

AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR HERZ-, THORAX- UND HERZNAHE GEFÄßCHIRURGIE  
DIREKTOR: PROF. DR. MED. CHRISTOF SCHMID  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

ENDOTHELAPOPTOSE UND ZIRKULIERENDE ENDOTHELZELLEN (CECs) NACH  
AORTOKORONARER BYPASSOPERATION MIT UND OHNE EINSATZ DER HERZ-  
LUNGEN-MASCHINE

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
*der Medizin*

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
*Lucian Costin*

Dekan: Prof. Dr. med. Bernhard Weber

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christof Schmid

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Andreas Luchner

Tag der mündlichen Prüfung: 27.10.2008

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1 Einleitung .....</b>	<b>6</b>
1.1 Fragestellung und Ziel der Arbeit.....	6
1.2 Das Endothel .....	7
1.3 Zirkulierende Endothelzellen und endotheliale Progenitorzellen .....	9
1.4 Endothelzellapoptose .....	13
1.5 Extrakorporale Zirkulation.....	14
1.6 Myokardrevaskularisation mit und ohne EKZ .....	20
<b>2 Material und Methode.....</b>	<b>23</b>
2.1 Patientenkollektiv und Studienprotokoll .....	23
2.2 Studienablauf.....	25
2.3 Isolierung der CECs aus dem Blut.....	28
2.4 Detektion von apoptotischen Endothelzellen .....	33
2.5 Statistische Auswertung .....	35
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>36</b>
3.1 Demographische Daten und klinischer Verlauf.....	36
3.2 Zirkulierende Endothelzellen .....	36
3.3 Endothelzellapoptose .....	39
3.4 Korrelation CECs - Endothelzellapoptose.....	40

<b>4 Diskussion .....</b>	<b>42</b>
4.1 CECs bei Operationen mit und ohne EKZ .....	42
4.2 Endothelzellapoptose in dieser Studie.....	44
4.3 Ausblick auf mögliche Therapien .....	46
<b>5 Zusammenfassung .....</b>	<b>48</b>
<b>6 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>49</b>
<b>7 Danksagung .....</b>	<b>57</b>
<b>8 Lebenslauf.....</b>	<b>58</b>
<b>9 Erklärung.....</b>	<b>59</b>

## Abkürzungen

ACVB-OP:	Aortokoronarer (venöse) Bypassoperation
ACT:	Activated clotting time
ANCA:	Antineutrophile cytoplasmatische Antikörper
BMI:	Body Mass Index
BSA:	Bovine serum albumin
CD:	Cluster of differentiation (Zelloberflächenmoleküle)
CECs:	Zirkulierende Endothelzellen
CEPCs:	Zirkulierende endotheliale Vorläuferzellen (Progenitorzellen)
CPAP:	Continuous positive airway pressure
DAPI:	4, 6-Diamidin-2-phenylindol-dihydrochlorid
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
EDTA:	Ethylendiamin-tetraacetat
EKZ:	Extrakorporale Zirkulation
HLM:	Herz-Lungen-Maschine
HUVEC:	Human umbilical vein endothelial cell
IMV:	Intermittent mandatory ventilation
IL :	Interleukin
LIMA:	Linke Arteria mammaria (thoracica) interna
LV-EF:	Ejektionsfraktion des linken Ventrikels
OPCAB:	Off-pump coronary artery bypass (ACVB-OP ohne Einsatz der HLM)
p :	Signifikanz
PBS:	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (pH 7,4)
SIRS:	Systemic inflammatory response syndrome
SD:	Standardabweichung
TGF- $\beta$ :	Transformierender Wachstumsfaktor- $\beta$
TNF- $\alpha$ :	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
UEA-1:	Lectin1-Lösung vom Ulex europaeus
VEGF:	Vaskulo-endothelialer Wachstumsfaktor
VEGF-R2:	VEGF-Rezeptor 2 (=Flk1)
vWF:	von Willebrand- Faktor

# **1 Einleitung**

## **1.1 Fragestellung und Ziel der Arbeit**

Die extrakorporale Zirkulation (EKZ) dient in Form der Herz-Lungen-Maschine (HLM) dem alltäglichen Ersatz lebensnotwendiger Organfunktionen bei offenen Herzoperationen. Am häufigsten wird sie bei der aortokoronaren Bypassoperation eingesetzt. Darüber hinaus findet das Verfahren Anwendung zur Herz-Kreislaufunterstützung und zur Unterstützung bei pulmonalem Funktionsausfall bei akuter kardialer bzw. pulmonaler Dekompensation. Durch den Einsatz der EKZ im Rahmen einer elektiven aortokoronaren Bypassoperation, aber auch bei allen anderen Eingriffen, kommt es zu einer Reihe von Nebenwirkungen, d.h. pathophysiologischen Veränderungen im Organismus. Am bedeutsamsten hierbei ist eine reversible systemische Inflammation. Diese systemische Entzündungsreaktion während der EKZ ist für die Aktivierung von Endothelzellen und für die Adhäsion von polymorphkernigen Leukozyten verantwortlich (14, 52, 60).

Seit Mitte der 90er Jahre werden koronare Bypassoperationen auch ohne Verwendung der HLM als „off-pump coronary artery bypass“-Prozeduren (OPCAB) vorgenommen, um - neben der Vermeidung eines kardioplegischen Herzstillstands und der transversalen Aortenklammung - die inflammatorischen Nebenwirkungen der EKZ zu senken.

In vorausgegangenen Studien hat man eine Korrelation zwischen der Aktivität verschiedener endothelschädigender Krankheiten und der Prävalenz zirkulierender Endothelzellen (CECs) festgestellt (15, 18, 20, 21, 31, 33).

Die vorliegende Studie soll zeigen, dass die CECs auch als Marker für die Endothelschädigung in der Herzchirurgie dienen können. Darüber hinaus wurde untersucht, welche Beziehung zwischen den CECs und der apoptotischen Aktivität des Serums auf humane Endothelzellen bei Patienten, die entweder mit HLM oder mit dem OPCAB-Verfahren eine Myokardrevaskularisierung erhalten haben, besteht.

## 1.2 Das Endothel

### 1.2.1 Die Endothelmorphologie

Das vaskuläre Endothel kleidet als einschichtige Zellschicht luminal das gesamte Blutgefäßsystem aus und gehört zusammen mit der Basalmembran zur Tunica interna der Blutgefäße. Es besteht aus platten, flachkernigen, unregelmäßig begrenzten Zellen, die über Zellkontakte (gap- und tight-junctions) miteinander verbunden sind. In seinem Ausmaß ist das Endothel eines der größten Organe des menschlichen Körpers. Seine Oberfläche entspricht ungefähr der Ausdehnung von sechs Tennisplätzen, das Zellvolumen dem von fünf Herzen (72). Während Kapillaren nur aus Endothelzellen und der Basalmembran sowie meist den außen anliegenden Perizyten bestehen, weisen Arteriolen und Venolen sowie Arterien und Venen zwei weitere Schichten auf, nämlich die Tunica media, die aus glatten Muskelzellen besteht und unterschiedliche Mengen elastischer und kollagener Fasern enthält, und die Tunica adventitia (externa) aus überwiegend lockerem Bindegewebe, die als Verschiebeschicht mit dem angrenzenden Gewebe in Verbindung steht.

Es gibt unterschiedliche Anforderungen an das Endothel im Körper (72). Ein sogenanntes Schrankenendothel, charakterisiert durch ein zusammenhängendes Endothel und eine umgebende kontinuierliche Basalmembran, findet man beispielsweise in Gehirn, Lunge und Retina. In Geweben mit einem hohen Stoffaustausch (z.B. Darm, endokrine Drüsen, Niere) dagegen sind die Kapillaren mit Endothelzellen ausgebildet, die Fenestrationen mit Durchmessern zwischen 60 und 80 nm aufweisen. Die Wand von diskontinuierlichen Kapillaren, wie man sie in Leber, Milz und Knochenmark vorfindet, ist durch Lücken (>100 nm) zwischen den Endothelzellen, sowie, je nach Intensität des Stoffaustausches, durch eine diskontinuierliche oder fehlende Basalmembran gekennzeichnet.

Die Endothelzellen sind von einer extrazellulären Matrix umgeben, in der sie durch Integrine auf der Zelloberfläche bzw. Zellmembran verankert sind. Die extrazelluläre Matrix besitzt aber nicht nur eine mechanische Funktion zur Unterstützung und Aufrechterhaltung der Gewebestrukturen, sondern ist auch in wichtige zelluläre

Funktionen wie Migration, Proliferation und Differenzierung involviert. Auch bei der Bindung und Speicherung von Wachstumsfaktoren oder Proteinen, die Wachstumsfaktoren binden, spielt die extrazelluläre Matrix eine aktive Rolle. Daher ist ein Kontaktverlust der Endothelzellen mit der extrazellulären Matrix für die Zelle vital bedrohlich, d.h. kann zu einer Apoptose der Endothelzelle führen.

### **1.2.2 Die Endothelfunktion**

Früher dachte man, das Endothel habe lediglich eine Barrierefunktion. Inzwischen weiß man, dass es noch in zahlreichen weiteren Mechanismen involviert ist. Endothelzellen sind dynamische, systemisch disseminierte, heterogene Zellen mit synthetischen, sekretorischen, metabolischen und immunologischen Funktionen. Eine besonders wichtige Rolle spielen sie bei Entzündungsreaktionen, bei denen sich Endothelzellen voneinander lösen können und Leukozyten den Durchtritt in Entzündungsgebiete ermöglichen, sowie bei der Regulation des Gefäßdurchmessers. Sie produzieren die potenten Vasodilatoren Stickstoffmonoxid und Prostazyklin, den Vasokonstriktor Endothelin-1 und konvertieren Angiotensin I zu II (72). Die Balance zwischen diesen Mediatoren determiniert u.a. die Antworten des kardiovaskulären Systems bei Krankheiten wie Hypertension, Atherosklerose und Myokardinfarkt. Für die Regulation des Gefäßdurchmessers spielen auch die Perizyten eine wichtige Rolle, die zusammen mit den Endothelzellen von einer gemeinsamen Basalmembran umgeben werden (3). Man findet Perizyten vor allem an Gefäßen ohne glatte Gefäßmuskulatur (Arteriolen, Venolen und Kapillaren). Über gap junctions zwischen Endothelzellen und Perizyten erfolgt ein Informationsaustausch und über die Produktion vom transformierenden Wachstumsfaktor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) blockieren Perizyten die Fortbewegung und Proliferation von Endothelien.

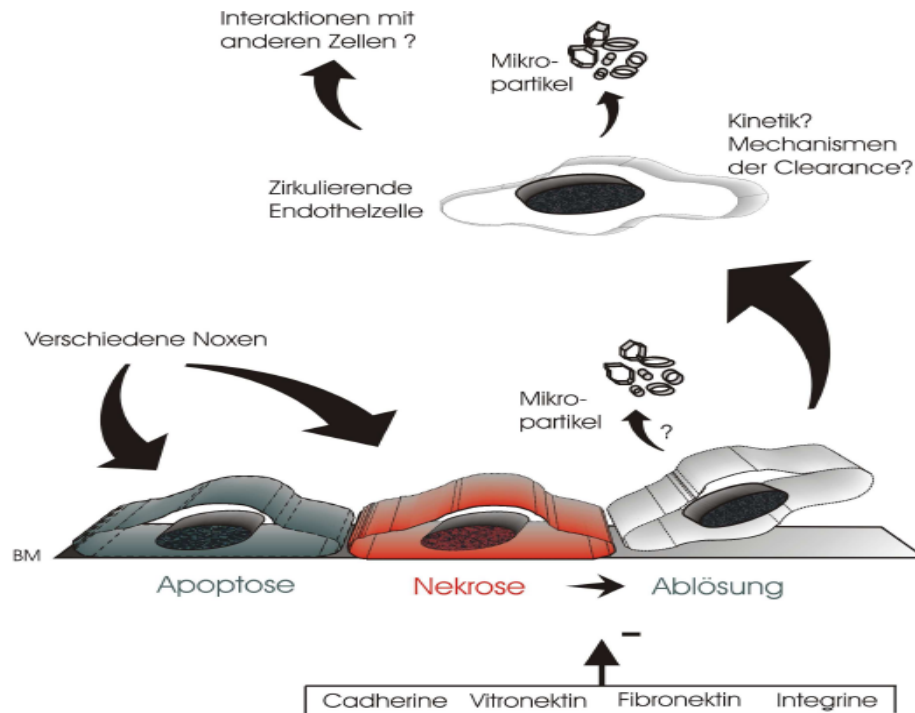
Die Endothelzellen besitzen zahlreiche Weibel-Palade-Körperchen, in denen u.a. der für die Adhäsion von Blutplättchen an Gefäßwandverletzungen notwendige von Willebrand-Faktor (vWF), sowie P-Selektin, welches die Adhäsion von Leukozyten im Rahmen inflammatorischer Prozesse vermittelt, nach ihrer Synthese gespeichert werden (20). Die Hochregulierung von endothelialen Adhäsionsmolekülen ist mit der



Ausschwemmung ihrer löslichen Fraktionen in den Blutkreislauf verbunden. Als Konsequenz können erhöhte Plasmakonzentrationen von löslichen Endotheladhäsinen gemessen werden - sie sind die einzigen zurzeit verfügbaren messbaren Marker für eine angestiegene Adhäsionsmolekülexpression (20, 21, 25). Gemessen werden die Adhäsionsmoleküle im Blut mittels ELISA (Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest bzw. Enzyme Linked Immunosorbent Assay).

