Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik (Department) Tübingen Abteilung Innere Medizin III (Schwerpunkte: Kardiologie und Kreislauferkrankungen) Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Gawaz

Beeinflussung der Thrombozyten- und Leukozytenaktivierung sowie die Auswirkungen auf das Gerinnungs- und Komplementsystem durch Nichtbeschichtete und Sirolimusbeschichtete Koronarendoprothesen

> Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Katja-Simone Rey

aus

VS-Villingen

2009

Dekan:Professor Dr. I. B. Autenrieth1. Berichterstatter:Privatdozent Dr. M. Beyer2. Berichterstatter:Privatdozent Dr. H. P. Wendel

gedruckt: Copier Center Haase, Würzburg, 2009

Meiner Familie und meinem Mann, Martin Roth

INHALTSVERZEICHNIS

<u>1 EINLEITUNG</u> 1-14		1-14
1.1	Koronare Herzkrankheit (KHK)	1
1.1.1	Entwicklung, Diagnostik und Therapie der KHK	2
1.2	Koronarendoprothesen (Stents)	5
1.2.1 1.2.2	Studien zu Sirolimus-Stents und nichtbeschichteten Stents	7 11
1.3	Sirolimus	12
1.4	Zielsetzung	14
2 MATERIA	AL UND METHODEN	<u>15-41</u>
2.1	Probanden	15
2.2	Material	16
2.2.1 2.2.2 2.2.3 2.2.3.1 2.2.3.2 2.2.3.3 2.2.4	Blutentnahme Schläuche Koronarendoprothesen (Stents) Unbeschichteter Stent (BMS; bare metal Stent) Beschichteter Stent (SES; sirolimus-eluting Stent) Einbringen der Stents in die Carmeda®-Schläuche Chandler Loop Modell	16 16 17 18 18 19 21
2.3	Labormethoden	22
2.3.1 2.3.2 2.3.3 2.3.3.1 2.3.3.2 2.3.3.3 2.3.3.4 2.3.3.5 2.3.3.6 2.3.4 2.3.4.1 2.3.4.1 2.3.4.2	Ablauf am Chandler Loop Modell Bestimmung von Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyte Bestimmung verschiedener Blutparameter (ELISA) PMN-Elastase sP-Selectin Betathromboglobulin (β-TG) SC5b-9 Thrombin-Antithrombin-III-Komplex (TAT) Factor XIIa Durchflusszytometrie der Thrombozyten (FACS-Analyse) Reagenzien für die Durchflusszytometrie Antikörper CD 45 CD 41 PAC 1 CD 62P (CL B Thromb/6)	22 en 24 24 26 27 29 30 32 33 35 36 37 38 38 38
2.4	Rasterelektronenmikroskopie der Stents	

2.5	Statistik	40
<u>3 ERGEI</u>	BNISSE 4	<u>2-59</u>
3.1	Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten	42
3.1.1 3.1.2 3.1.3	Erythrozyten Leukozyten Thrombozyten	42 43 43
3.2	Verschiedene Blutparameter (ELISA)	44
3.2.1 3.2.2 3.2.3 3.2.4 3.2.5 3.2.6	PMN-Elastase sP-Selectin Betathromboglobulin (β-TG) SC5b-9 Thrombin-Antithrombin-III-Komplex (TAT) Factor XIIa	44 45 46 47 48 49
3.3	Durchflusszytometrie der Thrombozyten (FACS-Analyse)	50
3.3.1 3.3.2 3.3.3 3.3.4 3.3.5	Negativkontrolle CD 45/CD 41 PAC 1 PAC 1 mit ADP CD62P (CLB Thromb/6)	50 51 52 52 52 53
3.4	Rasterelektronenmikroskopie der Stents	54
3.4.1 3.4.2 3.4.3	Stents ohne Blutkontakt BMS nach Durchlauf im Chandler Loop Modell SES nach Durchlauf im Chandler Loop Modell	54 56 58
<u>4 DISKU</u>	SSION 60	<u>)-82</u>
4.1	Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten	60
4.1.1 4.1.2 4.1.3	Erythrozyten Leukozyten Thrombozyten	60 60 62
4.2	Verschiedene Blutparameter (ELISA)	64
4.2.1 4.2.2 4.2.3 4.2.4 4.2.5 4.2.6	PMN-Elastase sP-Selectin Betathromboglobulin (β-TG) SC5b-9 Thrombin-Antithrombin-III-Komplex (TAT) Factor XIIa	64 66 68 70 72 74
4.3	Durchflusszytometrie der Thrombozyten (FACS-Analyse)	75
4.3.1	Negativkontrolle	75

4.3.2 4.3.3	CD 45/CD 41 PAC 1	76 78
4.3.4 4.3.5	PAC mit ADP CD 62P (CLB Thromb/6)	79 79
4.4	Rasterelektronenmikroskopie der Stents	
4.4.1	Unbeschichteter (BMS) und beschichteter Stent (SES) nach Durchlauf im Chandler Loop Modell	
<u>5 ZUSAMME</u>	ENFASSUNG	83-84
<u>6 LITERATU</u>	IRVERZEICHNIS	85-102
7 ANHANG		<u>103-119</u>
7.1.	Original Diagramm einer FACS-Analyse (CD 41/CD 45)	103
7.2.	Tabellen	111
7.2.1 7.2.2 7.2.3	Tabellen Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten Tabellen der ELISA-Werte Tabellen der FACS-Analyse	111 112 113
7.3	Bilder der Rasterelektronenmikroskopie	115
7.3.1 7.3.1.1 7.3.1.2	Bilder der Negativkontrollen BMS SES	115 115 116
7.3.2	Bilder des BMS nach Blutkontakt Bilder des SES nach Blutkontakt	116 118

Abkürzungsverzeichnis

ACS	Akutes Coronarsyndrom (bzw. Koronarsyndrom)
ADP	Adenosin-di-Phosphat
AP	alkalische Phosphatase
ARDS	acute (bzw. adult) respiratory distress syndrome
ATIII	Antithrombin III
Atm	Atmosphären (Druckskala)
β-TG	Betathromboglobulin
BMI	Body Mass Index
BMS	bare metal Stent (unbeschichteter Stent)
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	Cluster of differentiation
CRP	C-reaktives Protein
CTAD	Citrat/Theophyllin/Adenosin/Dipyridamol
DES	drug-eluting Stent (mit Medikament beschichteter Stent)
DIC	disseminierte intravasale Gerinnung
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	endothelial growth factor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluorescense activated cell sorting
FITC	Fluorescein
gpllbllla	Glycoprotein IlbIIIa
HDL	high density lipoprotein
HMWK	high molecular weight kininogen
lg	Immunglobulin
IL	Interleukin
КНК	Koronare Herzkrankheit
LAF-Box	Sterile Arbeits- und Werkbank
LCA	leukocyte common antigen
LDL	low density lipoprotein
LL	lower left

LR	lower right
MAC	membran attack complex
mTOR	mammalian target of rapamycin
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PBS	Phosphat Buffered Saline
PE	R-Phycoerythrin
PMN	Polymorphnucleär
РМТ	photomutiple Tube
РТСА	Percutane transluminale Koronarangioplastie Englisch: percutaneous transluminal coronary angioplasty
RNA	ribonucleic acid
SC5b-9	Komplementkomplex soluble C5b-9
SES	Sirolimus-eluting Stent (mit Sirolimus beschichteter Stent)
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
sP-Selectin	soluble P-Selectin
ТАТ	Thrombin-Antithrombin-III-Komplex
тсс	terminaler Komplementkomplex
TNF	Tumornekrosefaktor
UL	upper left
UR	upper right
WHO	World Health Organisation

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 (S. 22)	Schematische Darstellung des Chandler Loop Modells.
Abb. 2 (S. 42)	Vergleich der Erythrozytenzahl des Ausgangswertes mit den jeweiligen Schläuchen nach Durchlauf im Chandler Loop.
Abb. 3 (S. 43)	Vergleich des Ausgangswertes mit den jeweiligen Schläuchen nach Durchlauf im Chandler Loop Modell bezüglich der Leukozytenzahl (*p < 0,05 vs. Ausgangs- wert).
Abb. 4 (S. 44)	Thrombozytenzahl im Vergleich zwischen dem Ausgangswert und den jeweiligen Schläuchen nach Durchlauf im Chandler Loop Modell (*p < 0,05 vs. Ausgangswert).
Abb. 5 (S. 45)	Vergleich der PMN-Elastase zwischen den jeweiligen Schläuchen nach Durchlauf im Chandler Loop und dem Ausgangswert (*p < 0,05 vs. Ausgangswert).
Abb. 6 (S. 46)	Vergleich von sP-Selectin zwischen dem Ausgangswert und den jeweiligen Schläuchen nach Durchlauf im Chandler Loop Modell (*p < 0,05 vs. Ausgangswert bzw. $^{\circ}$ p < 0,05 vs. BMS).
Abb. 7 (S. 47)	Vergleich der β -TG Werte zwischen dem Ausgangswert und den jeweiligen Schläuchen nach Durchlauf im Chandler Loop (*p < 0,05 vs. Ausgangswert bzw. °p < 0,05 vs. SES).
Abb. 8 (S. 48)	Vergleich von SC5b-9 zwischen den jeweiligen drei Schläuchen nach Durchlauf im Chandler Loop und dem Ausgangswert (*p < 0,05 vs. Ausgangswert).
Abb. 9 (S. 49)	Vergleich zwischen dem Ausgangswert und den jeweiligen Schläuchen nach Durchlauf im Chandler Loop bezogen auf die TAT-Werte (*p < 0,05 vs. Ausgangswert).
Abb. 10 (S. 50)	Vergleich des Faktor XIIa zwischen dem Ausgangswert und den jeweiligen Schläuchen nach Durchlauf im Chandler Loop Modell (*p < 0,05 vs. Ausgangswert).
Abb. 11 (S. 51)	Vergleich von CD 41/CD 45 zwischen dem Ausgangswert und den jeweiligen Schläuchen nach Durchlauf im Chandler Loop.

- Abb. 12 (S. 52) Vergleich zwischen dem Ausgangswert und den jeweiligen Schläuchen nach Durchlauf im Chandler Loop bezüglich des Antikörpers PAC 1.
- Abb. 13 (S. 53) Vergleich PAC 1 mit ADP zwischen dem Ausgangswert und den jeweiligen Schläuchen nach Durchlauf im Chandler Loop Modell.
- Abb. 14 (S. 54) Vergleich von CD 62P (CLB Thromb/6) zwischen den jeweiligen Schläuchen nach Durchlauf im Chandler Loop Modell und dem Ausgangswert.
- Abb. 15 (S. 55) BMS ohne Blutkontakt.
- Abb. 16 (S. 55) SES ohne Blutkontakt.
- Abb. 17 (S. 56) Vergrößerung der Sirolimusbeschichtung an verschiedenen Stellen des Stents.
- Abb. 18 (S. 56) BMS nach Blutkontakt.
- Abb. 19 (S. 57) Vergrößerte Darstellung der aufgelagerten Zellaggregate.
- Abb. 20 (S. 57) Detailansicht dreier Thrombozytenaggregate.
- Abb. 21 (S. 58) SES nach Blutkontakt.
- Abb. 22 (S. 58) Aufgelagerte Erythrozyten auf dem SES.
- Abb. 23 (S. 59) Fibrinschicht mit aufgelagerten Zellen und Zellaggregaten.
- Abb. 24 (S. 59) Thrombozytenaggregate in Detailansicht.
- Abb. 25 (S. 103) Original Diagramme FACS-Analyse (CD 41/CD 45); Ausgangswert.
- Abb. 26 (S. 106) Original Diagramme FACS-Analyse (CD 41/CD 45); Schlauch ohne Stent nach Durchlauf im Chandler Loop Modell.
- Abb. 27 (S. 108) Original Diagramme FACS-Analyse (CD 41/CD 45); Schlauch mit dem BMS nach Durchlauf im Chandler Loop Modell.
- Abb. 28 (S. 109) Original Diagramme FACS-Analyse (CD 41/CD 45); Schlauch mit dem SES nach Durchlauf im Chandler Loop Modell.

- Abb. 29 (S. 115) BMS
- Abb. 30 (S. 116) SES
- Abb. 31 (S. 116) Bilder des BMS nach Blutkontakt.
- Abb. 32 (S. 118) Bilder des SES nach Blutkontakt.

Tabellenverzeichnis

Tab. 1 (S. 42)	Zahl der Erythrozyten [10 ⁶ /µl] vor und nach Durchlauf im Chandler Loop Modell.
Tab. 2 (S. 43)	Zahl der Leukozyten [10 ³ /µl] vor und nach Durchlauf im Chandler Loop Modell.
Tab. 3 (S. 44)	Zahl der Thrombozyten [10 ³ /µl] vor und nach Durchlauf im Chandler Loop Modell.
Tab. 4 (S. 45)	Werte der PMN-Elastase [µg/l] vor und nach Durchlauf im Chandler Loop Modell.
Tab. 5 (S. 46)	Werte von sP-Selectin [ng/ml] vor und nach Durchlauf im Chandler Loop Modell.
Tab. 6 (S. 47)	Werte des $\beta\text{-}TG$ [IU/ml] vor und nach Durchlauf im Chandler Loop Modell.
Tab. 7 (S. 48)	Werte des SC5b-9 [ng/ml] vor und nach Durchlauf im Chandler Loop Modell.
Tab. 8 (S. 48)	Werte des TAT [µg/l] vor und nach Durchlauf im Chandler Loop Modell.
Tab. 9 (S. 49)	Werte des Faktor XIIa [ng/ml] vor und nach Durchlauf im Chandler Loop Modell.
Tab. 10 (S. 51)	Negativkontrolle [Aktivierung in %] vor und nach Durchlauf im Chandler Loop Modell.
Tab. 11 (S. 51)	CD 41/CD 45 [Aktivierung in %] vor und nach Durchlauf im Chandler Loop Modell.
Tab. 12 (S. 52)	PAC 1 [Aktivierung in %] vor und nach Durchlauf im Chandler Loop Modell.
Tab. 13 (S. 53)	PAC 1 mit ADP [Aktivierung in %] vor und nach Durchlauf im Chandler Loop Modell.
Tab. 14 (S. 54)	CD 62P (CLB Thromb/6) [Aktivierung in %] vor und nach Durchlauf im Chandler Loop Modell.
Tab. 15 (S. 111)	Erythrozyten [10 ⁶ /μl]
Tab. 16 (S. 111)	Leukozyten [10 ³ /µl]

- **Tab. 17 (S. 111)** Thrombozyten [10³/µl]
- **Tab. 18 (S. 112)** PMN-Elastase [µg/l]
- Tab. 19 (S. 112) sP-Selectin [ng/ml]
- **Tab. 20 (S. 112)** β-TG [IU/ml]
- Tab. 21 (S. 112) Sc5b-9 [ng/ml]
- **Tab. 22 (S. 113)** TAT [μg/l]
- Tab. 23 (S. 113)Factor XIIa [ng/ml]
- Tab. 24 (S. 113)Negativkontrolle (Aktivierung in %)
- Tab. 25 (S. 113) CD 41/CD 45 (Aktivierung in %)
- **Tab. 26 (S. 114)** PAC 1 (Aktivierung in %)
- Tab. 27 (S. 114)PAC1/ADP (Aktivierung in %)
- Tab. 28 (S. 114) CD 62P (CLB Thromb/6) (Aktivierung in %)

1. Einleitung

1.1 Koronare Herzkrankheit (KHK)

Erkrankungen des Herz- und Kreislaufsystems gehören weltweit zu den häufigsten Todesursachen. Vor allem in den Gesellschaften der Industrienationen, aber auch in den Entwicklungsländern steigt die Zahl der Herz-Kreislauf-Erkrankten zunehmend. So sind "Herz-Kreislauf-Erkrankungen [...] in den westlichen Ländern für 45% und in den Entwicklungsländern für 24,5% der Gesamtmortalität verantwortlich" (34). Im europäischen Vergleich zeigen die osteuropäischen Staaten die höchsten Sterblichkeitsraten, allen voran Russland (87) und Ungarn, während die Länder des Mittelmeerraumes die niedrigsten Raten zu verzeichnen haben (34).

Auch in der Bundesrepublik Deutschland zählen die Herz-Kreislauf-Erkrankungen zu den führenden Mortalitätsursachen. Besonders die chronisch ischämische oder koronare Herzkrankheit, der akute Myokardinfarkt und die Herzinsuffizienz gehören zu den Spitzenreitern in der Todesursachenstatistik. Laut statistischem Bundesamt in Wiesbaden verstarben im Jahre 2007 9,4% der Menschen an der chronisch ischämischen Herzkrankheit, 6,9% an einem akuten Myokardinfarkt und 6% an einer Herzinsuffizienz (131). Der Anteil von Männern und Frauen an den jeweiligen Krankheitsbildern ist dabei sehr unterschiedlich. So erlagen 8,9% der Männer und 9,8% der Frauen der Koronaren Herzerkrankung, während 7,8% der Männer und 6% der Frauen einen akuten Herzinfarkt erlitten und starben. Die Herzinsuffizienz führte bei Frauen in 7,8% der Fälle zum Tod. Bei den Männern hingegen steht die Herzinsuffizienz mit 4,1% in der Todesursachenstatistik lediglich an Platz vier, obwohl sie der häufigste Behandlungsanlass und damit die häufigste Diagnose für Männer in der Bundesrepublik Deutschland ist (131). Auch die vorläufigen Zahlen aus Wiesbaden für das Jahr 2008 lassen die drei genannten Erkrankungen an der Tabellenspitze der Todesursachenstatistik stehen und zeigen damit den stetigen Aufwärtstrend kardiovaskulärer Ereignisse.

1.1.1 Entwicklung, Diagnostik und Therapie der KHK

Eine Koronare Herzkrankheit kann sich klinisch entweder als stabile Angina pectoris ohne wesentliche Beschwerden oder aber als akutes Koronarsyndrom (instabile Angina pectoris beziehungsweise akuter Myokardinfarkt) mit entsprechender Symptomatik präsentieren (36). Die Ursache dafür liegt in der so genannten Koronarinsuffizienz, einem Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und -bedarf im Herzmuskel (111), verursacht durch atherosklerotische Stenosen in den jeweiligen Koronararterien (Ein-, Zwei- oder Dreigefäß-KHK).

Der erste Schritt in der Pathogenese einer Atherosklerose ist die durch kardiovaskuläre Risikofaktoren ausgelöste endotheliale Dysfunktion (111), eine lokale Veränderung der innersten Schicht der Arterienwand bei ansonsten intaktem Endothel (response to injury -Hypothese) (111). Kann sich das Endothel nicht wieder regenerieren, kommt es durch kompensatorische Mechanismen, wie die Veränderung von Adhäsionsund Permeabilitätseigenschaften oder die Bildung lokaler und proinflammatorischer Zytokine (TNF α, IL 1, IL 6, CRP) (78, 88), zu weiteren Entzündungsprozessen und einer Proliferation im subintimalen Raum (78, 111), die sich makroskopisch als weißliche Fettablagerungen (fatty streaks) (111, 148) zeigen. Außerdem wandern glatte Muskelzellen, Lymphozyten, Neutrophile, Mastzellen und besonders Makrophagen ein (78, 88), die sich durch die Speicherung von oxidiertem und modifiziertem Cholesterin in Schaumzellen (foam cells) umwandeln (78, 111, 148). Auch Leukozyten und Thrombozyten lagern sich durch die veränderten Oberflächeneigenschaften des Endothels an (78).

Diese atherosklerotischen Veränderungen lassen sich bereits im frühen Kindesund Jugendalter nachweisen (148). Im Laufe der Jahre entsteht aus diesen fatty streaks über fibrös-fetthaltige Intermediärläsionen (111) eine komplizierte Plaque (22), die zunehmend das Gefäßlumen einengt (Stenose) und so zu entsprechenden Beschwerden führen kann. Die Lebenszeitprävalenz für die Entwicklung einer KHK beträgt in Deutschland für Männer zirka 30% und für Frauen zirka 15% (61) und hängt vom Vorhandensein verschiedener kardiovaskulärer Risikofaktoren und ihrer Potenz über die Jahre und Jahrzehnte

ab. Zu den wahrscheinlich wichtigsten Risikofaktoren gehört neben dem Zigarettenkonsum (27, 36, 50, 53, 60) das metabolische Syndrom (138). Hierunter versteht man eine Kombination aus "abdomineller Adipositas, Hypertriglycerinämie, vermindertem HDL-Cholesterin, Hypertonie und einer Glucosetoleranz und -regulation" (24). Weitere gestörten wichtiae Risikofaktoren sind Alter, Geschlecht, bereits vorgekommene Angina pectoris Beschwerden, eine positive Familienanamnese bezüglich einer KHK oder Herzinfarkten und die einzelnen Werte von LDL-Cholesterin, HDL-Cholesterin und den Triglycerinen (27, 138) sowie der Konsum von Alkohol und die Häufigkeit sportlicher Aktivitäten (50). Des Weiteren eine atherogene Ernährung, Hyperhomocysteinämie, Thromboseneigung (Thrombophilie) und Entzündungszustände.

Auch die soziale Klasse und die Schulbildung werden zu den kardiovaskulären Risikofaktoren gezählt. So gibt es nach Greiser et al (1989) eine negative Assoziation zwischen der Prävalenz der KHK und der Länge der Schulausbildung (53). Auch das Rauchen und die sportliche Aktivität unterliegen einem sozialen Gradienten zu Ungunsten der unteren sozialen Schichten (61).

Der Goldstandard zur Sicherung einer koronaren Herzerkrankung ist die Koronarangiographie (61, 111, 123). Neben dem direkten Nachweis stenosierter Gefäße lassen sich Abnormalitäten der Gefäße und Abweichungen der Herzfunktion sofort diagnostizieren (111). Ergeben sich aus den Befunden schließlich Interventionsmöglichkeiten, können diese sofort ergriffen werden. Auch eine begleitende intravaskuläre Ultraschalluntersuchung kann zusätzlich durchgeführt werden.

Das Standardverfahren in der Revaskularisierungstherapie ist die Ballondilatation (PTCA/percutaneous transluminal coronary angioplasty) (67). Sie wurde 1974 durch Andreas R. Grüntzig in Zürich eingeführt. Nachdem Grüntzig 1976 eine Ballonkoronardilatation bei einem Hund vorstellte, verlief der erste Versuch einer PTCA bei einem inoperablen Patienten im Endstadium der KHK noch im gleichen Jahr aufgrund technischer Schwierigkeiten erfolglos. Die

3

weltweit erste erfolgreiche Ballondilatation erfolgte am 16. September 1977 im Universitätsspital Zürich durch Andreas R. Grüntzig.

Im Jahre 1978 wurde die Methode in den USA eingeführt und verbreitete sich weltweit mit einem geometrischen Zuwachsmuster (62). Bei der PTCA beruht die Erweiterung des Gefäßlumens auf einem Einreißen der atherosklerotischen Plaques, einer Überdehnung der Gefäßwand, einschließlich Media und Adventitia sowie in der Kompression von atherothrombotischem Material (119). Eine PTCA wird dann als erfolgreich angesehen, wenn die Stenose um mehr als 20% abnimmt, die verbleibende Reststenose nicht mehr als 50% beträgt und "keine interventionsbezogenen Komplikationen (Infarkt, Notfall-OP, Tod) auftreten" (119).

In 90-96% der Fälle können ein oder mehrere Gefäße wieder eröffnet werden, während akute Komplikationen wie prolongierte Angina pectoris, Myokardinfarkt oder okklusive Dissektionen (35) bei 1% der Patienten und weniger vorkommen und tödliche Ausgänge sogar weit unter 1% liegen (67).

Restenosen entwickeln sich bei zirka einem Drittel der Patienten (51) und schmälern dadurch die Langzeit-Effektivität (57). Sie entstehen meist innerhalb der ersten sechs Monate "als Folge initialer elastischer Rückstellkräfte (recoil), narbiger Schrumpfung von Media und Adventitia sowie einer chronischen Inflammation mit Proliferation von Gefäßmuskelzellen (Intimaproliferation) und Produktion extrazellulärer Matrix" (67, 113, 119). Auch hier scheinen die bekannten Risikofaktoren eine bedeutende Rolle zu spielen. Vor allem Patienten mit Mehr-Gefäß-KHK, Hypertonie, Hyperlipoproteinämie (57) und erhöhter Plättchenaggregabilität (51) haben ein erhöhtes Risiko für die Ausbildung einer Restenose.

Die perkutane Koronarintervention (PTCA) schließt heute in der Regel eine Stentimplantation ein (125). Ziel ist es dabei, Akutverschlüsse nach PTCA zu minimieren, eine bessere Gefäßdurchgängigkeit nach unzureichender PTCA zu gewährleisten und Restenosen zu verhindern (61). Die Erfolgsrate nach gelungener Stentimplantation beträgt heute weit über 95% (62). Limitationen ergeben sich lediglich durch kritische anatomische Verhältnisse (62) oder durch ausgedehnte pathologische Befunde. Restenosen treten meist als so genannte Instent-Restenosen mit einer Häufigkeit von 20-30% auf. Sie sind Zeichen einer Hyperplasie der Intima und können entweder den ganzen Stent oder nur dessen Ränder befallen. Besonders bei Patienten mit kleinen Gefäßen, Diabetes mellitus oder multiplem Stenting sind Instent-Restenosen zu finden (119).

Ein weiteres Problem nach erfolgreichem Stenting stellt die akute beziehungsweise subakute Stentthrombose dar. Sie tritt in 80% der Fälle innerhalb der ersten 14 Tage auf. Aufgrund standardisierter Implantationstechniken und einer Thrombozytenaggregationshemmung konnte die akute/subakute Stentthrombose von 25% auf 1% in ihrer Häufigkeit gesenkt werden.

1.2 Koronarendoprothesen (Stents)

Als endoluminale Gefäßprothese (Koronarendoprothese) beziehungsweise Stent bezeichnet man ein aus Metall gefertigtes Gitterröhrchen, das ein durch PTCA aufdilatiertes Gefäß offen halten und Folgekomplikationen wie die Restenose verhindern soll.

Der Begriff "Stent" oder "Stenting" besteht bereits seit dem 14. Jahrhundert und bedeutet Verstärkung. Damals dienten Stents zum Trocknen und Reinigen der Fischernetze über Flüssen. Der Ausdruck Stenting war bei den Hausfrauen gleichbedeutend mit dem Stärken von Kleidungsstücken (119).

Lange Zeit wurde der Begriff irrtümlich auf den Londoner Zahnarzt Charles Stent zurückgeführt, der im 19. Jahrhundert eine plastische Masse zur Stabilisierung von Hauttransplantaten verwendet hatte. Die so genannte "Stents mass" war nach dem Erwärmen verformbar und wurde nach Abkühlung wieder hart (119).

Im Jahre 1912 implantierte Carrel erstmals ein Glasröhrchen in die Aorta eines Hundes und läutete damit das Zeitalter der modernen Revaskularisierungstherapie und -chirurgie ein. "Dotter ersetzte 1969 das Prinzip der Röhre durch flexible Metallspiralen". In den folgenden Jahren wurden mehrere experimentelle Untersuchungen von Gianturco, Amplatz, Senning und Palmaz vorgenommen.

<u>Einleitung</u>

Die erste bei einem Menschen vorgenommene Stent-Implantation erfolgte am 12. Juni 1986 durch Ulrich Sigwart im Rahmen eines PTCA-Kurses in Lausanne. Der damalige Patient entwickelte nach zunächst erfolgreicher PTCA einen subakuten Gefäßverschluss des Ramus interventrikularis anterior, so dass sich Sigwart zu dieser "gewagten" Methode entschloss.

Seither ist das Einbringen von Stents bei einer PTCA das Standardverfahren in der Revaskularisierungstherapie (125, 126). Im Durchschnitt werden bei 80% aller Katheterintervention ein oder mehrere Stents implantiert (125, 126). Besonders Patienten mit Rezidivstenosen und Patienten, bei denen das PTCA-Ergebnis aufgrund des elastischen Recoils nicht zufrieden stellend ist, kommen für eine Stent-Implantation in Frage (62). Aber auch Bypass-Stenosen, Koronarperforationen und symptomatische Dissektionen bedürfen der Behandlung durch einen Stent (62).

Zurzeit sind über 30 verschiedene Stent-Modelle auf dem Markt, die sich durch folgende Kriterien unterscheiden:

Es gibt selbstexpandierende und ballonexpandierbare Stents. Die meisten Stents sind ballonexpandierend und entweder bereits industriebedingt auf einem Ballonkatheter vormontiert oder können durch den Operateur selbst aufgebracht werden.

Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal ist die Herstellung der Stents. Dabei können die Stents aus einem fortlaufenden Metallfaden hergestellt (coil-Stent) oder mittels Lasertechnik aus einer Metallröhre herausgeschnitten werden (slotted tube stents). Die Mehrzahl der Stents wird heute durch Lasertechnik produziert.

Der wichtigste Unterschied besteht aber in der Verwendung des Materials. Hauptsächlich werden Stents aus chirurgischem Edelstahl hergestellt (316 L stainless steel). Andere Möglichkeiten sind Tantal, Legierungen aus Platin und Iridium beziehungsweise Kobalt-Chrom (125, 126) oder Nitinol, das aus Nickel und Titan gemischt wird. Die Beschichtung der Stents mit Gold verbessert ihre Sichtbarkeit bei der Durchleuchtung und erleichtert damit eine exakte Plazierung.

<u>Einleitung</u>

Um ihre primäre Thrombogenität zu reduzieren, sind die Stents teilweise mit ployvalent-gebundenem Heparin, Hirudin und Prostazyklin oder aber auch seit neuestem mit Immunsuppressiva wie dem Mitosehemmer Paclitaxel oder dem T-Zell-Inhibitor Sirolimus beschichtet. Aufgrund dieser medikamentösen Beschichtung bezeichnet man sie als drug-eluting-Stents (DES).

