Lebenslauf

1 Einleitung

Im Rahmen der extrakorporalen Zirkulation (EKZ) kommt es zu einer ausgeprägten systemischen Ganzkörperentzündungsreaktion.[10,27] Diese beruht insbesondere auf der Interaktion von Blut mit den künstlichen Oberflächen der EKZ, in deren Folge auf plasmatischer Ebene die Kontaktphase sowie die extrinsische und intrinsische Gerinnung und das Fibrinolysesystem aktiviert wird.[13] Auf zellulärer Ebene spielen vor allem neutrophile Granulozyten und Monozyten eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und Aufrechterhaltung entzündlicher Reaktionen nach EKZ.[13] Die an der artifiziellen Oberfläche aktivierten neutrophilen Granulozyten sind durch Freisetzung zytotoxischer Enzyme und freier Radikale sowie durch das komplexe Zusammenspiel mit dem Gefäßendothel maßgeblich an der pro-inflammatorischen Reaktion nach EKZ beteiligt und stellen einen Hauptansatzpunkt der Bestrebungen zur Abmilderung der EKZ-assoziierten entzündlichen Reaktionen dar.[13,19,32] Die ebenfalls an der Fremdoberfläche der EKZ aktivierten Monozyten wirken aufgrund der verstärkten Expression der Zytokine IL-6 und IL-8 pro-inflammatorisch. Sie bewirken eine gesteigerte Chemotaxis neutrophiler Granulozyten und eine Aktivierung von B- und T-Zell-Lymphozyten.[20,35] Zudem entfalten sie durch Freisetzung des Tissue Factor (TF) eine pro-koagulatorische Wirkung.[13]

Die Folge dieser komplexen plasmatischen und zellulären Reaktionen im Rahmen der EKZ sind Funktionsstörungen in nahezu allen Organen. Im Hinblick auf das Herz-Kreislauf-System hervorzuheben ist zum einen das „Kapillar-Leck-Syndrom“ mit erhöhter Permeabilität des Gefäßendothels und Ödembildung und zum anderen eine verminderte myokardiale Kontraktilität.[10,16,30]

Einen Ansatz zur Reduzierung der Nebenwirkungen der EKZ bieten Modifikationen der artifiziellen Oberflächen mit verschiedenen hämokompatiblen Substanzen.[18,38] Durch die Beschichtung mit Heparin wurde eine Reduzierung der Aktivität neutrophiler Granulozyten, des Komplementsystems und der Zytokinexpression erreicht.[37,39] Zudem zeigten Monozyten in vitro eine direkt von der Oberfläche abhängige Zytokinexpression.[36] Zu der neuartigen Oberflächenbeschichtung mit rekombinantem Albumin liegen bisher wenige Daten vor.[14]

Es ist anzunehmen, dass die komplexen Aktivierungsvorgänge im Rahmen der EKZ zu einer ausgeprägten Veränderung auf Ebene der Genexpression in Leukozyten führen. Kenntnisse darüber sind bisher jedoch sehr begrenzt. In diesem Zusammenhang könnten sich durch die Anwendung von DNA-Microarrays, die die Darstellung der Expression von Tausenden von Genen ermöglichen,[12] neue Erkenntnisse ergeben.

1.1 Fragestellung

Die vorliegende Studie soll die EKZ-bedingten Veränderungen der leukozytären sowie monozytären Genexpression eingehend analysieren und mögliche Differenzen zwischen der Heparin- und Proteinbeschichtung aufzeigen. Zudem soll zur weiterführenden Klärung inflammatorischer Reaktionen auf molekularer Ebene beigetragen und deren Auswirkungen auf den klinischen Verlauf der Patienten untersucht werden.

2 Patienten und Methoden

2.1 Studiendesign

In einer prospektiven, randomisierten und doppelblinden Vergleichsstudie wurden zwei unterschiedliche Oberflächenbeschichtungen der EKZ untersucht. Die Genehmigung der Ethikkommission lag vor und die Patienten gaben ihr schriftliches Einverständnis. 65 kaukasische Patienten, die sich einer elektiven aortokoronaren Bypassoperation (ACVB) mit Einsatz der EKZ unterzogen, wurden per Zufall entweder der Gruppe H (Heparin beschichtete EKZ-Sets; n = 34) oder der Gruppe P (Protein beschichtete EKZ-Sets; n = 31) zugeteilt.

Ausschlusskriterien waren: Ejektionsfraktion < 30 %, links ventrikulärer enddiastolischer Druck (LVEDD) > 20 mmHg, pulmonäre, renale oder hepatische Insuffizienz, Insulin abhängiger Diabetes mellitus (IDDM), akute Infektionen, Adipositas (Body mass index ≥ 30), Notfall- und Reoperationen sowie Einnahme von Aspirin weniger als fünf Tage präoperativ.

Alle Patienten erhielten die gleiche intra- und perioperative Behandlung. Die EKZ bestand aus folgenden Komponenten: der Typ S II Pumpe (Stoeckert, Berlin, Deutschland), dem QUADROX HMO 1010 Oxygenator, dem arteriellen Filter Quart, dem VHK 4201 Reservoir und einem standardmäßigen Schlauchsystem (alle Komponenten von Maquet, Hirrlingen, Deutschland).

In Gruppe H waren sämtliche Komponenten der EKZ mit Bioline-Coating (Maquet, Hirrlingen, Deutschland) beschichtet. Bei diesem Beschichtungssystem werden Heparinmoleküle durch kovalente Bindungen und ionische Interaktionen stabil an der Polypeptidoberfläche fixiert.[4,24] In Gruppe P war die gesamte Oberfläche der EKZ mit dem Safeline-Treatment (Maquet, Hirrlingen, Deutschland) beschichtet. Dabei handelt es sich um rekombinantes Albumin, das durch van der Waalsche und elektrostatische Kräfte stabil an die Polypropyleneoberflächen der EKZ gebunden ist.[4]

Die Anästhesie wurde mit Propofol (6 – 12 mg/kg), Sufentanyl (0,15 – 0,7 µg/kg), Rocuronium (0,3 – 0,6 mg/kg) und Sevofluran (low flow) durchgeführt. Die „Activated Clotting Time“ (ACT) wurde nach Gabe von initial 300 IE/kg Heparin über 400 s gehalten.

Systemische milde Hypothermie von minimal 30° C und kalte Blutkardioplegie wurden verwendet.

Arterielle Blutproben wurden nach Einleitung der Narkose, aber vor Hautschnitt, 20 min nach Beginn der EKZ, bei Ende der EKZ, sowie 6 h, 24 h und 72 h nach Ende der EKZ entnommen. Die Patienten wurden bis zum Tag der Entlassung aus der Klinik nachbeobachtet.

2.2 Erfassung klinischer, laborchemischer und biochemischer Daten

2.2.1 Klinische Daten

Die demographischen Daten (Alter, Risikofaktoren, Ausprägung der koronaren Herzkrankheit) wurden aus den Befunden in der Patientenakte übernommen. Die Körperoberfläche (KOF) wurde aus den Daten der Abteilung für Kardiotechnik entnommen.

Die den intraoperativen Verlauf kennzeichnenden Daten (EKZ-Dauer, Aortenklemmzeit, Reperfusionszeit, EKZ-Flow, ACT, Hämatokrit) wurden von der Abteilung für Kardiotechnik aufgezeichnet und von dort übernommen. Die jeweils durchgeführte Operation wurde vom Operateur im OP-Protokoll dokumentiert und die notwendigen Informationen (Anzahl der distalen Anastomosen, Verwendung der Arteria mammaria interna, Revisionen, Todesfälle) konnten diesem entnommen werden.

Der postoperative Verlauf der Patienten wurde ausführlich in den Patientenkurven (Förderungsmenge der Thoraxdrainage) und mit Hilfe des Softwareprogramms Care-Vue der Anästhesiologischen Abteilung (Transfusionsmenge, Beatmungsdauer, Katecholamingabe, Dauer des Aufenthaltes auf der Intensivstation) dokumentiert.

2.2.2 Laborchemische und biochemische Daten

Die Werte der laborchemischen und biochemischen Parameter (Differentialblutbild, partielle Thromboplastinzeit (PTT), Serumkreatinin, Glutamin-Oxalat-Transaminase (GOT), Glutamin-Pyruvat-Transaminase (GPT), Creatinkinase (CK und CK-MB), Laktatdehydrogenase (LDH), C-reaktives Protein (CRP)) wurden aus den Blutproben der

Studienpatienten im Zentrallabor der Klinik bestimmt und konnten von dort übernommen werden.

2.2.3 Statische Auswertung der klinischen, laborchemischen und biochemischen Daten

Die klinischen Daten wurden mittels des t-Test für ungepaarte Stichproben bei einem Signifikanzniveau von $p < 0.05$ getestet. Die laborchemischen und biochemischen Daten wurden innerhalb der Gruppen mittels des t-Tests für gepaarte Stichproben und zwischen den Gruppen mittels des t-Tests für ungepaarte Stichproben jeweils auf einem Signifikanzniveau von $p < 0.05$ getestet.

2.3 DNA-Microarrays zur Genexpressionsanalyse in Leukozyten

Die Microarray-Analysen wurden zur Bestimmung der Genexpression in zirkulierenden Leukozyten präoperativ sowie 6 h nach Ende der EKZ bei jeweils sechs Patienten einer Gruppe durchgeführt.

2.3.1 Isolation leukozytärer Gesamt-RNA, cDNA-Synthese und Biotin-Markierung

Leukozyten wurden durch Zentrifugation für 25 min bei 400 g direkt nach Blutprobenentnahme isoliert. Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte unmittelbar nach Zellseparation (Rneasy Midi Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland). Diese wurde unter Anwendung des Filtersystems Microcon YM-30® (Amicon, Billerica, MA, USA) durch Zentrifugation für 8 min bei 8000 g auf eine Konzentration von 500 – 1000 µg/ml eingestellt (Spektrophotometrie: A_{260}/A_{280} zwischen 1.7 – 2). Die Qualität der RNA wurde mittels routinemäßiger Acrylamidgel-Elektrophorese überprüft. Für die cDNA-Synthese wurden 10 ng der leukozytären RNA verwendet (Superscript II, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Die cRNA wurde mit Biotin mittels in vitro Transkription markiert (BioArray High Yield RNA Transcript Labeling Kit, Enzo Biochemicals, Farmingdale, NY, USA).

2.3.2 Microarray Hybridisierung und Signal Auswertung

Nach induzierter Fragmentation bei 94° C für 35 min, wurden 15 µg Biotin-markierter cRNA mit eukaryotischen Kontrollen vermischt und auf dem Human Genome Chip U133A (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA) für 16 h bei 45° C in einem rotierenden Ofen (60 U/min) hybridisiert. Diese DNA-Microarrays ermöglichen die simultane Analyse der Expression von 22.283 Genen. Die cRNA wurde nach anschließendem Waschen und Färben mit Streptavidin gekoppeltem Phycoerythrin (Molecular Probes, Eugen, OR, USA) mit der Affymetrix Fluidic Station detektiert und die Analyse mit dem Affymetrix Scanner komplettiert. Mit der Affymetrix Microarray Suite (v5.0) wurde die relative Menge jedes Gens aufgrund der Signalintensität des „Probe Sets“ bestimmt. Anschließend wurden die Daten in das Microarray Data Mining Tool eingelesen und für die statistische Auswertung bereitgestellt. Die Microarray Analysen wurden entsprechend den Vorgaben der “minimum information about a microarray experiment” (MIAME) durchgeführt.[9]

2.3.3 Statistische Auswertung der Microarray-Daten

2.3.3.1 „Present-Call” Filter

Der so genannte „Present-Call“ Filter zählt das Vorkommen von „korrekten“ Hybridisierungen auf den Microarrays und ermöglicht so eine Auswertung und Beurteilung der Funktion von Microarrays.[6]

2.3.3.2 „Signal-to-Noise Ratio“

Die „Signal-to-Noise Ratio“ (SNR) bezieht sich auf das „Multiple Testing Problem“, das durch wiederholtes Testen von 22.283 Genen auf einem bestimmten Signifikanzniveau entsteht. Anhand dieser Ratio kann eine Aussage über die Verhältnismäßigkeit und Zuverlässigkeit der statistischen Auswertung getroffen werden.[23]

2.3.3.3 Statistische Auswertung innerhalb der Gruppen

Die Methoden A und B beziehen sich auf die Veränderung der Genexpression innerhalb der Gruppen (präoperativ versus postoperativ). Methode A diente zur Identifikation signifikanter Unterschiede von „Probe Sets“ (bezeichnet die zur Bestimmung eines Gens

notwendigen Oligonukleotidsequenzen mit internen „match“ und „mismatch“ Kontrollen) unter Anwendung des gepaarten t-Test, wobei die präoperative Expression als Kontrolle herangezogen wurde. Die parametrische Verteilung der Microarray-Daten wurde mit dem Shapiro-Wilk Test für Normalverteilung bestätigt. Es wurden drei verschiedene p-Werte für hoch- und herunterregulierte Gene ausgewählt: 0.05, 0.01, und 0.001. Anhand der Methode B wurden die Gene identifiziert, die eine 1.2-, 1.5-, 2-, 4-, oder 6-fache postoperative Veränderung der Expression („fold change“: fc) im Vergleich zu präoperativ zeigten. Letztendlich wurden nur diejenigen Gene ausgewertet, die sowohl eine signifikante Veränderung ($p < 0.05$) als auch eine mindestens 4-fache Veränderung der Expression zeigten.

2.3.3.4 Statistische Auswertung zwischen den Gruppen

Die Methoden C und D beziehen sich auf die Veränderung der Genexpression zwischen den Gruppen (Gruppe H versus Gruppe P). Methode C diente zur Identifikation der relativen Signalintensitäten von „Probe Sets“ durch Subtraktion der präoperativen von den postoperativen Signalwerten. Die relativen Signalintensitäten der Gruppen wurden unter Anwendung des ungepaarten t-Tests auf einem Signifikanzniveau von $p < 0.05$ miteinander verglichen. Mit der Methode D wurde die differentielle Expression (Δ-Expression) zwischen den Gruppen durch Subtraktion der relativen Signalintensitäten voneinander ermittelt. Letztendlich wurden nur diejenigen Gene ausgewertet, die sowohl einen signifikanten Unterschied der relativen Signalintensitäten ($p < 0.05$) als auch eine Δ-Expression > 0.4 zeigten.

2.3.3.5 MAPPFinder

Die Software Micro-Array-Gene-Pathway-Profile-Finder (MAPPFinder, Gladstone Institute, San Francisco, CA, USA) ermöglicht die Erstellung von Genexpressionsprofilen durch die Verknüpfung von Microarray-Daten mit der Datenbank des Gene Ontology Project (GO; Abb. 1).[11,31] Das Programm berechnet auf der Grundlage der vorliegenden Microarray-Daten für jeden Signalweg („Gene Pathway“ oder „GO term“) einen z score und ermöglicht so eine Aussage über den relativen Anteil der Expressionsveränderungen

innerhalb eines „Gene Pathways“ (Abb. 2).[11] Ein positiver z score zeigt diejenigen „Gene Pathways“ an, die eine größere Zahl an differenziell exprimierten Genen als per Zufall erwartet, aufweisen. Die MAPPFinder-Auswertungen wurden innerhalb der Gruppen anhand folgender Auswahlkriterien durchgeführt: entweder eine Zunahme (fold change > 1.2 und $p < 0.05$) oder Abnahme (fold change < 1/1.2 und $p < 0.05$) der Genexpression in Leukozyten 6 h nach Ende der EKZ im Vergleich zu präoperativ.

2.3.3.6 Software

Die statistische Auswertung der Microarray-Daten erfolgte mit JMP (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) und Excel (Microsoft, Redwood, WA, USA). Zudem wurde die Software MAPPFinder 1.0 beta (Gladstone Institute, San Francisco, CA, USA) eingesetzt.

2.4 RealTime-PCR zur Analyse monozytärer Zytokinexpression und Verifizierung der Microarray-Daten

Die RT-PCR wurde zur Bestimmung der Expression von TNF-α, IL-1ß, IL-6 und IL-8 in zirkulierenden Monozyten präoperativ, 20 min nach Beginn der EKZ, bei Ende der EKZ, sowie 6 h, 24 h und 72 h nach Ende der EKZ bei jeweils sechs Patienten einer Gruppe (siehe 2.3) durchgeführt.

Zudem wurden die Ergebnisse der Microarray-Analysen für die Gene PXN, LEF1, MATN3 und NR1/2 in zirkulierenden Leukozyten beider Patientengruppen präoperativ sowie 6 h nach Ende der EKZ mit RT-PCR verifiziert.

2.4.1 Isolation monozytärer Gesamt-RNA und cDNA-Synthese

Monozyten wurden mittels immunomagnetischer Separation mit dem Monocyte mRNA Isolation Kit, Dynabeads M-450 CD-14 (Dynal, Oslo, Norwegen) aus den Blutproben isoliert. Die Extraktion monozytärer RNA erfolgte mit dem Monocyte mRNA Isolation Kit/ Dynabeads Oligo (dT_{25}) (Dynal, Oslo, Norwegen). Zur cDNA-Synthese wurde das

Verfahren SuperScript II (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) angewendet. Die Einzelheiten zur Durchführung werden an anderer Stelle detailliert beschrieben.[41]

2.4.2 Isolation leukozytärer Gesamt-RNA und cDNA-Synthese

Die Gesamt-RNA-Isolierung erfolgte unmittelbar nach Zellseparation durch Zentrifugation für 25 min bei 400 g (Rneasy Midi Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland). Für die cDNA-Synthese wurde das Verfahren Superscript II (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) verwendet.

2.4.3 Primer für die RealTime-PCR

Die Primer zur Bestimmung der monozytären Zytokine TNF-α, IL-1ß, IL-6 und IL-8, sowie zur Verifizierung der Microarray-Daten für die Gene PXN, LEF1, MATN3 und NR1/2 wurden mit der Software Primer 3 (Whitehead Institute, Center for Genome Research, Cambridge, MA, USA) und Primer Premier 5 (Premier Biosoft International, Palo Alto, CA, USA) konstruiert. GAPDH diente als Housekeeping Gen.