### **1.3 Zirkulierende Endothelzellen und endotheliale Progenitorzellen**

Die Pioniere im Konzept CECs waren Bouvier und Hladovec, die non-hämatopoetische Zellen im peripheren Blut bei Tieren nach Endotoxininnokulation bereits Anfang der 70er Jahre anhand morphologischer Merkmale nachgewiesen haben (12, 33). Inzwischen wurden CECs bei weiteren Krankheitsbildern detektiert: Im Rahmen eines akuten Koronarsyndroms (39, 50, 53) oder einer koronaren Angioplastie (23), bei einer Sichelzellanämie (66, 67), bei einer chronisch venösen Insuffizienz (38), bei einer thrombotischen Thrombozytopenie (45), bei Infektionen mit Rickettsia conorii (21) und Zytomegalovirus (31, 55), beim Behcet Syndrom (15), beim Lupus erythematodes und bei ANCA-assoziierten Vaskulitiden (Anti-Neutrophile cytoplasmatische Antikörper) (76). Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit entzündlichen und renalen Erkrankungen oder mit einer Vaskulitis im Vergleich zu gesunden Probanden erheblich mehr CECs aufweisen. Bei Patienten mit Sichelzellanämie ergab sich, dass die Zahl der CECs bei aktiver Erkrankung deutlich ansteigt (67). In analoger Weise konnte nachgewiesen werden, dass die Zellzahl im Verlauf einer erfolgreichen immunsuppressiven Therapie fällt und somit mit der Krankheitsaktivität korreliert. Bei der systemischen Sklerose fand sich eine Korrelation der CECs mit den (erhöhten) Plasmaspiegeln der löslichen Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1, E- und P-Selektin (18). Diese Befunde sprechen dafür, dass eine chronische Aktivierung des Endothels zu einer Ablösung der Endothelzellen von der Basalmembran führen kann (Abbildung 1). Bezüglich des Phänotyps können sich CECs unterscheiden. Erste Untersuchungen zum Phänotyp dieser Zellen wiesen auf einen prokoagulatorisch-nekrotischen Phänotyp hin.

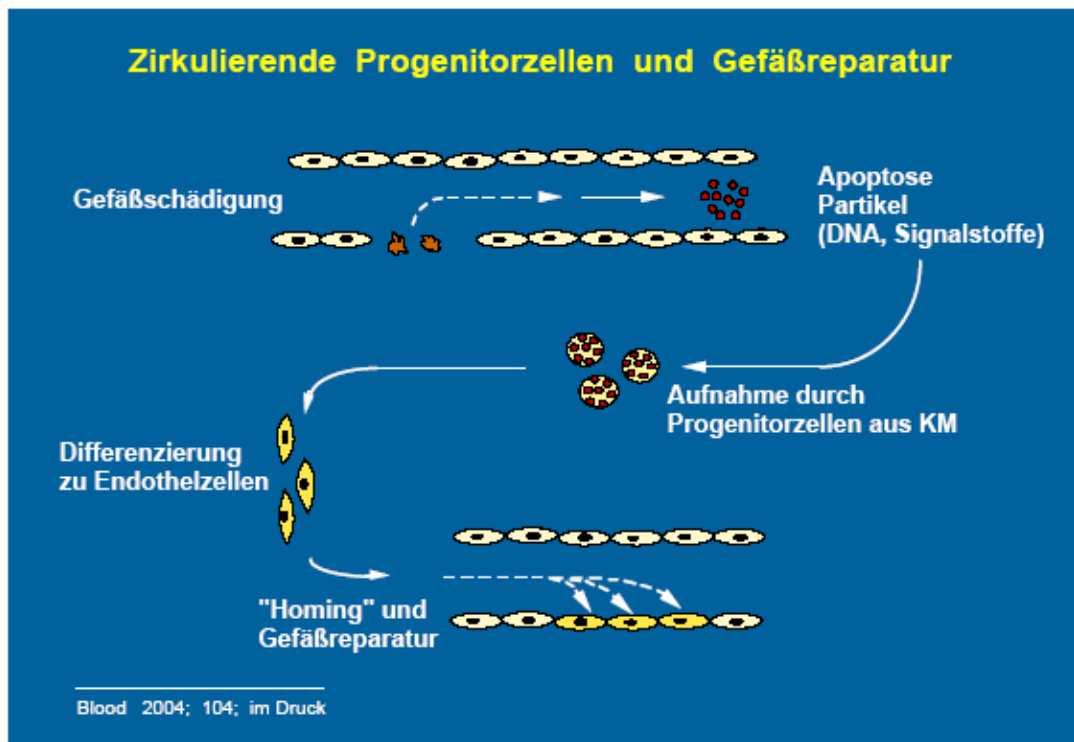


**Abbildung 1:** Endothelapoptose / Endothelnekrose und Ablösung der Endothelzellen von der Basalmembran (77)

Bei Sichelzellanämie, ANCA-assoziierten Vaskulitiden und akutem Koronarsyndrom wurde eine abnorme Expression von „Tissue-Faktor“ (Thromboplastin) bei CECs nachgewiesen, die zu einem chronischen prokoagulatorischen Status führt (76). Bei akutem Koronarsyndrom wurden intakte CECs isoliert und im Rahmen von entzündlichen Krankheiten waren nekrotische Zellen oder Zellmembranteile zu sehen (20).

Eine erhöhte Zahl an CECs fand man bei Patienten mit Zustand nach allogener hämatopoetischen Stammzelltransplantation als Hinweis für eine Endothelschädigung (78). Die hier auftretenden Komplikationen (entzündliche Reaktionen, veno-okklusives Syndrom, thrombotische Purpura, mikroangiopatische Anämie) sind mit einer Endotheldysfunktion assoziiert, die als Frühmarker für eine „Organdysfunktion“ angesehen werden (34). Die laborchemische Monitorisierung dieser Patienten hat bestätigt, dass das Serum eine apoptotische Aktivität an Endothelzellen besitzt, deren Maximum mit einer Abstoßungsreaktion korreliert. Als Marker für eine Endotheldysfunktion können CECs auch bei Vaskulitiden in nierentransplantierten

Patienten dienen (79, 80). Bei den mit Calcineurininhibitoren therapierten Patienten fand sich eine erhöhte Zahl an CECs als Hinweis für einen Endothelschaden. Die Zahl an CECs korrelierte zudem mit Serumspiegel von Cyclosporin A. Ansonsten spielen bei Nierentransplantierten die Endothelzellen die Hauptrolle, indem sie eine Barriere zwischen dem implantierten Organ und den zirkulierenden Immunzellen des Empfängers darstellen. Während einer Abstoßungsreaktion werden die Endothelzellen zu einem Ziel für die Immunattacken und nicht zuletzt für die Medikamente, wie z.B. die Calcineurininhibitoren. Es fand sich jedoch keine Korrelation zwischen Zahl der CECs, dem Tacrolimusspiegel, dem Geschlecht, dem Alter oder dem Serumkreatinin. Von den CECs sind CEPCs (zirkulierende endotheliale Progenitorzellen oder Vorläuferzellen) abzugrenzen.



**Abbildung 2:** Postnatale Angiogenese und Vaskulogenese. Rekrutierung Endothelzellen aus bestehenden Gefäßwänden und CEPCs spielen eine entscheidende Rolle bei der Regulation postnataler Angiogenese und Vaskulogenese (75)

Die zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen sind Zellen, die direkt aus dem Knochenmark in das Blut eingeschwemmt werden und der Reparatur von Gefäßen und der Neorevaskularisation dienen (57, 65). Der Phänotyp der CEPCs ähnelt dem des embryonalen Angioblasten. Sie haben die Fähigkeit zu zirkulieren, zu proliferieren und sich in erwachsene Endothelzellen zu differenzieren (Abbildung 2). Eine unkontrollierte Blutgefäßbildung spielt bei verschiedenen Erkrankungen, wie der diabetischen Retinopathie und der rheumatoiden Arthritis, vor allem aber beim Tumorwachstum und bei einer Metastasierung eine maßgebliche Rolle (28, 29).

Bereits 2003 haben Scheubel und Mitarbeiter nachgewiesen, dass die Anzahl der CEPCs während und nach einer ACVB-OP (aortokoronare venöse Bypassoperation) ansteigt, was als Hinweis für eine Endothelregeneration angesehen wird (61). Heute dienen VEGF-R2 (vaskulo-endothelialer Wachstumsfaktor-Rezeptor) und die Zelloberflächenmoleküle CD34 und CD133 ("Cluster of differentiation") als Marker für CEPCs (27, 30). Die Unterscheidung zwischen CEPCs, ausgereiften Endothelzellen und hämatopoetischen Zellen ist aber schwierig, da alle Zelllinien ähnliche Marker wie VEGF-R2 (=Flk1), VE-Cadherin oder CD34 exprimieren können. Unter bestimmten Umständen, wie fortgeschrittenem Alter, Diabetes oder Hypercholesterinämie, ist das Angiogenese-Potenzial herabgesetzt und die Ausschüttung von VEGF (Vaskulo-endothelialer Wachstumsfaktor) vermindert (40). Bei zusätzlicher Gabe von VEGF werden verstärkt CEPCs aus dem Knochenmark rekrutiert und die Neovaskularisation erhöht (6). Die Möglichkeit CEPCs nach Isolation auch *in vitro* zu vermehren und anschließend in ischämische Bereiche zu injizieren, um die Neovaskularisation zu stimulieren, stellt eine neue Therapieoption dar (40, 56). Auch durch Gabe von Statinen kann die Anzahl der aus dem Knochenmark rekrutierten CEPCs erhöht werden (8, 16). Das Wachstum und die Differenzierung dieser Progenitorzellen zu reifen Endothelzellen werden nach Aufnahme der Apoptosepartikel stimuliert (75). Diese differenzierten Zellen könnten dann durch entsprechende Oberflächenmoleküle, "molekulare Adressen", an die gewünschten (geschädigten) Stellen des Gefäßsystems gelenkt werden. Ein Ziel der gegenwärtigen Forschung ist es, die Anzahl und das Differenzierungspotential dieser Progenitorzellen für die Regeneration des Gefäßsystems zu steigern und die genaue "Adressierung" zu verbessern.

Insgesamt ist jedoch über eine mögliche pathophysiologische Bedeutung zirkulierender

Endothelzellen und ihren Weg im Blut, wo sie in Relation zu den anderen Blutzellen nur einen kleinen Anteil ausmachen, noch sehr wenig bekannt.

## **1.4 Endothelzellapoptose**

Die Apoptose ist der sogenannte programmierte Zelltod. Sie ist ein sehr gut kontrollierter Bioprozess, um die beschädigten Zellen zu entfernen und diese durch andere zu erneuern (68). Die Endothelapoptose findet sowohl während der Embryonalentwicklung als auch im adulten Organismus statt. Im Gegensatz zur Nekrose versteht man unter Apoptose einen aktiven, biochemisch regulierten Prozess, welcher keinen Zelltod von Nachbarzellen und keine Entzündungsreaktionen auslöst. Bei dieser zellulären "Selbstzerstörung" spielen die Mitochondrien eine Schlüsselrolle durch Freisetzung von Caspase-Aktivatoren (z.B. Cytochrom C), Veränderungen im Elektronentransport, Verlust des mitochondrialen Membranpotentials sowie veränderte zelluläre Redox-Reaktionen. Eine Fehlregulierung der Apoptose kann sowohl zu Tumoren und Autoimmunerkrankungen als auch zu Gewebezerstörungen führen. Apoptose ist charakterisiert durch morphologische Veränderungen der Zelle. Die Zelle schrumpft, löst sich aus ihrem Zellverband und es kommt zur Bildung apoptotischer Bläschen an der Zelloberfläche. Gleichzeitig erfolgt eine Kondensation des Chromatins in der Nähe der inneren Kernmembran (Kernwandhyperchromatose). Der Kern zerfällt in Fragmente und schließlich auch die Zelle in zahlreiche membranumschlossene, organellenreiche Teile, die sogenannten apoptotischen Körperchen (75). Apoptotische Körperchen werden von Nachbarzellen oder Makrophagen phagozytiert.