Die Streben der Stents (struts) weisen je nach "Stent-Architketur" einen Durchmesser zwischen 0,025 und 0,18mm auf und sollten möglichst gleichmäßig in die betroffene Läsion einmodeliert werden, so dass jede Strebe Wandkontakt hat. Nach der Implantation bedecken sie zwischen 10 und 40% der Gefäßoberfläche, während die elastische Rückstellung maximal 10% beträgt.

Auch die Längen und Breiten der Stents variieren stark. So können selbst kleinste Läsionen von 7mm bis hin zu großen Verschlüssen mit einer Länge von 50mm mit einem Stent behandelt werden. Der kleinste Durchmesser beginnt bei 2,5mm.

Das Einbringen der Stents erfolgt nach standardisiertem Schema. Der Stent wird unter Durchleuchtung in das Koronargefäß eingebracht und in der Plaque entfaltet. Die Stents verbleiben zeitlebens im Gefäßlumen. Der Patient bemerkt die Intervention oftmals durch pectanginöse Beschwerden, die entweder aus Spasmen in benachbarten Gefäßabschnitten oder Überdehnungen im gerade aufgedehnten Gefäß resultieren. Komplikationen sind neben den im Kapitel 1.1.1 genannten PTCA- Komplikationen der Verlust des Stents bei unsachgemäßem Vorgehen oder bei Abbruch des Interventionsvorgangs aufgrund ausgedehnter pathologischer Befunde.

(119)

1.2.1 Studien zu Sirolimus-Stents und nichtbeschichteten Stents

Bereits ein Jahr nach seiner ersten erfolgreichen Stent-Implantation brachte Ulrich Sigwart erste Veröffentlichungen heraus, in denen er schrieb, dass "diese vaskulären Endoprothesen eine sinnvolle Möglichkeit bieten, Gefäßverschlüssen vorzubeugen und eine Restenose nach PTCA verhindern können" (124). Seither wurden unzählige Studien mit Stents vorgenommen. Zwischen 1991 und 1993 wurde in Europa die BENESTENT-Studie und in den USA die STRESS-Studie zur Effektivität der Stents durchgeführt (101). Dabei zeigte sich in der BENESTENT-Studie der deutliche Vorteil einer Stent-Implantation gegenüber der Standard-Koronarangioplastie (122). Auch die Arbeitsgruppe um Savchenko et al (2000) zeigte, dass "die Implantation eines Stents in die Koronararterien den antiischämischen Effekt der Koronarangioplastie verlängern und die Notwendigkeit von Reinterventionen, aufgrund von Restenosen oder wiederkehrender Angina pectoris, reduzieren kann" (115) und so deutlich effektiver ist als eine alleinige PTCA ohne Stenting (64).

Auch die Einführung der drug-eluting Stents zog weitere Studien nach sich, um den Vorteil der Medikamentenbeschichtung gegenüber den bisherigen Stents festzustellen. Die ersten klinischen Pilotstudien mit sirolimusbeschichteten Stents (FIM-First in Man) wurden im Jahr 2000 in Sao Paulo (Brasilien) und Rotterdam (Niederlande) durchgeführt. Hier wurden 45 Patienten mit stabiler Angina pectoris mit zwei verschiedenen Sirolimus-Stents behandelt. Der einen Gruppe wurden so genannte slow release Stents implantiert, die den Wirkstoff nur langsam abgaben, während die andere Gruppe einen fast release Stent erhielt (schnelle Wirkstoffabgabe). Alle Stents hatten die gleiche Länge und den gleichen Durchmesser. Nach erfolgreicher Behandlung wurden alle 45 Patienten beschwerdefrei aus dem Krankenhaus entlassen und nach vier, acht und zwölf Monaten mittels Angiographie und intravaskulärem Ultraschall erneut kontrolliert. Nach vier Monaten zeigte sich in beiden Gruppen lediglich eine minimale Hyperplasie der Intima, während schwerwiegende Komplikationen wie Restenosen oder Instentstenosen nicht zu beobachten waren. Auch nach acht und zwölf Monaten zeigten sich keine weiteren Veränderungen oder kardiale Ereignisse (113)

In der RAVEL-Studie von 2001 wurde bei 238 Patienten mit neu aufgetretener KHK die Sicherheit und Effektivität der Sirolimus-Stents mit unbeschichteten Stents verglichen. Dabei zeigte sich in der Kontrolle nach sechs Monaten, dass es in der Sirolimus-Gruppe zu keiner Restenose kam, während bei 26% der Patienten, die einen unbeschichtetem Stent erhielten, eine Restenose auftrat (113). Auch andere kardiale Ereignisse traten nach Einsatz eines drug-eluting-Stents zunächst deutlich weniger häufig auf als beim unbeschichteten Stent (52, 64).

Sechs Jahre nach Erscheinen dieser Ergebnisse zeigt sich nun, dass durch den Einsatz der sirolimusbeschichteten Stents die Restenoserate und somit die Notwendigkeit erneuter Reinterventionen (77) durch das Unterdrücken der neointimalen Hyperplasie zwar reduziert wird, gleichzeitig aber der Einheilungsprozess der Stents in die Endothelwand (Endothelialisierung) deutlich verzögert wird und dadurch die Stents länger einen thrombogenen Fremdkörper im Gefäß darstellen (76, 125, 126). Besonders die Beeinträchtigung der intimalen Heilungsphase (68, 76) wird als die Hauptursache für das vermehrte Auftreten von akuten/subakuten und auch späten Stentthrombosen nach Implantation der Sirolimusstents angesehen (37, 68, 76, 82, 84). Bei bis zu 2,7% aller Implantationen eines Sirolimusstents entstehen Stentthrombosen. Akute und subakute Stentthrombosen treten in der Regel innerhalb der ersten 14 Tage auf (76, 82). Aber auch schon nach sechs Stunden beziehungsweise 375 Tagen bis hin zu 17 Monaten postinterventionell wurden späte Stentthrombosen beobachtet (76). Neben den bereits bekannten Risikofaktoren wie Diabetes mellitus, akuten Nierenfunktionsstörungen oder chronischen Nierenschäden, dem akuten Koronarsyndrom, einer reduzierten Pumpfunktion der Ventrikel, Mehr-Gefäß-KHK, Bifurkationsläsionen, stark atherosklerotischen Regionen und der gleichzeitigen Behandlung mehrerer Läsionen, steht vor allem die inadäguate antithrombotische Therapie im Vordergrund der Diskussion (37, 76, 82, 130, 141). Um die Rate an Stentthrombosen zu reduzieren, wird eine doppelte antithrombotische Therapie mit Aspirin und dem Thrombozytenaggregationshemmer Clopidogrel gefordert (125, 126, 129). Da Clopidogrel für die Vor- beziehungsweise Nachbehandlung einer Stentimplantation aber nicht zugelassen ist und somit in dieser Indikation einen "off-label use" darstellt, führte es bei den niedergelassen Vertragsärzten teilweise zu einer fehlenden oder ungenügenden Versorgung der Patienten nach koronarer Stentimplantation (125, 126) mit der Folge ansteigender Zahlen an (späten) Stentthrombosen (68). Clopidogrel ist ein Adenosinphosphatat

(ADP) Antagonist aus der Klasse der Thienopyridine und blockiert selektiv die Bindung von ADP an seine Rezeptoren auf den Thrombozyten und verhindert somit die ADP-induzierte Vernetzung der Thrombozyten über den gpIIb/IIIa Rezeptorkomplex. Die Eliminationshalbwertszeit beträgt zirka acht Stunden. Aufgrund seiner irreversiblen Bindung an den Rezeptor dauert es [ungefähr] fünf bis sieben Tage nach Absetzen von Clopidogrel, bis sich die Thrombozytenfunktion wieder normalisiert hat (125, 126). Basierend auf den Datenlagen verschiedener Studien gilt heute die allgemeine, leitlinienorientierte Empfehlung, dass nach Implantation eines unbeschichteten Stents über vier Wochen, nach Implantation eines medikamentenbeschichteten Stents mindestens sechs Monate lang Clopidogrel als Zweifachtherapie zusammen mit Aspirin gegeben werden soll. Bei komplexen Läsionen (Bifurkationsstenosen) kann die Therapiedauer auf bis zu ein Jahr erweitert werden (125, 126). Unter doppelter Plättchenhemmung beträgt heute die Rate an Stentthrombosen bei unbeschichteten Stents zirka 1% (125, 126).

Aber auch das Sirolimus selbst soll eine gewisse Thrombogenität besitzen, die zur Entwicklung der Stentthrombosen beiträgt. So haben Babinska et al (1998) in ihren Studien zeigen können, dass durch Sirolimus (Rapamycin) behandelte Thrombozyten eine deutlich höhere ADP-induzierte Aggregationsneigung aufweisen als normale Thrombozyten (9) und sich infolge eine ausgeprägte Thrombozytopenie mit Verschlechterung der Nierenfunktion und Blutungszeichen einstellen kann (9, 18, 109). Damit bleibt die akute/subakute und späte Stentthrombose eine ernsthafte Komplikation dieser Technologie (82). Vor allem die Rate an Myokardinfarkten und tödlichen kardiovaskulären Ereignissen zeigt eine deutliche Assoziation zum Auftreten der Stentthrombose (84, 125, 126). So führen Stentthrombosen bei 80% aller Patienten zu einem akuten Myokardinfarkt, während die Mortalität, vor allem der späten Stentthrombosen, bis zu 45% beträgt" (125, 126).

Die Debatte, ob sirolimusbeschichtete Stents thrombogener sind als unbeschichtete Stents, ist in vollem Gange und letztendlich noch nicht vollständig geklärt (20, 37, 77, 84, 93, 121, 130, 132). Trotz allem scheint die Sterblichkeitsrate insgesamt nach einem Jahr verglichen mit nichtbeschichteten Stents ähnlich zu sein (64).

1.2.2 Wirkung auf Gerinnungssystem und Inflammation

Die Wirkungen beziehungsweise Pathomechanismen nach erfolgreicher Stentimplantation, die sowohl an der Gefäßwand als auch im gesamten Kreislauf stattfinden, sind bis heute nicht vollständig geklärt. Aus diesem Grund beschäftigen sich weltweit zahlreiche Arbeitsgruppen mit dieser Thematik, wobei besonders die Wirkung der verschiedenen Stents auf das Gerinnungssystem und die Entzündungsvorgänge (Inflammation) im Vordergrund steht.

Die Arbeitsgruppe um Tepe et al (2002) hat in einem in vitro Modell die Thrombogenität verschiedener Stentmodelle untersucht. Dabei hat sich gezeigt, dass eine Aktivierung des Gerinnungssystems unter anderem vom Design der Stents (Oberfläche) abhängt. Elektronisch geschliffene Stents wiesen die geringste Thrombogenität auf. Dennoch wurde bei allen untersuchten Stents eine Aktivierung des Gerinnungssystems durch Anstieg des Thrombin-Antithrombin-III-Komplex, einem Parameter der Thrombinaktivierung, sowie einem Abfall der Thrombozyten festgestellt. Somit stellen die Stents selbst bereits einen entscheidenden Faktor dar, der die Gerinnung und ihre Aktivierung beeinflusst (136).

Auch die Verwendung verschiedener Beschichtungen hat eine erhebliche Wirkung auf das Gerinnungssystem. So kommt es nach der Implantation eines heparinbeschichteten Stents deutlich weniger häufig zur Aktivierung von Thrombozyten und damit zur Expression des gpIIb/IIIa-Rezeptors an dessen Oberfläche (56). Sirolimus, was ebenfalls zur Beschichtung von Stents eingesetzt wird, beeinflusst die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation (9).

Auch auf Ebene der Inflammation kann man spezifische Veränderungen feststellen. Nach der Implantation eines Stents kommt es nicht nur zur Aktivierung von neutrophilen Granulozyten (42, 73), sondern auch zur Ausschüttung der inflammatorischen Zytokine IL-6, IL-8, und IL-11 sowie einem Anstieg des Akut-Phase Proteins CRP (3, 31, 42). Besonders das CRP zeigt im

Einleitung

Anstiegsverhalten keine Unterschiede zwischen der Verwendung eines drugeluting Stent und eines nicht beschichteten Stents (52), stellt aber dennoch einen Marker für die Abschätzung einer Entzündung nach erfolgreicher Stentimplantation dar (72).

Die genannten inflammatorischen Reaktionen ziehen wiederum weitere Entzündungskaskaden nach sich und korrelieren daher ebenfalls mit der Entstehung einer akuten/subakuten [und späten] Stentthrombose beziehungsweise Restenose (31).

Auch zelluläre Interaktionen zwischen Neutrophilen und Thrombozyten scheinen für eine Progression der neointimalen Proliferation eine entscheidende Rolle zu spielen (73).

Durch einen Anstieg des B-Zell- und Makrophagen-Liganden CD 40 zirka 10 Minuten nach Stentimplantation (2) sowie durch eine Erhöhung von IL-6 innerhalb der ersten Stunde (3), lassen sich zwei weitere Parameter definieren, die als früher Marker eine Entzündungsreaktion auf den Stent zeigen können.

Aber auch hier gibt es weitere inflammatorische Wirkungen, die durch das Einbringen eines Stents beeinflusst werden.

1.3. Sirolimus (Rapamycin)

Im Dezember 1964 isolierten Forscher der Canadian Medical Research Expedition auf der Osterinsel Rapa Nui aus einer Bodenprobe die Substanz Rapamycin (91, 107, 113). Rapamycin gehört zu den Makrolid-Antiobiotika und wird von dem Bakterium Streptomyces hygroscopius produziert. Ursprünglich waren die Forscher an der antimykotischen Wirkung des Naturstoffes interessiert, bis sie eine nicht akzeptable Nebenwirkung herausfanden: Rapamycin blockiert das Immunsystem (107).

Rapamycin bindet an den intrazellulären Rezeptor FK506, der zur Familie der immunophilen Proteine gehört (91), und bildet so den Komplex FKBP12. Dieser Komplex inhibiert die Kinase "mammalian target of rapamycin (mTOR)", die eine wichtige Komponente in der Regulation und Progression des Zellzyklus ist (91). Dadurch wird der Übergang von der G1- zur S-Phase verhindert. "In der Folge werden mehrere spezifische Signaltransduktionswege blockiert" (107),

Einleitung

darunter die Freisetzung von Interleukin 2 und 4 (113). Dadurch wird die Interleukin-gesteuerte T-Zell-Proliferation (Inflammation) sowie die Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen unterdrückt (113).

Beide Vorgänge spielen eine wichtige Rolle bei Tumorwachstum und Metastasenbildung, diabetischer Retinopathie, Arthritis (91) und besonders bei Veränderungen arterieller Gefäße nach Organtransplantation, PTCA oder Koroanarstenting (113).

Seit September 1999 ist Rapamycin in den USA unter dem Handelsnamen Sirolimus von der US Food and Drug Administration als Immunsuppressivum zur Prävention einer Organabstoßung nach Nierentransplantation bei Erwachsenen zugelassen (107, 109). In der Bundesrepublik Deutschland erfolgte die Einführung und Zulassung am 15. April 2001. (107)

Als Monotherapie eingesetzt, ist Sirolimus nicht nephrotoxisch, was ein bedeutender Vorteil gegenüber anderen Immunsupressiva ist (107).

Zu den häufigsten Nebenwirkungen gehören Störungen des Lipidstoffwechsels wie Hyperlipidämie, Hypertriglycerinämie oder Hypercholesterinämie (109), weshalb eine Begleittherapie mit Statinen meist unerlässlich ist (107). Außerdem können Hypertonie, Lungenemphyseme, Polyarthralgien, Diarrhö, Magenschleimhautentzündungen, Thrombozyto- und Leukozytopenien, Anämien, Epistaxis, Erhöhung der Leberenzyme, Ödeme an den Extremitäten, Wundheilungsstörungen, Harnwegsinfektionen und Hautunreinheiten wie Akne vorkommen (18, 107, 109, 113).

Dank seiner antiproliferativen und antimigrativen Wirkungen findet Sirolimus nicht nur in der immunsuppressiven Therapie einen festen Platz, sondern auch in der Revaskularisierungstherapie bei KHK oder akuten ischämischen Ereignissen in Form von sirolimusbeschichteten Stents.

In den drug-eluting Stents wird Sirolimus fest an die Metallstrukturen des Stents gekoppelt, so dass ein Abrieb während der Implantation kaum möglich ist. Über einen Zeitraum von mehreren Wochen wird das Sirolimus dann langsam wieder freigesetzt, wobei 80% des Wirkstoffs vor allem in den ersten 30 Tagen, die restlichen 20% in den folgenden drei Monaten freigesetzt werden sollen (75). Durch die Reduzierung der Hyperplasie sowie der Aktivitätshemmung von glatten Muskelzellen und Entzündungszellen soll eine natürliche Reendothelialisierung erreicht werden, was wiederum das Risiko einer Restenose/Instentstenose und die damit verbundenen Reintervention minimiert (113).

1.4 Zielsetzung

Die Erfolgsrate und Langzeiteffektivität nach primär erfolgreicher Intervention mittels PTCA wird durch die häufige Restenosierung nach wenigen Monaten erheblich gemindert. Durch den Einsatz von Koronarendoprothesen (Stents) konnte die Restenoserate zwar deutlich verbessert werden, aber durch das vermehrte Auftreten von Instentstenosen ergaben sich neue Komplikationen in der Revaskulariersierungstherapie. Diese konnten durch die Weiterentwicklung der Stents zu drug-eluting Stents (DES), allen voran der mit dem Immunsuppressivum Sirolimus beschichtete Stent, weiter reduziert werden. Jedoch zeigen sich durch die verzögerte Einheilungsphase ins Gefäßbett (Endothelialisierung) und eine teilweise inadäquate antithrombotische Therapie vermehrt akute/subakute und späte Stentthrombosen nach deren Implantation. Die Diskussion, ob sirolimusbeschichtete Stents thrombogener sind als

Nichtbeschichtete Stents ist in vollem Gange.

Von großer Bedeutung ist insbesondere, ob mit Sirolimus beschichtete Stents eine "Eigenthrombogenität" aufweisen. In der Literatur gibt es kaum Daten, die den Effekt der Sirolimusstents auf Entzündung, Plättchenaktivierung, Gerinnung und Komplementaktivierung berücksichtigen.

Das Ziel dieser Studie ist es, die Thrombogenität von unbeschichteten und mit dem Immunsuppressivum Sirolimus (Rapamycin) beschichtete Stents (Cypherstents) in einem in vitro Modell zu untersuchen.

Dabei sollen vor allem die Wirkungen beider Stents auf die Thrombozyten, das Gerinnungssystem, die Komplementaktivierung und die Inflammation genauer untersucht und verglichen werden, um einen Zusammenhang mit dem Auftreten einer akuten/subakuten und späten Stentthrombose herauszufinden.

2. Material und Methoden

2.1 Probanden

Die vorliegende Studie wurde in der Zeit von August 2004 bis März 2005 an der Medizinischen Universitätsklinik in Zusammenarbeit mit der Forschungsabteilung der Herz-, Thorax und Gefäßchirurgie der Eberhard Karls Universität Tübingen durchgeführt.

Die Studie wurde von der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen geprüft und genehmigt.

Aufgrund des begrenzten Materials wurden für diese Studie neun Probanden ausgewählt, die folgende Einschlusskriterien zu erfüllen hatten: Die Probanden sollten männlich und nicht älter als 40 Jahre alt sein (das Durchschnittsalter betrug 26,5 Jahre). Außerdem sollten sie Nichtraucher sein, sich während des Studienzeitraums gesund fühlen und keine internistische Grunderkrankung haben. Des Weiteren sollten sie keine regelmäßige Medikamenteneinnahme und besonders 14 Tage vor Studienbeginn keine Aspirineinnahme aufweisen, da sich beides auf die in der vorliegenden Studie gemessenen Parameter auswirken kann.

Aufgrund der geringen Anzahl an Probanden und der wahrscheinlichen Einnahme oraler Kontrazeptiva, die wegen der Thrombozytenaktivierung als Ausschlusskriterium definiert war, wurden keine Frauen in die Studie einbezogen.

Die Probanden wurden mündlich über den Ablauf der Studie informiert. Ihr Einverständnis zur einmaligen Blutentnahme vor Studienbeginn gaben sie durch mündliche Zusage und in schriftlicher Form durch Unterschrift des Studienprotokolls.

2.2. Material

2.2.1 Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte nach dem internationalen Standard. Nachdem eine desinfizierte Unterarmvene punktiert war, wurde die Stauung des Oberarmes sofort gelöst, um eine Irritation und Aktivierung der im Blut enthaltenen und für die Studie relevanten Parameter zu vermeiden.

Als Abnahmesystem wurde das VENISYSTEMS[™] Butterfly®-19 und der Multi-Adapter der Firma SARSTEDT (Nürnbrecht, Deutschland) verwendet, da es besonders eine Aktivierung der Thrombozyten so gering wie möglich halten soll. Allen Probanden wurden zirka 63ml Blut in sieben Neutralmonovetten á 9ml (Firma SARSTEDT, Nürnbrecht, Deutschland) entnommen. Die Neutralmonovetten wurden zuvor mit 0,9ml Liquemin Roche® zur Antikoagulation (Heparinisierung) befüllt, so dass pro entnommenem Milliliter Blut eine internationale Einheit Liquemin enthalten war.

Nach Abnahme des Blutes wurden die Neutralmonovetten vorsichtig geschüttelt, um eine komplette Vermischung des Blutes mit dem enthaltenen Liquemin zu gewährleisten. Anschließend wurden die Neutralmonovetten geöffnet und das Blut zur Weiterverarbeitung gepoolt, das heißt der Inhalt aller sieben Neutralmonovetten wurde in einem Gefäß zusammengeführt.

2.2.2 Schläuche

Um die Koronarendoprothesen (Stents) in ihrer Funktion testen zu können, mussten sie in eine Art Gefäßimitation implantiert werden. Dazu wurden spezielle Schläuche der Firma Medtronic (Heerlen, Niederlande) verwendet, die während kardiopulmonalen oder anderen Bypass-Eingriffen als extrakorporaler Kreislauf dienen.

Die Schläuche gehören zur Produktlinie Carmeda® (Bioactive Surface Component(s) Inside) und haben die Maße 1/4 x 1/16 x 185cm. Sie sind an ihrer Innenseite speziell mit einer Heparinbeschichtung ausgestattet, die eine Koagulation des Blutes verhindern soll.

Die 185cm langen Schläuche wurden unter sterilen Bedingungen aus ihrer Verpackung entnommen, mittels Markierungsstift in 50cm lange Abschnitte unterteilt und anschließend mit einem Schlauchschneider auf oben genannte Länge zurecht geschnitten. Als Schlauchschneider diente eine Ritzmesserklinge, die in einer auf- und zuklappbaren Halterung befestigt war.

Danach wurden von einem Silikonschlauch, dessen Innendurchmesser ein bisschen größer als der Gesamtdurchmesser des Carmeda®-Schlauches war, zirka 2,5-3cm kleine Stücke, ebenfalls mit dem Schlauchschneider, abgeschnitten.

Das kleine Silikonschlauchstück wurde nun bis zur Hälfte auf das eine Ende des Carmeda®-Schlauches gesteckt. Die andere Seite des Carmeda®-Schlauches wurde in die noch freie Hälfte des Silikonschlauchstücks gedrückt, so dass ein geschlossenes Ringsystems mit dem Silikonschlauchstück als Abdichtung entstand.

Für jeden Probanden wurden drei solcher präparierten Schläuche benötigt, so dass insgesamt für die Studie 27 Schläuche á 50cm hergestellt wurden.

Damit beim späteren Einbringen der Stents keine Verwechslungen zwischen den beschichteten und unbeschichteten Stents entstehen konnten, wurden die Schläuche bereits im Vorfeld nach folgender Systematik beschriftet: Die Probanden wurden von eins bis neun durchnumeriert. Jedem Probanden wurden drei Schläuche zugeteilt und entsprechend seiner Nummer beschriftet. Der Schlauch, in den kein Stent eingebracht werden sollte, bekam zusätzlich das Kürzel Probandenummer /1. Der Schlauch für den unbeschichteten Stent wurde mit /2 und der für den beschichteten Stent mit /3 gekennzeichnet.

Die so vorbereiteten Schläuche wurden bis zur Implantation der Stents beziehungsweise bis zur Befüllung mit Blut bei -12℃ im Kühlraum gelagert.

2.2.3 Koronarendoprothesen (Stents)

In dieser Studie wurden jeweils zehn unbeschichtete und zehn beschichtete Stents der Marke Cordis® von der Firma Johnsons und Johnson (Roden, Niederlande) untersucht.

2.2.3.1 Unbeschichteter Stent (BMS; bare metal Stent)

Als Vertreter für den unbeschichteten Stent (BMS) wurde das BX Sonic™ ballonexpandierbare Stentsysten ausgewählt. Dieses System umfasst einen 140cm langen Katheter, auf dessen Spitze ein 24mm langer Ballon angebracht ist, der aus DURALYN besteht. Durch Inflation einer Kochsalzlösung kann der Ballon in die gewünschte Länge und den gewünschten Durchmesser gebracht werden. Allerdings sollte der so genannte rated-burst Druck von 16 Atmosphären (Stentbreite hier 3,78mm) nicht überschritten werden, da der Ballon sonst platzen kann (Ergebnisse aus in-vitro-Tests). Über dem Ballon ist der noch zusammengefaltete 23mm lange Stent vormontiert, der sich schlagartig entfaltet, sobald der Ballon mit Kochsalzlösung gefüllt wird. Der Stent selber besteht aus 316L chirurgischem Edelstahl und wird aus nahtlosem Rohrmaterial lasergeschnitten und elektrolytisch poliert. Er ist am Ballon von zwei röntgensichtbaren Platin-Iridium Markern umgeben, so dass die genaue Position des Stents in vivo beim Röntgen-Durchleuchten angeben werden kann. Abhängig vom Inflationsdruck des Ballons, in Atmosphären (atm) gemessen, kann der Stent eine minimale Breite von 2,98mm bei 4atm und eine maximale Breite von 3,9mm bei 20atm annehmen. Mit zunehmender Breite wird allerdings auch die Standardlänge des Stents von 23mm kleiner. Um ein optimales Ergebnis zu erzielen, wird ein Druck von 10atm empfohlen, bei dem der Stent zirka 3,5mm breit und 23mm lang wird. (44)

Für die Studie wurden neun dieser Stents in die Carmeda®-Schläuche implantiert und im Chandler Loop Modell mit Probandenblut in Verbindung gebracht.

Der zehnte Stent dieser Gruppe wurde zwar in einen Schlauch implantiert, aber ohne Blutkontakt für die Rasterelektronenmikroskopie präpariert.

2.2.3.2 Beschichteter Stent (SES; sirolimus-eluting Stent)

Als beschichteter Stent (SES) wurde für diese Studie das Cypher™ Sirolimuseluting Stentsystem verwendet.

Auch hier sitzt auf einem 140cm langen Katheter ein Ballon aus DURALYN, auf dessen Spitze ein 23mm langer Stent vormontiert ist.

Der Ballon an der Katheterspitze hat bei diesem System eine Länge von 25mm. Der Stent besteht auch hier aus 316L chirurgischem Edelstahl und wurde aus nahtlosem Rohrmaterial lasergeschnitten und elektrolytisch poliert. Auch die Position der zwei Platin-Iridium Marker um den Stent ist, wie beim oben beschriebenen System, identisch.

Durch einen Inflationsdruck vom 6atm lässt sich der Stent auf eine minimale Breite von 2,91mm expandieren. Bei einem Druck vom 20atm beträgt die maximale Breite 3,9mm. Als Standard wird hier ein Druck von 12atm empfohlen, bei dem der Stent eine Länge vom 23mm und eine Breite von 3,5mm annimmt. Der rated-burst Druck, bei dem der Ballon platzen kann, liegt bei diesem System bei 16atm und einer Stentbreite von 3,76mm. (45).

Die Besonderheit dieses Stentsystems ist die Beschichtung der Innenfläche mit dem Immunsuppressivum Sirolimus (Rapamycin).

Der Medikamentenanteil von Sirolimus auf einem Cypherstent beträgt zirka 140µg/cm² (45).

Auch hier wurden neun Stents für die Studie verwendet und ein Stent ohne Blutkontakt für die Rasterelektronenmikroskopie vorbereitet.

2.2.3.3 Einbringen der Stents in die Carmeda®-Schläuche

Das Einbringen der Stents in die bereits vorbereiteten 50cm langen Carmeda®-Schläuche erfolgte unter sterilen Bedingungen unter einer LAF-Box. Die Katheter wurden ausschließlich mit gebrauchsfertigen, sterilen Handschuhen (Firma Semperit, Vienna, Österreich) angefasst. Die auf dem Ballon vormontierten und noch nicht entfalteten Stents selber wurden nicht berührt.

Das Einbringen aller 18 Stents erfolgte nach demselben Schema. Grundsätzlich musste darauf geachtet werden, dass die unbeschichteten Stents in die präparierten Schläuche mit dem Kürzel /2 und die beschichteten Stents entsprechend in /3 implantiert wurden.

Das jeweilige Stentsystem wurde aus der Verpackung entnommen und zunächst von Schutzhüllen und sonstigen umgebenden oder zusammenhaltenden Materialien befreit. Anschließend wurde der mit dem Silikonstück verschlossenen Carmeda®-Schlauch geöffnet und der Katheter in den Schlauch eingeführt. Der Stent sollte nicht vollständig in der Schlauchmitte, sondern zirka 5-10cm von einem der beiden Schlauchenden entfernt positioniert werden. Das Katheterende wurde mit einer Pumpe, die den Ballon mit Flüssigkeit inflatieren sollte, verbunden. Die Pumpe bestand aus einer Halterung, in deren Mitte ein Flüssigkeitsreservoir in Spritzenform angebracht war. Das Reservoir war vorne mit einer Druckanzeige, in Atmosphären (atm) skaliert, verbunden. Am hinteren Ende befand sich ein drehbarer Griff, mit dem man Flüssigkeit aus dem Reservoir verdrängen und so einen beliebigen Druck aufbauen konnte. Durch entgegengesetztes Drehen ließ sich der Druck wieder abbauen. Als inflatierbare Flüssigkeit wurde destilliertes Wasser der Firma Fresenius Kabi (Bad Homburg, Deutschland) verwendet.