Es wurden folgende Primer verwendet: TNF-α forward 5’ CCGTCTCCTACCAGAC-CAAGG 3’ und reverse 5’ CTGGAAGACCCCTCCCAGATAG 3’, IL-1ß forward 5’ CC-CACAGACCTTCCAGGAGA 3’ und reverse 5’ CGGAGCGTGCAGTTCAGT G 3’, IL-6 forward 5’ CACACAGACAGCCACTCACCT C 3’ und reverse 5’ CTGCCAGTGCCTCT-TTGCTG 3’, IL-8 forward 5’ GACTTCCAAGCTGGCCGTG 3´ und reverse 5’ CTCCTT-GGCAAAACTGCACC 3’, PXN forward 5’-GAGCTGATGGCTTCGCTGTC-3’ und reverse 5’-ATGAACCCTCCCTCGTCCTG-3’, LEF1 forward 5’-CTCTTGGCTGGCAA-GGTCAG-3’ und reverse 5’-CAGTTGTGTGGGGACCAGGA-3’, MATN3 forward 5’-TGAGCCCCTAGAGGAGCATG-3’ und reverse 5’-GGCACTGGTGTGTTCCAAGC-3’, NR1/2 forward 5’-CCCATCGAGGGAAGAAGCTG-3’ und reverse 5’-GGCTGGGGGTT-TGTAGTTCC-3’ sowie GAPDH forward 5’-TCAACAGCGACACCCACTCC-3’ und reverse 5’-TGAGGTCCACCACCCTGTTG-3’.

2.4.4 RealTime-PCR

Die RT-PCR-Bestimmungen erfolgten in einem iCycler (Biorad, Hercules, CA, USA). GAPDH wurde als Housekeeping Gen etabliert. Das weitere Vorgehen und die Auswertung wurden durchgeführt wie andernorts beschrieben.[41]

2.4.5 Statistische Auswertung der RealTime-PCR-Daten

Die Daten wurden mittels des t-Test für gepaarte bzw. ungepaarte Stichproben auf signifikante Unterschiede innerhalb und zwischen den Gruppen auf einem Signifikanzniveau von $p < 0.05$ getestet.

2.4.6 Software

Die statistische Auswertung der RT-PCR-Daten erfolgte mit JMP (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) sowie Excel und REST-XL (Microsoft, Redwood, WA, USA).

2.5 Funktionelle Zuordnung und Klassifikation der Gene

Die im Rahmen der Microarray-Analysen ermittelten Gene werden anhand des Gen-Namens oder Gen-Symbols, der Locus Link Kennziffer, der Expression Ratio oder Δ-Expression sowie der Gen Funktion aufgeführt. Die jeweils angegebene Funktion der Gene basiert auf der Auswertung gängiger Literatur sowie der Beiträge in „online Mendelian Inheritance in Man“ (OMIM) und Locus Link.[5]

2.6 Sprache und Nomenklatur

Zur Vermeidung von Missverständnissen wurden die in vorliegender Arbeit aufgeführten Gene sowie Signalwege („Gene Pathway“ oder „GO term“) mit den international üblichen, englischen Namen bezeichnet. Ebenso wurde auf eine Übersetzung der Ausführungen zu den spezifischen Funktionen der genannten Gene und Signalwege ins Deutsche verzichtet. Ebenfalls wurden feststehende Begriffe wie „Probe Set“, „fold change“, „Present-Call“ etc.

nicht ins Deutsche übersetzt. Diese Begriffe könnten in deutscher Übersetzung möglicherweise nicht eindeutig in ihren originären Kontext gebracht werden. Zudem ist ihr Gebrauch im Deutschen weitgehend üblich.

3 Ergebnisse

3.1 Klinische Ergebnisse

Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Gruppe H (n = 34) und Gruppe P (n = 31) in Bezug auf demographische und perioperative Daten beobachtet werden (Tab. 1). Es zeigten insbesondere die EKZ-Dauer, die Aortenklemmzeit, die Reperfusionsdauer, die postoperative Blutungsmenge über die Thoraxdrainagen, die Intubations- und Beatmungsdauer, die Transfusionsmenge, die medikamentöse Inotropie sowie die Dauer der Überwachung auf der Intensivstation keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Tab. 1).

Auffallend ist jedoch die Anzahl von vier Revisionen in Gruppe H, entgegen nur zwei Revisionen in Gruppe P. Die Gründe hierfür waren in Gruppe H zwei Fälle mit „Low-Cardiac-Output"-Syndrom, wobei einer der Patienten in tabula verstarb, zudem ein Fall mit postoperativen Herzrhythmusstörungen mit letaler Folge und ein Fall mit postoperativer Blutung. In Gruppe P kam es in einem Fall ebenfalls zum „Low-Cardiac-Output"-Syndrom mit der Notwendigkeit weiterer aortokoronarer Anastomosen. Im zweiten Fall musste wegen einer postoperativen Blutung revidiert werden.

3.2 Laborchemische und biochemische Ergebnisse

Laborchemisch fiel eine deutliche und anhaltende Zunahme der Leukozytenzahl bei Ende der EKZ auf größer 10.000 /µl nach initialem Abfall auf 5000 /µl in beiden Gruppen auf ($p < 0.05$; Abb. 3). Bei Betrachtung des Differentialblutbildes zeigte sich initial eine deutliche Zunahme der Konzentration neutrophiler Granulozyten von präoperativ 60 % auf 90 % 6 h nach EKZ ($p < 0.05$; Abb. 4), dem entgegengesetzt ein bei Ende der EKZ beginnender Abfall der Konzentration von Lymphozyten von initial 20 % auf unter 10 % 6 h nach EKZ ($p < 0.05$; Abb. 5). Die Lymphozytenzahl 6 h nach EKZ zeigte einen signifikant niedrigeren Wert in Gruppe H im Vergleich zu Gruppe P ($p < 0.05$; Abb. 5). Ein ähnlicher Verlauf wurde für die Konzentration der Monozyten beobachtet ($p < 0.05$; Abb. 6).

Die Bestimmung der partiellen Thromboplastinzeit (PTT) zeigte im Verlauf bis 72 h nach EKZ signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen ($p < 0.05$), sowie 24 h nach Ende der EKZ eine signifikant längere PTT in Gruppe H ($p < 0.05$; Abb. 7).
Die Parameter der Nieren- und Leberfunktion (Serum-Kreatinin, GOT und GPT) zeigten im Verlauf innerhalb der Gruppen signifikante Veränderungen ($p < 0.05$), zwischen den Gruppen konnte jedoch kein signifikanter Unterschied beobachtet werden (Abb. 8 – 10).
Der CK/CK-MB Quotient nimmt im postoperativen Verlauf in beiden Gruppen stetig ab ($p < 0.05$; Abb. 11). Im Gegensatz dazu wurde eine stetige Zunahme der Aktivität der Laktatdehydrogenase (LDH) bis 24 h nach EKZ beobachtet und nachfolgend ein leichter Rückgang der Aktivität 72 h nach Ende der EKZ ($p < 0.05$; Abb. 12).
Die Konzentration des C-reaktiven Proteins zeigte einen sehr deutlichen und signifikanten, 6 h nach Ende der EKZ einsetzenden Anstieg innerhalb beider Gruppen ($p < 0.05$; Abb. 13). Des Weiteren zeigte diese bei Ende der EKZ in Gruppe H einen signifikant höheren Wert verglichen mit Gruppe P ($p < 0.05$; Abb. 13).

3.3 DNA-Microarray-Ergebnisse

Die Microarray-Analysen wurden bei zwölf der insgesamt 65 Patienten durchgeführt (Gruppe H: $n = 6$; Gruppe P: $n = 6$).

3.3.1 „Present-Call“ Filter

Es wurde ein einheitlicher Prozentsatz an „Present-Calls“ in Gruppe H (12 Microarrays, 39.1 % ± 3.2 % (Mittelwert ± Standardabweichung)) und Gruppe P (12 Microarrays, 39.4 % ± 2.8 %) beobachtet.

3.3.2 „Signal-to-Noise Ratio“

Die SNR belief sich auf 4.23 bei $p < 0.05$, 8.97 bei $p < 0.01$ und 10.7 bei $p < 0.001$ in Gruppe H. In Gruppe P zeigte sich jeweils eine deutlich geringere SNR mit 2.05 bei $p < 0.05$, 1.47 bei $p < 0.01$ und 0.65 bei $p < 0.001$.

3.3.3 Perioperative Expressionsveränderung von einzelnen Genen in Leukozyten

Insgesamt war die Anzahl der differentiell exprimierten Gene in Gruppe H deutlich größer als in Gruppe P, ungeachtet ob die Gene anhand ihres p-Wertes ($p < 0.001$; Abb. 14 und 15) oder „fold change“ ($p < 0.05$; Abb. 16 und 17) dargestellt wurden.

3.3.3.1 Veränderung der Genexpression innerhalb der Gruppen

Entsprechend der Methoden A und B zeigten 50 Gene eine Hochregulierung in Gruppe H im Gegensatz zu nur 7 Genen in Gruppe P (Tab. 2 und 3). Ebenso wurden 27 Gene in Gruppe H herunterreguliert im Vergleich zu nur 7 Genen in Gruppe P (Tab. 4 und 5).

Die insgesamt stärksten Veränderungen der Expression wurden in Gruppe H für die Gene CRISP3, PRV1 (18-fach hochreguliert) und MAP4K1 (22-fach herunterreguliert), und in Gruppe P für CD163 (4-fach hochreguliert) und wiederum MAP4K1 (6-fach herunterreguliert) beobachtet (Tab. 2 – 5).

Insbesondere zeigten in Gruppe H zahlreiche Gene stärkste Expressionsveränderungen, die funktionell im Rahmen der angeborenen Immunantwort und Inflammation (FCAR, JAK3, CD163, MAP4K1, CR1, TNFRSF 12), Apoptose und Regulierung des Zellzyklus (GADD45A, CHEK2, S100A8) sowie Angiogenese (HGF, CEACAM1) eine zentrale Rolle einnehmen (Tab. 2 und 3).

3.3.3.2 Veränderung der Genexpression zwischen den Gruppen

Entsprechend der Methoden C und D zeigten 18 Gene die größte Δ-Expression in Abhängigkeit von der EKZ-Oberfläche (Tab. 6).

Zwölf dieser Gene wurden vorwiegend in Gruppe H exprimiert. Hierunter fanden sich Gene die für Funktionsproteine der extrazellulären Signaltransduktion (MAPK12), Zell-Zell Interaktion (CDH6) und neutrophilen Chemotaxis (MCP2) kodieren. Die übrigen sechs Gene wurden dagegen vorwiegend in Gruppe P exprimiert und sind an der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-Kappa B (MINK), infolge oxidativen Stresses (TP53I11) und an der Regulation des Cytochroms P450 (NR1/2) beteiligt (Tab. 6).

3.3.4 Perioperative Expressionsveränderung von „Gene Pathways“ in Leukozyten

Die MAPPFinder-Berechnungen ergaben 1405 hochregulierte und 1454 herunterregulierte „Gene Pathways“ in Gruppe H, im Vergleich zu 552 hochregulierten und 818 herunterregulierten in Gruppe P ($p < 0.01$; Abb. 18).

Die „Gene Pathways“ „small GTPase mediated signal transduction“ ($z = 5.8$, hochreguliert) und „cytosolic ribosome“ ($z = 17.1$, herunterreguliert) zeigten den insgesamt höchsten z score innerhalb von Gruppe H (Tab. 7), gleichermaßen wie „interleukin-1 receptor antagonist“ ($z = 8.56$, hochreguliert) und „integrase“ ($z = 5.11$, herunterreguliert) innerhalb von Gruppe P (Tab. 8).

Im Überblick zeigte sich in Gruppe H eine funktionell einheitliche Regulierung der „Gene Pathways“. Insbesondere wurde hier eine Hochregulierung von „Gene Pathways“ beobachtet, die im Rahmen entzündlicher Reaktionen und im Rahmen zellulärer Reaktionen infolge von Stress von entscheidender Bedeutung sind. „Gene Pathways“, die in Zusammenhang mit Ribosomen und der Proteinbiosynthese stehen, wurden überwiegend herunterreguliert (Tab. 7). Die Analyse der „Gene Pathways“ in Gruppe P zeigte keine vergleichbar einheitliche Veränderung (Tab. 8).

3.3.5 Verifizierung der Microarray-Ergebnisse

Die Bestimmungen der Genexpression von LEF1, NR1/2, MATN3 und PXN mit DNA-Microarrays stimmte mit den RT-PCR-Bestimmungen in 93 % der Fälle (15 aus 16) überein.

Die Expression von LEF1 gemessen mit Microarrays (Gruppe H: 2.3-fach herunterreguliert, $p < 0.05$; Gruppe P: 2-fach herunterreguliert, $p < 0.05$) konnte mit RT-PCR (Gruppe H: 2.9-fach herunterreguliert; Gruppe P: 1.3-fach herunterreguliert) bestätigt werden. Ebenso zeigte die Expression von NR1/2 einheitliche Ergebnisse sowohl mit Microarrays (Gruppe H: 2.4-fach hochreguliert, $p < 0.05$; Gruppe P: 1.4-fach herunterreguliert, $p < 0.05$) als auch mit RT-PCR (Gruppe H: 5.3-fach hochreguliert, $p < 0.05$; Gruppe P: 3-fach herunterreguliert, $p < 0.01$). Die Bestimmung der Expression von MATN3 mit Microarrays (Gruppe H: 1.2-fach herunterreguliert; Gruppe P: 4.6-fach hochreguliert, $p < 0.05$) zeigte sich einheitlich zu den RT-PCR-Kontrollen (Gruppe H: 2.2-

fach herunterreguliert; Gruppe P: 1.4-fach hochreguliert). Die Microarray-Analyse von PXN (Gruppe H: 1.5-fach hochreguliert, $p < 0.01$; Gruppe P: 1.2-fach hochreguliert) zeigte eine Diskrepanz zur RT-PCR-Kontrolle (Gruppe H: 10-fach herunterreguliert; Gruppe P: 1.5-fach hochreguliert) in einem Fall auf.

3.4 Ergebnisse der monozytären Zytokinexpression

Die Bestimmung der monozytären Zytokinexpression wurde bei 12 der insgesamt 65 Patienten durchgeführt (Gruppe H: $n = 6$; Gruppe P: $n = 6$).

Die Expression von IL-1ß, IL-6, IL-8 und TNF-α in Monozyten zeigt im perioperativen Verlauf deutliche Veränderungen. Nach präoperativ geringer Expression wurde ein deutlicher Anstieg aller Zytokine zum Ende der EKZ hin beobachtet, gefolgt von einem raschen Rückgang der Expression auf das Ausgangsniveau 6 h postoperativ.

Die Expression von IL-1ß zeigte bei Ende der EKZ eine sehr starke Zunahme der Expression in Gruppe H, gefolgt von einem raschen Rückgang auf den Ausgangswert (Abb. 19).

Es wurde eine starke Zunahme der Expression von IL-6 bei Ende der EKZ in beiden Gruppen sowie ein postoperativ rasch einsetzender Rückgang beobachtet. Die statistische Auswertung ergab keine signifikanten Unterschiede sowohl innerhalb als auch zwischen den Gruppen (Abb. 20).

Die Expression von IL-8 zeigte bei Ende der EKZ innerhalb beider Gruppen (im Vergleich zur präoperativen Expression) signifikante Unterschiede ($p < 0.05$; Abb. 21). Der Vergleich zwischen den Gruppen bei Ende der EKZ ergab einen signifikant höheren Wert in Gruppe P ($p < 0.05$; Abb. 21).

Die Expression von TNF-α wies 20 min nach Beginn der EKZ eine signifikant höhere Expression in Gruppe P auf ($p < 0.05$; Abb. 22). Bei Ende der EKZ sowie 6 h nach Ende der EKZ wurden signifikante Unterschiede der Expression von TNF-α innerhalb beider Gruppen beobachtet ($p < 0.05$; Abb. 22).

4 Diskussion

Operationen am Herzen mit extrakorporaler Zirkulation sind gekennzeichnet durch eine große Anzahl von Einflussgrößen, die den perioperativen Verlauf maßgeblich beeinflussen können. Die Anwendung der EKZ selbst stellt einen entscheidenden Einflussfaktor dar, da sie zu einer Ganzkörperentzündungsreaktion führt.

So wiesen Paparello et al. auf die im Rahmen der EKZ eintretenden komplexen Mechanismen hin, die zur Aktivierung von Leukozyten und Endothelzellen führen und für die Entstehung von Dysfunktionen verschiedener Organe verantwortlich sind.[27] Cremer et al. konnten die Zunahme von pro-inflammatorisch wirksamen Mediatoren (IL-6, Neutrophilen-Elastase) infolge EKZ zeigen.[10] Edmunds gelang es die ausgeprägte Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten durch die EKZ nachzuweisen.[13] Henneien et al. verdeutlichten den Zusammenhang zwischen pro-inflammatorisch wirksamen Zytokinen und myokardialer Ischämie und Dysfunktion im Rahmen der EKZ, wobei eine positive Korrelation der Aortenklemmzeit und postoperativer Zytokinlevel festgestellt werden konnte.[20] Diesen Befunden ähnlich konnten Wan et al. eine positive Korrelation der IL-6- und IL-8-Plasmakonzentration mit der myokardialen Ischämiedauer nachweisen.[35] Die pro-inflammatorische Funktion von Leukozyten im Rahmen der EKZ konnten Hayashi et al. durch eine verminderte Komplikationsrate nach Gabe von Leukozyten-depletierter Blutkardioplegie nachweisen.[19] Die Beteiligung des Endothels an den EKZ-assoziierten entzündlichen Reaktionen durch eine verstärkte Proteinadhäsion und eine Zunahme der Permeabilität wurde von Verrier und Morgan beschrieben.[32] Dies steht in engem Zusammenhang mit der von Aebert et al. nachgewiesenen Zunahme der Apoptoserate in Endothelzellen während EKZ mit kardioplegischem Arrest.[2] Die Aktivierung der Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems an der Fremdoberfläche konnten Zimmermann et al. anhand veränderter Zytokinexpression zeigen und hoben die Bedeutung der RT-PCR als Methode des „Gene-Monitoring“ hervor.[41] Ruel et al. konnten ausgeprägte Veränderungen der Genexpression in Herzmuskelzellen nach EKZ mit kardioplegischem Arrest nachweisen.[28] Des Weiteren zeigten Bottio et al. bei aortokoronaren Bypassoperationen mit EKZ im Vergleich zu

aortokoronaren Bypassoperationen ohne EKZ ein signifikant geringeres Vorkommen postoperativer Komplikationen bei Operationen ohne EKZ.[8]

Die Beteiligung der EKZ an der Entstehung perioperativer Entzündungsreaktionen und postoperativer Komplikationen ist folglich unbestritten, die Bedeutung und der Nutzen der EKZ für die Entwicklung chirurgischer Verfahren ebenso. Die moderne Herzchirurge ist ohne die EKZ in der heutigen Form undenkbar. Demzufolge treten in diesem Zusammenhang die Verträglichkeit der EKZ und insbesondere die Eigenschaften der Fremdoberfläche im Rahmen der EKZ-induzierten entzündlichen Vorgänge in den Vordergrund.
So hängt die Verträglichkeit bzw. Hämokompatibilität einer Fremdoberfläche weitgehend davon ab, inwieweit das physiologische Milieu der Gefäßwand imitiert werden kann. Ziel ist, das fortwährende Spiel von Gerinnung und Fibrinolyse im Gleichgewicht zu halten, sowie die Adhäsion von Plasmaproteinen und die Aktivierung von Blutzellen an der Fremdoberfläche zu verhindern. Aufgrund dessen wurden in der Vergangenheit große Forschungs- und Entwicklungsarbeiten zur Verbesserung der Hämokompatibilität von Fremdoberflächen unternommen. Einen Ansatz hierfür bietet die Modifikation der Fremdoberflächen mit Substanzen wie Poly-2-methoxyethylacrylate (PMEA), Phosphatidycholin und Rapamycin. Zudem besteht die Möglichkeit der Oberflächenbeschichtung mit kovalent gebundenem Heparin (Bioline-Coating) sowie rekombinantem Albumin (Safeline-Treatment).