Im adulten Organismus ist die Apoptose von Endothelzellen quasi der Gegenspieler zur Neovaskularisierung. Pro-angiogene Faktoren wie beispielsweise VEGF und fibroblastischer Wachstumsfaktor verhindern eine endotheliale Apoptose. Endothelzellen können daher bei Fehlen von VEGF in Richtung Apoptose gehen. Außerdem induziert VEGF eine erhöhte Permeabilität und erhöht die Expression von proteolytischen Enzymen in Endothelzellen (24). Apoptotische Endothelzellen setzen Interleukin-1 (IL-1) frei, welches auf der einen Seite die Apoptose von Endothelzellen induzieren, auf der

anderen Seite aber beispielsweise die Endozytose von apoptotischen Körperchen durch benachbarte Endothelzellen steigern kann.

Im Rahmen von entzündlichen Prozessen spielen die Neutrophilen, Zytokine und Proteasen eine besondere Rolle. Die extrazelluläre Matrix (Vitronectin, Fibronectin, Cadherin) verankert die Endothelzellen, wodurch eine Endothelapoptose verhindert wird (9, 59). In vitro induzieren entzündliche Stimuli und proatherosklerotische Faktoren bei Endothelzellen Apoptose, während antiatherosklerotische Faktoren vor der Endothelzellapoptose schützen.

Man muss annehmen, dass im Zytoplasma und auf der Zellmembran der Zellen von der initialen Schädigung über Nekrose / Apoptose bis zur Ablösung von der Basalmembran zahlreiche noch unbekannte Aktivierungsvorgänge ablaufen. Somit sind der Vorgang der Ablösung der Endothelzellen von der Basalmembran und ihr Weg im peripheren Blut gegenwärtig noch völlig unklar.

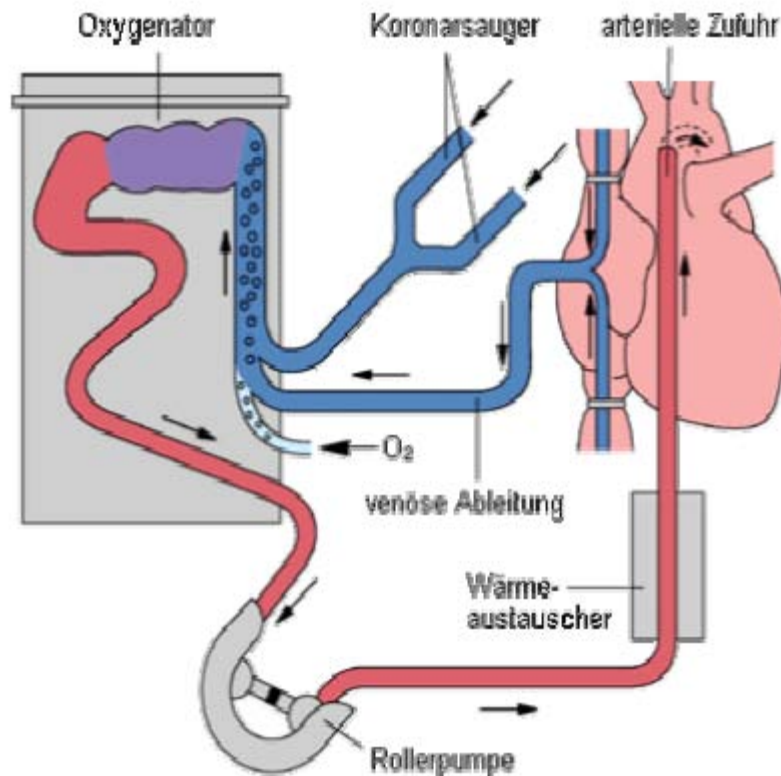
## **1.5 Extrakorporale Zirkulation**

### **1.5.1 Prinzip der EKZ**

Ein zentrales Instrument der Herzchirurgie ist die HLM, mit der die extrakorporale Zirkulation durchgeführt wird. Mit ihrer Hilfe können Herz und Lunge aus dem Kreislauf ausgeschaltet und Korrekturen am stillgelegten Herzen durchgeführt werden. Erstmals wurde eine HLM 1953 in den USA eingesetzt. Im Laufe der vergangenen Jahrzehnte wurde diese Technik zum Routineverfahren weiter entwickelt und hat sich in allen deutschen herzchirurgischen Abteilungen und Kliniken etabliert (44, 62). Die EKZ wird bei nahezu allen herzchirurgischen Eingriffen einschließlich der aortokoronaren Bypass-Operation, dem Herzklappenersatz oder der Korrektur angeborener Herzfehler angewendet.

### 1.5.2 Durchführung der EKZ

Zu den Grundkomponenten der EKZ gehören die venöse Abflussleitung, ein Reservoir, ein Oxygenator mit integriertem Wärmetauscher, ein arterieller Filter, eine Pumpe und die arterielle Zufuhrleitung (Abbildung 3).



**Abbildung 3:** Herz-Lungen-Maschine: Schema der extrakorporalen Zirkulation (44)

Der extrakorporale Bypass wird zunächst mit einer ausgeglichenen Salzlösung gefüllt, um den Hämatokrit auf 20-25 % zu verdünnen. Diese Hämodilution verringert den Bedarf an Blutkonserven, reduziert die Traumatisierung von Blutzellen und Plasmaproteinen und erhöht die Urinausscheidung und die Kreatininclearance. Sie senkt allerdings auch den intravaskulären onkotischen Druck und führt somit zu einer stärkeren interstitiellen Ödembildung. Vor dem Beginn der EKZ muss eine Antikoagulation mit ungefähr 400 IE Heparin/kg durchgeführt werden. Über die

drainierenden Kanülen im rechten Vorhof, in den beiden Hohlvenen oder der V. femoralis fließt das Blut mittels Schwerkraft über das Reservoir in einen Gasaustauscher (Oxygenator). Darauf wird das Blut von Kohlendioxid befreit und mit Sauerstoff angereichert. Somit dient der Oxygenator grundlegend als Ersatz der Gasaustauschfunktion der Lunge. Das Oxygenatorsystem ist mit einem Wärmetauscher ausgestattet, der das Blut abkühlen und erwärmen kann. Die zwischengeschalteten Filter der HLM sind erforderlich, um Partikel wie Erythrozytenfragmente, Thrombozytenaggregate oder Leukozyten zurückzuhalten.

Zudem wird das Einströmen von Fett-, Luft- oder Stoffpartikeln in den Körperkreislauf verhindert. Das aus dem venösen Zufluss passiv eingeströmte Blut muss nach der HLM-Passage aktiv in den Patientenkreislauf zurückgepumpt werden. Dazu stehen verschiedene Arten von Pumpen zur Verfügung. Die zurzeit am häufigsten eingesetzte ist die Roller-Pumpe, die zu einem kontinuierlichen, nichtpulsatilen Blutfluss führt. Zusätzlich werden Pumpen mit Sogfunktion benutzt. Dazu gehört der sogenannte „Vent“, eine Pumpe zum Absaugen des Blutes aus dem Ventrikel, und der Kardiotomiesauger, eine Pumpe zum Absaugen von Blut aus dem Operationsfeld. Nach Passage der HLM wird das Blut über eine in der Aorta oder in der Arteria femoralis liegende Kanüle in den arteriellen Kreislauf des Patienten zurückgepumpt. Bei normaler Körpertemperatur liegt der notwendige Flussindex bei ca. 2,3 - 2,5 l/min/m<sup>2</sup>.

Kurzdauernde Eingriffe werden überwiegend in Normothermie durchgeführt. Längerdauernde Eingriffe werden in Hypothermie durchgeführt, wobei der Grad der Hypothermie von der Art, Komplexität und der voraussichtlichen Dauer des Eingriffs abhängig ist. Eine moderate Hypothermie von 28 - 32°C ist sinnvoll, wenn eine Ischämiezeit > 1 h erwartet wird, während bei Ischämiezeiten bis zu und über 2 h der Patient auf unter 28°C gekühlt werden sollte (62). Die Hypothermie führt zu einer vorteilhaften Verlangsamung der Stoffwechselprozesse, so dass weniger Sauerstoff- und Substratangebot notwendig ist. Daher kann, in Abhängigkeit von der Temperatur, das Flussvolumen der HLM erheblich reduziert werden, was zugleich den Vorteil hat, dass das Operationsgebiet blutleerer und übersichtlicher wird.

Während der EKZ müssen in kurzen Abständen die Gerinnungsparameter kontrolliert werden, ebenso wie Blutfluss, systemarterieller und -venöser Druck, Temperatur, Urinausscheidung, Blutgase, Elektrolyte, Blutzucker, Hämatokrit. Nach Beendigung der



EKZ wird das Herz dekanüliert und die Antikoagulation wird durch die Gabe von Protaminsulfat aufgehoben (44, 62).

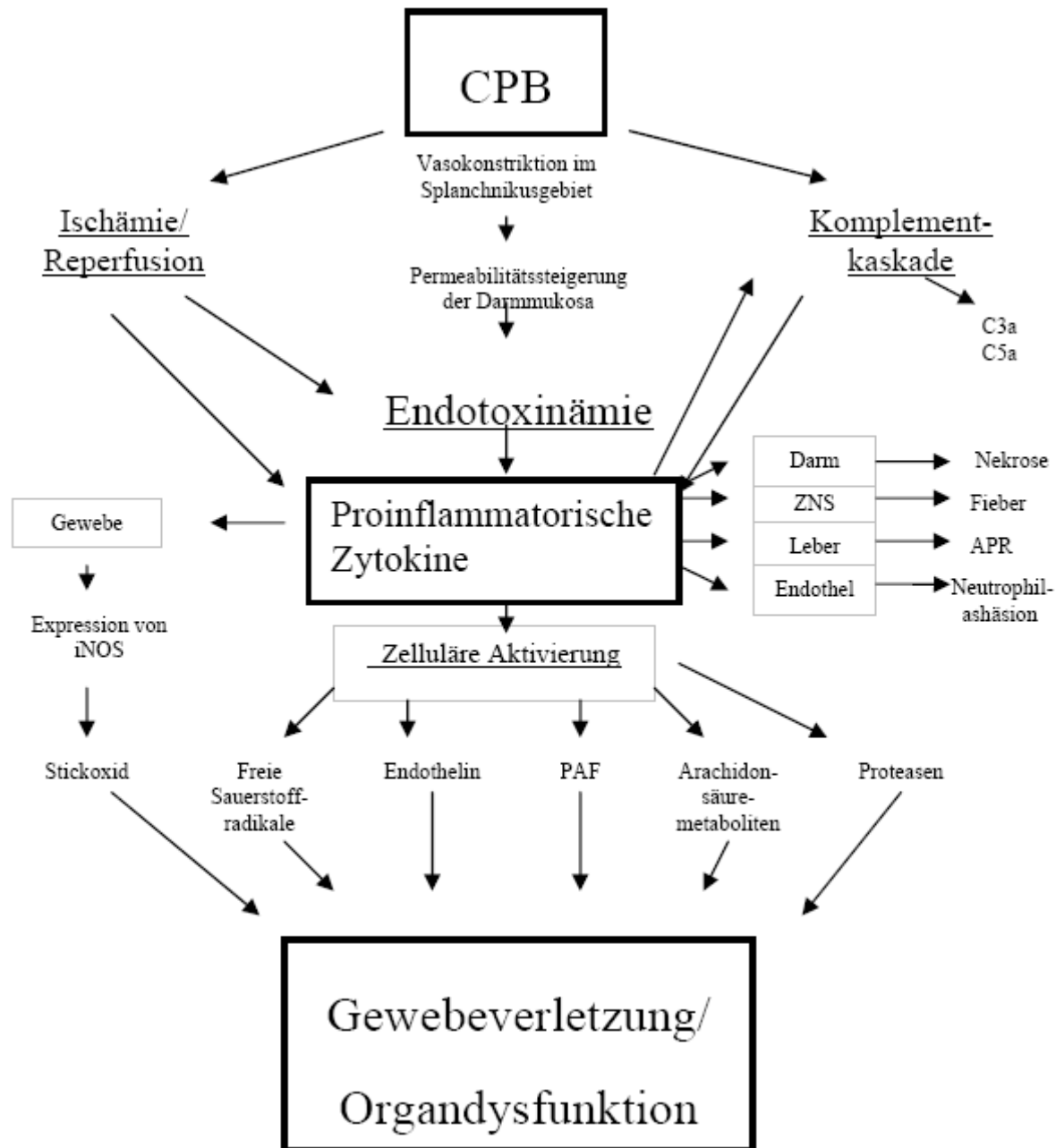
### **1.5.3 Auswirkungen der EKZ**

Wie viele andere diagnostische und therapeutische unphysiologische Eingriffe führt auch die EKZ zu mannigfaltigen Nebenwirkungen einschließlich einer unerwünschten systemischen Entzündungsreaktion (54, 60, 62). Schon 1973 wurden ultrastrukturelle Veränderungen in Organen von Patienten beschrieben, die unter Anwendung einer EKZ operiert wurden (42).