Nachdem das Kathetersystem über einen Verbindungsschlauch an die Pumpe angeschlossen war, wurde in gleichmäßigem Tempo der Griff bis zu dem Druck gedreht, an dem sich der Stent automatisch auf eine Länge von 23mm und eine Breite von 3,5mm entfaltete. Anschließend wurde der Druck bis zum rated-burst Druck von 16atm erhöht, so dass der Stent nun eine Breite von zirka 3,8mm annahm. Der Ballon wurde nun wieder vollständig deflatiert und der Katheter langsam und vorsichtig zurückgezogen, ohne den Stent mit hinaus zu ziehen. Da der Stent aber die Innenwand des Carmeda®-Schlauches nicht vollständig erreichte und somit noch beweglich war, musste mit einem zweiten Ballonkatheter nachdilatiert werden. Hierzu wurde der PALMAZ CORINTHIAN IQ Transhepatische Gallengangsstent mit Implantationssystem der Marke Cordis® (Johnson und Johnson, Roden, Niederlande) verwendet, bei dem der Ballon mit einem Druck von 8atm eine Breite von zirka 8mm annehmen kann (rated-burst Druck 10atm). Der Stent war bei diesem System nicht mehr vorhanden, da er bereits anderweitig implantiert worden war.

Der zweite Katheter wurde nun in den Schlauch eingeführt und der maximal deflatierte Ballon vorsichtig in den entfalteten Stent vorgeschoben. Nachdem der Stent zwischen den Platin-Markierungen des Ballons positioniert war, wurde mittels Pumpe gleichmäßig ein Druck von 8atm aufgebaut, so dass der Stent nun auf zirka 6,4mm gedehnt wurde und so die Innenwand des Carmeda®-Schlauches fest berührte und nicht mehr beweglich war. Anschließend wurde

der Ballon wieder deflatiert und der Katheter zurückgezogen. Der Carmeda®-Schlauch wurde mittels eines Silikonschlauchstückes erneut fest zum Ringsystem verschlossen und bis zum Studienbeginn im Kühlraum bei -12°C aufbewahrt.

2.2.4 Chandler Loop Modell

Eines der wichtigsten Geräte dieser Studie war das modifizierte Chandler Loop Modell. Dieses Gerät wurde von der Forschungsabteilung der Herz-, Thoraxund Gefäßchirurgie der Universität Tübingen modifiziert und ist dazu gedacht, den menschlichen Kreislauf mit 37 °C Körpertemperatur nahezu realistisch zu simulieren. Seine Funktionsweise soll anhand der unten aufgeführten Abb. 1 erklärt werden.

Das Becken 1 wird benötigt, die der Körpertemperatur entsprechende Wärme von zirka 37 °C zu erzeugen. Dazu ist es nahezu komplett mit Leitungswasser gefüllt und wird über eine integrierte Heizspirale, die durch einen An- und Ausschalter gesteuert wird, auf 37 °C erwärmt. Zwei an den Außenseiten des Beckens angebrachte Thermometer überwachen die Wassertemperatur. Sollte die Temperatur des Beckens über 37 °C steigen, ist es möglich, diese über eine Kühlung wieder zu senken.

Das Becken 2 ist zu fast 75% ebenfalls mit 37℃ warmem Leitungswasser gefüllt. Über eine zu- und abführende Leitung ist es mit dem Becken 1 verbunden, so dass das Wasser in Becken 2 sich in ständiger Umwälzung durch das Becken 1 befindet. Dadurch wird eine konstante Temperatur von 37℃ in Becken 2 gewährleistet.

Im Becken 2 wird auch der menschliche Kreislauf simuliert. Dazu ist am Becken 2 ein Generator angebracht, der eine drehbare Scheibe mit aufgesetzten Stäben bewegt. Die senkrecht zur Scheibe stehenden Stäbe sind außerdem so angeordnet, dass sich die aufgereihten Carmeda®-Schläuche stets zu 80% im 37 ℃ warmen Wasser befinden. Die Schläuche werden mittels Gummibändern, welche in Kreuztechnik an den Stäben befestigt werden, fixiert. Durch Betätigen des An-Schalters beginnt nun die Scheibe, sich in gewünschter Geschwindigkeit (15 Umdrehungen pro Minute) zu drehen. Durch die

kontinuierliche Bewegung wird eine Fließgeschwindigkeit von zirka 12,5cm/sec erreicht, so dass das Blut in den Schläuchen nicht zum Stillstand kommt und so das Durchfließen der glattwandigen Gefäße im Körper simuliert.



Abb. 1: schematische Darstellung des Chandler Loop Modells.

2.3 Labormethoden

2.3.1 Ablauf am Chandler Loop Modell

Nachdem die Blutentnahme erfolgt war, wurde das Blut zur Weiterverarbeitung gepoolt. Das heißt, dass alle sieben Neutralmonovetten geöffnet und das Blut in einem gemeinsamen Gefäß (Labormaßbecher) zusammengeführt wurden.

Da alle Blutparameter als 0-oder Ausgangswert, das heißt vor Durchlauf im Chandler Loop Modell, zu bestimmen waren, wurden zunächst folgende Monovetten aus dem gepoolten Blut befüllt: eine Citratmonovette 5ml für die Gerinnungsparameter, eine EDTA-Monovette 2,7ml für die hämatologischen Untersuchungen und eine Heparinmonovette 2,7ml für die Durchflusszytometrie (FACS-Analyse). Diese Monovetten wurden von der Firma SARSTEDT (Nürnbrecht, Deutschland) bezogen. Außerdem wurde eine Vacutainermonovette CTAD mit 4,5ml (Citrat/Theophyllin/Adenosin/ Dipyridamol) der Firma BD (Becton and Dickinson, Erembodegem, Belgien) für

die Bestimmung des β-Thromboglobulins verwendet, die nach dem Befüllen sofort in Eis gekühlt wurde. Alle Monovetten bekamen die Aufschrift Probandenummer /0 und wurden bis zur Weiterverarbeitung wieder fest verschlossen.

Danach wurden die vorbereiteten drei Carmeda®-Schläuche pro Proband aus dem Kühlraum geholt und mit zirka 15ml gepooltem Blut gefüllt. Um Blasenbildung im Schlauch und Verschütten beim Füllen zu vermeiden, wurde als Trichter eine 20ml Spritze ohne Stempel der Firma Braun (Melsungen, Deutschland) zu Hilfe genommen. Nachdem die gefüllten Carmeda®-Schläuche wieder zum Ringsystem verschlossen waren, wurden sie in den Chandler Loop eingebracht. Dazu wurden sie, wie im Kapitel 2.2.4 bereits beschrieben, hintereinander auf die Stäbe aufgereiht und mit Gummibändern fixiert. Dann wurde das Chandler Loop Modell gestartet. Mit einer Geschwindigkeit von 15 Umdrehungen pro Minute sollten die Schläuche genau 90 Minuten im Chandler Loop den Kreislauf simulieren.

Nach Ablauf der vorgegebenen Zeit wurde der Chandler Loop angehalten und die Schläuche heraus genommen. Anschließend wurden die Schläuche wieder geöffnet und das enthaltene Blut auf folgende beschriftete Monovetten zur Weiterverarbeitung und Messung verteilt: Das Blut aus dem Schlauch ohne Stent kam in die Monovetten mit dem Kürzel Probandenmummer /1. Das Blut, das mit dem unbeschichteten Stent Kontakt hatte, wurde in die Monovetten mit /2 und das des beschichteten Stents in die mit der Aufschrift /3 gegeben.

Aus jedem Schlauch wurde erneut eine Citratmonovette 5ml für die Gerinnungsuntersuchungen, eine **EDTA-Monovette** 2,7ml für die hämatologischen Parameter und eine Heparinmonovette 2,7ml für die Durchflusszytometrie befüllt. Diese Monovetten wurden ebenfalls von der Firma SARSTEDT (Nürnbrecht, Deutschland) geliefert. Auch eine Vacutainermonovette mit 4,5ml CTAD (Citrat/Theophyllin/Adenosin/ Dipyridamol) der Firma BD (Becton and Dickinson, Erembodegem, Belgien) für die Bestimmung des β-Thromboglobulins, die nach dem Befüllen in Eis gekühlt werden musste, wurde wieder verwendet.
Nachdem das Blut in die Monovetten abgefüllt war, wurden diese wieder fest verschlossen.

2.3.2 Bestimmung von Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten

Die Bestimmung von Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten erfolgte sowohl vom 0-oder Ausgangswert als auch von den drei Schläuchen nach der Simulation. Dazu wurden aus dem gepoolten Blut beziehungsweise aus den jeweiligen Schläuchen das Blut in EDTA-Monovetten gefüllt und zur Bestimmung in den Hämocytometer der Firma Axon Lab AG (Baden-Dättwill, Schweiz) eingebracht. Die Auszählung der jeweiligen Zellen erfolgte automatisch im Gerät.

Als Referenzbereiche wurden für die jeweiligen Zelllinien folgende Werte angegeben:

Erythrozyten 4,4-5,9 x $10^{6}/\mu$ l (Referenzbereich nur für Männer, da alle Probanden männlich waren)

Leukozyten 4300-10000/µl

Thrombozyten 150000-350000/µl (33).

2.3.3 Bestimmung verschiedener Blutparameter (ELISA)

Um die entsprechenden ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) durchführen zu können, wurden das Plasma der EDTA-, der Citrat- und der CTAD-Monovette benötigt. Dazu wurden die Monovetten für 20 Minuten bei 3000U/min zentrifugiert (Zentrifuge Varifuge RF). Anschließend wurde das Plasma in entsprechend beschriftete Eppendorfhütchen zu je 300µl abpipettiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur Bestimmung wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

Auch hier wurden die unten genannten Parameter vor und nach Durchlauf im Chandler Loop bestimmt.

2.3.3.1 PMN-Elastase

Die PNM-Elasatase wurde mit dem Kit PMN-Elastase der Firma MERCK (Darmstadt, Deutschland) bestimmt.

<u>Testprinzip</u>

Mit diesem heterogen aufgebauten Enzymimmunoassay lässt sich die PMN-Elastase aus polymorphnucleären Leukozyten im Komplex mit PMN-Elastase α_1 Proteinaseinhibitor (PI) bestimmen.

Dazu wird im ersten Inkubationsschritt der PMN-Elastase α_1 PI-Komplex mit seinem PMN-Elastase Teil an die Antikörper gebunden, die an die Röhrchenwand des Kits gekoppelt sind. Im zweiten Schritt werden mit alkalischer Phophatase (AP) markierte Antikörper zugegeben, die mit dem α_1 -PI-Teil reagieren. Die ungebundenen AP-Antikörper werden ausgewaschen. Über die markierten AP-Antikörper wird die enzymatische Aktivität des Immunkomplexes photometrisch bestimmt.

Testreagenzien

- 1. Kalibratoren 1-4 (Phophatpuffer pH 7,5, Stabilisatoren, Konservierungsstoffe, PMN-Elastase α_1 PI-Komplex)
- 2. Kontrollplasma vom Schaf versetzt mit PMN-Elastase α_1 PI-Komplex
- 3. Probenverdünnungsmedium (Phosphatpuffer pH 7,5 mit Stabilisatoren)
- 4. Waschlösung
- 5. AP-Substrat (4-Nitrophenylphosphat)
- 6. AP-Puffer (Diethanolamin, pH 9,8)
- 7. Stopplösung (NaOH)
- 8. Antikörper beschichtete Röhrchen (anti PMN-Elastase Antikörper vom Schaf)
- 9. Antikörper-Enzym-Konjugat (Tris-Puffer pH 7,5, anti α₁ PI Antikörper vom Kaninchen gekoppelt mit alkalischer Phosphatase)
- 10. Antikörper-Enzym-Konjugat-Puffer (Borat Puffer pH 8,0)

Testdurchführung

Zunächst wurden 50µl der zu untersuchenden Probe und einer Kontrolle mit 2,5ml Verdünnungslösung in separaten Gefäßen gemischt. Die antikörperbeschichteten Röhrchen wurden mit 1ml Waschlösung gefüllt und für 5-20 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert. Nachdem die Zeit abgelaufen

war, wurden die Röhrchen vollständig abgesaugt und die verdünnte Probe beziehungsweise die verdünnte Kontrolle hinein gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten bei Zimmertemperatur wurden die Röhrchen wieder vollständig abgesaugt und dreimal mittels Waschlösung gewaschen. Anschließend wurden 500µl der Antikörper-Enzymlösung hinzu gegeben und für 30 Minuten inkubiert. Nach zwei weiteren Waschvorgängen wurden 500µl Substratlösung hinzugefügt und alles noch einmal für 30 Minuten bei Zimmertemperatur lichtgeschützt inkubiert. Nach Stoppen der Reaktion mit 100µl NaOH wurden die Proben innerhalb einer Stunde gegen ein Leerwertgemisch aus 500µl Substratlösung und 100µl Stopplösung bei einer Wellenlänge von 405nm gemessen.

Der Referenzbereich liegt nach Angaben des Herstellers zwischen 12 und 32 µg/l (Mittelwert: 22µg/l, Standardabweichung 10µg/l) für gesunde Erwachsene.

2.3.3.2 sP-Selectin

Die Bestimmung von sP-Selectin erfolgte mit dem Test Kit der Firma R&D (Minneapolis, USA).

<u>Testprinzip</u>

Dieser zur Bestimmung von sP-Selectin verwendete Enzymimmunoassay ist nach dem Sandwichprinzip aufgebaut. Dazu sind in den Vertiefungen der Mikrotitrationsplatte monoklonale Antikörper gegen sP-Selectin fixiert, an die das in der Probe enthaltene sP-Selectin im ersten Inkubationsschritt bindet. Nach Zugabe von peroxidasekonjugierten Antikörpern gegen das bereits gebundene sP-Selectin werden die ungebundenen Antikörper durch wiederholtes Waschen entfernt. Zuletzt wird eine Lösung zugesetzt, die über eine Peroxidasereaktion eine Farbentwicklung auslöst. Diese lässt sich photometrisch bestimmen und ist proportional zur gesuchten Konzentration.

Testreagenzien

1. sP-Selectin Mikrotitrationsplatte (mit Mausantikörper gegen sP-Selectin)

2. sP-Selectin Standardlösung

- 3. Probenverdünnung
- 4. sP-Selectin konjugiertes Konzentrat (peroxidasekonjugierte Antikörper vom Schaf gegen sP-Selectin)
- 5. Konjugationslösung
- 6. sP-Selectin Standard
- 7. Waschlösung
- 8. Substrat (Tetramethylbenzidine)
- 9. Stopplösung

Testdurchführung

In die Vertiefungen der Mikrotitrationsplatte wurden jeweils 100µl der bereits verdünnten Probe beziehungsweise der Standardlösung pipettiert. Nach kurzem Warten und Absaugen der Platte wurden jeweils 100µl der konjugierten Antikörper hinzugefügt und für 60 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Platten erneut vorsichtig abgesaugt und die nicht gebundenen Antikörper durch dreimaliges Waschen entfernt. Dann wurden 100µl der Substratlösung hinein pipettiert und für weitere 15 Minuten inkubiert. Durch Zugabe von 100µl Stopplösung wurde die Reaktion beendet und die Proben innerhalb von 30 Minuten bei einer Wellenlänge von 450nm am Photometer gemessen. Durch Erstellen einer Bezugskurve aus den Standardwerten konnten die sP-Selectin-Werte der Proben anschließend aus der Kurve abgelesen werden.

Die Referenzwerte variieren für Erwachsene laut Hersteller zwischen 18 und 40ng/ml.

2.3.3.3 β-Thromboglobulin (β-TG)

Die Konzentration von β -TG wurde mit dem Enzymimmunoassay der Firma Roche (Mannheim, Deutschland) gemessen.

<u>Testprinzip</u>

Auch dieser Enzymimmunoassay ist nach dem Sandwichprinzip aufgebaut. Im ersten Inkubationsschritt wird das in der Probe enthaltene β -TG an die in den

Vertiefungen des Mikrotitrationsstreifens enthaltenen Antikörper gebunden. Im zweiten Inkubationsschritt binden peroxidasekonjugierte Antikörper an weitere Bindungsstellen des β -TG-Moleküls. Im Anschluss an wiederholte Waschvorgänge, in denen die nicht gebundenen Antikörper entfernt werden, wird Harnstoffperoxid und das Chromogen Ortho-Phenyldiamin hinzugefügt. Die daraufhin einsetzende Farbreaktion wird nach Beendigung einer festgelegten Zeitspanne durch Säurezugabe beendet und die Konzentration an β -TG photometrisch bestimmt.

Testreagenzien

- 1. Mikrotitrationsstreifen (mit Anti-human-β-TG vom Kaninchen)
- 2. Anti-human-β-TG vom Kaninchen, gekoppelt mit Peroxidase
- 3. Ortho-Phenyldiamin (2mg)
- 4. Harnstoffperoxid (5mg)
- 5. Konzentrierter Phosphatpuffer
- 6. Konzentrierte Waschlösung
- 7. Kalibrator mit humanem β-TG
- 8. Kontrolllösung

Testdurchführung

Zunächst wurden 200µl des verdünnten Probandenplasmas beziehungsweise einer verdünnten Kontrolle in die Vertiefungen des Mikrotitrationsstreifens hinein pipettiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit von einer Stunde bei 18-25℃ wurden die Streifen abgesaugt und mit konzentrierter Waschlösung fünfmal gewaschen. Anschließend wurden jeweils 250µl der peroxidasekonjugierten Antikörper hinzugefügt und erneut für 60 Minuten bei 18-25℃ inkubiert. Nach weiteren fünf Waschgängen wurden das Harnstoffperoxid sowie das Chromogen Ortho-Phenyldiamin zugegeben. Diese Reaktion wurde nach drei Minuten durch die Zugabe von Salzsäure gestoppt und die Proben am Photometer bei einer Wellenlänge von 492nm gemessen.

Nachdem eine Standardkurve aus den Werten der Kontrolle auf doppeltlogarithmischem Papier erstellt wurde, konnten die β-TG-Werte aus dem Plasma der Patientenproben direkt aus der Kurve abgelesen werden. Nach Angaben des Herstellers sollen die β-TG-Werte für erwachsene Personen in Bereich zwischen 10 und 50IU/I liegen.

2.3.3.4 SC5b-9

Der in den Proben enthaltene SC5b-9-Komplex wurde mit dem Enzymimmunoassay der Firma QUIDEL (San Diego, USA) erfasst.

<u>Testprinzip</u>

Dieser Enzymimmunoassay funktioniert ebenfalls nach dem Sandwichprinzip und läuft in drei Phasen ab.

In der ersten Phase binden die in den Proben enthaltenen SC5b-9 Komplexe an die entsprechenden Antikörper in den Vertiefungen der Mikroassayplatte, wobei nicht gebundene Komplexe durch einen anschließenden Waschvorgang entfernt werden.

Im zweiten Schritt werden an Meerrettichperoxidase gebundene Antikörper gegen den SC5b-9-Komplex hinzu gegeben. Auch hier werden die ungebundenen Antikörper durch Waschen entfernt.

Zuletzt wird in die Vertiefungen ein chromogenes Enzymsubstrat eingebracht, welches durch die Peroxidasereaktion eine Grünfärbung erhält. Nach Stoppen der Reaktion mit Oxalsäure wird die Konzentration an SC5b-9 anhand der Farbintensität photometrisch gemessen und mittels einer Eichgeraden bestimmt.

<u>Testreagenzien</u>

- 1. SC5b-9-Standardlösung (mit definierter Menge von SC5b-9)
- 2. Kontrolllösungen (mit hohen und niedrigen Mengen an SC5b-9)
- Beschichtete Teststreifen (monoklonale Antikörper gegen SC5b-9 von der Maus)
- 4. Stopplösung (250mmol/I Oxalsäure)
- 5. konzentrierte Waschlösung
- 6. Probenverdünnungsmittel (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)

- 7. Substratverdünnung (Zitratpuffer)
- 8. konzentriertes Substrat
- 9. SC5b-9-Konjugat (an Meerrettichperoxidase gebundene Antikörper gegen SC5b-9 von der Ziege)

Testdurchführung

Die Vertiefungen der Mikroassayplatte wurden zunächst angefeuchtet, mit 100µl Probenverdünnung befüllt und schließlich die Proben oder Kontrollen hinein pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten bei 15-30 °C folgten fünf Waschvorgänge, in denen die nicht gebundenen SC5b-9-Komplexe entfernt wurden.

Anschließend wurden je 50µl der SC5b-9-Konjugatlösung hinzu gegeben und erneut für eine Stunde inkubiert. Nach weiteren fünf Waschvorgängen wurden jeweils 100µl der Substratlösung in die Vertiefungen pipettiert. Nach 30 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von je 50µl Oxalsäure gestoppt und die Proben am Photometer bei einer Extinktion von 405nm gemessen.

Nach Auftragen der Standardwerte in ein entsprechendes Diagramm konnten die ermittelten Werte direkt abgelesen und entsprechend ihrer Verdünnung berechnet werden.

Die Nachweisgrenze für SC5b-9 liegt laut Herstellerangaben bei einem Wert von 7,9ng/ml. Allerdings wird als untere Bestimmungsgrenze ein Wert von 40ng/ml festgelegt, der den Kriterien Genauigkeit und Präzision dieses Tests somit gerade noch gerecht wird.

Einen Norm- oder Referenzbereich für Erwachsene gibt es nicht.

2.3.3.5 Thrombin-Antithrombin-III-Komplex (TAT)

Mit dem Enzymimmunoassay Enzygnost® TAT der Firma Behringwerke AG (Marburg, Deutschland) erfolgte die Bestimmung des Thrombin-Antithrombin-III-Komplex (TAT).

Testprinzip

Auch die Mikrotitrationsplatten zur Bestimmung der TAT-Komplexe folgen dem

Sandwichprinzip. Dazu binden die in den Proben enthaltenen TAT-Komplexe an entsprechende Antikörper in den Vertiefungen der Mikrotitrationsplatte. Nach Auswaschen der überschüssigen und nicht gebundenen TAT-Komplexe werden in einem weiteren Schritt peroxidasekonjugierte Antikörper gegen humanes AT III hinzugefügt, wobei auch hier die ungebundenen Antikörper durch einen Waschvorgang entfernt werden. Die sich anschließende enzymatische Umwandlung von Wasserstoffperoxid und einem Chromogen wird mittels Schwefelsäure unterbrochen. Die Konzentration von TAT, die proportional zur Farbintensität ist, kann nun photometrisch bestimmt werden.

Testreagenzien

- 1. Enzygnost TAT (Mikrotitrationsplatten mit Kaninchen-Antikörpern gegen humanes Thrombin)
- 2. Anti-ATIII (Peroxidasekonjugierte Antikörper vom Kaninchen gegen ATIII)
- 3. Konjugat-Puffer (Tris-Puffer, Serumalbumin vom Rind)
- 4. TAT-Standardplasmen
- 5. TAT-Kontrollplasmen
- 6. Probenpuffer (TAT)
- 7. Waschlösung POD (Phosphatpufferlösung)
- 8. Puffer/Substrat POD (Wasserstoffperoxid in Citratpuffer)
- 9. Chromogen POD (o-Phenylendiamin-dihydrochlorid)
- 10. Stopplösung (0,5N Schwefelsäure)

Testdurchführung

50µl Probenpuffer TAT wurden zunächst mit je 50µl Kontrolle, Standard oder der eigentlichen Probe in den Vertiefungen der Mikrotitrationsplatte vermischt und bei 37 ℃ für zirka 15 Minuten inkubiert. Nach kurzem Absaugen und zweimaligen Waschen wurden je 100µl Konjugatlösung hinzugefügt und erneut für 15 Minuten inkubiert. Im Anschluss an drei weitere Waschvorgänge wurden 100µl der frisch angesetzten Chromogen-Puffer/Substrat-Lösung dazu pipettiert und bei 25 ℃ für 30 Minuten lichtgeschützt stehen gelassen. Durch Zugabe von 100µl Stopplösung POD wurde die enzymatische Reaktion gestoppt und die Proben bei einer Wellenlänge von 492nm gegen destilliertes Wasser am Photometer gemessen.

Anschließend erfolgte die Erstellung einer Bezugskurve auf doppeltlogarithmischem Papier, aus der die ermittelten TAT-Werte direkt abgelesen werden konnten.

Als Referenzbereich gibt der Hersteller für gesunde Erwachsene Werte zwischen 1,0 und 4,1µl/l an.

2.3.3.6 Factor XIIa

Zur Bestimmung der Konzentration von Factor XIIa wurde der FXIIA ELISA Kit der Firma Axis-Shield (Dundee, Schottland, Vereinigtes Königreich) eingesetzt.

<u>Testprinzip</u>

Bei diesem, nach dem Sandwichprinzip aufgebauten, Enzymimmunoassay wird im ersten Schritt der in den Standards, Kontrollen oder Proben enthaltene Factor XIIa an Maus-Antikörper in den Vertiefungen der Platte gebunden. Nach mehrmaligem Waschen werden weitere Schaf-Antikörper gegen den humanen Factor XIIa hinzugefügt und sollen binden. Im nächsten Schritt werden nach erneuten Waschvorgängen enzymmarkierte Antikörper gegen die bereits Zugabe gebundenen Schaf-Antikörper hinzugefügt, die nach einer Substratlösung eine Farbreaktion hervorrufen. Diese kann am Photometer gemessen und somit die Konzentration an enthaltenem Factor XIIa bestimmt werden.

Testreagenzien

- 1. FXIIa Mikrotitrationsplatten (mit Maus-Antikörpern gegen Factor XIIa)
- 2. Anti-FXIIA-Konjugat (mit Antikörpern vom Schaf gegen Factor XIIa)
- 3. Substrat (Phenolphtalein Monophosphat)
- 4. Stopplösung (Sodiumhydroxid, EDTA, Carbonat-Puffer)
- 5. FXIIa Waschlösung (Borate -Puffer, Salzsäure)
- 6. FXIIa-Standards
- 7. FXIIa-Kontrollen

Testdurchführung

In die Vertiefungen der Mikrotitrationsplatten wurden zuerst je 100µl Standard, Kontrollen und Proben hinein pipettiert und für 60 Minuten bei 18-25℃ inkubiert. Anschließend wurden die Platten fünfmal mit 200µl Waschlösung gewaschen und wieder mit je 100µl Anti-FXIIA befüllt. Nach einer Inkubationszeit von weiteren 60 Minuten bei gleicher Temperatur folgten weitere fünf Waschvorgänge. Zuletzt wurden je 100µl des Substrates hinzugefügt und inkubiert. Die sich entwickelnde enzymatische Farbreaktion wurde nach 15 Minuten durch Zugabe der Stopplösung angehalten. Die Proben wurden dann am Photometer bei einer Wellenlänge von 550nm gemessen.

Die Werte der Standards wurden zur Ermittlung einer Bezugskurve auf logarithmischem Papier aufgetragen, so dass die Konzentrationen in den Proben direkt der Kurve entnommen werden konnten.

Die Werte sind nach Angaben des Herstellers sowohl alters- als auch geschlechtsabhängig. Für beide Geschlechter gilt als Referenzwert für Erwachsene zwischen dem 18. und 68. Lebensjahr ein Wert von zirka 1,53ng/ml.

2.3.4 Durchflusszytometrie der Thrombozyten (FACS-Analyse)

Eine Durchflusszytometrie der Thrombozyten (FACS-Analyse, englisch: fluorescene activated cell sorting) sollte sowohl vom 0- oder Ausgangwert als auch von den jeweiligen drei Schläuchen nach Simulation im Chandler Loop Modell erfolgen.

Ein Durchflusszytometer ist ein "optisches Meßsystem, das Streulicht- und Fluoreszenzsignale einzelner in einem Flüssigkeitsstrom fokussierter Partikel analysiert".

Dabei kann es sowohl Zellen des hämatologischen Systems wie Lymphozyten, Leukozyten, Thrombozyten oder Erythrozyten als auch Zellen in Körperflüssigkeiten (Gelenkflüssigkeit, Liquor, Sperma und andere) erfassen. Selbst Tumorzellen, virusinfizierte Zellen und Bakterien können mit dem Durchflusszytometer sichtbar gemacht werden. "Das Anwendungsspektrum reicht von der Lymphozytentypisierung über Zellzyklusanalysen bis zu funktionellen Untersuchungen wie beispielsweise intrazellulären Stoffwechselvorgängen."

Dazu ist ein Durchflusszytometer aus einem Flüssigkeitssystem, einem optischen System, einer Signalverarbeitung und einem System zur Darstellung der Messergebisse ausgestattet.

Das Flüssigkeitssystem dient als Trägerlösung für die enthaltenen Zellen und leitet sie entsprechend an die Stellen des optischen Systems, das aus Anregungs- und Detektionsteil besteht. Im Anregungsteil werden die Zellen durch einen Laser auf ein höheres Energieniveau gebracht und damit angeregt. Der Detektionsteil misst anschließend über die verschiedenen Richtungen des abgehenden Streulichts die noch enthaltene Energie. Diesen Strahlungsübergang auf das Grundniveau bezeichnet man auch als Fluoreszenz.

Die vom Detektionsteil wahrgenommen Signale werden über Photoröhrchen (PMT=photomutiple Tube) oder Photodioden weiter verarbeitet und anschließend als Histiogramme oder Zweiparameterdiagramme am Bildschirm sichtbar.

Um die Zellen für den Durchflusszytometer besser anregbar machen zu können, werden sie mit speziellen Farbstoffen, so genannten Fluorchromen, markiert. Diese sind meist an entsprechende Antikörper gegen die gesuchten Zellen gekoppelt. Es gibt Farbstoffe für die Immunfluoreszenz wie Fluorescein (FITC) oder R-Phycoerythrin (PE), aber auch solche für den Nachweis von DNA oder RNA, Calcium, Mitochondrien, Membranpotentialen oder für intrazelluläre pH-Messungen.