Die Hämokompatibilität der Heparinbeschichtung wurde in der Vergangenheit eingehend analysiert. So konnten eine verringerte Komplement-Aktivierung, eine verminderte Expression der Leukozytenadhäsionsmoleküle CD11b/c sowie eine reduzierte Produktion von freien Radikalen infolge EKZ mit Heparinbeschichtung beobachtet werden.[18,37-39] Zudem zeigten verschiedene Studien einen geringeren Blutverlust, eine kürzere Krankenhausverweildauer der Patienten, weniger zerebrale Komplikationen sowie eine verbesserte Lungenfunktion nach EKZ mit Heparinbeschichtung.[3,38] Diese Befunde weisen

auf eine insgesamt weniger ausgeprägte Ganzkörperentzündungsreaktion nach EKZ mit Heparin beschichteten EKZ-Systemen hin.
Im Gegensatz zu den zahlreich vorhandenen Arbeiten zur Heparinbeschichtung wurde bisher nur eine Arbeit zur Proteinbeschichtung veröffentlicht. Darin konnten Feyrer et al. im Hinblick auf die Serumkonzentration von C3 (Komplement) und IL-6 sowie auf den Flüssigkeitshaushalt („Kapillar-Leck-Syndrom“) hin keine signifikanten Unterschiede zwischen der Heparinbeschichtung und der Proteinbeschichtung beobachten. Sie schlugen aufgrund dessen die Proteinbeschichtung als Alternative für die Heparinbeschichtung in der klinischen Anwendung vor.[14]

Wie oben ausgeführt spielt die Aktivierung von Blutzellen, insbesondere von neutrophilen Granulozyten und Monozyten an der Fremdoberfläche eine zentrale Rolle bei der Entstehung von EKZ-assoziierten entzündlichen Vorgängen. In diesem Zusammenhang konnten Barstadt et al. eine reduzierte, monozytäre Expression des Gewebsfaktors (Tissue Factor) nach EKZ mit Heparinbeschichtung und infolge dessen eine verminderte prokoagulatorische Wirkung zeigen.[7] Weber et al. zeigten die Abhängigkeit der monozytären Zytokinexpression von der Art der Fremdoberfläche.[36]

4.1 Diskussion der eigenen Ergebnisse

Die einführenden Erläuterungen zur Entstehung der EKZ-assoziierten Ganzkörperentzündungsreaktion mit Dysfunktion verschiedener Organe in Abhängigkeit von der EKZ-Oberfläche werden durch die Befunde der vorliegenden Arbeit weitestgehend bestätigt. Allerdings wurden keine signifikanten Unterschiede im postoperativen klinischen Verlauf der Patienten infolge Heparin- oder Proteinbeschichtung der EKZ eruiert. Innerhalb der Gruppen jedoch zeigten sich signifikante Veränderungen nahezu aller laborchemischen und biochemischen Parameter. Insbesondere fielen zwischen der Heparinbeschichtung und der Proteinbeschichtung signifikante Unterschiede der Konzentration des C-reaktiven Proteins, des Anteils an Lymphozyten und der partiellen Thromboplastinzeit auf. Die Befunde der

Genexpressionsanalysen waren eindeutig und wiesen signifikante Unterschiede sowohl innerhalb als auch zwischen den Gruppen auf.

4.1.1 Klinische Befunde

Bezüglich der Dauer der postoperativen Beatmung, des postoperativen Blutverlustes, der medikamentösen Inotropie durch Katecholamingabe, der Transfusionsmenge, der Dauer des Aufenthaltes auf der Intensivüberwachungsstation und der Zahl postoperativer Revisionen und Todesfälle zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Dies entspricht weitestgehend den klinischen Beobachtungen anderer Autoren.[18,38] Obwohl die doppelt so hohe Anzahl an Revisionen und das Vorkommen zweier Todesfälle in Gruppe H sicherlich sehr bedenklich sind, kann dies in Anbetracht der zahlreichen weiteren Einflussfaktoren bei aortokoronaren Bypassoperationen mit EKZ nicht ausschließlich auf die Beschichtung selbst zurückgeführt werden. So sprechen die Befunde dieser Arbeit weder für einen Vor- noch Nachteil einer der Beschichtungen und zeigen deren „Gleichwertigkeit“ in Bezug auf die erhobenen klinischen Verlaufsparameter.

4.1.2 Laborchemische und biochemische Befunde

Verschiedene laborchemische und biochemische Parameter weisen postoperativ auf eine signifikante Dysfunktion des Herzens (CK/CK-MB), der Leber (GOT, GPT) sowie der Blutzellbildung und Gerinnung (Differentialblutbild, PTT) und auf eine erhöhte entzündliche Aktivität (Leukozytenzahl, CRP) hin, wie auch die nach Ende der EKZ einsetzende reaktive Leukozytose mit erhöhtem Anteil an neutrophilen Granulozyten zeigt. Besonders auffällig ist der bei Ende der EKZ signifikante Unterschied der CRP-Plasmakonzentration zwischen den Gruppen. Das C-reaktive Protein ist als Entzündungs-marker für die Beurteilung des Zustandes von intensivmedizinischen Patienten ein wichtiger Parameter. Die signifikant niedrigere CRP-Konzentration bei Ende der EKZ in Gruppe P ist somit ein starker Hinweis für eine reduzierte entzündliche Reaktion auf die Proteinbeschichtung und stimmt überein mit geringeren Veränderungen der leukozytären Genexpression infolge EKZ mit Proteinbeschichtung. Rückschlüsse auf die Ursachen der geringeren CRP-Konzentration in Gruppe P können anhand vorliegender Daten jedoch

nicht gezogen werden. Deshalb sollten zukünftige Studien zur Klärung dieser Frage durchgeführt werden.

4.1.3 Befunde der Genexpressionsanalysen

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Genexpressionsanalysen weisen erstmalig die direkte Abhängigkeit der Genexpression von der Art der Oberfläche in zirkulierenden Leukozyten von Patienten, die sich einer elektiven aortokoronaren Bypass-operation mit EKZ unterzogen, nach. Weiterhin wurden Expressionsveränderungen zahlreicher Gene mit funktioneller Bedeutung im Rahmen inflammatorischer Reaktionen mit nachfolgender „Gene-Pathway"-Aktivierung beobachtet und eine große Anzahl von Genen erstmalig im Zusammenhang mit der EKZ beschrieben.

4.1.3.1 Einzelne Gene

Im Rahmen der RT-PCR-Analysen von Monozyten zeigte besonders die Expression von IL-8 einen charakteristischen Verlauf mit einem signifikanten Anstieg bei Ende der EKZ innerhalb und zwischen den Gruppen sowie einem raschen Rückgang innerhalb von 6 h auf das Ausgangsniveau. Dieses Ergebnis stimmt überein mit der für IL-8 beschriebenen pro-inflammatorischen Wirkung durch die Erhöhung der neutrophilen Chemotaxis.[15,25] Der Verlauf der Expression von TNF-α weist ebenfalls einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen 20 min nach Beginn der EKZ auf. Die signifikant niedrigere Expression von IL-8 und TNF-α spricht für eine geringere Aktivierung von Monozyten an der Heparinbeschichtung. Allerdings steht dies im Widerspruch zu den Befunden der leukozytären Genexpression. Diese Diskrepanz ist auf den ersten Blick eher irreführend und kann anhand vorliegender Daten nicht geklärt werden. Eine mögliche Erklärung könnte ein modifizierter Aktivierungsprozess von Monozyten innerhalb des Monozyten-Makrophagen-Systems sein, der für Granulozyten so nicht wirksam ist. Zudem sollte beachtet werden, dass der Anteil der Monozyten bei Ende der EKZ mit 1,5 % verschwindend gering ist und aufgrund dessen die verstärkte Expression im Rahmen der Microarray-Analysen nicht in Erscheinung treten konnte. Darüber hinaus sollten vorliegende RT-PCR-Daten in Anbetracht der großen Standardabweichungen, die

möglicherweise auf das noch nicht endgültig etablierte Verfahren des „Gene-Monitoring“ mit RT-PCR und die geringe Erfahrung mit dieser Methode zurückzuführen sind, unter Vorbehalt interpretiert werden.

Die Analysen der leukozytären Genexpression mit DNA-Microarrays waren sehr gut durchführbar und die Befunde eindeutig. Insgesamt fiel auf, dass nur zwei Gene (CD163 und MAP4K1) eine gleichsinnige Veränderung in beiden Patientengruppen zeigten. Das von CD 163 kodierte Protein ist ein akutphasereguliertes Makrophagenprotein, welches als Scavenger-Rezeptor für Hämoglobin-Haptoglobin-Komplexe fungiert. Es wurde bereits als möglicher Ansatzpunkt zur Manipulation von EKZ-assoziierten inflammatorischen Prozessen vorgeschlagen.[17] MAP4K1 wirkt als ein vorgeschalteter Aktivator pro-inflammatorischer und pro-apoptotischer „Gene Pathways“ (MEKK, JNK und SAPK) im Falle zellulärer Aktivierung.[40] Die Beobachtung, dass CD163 und MAP4K1 unabhängig von der EKZ-Oberfläche exprimiert werden, legt nahe diese als Markergene pro-inflammatorischer und pro-apoptotischer zellulärer Aktivierung zu bezeichnen, wie dies bisher für c-fos, c-jun, EGR-1,[1,26,28] IL-6, TNF-α und IL-8[13] vorgeschlagen wurde.
Die in vorliegender Studie beobachteten Veränderungen der leukozytären Genexpression nach EKZ gehen einher mit ähnlichen Beobachtungen in aus Vorhofgewebe gewonnenen Kardiomyozyten.[28,34] Der signifikante Anstieg der Expression von MCP2 in Leukozyten und von MCP1 in Kardiomyozyten nach EKZ weist auf die Induktion inflammatorischer Reaktionen sowie auf zelluläre Schädigung hin. Im Gegensatz dazu wurde in ischämisch präkonditionierten Leukozyten eine Verringerung der Expression des zugehörigen Chemokinrezeptors beobachtet, was auf eine Minimierung zellulärer Schädigungen hinweist.[22] Somit könnte die verstärkte Expression von MCP1 und -2 nach EKZ darauf hindeuten, dass Ischämie und Hypoxie während der EKZ nicht primär an der Entstehung EKZ-assoziierter zellulärer Schädigungen beteiligt sind.
Das von CEACAM1 kodierte Protein bindet an endotheliales E-Selectin und stimuliert so die Proliferation, Chemotaxis und Angiogenese.[5] Dieses Gen wurde, wie vorliegende Ergebnisse zeigen, nach EKZ in Leukozyten hochreguliert, in Kardiomyozyten jedoch herunterreguliert.[28] Die verstärkte Expression des CEACAM1 ähnlichen CDH6 weist

zudem auf eine ausgeprägte Aktivierung der Leukozyten nach EKZ hin, wie bereits beschrieben.[13] Dies gilt zudem für die verstärkte Expression von S100A8 in Leukozyten sowie von S100A4 in Kardiomyozyten.[28] Diese Gene wurden in Zusammenhang mit zerebraler Beeinträchtigung und neurologischen Defiziten nach EKZ vormalig beschrieben.[5]

Zahlreiche MAP-Kinase Gene unterlagen, wie vorliegende Ergebnisse zeigen, einer differentiellen Expression in Leukozyten und Kardiomyozyten[28] nach EKZ, ebenso in ischämisch präkonditionierten Leukozyten.[22] Diese Gene und ihre Genprodukte sind an der Steuerung einer großen Vielfalt an Funktionen beteiligt[5] und spielen eine Schlüsselrolle im Rahmen zellulärer Reaktionen infolge von Stress.

Die bereits beobachtete Induktion von Apoptose in Endothelzellen durch die EKZ[2] stimmt mit vorliegenden Beobachtungen einer verstärkten Expression von GADD45A, MAP4K1 und CHEK2 in Leukozyten überein. Dies könnte auf eine Interaktion von Leukozyten mit den Endothelzellen hinweisen und möglicherweise ursächlich mit der erhöhten Apoptoserate in Endothelzellen nach EKZ[2] in Zusammenhang stehen.

4.1.3.2 „Gene Pathways“

Die Funktion und Bedeutung eines einzelnen Gens sollte auch in Zusammenhang mit anderen Faktoren (posttranslatorischer Proteinmodifikation, Transkriptionsfaktoren etc.) gesehen werden. Von großer Wichtigkeit ist hier das Zusammenspiel dieser Faktoren innerhalb des zugehörigen Signalweges („Gene Pathway“). Durch die Nutzung der MAPPFinder-Software konnten in vorliegender Arbeit Einblicke in die biologischen Vorgänge und Zusammenhänge innerhalb der analysierten Probe gewonnen werden. Besonders im Hinblick auf die verschiedenen Beschichtungen der EKZ fielen sehr starke Differenzen auf. In Gruppe H wurden Veränderungen von „großen“ Signalwegen, denen bis zu mehrere hundert einzelne Gene zugeordnet werden, beobachtet. Mit steigender Anzahl der zugeordneten Gene wächst die funktionelle Bedeutung dieser „großen“ Signalwege und repräsentiert umso mehr spezifische Veränderungen der Zelle. So wurden die „Gene Pathways“ „innate immune response“ und „response to stress“ infolge der Aktivierung von Leukozyten an der Heparinbeschichtung verstärkt exprimiert. Die

Alterationen dieser „Gene Pathways“ zeigen deutlich die Ausrichtung der zellulären Aktivität im Sinne einer zunehmenden entzündlichen Reaktion infolge EKZ mit Heparinbeschichtung an, was mit den Beobachtungen bei einzelnen Genen übereinstimmt.
In Gruppe P zeigten sich dahingehend deutlich weniger ausgeprägte Veränderungen der „Gene Pathways“. Hier veränderten sich vor allem „kleine“ Signalwege mit einer geringen Anzahl an Genen und einer eher eingeschränkten biologischen Funktion und Bedeutung. Insgesamt ist hier kein einheitliches Muster der zellulären Aktivierung und Zellantwort zu erkennen, im Gegensatz zu Gruppe H. Dies weist auf eine weniger ausgeprägte Schädigung und geringere Aktivierung der Leukozyten nach Kontakt mit der Proteinbeschichtung hin.
Mit Hilfe der MAPPFinder-Auswertung konnte so erstmalig ein klares, kontextuelles Muster der leukozytären Genexpression in Abhängigkeit von der Art der EKZ-Oberfläche nachgewiesen werden.

4.2 Diskussion der Methoden

Nicht nur wegen der neuartigen und bisher unbekannten Befunde im Rahmen der Genexpressionsanalysen, sondern auch insbesondere wegen der erstmaligen Anwendung der DNA-Microarrays zur Klärung von Auswirkungen der EKZ auf Leukozyten darf vorliegende Arbeit als „wegweisend“ eingestuft werden.
Die Analyse der Expression von Genen mit DNA-Microarrays wurde erstmalig von Duggan et al. im Jahre 1999 vorgestellt und ihre Anwendung hat seither exponentiell zugenommen.[12,33] Moderne DNA-Microarrays bieten die Möglichkeit zur simultanen Analyse von über 20.000 verschiedenen Genen. Dies öffnet eine große Bandbreite an Einsatzmöglichkeiten dieser Methode zur Klärung von Krankheitsentstehungen, physiologischen sowie pathophysiologischen Vorgängen und im Rahmen diagnostischer Bemühungen.
Allerdings besteht die Schwierigkeit dieser Methode darin, die unvorstellbar große Menge an Daten einer sinnvollen Auswertung zu unterziehen.[21,33] Eine Vielzahl von Wissenschaftlern beschäftigt dieses Problem der Datenauswertung mit der Folge einer bis dato unüberschaubaren Anzahl von Algorithmen. Aufgrund dessen oder möglicherweise

trotz dessen konnten bisher keine allgemeingültigen Standards zur Auswertung von Microarray-Daten vereinbart werden. Einen Ansatz zur Vereinheitlichung von Microarray-Analysen stellen die „MIAME“-Richtlinien dar,[9] welche in vorliegender Arbeit beachtet wurden. Diese stellen einen Katalog der „unbedingt notwendigen Informationen über Microarray-Experimente“ bereit und sollen in Zukunft bei Beachtung durch möglichst viele Nutzer die Vereinheitlichung der Methode und Standardisierung der Datenauswertung ermöglichen.

Aufgrund der bisher noch nicht standardisierten Auswertung von Microarray-Daten wurde in vorliegender Arbeit größter Wert auf eine möglichst einfache, aber effektive Auswertung gelegt. So wurden verschiedene Ansätze gewählt um einen möglichst großen und unverfälschten Einblick in die tatsächlichen biologischen Vorgänge des Untersuchungsmaterials zu erreichen. Dies gilt neben der Berechnung der „Signal-to-Noise Ratio“ und des „Present-Call“ Filters insbesondere in Bezug auf die neu entwickelte Software MAPPFinder, mithilfe derer Microarray-Daten durch die Verknüpfung der Microarray Ergebnisse mit dem Inhalt der „Gene Ontology“-Datenbank (GO) in einen „globalen“ biologischen Kontext gebracht werden können. Die in vorliegender Arbeit durchgeführte MAPPFinder-Auswertung zählt zu den ersten Studien überhaupt, in deren Rahmen diese Methode eingesetzt wurde. Sie zeigt somit auch neue Wege der Datenverarbeitung auf.