Der Einsatz der EKZ bedingt eine Vollheparinisierung, eine Hämodilution, eine eventuelle Hypothermie, sowie einen nichtpulsatilen Fluss. Das Blut erhält Kontakt zu nichtepithelialen Oberflächen (insbesondere im Oxigenator) und ist abnormen Scherkräften ausgesetzt. Hierdurch werden alle korpuskulären Blutbestandteile und Proteine mehr oder weniger in Mitleidenschaft gezogen. Klinisch bedeutsam sind die Hämolyse der Erythrozyten, die Degranulierung und Verklumpung der Thrombozyten, wodurch deren Zahl und Integrität abnehmen, die Stimulation der Gerinnungs- und Fibrinolysekaskaden, die Aktivierung des Komplementsystems sowie die Freisetzung inflammatorischer Substanzen, welche zu einer SIRS („systemic inflammatory response syndrome“) führen können (Abbildung 4).

Nachdem Herz und Lunge nach Öffnung der Aortenklemme ihre physiologische Funktion wieder aufnehmen und reperfundiert werden, werden aus diesen ischämischen Organen zudem pathogene Moleküle wie z.B. freie Sauerstoffradikale freigesetzt. Klinisch kann sich dieses Geschehen, das mittlerweile unter dem Begriff „Postperfusionssyndrom“ subsumiert wird, vor allem als multiple Organfunktionsstörungen manifestieren. Hier sind besonders das kardiovaskuläre System, die Lungen und die Nieren betroffen. Klinisch äußert sich dies in einem Temperaturanstieg, einer Leukozytose und einer gesteigerten Kapillarpermeabilität („capillary leak syndrome“) mit Ödemneigung und sekundären Organfunktionsstörungen (Lunge, Niere, Gehirn, Darm). Diese Effekte sind von der Dauer der EKZ abhängig und betreffen Säuglinge, Kleinkinder und ältere Menschen besonders stark. In den letzten

Jahren wurde deutlich, dass dabei auch das Herz nicht unwesentlich mitbetroffen ist (35).



**Abbildung 4:** Systemisches Inflammationsreaktionssyndrom (SIRS) nach EKZ (CPB = Cardiopulmonaler Bypass; APR = Akute-Phase-Reaktion; iNOS = induzierbare Stickoxidsynthase; PAF = Plättchenaktivierender Faktor) (44, 54)

Man vermutet, dass diese Organschädigungen für die heute noch verbliebene Letalität und Morbidität nach herzchirurgischen Eingriffen verantwortlich zu machen sind.

Es werden verschiedene Faktoren diskutiert, die diese Inflammation induzieren. Zum einen der Kontakt des Blutes mit unphysiologischen Oberflächen und abnormalen Druck- und Scherkräften während der Passage durch die Herz-Lungen-Maschine, zum anderen das chirurgische Trauma, die Ischämie-Reperfusion der Organe, Veränderungen der Körpertemperatur, sowie die Freisetzung von Endotoxin. Neben dem Kontakt mit der Oberfläche der EKZ ist auch die Berührung mit negativ geladenen subendothelialen Strukturen wie Kollagenfasern während des Operationsgeschehens ein auslösender Faktor. Andere Pathomechanismen wie z.B. Mikroembolien und die Bildung von Gasbläschen im OP-Gebiet verstärken diese pathogenen Effekte. Welchen Stellenwert die nichtpulsatile Perfusion hat, ist bislang unklar.

Es wird vermutet, dass ein pulsatiler Fluss, der aber nur mit wenigen Herz-Lungen-Maschinen möglich ist, zu einer geringeren Vasokonstriktion und damit besseren Mikrozirkulation und zu einer verminderten Ödemneigung führt (62).

Das konventionell angewendete Heparin hindert zwar die sichtbare Thrombenentstehung, jedoch behindert es nicht die Aktivierungen einzelner Schritte in der Gerinnungskaskade, welches „per se“ bereits einen schweren Schaden darstellen kann. Alternative Wege, um die komplexe Gerinnungskaskade trotz der klinischen Umstände schadungsfrei zu erhalten, sind Gegenstand der Forschung.

Zusammenfassend lässt sich somit konstatieren, dass die EKZ durch eine systemische Entzündungsreaktion mit Aktivierung des körpereigenen Immunsystems und mit Freisetzung von Entzündungsmediatoren und gleichzeitigen Veränderungen der zellulären Immunität charakterisiert ist. Die typischen Folgeerscheinungen postoperativ sind eine verlängerte postoperative Beatmungszeit und (meist transiente) neuropsychologische Dysfunktionen im Sinne von kognitiven Defiziten. Hieraus resultieren eine verlängerte Regenerationsdauer und ein verlängerter Krankenhausaufenthalt für die operierten Patienten.

## 1.6 Myokardrevaskularisation mit und ohne EKZ

Seit Mitte der 90er Jahre werden koronare Bypassoperationen nicht nur unter Verwendung der HLM, sondern auch ohne EKZ als OPCAB-Prozeduren vorgenommen (5, 47). Diese Koronareingriffe ohne EKZ gehören zu den minimalinvasiven Eingriffen und haben den Vorteil, dass die Nebenwirkungen bzw. Gefahren der HLM entfallen und dadurch auch Patienten operiert werden können, bei denen das Standardverfahren z. B. aufgrund eines Blutungsrisikos kontraindiziert ist (Tabelle 1).

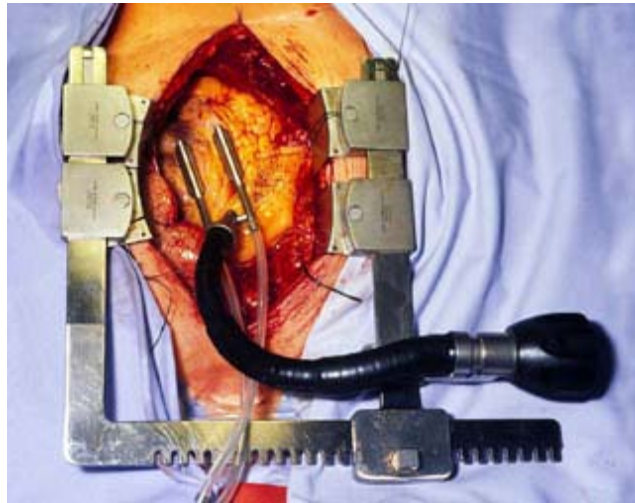
Mit Herz-Lungen-Maschine (Standardverfahren)	Ohne Herz-Lungen- Maschine (OPCAB)
Schlechte Zielgefäße	Blutungsproblematik/Gerinnungsstörung
Intramuraler Koronarverlauf	Ischämieproblematik (pAVK, Karotisstenose)
Offene Endarterektomie	Porzellanaorta
Großes Herz	Schlechte LV-Funktion
Zusatzeingriff	Einfache Stenosekonstellation

**Tabelle 1:** Vorteile der beiden Operationsverfahren bzw. deren bevorzugte Anwendung bei Koronarrevaskularisationen (62)

Zahlreiche Vergleichsstudien zwischen der konventionellen Bypasschirurgie und der OPCAB-Chirurgie und deren Metaanalysen zeigten dabei keine Überlegenheit der OPCAB-Verfahren hinsichtlich der perioperativen Letalität und anderer Parameter (70, 73). Eine Überlegenheit der OPCAB-Chirurgie ist jedoch bezüglich des Auftretens von Rethorakotomien, des perioperativen Blutverlustes, der Beatmungszeit, der Transfusionspflichtigkeit und folglich der Intensiv- und Krankenhausliegedauer sowie des Ressourcenverbrauchs in manchen Studien erkennbar (49, 58, 64).

Der wesentliche Unterschied zur Standardtechnik besteht darin, dass bei der OPCAB-Operation am schlagenden Herzen ohne Einsatz der HLM operiert wird (Es steht zu

jeder Zeit eine HLM bereit, um gegebenenfalls zur konventionellen Methode wechseln zu können). Der Zugang zum Herzen erfolgt wie bei der Standardtechnik über eine Durchtrennung des Brustbeines, die Sichtverhältnisse für den Operateur sind also identisch. Wie auch bei der Standardtechnik wird meist die linke Arteria thoracica interna auf Ramus interventrikularis anterior angelegt (Abbildung 5).



**Abbildung 5:** Das Operationsfeld bei einer OPCAB-Operation. Der Stabilisator minimiert durch Druck und Sog die Bewegungen des Herzmuskels an der Stelle, an der der Bypass aufgenäht wird (5)

Darüber hinaus können wie bei der konventionellen Methode auch weitere Bypässe angelegt werden (Abbildung 6). Als arterielle Bypässe kommen die rechte Brustwandarterie oder eine Arteria radialis in Frage, venöse Bypässe werden aus oberflächlichen Beinvenen angelegt. Die Koronargefäße werden im Prinzip wie bei den konservativen Operationstechniken anastomosiert. Allerdings kann das Auffinden des richtigen Koronargefäßes z.B. bei einer ausgeprägten epikardialen Fettschicht oder einem intramuralen Verlauf schwierig, wenn nicht sogar unmöglich sein. Darüberhinaus können die epikardialen Präparationen zu unangenehmen Sickerblutungen führen (62). Typische Komplikationen der konventionellen Koronarchirurgie (perioperative Myokardinfarkte, Rethorakotomien wegen Nachblutung oder die perioperative Letalität),

lassen sich mit OPCAB-Technik sicherlich nicht generell senken, obwohl das Ausmaß HLM-induzierter systemischer inflammatorischer Aktivierung durch Verzicht auf EKZ signifikant reduziert werden kann (17).



**Abbildung 6:** Hinterwandexposition am schlagenden Herzen (17)

Tendenziell zeichnet sich jedoch für OPCAB-Eingriffe positiv ab, dass besondere Risikogruppen vom OPCAB-Verfahren teilweise auch signifikant profitieren können (70, 73). Dies trifft insbesondere für Patienten mit hohem neurologischen perioperativen Risiko zu (zum Beispiel bei Z. n. Schlaganfall, bei intra- oder extrakraniellen Stenosen der hirnversorgenden Arterien, bei Arteriosklerose der Aorta ascendens), für Patienten mit Organdysfunktionen (beispielsweise chronisch kompensierter Niereninsuffizienz) oder bei fortgeschrittenem Alter. Bei multimorbiden Patienten mit schwersten Koronarveränderungen kann es sinnvoll sein, nur das wichtigste Gefäß in OPCAB-Verfahren zu versorgen und anschließend die anderen Koronarstenosen unter dem Schutz des neuen Koronarbypasses zu dilatieren (s.g. „Hybridverfahren“) (62).

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Patientenkollektiv und Studienprotokoll**

Bei der vorliegenden Studie handelte es sich um eine prospektive Untersuchung. Das hierfür benötigte Studienprotokoll wurde durch die Ethikkommission genehmigt. Nach vorheriger Aufklärung und schriftlicher Einverständniserklärung wurden insgesamt 30 Patienten, die sich an der Universitätsklinik Regensburg einer elektiven ACVB-OP unterzogen, in diese Studie aufgenommen. Dieses Patientenkollektiv wurde in 2 Gruppen aufgeteilt:

#### **Gruppe A** (OPCAB-Patientenkollektiv)

bestand aus 15 Patienten, die am schlagenden Herzen, ohne Einsatz der HLM (in s.g. OPCAB-Verfahren) operiert wurden.

#### **Gruppe B** (HLM-Patientenkollektiv)

bestand auch aus 15 Patienten, die einer Myokardrevaskularisierung mit Zuhilfenahme der Herz-Lungen-Maschine unterzogen wurden.