Besondere Möglichkeiten ergeben sich durch den Einsatz verschiedener Farbstoffkombinationen bei gleicher anregbarer Wellenlänge. Durch die unterschiedlichen Anregungs- und Emissionswellenlängen lassen sich zum Beispiel heterogene Zellpopulationen genauer charakterisieren. (117)

Das in dieser Studie verwendete FACS-Gerät FACScan stammt von der Firma BD (Becton and Dickinson, Erembodegem, Belgien). Der enthaltene Laser hat einen Wellenlängenbereich von 325-752nm und lässt sich entsprechend auf die verwendeten Fluorchrome einstellen. Der Farbstoff Fluorescein (FITC) wird bei einer Wellenlänge von zirka 530nm und R-Phycoerythrin (PE) bei zirka 585nm angeregt. Beide Farbstoffe wurden in Verbindung mit Antikörpern in dieser Studie verwendet.

2.3.4.1 Reagenzien für die Durchflusszytometrie

Bevor das Blut für die Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) aufbereitet werden konnte, mussten zunächst noch weitere Vorbereitungen getroffen werden.

Tyrode Puffer

Als erstes wurde ein Tyrode Puffer angesetzt, der bei der Aufbereitung des Blutes für die Durchflusszytometrie wichtig war.

Dazu wurden 4,388g NaCl, 0,09315g KCl, 0,1105g CaCl² und 0,504g NaHCO³ mit einer Präzisionswaage der Firma Sartorius Research (Göttingen, Deutschland, letzte Wartung April 2004) abgewogen und miteinander vermengt. Diese Reagenzien wurden von der Firma MERCK (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Außerdem wurden noch 0,203g MgCl² der Firma Molecular Sigma Biology (München, Deutschland) dazugegeben. Anschließend wurde das Gemisch mit 500ml destilliertem Wasser (Fresenius Kabi. Bad Homburg, Deutschland) aufgefüllt. Nach vorsichtigem Schütteln wurden zusätzlich 0,5g Glucose, ebenfalls von Molecular Sigma Biology (München, Deutschland), hinzugefügt, so dass die Lösung pro Milliliter ein Gramm Glucose enthielt.

Nachdem die Reagenzien auf dem Magnetrührer nach zirka 30 Minuten vollständig gelöst waren, wurde das Gemisch am pH-Meter auf 7,4 eingestellt. Als letztes wurden 0,5g BSA hinzu gegeben, so dass auch hier pro Milliliter Lösung ein Milligramm BSA enthalten war.

Nach erneutem Rühren wurden ungefähr 30 Falcons (Cellstar®) der Firma Greiner Bio One (Frickenhausen, Deutschland) mit jeweils 10ml Tyrode Puffer befüllt (alliqoutiert) und bei -20 °C bis zum Studienbeginn eingefroren.

ADP (Adenosin-di-Phosphat)

Ein weiteres Reagenz bei der Durchflusszytometrie war das ADP (Adenosin-di-Phosphat) der Firma MöLAB (Hilden, Deutschland). Es wurde nach Gebrauchsanweisung mit 1ml destilliertem Wasser (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) aufgelöst, zu 20µl in zirka 50 Eppendorfhütchen abpipettiert und ebenfalls bei -20 °C tiefgefroren.

Vor jedem Versuch wurde die benötigte Menge an ADP rechtzeitig aufgetaut. Bevor das ADP aber für den Versuch verwendet werden konnte, wurden pro 20µl noch 36,65ml destilliertes Wasser hinzu gegeben und anschließend alles gut durchmischt (vortexen).

<u>Cellfix™</u>

Um nach Aufbereitung des Blutes von eventuell auftretenden Verzögerungen vor der Messung oder Fehlmessungen selbst unabhängig zu sein, wurden die Zellen in so genanntem Cellfix[™] (BD, Erembodegem, Belgien) fixiert. Dieser Zusatz macht es möglich, die Zellen für zirka 24 Stunden zu konservieren.

Dazu wurde die entsprechend benötigte Menge Zellfix mit destilliertem Wasser (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) auf eine Konzentration von 1:10 verdünnt. Diese Mischung sollte nicht länger als 24 Stunden aufbewahrt werden und wurde daher täglich frisch angesetzt.

2.3.4.2 Antikörper

Die Aufbereitung des Blutes zur Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) erfolgte bei allen Antikörpern nach demselben Prinzip. Daher soll im Folgenden kurz auf die Gemeinsamkeiten eingegangen werden, bevor die Antikörper im Einzelnen besprochen werden.

Nachdem das Blut vor Einbringen in die Schläuche beziehungsweise nach Durchlauf im Chandler Loop Modell in die Heparinmonovetten abgefüllt war, wurden diese vorsichtig geschüttelt, um eine komplette Durchmischung des Blutes mit dem enthaltenen Heparin zur Antikoagulation zu erreichen. Anschließend wurde 20µl des heparinisierten Blutes in ein Eppendorfhüttchen abpipettiert und mit 980µl des zuvor vorbereiteten Tyrode-Puffers verdünnt. Nach kurzem durchmischen (vortexen), wurden jeweils 50µl dieser Mischung in 5 Eppendorfhütchen umverteilt.

In eines der fünf Eppendorfhütchen wurden keine Antikörper gegeben, um die Zellen in ihrem nativen Zustand belassen und somit eine Negativkontrolle zu erhalten.

In die anderen vier Eppendorfhütchen wurden die verschiedenen Antikörper in entsprechender Menge dazu gegeben und alles noch einmal gut durchmischt (vortexen). Die hinzugefügten Volumen waren Standardmengen, die sich aus Erfahrungen in anderen Studien mit diesen Antikörpern ergaben.

Anschließend wurden die Eppendorfhütchen samt Inhalt für genau 30 Minuten an einen dunklen und erschütterungsfreien Ort inkubiert. Nachdem die Zeit abgelaufen war, wurde der Inhalt der Eppendorfhütchen mit einer Pipette (Eppendorf Reference) jeweils auf ein FACS-Röhrchen der Firma BD (Becton and Dickinson, Erembodegem, Belgien) umpipettiert, weil nur diese Röhrchen für die Messung im FACS-Gerät genutzt werden können. Zuletzt wurden pro Röhrchen 500µl des ebenfalls vorbereiteten Cellfix[™] dazu gegeben, um die Zellen für eine spätere Messung zu konservieren. Die Röhrchen wurden mit ihrem Deckel verschlossen und bis zur Messung am FACS-Gerät bei 7°C dunkel und erschütterungsfrei im Kühlschrank gelagert.

Antikörper CD 45

Der Antikörper CD 45 der Firma BD (Becton and Dickinson, Erembodegem, Belgien) ist ein Maus-Immunglobulin IgG1 (Kappa) und reagiert mit verschieden schweren Isoformen des LCA (leucocyte common antigen). Das LCA ist auf Leukozyten, Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten, Eosinophilen und Thymozyten vorhanden, allerdings nicht auf zirkulierenden Erythrozyten, Thrombozyten oder erythropoetischen Stammzellen des Knochenmarks.

CD 45 ist mit dem Fluoreszenzfarbstoff R-PE gekoppelt und macht in der Durchflusszytometrie alle die Zellen sichtbar, die das LCA aufweisen. (43, 117) Der Antikörper wurde in dieser Studie mit einer Konzentration von 5µl verwendet und gemeinsam mit CD 41 in einer Probe vermischt.

Antikörper CD 41

CD 41 ist ebenfalls ein aus der Maus isoliertes Immunglobulin der Klasse IgG1 und wurde von der Firma Immunotech (Marseille, Frankreich) bezogen.

Das eigentliche CD 41 bildet als αllb Kette, auch gpllb genannt, zusammen mit der β3 Kette (gpllla oder CD 62) den Glycoproteinkomplex gpllb/Illa, der am Fibrinogenrezeptor auf allen Thrombozyten zu finden ist (48) und bei deren Aktivierung im Gerinnungsprozess eine große Rolle spielt. Der gpllb/Illa Komplex gehört zur Familie der Cytoadhäsine, die auch Integrin genannt wird.

Der Antikörper CD 41 reagiert unabhängig von der Anwesenheit des gplla ausschließlich mit der gpllb-Kette und somit nur mit normalen Thrombozyten und Megakaryozyten.

Er verhindert nicht die durch Kollagen, Arachidonsäure oder Thrombin ausgelöste Aggregation der Thrombozyten und auch nicht die Bindung von Fibrinogen an den Plättchenaggregaten, die durch ADP, Arachidonsäure oder PAF getriggert wird.

Durch die Markierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC kann man mit dem Antikörper CD 41 also die Funktion der Thrombozyten überprüfen und den gpIIb-Anteil des Glycoproteinkomplexes identifizieren (46, 117).

CD 41 wurde, wie oben bereits erwähnt, zusammen mit CD 45 in einer Probe gemischt und mit einer Konzentration von 5µl gebraucht.

Antikörper PAC 1

PAC 1 ist ein Antikörper, der ein Epitop des gpllb/Illa Glycoproteinkomplexes auf aktivierten Thrombozyten Nähe beziehungsweise in der am Fibrinogenrezeptor selbst erkennen und durch Kopplung mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC markieren kann.

PAC 1 bindet somit also ausschließlich an aktivierte Thrombozyten und verhindert durch seine Bindung außerdem die Thrombozytenaggregation durch Fibrinogen.

Der Antikörper ist ein Pentamer der Klasse IgM und kann für folgende Studienziele verwendet werden: Verständnis über Struktur und Funktion des gpIIb/IIIa-Komplexes sowie seiner Liganden, Hämostase und Thrombose bei Gefäßverletzungen, metabolische Reaktionen infolge von Veränderungen der Plättchenoberfläche und therapeutische Strategien zur Verhinderung der Plättchenaktivierung (48).

Das verwendete PAC 1 stammte von der Firma BD (Becton and Dickinson, Erembodegem, Belgien) und wurde mit der Konzentration von 2µl eingesetzt.

Um die korrekte Funktion des Antikörpers PAC 1 zu überprüfen, wurde eine so genannte Positivkontrolle angefertigt. Dazu wurden 2µl von PAC 1 und 10µl ADP (Adenosin-di-Phosphat) zur Blut-Tyrode-Mischung dazu gegeben. Das ADP induziert eine Aktivierung der Thrombozyten und ermöglicht so die Bindung von PAC 1 an die Thrombozyten.

Antikörper CD 62P (CLB Thromb/6)

CD 62P (auch P-Selectin genannt) ist ein Glycoprotein mit einem lectinähnlichen Aminoende und einem EGF Bereich sowie anderen wichtigen Domänen. Es ist in den α -Granula von zirkulierenden Plättchen und in Endothelzellen enthalten und wird bei Aktivierung (in vivo und in vitro) auf die Oberflächenmembran von Thrombozyten und auch Megakaryozyten transloziert. Es spielt eine wichtige Rolle bei der Interaktion zwischen aktivierten Plättchen und Monozyten beziehungsweise Neutrophilen.

Der Antikörper CD 62P (CLB Thromb/6) gegen das P-Selectin, verbunden mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC, erkennt die Region zwischen Lectin und der EGF-Domäne und bindet an diese.

CD 62P ist somit also für Studien an aktivierten Plättchen geeignet (47) und wurde in dieser Studie mit einer Konzentration von 10µl verwendet. Der Antikörper selbst gehört zur Klasse der Immunglobuline IgG1 (Maus) und wurde von der Firma Immunotech (Marseille, Frankreich) geliefert.

2.4 Rasterelektronenmikroskopie der Stents

Wie im Kapitel 2.2.3.1 und 2.2.3.2 beschrieben, sollen die Stents im Rasterelektronenmikroskop untersucht werden. Dazu wurden sowohl vom unbeschichteten (BMS) als auch vom beschichteten Stent (SES) je einer ohne Blutkontakt und einer nach Durchlauf im Chandler Loop präpariert.

Nachdem das Blut aus den Schläuchen zur weiteren Verarbeitung entnommen worden war, wurden diese mit physiologischer Kochsalzlösung ausgewaschen, um das noch anhaftende Blut zu entfernen. Das Schlauchstück, in dem der jeweilige Stent lag, wurde mit dem Schlauchschneider vom restlichen Schlauch abgeschnitten und für 60 Minuten bei 4-8 °C in 2%igem Glutaraldehyd fixiert. Anschließend wurde der Stent mit einer kleinen Zange, einer Pinzette und einem Skalpell aus dem Schlauchstück herauspräpariert und auf eine Größe von zirka 0,5 x 0,5cm zurechtgeschnitten. Es folgte die erneute Fixierung bei 4-8 °C in 2%igem Glutaraldehyd für weitere 30 Minuten. Das Glutaraldehyd wurde dann durch Einlegen des Stents für 10 Minuten in eine PBS-Lösung wieder herausgewaschen. Der Stent wurde nun in aufsteigender Alkoholreihe entwässert. Beginnend bei 40%igem Ethanol wurde dieser jeweils für 10 Minuten in den in Zehnerschritten aufsteigenden Alkohollösungen belassen und zuletzt einmal in 96%igem Ethanol, sowie zweimal für 10 Minuten in absolutem Alkohol eingelegt.

Die nun fixierten Stents wurden für den Transport einzeln in kleine Falcons (Cellstar®) der Firma Greiner (Frickenhausen, Deutschland) verpackt und ihrem Inhalt entsprechend beschriftet.

Die Stents ohne Blutkontakt wurden lediglich aus dem Schlauch herauspräpariert, auf die Maße 0,5 x 0,5cm zurechtgeschnitten und in beschriftete Transportgefäße gelegt. Eine Fixierung oder Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe war wegen des fehlenden Zellkontaktes nicht nötig. Die Untersuchung der Stents am Rasterelektronenmikroskop erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Zoologischen Institut der Fakultät für Biologie der Universität Tübingen.

2.5 Statistik

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Professor Klaus Dietz, Direktor des Instituts für Medizinische Biometrie der Eberhard Karls Universität Tübingen.

Für die Berechnungen wurde das Statistik-Software-Paket JMP® der Firma SAS Institute Inc. (Cary, NC, USA) verwendet.

Nicht normalverteilte Daten wurden vor der Analyse logarithmiert.

Um einen Vergleich zwischen dem Ausgangswert und den jeweiligen Schläuchen zu erhalten, wurden die ELISA-Daten einem Tukey HSD-Test unterzogen. Dieser Test ist ein Folgetest, der alle paarweisen Vergleiche nach einer Varianzanalyse durchführt. Da der Tukey HSD-Test berücksichtigt, dass es sich um paarige Tests handelt und der Name des Individuums als zufälliger Faktor in das Modell eingeht, finden sich auch dann signifikante Unterschiede, wenn sich die Konfidenzintervalle stark überlappen.

Die Daten der FACS-Analyse wurden mit einer zwei-faktoriellen Varianzanalyse verglichen, die den festen Faktor "Nummer" und den zufälligen Faktor "Proband" einbezieht. Ein Tukey HSD-Test erfolgte anschließend nicht, da der globale Test für die Gleichheit der "Nummern" keine Signifikanz ergab und so die Nullhypothese gleicher Mittelwerte für die einzelnen "Nummern" nicht verworfen werden konnte.

Irrtumswahrscheinlichkeiten mit p < 0,05 wurden bei beiden Varianzanalysen als statistisch signifikant angesehen.

Die im Kapitel 3 dargestellten Diagramme und Tabellen zeigen den Mittelwert ± Standardfehler (siehe auch Tabellen Kapitel 7). Die Abkürzungen BMS (bare metal Stent) und SES (Sirolimus-eluting Stent) stehen dabei für die beiden untersuchten Stents.

3. Ergebnisse

3.1 Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten

3.1.1 Erythrozyten

Beim Vergleich der drei Schläuche mit dem Ausgangswert zeigt sich weder eine deutliche Abnahme noch eine Zunahme der Erythrozytenzahl, so dass hier kein signifikanter Unterschied festgestellt werden kann. Auch die Ergebnisse der Schläuche untereinander sind statistisch nicht signifikant.

Tab. 1: Zahl der Erythrozyten $[10^{6}/\mu]$ vor und nach Durchlauf im Chandler Loop Modell.

Ausgangswert	ohne Stent	BMS	SES
4,59 ± 0,11	4,66 ± 0,09	4,63 ± 0,28	4,58 ± 0,1



Abb. 2: Vergleich der Erythrozytenzahl des Ausgangswertes mit den jeweiligen Schläuchen nach Durchlauf im Chandler Loop.

3.1.2 Leukozyten

Bei der Leukozytenzahl konnte im Vergleich zum Ausgangswert eine signifikante Abnahme bei allen drei Schläuchen gezeigt werden (p < 0,05). Zwischen den Schläuchen selbst ergibt sich allerdings kein Unterschied zur Irrtumswahrscheinlichkeit, da sich die Zahl der Leukozyten nur gering unterscheidet.

Tab. 2: Zahl der Leukozyten [10³/μl] vor und nach Durchlauf im Chandler Loop Modell.

Ausgangswert	ohne Stent	BMS	SES
5,27 ± 0,42	4,93 ± 0,38	4,93 ± 0,38	4,96 ± 0,44





3.1.3 Thrombozyten

Die Zahl der Thrombozyten nimmt im Vergleich zum Ausgangswert bei allen drei Schläuchen deutlich ab. Dennoch stellt sich ein statistisch signifikantes Ergebnis nur zwischen dem Ausgangswert und dem BMS beziehungsweise dem Ausgangswert und dem SES dar (p < 0,05). Eine Differenz zwischen dem Ausgangswert und dem Schlauch ohne Stent konnte nicht gefunden werden. Auch hier gibt es aufgrund der ähnlichen Werte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Schläuchen.

Tab. 3: Zahl der Thrombozyten $[10^{3}/\mu I]$ vor und nach Durchlauf im Chandler Loop Modell.

Ausgangswert	ohne Stent	BMS	SES
238,89 ± 12,72	228,44 ± 11,88	218,56 ± 12,09	222 ± 13,06



Thrombozyten



3.2 Verschiedene Blutparameter (ELISA)

3.2.1 PMN-Elastase

Bei der PMN-Elastase zeigt sich eine deutliche Zunahme der Werte bei den jeweiligen drei Schläuchen nach Durchlauf im Chandler Loop Modell verglichen

Ergebnisse

mit dem Ausgangswert. Dieses Ergebnis ist statistisch signifikant (p < 0,05). Bei den drei Schläuchen untereinander konnte keine Differenz gefunden werden, da die Messungen vergleichbar sind.

Tab. 4: Werte der PMN-Elastase [µg/l] vor und nach Durchlauf im Chandler Loop Modell.

Ausgangswert	ohne Stent	BMS	SES
100,96 ± 4,62	173,21 ± 14,13	163,78 ± 8,32	166,8 ± 10,12





Abb. 5: Vergleich der PMN-Elastase zwischen den jeweiligen Schläuchen nach Durchlauf im Chandler Loop und dem Ausgangswert (*p < 0,05 vs. Ausgangswert).

3.2.2 sP-Selectin

Im Vergleich zum Ausgangswert steigen die sP-Selectin-Werte bei allen drei Schläuchen an. Ein statistisch signifikanter Unterschied besteht allerdings nur zwischen dem Ausgangswert und dem BMS beziehungsweise dem Ausgangswert und dem SES (p < 0,05). Ebenfalls statistisch signifikant ist die Differenz zwischen dem Schlauch ohne Stent und dem BMS (p < 0,05). Zwischen dem Ausgangswert und dem Schlauch ohne Stent konnte ebenso wenig ein Unterschied zur Irrtumswahrscheinlichkeit gefunden werden wie zwischen dem BMS und dem SES.

 Tab. 5: Werte von sP-Selectin [ng/ml] vor und nach Durchlauf im Chandler Loop Modell.

Ausgangswert	ohne Stent	BMS	SES
32,36 ± 2,61	34,85 ± 2,8	38,92 ± 3,86	36,22 ± 2,69



<u>sP - Selektin</u>

Abb. 6: Vergleich von sP-Selectin zwischen dem Ausgangswert und den jeweiligen Schläuchen nach Durchlauf im Chandler Loop Modell (*p < 0,05 vs. Ausgangswert bzw. °p < 0,05 vs. BMS).

3.2.3 Betathromboglobulin (β-TG)

Beim β -TG konnten deutlich höhere Werte bei den jeweiligen drei Schläuchen als beim Ausgangswert beobachtet werden, die auch statistisch signifikant sind (p < 0,05). Der höchste Anstieg wurde beim BMS gemessen. Es besteht ebenfalls eine Signifikanz zwischen dem Schlauch mit dem BMS und dem Schlauch mit dem SES (p < 0,05). Beim Vergleich des Schlauchs ohne Stent mit den Schläuchen, in denen Stents implantiert waren, zeigt sich kein statistisch relevanter Unterschied. $\label{eq:constraint} \begin{array}{l} \textbf{Tab. 6: Werte des β-TG [IU/ml] vor und nach Durchlauf im Chandler \\ Loop Modell. \end{array}$

Ausgangswert	ohne Stent	BMS	SES
54,29 ± 5,37	364,04 ± 92,29	673,83 ± 163,13	307,94 ± 54,87



Betathromboglobulin



3.2.4 SC5b-9

Beim Vergleich von SC5b-9 zeigt sich eine sehr deutliche Zunahme der Werte vom Ausgangswert zu den jeweiligen drei Schläuchen nach Durchlauf im Chandler Loop Modell, was sich auch als statistisch signifikant erweist (p < 0,05). Das höchste Ergebnis wurde beim SES gemessen. Zwischen den drei Schläuchen ergeben sich keine signifikanten Unterschiede.

Tab. 7: Werte des	SC5b-9 [ng/ml] vor und nach Durchlauf im Chang	dler
Loop Mod	ell.	

Ausgangswert	ohne Stent	BMS	SES
193,74 ± 31,99	858,9 ± 106,98	848,88 ± 76,62	1053,95 ± 142,54





3.2.5 Thrombin-Antithrombin-III-Komplex (TAT)

Auch die TAT Werte nehmen vom Ausgangswert zu den jeweiligen drei Schläuchen sehr deutlich zu, so dass dieses Ergebnis daher auch statistisch signifikant ist (p < 0,05). Der höchste Wert konnte dabei beim BMS gefunden werden.

Zwischen den drei Schläuchen gibt es keine statistisch signifikante Differenz.

Tab. 8: Werte des TAT [μg/l] vor und nach Durchlauf im Chandler Loop Modell.

Ausgangswert	ohne Stent	BMS	SES
1,5 ± 0,38	8,98 ± 2,94	13,96 ± 3,88	7,64 ± 1,26

<u>SC5b - 9</u>



Abb. 9: Vergleich zwischen dem Ausgangswert und den jeweiligen Schläuchen nach Durchlauf im Chandler Loop bezogen auf die TAT -Werte (*p < 0,05 vs. Ausgangswert).

3.2.6 Faktor XIIa

Die Werte beim Faktor XIIa steigen im Vergleich zum Ausgangswert bei den jeweiligen drei Schläuchen nach Durchlauf im Chandler Loop nur minimal an, so dass lediglich ein signifikanter Unterschied zwischen dem Ausgangswert und dem Schlauch ohne Stent besteht (p < 0,05). Zwischen dem Ausgangswert und den Schläuchen mit den beiden implantierten Stents gibt es keine statistische Signifikanz. Auch die drei Schläuche untereinander zeigen keinen Unterschied zur Irrtumswahrscheinlichkeit.

Tab. 9: Werte des Faktor XIIa [ng/ml] vor und nach Durchlauf im Chandler Loop Modell.

Ausgangswert	ohne Stent	BMS	SES
0,63 ± 0,06	0,79 ± 0,07	0,7 ± 0,07	0,73 ± 0,07



Abb. 10: Vergleich des Faktor XIIa zwischen dem Ausgangswert und den jeweiligen Schläuchen nach Durchlauf im Chandler Loop Modell (*p < 0,05 vs. Ausgangswert).</p>

3.3 Durchflusszytometrie der Thrombozyten (FACS-Analyse)

3.3.1 Negativkontrolle

Mit der Negativkontrolle (native Zellen) soll sichergestellt werden, dass die Zellen nicht durch falsche Labormethoden vorzeitig aktiviert werden und damit die eigentlichen Proben nicht mehr aussagekräftig sind. Beim Vergleich der Negativkontrolle zwischen dem Ausgangswert und den jeweiligen drei Schläuchen nach Durchlauf im Chandler Loop Modell zeigen sich bezüglich der Aktivierung keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Auch die Schläuche untereinander sind nicht statistisch signifikant unterschiedlich.

Tab. 10: Negativkontrolle [Aktivierung in %] vor und nach Durchlauf im
Chandler Loop Modell.

Ausgangswert	ohne Stent	BMS	SES
0,34 ± 0,09	0,26 ± 0,05	0,53 ± 0,09	0,41 ± 0,08

3.3.2 CD 45/CD 41

Nach Durchlauf im Chandler Loop sind bei allen drei Schläuchen nahezu genauso viele Zellen aktiviert und binden die Antikörper CD 41/CD 45 wie beim Ausgangswert, so dass sich bei diesem Vergleich kein statistisch signifikantes Ergebnis finden lässt. Auch die Werte zwischen den Schläuchen selbst sind ähnlich und daher statistisch nicht signifikant.

Tab. 11: CD 41/CD 45 [Aktivierung in %] vor und nach Durchlauf im
Chandler Loop Modell.

Ausgangswert	ohne Stent	BMS	SES
77,1 ± 7,13	76,1 ± 2,36	76,91 ± 2,18	76,97 ± 2,04





3.3.3 PAC 1

Die aktivierten Zellen steigen beim Antikörper PAC 1 nach Durchlauf im Chandler Loop Modell verglichen mit dem Ausgangswert unterschiedlich stark an. Die höchste Aktivierung konnte beim BMS gemessen werden. Dennoch besteht keine statistisch signifikante Differenz zwischen dem Ausgangswert und den drei Schläuchen. Die Werte der Schläuche untereinander sind hier ebenfalls ähnlich und zeigen keinen signifikanten Unterschied.

Tab. 12: PAC 1 [Aktivierung in %] vor und nach Durchlauf im
Chandler Loop Modell.

Ausgangswert	ohne Stent	BMS	SES
22,47 ± 2,43	33,92 ± 6,98	35,92 ± 8,17	28,52 ± 5,74



Abb. 12: Vergleich zwischen dem Ausgangswert und den jeweiligen Schläuchen nach Durchlauf im Chandler Loop bezüglich des Antikörpers PAC 1.

3.3.4 PAC 1 mit ADP

Nach Durchlauf im Chandler Loop Modell wurden bei allen drei Schläuchen weniger Zellen aktiviert und haben PAC 1 und ADP gebunden als beim Ausgangswert. Dennoch ist dieser leichte Abfall nicht statistisch relevant.

Zwischen den Schläuchen selbst ist die Aktivierung vergleichbar, weshalb sich hier ebenfalls kein signifikanter Unterschied darstellen lässt.

Tab. 13: PAC 1 mit ADP [Aktivierung in %] vor und nach Durchlauf im
Chandler Loop Modell.

Ausgangswert	ohne Stent	BMS	SES
95,59 ± 0,45	94,71 ± 0,56	94,54 ± 0,72	94,65 ± 0,68





Abb. 13: Vergleich PAC 1 mit ADP zwischen dem Ausgangswert und den jeweiligen Schläuchen nach Durchlauf im Chandler Loop Modell.

3.3.5 CD 62P (CLB Thromb/6)

Beim Vergleich des Ausgangswerts mit den jeweiligen drei Schläuchen stellt sich eine leichte Abnahme in der Aktivierung der Zellen bei CD 62P dar. Dieses Ergebnis ist allerdings nicht statistisch signifikant. Zwischen den Schläuchen selbst wurden etwa gleich viele Zellen aktiviert, so dass auch hier kein Unterschied zur Irrtumswahrscheinlichkeit besteht. **Tab. 14**: CD 62P (CLB Thromb/6) [Aktivierung in %] vor und nach Durchlaufim Chandler Loop Modell.

Ausgangswert	ohne Stent	BMS	SES
56,92 ± 1,66	54,02 ± 1,3	54,44 ± 1,59	54,63 ± 1,42







3.4 Rasterelektronenmikroskopie der Stents

3.4.1 Stents ohne Blutkontakt

Die dargestellten Abbildungenen zeigen den unbeschichteten Stent (BMS) und den mit Sirolimus beschichteten Stent (SES) in der so genannten Negativkontrolle. Das heißt, dass diese beiden Stents nicht mit Probandenblut in Kontakt gekommen sind und daher im Originalzustand für die Rasterelektronenmikroskopie präpariert wurden.

Abgebildet sind jeweils eine Übersichtsaufnahme sowie eine vergrößerte Detailansicht.

In der Übersicht lassen sich die einzelnen Streben (struts) sowie ihre

Ergebnisse

Anordnung im Stentdesign gut erkennen. Die im Hintergrund befindlichen "Wassertropfen" sind Rückstände des Trägermaterials für die Rasterelektronenmikroskopie.

Die Vergrößerung zeigt eine Querstrebe mit ihrer nahezu glatt polierten Oberfläche beziehungsweise mit der Sirolimusbeschichtung.

In der Abb. 17 sieht man die Beschichtung mit Sirolimus nochmals vergrößert.



Abb. 15: BMS ohne Blutkontakt. Links eine Übersichtsaufnahme, rechts die Vergrößerung einer Querstrebe.



Abb. 16: SES ohne Blutkontakt. Links wiederum die Übersichtsaufnahme, rechts eine vergrößerte Querstrebe.



Abb. 17: Vergrößerung der Sirolimusbeschichtung an verschiedenen Stellen des Stents.

3.4.2 BMS nach Durchlauf im Chandler Loop Modell

Die Abb. 18 gibt eine bereits vergrößerte Ansicht einer Strebe (strut) mit angrenzender Querstrebe des BMS wieder. Auf die Übersichtsaufnahme wurde hier bewusst verzichtet, da kein Unterschied zur Negativkontrolle zu erkennen ist. Die Streben sind mit einem dichten Fibrinbelag bedeckt, auf dem sich mehrere Zellaggregate abgelagert haben. An vielen Stellen ist die Fibrinschicht bereits wieder aufgebrochen, was allerdings auch durch die Fixierungstechnik der Stents bedingt sein kann.