4.3 Bedeutung der eigenen Ergebnisse

In vorliegender Arbeit wurde eine signifikante Veränderung Tausender Gene in Leukozyten nach EKZ beschrieben.[29] Zudem konnte die direkte Abhängigkeit der Genexpression in Leukozyten von der Art der Fremdoberfläche nachgewiesen werden.[29]

Insgesamt weisen die Befunde dieser Arbeit auf molekularer Ebene auf eine verringerte Aktivierung von Leukozyten nach EKZ mit der Proteinbeschichtung hin. Dies ist umso überraschender, weil angenommen wird, dass durch die Beschichtung mit Heparin das physiologische Milieu des Gefäßendothels teilweise imitiert werden kann. Verschiedene Studien konnten dies mit der Reduzierung entzündlicher Reaktionen nach EKZ mit Heparin

beschichteten Oberflächen zeigen.[3,18,37-39] So ist die signifikant niedrigere Konzentration des CRP bei Ende der EKZ mit Proteinbeschichtung eher unerwartet, doch da es sich um ein Akutphaseprotein handelt, könnte das ein erster, klinisch relevanter Hinweis auf eine bessere Verträglichkeit der Proteinbeschichtung im Vergleich zur Heparinbeschichtung sein. Ebenso weisen die deutlichen und signifikanten Befunde der leukozytären Genexpression auf eine reduzierte entzündliche Reaktion sowie geringere zelluläre Aktivierung nach EKZ mit Proteinbeschichtung hin.

Allerdings sind vorliegende Befunde nicht hinreichend, um Rückschlüsse auf die effektive Funktionalität der kodierten Proteine und somit auf den klinischen Verlauf der Patienten zu ziehen. Dies gilt insbesondere deshalb, weil Veränderungen der Genexpression nicht gleichgesetzt werden dürfen mit der Funktionalität der konsekutiv synthetisierten Proteine. Dies beruht auf der komplexen Abfolge der Proteinbiosynthese mit posttranslatorischen Modifikationen und möglicherweise noch unbekannten Einflüssen der EKZ. Somit ist dies unter Umständen dafür verantwortlich, dass in der vorliegenden Arbeit bis auf wenige Ausnahmen keine wesentlichen Unterschiede klinischer Parameter zwischen den Gruppen nachgewiesen werden konnten.

Zusammenfassend ist anhand vorliegender Befunde festzustellen, dass die Proteinbeschichtung nicht nur eine Alternative zur Heparinbeschichtung darstellt, sondern dieser möglicherweise im klinischen Gebrauch „gleichwertig“ ist. Jedoch kann dies anhand vorliegender Daten nicht abschließend beurteilt werden. Zur weiterführenden Klärung dieser Frage bedarf es somit zusätzlicher Studien die die Auswirkungen der Proteinbeschichtung eingehend analysieren.

4.4 Ausblick

Die vorliegende Arbeit konnte spezifische Veränderungen leukozytärer Genexpression infolge EKZ mit unterschiedlichen Oberflächenbeschichtungen eindeutig nachweisen. Dies gelang insbesondere aufgrund der sehr gut durchführbaren und geeigneten Methode der DNA-Microarrays. Derzeit steht für den molekularbiologischen Sektor keine Methode mit ähnlichen Möglichkeiten zur Verfügung. So sind Weiterentwicklungen dieser Methode

vorstellbar, die zur fortführenden Klärung pathophysiologischer Reaktionen bei Interaktionen von Blutzellen und Plasmaproteinen mit Fremdmaterialien dienlich sein könnten. Dies könnte durch die Entwicklung eines spezifischen Testes zur Beurteilung der Verträglichkeit von Biomaterialien, basierend auf bereits evaluierten Gen-Markern, realisiert werden. Ein solcher Test wäre nicht nur für die bei der EKZ verwendeten Materialien anwendbar, sondern könnte bis hin zur Endoprothetik jeglicher Form neue Erkenntnisse liefern. Eine detaillierte Beurteilung der Bio- bzw. Hämokompatibilität von Fremdmaterialien im Rahmen präklinischer Tests könnte so möglich werden.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende prospektive, randomisierte und doppelblinde Vergleichsstudie wurde zur Klärung perioperativer Veränderungen im Rahmen der Ganzkörperentzündungsreaktion nach extrakorporaler Zirkulation (EKZ) in Abhängigkeit von der EKZ-Oberfläche (Gruppe H: Heparinbeschichtung, n = 34 Patienten; Gruppe P: Proteinbeschichtung, n = 31 Patienten) durchgeführt. Moderne molekularbiologische Verfahren zur Bestimmung der leukozytären bzw. monozytären Genexpression wurden durchgeführt (DNA-Microarrays, RT-PCR). Die demographischen Daten zeigten im Gruppenvergleich keine signifikanten Unterschiede. Der klinische Verlauf zeigte hinsichtlich des Blutverlustes über die Thoraxdrainage, der postoperativen Intubationsdauer, des Transfusionsbedarfs, der Katecholamingabe und der Dauer des Aufenthaltes auf der Intensivstation keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Laborchemisch fiel eine signifikant geringere Konzentration des C-reaktiven Proteins bei Ende der EKZ in Gruppe P auf. Die leukozytäre Genexpression von 22.283 verschiedenen Genen wurde unmittelbar präoperativ und sechs Stunden nach Ende der EKZ mit dem Affymetrix Human Genome Chip U133A bei jeweils sechs Patienten einer Gruppe bestimmt. Die konventionelle statistische Auswertung zeigte signifikante Veränderungen der Genexpression in Abhängigkeit von der Oberflächenbeschichtung bei mehreren Tausend Genen. Darunter wurden insbesondere in Gruppe H Gene differentiell exprimiert, die eine entscheidende Rolle in entzündlichen Reaktionen, apoptotischen Vorgängen und zellulären Anpassungsreaktionen spielen (MAPK12, MCP2, GADD45A). Die Auswertung der Microarray-Daten mit der MAPPFinder-Software erbrachte für beide Beschichtungen typische Expressionsmuster. Die Microarray-Daten konnten mit RT-PCR für LEF1, MATN3, PXN und NR1/2 verifiziert werden. Die monozytäre Zytokinexpression bei jeweils sechs Patienten einer Gruppe zeigte perioperativ für IL-8 und TNF-α signifikante Unterschiede sowohl innerhalb als auch zwischen den Gruppen. Vorliegende Befunde verdeutlichen die Auswirkungen der EKZ-Oberfläche auf molekularer Ebene und zeigen die direkte Abhängigkeit der Genexpression in Leukozyten von der Art der Fremdoberfläche. Sie geben des Weiteren Hinweise auf eine reduzierte zelluläre Aktivierung an der mit Protein beschichteten EKZ-Oberfläche, was für eine möglicherweise bessere Hämokompatibilität der Proteinbeschichtung sprechen könnte.

6 Tabellen und Abbildungen

Tabelle 1 Demographische und perioperative Daten

	Gruppe H	Gruppe P
Demographische Daten		
Patienten, männlich/weiblich [n]	34/0	31/0
Alter [a] *	63.1 ± 7.6	61.5 ± 9.45
KOF [m^2] *	1.99 ± 0.14	1.96 ± 0.14
CVRF [n] *	2.09 ± 0.83	2.08 ± 1.38
Zahl stenosierter Koronarien [n]	2.85 ± 0.35	2.96 ± 0.18
Intraoperativer Verlauf		
EKZ-Dauer [min] *	87.1 ± 32.3	82.1 ± 20.6
Aortenklemmzeit [min] *	48.8 ± 13.3	51.1 ± 14.3
Reperfusion [min] *	26.8 ± 12.2	23 ± 6.57
EKZ-Flow [l/min] *	4.77 ± 0.36	4.72 ± 0.35
Dist. Anastomosen [n] *	3.62 ± 0.82	3.66 ± 0.67
IMA [n]	34	31
Heparin [I.E.] *	39832 ± 6747	38960 ± 7481
Min. ACT [s] bei EKZ *	456 ± 99.9	434 ± 20.5
Min. Hkt [%] bei EKZ *	30.1 ± 3.41	30.2 ± 3.33
Postoperativer Verlauf		
Thoraxdrainage [ml] °	850 (360 – 2270)	790 (440 – 1800)
Erythozyten-Konzentrat [ml] °	500 (0 – 600)	600 (0 – 1500)
Thrombozyten-Konzentrat [ml] °	390 (0 – 480)	580 (0 – 1200)
Fresh Frozen Plasma [ml] °	943 (0 – 1487)	984 (0 – 2400)
Beatmungsdauer [h] °	11.25 (7 – 39)	11.5 (7.5 – 26.8)
Dobutamin [µg/kg/min] °	4.3 (0 – 7.5)	5 (0 – 10)
Arterenol [µg/kg/min] °	0.03 (0 – 0.41)	0.03 (0 – 0.19)
Intensivaufenthalt [h] °	23.5 (10.3 – 94.5)	22.5 (7 – 47)
Revisionen [n]	4	2
Mortalität [n]	2	0

* Mittelwert und Standardabweichung; ° Median und Range; KOF: Körperoberfläche; CVRF: Cardiovaskuläre Risikofaktoren; EKZ-Flow: Pumpleistung der Herz-Lungen-Maschine; IMA: Internal Mammaria Artery; ACT: Activated clotting time

Tabelle 2 Gene mit einer mindestens 4-fachen Erhöhung der Expression postoperativ versus präoperativ in Leukozyten nach EKZ mit Heparinbeschichtung (entsprechend Methode A und B; $n_{Gruppe\ H} = 6$).

Gene Name	Gene Symbol	Locus Link	Fold Change (post:pre)*	Gene Function
Cysteine-rich secretory protein	CRISP3	10321	18:1	Innate immune response, cell-adhesion
Polycythemia rubra vera 1	PRV1	57126	18:1	Surface receptor activity, changes cell activity
ATPase	ATP9A	10079	16:1	Cation transport, hydrolase activity
Haptoglobin-related protein	HPR	3250	13:1	Binds hemoglobin
FK506-Binding-Protein	FKBP5	2289	12:1	FK506 used in coronary stent coatings, inhibits cytokine-production
ATPase	ATP11A	23250	11:1	Cation transport, hydrolase activity
Fragment crystallizable gamma 2 receptor	FCAR	2204	9:1	Triggers phagocytosis, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity and proinflammatory mediators
Ectonucleoside-triphosphate-diphosphohydrolase 7	LALP1	57089	7:1	Hydrolase activity
Glycogenin	GYG	2992	7:1	Glycogen synthesis
Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1	CEACAM1	634	7:1	Angiogenesis, chemotaxis
	FLJ12442	64943	7:1	Unknown
WD repeat and SOCS box-containing	WSB1	26118	7:1	Intracellular signalling
UDP-tansferase	UGCG	7357	6:1	Involved in multiple processes
Annexin 3	ANXA3	306	6:1	Cellular growth, signal transduction, maybe involved in anti-coagulation

6-phosphofructo-2-kinase	PFKFB2	5208	6:1	Regulates glycolysis in cells (cardiac isozyme)
Calcium-transporting ATPase 2C2	KIAA0703	9914	6:1	Hydrolase activity, ATP binding, proton transport
Hepatocyte growth factor	HGF	3082	6:1	HGF-IL7-heparin-complex, B-cell development
MLX-interactor	MONDOA	22877	6:1	Transcription factor
Myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate	MARCKS	4082	5:1	Actin cytosceleton and cell motility
Janus kinase 3	JAK3	3718	5:1	Interleukin transduced immune reaction
Found in inflammatory zone	FIZZ3	56729	5:1	Inflammation, insulin resistance
Interleukin-18-receptor	IL18R1	8809	5:1	Interleukin-receptor activity
Flotillin 1	FLOT1	10211	5:1	Vesicular trafficking, signal transduction
Hydroxyprostaglandin dehydrogenase	HPGD	3248	5:1	Prostaglandin degradation, anti-inflammation
Phospholipid-scramblase	PLSCR1	5359	4:1	Platelet procoagulant activity, apoptotic cell clearance
Fructose-2,6-biphosphatase 3	PFKFB3	5209	4:1	Provides glycolytic flux to proliferating leukocytes
Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, gamma polypeptide	PIK3CG	5294	4:1	Extracellular signal modulation, cell-cell adhesion, regulation of cytotoxicity in NK cells
Haptoglobin	HP	3240	4:1	Binds hemoglobin
Growth arrest and DNA-damage-inducible-alpha	GADD45A	1647	4:1	P38 „Gene Pathway“, apotosis, cell cycle arrest
Stomatin	EPB72	2040	4:1	Unknown
Complement receptor	CR1	1378	4:1	C3b and C4b receptor, regulates complement cascade
RNA binding protein with multiple splicing	RBPMS	11030	4:1	RNA processing
Solute carrier family 2, member 3	SLC2A3	6515	4:1	Glucose transport

Arginase	ARG1	383	4:1	Cell damage repair
Hemoglobin scavenger receptor	CD163	9332	4:1	Acute-phase regulated macrophage protein, endocytosis of hemoglobin
Growth arrest-specific 6	GAS6	2621	4:1	Cell proliferation
Carboxypeptidase D	CPD	1362	4:1	Undefined regulatory function
Orosomucoid 1	ORM1	5004	4:1	Acute phase
Solute carrier family 1, member 3	SLC1A3	6507	4:1	Neurotransmitter reuptake
GM2 ganglioside activator	GM2A	2760	4:1	Glycosphingolipid catabolism
Homeodomain interacting protein kinase 3	HIPK3	10114	4:1	Repressor of NK-cell transcription factors
Cold autoinflammatory syndrome 1	CIAS1	114548	4:1	Inflammation, apoptosis, questionable NF-Kappa B activation
Nuclear receptor subfamily 2, group E, member 1	NR2E1	7101	4:1	Transcription factor
G-protein-receptor 30	GPR30	2852	4:1	G-protein signal transduction
Matrix metalloproteinase 8	MMP8	4317	4:1	Breakdown of extracellular matrix
Interleukin 1 receptor	IL1R2	7850	4:1	Interleukin binding
Olfactomedin 4	GW112	10562	4:1	Associated with inflammed colonic epithelium
Solute carrier family 26, member 3	SLC26A3	1811	4:1	Sulfate transporter
Nucleolar protein 7	RARG-1	51406	4:1	Member of the superfamily of steroid/thyroid nuclear receptors
Zinc finger protein 44 (KOX 7)	GIOT-2	51710	4:1	Unknown

* Mittelwert

Tabelle 3 Gene mit einer mindestens 4-fachen Verringerung der Expression postoperativ versus präoperativ in Leukozyten nach EKZ mit Heparinbeschichtung (entsprechend Methode A und B; $n_{Gruppe\ H} = 6$).

Gene Name	Gene Symbol	Locus Link	Fold Change (post:pre)*	Gene Function
Hematopoietic progenitor kinase 1	MAP4K1	11184	1:22	Activator of MEKK/JNK/SAPK
Ubiquitin associated and SH3 domain containing, A	UBASH3A	53347	1:10	Unknown
Tumor necrosis factor	TNFRSF12	8718	1:7	NF-kappa B activation, apoptosis, inflammation
M-phase phosphoprotein 9	MPHOSPH9	10198	1:7	Cell cycle regulation
CHK2 checkpoint	CHEK2	11200	1:6	Cell cycle regulation
Inducible T-cell co-stimulator	ICOS	29851	1:6	Cell-cell signaling, immune responses, proliferation
Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 16B	PPP1R16B	26051	1:5	Involved in plasma membrane signal transduction
Protein NIMA-interacting 1	PIN1	5300	1:5	Mitosis regulation
Transcription factor 3	TCF3	6929	1:5	Transcription factor, B-cell development
RAD51	RAD51C	5889	1:5	DNA repair
Zinc finger protein 23	ZNF23	7571	1:5	Unknown
Lymphocyte antigen 9	LY9	4063	1:5	T-cell adhesion
GPP34-related protein	FLJ10687	55204	1:5	Regulation in Golgi trafficking
Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C	CDKN1C	1028	1:5	Inhibitor of cell proliferation, debatable tumor suppression
Chromosome 20 open reading frame 19	C20orf19	55857	1:5	Unknown
Dipeptidase 3	LOC64180	64180	1:4	Unknown

Minichromosome maintenance deficient 5	MCM5	4174	1:4	Cell cycle regulation
Dodecenoyl-Coenzyme A delta isomerase	DCI	1632	1:4	Beta-oxydation
Fucosyltransferase 8	FUT8	2530	1:4	Seems to be involved in cancer cell development
Ring finger protein 144	UBCE7IP4	9781	1:4	Various protein interactions
Tropomyosin 2 (beta)	TPM2	7169	1:4	Skeletal muscle damage
S100 calcium binding protein A8	S100A8	6279	1:4	Regulation of cell cycle, cytokine activity, correlation with CPB induced cerebral damage
CD72 antigen	CD72	971	1:4	B-cell proliferation
Fms-related tyrosine kinase 3 ligand	FLT3LG	2323	1:4	Hematopoietic growth factor
Fumarylacetoacetate hydrolase domain containing 2A	LOC51011	51011	1:4	Unknown
Purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 5	P2RX5	5026	1:4	Functions as a ligand-gated ion channel
Alpha-methylacyl-CoA racemase	AMACR	23600	1:4	Involved in induction of neuropathy

* Mittelwert

Tabelle 4 Gene mit einer mindestens 4-fachen Erhöhung der Expression postoperativ versus präoperativ in Leukozyten nach EKZ mit Proteinbeschichtung (entsprechend Methode A und B; $n_{Gruppe\ P} = 6$).

Gene Name	Gene Symbol	Locus Link	Fold Change (post:pre)*	Gene Function
Hemoglobin scavenger receptor	CD163	9332	4:1	Acute-phase regulated macrophage protein, endocytosis of hemoglobin
Endothelin receptor type B	EDNRB	1910	4:1	Second messenger
Collagen, type XVI, alpha 1	COL16A1	1307	4:1	Maintains extracellular matrix
Cysteine and glycine-rich protein 2	CSRP2	1466	4:1	Cellular differentiation
Parathyroid hormone-like hormone	PTHLH	5744	4:1	Regulates endochondral bone development
Solute carrier family 4	SLC4A4	8671	4:1	Ion transporter, sodium, bicarbonate

* Mittelwert

Tabelle 5 Gene mit einer mindestens 4-fachen Verringerung der Expression postoperativ versus präoperativ in Leukozyten nach EKZ mit Proteinbeschichtung (entsprechend Methode A und B; $n_{Gruppe\ P} = 6$).