Es wurden 21 Männer und 9 Frauen untersucht. Das Durchschnittsalter betrug 67,4 Jahre (Altersspanne 59 bis 75 Jahre).

Als **Kontrollgruppe** dienten 10 gesunde 20-30-jährige Probanden.

#### **Als Ausschlusskriterien galten:**

- Ein Höchstalter von 75 Jahren (aufgrund des Komorbiditätsrisikos)
- Patienten mit einer Niereninsuffizienz (pathologischen Harnstoff- oder Kreatininwerte)
- Patienten mit Diabetes mellitus
- Patienten unter Steroidbehandlung

- Eine hämodynamische Instabilität oder Notfallsituation (Myokardiale Zellschädigung möglich)
- Präoperative Katecholamingabe oder mechanische Kreislaufunterstützung
- Patienten mit abgelaufenen Infektionen .

Die Patientencharakteristika und Einzelheiten über den perioperativen Verlauf sind der unterliegenden Tabelle zu entnehmen (Tabelle 2).

<b>Patientendaten</b>	<b>Gruppe A (OPCAB)</b>	<b>Gruppe B (HLM)</b>	<b>Signifikanz (p)</b>
<b>Alter</b>	<b>66,4 ± 9,8</b>	<b>69,2 ± 9,7</b>	<b>n.s.</b>
<b>Geschlecht (w/m)</b>	<b>11/4</b>	<b>10/5</b>	<b>n.s.</b>
<b>EuroSCORE</b>	<b>3,9 ± 2,1</b>	<b>4,6 ± 2,3</b>	<b>n.s.</b>
<b>Pumpfunktion LV–EF (%)</b>	<b>65 ± 9</b>	<b>68 ± 7</b>	<b>n.s.</b>
<b>BMI/Adipositas</b>	<b>24,7 ± 5,2</b>	<b>26,6 ± 3,7</b>	<b>n.s.</b>
<b>OP-Zeit (Min.)</b>	<b>167 ± 21</b>	<b>202 ± 34</b>	<b>0,041</b>
<b>Ischämiezeit (Min.)</b>	<b>-</b>	<b>52,1 ± 21</b>	
<b>Bypasszeit (Min.)</b>	<b>-</b>	<b>95,2 ± 25</b>	
<b>Grafts (Durchschnittszahl)</b>	<b>1,9 ± 0,9</b>	<b>2,2 ± 0,8</b>	<b>n.s.</b>
<b>LIMA-Verwendung (%)</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>n.s.</b>
<b>Beatmungszeit (Stunde)</b>	<b>8,2 ± 4,2</b>	<b>13,6 ± 1,8</b>	<b>0,046</b>
<b>Intensivstation &gt; 24 h</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>n.s.</b>
<b>Blutverlust (ml)</b>	<b>515 ± 63</b>	<b>581 ± 144</b>	<b>n.s.</b>

**Tabelle 2:** Demographische und perioperative Daten



## **2.2 Studienablauf**

### **2.2.1 Narkoseeinleitung**

Alle Patienten erhielten eine intravenös geführte Narkose bestehend aus Fentanyl 5 µg/kg (Fentanyl-Janssen<sup>®</sup>, Janssen GmbH, Neuss), Etomidate und Pancuronium 100 µg/kg. Die Narkose wurde in Form einer kontinuierlichen, intravenösen Infusion mit 3,0-5,0 µg/kg/h Propofol (Disoprivan<sup>®</sup>, Zeneca GmbH, Plankstadt) und intermittierenden Bolus-Gaben von Fentanyl (bis zu 20 µg/kg) und Pancuronium (50 µg/kg) aufrechterhalten. Als inhalatives Agent wurde Enfluran verwendet. Die Beatmung erfolgte mit einer inspiratorischen Sauerstoffkonzentration von 40% in Luft (FiO<sub>2</sub> 0,4).

### **2.2.2 Operationstechnik**

#### **Gruppe A (OPCAB):**

Nach Desinfektion und steriler Abdeckung des Patienten, erfolgte eine mediane Sternotomie. Die linke A. thoracica interna wurde präpariert und zur Implantation vorbereitet und bis zur weiteren Verwendung in eine Nitroprussid-getränkte Kompresse gepackt. Simultan dazu wurde ein Segment der Vena saphena magna am Ober- und/oder Unterschenkel entnommen. Nach Eröffnen des Perikards wurden 2 oder 3 Zugnähte am postero-lateralen Herzbeutel platziert, um das Herz zu luxieren.

Alle Patienten erhielten Heparin (Liquemin N 25000, Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wihlen, Deutschland) in einer Dosis von 150 IE/kg, um einen ACT-Wert („activated clotting time“) von > 250 s zu erreichen, sowie Tranexamsäure in einer Dosis von 2 mg/kg/h). Mit Zuhilfenahme des Stabilisators wurden die Bewegungen des Herzmuskels an der Stelle, an der der Bypass aufgenäht wurde, minimiert. Das Zielgefäß wurde mittels eines filzarmierten Tourniquets proximal an der Anastomosierungsstelle temporär okkludiert und ein intrakoronarer Shunt bis zur Fertigstellung der Anastomose eingelegt. Nach Anlage der Anastomose der linken A. thoracica interna auf den Ramus interventrikularis anterior wurden die venösen

Bypassanastomosen angelegt. Die zentrale Anastomose der venösen Bypässe an der Aorta ascendens erfolgte nach partieller Ausklemmung der aufsteigenden Aorta. Hiernach wurde Heparin mittels Protamin (Protamin ICN, 1000 I.E./ml, ICN, Frankfurt/Main, Deutschland) in einem Verhältnis 1 : 1 antagonisiert, um den ACT-Wert zu normalisieren. Nach subtiler Blutstillung wurde das Sternum wieder verschlossen. Bei allen Operationen wurde ein Cell-Saver angewandt, um den Bedarf an Blutübertragungen zu minimieren.

### **Gruppe B (HLM-Gruppe):**

Die Eröffnung des Brustkorbs und die Präparation der Bypassgefäße erfolgten in analoger Weise zum OPCAB-Verfahren. Die systemische Antikoagulation wurde mit 300 IE/kg Heparin intravenös durchgeführt und über die repetitive Messung der ACT kontrolliert, um einen ACT-Wert > 400 s aufrechtzuerhalten. Die Patienten in dieser Gruppe erhielten ebenfalls 2 mg/kg/h i.v. Tranexamsäure. Nach der Perikardiotomie wurden die großen Gefäße präpariert, Aorta und rechter Vorhof an die EKZ angeschlossen. Das HLM-System bestand aus einer venösen 2- Stufen-Kanüle, einem venösen Reservoir, einer Roller-Pumpe (HL30®, Jostra, Hirrlingen, Deutschland), Membranoxygenator (Quadrox®, Jostra, Hirrlingen, Deutschland) und einem arteriellen 40 µm-Filter (Pall Biomedical, NY, USA). Als "Priming" wurden 1,5 l Ringerlösung verwandt. Der kardiopulmonale Bypass wurde in Normothermie durchgeführt. Die Flußrate lag bei 2,4 l/m<sup>2</sup> Körperoberfläche. Es wurde ein mittlerer arterieller Druck von 55-65 mmHg aufrechterhalten. Der Hämatokrit wurde auf Werte zwischen 22-25 % abgesenkt. Nach Querabklemmung der Aorta wurden 2 l kalter Kardioplegielösung (Bretschneider-HTK, Köhler, Alsbach, Deutschland) antegrad über die Aortenwurzel infundiert. In identischer Weise zur OPCAB-Gruppe erhielten alle Patienten einen A. thoracica interna-Bypass auf den Ramus interventrikularis anterior und Venenbypässe auf die anderen Koronargefäße. Die zentralen aorto-venösen Anastomosen erfolgten während der Reperfusionsphase am schlagenden Herzen. Die Heparinantagonisierung erfolgte mit Protamin (1,0-1,2 mg auf 1 mg Heparin) nach Entfernung der venösen Kanüle. Nach sicherer Hämostase wurde der Wundverschluß in analoger Weise durchgeführt. Ein Cell Saver bereitete das HLM-Blut zur Retransfusion auf, die Erythrozytensuspension wurde retransfundiert.

### **2.2.3 Perioperatives Management**

Nach Beendigung des Eingriffs wurden die Patienten mit stabilen hämodynamischen Parametern auf die perioperative Intensivstation verlegt. Das postoperative Management war in beiden Patientenkollektiven identisch. Alle Patienten wurden über mindestens 2 Stunden beatmet. Die Entwöhnung von der maschinellen Beatmung erfolgte mit der „intermittent mandatory ventilation“ (IMV), die neben der maschinellen Beatmungsform auch eine Spontanatmung zulässt. Mit wachsender Vigilanz wurde eine assistierte Beatmung mit CPAP („continous positive airway pressure“) durchgeführt. Sobald die Blutgasanalyse zufriedenstellend und die Vigilanz ausreichend waren, wurden die Patienten extubiert.

### **2.2.4 Messzeitpunkte**

Die Blutabnahmen erfolgten zu definierten Zeitpunkten aus dem peripheren Blut. Hierzu wurden jeweils zwei 9 ml EDTA-Röhrchen verwendet. Mit dem ersten Röhrchen erfolgte die Detektion der CECs, mit dem zweiten Röhrchen die Bestimmung der Apoptoseaktivität des Patientenserums.

Die Blutentnahme musste vorsichtig erfolgen, um eine durch Gefäßmanipulation verursachte Detektion von CECs zu vermeiden. Vor Abnahme der EDTA-Röhrchen wurde 2 ml Blut für eine routinemäßig durchgeführte Blutgasanalyse entnommen, erst dann wurde vorsichtig und langsam das Blut für die CECs - Isolierung abgenommen.

Die Blutabnahmen erfolgten zu folgenden Zeiten:

- Präoperativ vor der Narkoseeinleitung.
- Zum Zeitpunkt des Abganges von der HLM (in Gruppe B) oder nach Fertigstellung der letzten Anastomose in Gruppe A (OPCAB).
- 1, 6, 12, 24 und 48 Stunden postoperativ.

Bei den 10 gesunden Probanden der Kontrollgruppe wurden ebenfalls je zwei 9 ml EDTA-Röhrchen gewonnen und sie dienten als Kontrollproben.

## **2.3 Isolierung der CECs aus dem Blut**

### **2.3.1 Prinzip**

Die immunomagnetische Isolierung gewährleistet eine gute Sensitivität und Spezifität bei vertretbarem Aufwand. Sie eignet sich in besonderer Weise für die Isolation seltener Zellen (Tumorzellen, Leukämiezellen) aus dem Blut und anderen Körperflüssigkeiten (21, 32). Da CECs in Relation zu allen anderen Blutzellen ebenfalls um einige Größenordnungen seltener vorkommen, wird die immunomagnetische Isolierung seit einigen Jahren auch zur Isolierung von CECs verwandt (20, 26). Erstmals wurde diese Bestimmungsmethode zur Isolierung von CECs bei Patienten mit Rickettsiosen und Myokardinfarkt etabliert (21, 53). Normalerweise beträgt die Konzentration der CECs im peripheren Blut bei Gesunden 0 bis 10/ml (20).

Grundlage dieser Nachweismethode sind paramagnetische DynaBeads aus Polystyren mit einem 4,5 µm von Durchmesser, die in einem Magnetfeld (Dyna MPC) isoliert werden können. Sie sind mit einem murinen Pan-Mouse-IgG-Antikörper (S-Endo-1) beschichtet, dessen korrespondierendes Antigen CD-146 ist. CD-146 ist ein Oberflächenantigen, das an allen Typen von humanen Endothelzellen exprimiert wird und für den Zell-Zell-Kontakt verantwortlich ist. Diese Antigene sind dort in die Zytoskelettdynamik (Aktin) involviert (4). Die S-Endo-1-Antikörper (MoAb) werden gegen in Kultur gehaltene Endothelzellen aus der menschlichen Nabelschnur hergestellt. Die immunomagnetische Trennung basiert auf der Bindung zwischen diesen monoklonalen S-Endo-1-MoAbs und dem Oberflächenantigen CD-146, wodurch man die Zahl, den Ursprung und den Phänotyp der CECs untersuchen kann (10, 23). Die Trennung an sich dauert wenige Sekunden und kann mehrfach wiederholt werden, um eine komplette Isolierung der DynaBeads zu erzielen (22, 23, 53).