Abb. 18: BMS nach Blutkontakt.

Ergebnisse

In dieser Abbildung (Abb. 19) sind die aufgelagerten Zellaggregate auf dem Fibrinrasen vergrößert dargestellt. Eine genaue Identifizierung ist bei dieser Vergrößerung aber noch nicht möglich. Dennoch handelt es sich wahrscheinlich um Thrombozytenaggregate, da bereits so genannte Podozyten (Füßchen) als kleine "Fäden" zwischen den einzelnen Ablagerungen zu erkennen sind.



Abb. 19: Vergrößerte Darstellung der aufgelagerten Zellaggregate.

In dieser Vergrößerung (Abb. 20) sieht man nun deutlich, dass die Zellaggregate aus mehreren Thrombozyten aufgebaut sind und mittels der Podozyten miteinander in Kontakt stehen beziehungsweise sich im Fibrinrasen fest verankern.



Abb. 20: Detailansicht dreier Thrombozytenaggregate.

3.4.3 SES nach Durchlauf im Chandler Loop Modell

In Abb. 21 ist ebenfalls eine Strebe des beschichteten Stents mit einer abgehenden Querstrebe dargestellt. Eine genaue Unterscheidung zwischen Sirolimusbeschichtung und Fibrinbelag ist in dieser Vergrößerung nicht möglich. Man kann außerdem vereinzelt aufgelagerte Zellen beziehungsweise Zellaggregate erkennen.



Abb. 21: SES nach Blutkontakt.

In dieser Vergrößerung (Abb. 22) haften einige Erythrozyten sowie ein Thrombozytenaggregat auf der Oberfläche.



Abb. 22: Aufgelagerte Erythrozyten auf dem SES.

Die Abb. 23 zeigt eine weitere Vergrößerung des SES. Hier kann man nun eine dünne Fibrinschicht mit auf gelagerten Zellen und Zellaggregaten deutlich erkennen. Eine genaue Abgrenzung zur Sirolimusbeschichtung ist nicht möglich.



Abb. 23: Fibrinschicht mit aufgelagerten Zellen und Zellaggregaten.

In dieser Abbildung (Abb. 24) sieht man nochmals zwei Thrombozytenaggregate in einer stark vergrößerten Detailansicht. Man erkennt außerdem den verbindenden Podozyten zwischen ihnen sowie ihre Verankerung im Fibrinbelag.



Abb. 24: Thrombozytenaggregate in Detailansicht.
4. Diskussion

4.1 Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten

4.1.1 Erythrozyten

In der Literatur lassen sich keine Angaben über die Zahl der Erythrozyten vor beziehungsweise nach einer Stentimplantation finden. Ohba et al (2003) beschreiben in ihrer Arbeit den Aufbau eines aspirierten Thrombus aus einer Koronararterie. Dieser besteht vorwiegend aus "Thrombozyten (100), irregulär geformten Erythrozyten und einer großen Zahl an Leukozyten, hauptsächlich Neutrophilen" (103). Die Arbeitsgruppe um Nagata et al (2004) fand sogar heraus, dass Thromben der rechten Koronararterie deutlich mehr Erythrozyten beinhalten als Thromben der linken Koronararterie (100).

In dieser Studie bildeten sich allerdings keine Thromben in den verwendeten Schläuchen beziehungsweise in den Stents aus. Dennoch kann man in den Bildern der Rasterelektronenmikroskopie beim beschichteten Stent nach Durchlauf im Chandler Loop Modell einige aufgelagerte Erythrozyten auf einem Fibrinrasen erkennen (siehe Abb. 22, Kapitel 3.4.3).

Diese Zahl ist allerdings so gering, dass sich kein Unterschied zwischen dem Ausgangswert und den jeweiligen drei Schläuchen nach Durchlauf im Chandler Loop Modell feststellen lässt. Auch zwischen dem nichtbeschichteten Stent (BMS) und dem Sirolimusstent (SES) beziehungsweise dem Schlauch ohne implantierten Stent ist kein signifikantes Ergebnis erkennbar, so dass die Erythrozytenzahl in dieser Studie insgesamt unbeeinflusst bleibt und sich alle Werte im Normbereich befinden.

4.1.2 Leukozyten

Wie im Einleitungskapitel 1.1.1 bereits erwähnt, gehören auch Entzündungszustände zu den Risikofaktoren für die Entstehung einer Koronaren Herzkrankheit. So fanden Madjid et al (2004) heraus, dass sowohl bei gesunden Menschen als auch bei KHK-Patienten erhöhte Leukozytenwerte die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse erhöhen (89). Auch Patienten mit einem frischen, akuten Myokardinfarkt weisen höhere Zahlen an Leukozyten im Blut auf als vergleichbare gesunde Probanden (15). Die Leukozytose bleibt nach erfolgreicher PTCA weiterhin bestehen oder kann sogar noch zunehmen (96), was wiederum mit einem erhöhten Risiko für die Sterblichkeit nach PTCA assoziiert ist (58). Der Anstieg der Leukozyten ist eine nicht spezifische Antwort (58) auf eine Entzündungsreaktion im Gefäß, ausgelöst durch einen rupturierten Plaque bei einem akuten Myokardinfarkt oder die Verletzung durch die Intervention selbst. Die Leukozyten als primäre Inflammationszellen werden durch verschiedene Mediatoren in die verletzte Gefäßwand rekrutiert und dienen dort als Reparaturmechanismus (29). Auch das Einbringen eines Stents stellt eine starke Verletzung des Gefäßendothels dar und führt dadurch zu einer komplexen Entzündungsreaktion mit Erhöhung der Leukozytenzahl (29). Aus diesem Grund spielt die Aktivierung der Leukozyten eine wesentliche Rolle bei der Entstehung von akuten/subakuten oder späten Stentthrombosen und Restenosen (29, 71).

In der vorliegenden Studie lagen sowohl die Leukozytenwerte des Ausgangswertes als auch die Werte der drei Schläuche nach Durchlauf im Chandler Loop Modell im Normalbereich für gesunde Erwachsene. Dennoch kam es zu einem signifikanten Abfall der Leukozytenzahl bei allen drei Schläuchen nach Durchlauf im Chandler Loop Modell, verglichen mit dem Ausgangswert. Da es sich um ein Stent Modell ex vivo handelt, können keine Leukozyten aus dem zirkulierenden Blut beziehungsweise ihren Speicherorten nachfolgen, auch wenn durch die Schläuche oder die Stents ausgelöst, entsprechende Mediatoren ausgeschüttet wurden.

Der Abfall der Leukozyten kann daher nur durch die thrombogene Oberfläche der Schläuche beziehungsweise der Stents erklärt werden. So befinden sich nach Ward et al (2002) Kollagen und Leukozyten hauptsächlich in den Streben von implantierten Stents, wobei besonders die Leukozyten rund um die Streben akkumulieren (143). Auch in den rasterelektronenmikroskopischen Bildern der hier vorliegenden Studie sieht man eine starke Fibrinbeschichtung mit aufgelagerten Zellen rund um die Streben der Stents (siehe Abb. 18, 19, 20, Kapitel 3.4.2).

Diskussion

Da allerdings die Leukozytenwerte der drei Schläuche nach Durchlauf im Chandler Loop untereinander nicht signifikant unterschiedlich sind, kann der Abfall der Leukozyten nicht allein durch die Anwesenheit der Stents erklärt werden. Darum ist es wahrscheinlich, dass auch die Oberfläche der Schläuche einen Einfluss auf die Leukozyten haben muss. Da das Material der Schläuche trotz Heparinbeschichtung nicht physiologisch ist, war es am ehesten zu einer Aktivierung des Gerinnungssystems mit Ablagerung von Kollagen, Fibrin und entsprechenden Zellen, inklusive Leukozyten, auf der Oberfläche gekommen.

4.1.3 Thrombozyten

Die Thrombozyten als wichtigste Komponente des Gerinnungssystems spielen in der Pathogenese der Koronaren Herzkrankheit eine entscheidende Rolle (120, 139). Besonders nach Ruptur einer stabilen Plaque werden sie aktiviert und sind so für den Komplettverschluss des Gefäßes, also den akuten Myokardinfarkt, verantwortlich. Da die Thrombozyten bereits vor einer durchgeführten Intervention aktiviert sind (120), erklärt sich auch das Auftreten von Komplikationen wie der akuten/subakuten und späten Stentthrombose nach Stentimplantation (11, 63, 72). In den Studien von Inoue et al (2000) ist die Aktivierung der Thrombozyten und auch der Leukozyten nach Stentimplantation sogar größer als nach einer Ballonangioplastie (73). Auch die Stentlänge hat einen Einfluss auf die Plättchenaktivierung. Beythien et al (1999) beobachteten in ihren Studien, dass bei längeren Stents mehr Thrombozyten aktiviert werden, als bei kürzeren Stents (11).

In dieser Studie fallen die Thrombozyten bei allen drei Schläuchen nach Durchlauf im Chandler Loop Modell im Vergleich zum Ausgangswert ab. Als statistisch relevant hat sich dabei allerdings nur der Unterschied bei den beiden implantierten Stents gezeigt. Die Thrombozyten werden durch das unphysiologische Material der verwendeten Schläuche und in noch stärkerem Maße durch die Oberfläche der Stents aktiviert und lagern sich daher vor allem auf den Stents ab. In den Bildern der Rasterelektronenmikroskopie sieht man sowohl beim unbeschichteten Stent als auch beim sirolimusbeschichteten Stent mehrere Thrombozytenaggregate auf einem Fibrinrasen (siehe Kapitel 3.4.2

und 3.4.3). Aus diesem Grund ist der Abfall der Thrombozyten beim Schlauch ohne implantierten Stent nicht so ausgeprägt wie bei den Schläuchen, in denen die Stents implantiert waren.

Tarnok et al (1999) beschreiben in ihren Ergebnissen, dass die Plättchenaktivierung und auch die Bildung von Leukozyten-Thrombozytenaggregaten hauptsächlich von der Stentoberfläche abhängt. So weisen die heparinbeschichteten Stents in ihren Studien eine deutlich geringere Plättchenaktivierung auf als vergleichbare unbeschichtete Stents der gleichen Länge und Struktur (134). Auch die elektronenmikroskopischen Bilder aus den Studien von Hietala et al (2004) zeigen, dass auf heparinbeschichteten Stents weniger Thrombozyten aufgelagert sind als auf unbeschichteten Stents (63).

In der vorliegenden Studie fand sich ein etwas geringerer Abfall der Thrombozyten beim SES im Vergleich zum BMS. Dieser Unterschied zwischen den Stents ist jedoch statistisch nicht signifikant, so dass keiner der beiden Stents bezüglich der Thromboyztenadhäsion einen eindeutigen Vorteil hat.

Aber nicht nur die Stents allein führen zu einem Abfall der Thrombozyten. Wie bereits erwähnt, muss auch das unphysiologische Material der verwendeten Schläuche einen Einfluss auf die Aktivierung der Thrombozyten haben, denn die Thrombozytenzahl ist beim Schlauch ohne implantierten Stent deutlich niedriger als beim Ausgangwert. In einer vergleichbaren Studie von Beythien et al (1999)war die Plättchenaktivierung ebenfalls in den Kontrollschlauchsystemen ohne Stents weniger ausgeprägt als in den Schläuchen, in denen Stents implantiert waren (11). Die Differenz zwischen Ausgangswert und Schlauch ohne Stent zeigt keinen Unterschied zur Irrtumswahrscheinlichkeit, so dass das Chandler Loop Modell insgesamt keinen signifikanten Einfluss auf die Thrombozytenaktivierung hat.

Die signifikant erniedrigten Thrombozytenzahlen bei den beiden Stents belegen jedoch die Thrombogenität der Stentoberfläche.

4.2 Verschiedene Blutparameter (ELISA)

4.2.1 PMN-Elastase

Die PMN-Elastase (polymorphnucleäre Elastase) ist eine lysosomale Serinprotease, die in Blut- und Gewebszellen vorkommt. Sie findet sich in besonders hoher Konzentration aber in den azurophilen Granula der polymorhkernigen, neutrophilen Leukozyten (PMN-Leukozyten) und Monozyten (14, 87, 104).

Die Elastase und andere lysosomale Enzyme sind im Stoffwechsel der Zellen physiologischerweise für die Aufrechterhaltung des Proteinkatabolismus, für Stoffwechselendprodukten und die den Abbau von für Zerstörung phagozytierter Fremdorganismen verantwortlich. Im Rahmen von Entzündungsreaktionen, zum Beispiel bei eindringenden Organismen oder bei Gewebsverletzungen, können diese Enzyme in hoher Konzentration in die Blutbahn freigesetzt werden. Im Blut wiederum sind die Enzyme an ihre natürlichen Antagonisten, die Proteinase-Inhibitoren, gekoppelt. Bei der PMN-Elastase findet zu 90% eine Kopplung an den a1-Proteinase-Inhibitor und zu 10% eine Bindung an α 2-Makroglobulin statt.

Da die PMN-Elastase von allen lysosomalen Enzymen die beste enzymatische Aktivität besitzt, eignet sie sich besonders gut zur Verlaufsbeobachtung bei entzündlichen Prozessen. Vor allem bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen wie der Colitis ulcerosa und dem Morbus Crohn wird sie häufig im weiteren Krankheitsverlauf bestimmt. Auch bei Sport- und Polytraumata, Schock, Hämolyse, Sepsis, zystischer Fibrose, Pleuraergüssen, Affektionen der männlichen Anhangsgebilde und bei chronischen Gelenkerkrankungen, beziehungsweise Unterscheidung zur zwischen entzündlichen und nichtentzündlichen oder entzündlichen und malignen Prozessen wird die PMN-Elastase herangezogen. (14, 104).

In den Studien von Kosar et al (1998) und Amaro et al (1995) zeigte sich, dass die PMN-Elastase an der Entstehung der Arteriosklerose beteiligt ist und dass es sogar einen Zusammenhang zwischen der Elastase-Konzentration und dem Vorhandensein einer KHK gibt. So hatten Patienten mit einer Koronarstenose

Elastase-Konzentrationen im Blut vergleichbare höhere als gesunde Probanden. Auch bei komplexen Plaques im Gefäß konnten höhere Konzentrationen an Elastase gemessen werden als bei Probanden mit einfachen Plagues. Daher definierten beide Studiengruppen die Konzentration an Elastase im Blut als einen Marker für das Auftreten einer KHK und erhöhte Werte als einen Parameter für die Wahrscheinlichkeit komplizierter Plagues (5. 80). Nach erfolgreicher Intervention mittels PTCA kommt es ebenfalls zu einer Aktivierung der neutrophilen Granulozyten mit Freisetzung von Elastase in die Blutbahn. In den Studien von Ikeda et al (1994) stiegen die Elastase-Konzentrationen bei Patienten, die eine PTCA erhielten, deutlich an (69). Bei den Patienten, bei denen lediglich eine Koronarangiographie durchgeführt wurde, zeigte sich dagegen keine Veränderung der Elastase-Konzentration (42, 69). Auch das Einbringen eines Stents ist mit einer frühen Aktivierung der PMN-Granulozyten assoziiert (42).

In der vorliegenden Studie steigen die Konzentrationen der PMN-Elastase vom Ausgangswert zu allen drei Schläuchen nach Durchlauf im Chandler Loop Modell statistisch signifikant an. Die Ursache für diesen Anstieg ist das Chandler Loop Modell selbst. Durch das unphysiologische Material der verwendeten Schläuche und die Oberfläche der Stents kommt es zu einer Reizung der PMN-Granulozyten (Leukozyten), die daraufhin vermehrt Elastase in das zirkulierende Blut ausschütten. Dies bestätigen auch die Ergebnisse der Leukozytenauswertung, wo es zu einem signifikanten Abfall der Leukozyten vom Ausgangswert zu allen drei Schläuchen nach Durchlauf im Chandler Loop Modell, bedingt durch die Bildung vom Zellaggregaten, kommt.

Die Schläuche zeigen untereinander im statistischen Vergleich keinen signifikanten Unterschied. Die Stents weisen im direkten Vergleich ähnliche hohe Elastase-Konzentrationen auf, so dass hier keiner der beiden Stents einen Vorteil bezüglich der Granulozytenaktivierung aufweist. Das bestätigen auch die Studien von Tepe et al (2006), in denen verschiedene Stents bezüglich Material und Oberfläche miteinander verglichen wurden. Alle Stents zeigten hier vergleichbare Werte an PMN-Elastase (135).

4.2.2 sP-Selectin

zelluläre P-Selectin, auch CD 62P ein Das genannt, ist Zelloberflächenglycoprotein mit einem Molekulargewicht von 140 kDalton. Es gehört zur Selectinfamilie der Adhäsionsmoleküle und spielt sowohl bei der Hämostase als auch bei Inflammationsprozessen eine wichtige Rolle. Es ist in der Membran von α-Granula in nicht-stimulierten Thrombozyten lokalisiert und wird bei deren Aktivierung auf die Zelloberfläche transformiert, wo es als Rezeptor für die Bindung von Leukozyten und Monozyten an die aktivierten Thrombozyten im Rahmen der Thrombusbildung dient.

Auch in den Weibel Palade Körperchen von Endothelzellen findet sich zelluläres P-Selectin, das die Adhäsion von verschiedenen Zellen an das aktivierte Endothel, vor allem bei akuten Entzündungsprozessen, unterstützt.

Nach der Stimulation wird das zelluläre P-Selectin physiologischerweise wieder zurückgebildet, in intrazellulären Kompartimenten recycled und anschließend erneut in die Membran der α-Granula beziehungsweise Weibel Palade Körperchen eingebaut.

Die ausschließlich im Serum vorkommende lösliche Variante des zellulären P-Selectins wird als sP-Selectin (soluble P-Selectin) bezeichnet und findet sich nur unter pathologischen Bedingungen. Das lösliche sP-Selectin ist ein proteolytisches Fragment des zellulären P-Selectins, das durch so genanntes lacking die Thrombozyten beziehungsweise Weibel Pallade Körperchen verlässt und dann im Serum oder Plasma nachweisbar ist. Vor allem beim ARDS, beim septischen Schock oder bei rheumatoiden Arthritiden finden sich veränderte Werte des sP-Selectins (10)

Auch bei Patienten mit Koronarer Herzkrankheit lassen sich erhöhte sP-Selectin Werte im Serum feststellen. Die Arbeitsgruppe von Mizia-Stec et al (2001) fand in ihren Studien heraus, dass Patienten mit stabiler Angina pectoris Symptomatik gleich hohe sP-Selectin Werte haben wie gesunde Vergleichspersonen (98). In den Ergebnissen von Guray et al (2004) zeigte sich, dass auch Patienten mit stabiler Angina pectoris höhere sP-Selectin Levels aufweisen als vergleichbare Kontrollen (55).

Die Patienten mit instabiler Angina pectoris hatten in beiden Studien allerdings

Diskussion

deutlich höhere sP-Selectin-Spiegel im Blut, bedingt durch die Aktivierung der Thrombozyten und Leukozyten durch die rupturierten Gefäßplaques (55, 98).

Yip et al (2006) wiesen in ihren Studien nach, dass das sP-Selectin nach einen akuten Myokardinfarkt zwar ansteigt (146), aber im Vergleich zu Patienten, die eine instabile Angina pectoris haben, nicht wesentlich erhöht ist (55). Auch nach erfolgreicher PTCA und Stentimplantation finden sich regelmäßig erhöhte sP-Selectin Werte (59, 105). In den Studien von Gutensohn et al (1997), in denen der Effekt von Tantalum Stents auf verschiedene Plättchenantigene untersucht wurde, stiegen die sP-Selectin Werte bei allen Stents deutlich an (59).

In der vorliegenden Studie finden sich bei allen drei Schläuchen nach Durchlauf im Chandler Loop Modell höhere Werte an sP-Selectin als beim Ausgangswert. Statistisch signifikant sind dabei die Ergebnisse der beiden implantierten Stents. Durch die Stents selbst kommt es zu einer verstärkten Aktivierung der Thrombozyten und damit zur Ausschüttung von sP-Selectin in das zirkulierende Blut der Schläuche. Diese Vermutung deckt sich mit den Ergebnissen der Thrombozytenauswertung, wo es ebenfalls einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen dem Ausgangswert und den beiden Stents gibt. Der Anstieg des sP-Selectin deutet hier auf eine Aktivierung der Thrombozyten hin und erklärt deren Abfall durch Organisation in den Plättchenaggregaten auf den Stents. Der stärkste Abfall in der Thrombozytenzahl, und damit die stärkste Aktivierung, konnte beim BMS nachgewiesen werden. Entsprechend findet sich beim BMS auch der höchste sP-Selectin Wert. Dennoch weist keiner der beiden Stents einen eindeutigen Vorteil bezüglich der Thrombozytenaktivierung und damit auch der sP-Selectin Freisetzung auf, da im direkten Vergleich kein Unterschied zur Irrtumswahrscheinlichkeit festgestellt werden konnte.

Das unphysiologische Material der verwendeten Schläuche hat auch hier wiederum einen Einfluss auf den untersuchten Parameter, denn auch beim Schlauch ohne implantierten Stent findet sich ein höherer sP-Selectin Wert als beim Ausgangswert. Dieses Ergebnis entspricht ebenfalls der Auswertung der Thrombozyten, wo ein Abfall in der Thrombozytenzahl beim Schlauch ohne implantierten Stent gefunden werden konnte. Dieser Unterschied ist aber nicht statistisch signifikant.

4.2.3 Betathromboglobulin (β-TG)

Das Betathromboglobulin (β -TG) ist ein spezifisches Thrombozytenprotein, das aus vier identischen Untereinheiten aufgebaut ist und ein Molekulargewicht von 36 kDalton hat. Es ist in den α -Granula der Thrombozyten lokalisiert (136) und wird bei der Aktivierung der Thrombozyten zusammen mit dem Plättchenfaktor 4 ausgeschüttet. Wechselwirkungen mit Subendothelstrukturen, atherosklerotischen Plagues, Immunkomplexen, artifiziellen Oberflächen, aber auch mit ADP (Adenosin-di-Phosphat), Kollagen und Thrombin sind dabei aktivierende Stimuli. Die wichtigste Funktion des β-TG ist die chemotaktische Rekrutierung und Aktivierung von Immunzellen im Rahmen von Entzündungsreaktionen. Einige molekulare Varianten des
ß-TG, die durch limitierte Proteolyse der aktivierten Thrombozyten entstehen, haben auch mikrobizide Wirkung gegen Bakterien und pathogene Pilze.

Die Halbwertszeit von β -TG im Plasma beträgt zirka 100 Minuten. Bei schwerer Niereninsuffizienz kann es zu einer verminderten β -TG-Clearance mit konsekutiv erhöhten β -TG-Plasmaspiegeln kommen. (7, 41)

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten beweisen, dass das β -TG bei Patienten mit Koronarer Herzkrankheit deutlicht verändert ist. Die ersten Studien aus den Achtziger Jahren von Mehta et al (1982) und auch von de Bör et al (1983) zeigten, dass KHK-Patienten signifikant höhere β -TG-Werte im Serum haben als vergleichbare gesunde Probanden und dass das β -TG ein Marker für die Aktivierung der Thrombozyten in vivo ist (30, 95). Mc Gill et al (1989) sowie Butkiewics et al (2003) differenzierten die KHK Patienten bezüglich der β -TG-Levels weiter nach Patienten mit stabiler oder instabiler Angina pectoris. Auch hier fanden sich in beiden Gruppen erhöhte β -TG-Werte verglichen mit den Kontrollpersonen (19, 94).

Nach einem akuten Myokardinfarkt beziehungsweise direkt vor einer PTCA haben die Patienten ebenfalls hohe β -TG-Spiegel im Blut (1, 21, 79). Diese bleiben nach erfolgreicher Intervention entweder unverändert hoch (1, 21) oder zeigen einen geringen Trend zum Abfall (79).

In der vorliegenden Studie steigen die β-TG-Werte nach Durchlauf im Chandler Loop Modell im Vergleich zum Ausgangswert bei allen drei Schläuchen signifikant an. Der höchste Anstieg konnte dabei beim BMS gemessen werden. Da es beim Schlauch ohne implantierten Stent zu einem signifikanten Anstieg gegenüber dem Ausgangswert kam, scheint hier das Chandler Loop Modell selbst einen Einfluss auf den untersuchten Parameter zu haben. Dennoch ist dieses Ergebnis nur relativ zu betrachten, weil beim Vergleich zwischen dem Schlauch ohne Stent und den beiden Schläuchen, in denen die Stents implantiert waren, kein signifikanter Unterschied zu finden ist. Das bedeutet, dass eine Aktivierung der Thrombozyten und damit eine Ausschüttung von β -TG nach 90 Minuten im Chandler Loop Modell bei allen drei Schläuchen statt gefunden hat, unabhängig von der Anwesenheit eines Stents. In einer vergleichbaren Studie von Tepe et al (2002), in der verschiedene Stents (136).

Trotzdem zeigen gerade die beiden untersuchten Stents eine deutliche Beeinflussung des β -TG-Levels. Besonders beim BMS werden die Thrombozyten aktiviert und extrahieren große Mengen an β -TG in das zirkulierende Blut des Schlauchs. Dieses Ergebnis lässt sich, wie beim sP-Selectin auch, mit den Ergebnissen der Thrombozytenauswertung vergleichen, wo die Thrombozyten durch den BMS am stärksten aktiviert werden und daher auch signifikant zum Ausgangswert abfallen.

Beim SES findet sich ebenfalls ein deutlicher β -TG-Anstieg, der aber nicht so ausgeprägt ist wie beim BMS oder dem Schlauch ohne Stent. Da im statistischen Vergleich ein signifikanter Unterschied zwischen dem SES und BMS gefunden werden konnte, könnte hier die Beschichtung mit Sirolimus ein Vorteil sein. In einer Genstudie von Nuhrenberg et al (2005) wurden Endothelzellen der Nierenarterie nach einer Angioplastie mit und ohne Sirolimus kultiviert. Einige Gene sind dabei direkt mit der Rekrutierung von Immunzellen durch Chemokine assoziiert. Es zeigte sich, dass Sirolimus eine Downregulierung dieser Gene und damit eine geringere Ausschüttung der Chemokine bewirken kann (102).

4.2.4 SC5b-9

Das Komplementsystem ist ein wichtiger Bestandteil des Körpers in der Abwehr von eingedrungenen Fremdorganismen, aber auch bei der Zerstörung körpereigener Zellen. Das Komplementsystem kann auf zwei Wegen aktiviert werden: Zum einen über den klassischen Weg, der durch Antigen-Antikörper-Komplexe vermittelt wird und zum anderen über den alternativen Reaktionsweg ohne Komponenten des Immunsystems. Hier wird die Kaskade durch Kontakt mit Lipopolysaccharidstrukturen, Proteinasen wie Plasmin und Trypsin oder aber durch viele anderen Faktoren in Gang gesetzt. Am Ende beider Aktivierungswege steht immer die Bildung des terminalen Komplementkomplexes (TCC) C5b-9, der durch Zusammenlagerung der Komplementfaktoren C5 bis C9, teilweise membrangebunden, entsteht. Ein Dimer aus C5b-9 ist der so genannte membran attack complex (MAC), der durch Kanäle in der Zellmembran die Permeabilitätsbarriere der angegriffenen Zelle aufhebt und so zur osmotischen Lyse der Zelle führt. Der membran attack komplex löst außerdem die Bildung und Freisetzung verschiedener Mediatoren wie Leukotriene, Prostaglandin E, Interleukin 1 und Thromboxan B2 beziehungsweise die Entstehung von Wasserstoffradikalen aus, die ihrerseits wiederum das zelluläre Immunsystem aktivieren. Bei Abwesenheit einer Targetmembran werden an den C5b-7-Komplex zwei bis drei Moleküle des Serumprotein S gebunden. Dieses ist ein a-Glycoprotein mit einem Dalton Molekulargewicht zirka 80.000 und kommt in von einer Plasmakonzentration von 150-250mg/l vor. Durch die Bindung an das Protein S entsteht der so genannte SC5b-9-Komplex (soluble C5b-9 Komplex), der die lösliche und nicht-lytische Form des terminalen Komplementkomplexes darstellt und im Serum nachgewiesen werden kann. (108, 112). Neben dem Protein S gibt es noch zahlreiche andere endogene Komplementinaktivatoren wie den C1-Esteraseinhibitor (C1-INH), den Faktor H und I oder das C4-bindende Protein (128).

Auch bei Patienten mit Koronarer Herzkrankheit kann man den SC5b-9 Komplex im Serum bestimmen. Yasuda et al (1990) konnten in ihren Studien zeigen, dass bei Patienten mit instabiler Angina pectoris eine milde Aktivierung des Komplementsystems stattfindet, bei Patienten mit stabiler Angina pectoris aber keine Reaktion zu beobachten ist (144). Hoffmeister et al (2002) dagegen konnten auch bei Patienten mit stabiler Angina pectoris eine Beteiligung des Komplementsystems nachweisen (65). Besonders nach einem akuten Myokardinfarkt steigt die Serumkonzentration von SC5b-9 stark an, so dass eine Myokardschädigung wahrscheinlich auch mit der Aktivierung des Komplementsystems assoziiert ist (144). Außerdem konnte die Arbeitsgruppe um Yasuda et al (1990) nachweisen, dass Patienten mit kongenitalem Herzfehler und zusätzlichem akutem Myokardinfarkt höhere SC5b-9 Werte haben als vergleichbare Patienten mit Myokardinfarkt ohne Herzfehler (144).

Auch eine PTCA scheint Einfluss auf das Komplementsystem zu haben. Kowalksi et al (1997) folgerten aus ihren Studienergebnissen, dass die durch PTCA ausgelöste Ischämie den alternativen Komplementweg aktiviert und darauf wiederum eine Reaktion der Neutrophilen zu erwarten ist (81).