Gene Name	Gene Symbol	Locus Link	Fold Change (post:pre)*	Gene Function
Hematopoietic progenitor kinase 1	MAP4K1	11184	1:6	Activator of MEKK/JNK/SAPK
Aldehyde dehydrogenase	ALDH5A1	7915	1:5	Mitochondrial NAD(+)-dependent dehydrogenase
GATA binding protein 3	GATA3	2625	1:4	T-cell receptor, causes IL-5 expression
Granzyme H	CTLA1	113155	1:4	Perforin, cytotoxic cells, immune response, apoptosis
Aspartyl aminopeptidase	DNPEP	23549	1:4	Mediator for general metabolism of intracellular proteins
Chromosome 21 open reading frame 2	C21orf2	755	1:4	Unknown
Growth arrest-specific 2	GAS2	2620	1:4	P53-dependent apoptosis

* Mittelwert

Tabelle 6 Gene mit der größten Expressionsveränderung (∆-Expression) in Leukozyten nach EKZ mit Heparinbeschichtung bzw. Proteinbeschichtung (entsprechend Methode C und D; $n_{Gruppe\ H} = 6$, $n_{Gruppe\ P} = 6$). Entnommen aus: Seeburger et al. Circulation. 2005 [in press]

Gene Name	Gene Symbol	Locus Link	Δ-Expression	Gene Function
Genes Exhibiting Greater ∆-Expression in the Heparin Coated Group				
Annexin 9	PPFIBP1	8496	0.56	Cellular growth
Pyruvat carboxylase	PC	5091	0.55	Krebs cycle
Phosphatidic acid phosphatase type 2C	PPAP2C	8612	0.54	Activates proteinkinase C
Chemokine (C-C motif) ligand 8	MCP2/CCL8	6355	0.51	Enhances neutrophil chemotaxis
	FLJ20097	55610	0.50	Unknown
Nudix-type motif 4	NUDT4	11163	0.48	Intracellular signalling
Solute carrier organic anion transporter family, member 1A2	SLC21A3	6579	0.46	Membrane carrier
Mitogen-activated-protein-kinase 12	MAPK12	6300	0.45	Extracellular signal transduction, p38-gamma interaction
	FLJ22558	64758	0.42	Unknown
RAS-associated protein 13	RAB13	5872	0.41	Formation of tight junction
	PCSK1	5122	0.41	Regulation insulin biosynthesis
Cadherin 6	CDH6	1004	0.41	Cell-cell interaction in epithelium
Genes Exhibiting Greater ∆-Expression in the Protein Coated Group				
Misshapen/NIK-related kinase	MINK	50488	0.52	Downstream activation of NF-Kappa-B
Tumor protein p53 inducible protein 11	TP53I11	9537	0.50	P53-induced apoptosis due to oxidative stress
Nuclear receptor subfamily 1(group	NR1/2	8856	0.45	Regulation of Cytochrom P-450

I, member 2)				
Golgi protein 67	GOLGIN-67	23015	0.45	Protein modification
Retinoid-X-receptor, beta	RXRB	6257	0.44	MHC class I promoter binding protein
Myotubularin related protein 1	MTMR1	8776	0.42	Muscle formation

Tabelle 7 MAPPFinder Ergebnisse der leukozytären Genexpression postoperativ versus präoperativ nach EKZ mit Heparinbeschichtung ($n_{Gruppe\ H}$ = 6).

Significantly Upregulated Gene Pathways		Significantly Downregulated Gene Pathways	
Gene Pathway (GO Term)	z Score	Gene Pathway (GO Term)	z Score
Small GTPase mediated signal transduction	5.8	Cytosolic ribosome	17.1
Inflammatory response	5.5	Structural constituent of ribosome	16.0
Response to pest/pathogen/parasite	5.1	Ribosome	15.1
Response to stress	5.1	Ribonucleoprotein complex	14.1
F-actin capping	5.0	Cytosolic large ribosomal subunit	12.9
GTPase	4.63	Large ribosomal subunit	12.8
Intracellular signaling cascade	4.56	Protein biosynthesis	12.8
Small monomeric GTPase	4.45	RNA binding	12
Defense response	4.38	Cytosolic small ribosomal subunit	10.7
Immune response	4.36	Cytosol	10.5
RAB small monomeric GTPase	4.19	Nucleic acid binding	9.45
Hematopoietin/interferon-class (D200-domain) cytokine receptor	4.18	Small ribosomal subunit	9.36
Protein transport	4.17	Biosynthesis	8.50
Intracellular protein transport	4.15	Metabolism	7.62
Endoplasmic reticulum	4.14	Cytoplasm	7.16
Antimicrobial peptide	4.08	Intracellular	7.04
Protein binding	4.03	Ribosome biogenesis	6.59
Arp2/3 protein complex	3.99	Protein metabolism	6.24
Magnesium binding	3.86	mRNA splicing	6.05
Vesicle-mediated transport	3.82	Structural molecule	5.78
Hyaluronic acid binding	3.74	RNA splicing	5.70
Golgi apparatus	3.74	Eukaryotic translation initiation factor 3 complex	5.61
Receptor signaling protein	3.73	Mitochondrion	5.51
GTP binding	3.64	Nucleus	5.49
Thromboxane receptor	3.58	Nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism	5.35
Response to wounding	3.51	mRNA processing	5.00
Membrane fusion	3.48	RNA processing	4.91
Kinase	3.41	Nucleolus	4.87

RAS protein signal transduction	3.37	mRNA binding	4.77
Signal transduction	3.37	Translation initiation factor	4.74
Protein kinase cascade	3.32	Translational initiation	4.69
Protein transporter	3.31	Mitochondrial electron transport chain complex	4.46
Interleukin-1, Type I, activating receptor	3.29	Small nuclear ribonucleoprotein	4.46
Antibacterial peptide	3.29	Spliceosome complex	4.40
Long-chain-fatty-acid-CoA-ligase	3.29	Pre-mRNA splicing factor	4.32
Ubiquitin conjugating enzyme	3.21	DNA metabolism	4.30
Nucleotide binding	3.20	Nucleoplasm	4.27
Protein modification	3.13	Translation factor, nucleic acid binding	4.26
IgG binding	3.12	Protein folding	4.08
Protein carrier	3.12	Regulation of translation	4.01

GO: Gene Ontology

Tabelle 8 MAPPFinder Ergebnisse der leukozytären Genexpression postoperativ versus präoperativ nach EKZ mit Proteinbeschichtung ($n_{Gruppe\ P}$ = 6).

Significantly Upregulated Gene Pathways		Significantly Downregulated Gene Pathways	
Gene Pathway (GO Term)	z Score	Gene Pathway (GO Term)	z Score
Interleukin-1 receptor antagonist	8.56	Integrase	5.11
Embryo implantation	6.51	Keratinocyte differentiation	5.11
Vascular endothelial growth factor receptor	5.89	Myosin binding	5.11
Glutamyl-tRNA aminoacylation	5.19	Cell-cell signaling	5.08
Germ-cell development	5.19	Transmembrane receptor protein tyrosine phosphatase signaling gene pathway	4.92
Glutamate-tRNA ligase	5.19	Dipeptidyl-peptidase IV	4.92
Protein tyrosine/threonine phosphatase	5.19	Extracellular matrix glycoprotein	4.15
1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase	4.16	Frizzled-2 receptor signaling gene pathway	3.71
Peroxidase reaction	4.13	Integral to membrane	3.59
Nicotinic acetylcholine-gated receptor-channel complex	3.93	Extracellular	3.55
Peroxidase	3.91	Amiloride-sensitive sodium channel	3.49
Cell migration	3.74	RAS GTPase activator	3.49
G-protein-coupled receptor phosphorylating protein kinase	3.54	Calcium-transporting ATPase	3.49
Fibroblast growth factor receptor	3.54	Establishment and/or maintenance of cell polarity	3.49
Negative regulation of survival gene products	3.54	Sphingomyelin phosphodiesterase	3.47
Actin modulating	3.54	Receptor binding	3.41
Lactation	3.54	Signal transducer	3.37
Vitamin A metabolism	3.54	Cell surface receptor linked signal transduction	3.30
Tyrosine catabolism	3.54	Growth factor	3.27
Nicotinic acetylcholine-activated cation-selective channel	3.27	Dipeptidase	3.19
Histogenesis and organogenesis	3.25	Calcium ion homeostasis	3.05
Calcium ion homeostasis	3.14	Rho GTPase activator	2.95

Synaptonemal complex	3.11	Integral to plasma membrane	2.79
Glycosphingolipid biosynthesis	3.11	Signal transduction	2.75
Development	3.04	Extracellular space	2.72
Chromatin modeling	3.02	Galanin receptor	2.72
Cell adhesion	3.00	Notch binding	2.72
Biological process unknown	2.96	Regulation of proteolysis and peptidolysis	2.72
Pregnancy	2.95	Sphingomyelin metabolism	2.72
Ion channel	2.93	Nucleocytoplasmic transporter	2.72
Chemokine	2.89	Transcription elongation factor complex	2.72
Cellular component unknown	2.87	Alpha1-adrenergic receptor	2.72
Structural constituent of cytoskeleton	2.82	Inositol-1,4,5-triphosphate receptor	2.72
Nucleosome	2.81	Synaptic transmission	2.70
Regulation of G-protein coupled receptor protein signaling „Gene Pathway“	2.81	Plasma membrane	2.69
Transcription factor, cytoplasmic sequestering	2.78	Smooth muscle contraction	2.68
Prostaglandin biosynthesis	2.78	Cell-matrix adhesion	2.64
ATP-binding and phosphorylation-dependent chloride channel	2.78	Membrane	2.56
Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase	2.78	Glutamate signaling „Gene Pathway“	2.55
G-protein coupled receptor kinase	2.78	Sugar porter	2.47

GO: Gene Ontology

Abbildung 1 Algorithmus der MAPPFinder-Software. Entnommen aus Doninger et al. Genome Biology. 2003. 4:R7

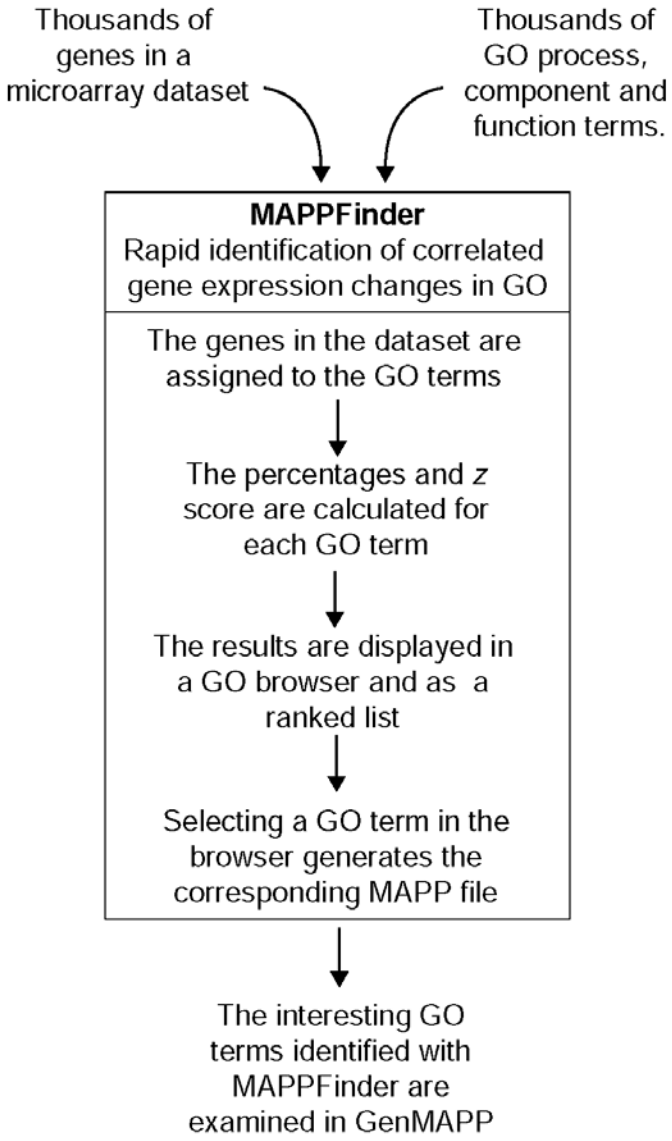


Abbildung 2 Struktur und Aufbau von Gene Ontology am Beispiel des „Gene Pathway“ RNA metabolism. Entnommen aus Doninger et al. Genome Biology. 2003. 4:R7

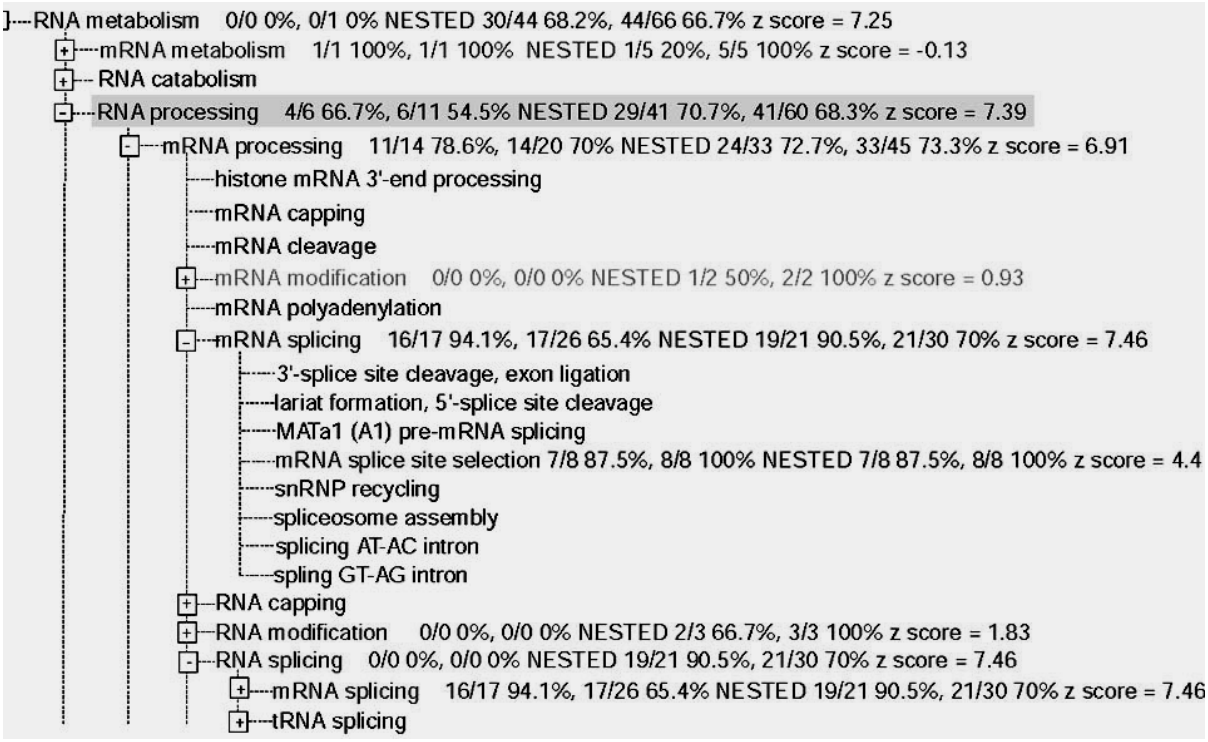


Abbildung 3 Leukozyten

(Mittelwert und Standardabweichung; * p < 0.05 Vergleich innerhalb der Gruppe mit präoperativ; $n_{Gruppe\ H}$ = 34, $n_{Gruppe\ P}$ = 31)

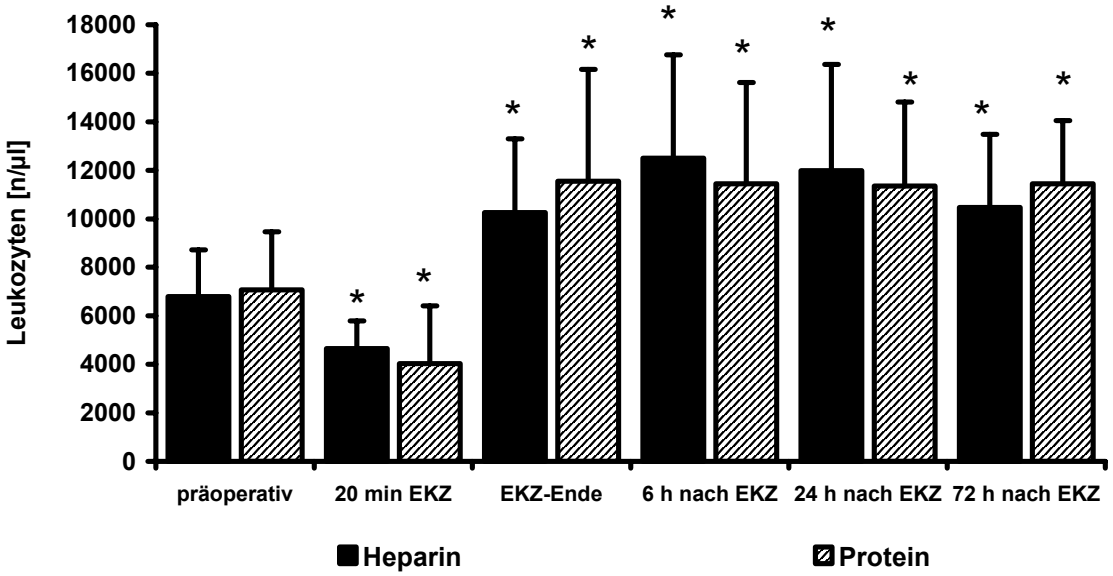


Abbildung 4 Neutrophile Granulozyten

(Mittelwert und Standardabweichung; * p < 0.05 Vergleich innerhalb der Gruppe mit präoperativ; $n_{Gruppe\ H}$ = 34, $n_{Gruppe\ P}$ = 31)