### **2.3.2 Immunomagnetische Bestimmung:**

Zunächst erfolgt die Präparation der DynaBeads (Vorgehensweise zur Beschichtung der

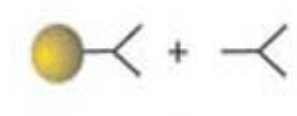
DynaBeads mit Antikörper):

DynaBeads M450 Pan-Mouse-IgG ( $4 \times 10^8$  Beads/ml, Dynal Biotech, Wi, USA) (Abbildung 7) werden zunächst resuspendiert.



**Abbildung 7:** DynaBeads in einer rasterelektronenmikroskopischen Aufnahme

Danach werden 350  $\mu$ l dieser Suspension in ein 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, für 1 min in den Dynal-Magneten (MPC-L, Dynal) gestellt. Nach Entfernen des Überstandes entfernt man den Magneten, resuspendiert die Beads mit 1 ml PBS/BSA-A (PBS/BSA: Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung/bovine serum albumin 0,1%, Natriumazid 0,1%) und stellt das Reaktionsgefäß erneut für 1 min in den Magneten. Nach Entfernen des Überstandes gibt man 950  $\mu$ l PBS/BSA -A plus 400  $\mu$ l S-Endo-1-Antikörper (monoklonaler Maus Antikörper anti-human S-Endo-1, 25  $\mu$ l/ml, Biocytex, Marceille, Frankreich) zu (Abbildung 8) und inkubiert die Mischung für 2 Stunden bei 4°C



**Abbildung 8:** DynaBeads M450 Pan-Mouse-Ig G (links) werden mit anti-CD-146-Antikörper (rechts) beschichtet.

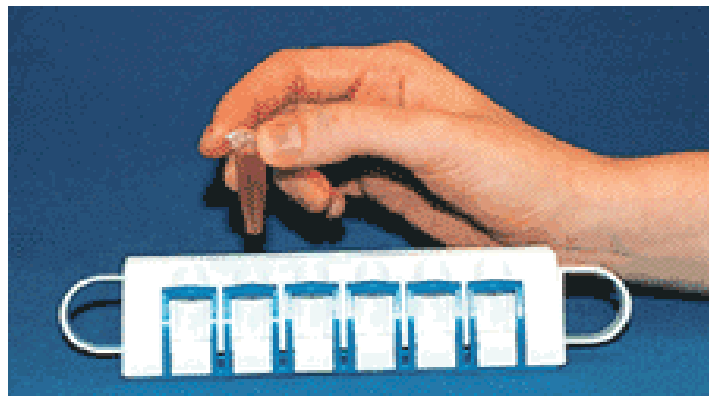
in einem Überkopf-Schüttler. Die Beads werden anschließend im Magneten separiert und mit 1 ml PBS/BSA-A gewaschen (Vorgang 2 x wiederholen). Schließlich werden die

gewaschenen Beads in 1 ml PBS/BSA-A resuspendiert und bei 4° C gelagert. Ein Ansatz von 1 ml ist für 20 Isolierungsvorgänge ausreichend.

Für die immunomagnetische Isolierung wird wie folgt vorgegangen:

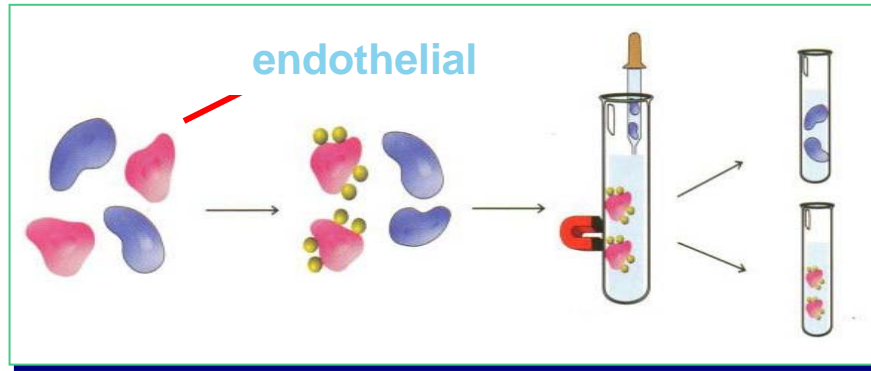
In ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß werden 1 ml PBS/BSA-AZ-Puffer (PBS/BSA 0,1%, Natriumazid 0,1%, Natriumzitat 0,1%) vorgelegt, mit 1 ml EDTA-Vollblut gemischt und mit 20 µl Oktagam-Lösung (Octapharma, Langenfeld) und 50 µl DynaBeads-Suspension versetzt. Um einer unspezifischen Bindung der DynaBeads an Leukozyten entgegen zu wirken wird ein Fc-Rezeptor-Blocker (Oktagam-Lösung) zugegeben und bei 4° C weiter bearbeitet (20).

Anschließend wird das Röhrchen für 30 min in einem Überkopf-Schüttler im Kühlraum inkubiert. Dann wird das Röhrchen für 1 min in den Magneten gehalten. Der Magnet ist in Abbildung 9 dargestellt.



**Abbildung 9:** Das Röhrchen wird in einen Dynal MPC-L Magneten gelegt

Danach wird der Überstand verworfen (abpipetiert) und das Röhrchen aus dem Magneten entnommen. Am Rand des Röhrchens, welches am Magneten angelegt war, befindet sich jetzt ein dunkelbrauner ca. 0,2 cm x 0,5 cm großer Streifen. Dieser besteht aus an DynaBeads gebundenen Endothelzellen. Die braune Farbe ergibt sich aus der Ansammlung der DynaBeads (Abbildung 10).



**Abbildung 10:** Isolierung der CECs

Es wird mit 1 ml PBS-AZ Puffer gewaschen, das Röhrchen geschüttelt und erneut für 1 Minute in den Magneten gelegt. Der Vorgang wird 2 x wiederholt. Schließlich werden die isolierten Beads in 200  $\mu$ l PBS/BSA-AZ resuspendiert (Lagerung bei 4° C möglich). Um den endothelialen Ursprung der Zellen zu prüfen, werden die Zellen mit UEA-1-FITC bearbeitet (Ulex europaeus Antigen, 2 mg in 1 ml A. bidest. lösen, diese Lösung 1:10 mit PBS-AZ verdünnen; Sigma) (79). Vor der Auswertung in der Nageotte-Kammer wird die Suspension erneut für 1 min in den Magneten gebracht und die Beads mit 100  $\mu$ l UEA-1 im Dunkeln für 1 Stunde im Überkopf-Schüttler im Kühlraum inkubiert. Das Lectin aus Ulex europaeus besteht aus einem Glykoprotein nicht immunologischen Ursprungs, welches hochspezifisch an Oberflächenrezeptoren von Endothelzellen bindet. An das Lectin ist ein Fluorochrom gekoppelt, welches sich in der Fluoreszenzmikroskopie in einer typischen Farbe (grün) hervorhebt. Das Fluorochrom ist lichtsensibel, deswegen wird das Röhrchen mit Aluminiumfolie lichtundurchlässig verpackt und in eine dunkle Kühlkammer gebracht. Da eine unspezifische Bindung am Fc-Rezeptor möglich ist, wird die Bearbeitung bei einer Temperatur von 4° C durchgeführt. Die unspezifische Bindung der Leukozyten ist jedoch sehr instabil im Vergleich zu stabilen Verhältnissen mit CECs (21, 66, 76, 79, 80). Nach der Färbung erfolgt eine 3malige Waschung mit PBS-AZ (analog zu oben). Die Beads werden letztlich in 200  $\mu$ l PBS/BSA-AZ resuspendiert und in der Nageotte-Zählkammer ausgezählt. Da die DynaBeads mit  $4,5 \pm 0,2 \mu$ m im Diameter zu groß für die Kapillaren des Durchflusszytometers sind, erfolgt die Auswertung in der Nageotte-Zählkammer unter dem Fluoreszenzmikroskop. Dies wird

durch die Fluoreszenz-Markierung der Endothelzellen mit UEA-1-FITC ermöglicht. Für diese Arbeit wurde das Fluoreszenzmikroskop Leica DMRE der Firma Leica Mikroskopie und Systeme GmbH (Wetzlar, Deutschland) in gekühltem Zustand verwendet.

Auswertung in der Nageotte-Zählkammer:

Die Kammertiefe beträgt 0,5 mm. Die quadratische Grundfläche von 100 mm<sup>2</sup> ist in 40 Rechtecke mit einer Fläche von je 2,5 mm<sup>2</sup> unterteilt.

Zuerst erfolgt die Verdünnung der isolierten Zellen 1:4 mit PBS/BSA-AZ (30 µl Zellsuspension + 90 µl Puffer) dann die Beschickung der Zählkammer mit 100 µl der Verdünnung. Im 10er Objektiv (FITC-Fluoreszenzfilter) werden 2 x 20 Rechtecke ausgezählt. Die Umrechnung erfolgt auf Anzahl der CECs pro ml Vollblut.

In der vorliegenden Studie wurden deutlich fluoreszierende Zellen mit mindestens 4 gebundenen DynaBeads (unter dem Fluoreszenzlicht) und zugleich intakte Zellen (unter dem Auflicht) als "positive Zellen" definiert. Es wurden alle positiven Zellen in der vorgegebenen Kammer gezählt (Abbildung 11). Die Gesamtzellzahl GZ an Endothelzellen pro ml Vollblut wurde wie folgt berechnet:

**GZ = (Zellzahl in der Zählkammer/Kammervolumen) × Volumen der Zellsuspension × Verdünnungsfaktor**

Folgt man dem oben beschriebenen Isolierungsprotokoll so entspricht bei einem Kammervolumen von 50 µl, einem Volumen der Zellen von 200 µl sowie einem Verdünnungsfaktor von 4 die Gesamtzellzahl GZ der isolierten Endothelzellen pro ml Vollblut dem 16fachen der Zellzahl in der Zählkammer:

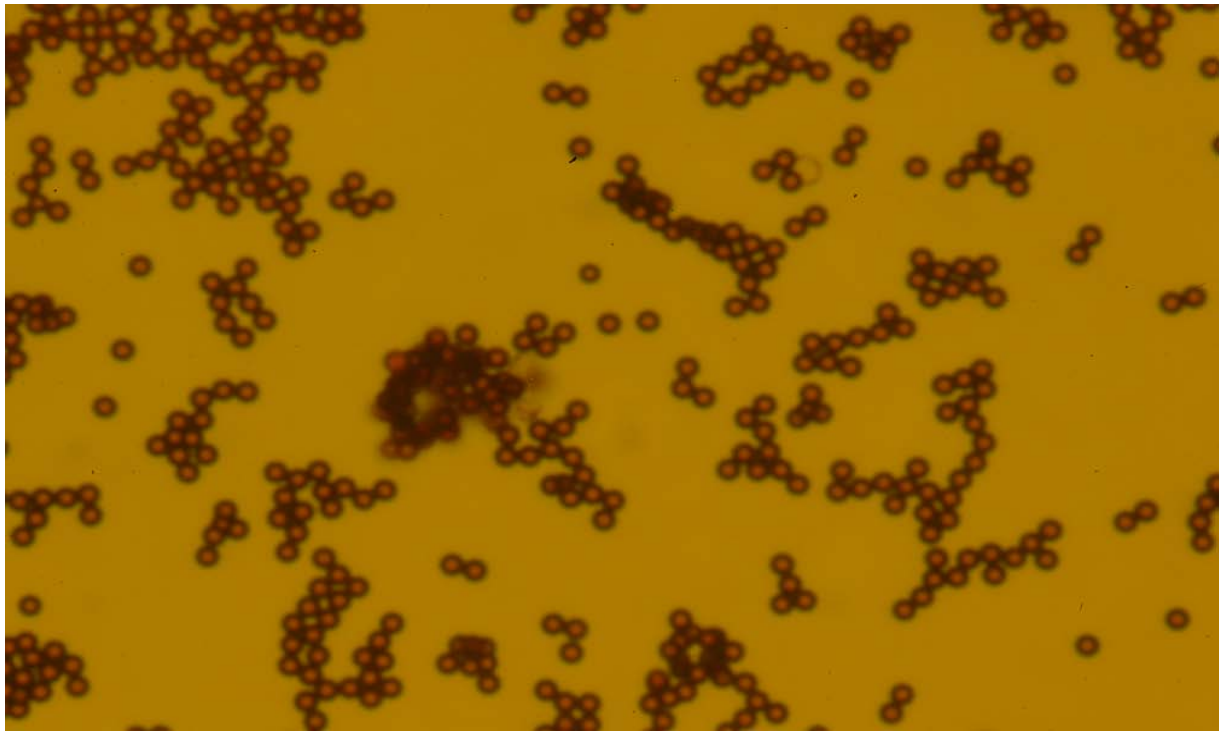
**GZ = (Zellzahl in der Zählkammer/50 µl) × 200 µl × 4 = Zellzahl in der Zählkammer × 16**

Die Endothelzellen waren in der Regel größer als andere Blutzellen und hatten eine ovale Zellstruktur. Ihre Morphologie war gut erkennbar. Der Zellkern grenzte sich gut vom Zytoplasma ab. Sie konnten isoliert oder verklumpt betrachtet werden. Die Zelllänge variierte zwischen 20 und 70 µm (78).