In der vorliegenden Studie steigt die Konzentration von SC5b-9 im Probandenserum vom Ausgangswert zu den drei Schläuchen nach Durchlauf im Chandler Loop Modell signifikant an. Der Grund dafür ist, wie bei vielen anderen Parametern zuvor, das Chandler Loop Modell selbst. Durch die unphysiologische Oberfläche der verwendeten Schläuche und der Stents kommt es zu einer Aktivierung des Komplementsystems beziehungsweise letztendlich zur Inaktivierung der entstandenen Komplementfaktoren und Bildung des SC5b-9 Komplexes. Die drei untersuchten Schläuche dagegen zeigen im statistischen Vergleich keinen signifikanten Unterschied. Auch die direkte Gegenüberstellung von SES und BMS ergibt keinen Vorteil für einen der beiden Stents. Dennoch konnte beim SES ein höherer SC5b-9-Wert gemessen werden als beim BMS oder beim Schlauch ohne implantierten Stent. Die Ursache dafür könnte die Beschichtung des Stents mit Sirolimus sein, die eine stärkere Aktivierung des Komplementsystems auslöst. In der Literatur lassen sich diesbezüglich allerdings keine Aussagen finden, die diese Theorie bestätigen.

4.2.5 Thrombin-Antithrombin-III-Komplex (TAT)

Ein zentrales Ereignis in der Gerinnungskaskade ist die Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin durch die verschiedenen Gerinnungsfaktoren. Thrombin wiederum hat nicht nur Einfluss auf die Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin, sondern auch auf andere physiologische Substrate wie das Protein C oder die Thrombozyten. Durch Bindung an das in der Leber synthetisierte Antithrombin III (ATIII) wird Thrombin zügig neutralisiert und es bildet sich der inaktive Thrombin-Antithrombin-III-Komplex (TAT). Dieser ist ein Indikator für die Endprodukte des Gerinnungssystems und wird meist zur Abschätzung der Gerinnungsaktivierung, beispielsweise bei thrombembolischen Ereignissen, herangezogen und unterliegt keinem zirkadianen Rhythmus. Vor allem bei Patienten mit genetischer Thromboseneigung oder disseminierter intravasaler Gerinnung (DIC), aber auch bei einer Heparin- oder Lysetherapie sind die Werte des TAT-Komplexes im Plasma erhöht. Bei einigen malignen Erkrankungen finden sich unabhängig vom Tumorstadium ebenfalls hohe TAT-Konzentrationen. Eine ebenso große Rolle spielt der TAT-Komplex auch bei Patienten mit Polytrauma, Leberfunktionsstörung, Sepsis oder bei schwangeren Frauen mit Verdacht auf eine Präeklampsie. (38, 142)

Bei Patienten mit Koronarer Herzkrankheit finden sich in der Literatur keine eindeutigen Aussagen über die Konzentration des TAT-Komplexes. Die Studienergebnisse von Giannitsis et al (1999) zeigten, dass KHK -Patienten mit angiographisch nachgewiesener Stenose deutlich höhere TAT-Werte haben als vergleichbare Kontrollen (140), so dass der TAT-Komplex als ein Marker für hyperkoagulatorische Zustände mit Tendenz Entstehung zur von Koronarthrombosen zu werten ist (49). Andere Studien dagegen konnten beweisen, dass Patienten mit stabiler Angina pectoris keine veränderten TAT-Konzentrationen aufweisen und daher folglich entweder keine Aktivierung des Gerinnungsysystems stattfindet oder aber der TAT-Komplex als Marker der aktiven Gerinnung eine zu schwache Sensitivität besitzt, weil das neu gebildete Thrombin möglicherweise anderweitig im Körper gebunden oder verbraucht wird (142). Auch bei Patienten mit instabiler Angina pectoris oder frischem akuten Myokardinfarkt konnten die Arbeitsgruppen um Figueras et al (2000)

Diskussion

und Hoffmeister et al (1999) trotz eines prokoagulatorischen Zustandes keine erhöhten TAT-Konzentrationen nachweisen (39, 66). Biasucci et al (1996) fanden dagegen heraus, dass es bei einer ischämischen Periode durchaus zu einem Anstieg des TAT-Levels kommt, mit einem Maximum bei ungefähr fünf Minuten und einem Rückgang auf den Ausgangswert nach zirka 15 Minuten (13). Den neuesten Studien von Morange et al (2006) zufolge ist das Risiko, an einer kardiovaskulären Erkrankung zu versterben, zwar mit erhöhten TAT-Werten assoziiert, es besteht aber kein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von veränderten TAT-Konzentrationen und nicht tödlichen kardialen Ereignissen (99).

Auch bezüglich der Interventionsmöglichkeiten gibt es keine definitiven Aussagen über das Verhalten des TAT-Komplexes. Nach einer erfolgreichen PTCA finden sich erhöhte TAT-Konzentrationen (114), während es nach Einsetzen eines Stents wiederum verschiedene Ergebnisse gibt. Die Studien von Dittel et al (1995) ergaben, dass die TAT-Werte nach Stenting unverändert blieben, unabhängig davon, welches Antikoagulationsregime verwendet wurde (32). Christensen et al (2001) konnten dagegen in ihrer Stentstudie zeigen, dass es bei unmodifizierten Stents und Stents, die heparinbeschichtet sind, aber keine behandelte Membran aufweisen, zu deutlichen Anstiegen des TAT-Levels kommt (23). Auch bei Tepe et al (2002) waren die TAT-Werte bei allen getesteten Stents um ein vielfaches höher als bei der Kontrolle (136).

In der hier vorliegenden Studie steigen die Konzentrationen des TAT-Komplexes vom Ausgangswert zu allen drei Schläuchen nach Durchlauf im Chandler Loop Modell, bedingt durch das Modell selbst, signifikant an, wobei der höchste Wert beim BMS gemessen werden konnte. Trotz Heparinbeschichtung der Schläuche kommt es zu einer Aktivierung des Gerinnungssystems mit anschließender Inaktivierung durch ATIII und Bildung des TAT-Komplexes. Diese Vermutung bestätigt sich durch den Schlauch 1, in dem es trotz Abwesenheit eines Stents zu einem Anstieg des TAT-Komplexes gekommen ist. Da es zwischen dem Schlauch ohne Stent und den beiden Schläuchen, in denen die Stents implantiert waren, keinen Unterschied zur Irrtumswahrscheinlichkeit gibt, wird die Gerinnung vermutlich sowohl durch das

unphysiologische Material der Schläuche als auch durch die Oberfläche der Stents aktiviert. Obwohl es zwischen dem BMS und dem SES statistisch keinen Unterschied gibt, ist der TAT-Wert beim BMS fast doppelt so hoch wie beim SES. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Auswertung der Thrombozyten und Thrombozytenproteine sP-Selectin und β-TG als Gerinnungsmarker, wo es ebenfalls beim BMS zu einer stärkeren Aktivierung kam. Da beim SES die geringste Menge an TAT im Plasma gemessen werden konnte, scheint hier die Beschichtung mit Sirolimus einen Vorteil bezüglich der Gerinnung zu haben.

4.2.6 Factor XIIa

Der Faktor XII, auch Hageman Faktor genannt, ist neben Prekallikrein und dem high molecular weight kininogen (HMWK) eines der drei Plasmaproteine, das die Gerinnungskaskade durch die so genannte intrinsische Oberflächen- oder Kontaktaktivierung auslösen kann. Der Faktor XIIa stellt dabei die aktivierte Variante des Faktor XII dar und ist zum einen an der weiteren Aktivierung der verschiedenen Gerinnungsfaktoren bis zur Bildung von Fibrinthromben und zum anderen über das Kallirein-Kinin-System an der Fibrinolyse beteiligt. Alle drei genannten Plasmaproteine sind an der Oberfläche von Gefäßendothelzellen lokalisiert und haben somit Einfluss sowohl auf lokale und systemische Entzündungsgeschehen als auch auf die Gerinnung selbst. Besonders bei Schwangerschaft, Sepsis, SIRS, Entzündungen, Ödemen, endotoxischem Schock, Hypotension, Arthritis, akuten Lungenerkrankungen oder dem ARDS spielt die Kontaktaktivierung eine große Rolle. (8, 26, 142)

Ein positiver Zusammenhang besteht ebenfalls zwischen dem Faktor XIIa und der Koronaren Herzkrankheit. So haben Patienten mit einem hohen Risiko für eine KHK, gemessen an den Risikoparametern Cholesterin, Trigylceride, Blutdruck, BMI, Tabakrauch sowie Alkoholkonsum, häufig erhöhte Werte an aktiviertem Faktor XII im Plasma (25, 97, 147). Auch Patienten mit bereits vorhandener KHK, die unter stabiler beziehungsweise instabiler Angina pectoris oder sogar einem akuten Myokardinfarkt leiden, haben höhere Faktor XIIa-Konzentrationen als vergleichbare Kontrollen, während die Werte zwischen den einzelnen KHK-Varianten aber wiederum vergleichbar sind (4, 26). Grundt et al

Diskussion

(2004) fanden sogar heraus, dass Patienten nach akutem Myokardinfakt häufiger ein Re-ACS bekommen, wenn der Faktor XIIa weiterhin auf einem hohen Niveau bleibt, so dass man den Faktor XIIa als Vorhersagemarker für koronare Ereignisse nach akutem Myokardinfakt verwenden könnte (54).

Nach Dilatation einer Koronararterie mittels PTCA (16) oder Stenting wird das Gerinnungssystem ebenfalls aktiviert. Vor allem die Stents stellen dabei eine sehr thrombogene Oberfläche dar (133). Dennoch finden sich in der Literatur keine genauen Angaben über den Faktor XIIa nach einer koronaren Intervention.

In der hier vorgelegten Stentstudie steigen die Konzentrationen an aktiviertem Faktor XII vom Ausgangswert zu den drei Schläuchen nach Durchlauf im Chandler Loop Modell nur geringfügig an. Ein signifikanter Unterschied konnte lediglich zwischen dem Ausgangswert und dem Schlauch ohne implantierten Stent gefunden werden. Sowohl zwischen dem Ausgangwert und den beiden Schläuchen, in denen die Stents implantiert waren, als auch zwischen den drei untersuchten Schläuchen untereinander, besteht kein Unterschied zur Irrtumswahrscheinlichkeit. Trotzdem löst das Chandler Loop Modell durch die unphysiologische und damit thrombogene Oberfläche der verwendeten Silikonschläuche und Stents eine Kontaktaktivierung aus, wobei es durch die Stents zu keiner stärkeren Aktivierung kommt. In den Studien von Arvidsson et al (2007) zeigte sich, dass neben Titanium vor allem Silikon das Gerinnungsund auch das Komplementsystem beeinflussen kann (6). Auch die Stents führen. wie bereits erwähnt, zu einer deutlichen Aktivierung der Gerinnungskaskade (133), wobei wir in der vorliegenden Studie keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Faktor XIIa Konzentration und damit der Komplementaktivierung zwischen dem BMS und dem SES finden konnten.

4.3 Durchflusszytometrie der Thrombozyten (FACS-Analyse)

4.3.1 Negativkontrolle

Wie in Kapitel 3.3.1 bereits beschrieben, dient die Negativkontrolle (native Zellen) als Qualitätsnachweis der eigenen Labormethoden. Mit ihr soll überprüft

werden, ob die Zellen bereits bei der Blutentnahme oder bei der weiteren Aufbereitung vorzeitig aktiviert worden sind und somit die eigentlichen Proben keine Aussagekraft mehr besitzen. Trotz standardisierter Venenpunktions- und Laborprotokolle werden dennoch immer einige wenige Zellen aktiviert und vom FACS-Gerät registriert.

In der hier vorgelegten Studie findet sich sowohl beim Ausgangswert als auch bei den drei Schläuchen nach Durchlauf im Chandler Loop Modell eine Aktivierung der nicht präparierten Zellen deutlich unter 1%. Ein Unterschied zwischen den Schläuchen konnte nicht gefunden werden.

4.3.2 CD 45/CD 41

Der Antikörper CD 45 ist ein in der Wissenschaft und Forschung, aber auch in der klinischen Praxis (117) häufig eingesetzter Antikörper. Mit ihm kann man die verschieden schweren Isoformen des so genannten leucocyte common antigen (LCA) auf allen humanen Leukozyten, Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten, Eosinophilen und Thymozyten identifizieren. Auf zirkulierenden Erythrozyten und Thrombozyten sowie auf erythropoetischen Stammzellen des Knochenmarks ist das LCA allerdings nicht nachweisbar.

CD 41 wiederum ist sowohl ein Antikörper als auch ein Antigen. Das 135 kDalton schwere Antigen CD 41 (cluster of differentiation 41) ist eine integrin α IIb-Kette (gpIIb), die zusammen mit der nicht kovalent gebundenen integrin β 3-Kette (gpIIIa) den so genannten gpIIbIIIa Glycoproteinrezeptorkomplexes bildet, der auf allen Thrombozyten nahe dem Fibrinogenrezeptor zu finden ist und so die Quervernetzung der Thrombozyten und damit die eigentliche Gerinnung auslöst. Der gpIIb/IIIa Komplex (gp für Glycoprotein) gehört zur Familie der Cytoadhäsine, die auch Integrin genannt wird (83).

Der Antikörper CD 41 (clusterdesignation 41) reagiert unabhängig von der Anwesenheit des gpIIIa ausschließlich mit der α-Kette des gpIIb-Anteils und daher nur mit normalen, nicht aktivierten Thrombozyten und Megakaryozyten. Die Bindung des Antikörpers hat keinen Einfluss auf die Plättchenfunktion. Weder die Fibrinbindung an die Thrombozyten noch die Aggregation derselben wird durch den Antikörper inhibiert.

Diskussion

Mit der Antikörperkombination CD 45/CD 41 kann man den Anteil der Leukozyten-Thrombozyten-Aggregate im Plasma erfassen.

Patienten mit Koronarer Herzkrankheit weisen dabei mehr Leukozyten-Thrombozyten-Aggregate auf als gesunde Kontrollpersonen. Bei stabiler Angina pectoris finden sich zirka 16% mehr Aggregate im Blutkreislauf, während es bei Patienten mit instabiler Angina pectoris sogar ungefähr 22% sind (106). Nach einem akuten Myokardinfarkt ist die Interaktion zwischen Leukozyten und Thrombozyten ebenfalls deutlich erhöht (17, 28). Jaster et al (2003) konnten in ihren Studien nachweisen, dass sich die Zahl der Leukozyten-Thrombozyten-Aggregate nach koronarer Intervention mittels PTCA im Vergleich zum Ausgangsstatus nicht verändert (74). Außerdem konnte die Arbeitsgruppe in einer Stentstudie zeigen, dass nach 24 Stunden weniger Aggregate gebildet werden, wenn heparinbeschichtete Stents zum Einsatz kommen (74). In den Stentstudien von Gutensohn et al (1997) und Beythien et al (1999), in denen verschiedene Beschichtungen getestet und miteinander verglichen wurden, gab es keinen signifikanten Änderungen bezüglich des Antikörpers CD 41 (11, 59). Bei den untersuchten Stents von Tarnok et al (1999) dagegen kam es zu einer deutlichen Leukozytenaktivierung mit Anstieg von CD 45 (134). Eine Kombination der Antikörper CD 45 und CD 41 verwendeten beide Arbeitsgruppen allerdings nicht. Außerdem wurde bei diesen Studien kein Test mit einer Sirolimus- oder Paclitaxelbeschichtung untersucht.

In der hier durchgeführten Stentstudie fielen die Leukozyten-Thrombozyten-Aggregate von 77,1% beim Ausgangswert zu den drei Schläuchen nach Durchlauf im Chandler Loop Modell um maximal 1% ab. Der geringste Abfall konnte bei den beiden implantierten Stents gezeigt werden. Da alle vier Ergebnisse aber insgesamt miteinander vergleichbar sind, konnte statistisch kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Insbesondere zwischen den beiden Stents fand sich kein Unterschied hinsichtlich der Bildung von Leukozyten-Thrombozyten-Aggregaten.

4.3.3 PAC 1

Der Glycoproteinrezeptorkomplex gpllblla befindet sich auf der Oberfläche inaktiver, zirkulierender Thrombozyten nahe dem Fibrinogenrezeptor. Bei der Aktivierung der Thrombozyten kommt es zu einer calciumabhängigen Konformationsänderung des gpllbllla mit Bildung einer weiteren Ligandenbindungsstelle. Hier können sich neben Fibrinogen auch die Makromoleküle Fibronectin, Vitronectin oder der von Willebrand Factor anlagern. Der Antikörper PAC 1 kann ein Epitop des gpllbllla-Rezeptors erkennen. Die Bindung erfolgt ausschließlich an bereits aktivierte Thrombozyten und verhindert damit auch die durch Fibrinogen ausgelöste Aggregation (48). Aus diesem Grund kann man mit dem Antikörper PAC 1 in der klinischen Forschung eindeutige Aussagen über die Zahl von aktivierten Thrombozyten machen. So konnten Singh et al (1995) beispielsweise zeigen, dass es zwischen KHK-Patienten mit instabiler Angina pectoris und vergleichbaren gesunden Probanden keinen Unterschied bezüglich der PAC 1 Werte gibt (127). Matsumoto et al (2002) wiesen dagegen nach, dass Patienten nach akutem Myokardinfarkt mit zirka 14% deutlich mehr PAC 1-tragende Thrombozyten haben als Patienten mit stabiler Angina pectoris, wo lediglich nur 9,3% aktivierte Thrombozyten im Blutkreislauf waren (92). Auch KHK-Patienten mit Restenose weisen im Vergleich zu restenosefreien Patienten eine gesteigerte Aktivierung und damit höhere PAC 1-Konzentrationen auf (90). Scharf et al (1992) beobachteten in ihren Studien, dass es während und 30 Minuten nach einer PTCA zu einem massiven Anstieg von PAC 1 kommt und folgerten daraus, dass die Thrombozyten vermutlich erst dann aktiviert werden, wenn sie durch die verletzte Koronararterie fließen (116). In einer Stentstudie von Gurbel et al (2003) wurden beim heparinbeschichteten Stent weniger gpIIbIIIa-Rezeptoren lokalisiert als bei einem nichtbeschichteten Stent (56).

In der hier vorgelegten Studie steigen die PAC 1-Konzentrationen und damit der prozentuale Anteil der aktivierten Thrombozyten vom Ausgangswert zu den drei Schläuchen nach Durchlauf im Chandler Loop Modell deutlich an, ohne dass jedoch ein signifikanter Unterschied gefunden werden konnte. Auch beim Vergleich der drei Schläuche untereinander konnte kein Unterschied zur Irrtumswahrscheinlichkeit festgestellt werden. Dennoch wurden mit nahezu 36% beim BMS die meisten Thrombozyten aktiviert. Dieses Ergebnis lässt sich sowohl mit den Thrombozyten selber, als auch mit den Thrombozytenmarkern β -TG und sP-Selectin vergleichen, bei denen es ebenfalls beim BMS zur stärksten Aktivierung kam. Aber auch beim Schlauch ohne implantierten Stent finden sich ungefähr 34 % PAC 1-tragende Thrombozyten. Trotz der Heparinbeschichtung der Schläuche werden die Thrombozyten durch das unphysiologische und fremde Material aktiviert. Die wenigsten Thrombozyten wurden beim SES aktiviert, so dass die Beschichtung mit Sirolimus, unabhängig von der Anwesenheit des thrombogenen Schlauches, bezüglich der Thrombozytenaktivierung von Vorteil sein kann. Ein Vergleich lässt sich auch hier mit den Thrombozyten und den β -TG- beziehungsweise sP-Selectin-Werten ziehen, da die geringste Aktivierung dort jeweils beim SES nachgewiesen werden konnte.

4.3.4 PAC 1 mit ADP

Die Probe PAC 1 mit ADP (Adenosin-di-Phosphat) stellt eine Positivkontrolle für die korrekte Funktion des Antikörpers PAC 1 dar und wird in der Regel in standardisierten Protokollen empfohlen. Das hinzugefügte ADP löst eine Aktivierung der Thrombozyten aus (137), so dass der Antikörper PAC 1 an den gpllbIlla-Rezeptorkomplex binden kann.

In dieser Stentstudie fallen die durch ADP aktivierten Thrombozyten von zirka 96% beim Ausgangswert zu den drei Schläuchen nach Durchlauf im Chandler Loop Modell um maximal 1% ab. Da die Messergebnisse alle ähnlich und damit miteinander vergleichbar sind, konnte bei der statistischen Auswertung kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

4.3.5 CD 62P (CLB-Thromb/6)

P-Selectin beziehungsweise CD 62P, GMP-140 oder PADGEM protein (platelet activation antigen P-Selectin), ist ein 140 kDalton schweres Gylcoprotein mit einer komplexen biochemischen Struktur. Es besitzt ein lectinähnliches Aminoende, einen EGF-Bereich sowie mehrere andere wichtige Domänen und Ligandenbindungsstellen. Neben P-Selectin sind noch die Varianten E-Selectin und L-Selectin bekannt. Das P-Selectin ist in der Membran der α -Granula von inaktiven, zirkulierenden Thrombozyten und Megakaryozyten, aber auch in Endothelzellen von Weibel Palade Körperchen, eingebaut und wird bei Aktivierung auf deren Zelloberfläche transformiert, wo es als Rezeptor für die Bindung von Leukozyten und Monozyten an die aktivierten Zellen im Rahmen der Hämostase oder bei Inflammationsprozessen eine wichtige Rolle spielt. Nach der Stimulation wird P-Selectin wieder recycled und erneut in die Membran der α -Granula der entsprechenden Zellen eingebaut.

Der Antikörper CD 62P kann die Region zwischen Lectin und der EGF-Domäne erkennen und bindet daher ausschließlich an bereits aktivierte Thrombozyten, Megakaryozyten oder Weibel Pallade Körperchen. (47)

Besonders bei Patienten mit Koronarer Herzkrankheit kann man mittels Durchflusszytometrie Antikörper CD 62P-beladene Thrombozyten nachweisen. In den Untersuchungen von Patel et al (2004) hatten Patienten mit stabiler Angina pectoris 49% CD 62P-positive Thrombozyten im entnommenen Blut, während es bei Probanden mit instabiler Angina pectoris sogar 94% waren (106). Auch nach einem akuten Myokardinfarkt finden sich deutlich höhere CD 62P-Expressionen, verglichen mit gesunden Kontrollen oder Risikopatienten (118, 145). Inoue et al (1996 und 2000) konnten in ihren Studien zeigen, dass es durch PTCA oder Stenting ebenfalls zu einem Anstieg der CD 62P-Werte kommt, wobei besonders das Einbringen eines Stents eine stärke Aktivierung der Thrombozyten auslöst als die Dilatation der Koronararterie bei PTCA (70, 73).

In dieser Stentstudie ergab sich hinsichtlich der aktivierten und CD 62Ptragenden Thrombozyten kein signifikanter Unterschied zu den drei Schläuchen nach Durchlauf im Chandler Loop Modell. Insbesondere zwischen den beiden Stents konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der CD 62P-Expression auf den Thrombozyten gefunden werden.

In den Stentstudien von Gutensohn et al (1997) und Beythien et al (1999), in denen das Blut nach Kontakt mit heparinbeschichteten Stents und Tantalum Stents mittels Durchflusszytometrie untersucht wurde, zeigten sich dagegen schon kurz nach Beginn der Zirkulation mehr CD 62P positive Thrombozyten bei beiden Stents als bei der Kontrolle (11, 59).

Auch beim Vergleich mit der löslichen Variante des P-Selectin (sP-Selectin) zeigt sich hier keine Übereinstimmung der Ergebnisse, da beim sP-Selectin nicht nur eine Signifikanz sowohl zwischen dem Ausgangswert und den beiden implantierten Stents als auch zwischen dem Schlauch ohne Stent und dem BMS festgestellt werden konnte, sondern auch ein deutlicher Anstieg der Werte, verglichen mit dem Ausgangswert, stattgefunden hat.

4.4 Rasterelektronenmikroskopie der Stents

Nach Durchlauf im Chandler Loop Modell wurden jeweils ein unbeschichteter (BMS) und ein beschichteter Stent (SES) für die Rasterelektronenmikroskopie präpariert, um die eventuell vorhandenen Unterschiede zwischen den beiden Stents sichtbar machen zu können. Um einen besseren Vergleich zu haben, wurden zusätzlich ein BMS und ein SES ohne Blutkontakt als so genannte Negativkontrolle untersucht. Die Bilder der Rasterelektronenmikroskopie sind im Kapitel 3.4 sowie im Anhang 7.3 zu finden.

4.4.1 Unbeschichteter (BMS) und beschichteter Stent (SES) nach Durchlauf im Chandler Loop Modell

In dieser Studie löste der BMS nach Durchlauf im Chandler Loop Modell insgesamt eine stärkere, wenngleich statistisch nicht signifikant erhöhte Aktivierung der gemessenen Parameter aus, als der SES oder der Schlauch ohne implantierten Stent. Besonders bei den Thrombozytenparametern war dieser Effekt tendenziell zu beobachten. In den rasterelektronenmikroskopischen Bildern der hier vorliegenden Studie kann man bei beiden Stents nach Blutkontakt eine dicke Fibrinschicht mit aufgelagerten Zellaggregaten erkennen. Vor allem an den Querstreben ist der Fibrinrasen dicker als an den übrigen Strukturen. Neben vereinzelten Erythrozyten und Leukozyten finden sich hautsächlich Thrombozytenaggregate, die sich untereinander, aber auch im Fibrinuntergrund mit ihren Podozyten verankern. Ähnliche Ergebnisse konnten auch Beythien et al (1994) und

Diskussion

Fontaine et al (1996) aufweisen. In den mikroskopischen Bildern der von ihnen untersuchten unbeschichteten Stents zeigte sich, dass eine extreme Thrombozytenakkumulation besonders den Kreuzungsstellen an der Stentstreben stattgefunden hat und dass das Lumen meist durch Fibrin-Thrombozyten-Aggregate verengt war (12, 40). Bei den mit Polyetherurethanel und Parylene beschichteten Stents dagegen konnten Fontaine et al (1996) nur wenige aufgelagerte Thrombozyten nachweisen (40). Auch Hietala et al (2004) bestätigten durch ihre Studien, dass auf heparinbeschichteten Stents weniger Thrombozyten zu finden sind als auf unbeschichteten Stents (63). In der vorliegenden Studie lassen sich in der Übersichtsaufnahme der Querstrebe des SES nach Blutkontakt nur wenige Zellen auf einem dünnen Fibrinbelag vermuten, der allerdings nicht von der eigentlichen Beschichtung mit Sirolimus zu unterscheiden ist. Auch in den vergrößerten Aufnahmen finden sich weniger Thrombozytenaggregate als beim BMS. Dieses Ergebnis deckt sich ebenfalls wiederum mit den Auswertungen der Thrombozytenparameter, wo der SES in der Regel die geringste Aktivierung auslöste.

5. Zusammenfassung

Die Koronare Herzkrankheit (KHK) gehört weltweit zu den häufigsten Todesursachen. Neben der medikamentösen Therapie stehen vor allem die Dilatation der betroffenen Koronargefäße mittels perkutaner transluminaler Koronarangioplastie (PTCA) und das Einsetzen von Koronarendoprothesen, den so genannten Stents, im Vordergrund. Allein in Deutschland werden jährlich über 150.000 Koronarinterventionen vorgenommen, wobei in zirka 80% der Fälle ein oder mehrere Stents implantiert werden. Die Erfolgsaussichten werden aber leider häufig durch das Auftreten von akuten/subakuten und späten Stentthrombosen oder Restenosen gemindert. Daher gibt es seit einigen Jahren medikamentös beschichtete Stents auf dem Markt, die gerade diese postinterventionellen Komplikationen noch weiter reduzieren sollen. In den ersten klinischen Studien erzielten die drug-eluting Stents (DES) bisher gute Ergebnisse. Aber gerade nach DES-Implantation spielt die akute/subakute oder späte Stentthrombose eine große Rolle. Die Diskussion bezüglich einer höheren Thrombogenität der DES ist in vollem Gange.

In der vorliegenden Studie wurde die Thrombogenität von DES im Vergleich zu unbeschichteten Stents (BMS) experimentell untersucht. Dazu wurden neun unbeschichtete (BMS) und neun mit dem Immunsuppressivum Sirolimus (Rapamycin) beschichtete Stents (SES) in Silikonschläuche implantiert und mit dem Blut von gesunden, jungen männlichen Probanden in einem modifizierten Chandler Loop Modell in Kontakt gebracht, das über 90 Minuten den menschlichen Kreislauf simulieren sollte. Silikonschläuche ohne Stents dienten gleichzeitig als Kontrolle. Für die Leukozyten, die PMN-Elastase, den Komplementsystemkomplex SC5b-9 und den Gerinnungsparameter Thrombin-Antithrombin-III-Komplex (TAT) konnte dabei ein Einfluss durch das gesamte Chandler Loop Modell, das heißt sowohl durch die Schläuche als auch durch die Stents, nachgewiesen werden. Der Gerinnungsfaktor XIIa und die Erythrozyten blieben allerdings unverändert.

Die Thrombozyten beziehungsweise die Thrombozytenproteine sP-Selectin und β -Thromboglobulin (β -TG) wurden dagegen hauptsächlich durch die jeweils verwendeten Stents beeinflusst. Vor allem der unbeschichtete Stent wies einen

Trend zu einer stärkeren Aktivierung auf als der mit Sirolimus beschichtete Stent. Dennoch konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Stents lediglich beim Thrombozytenmarker β -Thromboglobulin (β -TG) gefunden werden.

Auch in den Bildern der Rasterelektronenmikroskopie nach Blutkontakt, die zur Visualisierung der Ergebnisse gemacht wurden, finden sich mehr Thrombozytenaggregate und eine dickere Fibrinschicht auf dem unbeschichteten Stent, was die Ergebnisse der molekularen Marker stützt.

In einem weiteren Studienteil, in dem die Thrombozyten mittels Durchflusszytometrie vor und nach Durchlauf im Chandler Loop Modell untersucht wurden, konnte ebenfalls kein relevanter Unterschied festgestellt werden.