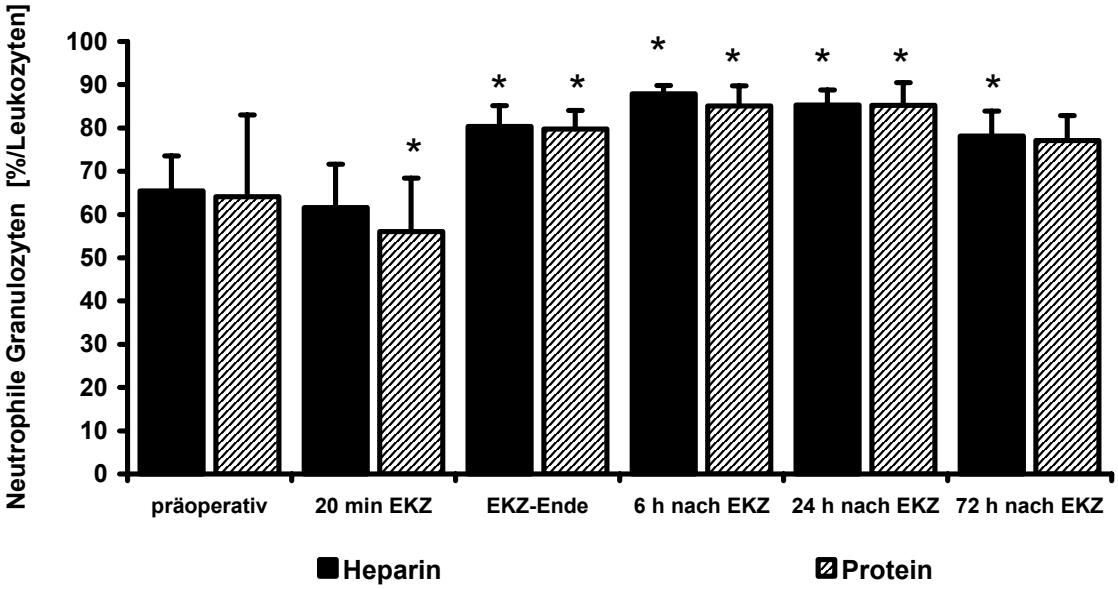


Abbildung 5 Lymphozyten

(Mittelwert und Standardabweichung; * p < 0.05 Vergleich innerhalb der Gruppe mit präoperativ; # p < 0.05 Vergleich zwischen den Gruppen; $n_{Gruppe\ H} = 34$, $n_{Gruppe\ P} = 31$)

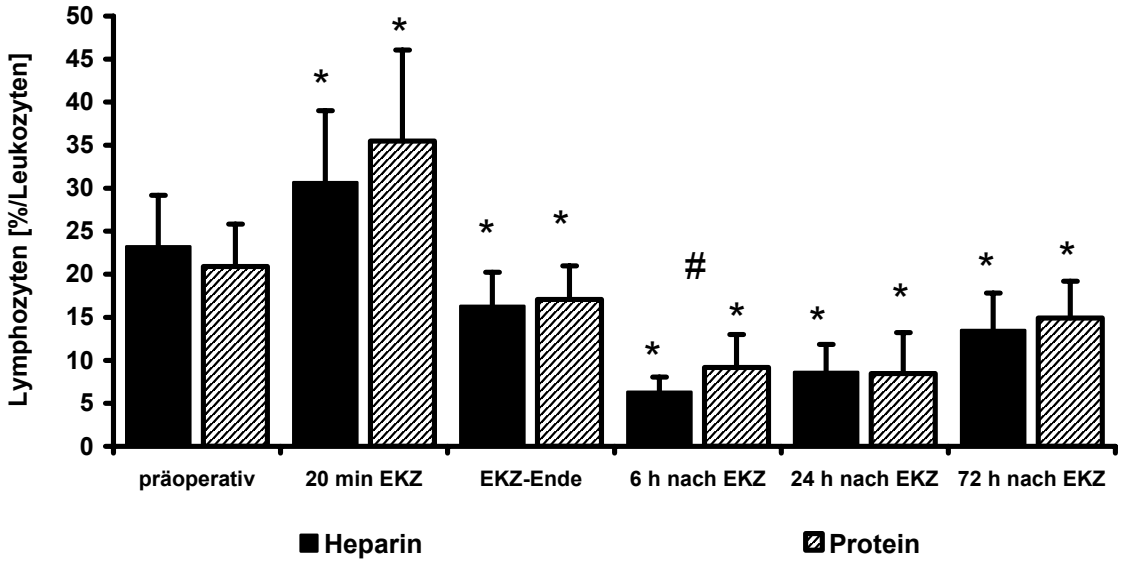


Abbildung 6 Monozyten

(Mittelwert und Standardabweichung; * p < 0.05 Vergleich innerhalb der Gruppe mit präoperativ; $n_{Gruppe\ H} = 34$, $n_{Gruppe\ P} = 31$)

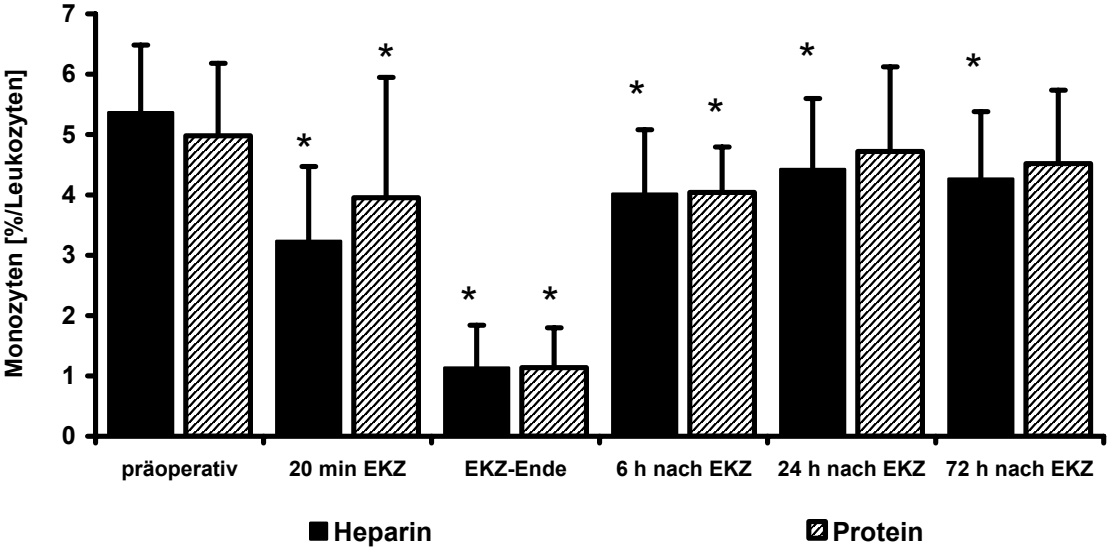


Abbildung 7 Partielle Thromboplastinzeit (PTT)

(Mittelwert und Standardabweichung; * p < 0.05 Vergleich innerhalb der Gruppe mit präoperativ; # p < 0.05 Vergleich zwischen den Gruppen; $n_{Gruppe\ H}$ = 34, $n_{Gruppe\ P}$ = 31)

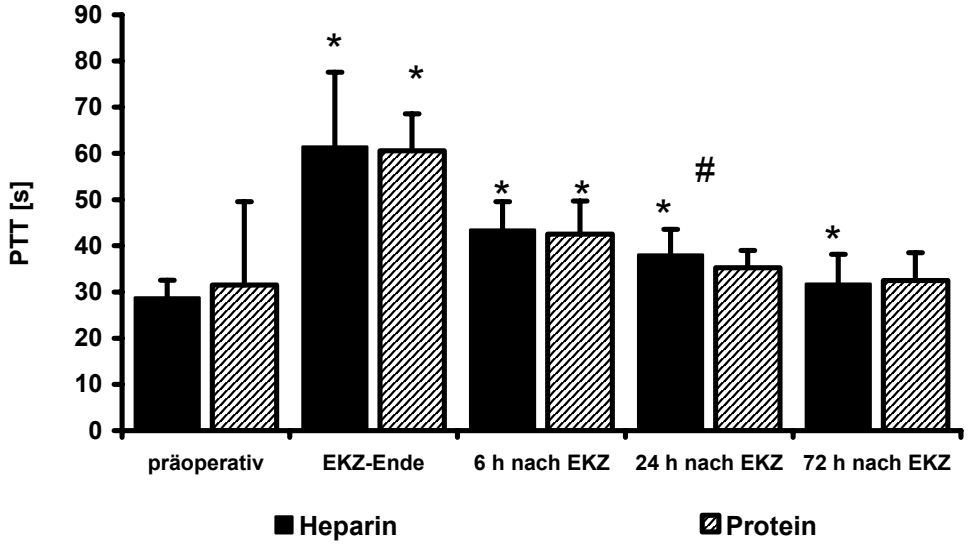


Abbildung 8 Serum-Kreatinin

(Mittelwert und Standardabweichung; * p < 0.05 Vergleich innerhalb der Gruppe mit präoperativ; $n_{Gruppe\ H}$ = 34, $n_{Gruppe\ P}$ = 31)

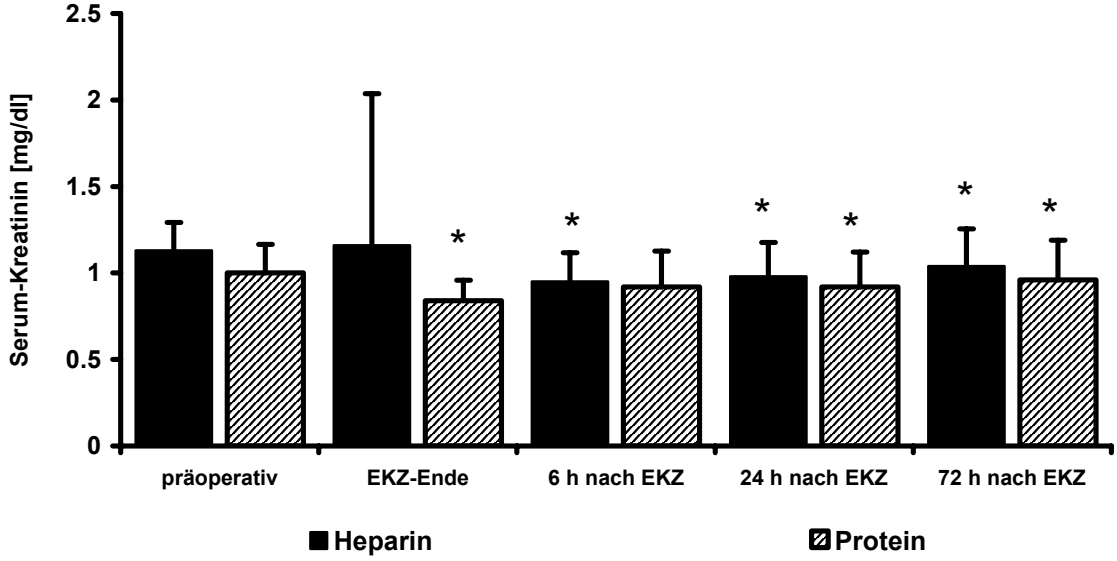


Abbildung 9 Glutamin-Oxalacetet-Transaminase (GOT)

(Mittelwert und Standardabweichung; * p < 0.05 Vergleich innerhalb der Gruppe mit präoperativ; $n_{Gruppe\ H}$ = 34, $n_{Gruppe\ P}$ = 31)

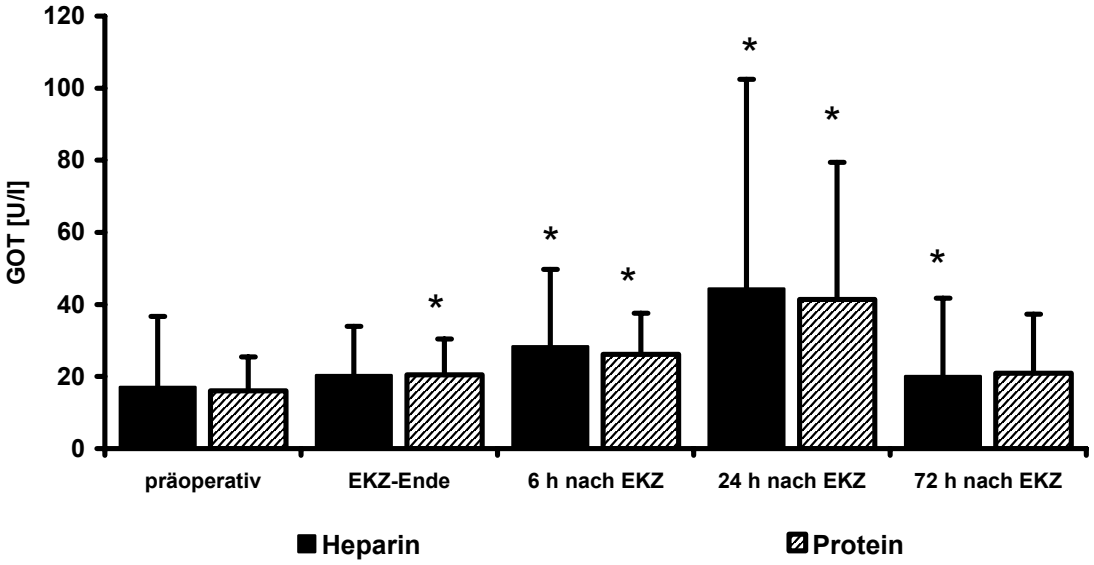


Abbildung 10 Glutamin-Pyruvat-Transaminase (GPT)

(Mittelwert und Standardabweichung; * p < 0.05 Vergleich innerhalb der Gruppe mit präoperativ; $n_{Gruppe\ H}$ = 34, $n_{Gruppe\ P}$ = 31)

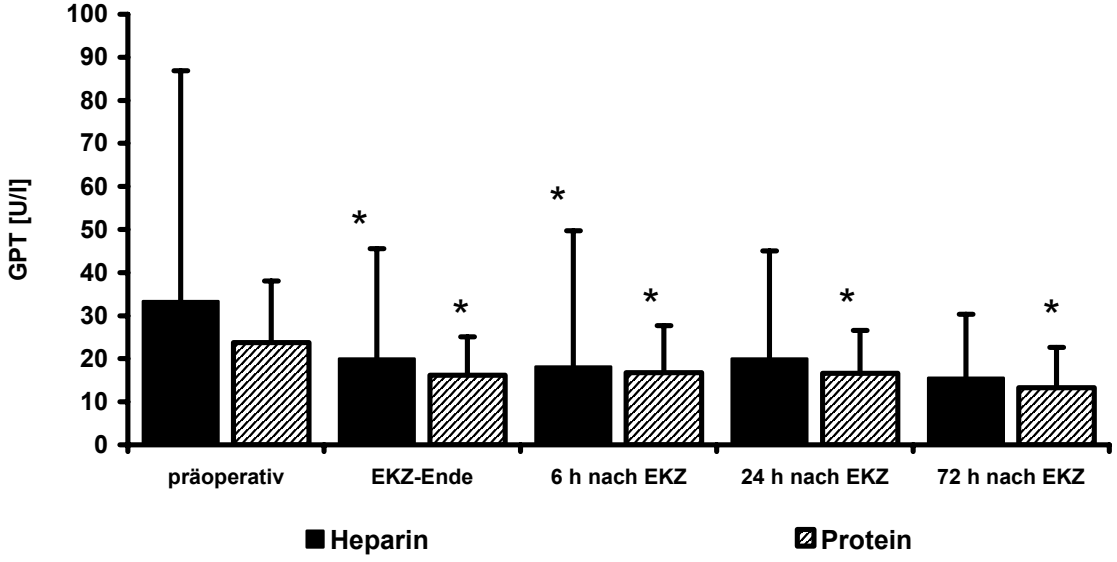


Abbildung 11 Quotient CK/CK-MB

(Mittelwert und Standardabweichung; * p < 0.05 Vergleich innerhalb der Gruppe mit präoperativ; $n_{Gruppe\ H} = 34$, $n_{Gruppe\ P} = 31$)

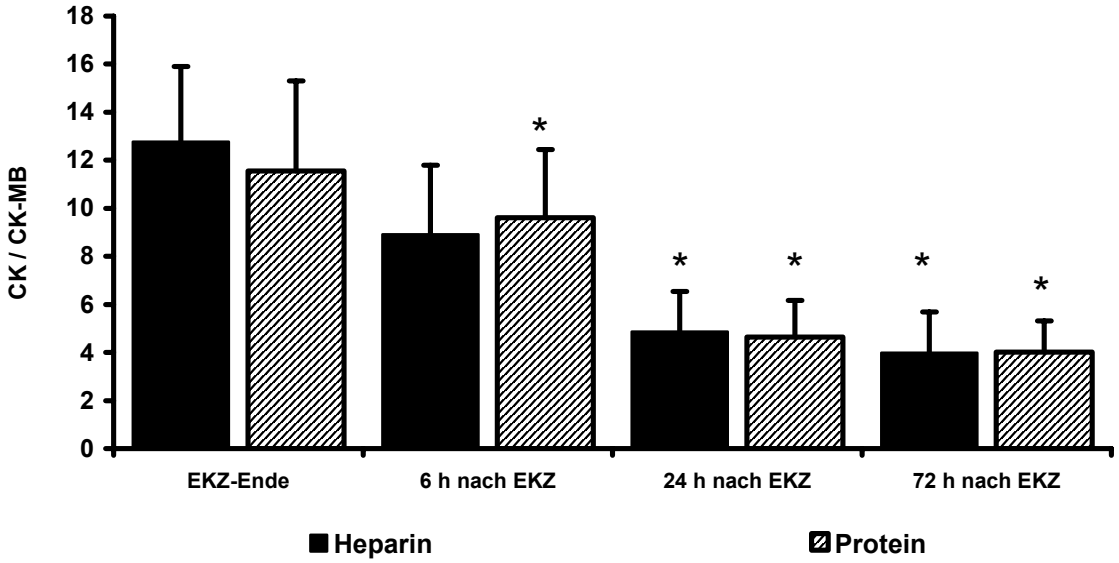


Abbildung 12 Laktatdehydrogenase (LDH)

(Mittelwert und Standardabweichung; * p < 0.05 Vergleich innerhalb der Gruppe mit präoperativ; $n_{Gruppe\ H} = 34$, $n_{Gruppe\ P} = 31$)