Benötigte Puffer:

PBS/BSA-A besteht aus 50 ml PBS ( 0,55 g Natriumdihydrogenphosphat  $\times$  H<sub>2</sub>O + 2,85 g Dinatriumhydrogenphosphat  $\times$  2 H<sub>2</sub>O + 8,7 g Natriumchlorid, ad 1 l Aqua bidest; pH 7,4, Merk, Darmstadt) + 50 mg BSA (Sigma, St. Louis, MO, USA) + 50 mg Natriumazid (Merk).



**Abbildung 11:** Nageotte-Zählkammer, beschickt. CECs in Mikroskopie nach Isolierung mittels DynaBeads und UEA-1-FITC-Färbung; 40  $\times$  Objektiv, Fluoreszenzlicht. Deutliche Fluoreszenz und Beladung mit mindestens 4 DynaBeads definieren positive Zellen.

## 2.4 Detektion von apoptotischen Endothelzellen

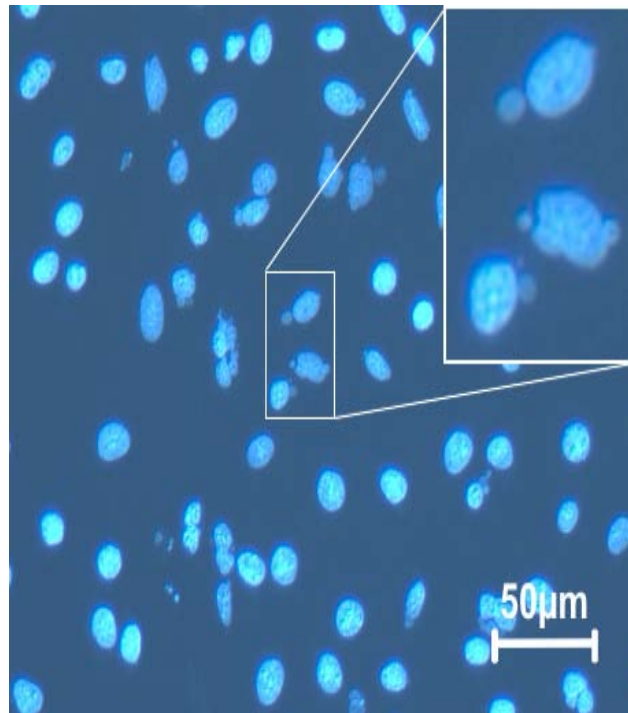
Zur Detektion der apoptotischen Endothelzellen wurde die DNA-DAPI-Methode angewandt (DAPI: 4,6-Diamidino-2-Phenylindole-Dihydrochlorid), wobei der

Fluoreszenzfarbstoff DAPI selektiv an DNA bindet. Die endotheliale Apoptoseaktivität wurde bestimmt, indem man das Serum mit einer Kultur Nabelschnurvenenendothelzellen (HUVEC, human umbilical vein endothelial cell) bebrütete. Die Methode wurde bereits publiziert (2, 46).

Humane Endothelzellen wurden aus frisch aufbereiteten Nabelschnurvenen Neugeborener nach einer von Jaffe et al., 1973 beschriebenen Methode isoliert (37). 100.000 Endothelzellen wurden in Petrischalen mit einem Durchmesser von 35 mm in serumfreiem Endothelzell-Medium (EGM, Promocell, Heidelberg) ausgesät, über Nacht im Brutschrank inkubiert und über 48 Stunden mit Serum von Patienten/gesunden Probanden in 50%igen Konzentrationen in EGM bebrütet. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Aceton/Methanol (1:1, bei  $-20^{\circ}\text{C}$  über 10 Minuten) fixiert.

Danach wurden die fixierten Zellen mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS; ICN, Meckenheim) gespült. Die Färbung von Endothelzellen erfolgte mit 4, 6-Diamidino-2-Phenylindole-Dihydrochlorid (DAPI;  $0,5\text{ }\mu\text{g/ml}$ ; Sigma), welches in 20%igem Glycerin/PBS verdünnt war. Die apoptotischen HUVEC wurden in Relation mit allen identifizierbaren Zellen über insgesamt 10 mikroskopische Felder ausgezählt. Die Durchschnittszahl der Zellen betrug 70 pro Feld. Die Zahl an apoptotischen Endothelzellen wurde prozentual dargestellt. Das Serum der gesunden Probanden diente als zusätzliche Kontrolle.

Die apoptotische Serumaktivität hat sich auf die Morphologie der Kulturzellen (HUVEC) ausgewirkt. Die kondensierten Zellkerne wurden unter Fluoreszenzmikroskopie betrachtet, wo sie die Merkmale für Apoptose und nicht für Zellnekrose zeigten (46). Die Zellen schrumpften und lösten sich aus ihrem Zellverband. Es kam zusätzlich zur Bildung apoptotischen Bläschen („apoptotic bodies“) an der Zelloberfläche (Abbildung 12). Als Merkmal für Zellapoptose konnte gleichzeitig eine Kernwandhyperchromatose (d.h. die Kondensation des Chromatins in der Nähe der inneren Kernmembran) betrachtet werden. Dadurch zerfiel der Kern in Fragmente und schließlich auch die Zelle in zahlreiche membranumschlossene, organellenreiche Teile.



**Abbildung 12:** Apoptotische Endothelzellen (HUVEC)

## 2.5 Statistische Auswertung

Alle Daten wurden als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt. Die Ergebnisse der endothelialen Apoptose in den Gewebekultur-Systemen wurden als Prozentsatz der apoptotischen Zellen  $\pm$  SD (Standardabweichung) ausgedrückt. Vergleiche innerhalb einer Gruppe wurden jeweils durch Anwendung des t-Tests für abhängige Proben und durch den Wilcoxon Test („matched pairs“) durchgeführt. Gruppenübergreifende Vergleiche an einem einzelnen, vorbestimmten Zeitpunkt wurden durch die Anwendung des t-Tests für unabhängige Proben im Falle einer Normalverteilung vorgenommen. Der Mann-Whitney-U-Test kam im Falle einer nicht-normalen Verteilung zum Tragen. Vergleiche innerhalb der einzelnen Gruppen und zwischen den Gruppen erfolgten durch Anwendung der Varianzanalyse (ANOVA). Alle statistischen Analysen wurden durch Anwendung der SPSS software Ver. 11.0 erzeugt. Als statistische Signifikanz wurde ein p-Wert von weniger als 0.05 angesehen.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Demographische Daten und klinischer Verlauf**

Die Gesamtgruppe aus allen 30 Studienteilnehmern bestand aus 9 Frauen und 21 Männern. Das Alter lag im Mittel bei 67,4 Jahren. Die Patientencharakteristika war in beiden Gruppen vergleichbar (Tabelle 2). Die demografischen Daten für die Adipositas, das Geschlecht, die Hämodynamik und die Risikofaktoren für Koronaropathie zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen.

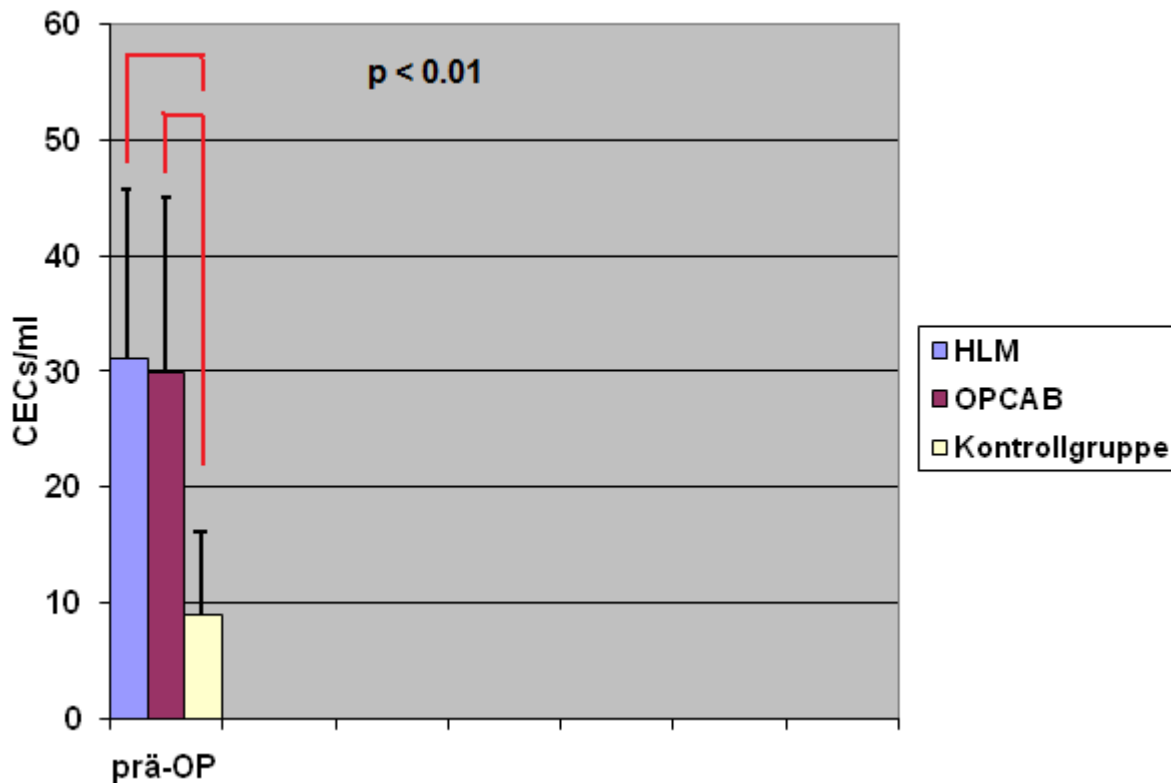
Die Zeitdauer, während der die Patienten in Gruppe B an die Herz-Lungen-Maschine angeschlossen waren (HLM Dauer), betrug im Mittel  $95,2 \pm 25$  Minuten. Die Ischämiezeit in der HLM-Gruppe (X-clamp) betrug  $52,1 \pm 21$  Minuten. Die durchschnittliche Anzahl an peripheren Anastomosen war zwischen der OPCAB-Gruppe und der HLM-Gruppe vergleichbar: OPCAB  $1,9 \pm 0,9$  vs. HLM-Gruppe mit  $2,2 \pm 0,8$ .

In Bezug auf den postoperativen Blutverlust, die Transfusionsnotwendigkeit, die Inzidenz postoperativer Myokardinfarkte oder Schlaganfälle und neu aufgetretenes Vorhofflimmern gab es keinen Unterschied. Es war keine Reoperation notwendig und es ist kein frühzeitiger Bypassverschluss aufgetreten. Im postoperativen Verlauf wurde keine Wundheilungsstörung weder in Gruppe A noch in Gruppe B festgestellt. In der OPCAB-Gruppe (Gruppe A) war keine Konversion bzw. Anschluss an die HLM erforderlich.

### **3.2 Zirkulierende Endothelzellen**

Die Probanden der Kontrollgruppe wiesen eine niedrigere Zahl an zirkulierenden Endothelzellen ( $12 \pm 6$  Zellen/ml; median 9 Zellen/ml) auf. Die Zahl von CECs in den beiden Studiengruppen war im Vergleich zur Kontrollgruppe bereits präoperativ

(Ausgangszahl) oder/und zu Beginn der EKZ signifikant höher. Präoperativ lag der Wert für die HLM-Gruppe um Faktor 3,4, für die OPCAB-Gruppe um Faktor 3,3 signifikant höher, ( $p < 0.01$ ) (Abbildung 13).