Aus den Ergebnissen der hier vorliegenden Studie lässt sich in vitro kein eindeutiger Unterschied hinsichtlich der Thrombogenität zwischen dem unbeschichteten Stent (BMS) und dem sirolimusbeschichteten Stent (SES) nachweisen.

Literaturverzeichnis

- Abe S., Marayuma I., Arima S., Yamaquchi H., Okino H., Hamasaki S., Nomoto K., Atsuchi Y., Tahara M., Tanaka H. (1990) Platelet activation during thrombolysis and percutaneous transluminal coronary angioplasty in the acute phase of myocardial infarction. J Cardiol 1990;20(4):849-59
- Aggarwald A., Blum A., Schneider DJ., Sobel BE., Dauerman HL. (2004) Soluble CD 40 ligand is an early initiator of inflammation after coronary intervention. Coron Artery Dis. 2004 Dec;15(8):471-5
- Aggarwald A., Schneider DJ., Terrien EF., Gilbert KE., Dauerman HL. (2003)
 Increase in interleukin-6 in the first hour after coronary stenting: an early marker of the inflammatory response.
 J Thromb Thrombolysis 2003 Feb;15(1):25-31

4. Altieri P, Devoto E., Spallarossa P., Rossettin P., Garibaldi S., Bertero G., Balbi M., Barsotti A., Brunelli C., Ghiqliotti G. (2005) Acute coronary syndromes do not promote prolonged in vivo FXII dependent prothrombotic activity. Thromb Res. 2005;115(1-2):65-72

- Amaro A., Gude F., Gonzalez -Juanatey R., Iglesias C., Fernandez-Vazquez F., Garcia-Acuna J., Gil M. (1995)
 Plasma leukocyte elastase concentration in angiographically diagnoses coronary artery disease.
 <u>Eur Heart J.</u> 1995 May;16(5):615-22
- 6. Arvidsson S., Askendal A., Tenqvall P. (2007) Blood plasma contact activation on silicon, titanium and aluminium. <u>Biomaterials.</u> 2007 Mar;28(7):1346-54 Epub 2006 Dec 6
- Asserachrom β -TG Roche (Stand Februar 2004) Gebrauchsanweisung Enzymimmunoassay zur quantitativen in vitro Bestimmung von β-TG. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany
- 8. Axis Shield Activated Factor XII ELISA Kit (Stand 03/2004) Gebrauchsanweisung Activated Factor XIIa. Axis Shield Diagnostics Limited, Dundee, Scotland (UK)

- Babinska A., Markell MS., Salifu MO., Akoad M., Ehrlich YH., Kornecki E. (1998)
 Enhancement of human platelet aggregation and secretion induced by rapamycin.
 Nephrol Dial Transplant 1998;13(12):3153-3159
- 10. Bender MedSystems (Stand 28.04.2006) Product information and manual. Human sP-Selectin, Instant ELISA www.bendermedsystems.com
- Beythien C., Gutensohn K., Bau J., Hamm CW., Kuhnl P., Meinertz T., Terres W. (1999) Influence of stent length and heparin coating on platelet activation: a flow cytometric analysis in a pulsed floating model. Thromb Res. 1999 Apr 15;94(2):79-86
- 12. **Beythien C., Terres W., Hamm CW. (1994)** In vitro model to test the thrombogenicitiy of coronary stents. <u>Thromb Res</u>. 1994 Sep 15;75(6):581-90
- Biasucci LM., Liuzzo G., Caliqiuri G. Quaranta G., Andreotti F., Sperti G., van de Greef W., Rebuzzi AG., Kluft C., Maseri A. (1996) Temporal relation between ischemic episodes and avtivation of the coagulation system in unstable angina. <u>Circulation</u>. 1996 Jun 15;93(12):2121-7
- 14. **BioVendor (Stand 18.07.2006)** Human PMN -Elastase ELISA. BioVendor Laboratory Medicine, Inc., www.biovendor.com
- Blancke F., Claeys MJ., Jorens P., Vermeiren G., Bosmans J., Wuyts FL., Vrints CJ. (2005) Systemic inflammation and reperfusion injury in patients with acute myocardial infarction. <u>Mediators Inflamm</u>. 2005 Dec 14;2005(6):385-9
- Borries M., Heins M., Fischer Y., Stiegler H., Peters A., Reinauer H., Schöbel FC., Strauer BE., Leschke M. (1999)
 Changes of hemostasis, endogenous fibrinolysis, platelet activation and endothelins after percutaneous transluminal coronary angioplasty in patients with stable angina. J Am Coll Cardiol. 1999 Aug;34(2):486-93

- 17. Botto N., Sbrana S., Trianni G., Andreassi MG., Ravani M., Rizza A., Al-Jabri A., Palmieri C., Berti S. (2006) An increased platelet-leucocyte interaction at the culprit site of coronary artery occlusion in acute myocardial infarction: A pathogenic role for "noreflow" phenomenon? Int J Cardiol. 2006 Aug 2 [Epub ahead of print]
- 18. **Buhaescu I., Izzedine H., Covic A. (2006)** Sirolimus--challenging current perspectives. <u>Ther Drug Monit</u> 2006;28(5):577-584
- Butkiewicz AM., Kemona H., Dymicka -Piekarska V., Bychowski J. (2003)
 Beta-thromboglobulin and platelets in unstable angina. Kardio Pol 2003 Jun;58(6):449-55
- Camenzind E., Steg PG., Wijns W. (2007) Stent thrombosis late after implantation of first-generation drug-eluting stents: a cause for concern. <u>Circulation</u> 2007;115(11):1440-1455
- 21. Caplice NM., Aroney CN., Bett JH., Cameron J., Campell JH., Hoffmann N., Mc Eniery PT., West MJ. (1997) Groth factors released into the coronary circulation after vascular injury promote proliferation of human vascular smooth cells in culture. J Am Coll Cardiol. 1997 Jun;29(7):1536-41
- 22. Choudhury RP., Lee JM., Greaves DR. (2005) Mechanism of disease: macrophage-derives foam cell emerging as therapeutic targets in atherosclerosis. <u>Nat Clin Pract Cardiovasc Med</u>. 2005 Jun;2(6):309-15
- Christensen K., Larsson R., Emanuelsson H., Elque G., Larsson A. (2001)
 Coagulation and complement activation. <u>Biomaterials</u>. 2001 Feb;22(4):349-55
- 24. **Citrome L. (2005)** Metabolic syndrome and cardiovascular disease. <u>J Psychopharmacol</u>. 2005 Nov;19(6Suppl):84-93
- Cooper JA., Miller GJ., Bauer KA., Morrissey JH., Meade TW., Howarth DJ., Barzegar S., Mitchell JP., Rosenberg RD. (2000) Comparison of novel hemostatic factors and conventional risk for prediction of coronary heart disease. <u>Circulation</u>. 2000 Dec 5;102(23):2816-22

- Coppola R., Cristilli P., Cugno M., Ariens RA., Mari D., Mannucci PM. (1996)
 Measurement of activated factor XII in health and disease. Blood Coagul Fibrinolysis. 1996 Jul;7(5):530-5
- 27. **Cullen P., von Eckardstein A., Assmann G. (1998)** Diagnosis and management of new cardiovascular risk factors. <u>Eur Heart J</u>. 1998; 19 Suppl O:O13-9
- Czyz A., Kolacz E., Angerer D., Zawilska K. (2005) Expression of activation antigens on lymphocyte surface and circulating platelet-leucocyte aggregates in ischaemic heart disease. <u>Kardiol Pol</u>. 2005 Mar;62(3):189-200; discussion 201
- 29. **Davis C., Fischer J., Ley K., Sarembock IJ. (2003)** The role of inflammation in vascular injury and repair. <u>J Thromb Heamost</u>. 2003 Aug;1(8):1699-709.
- 30. **De Bör AC., Han P., Turpie AG., Butt R., Gent M., Genton E. (1983)** Platelet tests and antiplatelet drugs in coronary artery disease. <u>Circulation</u> 1983 Mar;67(3):500-4
- 31. Dibra A., Mehilli J., Braun S., Hadamitzky M., Baum H., Dirschinger J., Schuhlen H., Schomig A., Kastrati A. (2005) Inflammatory response after intervention assessed by serial C-reactive protein measurements correlates with restenosis in patients treated with coronary stenting. <u>Am Heart J</u>. 2005 Aug;150(2):344-50
- 32. Dittel M., Haushofer A., Spiel R., Halbmayer WM., Prachar H., Fischer M., Miczoch J. (1995)
 Changes in antithrombin III, prothrombin fragment 1+2 and thrombin antithrombin III-complex following implantation of a coronary Palmaz -Schatz stent.
 <u>Z Kardiol</u>. 1995 Jan;84(1):22-9
- 33. **Dörner K. (2003)** Klinische Chemie und Hämatologie, 5. Auflage, Thieme Verlag
- 34. Dorner T., Riedler A. (2005)
 Epidemiologie der koronaren Herzkrankheit und Bedeutung für die Prävention.
 J Kardiol 2005; 12 (Suppl B)

35. Dorros G., Cowley MJ., Simpson J., Bentivoglio LG., Block PC., Bourassa M., Detre K., Gosselin AJ., Gruntzig AR. Kelsey SF., Kent KM., Mock MB., Mullin SM., Myler RK., Passamani ER., Stertzer SH., Williams DO. (1983)

Percutaneous transluminal coronary angioplasty: report of complications from the National Heart, Lung and Blood Institute PTCA Registry <u>Circulation</u>. 1983 Apr;67(4):723-30

36. Dunder K., Lind L., Lagerqvist B., Zethelius B. Vessby B., Lithell H. (2004)

Cardiovascular risk factors for stable angina pectoris versus unheralded myocardial infarction.

Am Heart J. 2004 Mar; 147(3):502-8

37. Ellis SG., Colombo A., Grube E., Popma J., Koglin J., Dawkins KD., Stone GW. (2007)

Incidence, timing, and correlates of stent thrombosis with the polymeric placlitaxel drug-eluting stent: A TAXUS II, IV, V and VI meta-analysis of 3,445 patients followed for up to 3 years. J Am Coll Cardiol 2007;49(10):1043-1051

- Enzygnost ® TAT micro (Stand 06/1998) Gebrauchsanweisung Enzymimmunoassay zur Bestimmung von Human-Thrombin/Antithrombin III-Komplex. Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, Germany
- Fiqueras J., Monasterio Y., Lidon RM., Nieto E., Soler-Soler J. (2000) Thrombin formation and fibrinolytic activity in patients with acute myocardial infarction or unstable angina: in-hospital course and relationship with recurrent angina at rest. J Am Coll Cardiol. 2000 Dec;36(7):2036-43
- Fontaine AB., Kölling K., Passos SD., Cearlock J., Hoffman R., Spigos DG. (1996)
 Polymeric surface modifications of tantalum stents. J Endovasc Surg. 1996 Aug;3(3):276-83
- 41. **Forschungszentrum Borstel (Stand 2004)** Leibniz -Zentrum für Medizin und Biowissenschaften Abteilung Immunologie und Zellbiologie Laborgruppe Biologische Chemie www.fz-borstel.de
- 42. Gach O., Biemar C., Nys M., Deby-Dupont G., Chapelle JP., Deby C., Lamy M., Pierard LA., Legrand V. (2005)
 Early release of neutrophil markers of activation after direct stenting in patients with unstable angina.
 <u>Coron Artery Dis</u>. 2005 Feb; 16(1):59-65

- 43. Gebrauchsanweisung BD Pharmigen[™] Technical Data Sheet CD 45 R-Phycoerythrin (R-PE)-conjugated mouse anti-human omonoclonal antibody
 BD Becton and Dickinson (Erembodegem, Belgien)
- 44. Gebrauchsanweisung BX Sonic[™] Ballonexpandierendes Stentsystem Cordis[®] Johnson und Johnson (Roden, Niederlande)
- 45. Gebrauchsanweisung Cypher Sirolimus eluting Stent Cordis® Johnson und Johnson (Roden, Niederlande)
- 46. **Gebrauchsanweisung Data Sheet, Monoclonal Antibody CD 41** Immunotech (Marseille, Frankreich)
- 47. Gebrauchsanweisung Monoclonal antibody CD 62P (P -Selectin) Immunotech (Marseille, Frankreich)
- 48. Gebrauchsanweisung Monoclonal antibodies detecting human antigenes PAC 1 BD (Becton and Dickinson, Erembodegem, Belgien)
- 49. Giannitsis E., Siemens HJ., Mitusch R., Tettenborn I., Wieqand U., Schmucker G., Sheikhzadeh A., Stierle U. (1999)
 Prothrombin fragments F1+2, thrombin-antithrombin III complex, fibrin monomers and fibrinogen in patients with coronary atherosclerosis. Int J Cardiol. 1999 Mar 15;68(3):269-74
- Glynn RJ., Rosner B. (2005) Comparison of Risk factors for the Competing Risks of Coronary Heart Disease, Stroke an Venous Thromboembolism. <u>Am J Epidemiol</u>. 2005 Oct 5; [Epub ahead of print]
- Goel PK., Shahi M., Agarwal AK., Scrivastava S., Seth PK. (1997) Platelet aggregability and occurence of restenosis following coronary angioplasty. <u>Int J Cardiol</u>. 1997 Aug 8;60(3):227-31
- Gogo PB Jr., Schneider DJ., Watkins MW., Terrien EF., Sobel BE., Dauerman HL (2005)
 Systemic inflammation after drug-eluting stent placement. J Thromb Thrombolysis. 2005 Apr;19(2):87-92
- 53. Greiser E., Jöckel KH., Giersiepen K., Maschewsky-Schneider U., Zachcial M. (1989) Cardiovascular disease risk factors, CHD morbidity and mortality in the Federal Republic of Germany. Int J Epidemiol. 1989;18(3Suppl 1); S118-24

- 54. **Grundt H., Nilsen DW., Hetland O., Valente E., Fagertun HE. (2004)** Activated factor 12 (FXIIa) predicts recurrent coronary events after an acute myocardial infarction. <u>Am Heart J.</u> 2004 Feb;147(2):260-6
- 55. Guray U., Erbay AR., Guray Y., Yilmaz MB., Boyaci AA., Sasmaz H., Korkmaz S., Kutuk E. (2004) Levels of soluable adhesion molecules in various clinical presentations of coronary atherosclerosis. <u>Int J Cardiol</u>. 2004 Aug;96(2):235-40
- 56. Gurbel PA, Bliden KP (2003) Platelet activation after stenting with heparin-coated versus noncoated stents. <u>Am Heart J</u>. 2003, Oct;146(4):E10
- 57. Gurlek A., Dagalp Z., Oral D., Omurlu K., Erol C., Akyol T., Tutar E. (1995)
 Restenosis after transluminal coronary angioplasty: a risk factor analysis. J Cardiovasc Risk. 1995 Feb;2(1):51-5
- Gurms HS., Bhatt DL., Gupta R., Ellis SG., Topol EJ., Lauer MS (2003)
 Preprocedural white blood cell count and death after percutaneous coronary intervention.
 Am Heart J. 2003 Oct;146(4):692-8
- 59. Gutensohn K., Beythien C., Bau J., Meinertz T., Kuehnl P. (1997) Flow cytometric analysis of coronary stent-induced alterations of platelet antigens in an in vitro model. <u>Thromb Res</u>. 1997 Apr 1;86(1):49-56
- Helmert U., Herman B., Jöckel KH., Greiser E., Madans J. (1989) Social class and risk factors for coronary heart disease in the Federal Republic of Germany. Results of the baseline survey of the German Cardiovascular Prevention Study (GCP). J Epidemiol Community Health. 1989 Mar;43(1):37-42
- 61. Herold G. und Mitarbeiter (2004) Innere Medizin Köln
- 62. Hess O.M., Simon R.W.R (2000) Herzkatheter-Einsatz in Diagnostik und Therapie, Springer Verlag

- 63. Hietala EM., Maasilta P., Juuti H., Nuutinen JP., Harjula AL., Salminen US., Lassila R. (2004)
 Platelet deposition on stainless steel, spiral, and braided polyactide stents. A comparative study. <u>Thromb Haemost</u>. 2004 Dec;92(6):1394-401
- 64. Hill R., Bagust A., Bakhai A., Dickson R., Dundar Y., Haycox A., Mujica Mota R., Reaney A., Roberts D., Williamson P., Walley T. (2004)

Coronary artery stents: a rapid review and economic evaluation. <u>Health Technol Assess</u>. 2004 Sep;8(35):iii-iv,1-242

- Hoffmeister HM., Ehlers R., Buttcher E., Kazmaier S., Szabo S., Beyer ME., Steinmetz A., Seipel L. (2002) Comparison of C-reactive protein and terminal complement complex in patients with unstable angina pectoris versus stable angina pectoris. <u>Am J Cardiol</u>. 2002 Apr 15;89(8):909-12
- 66. Hoffmeister HM., Jur M., Helber U., Fischer M., Heller W., Seipel L. (1999)
 Correlation between coronary morphology and molecular markers of fibrinolysis in unstable angina pectoris.
 <u>Atherosclerosis</u> 1999 May;144(1):151-7
- Hombach V., Waltenberger J., Voisard R., Hoher M. (1995) Recurrent stenosis following coronary angioplasty. Clinical, cell biological and molecular aspects. <u>Z. Kardiol</u>. 1995 Jan;8(1):5-21
- Iakovou I., Schmidt T., Bonizzonie E., Ge L., Sangiorgi GM., Stankovic G., Airoldi F., Chieffo A., Montorfano M., Carlino M., Michev I., Corvaja N., Briquori C., Gerckens U., Grube E. (2005) Incidence, predictors, and outcome of thrombosis after successful implantation of drug-eluting stents. JAMA. 2005;293(17):2126-2130
- Ikeda H., Nakayama H., Oda T., Kuwano K., Yamaga A., Ueno T., Yoh M., Hiyamata K., Koga Y., Toshima H. (1994) Neutrophil activation after percutaneous transluminal coronary angioplasty. <u>Am Heart J</u>. 1994 Dec;128(6 Pt 1):1091-8
- 70. **Inoue T., Hoshi K., Fujito T., Sakai Y., Morooka S., Sohma R. (1996)** Early detection of platelet activation after coronary angioplasty. <u>Coron Artery Dis</u>. 1996 Jul;7(7):529-34

- 71. Inoue T., Kato T., Hikichi Y., Hashimoto S., Hirase T., Morooka T., Imoto Y., Takeda Y., Sendo F., Node K. (2006) Stent-induced neutrophil activation is associated with an oxidative burst in the inflammatory process, leading to neointimal thickening. Thromb Haemost. 2006 Jan;95(1):43-8
- 72. Inoue T., Kato T., Uchida T., Sakuma M., Nakajima A., Shibazaki M., Imoto Y., Saito M., Hashimoto S., Hikichi Y., Node K. (2005) Local release of C-reactive protein from vulnerable plaque or coronary arterial wall by stenting. J Am Coll Cardiol. 2005 Jul 19; 46(2):239-45
- 73. Inoue T., Sohma R., Miyazaki T., Iwasaki Y., Yaguchi I., Morooka S. (2000) Comparison of activation process of platelets and neutrophils after coronary stent implantation versus ballon angioplasty for stable angina pectoris.

Am J Cardiol. 2000 Nov 15;86(10):1057-62

74. Jaster M., Schwimmbeck P., Spencker S., Schultheiss HP., Rauch U. (2003)

Randomized comparison of platelet-leucocyte aggregates and platelet activation in blood: heparin coated coiled wire stent implantation versus balloon angioplasty in acute myocardial infarction. <u>Thromb Res</u>. 2003;112(5-6):285-9

- 75. **Johnson and Johnson Homepage** Cypher Sirolimus-eluting Koronarstent *www.jnjgateway.com* (2005)
- Karvouni E., Korovesis S., Katritsis DG. (2005) Very late thrombosis after implantation of sirolimus eluting stent. <u>Heart</u>. 2005 Jun;91(6):e45
- 77. Kastrati A., Mehilli J., Pache J., Kaiser C., Valgimigli M., Kelbäk H., Menichelli M., Sabate M., Suttorp MJ., Baumgart D., Seyfarth M., Pfisterer ME., Schomig A. (2007) Analysis of 14 trials comparing sirolimus-eluting stents with bare metal stents. <u>N Engl J Med</u> 2007;356(10):1030-1039
- König W., Hoffmeister A., Khuseyinova N., Imhof A. (2003) Atherosklerose als inflammatorischer Prozess: C-reaktives Protein und koronares Risiko. <u>Deutsches Ärzteblatt</u> 100, Ausgabe 3 vom 17.01. 2003, Seite A-117, B-118, C-105

- 79. Korovesis S., Fredericks S., Holt D., Toutouzas P., Kaski JC., Webb-Peploe MM., Katritsis D. (2000) Release of platelet activation markers during coronary angioplasty. <u>Coron Artery Dis</u>. 2000 Jul;11(5):391-8.
- 80. Kosar F., Varol E., Ayaz S., Kutuk E., Oquzhan A., Diker E. (1998) Plasma leukocyte elastase concentration and coronary artery disease. Angiology 1998 Mar;49(3):193-201
- 81. Kowalski J., Kosmider M., Pawlicki L., Glowacka E. Banasik M., Baj Z., Ciewierz J., Pasnik J. (1997) Complement activates neutrophils during PTCA procedure in patients with unstable angina pectoris. Int J Cardiol. 1997 Feb;58(3):229-40
- 82. Kuchulakanti PK., Chu WW., Torguson R., Ohlmann P., Rha SW., Clavijo LC., Kim SW., Bui A., Gevorkian N., Xue Z., Smith K., Fournadjieva J., Suddath WO., Satler LF., Pichardi AD., Kent KM., Waksman R. (2006)

Correlates and long-term outcomes of angiographically proven stent thrombosis with sirolimus- and plaxitacel-eluting stents. <u>Circulation</u> 2006;113(8):1108-1113

83. Lack, O. (2003)

Monoklonale Antikörper als Rezeptor-Analoga für die kombinatorische Chemie. Entwicklung und Evaluation des Konzeptes am Beispiel von gpIIbIIIa-Rezeptor-Antagonisten.

Inaugural Dissertation zur Erlangung der philosophischen Doktorwürde an der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel

84. Lagerqvist B., James SK., Stenestrand U., Lindback J., Nilsson T., Wallentin L. (2007)

Long-term outcomes with drug-eluting stents versus bare metal stents in Sweden.

N Engl J Med 2007;356(10):1009-1019

85. **Laroia ST., Laroia AT (2004)** Drug-eluting stents. A review of the current literature. Cardiol Rev. 2004;12(1):37-43

86. Levi F., Lucchini F., Negri E., Vecchia C. (2002)

Trends in mortality from cardiovascular and cerebrovascular diseases in Europe and other areas of the world. <u>Heart</u>. 2002 Aug;88: 119-24

87. Li FQ., Horwitz M. (2001)

Characterization of mutant neutrophil elastase in severe congenital neutropenia. <u>J Biol Chem</u>. 2001 Apr 27;276(17):14230-41.Epub 2001 Jan 26.

- Liuzzo G., Giubilato G., Pinelli M. (2005) T cells and cytokines in atherogenesis. <u>Lupus</u> 2005;14(9):732-5
- Madjid M., Awan I., Willerson JT., Casscells SW. (2004) Leukocyte count and coronary heart disease: implications for risk assessment. J Am Coll Cardiol. 2004 Nov 16;44(10):1945-56
- 90. Markovitz JH., Roubin GS., Parks JM., Bittner V. (1996) Platelet activation and restenosis after coronary stenting: flow cytometric detection of wound-induced platelet activation. <u>Coron Artery Dis</u> 1996 Sep;7(9):657-65
- 91. Marx Steven O., Marks Andrew R. (2001) Bench to Bedside-The Development of Rapamycin and its Application to Stent Restenosis. <u>Circulation</u> 2001;104:852-855
- 92. **Matsumoto N., Nomura S., Kamihata H., Kimura Y., Iwasaka T. (2002)** Association of platelet-derived microparticles with C-C chemokines on vascular complication in patients with acute myocardial infarction. <u>Clin Appl Thromb Hemost</u> 2002 Jul;8(3):279-86
- 93. Mauri L., Hsieh WH., Massaro JM., Ho KK., D'Agostino R., Cutlip DE. (2007)
 Stent thrombosis in randomized clinical trials of drug-eluting stents. N Engl J Med 2007;356(10):1020-1029
- 94. McGill D., McGuiness J., Lloyd J., Ardlie N. (1989) Platelet function and exercise-induced myocardial ischaemia in coronary heart disease patients. <u>Thromb Res</u>. 1989 Oct 15;56(2):147-58
- 95. Mehta J., Mehta P. (1982) Comparison of platelet function during exercise in normal subjects and coronary artery disease patients: Potential role of platelet activation in myocardial ischemia. <u>Am Heart J</u> 1982 Jan;103(1):49-53
- 96. Mickelson JK., Lakkis NM., Villarreal -Levy G., Hughes BJ., Smith CW. (1996)
 Leukocyte activation with platelet adhesion after coronary angioplasty: a mechansim for recurrent disease?
 J Am Coll Cardiol. 1996 Aug;28(2):345-53
- 97. Miller GJ., Esnouf MP., Burgess AI., Cooper JA., Mitchell JP. (1997) Risk of coronary heart disease and activation of factor XII in middle aged men. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1997 Oct;17(10):2103-6
- 98. Mizia-Stec K., Mandecki T., Zahorska-Markiewicz B., Janowska J., Szulc A., Jastrzebska-Okon K., Twardowski R. (2001) P-Selectin and E-Selectin in Serum of patients with coronary artery disease. Pol Arch Med Wewn. 2001 Dec;106(6):1137-44
- 99. Morange PE., Bickel C., Nicaud V., Schnabel R., Rupprecht HJ., Peetz D., Lackner KJ., Cambien F., Blankenberg S., Tiret L., AtheroGene Investigators. (2006) Haemostatic factors and the risk of cardiovascular death in patients with coronary artery disease: the AtheroGene study. <u>Arterioscler Thromb Vasc Biol</u>. 2006 Dec;26(12):2793-9. Epub 2006 Oct 5.
- 100. Nagata Y., Usuda K., Uchiyama A., Uchikoshi M., Sekiguchi Y., Kato H., Miwa A., Ishikawa T. (2004) Characteristics of the pathological images of coronary artery thrombi according to the infarct related coronary artery in acute myocardial infarction. Circ J 2004 Apr;68(4):308-14
- Niemann, A. B. (2000) Der koronare Stent. Inaugural Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin (Tübingen)
- 102. Nuhrenberg TG., Voisard R., Fahlisch F., Rudelius M., Braun J., Gschwend J., Kountides M., Herter T., Baur R., Hombach V., Bäuerle PA., ZohInhofer D. (2005) Rapamycin attenuates vascular wall inflammation and progenitor cell promotors after angioplasty. <u>FASEB J</u> 2005 Feb;19(2):246-8. Epub 2004 Nov 16.
- 103. **Ohba T., Hata N., Ohaki Y. (2003)** Angioscopic appearance and histopathology of coronary artery thrombi. <u>Asian Cardiovasc Thorac Ann</u>. 2003 Sep;11(3):255-7

104. Ohlemüller, H. (1986)

PMN-Elastase in Diagnostik und Verlaufskontrolle chronisch entzündlicher Darmkrankheiten. Inaugural Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde 1986 (Tübingen)

105. Onohara T., Komori K., Inoguchi H., Yamamura S. (2002) Local blood serotonin and soluable P-Selectin levels during percutaneous transluminal balloon angioplasty and primary stenting of the iliac artery. <u>Surgery</u> 2002 Jan;131(1Suppl):S256-60

106. Patel PB., Pfau SE., Cleman MW., Brennan JJ., Howes C., Remetz M., Cabin HS., Setaro JF., Rinder HM. (2004) Comparison of coronary artery specific leukocyte platelet conjugate formation in unstable versus stable angina pectoris. <u>Am J Cardiol</u>. 2004 Feb 15; 93(4):410-3

107. **Pharmazeutische Zeitung 2005** Antibiotika/Chemotherapeutika-Sirolimus. *www.pharmazeutische-zeitung.de/51-01.htm (14.10.2005)*

108. **Quidel Deutschland GmbH (Stand 12/2003)** Enzym-Immunassay für die quantitative Bestimmung von SC5b-9-Komplexen in Humanserum und Humanplasma. Quidel Deutschland GmbH, Marburg, Germany

109. Rampino T., Marasa M., Malvezzi PM., Soccio G., Roscini E., Gamba G., Noris P., Alessiani M., Dal Canton A. (2004) Platelet-Independent defect in hemostasis associated with sirolimus use. <u>Transplant Proc</u> 2004;36(3):700-702

110. R & D Systems (Stand 03/2003) Produktinformation Parameter human sP-Selectin f ür die quantitative Bestimmung von humanem sP-Selectin in Zellkulturen, Serum oder Plasma. R & D Systems, Wiesbaden, Germany

111. Renz -Polster H., Krautzig S., Braun J. (2004) Basislehrbuch Innere Medizin. Urban und Fischer Verlag

112. **Rothfuss, J. C. (1991)** Der terminale Komplementkomplex

Der terminale Komplementkomplex SC5b-9 als Index für Biokompatibilität von Highflux-Dialysatoren und Untersuchung weiterer Biokompatibilitäts- und Leistungskriterien an Polysulfon- und Polyamid-Dialysatoren.