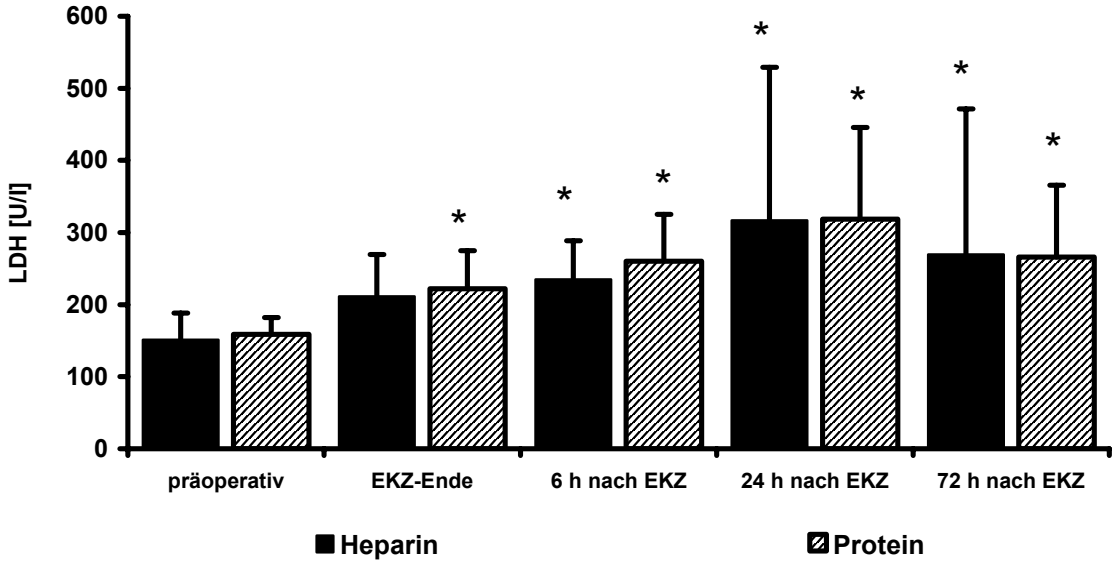


Abbildung 13 C-reaktives Protein

(Mittelwert und Standardabweichung; * p < 0.05 Vergleich innerhalb der Gruppe mit präoperativ; # p < 0.05 Vergleich zwischen den Gruppen; $n_{Gruppe\ H}$ = 34, $n_{Gruppe\ P}$ = 31)

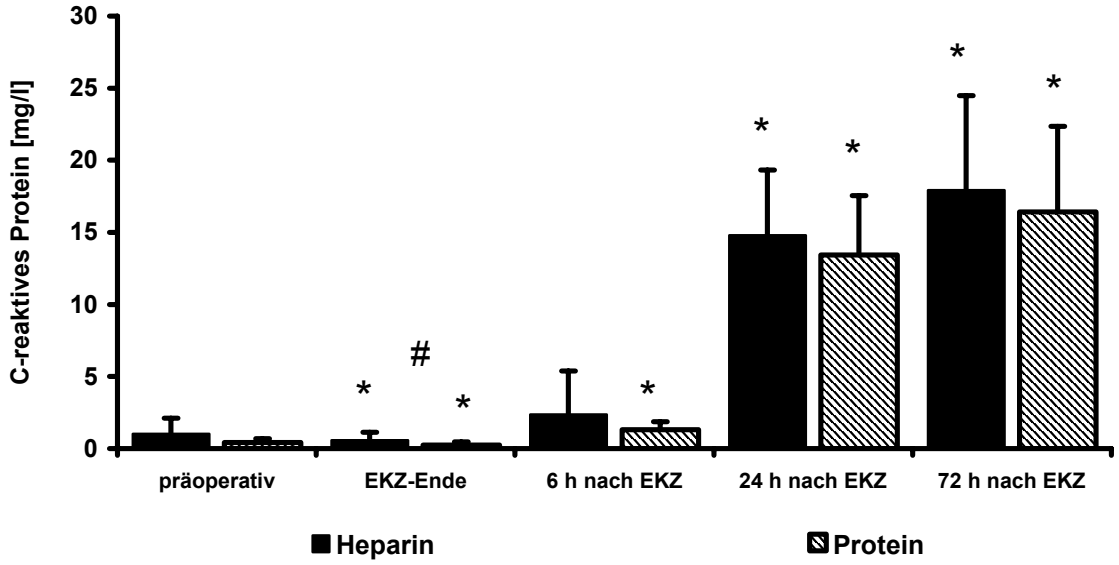


Abbildung 14 Anzahl der hochregulierten Gene aus 22.283 entsprechend Methode A, dargestellt anhand des p-Wertes post- versus präoperativ (logarithmisch skaliert). Waagrechte Linien zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ($n_{Gruppe\ H}$ = 6, $n_{Gruppe\ P}$ = 6). Entnommen aus: Seeburger et al. Circulation. 2005 [in press]

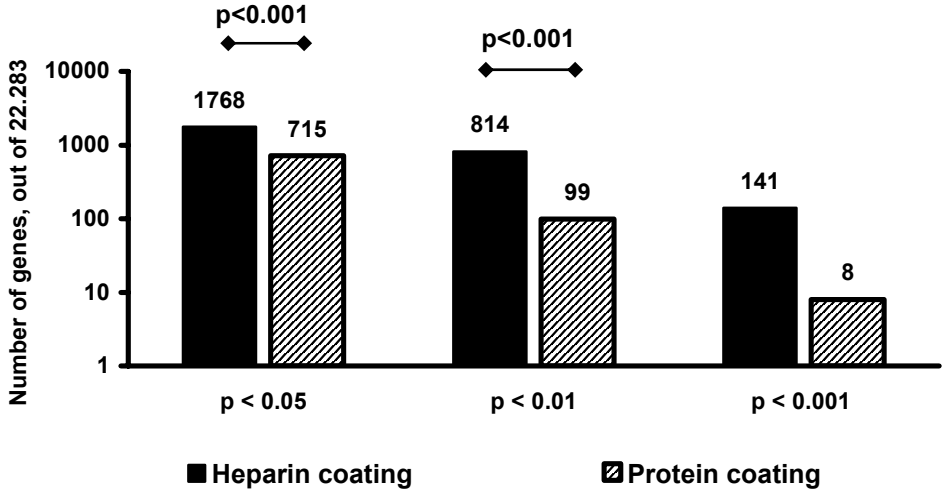


Abbildung 15 Anzahl der herunterregulierten Gene aus 22.283 (Details siehe Abb. 14). Entnommen aus: Seeburger et al. Circulation. 2005 [in press]

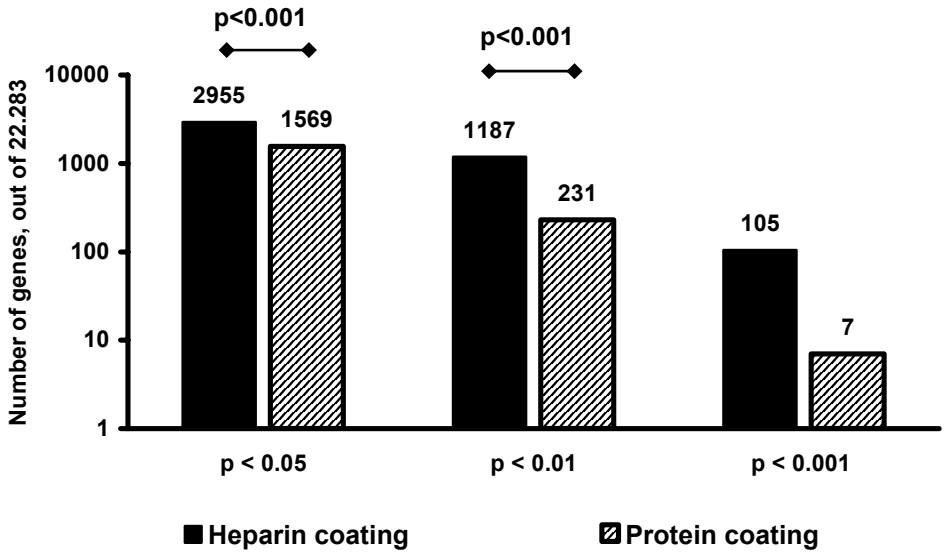


Abbildung 16 Anzahl der hochregulierten Gene aus 22.283 entsprechend Methode B, dargestellt anhand des „fold change“ post- versus präoperativ (logarithmisch skaliert). Waagrechte Linien zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ($n_{Gruppe\ H}$ = 6, $n_{Gruppe\ P}$ = 6). Entnommen aus: Seeburger et al. Circulation. 2005 [in press]

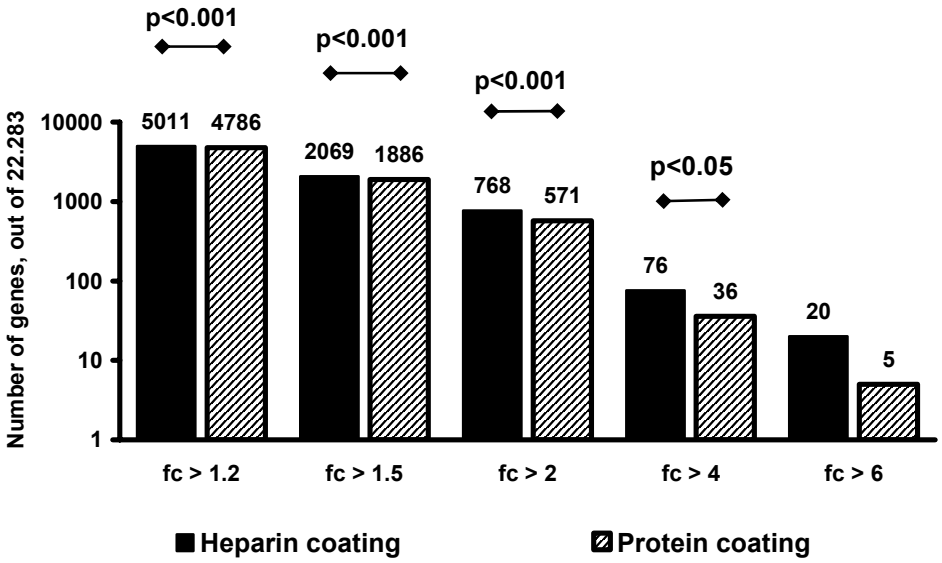


Abbildung 17 Anzahl der herunterregulierten Gene aus 22.283 (Details siehe Abb. 16). Entnommen aus: Seeburger et al. Circulation. 2005 [in press]

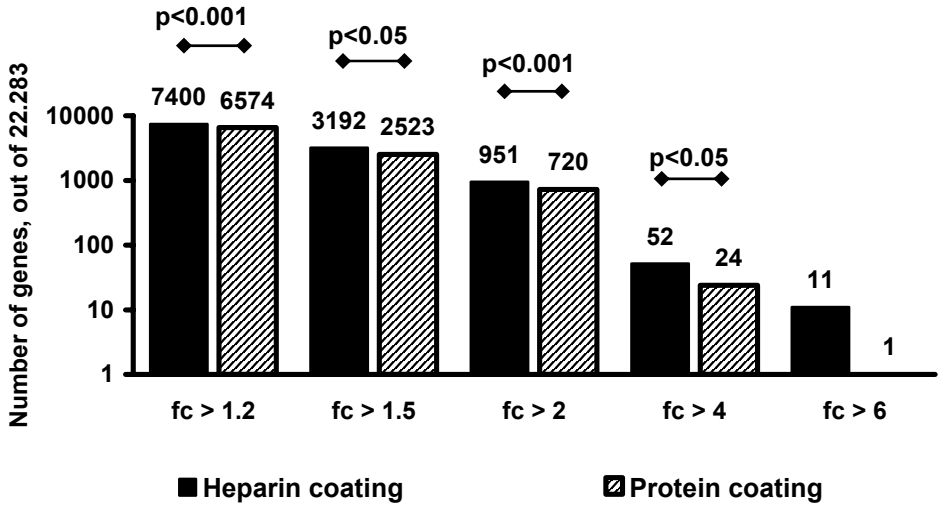


Abbildung 18 Anzahl der „Gene Pathways“ mit einem positiven z score prä- versus postoperativ entsprechend MAPPFinder-Analyse ($n_{Gruppe\ H} = 6$, $n_{Gruppe\ P} = 6$).
Entnommen aus: Seeburger et al. Circulation. 2005 [in press]

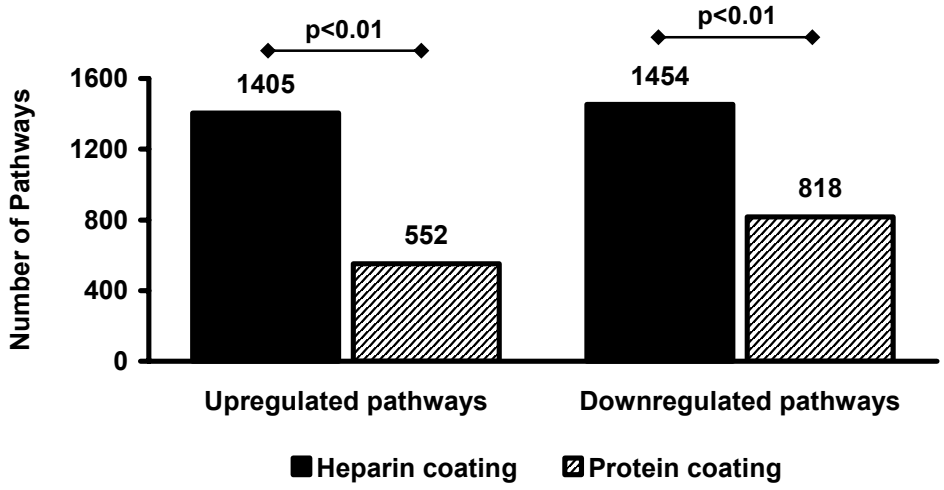


Abbildung 19 Perioperative Expression von IL-1ß in Monozyten

(Mittelwert und Standardabweichung; Effizienz GAPDH: 2,01; Effizienz IL-1ß: 1,87; $n_{Gruppe\ H}$ = 6, $n_{Gruppe\ P}$ = 6)

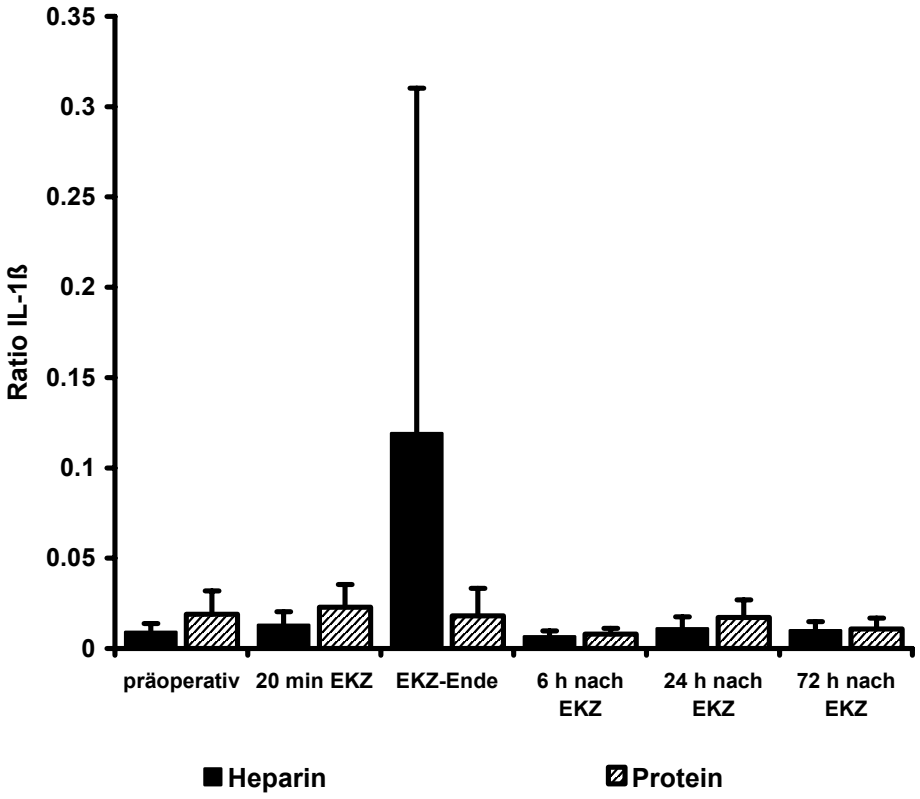


Abbildung 20 Perioperative Expression von IL-6 in Monozyten

(Mittelwert und Standardabweichung; Effizienz GAPDH: 2,01; Effizienz IL-6: 2,05; ; $n_{Gruppe\ H}$ = 6, $n_{Gruppe\ P}$ = 6)

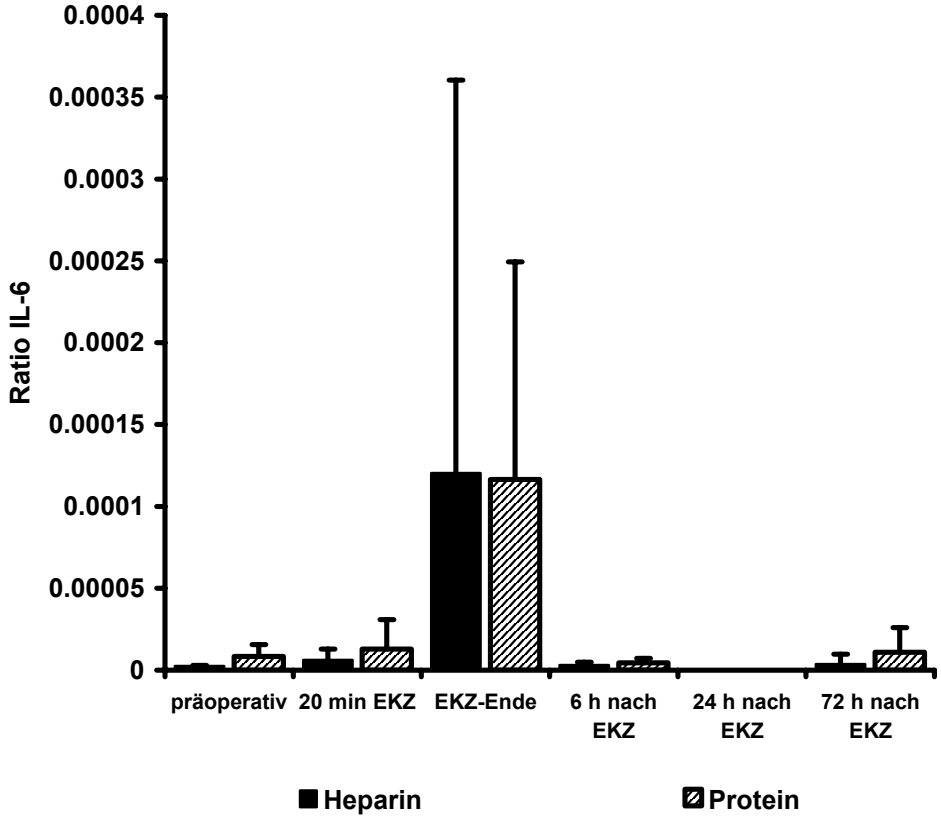


Abbildung 21 Perioperative Expression von IL-8 in Monozyten

(Mittelwert und Standardabweichung; Effizienz GAPDH: 2,01; Effizienz IL-8: 1,88; * $p < 0.05$ Vergleich innerhalb der Gruppe mit präoperativ; # $p < 0.05$ Vergleich zwischen den Gruppen; $n_{Gruppe\ H} = 6$, $n_{Gruppe\ P} = 6$)