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin 1991 (Tübingen)

- 113. **Ruygrok P.N., Muller D.W., Serruys P.W. (2003)** Rapamycin in cardiovascular medicine (Review). Internal Medicine Journal 2003; 33:103-109
- 114. Salloum J., Tharpe C., Vauqhan D., Zhao DX. (2005) Release and elimination of soluble vasoactive factors during percutaneous coronary intervention of saphenous vein grafts: analysis using the PercuSurge GuardWire distal protection device. <u>J Invasive Cardiol</u>. 2005 Nov;17(11):575-9
- 115. Savchenko AP., Matchin luG., Smirnov MA., Mironova Hu., Alekseeva IA., Liakishev AA. (2000) Long-term assessment of clinical parameter in patients with coronary heart disease after ballon angioplasty and stenting ballon angioplasty Vestn Rentgenol Radiol. 2000 Mar-Apr;(2):4-8
- 116. Scharf RE., Tomer A., Marzec UM., Teirstein PS., Ruggeri ZM., Harker LA. (1992) Activation of platelets in blood perfusing angioplasty-damaged coronary arteries. Flow cytometric detection. <u>Aterioscler Thromb</u>. 1992 Dec;12(12):1475-87
- 117. Schmitz G., Rothe G. (1994) Durchflusszytometrie in der klinischen Diagnostik. Schattauer Verlag
- 118. Schultheiss HP., Tschöpe D., Esser J., Schwippert B., Rösen P., Nieuwenhuis HK., Schmidt-Soltau C., Strauer B. (1994) Large platelets continue to circulate in an activated state after myocardial infarction. <u>Eur J Clin Invest</u>. 1994 Apr;24(4):243-7
- 119. Schunkert H., Kromer E.P. (1998) Rationelle Diagnostik und Therapie bei koronarer Herzerkrankung. Springer Verlag
- 120. Serebruany VL., Cummings CC., Malinin Al., Steinhubl SR., Gurbel PA. (2001)

Uniform platelet activation exists before coronary stent implantation despite aspirin therapy. <u>Am Heart J.</u> 2001 Oct; 142(4):611-6

121. Serruys PW. Daemen J (2007)

Are drug-eluting stents associated with a higher rate of late thrombosis than bare metal stents? Late stent thrombosis: a nuisance inboth bare metal and drug-eluting stents. <u>Circulation</u> 2007;115(11):1433-1439 122. Serruys PW., de Jaegere P., Kiemeneij F., Macaya C., Rutsch W., Heyndrickx G., Emanuelsson H., Marco J., Legrand V., Materne P. et al (1994) A comparison of ballon-expandable-stent implantation with ballon angioplasty in patients with coronary artery disease. Benestent Study Group.

N Engl J Med. 1994 Aug 25;331(8):489-95

- 123. **Shapiro TA., Hermann HC. (1992)** Coronary angiography and interventional cardiology. <u>Curr Opin Radiol</u>. 1992 Aug;4(4):55-64
- 124. Sigwart U., Puel J. Mirkowitch V., Joffre F., Kappenberger L. (1987) Intravascular stents to prevent occlusion and restenosis after transluminal angioplasty. <u>N Engl J Med</u>. 1987 Mar 19;316(12):701-6
- 125. Silber S., Böhm M., Gottwik M., Borggrefe M., Dietz R. (2006) Positionspapier zur Vermeidung von Tod und lebensbedrohlichen Komplikationen nach koronarer Stentimplantation durch die zusätzliche Gabe von Clopidogrel. Deutsche Gesellschaft für Kardiologie-Herz und Kreislaufforschung e.V (German Cardiac Society)
- 126. Silber S., Böhm M., Gottwik M., Borggrefe M., Dietz R. (10/2006) Akutes Herzinfarktrisiko bei mangelnder Clopidogrelgabe nach koronarer Stentimplantation. <u>Deutsches Ärzteblatt</u>, Jg. 103, Heft 43, 27.10.2006
- 127. Singh N., Gemmell CH., Daly PA., Yeo EL. (1995) Elevated platelet-derived microparticle levels during unstable angina. <u>Can J Cardiol</u>. 1995 Dec;11(11):1015-21
- 128. Sjoberg AP., Trouw LA., MCGrath FD., Hack CE., Blom AM. (2006) Regulation of complement activation by C-reactive protein: targeting of the inhibitory activity of C4b-binding protein. <u>J Immunol</u>. 2006 Jun 15;176(12):7612-20
- 129. Smith SC Jr., Feldman TE., Hirshfeld JW Jr. et al (2005) Guideline Update for Percutaneous coronary Interventions -- summary article: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (ACC/AHA/SCAI Writing Commitee to update the 2001 Guidelines for Percutaneous Coronary Intervention) <u>Circulation</u> 2006; 113(1):156-175

 130. Spaulding C., Daemen J., Boersma E., Cutlip DE., Serruys PW. (2007)
 A pooled analysis of data comparing sirolimus-eluting stents with baremetal stents.
 <u>N Engl J Med</u> 2007 356(10):989-997

131. Statistisches Bundesamt Wiesbaden (Stand 2007) Sterbefälle, Todesursachen, Kosten nach Krankheitsklassen und Geschlecht, Sterbeziffer. *www.destatis.de*

- 132. Stone GW., Moses JW., Ellis SG. et al (2007) Safety and efficacy of sirolimus- and paclitaxel-eluting coronary stents. <u>N Engl J Med</u> 2007;356(10):998-1008
- 133. Szuk T., Nagy B. Jr., Bereczky Z., Koszeqi Z., Edes I., Kappelmayer J. (2006)
 Effects of ad hoc clopidogrel loading versus pre-treatment on P -Selectin

Effects of ad hoc clopidogrel loading versus pre-treatment on P -Selectin expression after coronary stent implantation. <u>Platelets</u>. 2006 Aug;17(5):344-6

- 134. **Tarnok A., Mahnke A., Muller M., Zotz RJ (1999)** Rapid in vitro biocompatibility assay of endovascular stents by flow cytometry using platelet activation and platelet-leukocyte aggregation. <u>Cytometry</u>. 1999 Feb 15;38(1):30-9
- 135. Tepe G., Schmehl J., Wendel HP, Schaffner S., Heller S, Gianotti M., Claussen CD, Dauda SH. (2006) Reduced thrombogenicity of nitinol stents-in vitro evaluation of different surface modifications and coatings. <u>Biomaterials</u> 2006 Feb;27(4):643-50 Epub 2005 Aug 10
- 136. Tepe G., Wendel HP., Khorchidi S., Schmehl J., Wiskirchen J., Pusich B., Claussen CD., Duda SH. (2002) Thrombogenicity of Various Endovascular Stent Types: An In Vitro Evaluation. J Vasc Interv Radiol 2002, 13:1029-1035
- Teysseire N., Levy PY., Valeix B., Labrunie P., Levy G. (1995) Evaluation, by flow cytometry, of activated platelet levels after coronary angiography an intraluminal angioplasty. <u>Ann Biol Clin (Paris)</u> 1995;53(3):135-40
- 138. Tong W., Lai H., Yang C., Ren S., Dai S., Lai S. (2005) Age, gender and metabolic syndrome-related coronary heart disease in U.S. adults. <u>Int J Cardiol</u>. 2005 Oct 10;104(3):288-91

- 139. Tsiara S., Elisaf M., Jagroop IA., Mikhailidis DP. (2003) Platelets as predictors of vascular risk: is there a practical index of platelet activitiy? <u>Clin Appl Thromb Hemost</u>. 2003 Jul;9(3):177-90
- 140. Uno M., Tsuji H., Watanabe M., Takada O., Kobayashi K., Takabuchi H., Shirai K., Sawada S., Toyoda T., Yamamoto K. et al (1989) Application of thrombin-antithrombin III complex for detecting a latent hypercoagulable state in patients with coronary artery disease. Jpn Circ J. 1989 Oct;53(10):1185-91
- 141. Urban P., Gershlick AH., Guagliumi G., Guyon P., Lotan C., Schofer J., Seth A., Sousa JE., Wijns W., Berge C., Deme M., Stoll HP., e-Chypher Investigators (2006) Safety of coronary sirolimus eluting stents in daily clinical practice: one year follow-up of the e-Cypher registry. <u>Circulation</u> 2006; 113(11):1434-1441
- 142. Walter, T. (1999) Akutwirkungen von Enalapril auf die Fibrinolyse bei KHK sowie auf die myokardiale Ischämie bei aortokoronarer Bypass-Operation. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin an der Medizinischen Fakultät der Eberhard Karls Universität zu Tübingen
- 143. Ward MR., Agrotis A., Kanellakis P., Hall J., Hall J., Jennings G., Bobik A. (2002) Tranilast prevents activation of transforming growth factor-beta system, leukocyte accumulation, and neointimal growth in porcine coronary arteries after stenting.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2002 Jun 1;22(6):940-8.

- 144. Yasuda M., Takeuchi K., Hiruma M., Iida H., Tahara A., Itaqane H., Toda I., Akioka K., Teraqaki M., Oku H. et al (1990) The complement systen in ischemic heart disease. <u>Circulation</u> 1990 Jan;81(1):156-63
- 145. Yip HK., Chang LT., Sun CK., Chen MC., Yang CH., Hung WC., Hsieh YK., Fang CY., Hang CL., Wu CJ., Chang HW. (2006) Platelet activity is a biomarker of cardiac necrosis and predictive of untoward clinical outcomes in patients with acute myocardial infarction undergoing primary coronary stenting. <u>Circ J.</u> 2006; 70(1):31-6
- 146. Yip HK., Sun CK., Chang LT., Wu CJ (2006) Strong correlation between serum levels of inflammatory mediators and their distribution in infarct-related coronary artery. <u>Circ J.</u> 2006 Juk;70(7):838-45

- 147. Zito F., Drummond F., Bujac SR., Esnouf MP., Morrissey JH., Humphries SE., Miller GJ. (2000) Epidemiological and genetic association of activated factor XII concentration with factor VII activity, fibrinopeptide A concentration, and risk of coronary heart disease in men. Circulation. 2000 Oct 24;102(17):2058-62
- 148. **Zylka-Menhorn V. (1999)** Atherosklerose: Das Endothel vor dem "tödlichen Qiuntett" schützen. <u>Deutsches Ärzteblatt</u> 96, Ausgabe 31-32 vom 09.08.1999 Seite A-2011, B-1699, C-1595

7. Anhang

7.1 Original Diagramme FACS-Analyse (CD 41/CD 45)

In diesem Kapitel sind Auszüge aus einer Original FACS-Analyse dargestellt. Stellvertretend für alle analysierten Parameter sind die Diagramme und die so genannte Quadranten-Statistik für die Antikörperkombination CD 41/CD 45 des Probanden 1 sowohl vom Ausgangswert als auch von den jeweiligen drei Schläuchen nach Durchlauf im Chandler Loop aufgeführt.

Ausgangswert

(Abb. 25)



Die Graphik zeigt die vom FACS-Gerät erfassten Zellen, in diesem Fall Thrombozyten. Die Umrandung um den Zellhaufen ist variabel einstellbar. Nur die Zellen innerhalb des Kreises werden vom FACS-Gerät für die Auswertung herangezogen. So kann man eventuell unerwünschte Zellen oder Zelltrümmer aus der Messung herausfiltern.



Die linke Graphik gibt die Fluoreszenz 1 und damit den Farbstoff FITC (Fluorescein) wieder. Alle Zellen, die einen Antikörper mit dem genannten Farbstoff gebunden haben, werden hier erfasst und in Logarithmusschritten gezählt.

Ebenso verhält es sich mit dem Farbstoff PE (R-Phycoerythrin), der durch die rechte Graphik 2 (Fluoreszenz 2) dargestellt ist.

Da in der Antikörperkombination CD 41/CD 45 beide Farbstoffe vertreten sind (siehe auch Kapitel 2.3.4.2), finden sich auch in beiden Graphiken positive Ausschläge.



In dieser Graphik werden die Fluoreszenzen 1 und 2 nochmals gemeinsam in Form von aktivierten Zellen aufgetragen. Die X-Achse steht für die Fluoreszenz 1 und damit für FITC-tragende Zellen, die Y-Achse gibt die Fluoreszenz 2, also den Farbstoff PE, wieder. Zusätzlich sind Trennlinien bei 10¹ eingezeichnet, die

<u>Anhang</u>

die Graphik in vier Felder (Quadranten oder Quads) unterteilen. Zum einen werden nur die Zellen als aktiviert und antikörper- oder fluoreszenzfarbstofftragend gewertet, die rechts (X-Achse) beziehungsweise oberhalb (Y-Achse) der 10¹-Grenze liegen. Zum anderen dienen die vier Felder der einfacheren Auswertung in der so genanten Quadrantenstatistik.

Da die Antikörperkombination CD 41/CD 45 beide Farbstoffe beinhaltet, gibt es auch in dieser Graphik bei beiden Fluoreszenzen positive und damit aktivierte Zellen, die die genannten Antikörper tragen.

Mit der Quadrantenstatistik (siehe Quadrant statistics) kann man, wie bereits erwähnt, eine detaillierte Auswertung der Vier-Felder-Graphik vornehmen. Die Abkürzungen UL, UR, LL und LR stehen für die vier Felder (Quads). UL (upper left) ist das Rechteck links oben, UR (upper right) das rechte große Quadrat daneben. Das linke untere Feld wird mit LL (lower left) bezeichnet und LR (lower right) ist wiederum das Rechteck rechts daneben. Für alle vier Felder werden in der Quadrantenstatistik nun die verschiedenen aufgeführten Faktoren mit Zahlen belegt. So sind mit Events die Ereignisse beziehungsweise die Zahl der Zellen gemeint, die in jedem Feld ausgezählt werden. Da das FACS-Gerät insgesamt nur zehntausend Zellen auswerten soll (total events), ergibt die Summe der vier Felder genau die vorgegebene Zahl. Die Spalte %Total ist der wichtigste Faktor bei der Auswertung der FACS-Analyse. Sie gibt die aktivierten Zellen in den Feldern UL, UR und LR in % an und stellt im Grunde nur eine andere Schreibweise der Eventspalte dar. In diesem Fall befinden sich im Feld UR, welches beide Fluoreszenzen repräsentiert, 90,81% aktivierte Zellen, die damit beide Antikörper und die Farbstoffe tragen.

Der X Geo Mean beschreibt die Fluoreszenz, die von den im Feld enthaltenen Zellen ausgeht.

Die anderen Faktoren sind für die Auswertung zu vernachlässigen.

File: Vorher/CD 41+CD 45.026 Sample ID: Vorher/ CD 41+CD 45 Tube: Untitled Acquisition Date: 16-Mar-05 Gated Events: 10000	Log Data Units: Linear Values Patient ID: Panel: Untitled Acquisition Tube List Gate: No Gate Total Events: 10000
Tube: Untitled	Panel: Untitled Acquisition Tube List
Acquisition Date: 16-Mar-05	Gate: No Gate
Gated Events: 10000	Total Events: 10000
X Parameter: FL1-H(log)	Y Parameter: FL2-H(log)
Quad Location: 11,8	

Quad	Events	%Gated	%Total	XMean	XGeo Mean	Y Mean	YGeo Mean
UL	86	0.86	0.86	4.32	3.17	54.99	25.28
UR	9081	90.81	90.81	344.87	299.8	70.99	50.4
LL	69	0.69	0.69	3.66	2.5	2.13	1.62
LR	764	7.64	7.64	199.9	164.46	3.51	2.7

Hinweis: Die Quadrantenstatistik konnte nicht im Original übernommen werden, da kein vorhandenes Programm das Format unterstützt hat.

Die folgenden Abschnitte zeigen die Graphiken und Quadrantenstatistiken der drei Schläuche nach Durchlauf im Chandler Loop. Die Auswertung und Betrachtung erfolgt nach dem gleichen Prinzip wie beim Ausgangswert.

Schlauch ohne Stent nach Durchlauf im Chandler Loop Modell (Abb. 26)





File: KS/ CD 41+CD 45.026 Sample ID: KS/CD 41+CD 45 Tube: Untitled Acquisition Date: 16-Mar-05 Gated Events: 10000 X Parameter: FL1-H(log) Quad Location: 11,8 Log Data Units: Linear Values Patient ID: Panel: Untitled Acquisition Tube List Gate: No Gate Total Events: 10000 Y Parameter: FL2-H(log)

Quad	Events	%Gated	%Total	XMean	XGeo Mean	Y Mean	YGeo Mean
UL	76	0.76	0.76	4.02	2.88	44.47	26.23
UR	9116	91.16	91.16	533.53	463.69	61.2	44.45
LL	54	0.54	0.54	4.26	2.85	2.65	1.96
LR	754	7.54	7.54	328.85	266.1	3.75	2.9





File: NS/CD 41+CD 45.031	Log Data Units: Linear Values
Sample ID: KS/CD 41+CD 45	Patient ID:
Tube: Untitled	Panel: Untitled Acquisition Tube List
Acquisition Date: 16-Mar-05	Gate: No Gate
X Parameter: FL1-H(log) Quad Location: 11,8	Y Parameter: FL2-H(log)

Quad	Events	%Gated	%Total	XMean	XGeo Mean	Y Mean	YGeo Mean
UL	66	0.66	0.66	4.33	2.91	24.79	21.3
UR	9123	91.23	91.23	540.26	478.53	69.46	45.2
LL	49	0.49	0.49	4.86	3.42	3.53	2.63
LR	762	7.62	7.62	323.99	261.74	3.59	2.75

Schlauch mit dem SES nach Durchlauf im Chandler Loop Modell

(Abb. 28)





File: CS/CD 41+CD 45.036 Sample ID: CS/CD 41+CD 45 Tube: Untitled Acquisition Date: 16-Mar-05 Gated Events: 10000 X Parameter: FL1-H(log) Quad Location: 11,8 Log Data Units: Linear Values Patient ID: Panel: Untitled Acquisition Tube List Gate: No Gate Total Events: 10000 Y Parameter: FL2-H(log)

Quad	Events	%Gated	%Total	XMean	XGeo Mean	Y Mean	YGeo Mean
UL	147	1.47	1.47	4.15	2.95	39.32	26.06
UR	8986	89.86	89.86	528.32	454.99	58.22	44.73
LL	102	1.02	1.02	3.58	2.46	2.66	2.11
LR	765	7.65	7.65	319.11	234.88	3.61	2.76

7.2 Tabellen

Erläuterung zu den dargestellten Tabellen:

- 0 = Ausgangswert oder Messung vor Durchlauf im Chandler Loop Modell
- 1 = Schlauch ohne Stent nach Durchlauf im Chandler Loop Modell
- 2 = Schlauch mit nicht beschichtetem Stent (BMS) nach Durchlauf im Chandler Loop Modell
- 3 = Schlauch mit Sirolimus-beschichtetem Stent (SES) nach Durchlauf im Chandler Loop Modell

Die angegebenen Werte wurden auf zwei Stellen nach dem Komma gerundet.

7.2.1 Tabellen Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten

	Mittelwert	StdAbw.	StdFehler	Median	Min.	Max.
0	4,59	0,32	0,11	4,50	4,32	5,35
1	4,66	0,27	0,09	4,57	4,39	5,29
2	4,63	0,28	0,09	4,61	4,36	5,28
3	4,58	0,30	0,1	4,53	4,26	5,27

Tab. 15: Erythrozyten [10⁶/µl]

Tab. 16: Leukozyten [10³/µl]

	Mittelwert	StdAbw.	StdFehler	Median	Min.	Max.
0	5,27	1,25	0,42	5,3	3,5	8
1	4,93	1,13	0,38	4,9	3,3	7,4
2	4,93	1,15	0,38	5,1	3	7,2
3	4,96	1,32	0,44	5	3,1	7,9

Tab. 17: Thrombozyten [10³/µl]

	Mittelwert	StdAbw.	StdFehler	Median	Min.	Max.
0	238,89	38,17	12,72	239	195	291
1	228,44	35,63	11,88	235	174	280
2	218,56	36,28	12,09	221	156	260
3	222	39,18	13.06	211	159	269

7.2.2 Tabellen der ELISA-Werte

	Mittelwert	StdAbw.	StdFehler	Median	Min.	Max.
0	100,96	13,86	4,62	99,86	82,98	116,33
1	173,21	42,40	14,13	180,18	108,53	247,25
2	163,78	24,97	8,32	171,92	118,42	189,62
3	166,80	30,37	10,12	170,29	119,65	210,63

Tab. 18: PMN-Elastase [µg/l]

Tab. 19: sP-Selectin [ng/ml]

	Mittelwert	StdAbw.	StdFehler	Median	Min.	Max.
0	32,36	7,83	2,61	33,38	21,24	41,94
1	34,85	8,41	2,8	35,98	22,72	46,26
2	38,92	11,57	3,86	40,12	22,06	51,98
3	36,22	8,07	2,69	38,84	24,88	46,44

Tab. 20: β-TG [IU/ml]

	Mittelwert	StdAbw.	StdFehler	Median	Min.	Max.
0	54,29	16,11	5,37	54,39	32,4	76,96
1	364,04	276,87	92,29	280,75	119,19	1035,92
2	673,83	489,38	163,13	612,62	154,09	1488
3	307,94	164,60	54,87	302,46	129,17	689,51

Tab. 21: Sc5b-9 [ng/ml]

	Mittelwert	StdAbw.	StdFehler	Median	Min.	Max.
0	193,74	95,98	31,99	177,92	106,46	414,05
1	858,9	320,93	106,98	795,03	436,47	1488,86
2	848,88	229,87	76,62	778,35	570,83	1283,48
3	1053,95	427,62	142,54	1000,65	446,08	1614,64

Tab. 22: TAT [µg/l]

	Mittelwert	StdAbw.	StdFehler	Median	Min.	Max.
0	1,50	1,13	0,38	1,19	0,92	4,49
1	8,98	8,82	2,94	4,94	2,37	29,19
2	13,96	11,64	3,88	6,64	2,99	34,83
3	7,64	3,76	1,26	7,49	3,77	15,90

Tab. 23: Factor XIIa [ng/ml]

	Mittelwert	StdAbw.	StdFehler	Median	Min.	Max.
0	0,63	0,17	0,06	0,65	0,29	0,84
1	0,79	0.20	0,07	0,80	0,54	1,09
2	0,70	0,21	0,07	0,71	0,42	0,99
3	0,73	0,20	0,07	0,72	0,43	1,08

7.2.3 Tabellen der FACS-Analyse

Tab. 24: Negativkontrolle (Aktivierung in %)

	Mittelwert	StdAbw.	StdFehler	Median	Min.	Max.
0	0,34	0,28	0,09	0,22	0,1	0,89
1	0,26	0,15	0,05	0,18	0,06	0,46
2	0,53	0,27	0,09	0,39	0,26	1,12
3	0,41	0,24	0,08	0,32	0,22	0,92

Tab. 25: CD 41/CD 45 (Aktivierung in %)

	Mittelwert	StdAbw.	StdFehler	Median	Min.	Max.
0	77,1	7,13	2,38	76,04	67,38	90,81
1	76,1	7,08	2,36	75,4	65,91	91,16
2	76,91	6,55	2,18	75,76	67,85	91,23
3	76,97	6,12	2,04	75.76	67,33	89,86

	Mittelwert	StdAbw.	StdFehler	Median	Min.	Max.
0	22,47	7,3	2,43	21,4	12,89	36,41
1	33,92	20,94	6,98	23,67	18,91	82,23
2	35,92	24,52	8,17	25,69	15,24	75,5
3	28,52	17,21	5,74	81,07	9,45	60,79

Tab. 26: PAC 1(Aktivierung in %)

Tab. 27: PAC1/ADP (Aktivierung in %)

	Mittelwert	StdAbw.	StdFehler	Median	Min.	Max.
0	95,59	1,34	0,45	95,8	93,74	97,12
1	94,71	1,69	0,56	95,22	91,43	96,74
2	94,54	2,17	0,72	95,61	90,5	96,91
3	94,65	2,03	0,68	96,1	91,67	96,62

Tab. 28: CD 62P (CLB Thromb/6) (Aktivierung in %)

	Mittelwert	StdAbw.	StdFehler	Median	Min.	Max.
0	56,92	4,97	1,66	58,6	50,07	64,14
1	54,02	3,89	1,3	51,55	50,83	60,32
2	54,44	4,76	1,59	52,41	49,87	64,49
3	54,63	4,27	1,42	53,52	50,35	63,14

7.3 Bilder der Rasterelektronenmikroskopie

Die folgenden Abbildungen zeigen weitere rasterelektronenmikroskopische Bilder, die von den Stents gemacht wurden. Dargestellt sind sowohl Übersichtsaufnahmen als auch detaillierte Ausschnitte der Stents mit einzelnen Zellen (Erythrozyten) und Zellaggregaten (Thrombozytenaggregaten). Auch die abgelagerte Fibrinschicht lässt sich meist sehr gut erkennen und kann in den Bildern des SES nicht von der Sirolimusbeschichtung unterschieden werden.

7.3.1 Bilder der Negativkontrollen



7.3.1.1 BMS (Abb. 29)



7.3.1.2 SES (Abb. 30)



7.3.2 Bilder des BMS nach Blutkontakt (Abb. 31)







7.3.3 Bilder des SES nach Blutkontakt (Abb. 32)





Danksagung

Ich möchte mich bei allen recht herzlich bedanken, die zur Entstehung und zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt vor allem Herrn PD Dr. Martin E. Beyer für die freundliche Überlassung des Themas, das mir entgegengebrachte Vertrauen, die gute Betreuung sowie die Förderung dieser Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt außerdem Herrn Dr. Thomas Walter für die intensive Betreuung, die konstruktiven Beiträge sowie für die tatkräftige Unterstützung bei der Bewältigung von auftretenden Problemen. Dies war entscheidend für das Gelingen dieser Doktorarbeit.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn PD Dr. H.P. Wendel und seinen Mitarbeitern der Forschungsabteilung für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie der Eberhard Karls Universität Tübingen, insbesondere bei Frau Michaela Braun und Frau Doris Armbruster, die durch ihre Laborbestimmungen sehr viel zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Des Weiteren möchte ich Herrn Prof. Klaus Dietz vom Institut für Medizinische Biometrie der Universitätsklinik Tübingen für die gute Zusammenarbeit und Hilfe bei der statistischen Auswertung der Daten danken.

Zuletzt bedanke ich mich bei meiner Familie und besonders bei meinem Mann, Martin Roth, für die Unterstützung und die positive Kritik sowohl während dieser Doktorarbeit als auch während meines Studiums. Ihnen widme ich zum Dank diese Doktorarbeit.

CURRICULUM VITAE

PERSÖNLICHES

Geburtstag:	21.08.1981
Geburtsort:	VS-Villingen
Familienstand:	ledig
Nationalität:	deutsch
Konfession:	evangelisch
Vater:	Helmut Rey Bankkaufmann und selbstständiger Unternehmer, jetzt im Ruhestand
Mutter:	Monika Rey, geb. Schütte Kaufmännische Angestellte, jetzt im Ruhestand
Geschwister:	Jens-Holger Rey, Beamter im Polizeivollzugsdienst Anja Martina Rey, Tierarzthelferin

AUSBILDUNG

1988-1992:	Grundschule Neuhausen im Schwarzwald
1992-2001:	Zinzendorf-Gymnasium Königsfeld im Schwarzwald
2001:	Allgemeine Hochschulreife
2001-2007:	Studium der Humanmedizin an der Eberhard Karls
	Universität zu Tübingen
09.2003:	Ärztliche Vorprüfung
27.11.2007:	Ärztliche Prüfung

PRAKTIKA UND KLINISCHE AUSBILDUNG

02.2004-03.2004:	Famulatur in der Medizinischen Klinik und Poliklinik Tübingen, Abteilung III (Kardiologie)
08.2004-09.2004:	Famulatur in der Medizinischen Klinik und Poliklinik Tübingen, Abteilung III (Kardiologie)
09.2005-10.2005:	Famulatur in der Universitäts-Frauenklinik Tübingen
03.2006-04.2006:	Famulatur im Kreiskrankenhaus Eberbach, Anästhesiologie

- 08.2006-12.2006: PJ-Tertial Gynäkologie im Kreiskrankenhaus Böblingen
 - CA PD Dr. med. E. Weiss
 - 1. Teil: operative Gynäkologie und Ambulanz
 - 2. Teil: Risikoschwangeren-Station, Wöchnerinnen-Station, Schwangeren-Ambulanz und Pränataldiagnostik
 - 3. Teil: Kreissaal
- 12.2007-04.2007: PJ Tertial Chirurgie im Kreiskrankenhaus Böblingen
 - 1. Teil: Unfallchirurgie, Ltd. OA Dr. med. P. Hoffmann
 - 2. Teil: 2 Wochen Anästhesiologie, CA Dr. med. J. Diedler
 - 3. Teil: Allgemein- und Visceralchirurgie, CA Prof. Dr. med. K. Manncke und CA. Prof. Dr. med. G. Köveker
- 04.2007-07.2007: PJ Tertial Innere Medizin im Kreiskrankenhaus Böblingen-Sindelfingen
 - 1. Teil: Gastroenterologie und Onkologie am Klinikum Böblingen, CA Prof. Dr. med. H.-G. Leser
 - Teil: Onkologie, Kardiologie und Nephrologie am Klinikum Sindelfingen, CA Prof. Dr. med.
 H.-G. Leser, CA. Dr. med. H. Nebelsieck, CA Dr. med. D. Löhr
- Seit 01.2008: Weiterbildung zum Facharzt für Gynäkologie und Geburtshilfe 01.2008-09.2008: Verbundklinikum Landkreis Ansbach, Haus Rothenburg o.d.T., CA Günther Reu Seit 10.2008: Caritas Krankenhaus Bad Mergentheim, CA Dr. med. Th. Prätz

SONSTIGE KLINISCHE TÄTIGKEITEN

- 02.1999-10.2001: Aushilfe in der Praxis für Pathologie Prof. Dr. med. D. Sellin, VS-Schwenningen
 02.2002-03.2002: Krankenpflegepraktikum im Klinikum der Stadt Villingen-Schwenningen, Unfallchirurgie
 07.2002-08.2002: Krankenpflegepraktikum im Klinikum der Stadt Villingen-Schwenningen, Innere Medizin
- 09.2003-12.2007: Pflegehelferin in der Notaufnahme der Medizinischen Klinik und Poliklinik Tübingen

DISSERTATION

seit 03.2004:	bei Herrn PD Dr. med. Martin E. Beyer, CA Medizinische Klinik II am Kreiskrankenhaus Kirchheim-Nürtingen
Thema:	Beeinflussung der Thrombozyten- und Leukozytenaktivierung sowie die Auswirkung auf das Gerinnungs- und Komplementsystem durch Nichtbeschichtete und Sirolimusbeschichtete Koronarendoprothesen