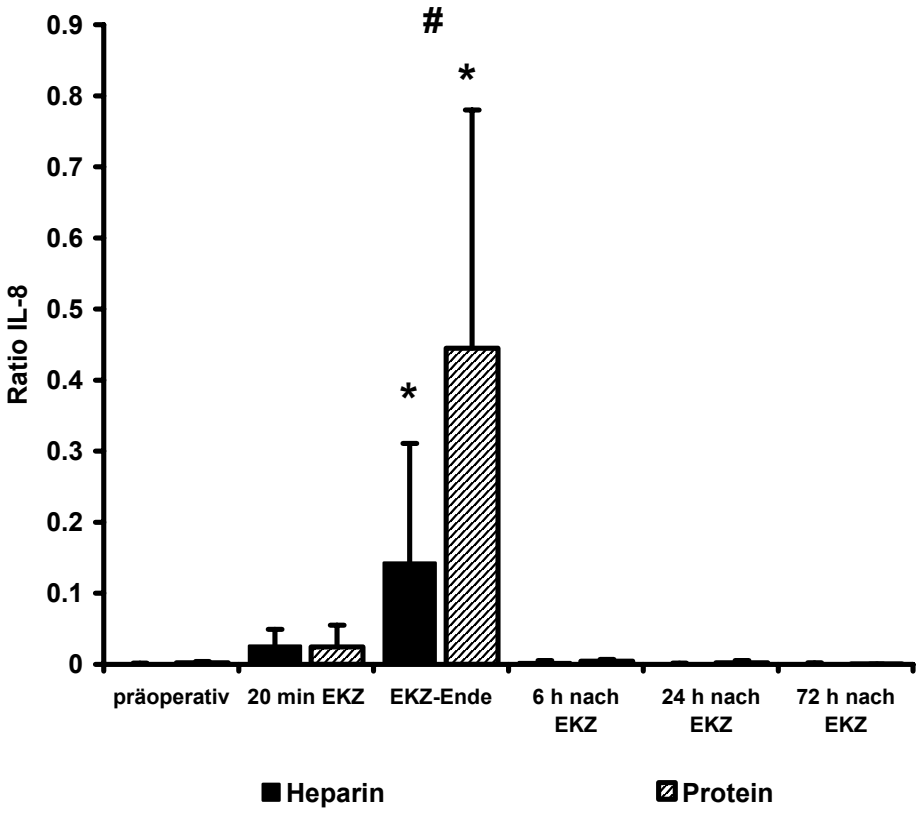
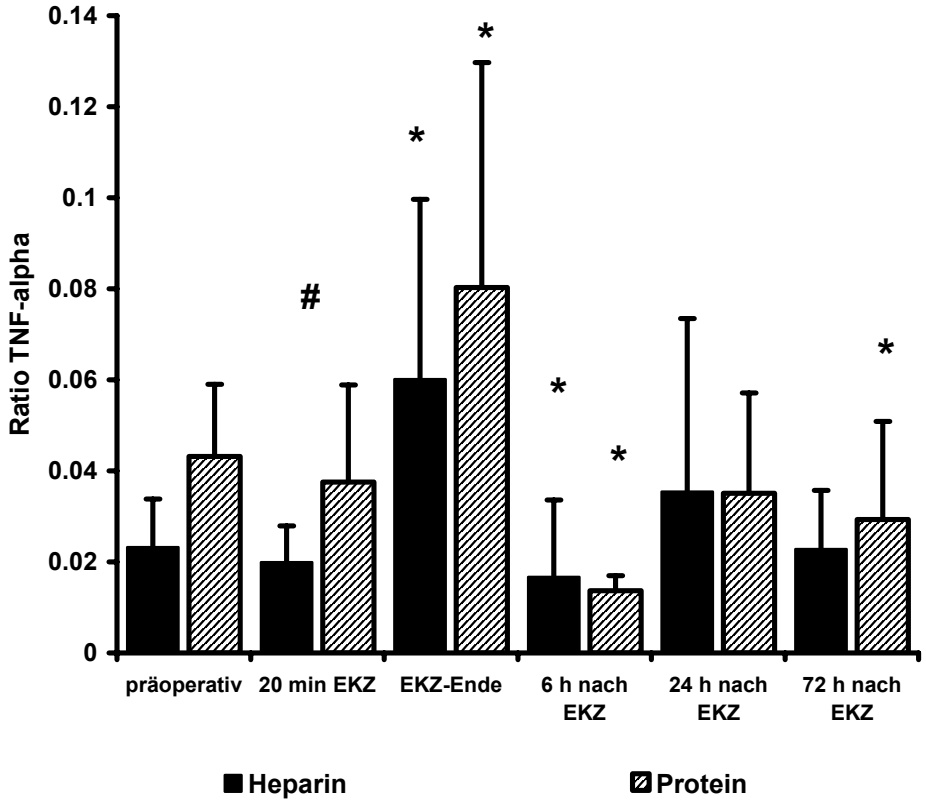


Abbildung 22 Perioperative Expression von TNF-α in Monozyten

(Mittelwert und Standardabweichung; Effizienz GAPDH: 2,01; Effizienz TNF-α: 1,81; * $p < 0.05$ Vergleich innerhalb der Gruppe mit präoperativ; # $p < 0.05$ Vergleich zwischen den Gruppen; $n_{Gruppe\ H} = 6$, $n_{Gruppe\ P} = 6$)



7 Literaturverzeichnis

1. Aebert H, Cornelius T, Ehr T, Holmer SR, Birnbaum DE, Riegger GA, Schunkert H. Expression of immediate early genes after cardioplegic arrest and reperfusion. Ann Thorac Surg. 1997; 63: 1669-1675.
2. Aebert H, Kirchner S, Keyser A, Birnbaum DE, Holler E, Andreesen R, Eissner G. Endothelial apoptosis is induced by serum of patients after cardiopulmonary bypass. Eur J Cardiothorac Surg. 2000; 18: 589-593.
3. Ashraf S, Tian y, Cowan D, Entrees A, Martin PG, Watterson G. Release of Proinflammatory Cytokines During Pediatric Cardiopulmonary Bypass: Heparin-Bonded Versus Nonbonden Oxygenators. Ann Thorac Surg. 1997: 64: 1790-1794.
4. Available from http://www.maquet.com
5. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez
6. Bakay M, Chen YW, Borup R, Zhao P, Nagaraju K, Hoffman EP. Sources of variability and effect of experimental approach on expression profiling data interpretation. BMC Bioinformatics. 2002; 3: 4.
7. Barstad RM, Ovrum E, Ringdal MA, Oysese R, Hamers MJ, Veiby OP, Rolfsen T, Stephens RW, Sakariassen KS. Induction of monocyte tissue factor procoagulant activity during coronary artery bypass surgery is reduced with heparin-coated extracorporeal circuit. Br J Haematol. 1996. 94(3): 517-525.
8. Bottio T, Rizzoli G, Caprili L, Nesseris G, Thiene G, Gerosa G. Full-sternotomy off-pump versus on-pump coronary artery bypass procedures: in-hospital outcomes and complications during one year in a single center. Tex Heart Inst J. 2003. 30(4): 261-267.
9. Brazma A, Hingamp P, Quackenbush J, Sherlock G, Spellman P, Stoeckert C, Aach J, Ansorge W, Ball CA, Causton HC, Gaasterland T, Glenisson P, Holstege FC, Kim IF, Markowitz V, Matese JC, Parkinson H, Robinson A, Sarkans U, Schulze-Kremer S, Stewart J, Taylor R, Vilo J, Vingron M. Minimum information about a microarray experiment (MIAME): toward standards for microarray data. Nat Genet. 2001; 29: 365-371.
10. Cremer J, Martin M, Redl H, Bahrami S, Abraham C, Graeter T, Haverich A, Schlag G, Borst HG. Systemic inflammatory response syndrome after cardiac operations. Ann Thorac Surg. 1996; 61: 1714-1720.
11. Doniger SW, Salomonis N, Dahlquist KD, Vranizan K, Lawlor SC, Conklin BR. MAPPFinder: using Gene Ontology and GenMAPP to create a global gene-expression profile from microarray data. Genome Biol. 2003; 4: R7.
12. Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P, Trent JM. Expression profiling using cDNA microarrays. Nat Genet. 1999; 21: 10-14.
13. Edmunds LH Jr. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass. Ann Thorac Surg. 1998; 66: 12-16.
14. Feyrer R, Harig F, Cesnjevar R, Faidi Mahmoud O, Fischlein T, Parsch H, Bretzger J, Doreth M, Weyand M: Ist die Heparinbeschichtung von EKZ-Systemen der Behandlung mit synthetischem Protein überlegen? Kardiotechnik. 2003. 3.

15. Finn A, Naik S, Klein N, Levinsky RJ, Strobel S, Elliott M: Interleukin-8 release and neutrophil degranulation after pediatric cardiopulmonary bypass. J Thorac Cardiovasc Surg. 1993; 105: 234-241.
16. Friedman M, Wang SY, Stahl GL, Johnson RG, Sellke FW. Altered beta-adrenergic and cholinergic pulmonary vascular responses after total cardiopulmonary bypass. J Appl Physiol. 1995; 79: 1998-2006.
17. Goldstein JL, Goldstein KA, Wardwell K, Fahrner SL, Goonan KE, Cheney MD, Yeager MP, Guyre PM. Increase in plasma and surface CD163 levels in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery. Atherosclerosis. 2003; 170: 325-332.
18. Harig F, Feyrer R, Mahmoud FO, Blum U, von der Emde J. Reducing the post-pump syndrome by using heparin-coated circuits, steroids, or aprotinin. Thorac Cardiovasc Surg. 1999; 47: 111-118.
19. Hayashi Y, Sawa Y, Fukuyama N, Miyamoto Y, Takahashi T, Nakazawa H, Matsuda H. Leukocyte-depleted terminal blood cardioplegia provides superior myocardial protective effects in association with myocardium-derived nitric oxide and peroxynitrite production for patients undergoing prolonged aortic crossclamping for more than 120 minutes. J Thorac Cardiovasc Surg. 2003; 126: 1813-1821.
20. Hennein HA, Ebba H, Rodriguez JL, Merrick SH, Keith FM, Bronstein MH, Leung JM, Mangano DT, Greenfield LJ, Rankin JS. Relationship of the proinflammatory cytokines to myocardial ischemia and dysfunction after uncomplicated coronary revascularization. J Thorac Cardiovasc Surg. 1994; 108: 626-635.
21. King HC, Sinha AA. Gene expression profile analysis by DNA microarrays: promise and pitfalls. JAMA. 2001; 286: 2280-2288.
22. Konstantinov IE, Arab S, Kharbanda RK, Li J, Cheung MMH, Cherepanov V, Downey GP, Liu PP, Cukerman E, Coles JG, Redington AN. The remote ischemic preconditioning stimulus modifies inflammatory gene expression in humans. Physiol Genomics. 2004; 19: 143-150.
23. Lang T, Secic M. How to report statistics in medicine: annotated guidelines for authors, editors, and reviewers. American College of Physicians Philadelphia 1997
24. Larm O, Larsson R, Olsson P. A new non-thrombogenic surface prepared by selective covalent binding of heparin via a modified reducing terminal residue. Biomater Med Devices Artif Organs. 1983; 11(2-3):161-173.
25. Marty C, Misset B, Tamion F, Fitting C, Carlet J, Cavaillon JM. Circulating interleukin-8 concentrations in patients with multiple organ failure of septic and nonseptic origin. Crit Care Med.1994; 22: 673-679.
26. Nelson DP, Wechsler SB, Miura T, Stagg A, Newburger JW, Mayer JE Jr, Neufeld EJ. Myocardial immediate early gene activation after cardiopulmonary bypass with cardiac ischemia-reperfusion. Ann Thorac Surg. 2002; 73: 156-162.
27. Paparella D, Yau TM, Young E. Cardiopulmonary bypass induced inflammation: pathophysiology and treatment. An update. Eur J Cardiothorac Surg. 2002; 21: 232-244.
28. Ruel M, Bianchi C, Khan TA, Xu S, Liddicoat JR, Voisine P, Araujo E, Lyon H, Kohane IS, Libermann TA, Sellke FW. Gene expression profile after cardiopulmonary bypass and cardioplegic arrest. J Thorac Cardiovasc Surg. 2003; 126: 1521-1530.

29. Seeburger J, Hoffmann J, Wendel HP, Ziemer G, Aebert H. Gene Expression Changes in Leukocytes During Cardiopulmonary Bypass are Dependent on Circuit Coating. Circulation. 2005. [in press]
30. Sellke FW, Tofukuji M, Stamler A, Li J, Wang SY. Beta-adrenergic regulation of the cerebral microcirculation after hypothermic cardiopulmonary bypass. Circulation. 1997; 96: II304-310.
31. The Gene Ontology Consortium. Creating the Gene Ontology resource: design and implementation. Genome Res. 2001; 11: 1425-1433.
32. Verrier ED, Morgan EN. Endothelial Response to Cardiopulmonary Bypass Surgery. Ann Thorac Surg. 1998; 66: S17-19.
33. Victor A, Klug SJ, Blettner M. Dtsch Arztebl. 2005; 102: A 355-360.
34. Voisine P, Ruel M, Khan TA, Bianchi C, Xu SH, Kohane I, Libermann TA, Out H, Saltiel AR, Sellke FW. Differences in gene expression profiles of diabetic and nondiabetic patients undergoing cardiopulmonary bypass and cardioplegic arrest. Circulation. 2004; 110: II280-286.
35. Wan S, Marchant A, DeSmet JM, Antoine M, Zhang H, Vachiery JL, Goldman M, Vincent JL, LeClerc JL. Human cytokine responses to cardiac transplantation and coronary artery bypass grafting. J Thorac Cardiovasc Surg. 1996; 111: 469-477.
36. Weber N, Wendel HP, Ziemer G. Gene monitoring of surface-activated monocytes in circulating whole blood using duplex RT-PCR. J Biomed Mate Res. 2001; 56: 1-8.
37. Wendel HP, Scheule AM, Eckstein FS, Ziemer G. Haemocompatibility of paediatric membrane oxygenators with heparin-coated surface. Perfusion. 1999; 14: 21-28.
38. Wendel HP, Ziemer G. Coating-techniques to improve the hemocompatibility of artificial devices used for extracorporeal circulation. Eur J Cardiothorac Surg. 1999; 16: 342-350.
39. Yamada H, Kudo I, Hirose Y, Toyoshima M, Abe H, Kurahashi K. Heparin-coated circuits reduce the formation of TNF-α duing cardiopulmonary bypass. Acta Anaesthesiol Scand. 1996; 40: 311-317.
40. Zanke BW, Boudreau K, Rubie E, Winnett E, Tibbles LA, Zon L, Kyriakis J, Liu FF, Woodgett JR. The stress-activated protein kinase „Gene Pathway“ mediates cell death following injury induced by cis-platinum, UV irradiation or heat. Curr Biol. 1996; 6: 606-613.
41. Zimmermann AK, Simon P, Seeburger J, Hoffmann J, Ziemer G, Aebert H, Wendel HP. Cytokine gene expression in monocytes of patients undergoing cardiopulmonary bypass surgery evaluated by real-time PCR. J Cell Mol Med. 2003; 7: 146-156.

Präsentation und Publikation

Auszüge dieser Arbeit wurden publiziert sowie auf verschiedenen Kongressen vorgestellt:

- Seeburger J, Hoffmann J, Wendel HP, Ziemer G, Aebert H. Gene Expression Changes in Leukocytes During Cardiopulmonary Bypass are Dependent on Circuit Coating. Circulation. 2005. [in press]

- American Heart Association's Scientific Sessions, New Orleans, Louisiana, USA, 7 – 10 November 2004
- Biostar Congress, Stuttgart, 6 – 8 November 2004
- 2nd Joint Meeting of the European Association for Cardiothoracic Surgery and European Society of Thoracic Surgeons, Wien, 12 – 15 October 2003
- International Symposium Functional Genomics of Infectious Diseases and Inflammation, Tübingen, 18 – 20 September 2003
- 29th Annual Meeting of the Society for Biomaterials, Reno, Nevada, USA, 30 Apr – 3 May 2003

Danksagung

Zu Großem Dank verpflichtet fühle ich mich Herrn Prof. Dr. Aebert für die Überlassung des Themas. Hervorheben möchte ich die ausgezeichnete Zusammenarbeit mit ihm sowie seine außerordentliche Unterstützung, die mir zuteil wurde.

Herrn Prof. Dr. Dietz danke ich sehr herzlich für seine ausführliche Beratung und seine Bemühungen im Rahmen der statistischen Auswertung, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen.

Herrn Dr. Wendel danke ich für seine kompetenten Ratschläge.

Für die gute Zusammenarbeit möchte ich mich bei Frau Dipl.-Biol. Zimmermann und Herrn Dipl.-Biol. Hoffmann bedanken.

Herrn Dipl.-Ing. Optenhöfel und den Mitarbeitern der Abteilung für Kardiotechnik der Klinik für Thorax- Herz- und Gefäßchirurgie der Universität Tübingen danke ich für die ausgezeichnete Kooperation.

Bei den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Forschungslabors der Abteilung für Thorax- Herz- und Gefäßchirurgie möchte ich mich für ihre Hilfsbereitschaft bedanken.

Allen Patienten danke ich aufrichtig für Ihre Teilnahme.

Lebenslauf

14.11.1974	Jörg Seeburger, geb. Weinmann, geboren in Bisidimo (Äthiopien); Eltern Klaus Weinmann und Margrit Weinmann, geb. Schmider; Verheiratet mit Verena Seeburger, drei Kinder
07/92	Mittlere Reife, Gymnasium Ebingen
08/92 – 07/93	Auslandsaufenthalt USA, Kanada
06/96	Allgemeine Hochschulreife, Gymnasium Balingen
07/96 – 01/97	Auslandsaufenthalt USA, Kanada
02/97 – 02/98	Zivildienst, Städtisches Krankenhaus Lübeck-Travemünde
03/98 – 09/98	Angestellter Firma Gerüstbau Jetter, Rosenfeld
10/98	Beginn Medizinstudium Universität Tübingen
09/00	Ärztliche Vorprüfung
08/01	Erster Abschnitt Ärztliche Prüfung
04/04	Zweiter Abschnitt Ärztliche Prüfung
04/04 – 03/05	Praktisches Jahr, Wahlfach Anästhesie
28.04.05	Dritter Abschnitt Ärztliche Prüfung

Hechingen, 02.05.2005