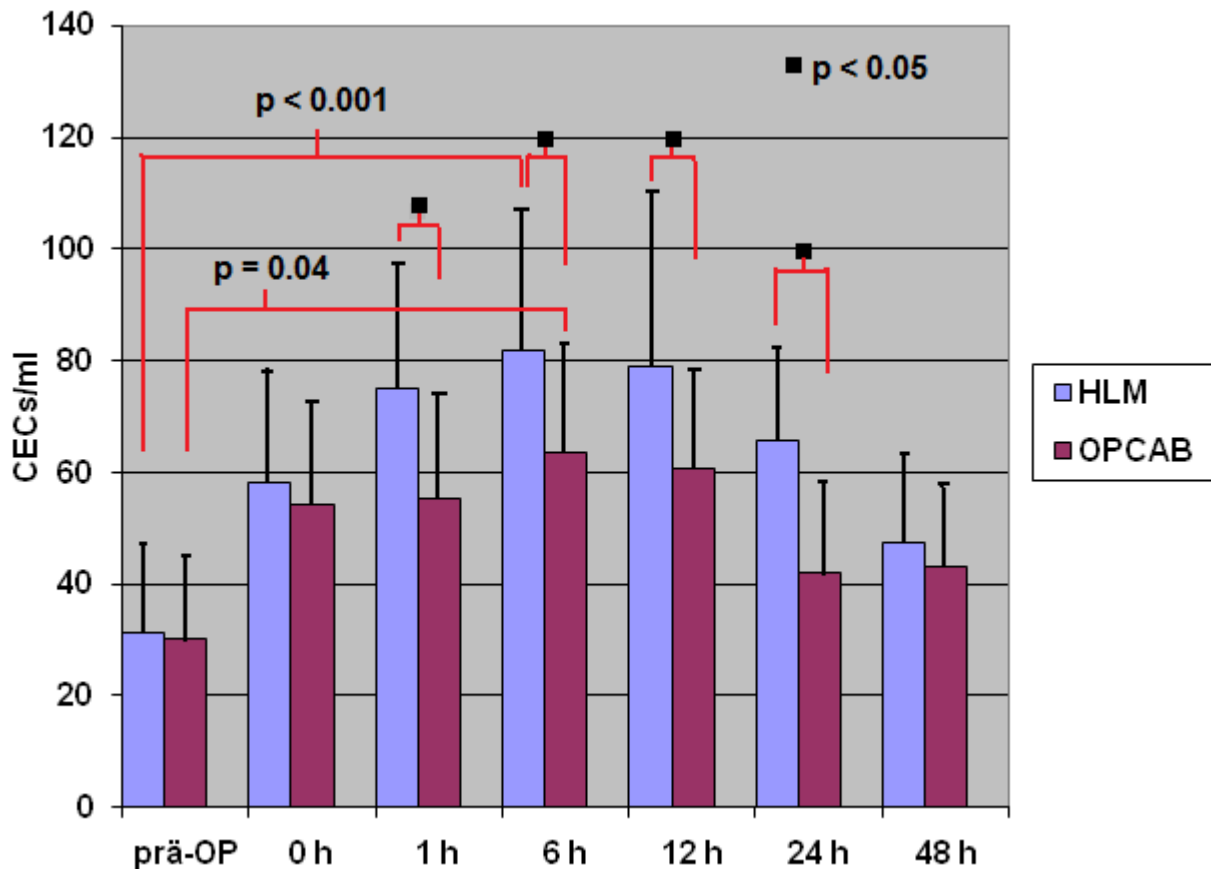


**Abbildung 13:** Die Ausgangswerte im direkten Vergleich. Die rote Linie deutet auf eine statistische Signifikanz hin ( $p < 0.01$ ).

Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Zellzahl 6 h postoperativ in der HLM-Gruppe: Zunahme um Faktor 2,6 (Bereich zwischen 44 – 141 Zellen/ml;  $p < 0.001$ ). Im Vergleich dazu war der Anstieg der Zellzahl in der OPCAB-Gruppe 6 h postoperativ signifikant geringer (Maximum an CECs 6 h postoperativ: Zunahme um Faktor 2,2, Bereich zwischen 48 – 105 Zellen/ml;  $p = 0.04$ ).

Insgesamt zeigte sich somit ein signifikant geringerer perioperativer Anstieg der CECs

nach Operation in der OPCAB-Gruppe im Vergleich zur HLM-Gruppe (Abbildung 14: Anstieg der CECs bei OPCAB-OP nach 1, 6, 12 und 24 h postoperativ signifikant niedriger,  $p < 0.05$ ).

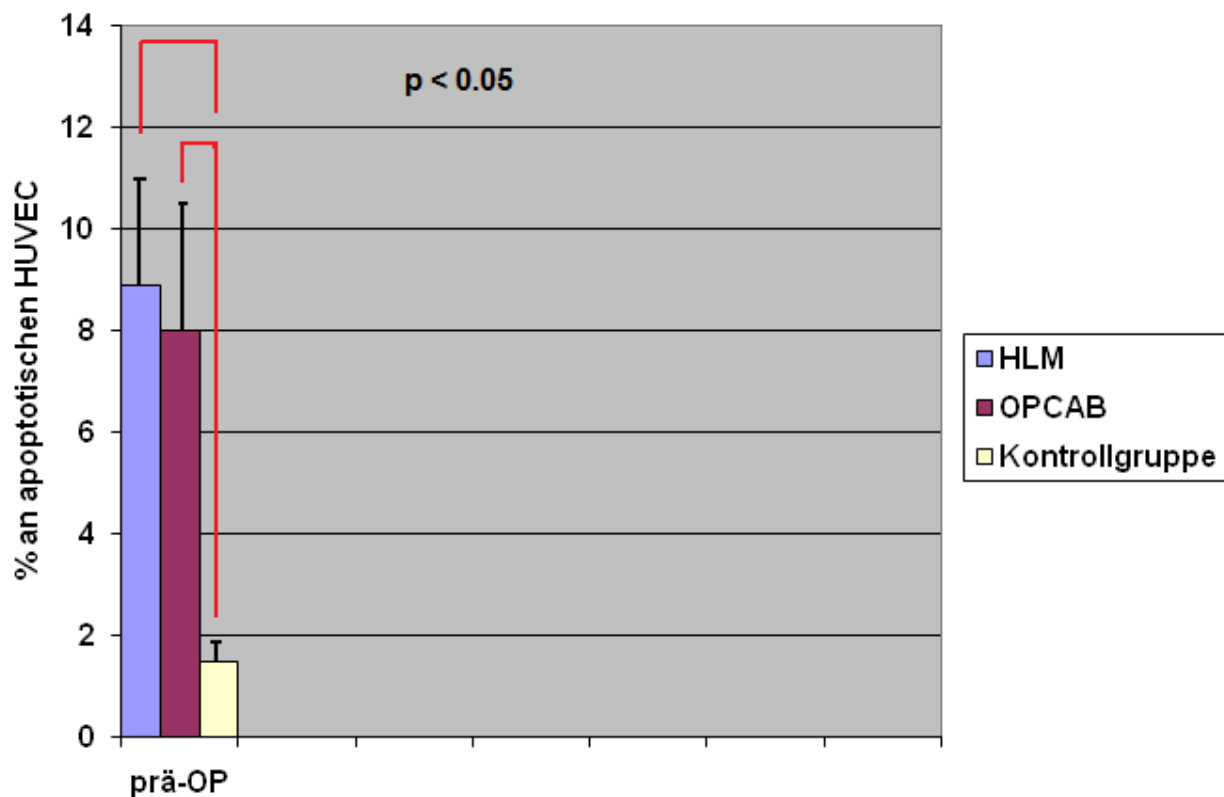


**Abbildung 14:** Die Zahl der CECs bei Koronarpatienten, die mit und ohne HLM operiert wurden. Mit rot werden die Signifikanzen dargestellt ( $p < 0.05$ ).

Im Laufe der ersten zwei postoperativen Tage sank die Zahl der CECs wieder ab, nach 48 Stunden war das Ausgangsniveau fast wieder erreicht (OPCAB-Gruppe  $43,2 \pm 20$  CECs/ml, HLM-Gruppe  $47,5 \pm 24$  CECs/ml, nicht signifikant erhöht vs. Ausgangswert). Allerdings lag die Zahl der CECs in beiden Gruppen immer noch signifikant höher als in der Kontrollgruppe ( $p < 0.005$ ).

### 3.3 Endothelzellapoptose

Im Serum der Koronarpatienten fand sich präoperativ eine erhöhte apoptotische Serumaktivität. Die Ausgangswerte beider Gruppen zeigten einen messbaren, aber statistisch nicht signifikanten Unterschied. Bei den gesunden Probanden in der Kontrollgruppe zeigte sich keine apoptotische Serumaktivität ( $< 2,0\%$ ) (Abbildung 15).

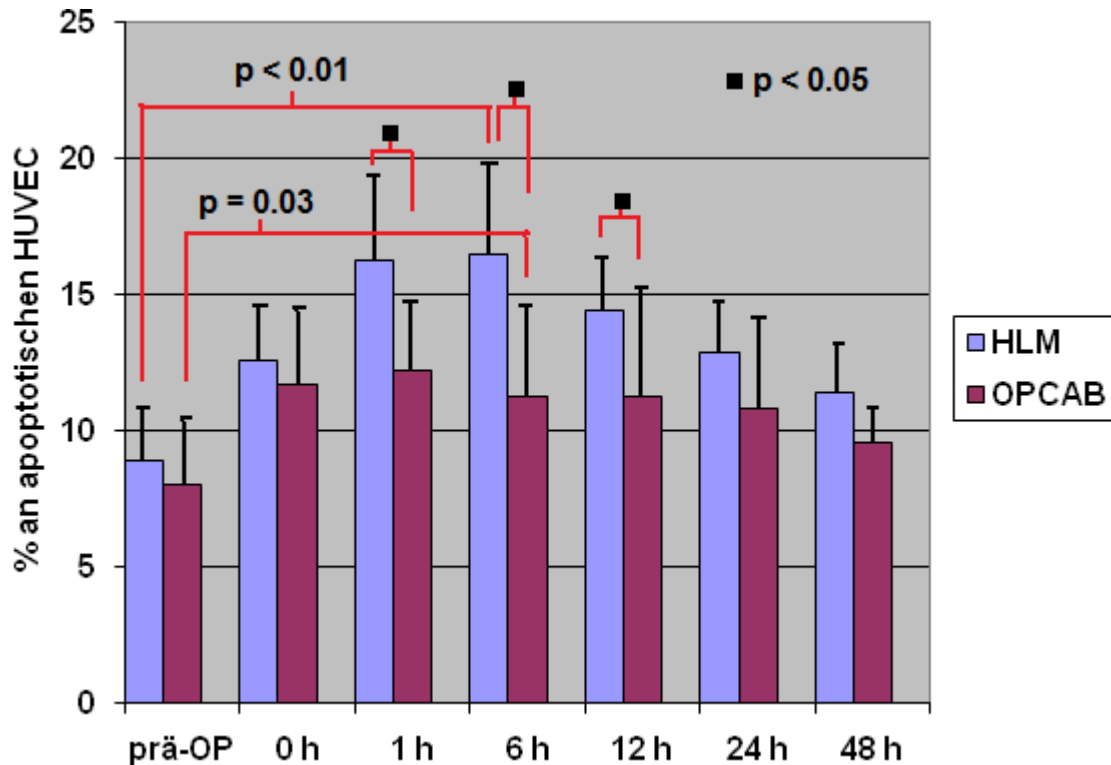


**Abbildung 15:** Präoperative apoptotische Aktivität des Serums bei Koronarpatienten, im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe.

Bei den Patienten, die mit einer HLM operiert worden waren, konnte 1, 6 und 12 h nach Beendigung der EKZ im Vergleich zu den präoperativen Ausgangswerte und den OPCAB-Patienten eine statistisch signifikante Zunahme der proapoptischen Serumaktivität nachgewiesen werden ( $p < 0.05$ ). Nach 6 Stunden in der HLM-Gruppe stieg die Zahl der apoptotischen Zellen signifikant von  $8,9 \pm 2,1 \%$  auf  $16,5 \pm 2,8 \%$  ( $p < 0.01$ ). Der Anstieg der apoptotischen Serumaktivität in OPCAB-Gruppe nach 6 h war

signifikant niedriger als in der HLM-Gruppe ( $p = 0.03$ ).

Nach 48 Stunden blieb der prozentuelle Anteil apoptotischer Endothelzellen in beiden Gruppen weiterhin hoch, aber der Unterschied zwischen beiden Gruppen zu dem Zeitpunkt war nicht mehr signifikant (Abbildung 16).



**Abbildung 16:** Apoptotische Aktivität des Serums auf HUVEC bei Koronarpatienten, die mit und ohne HLM operiert wurden. Mit rot werden die Signifikanzen gezeigt ( $p < 0.05$ ).

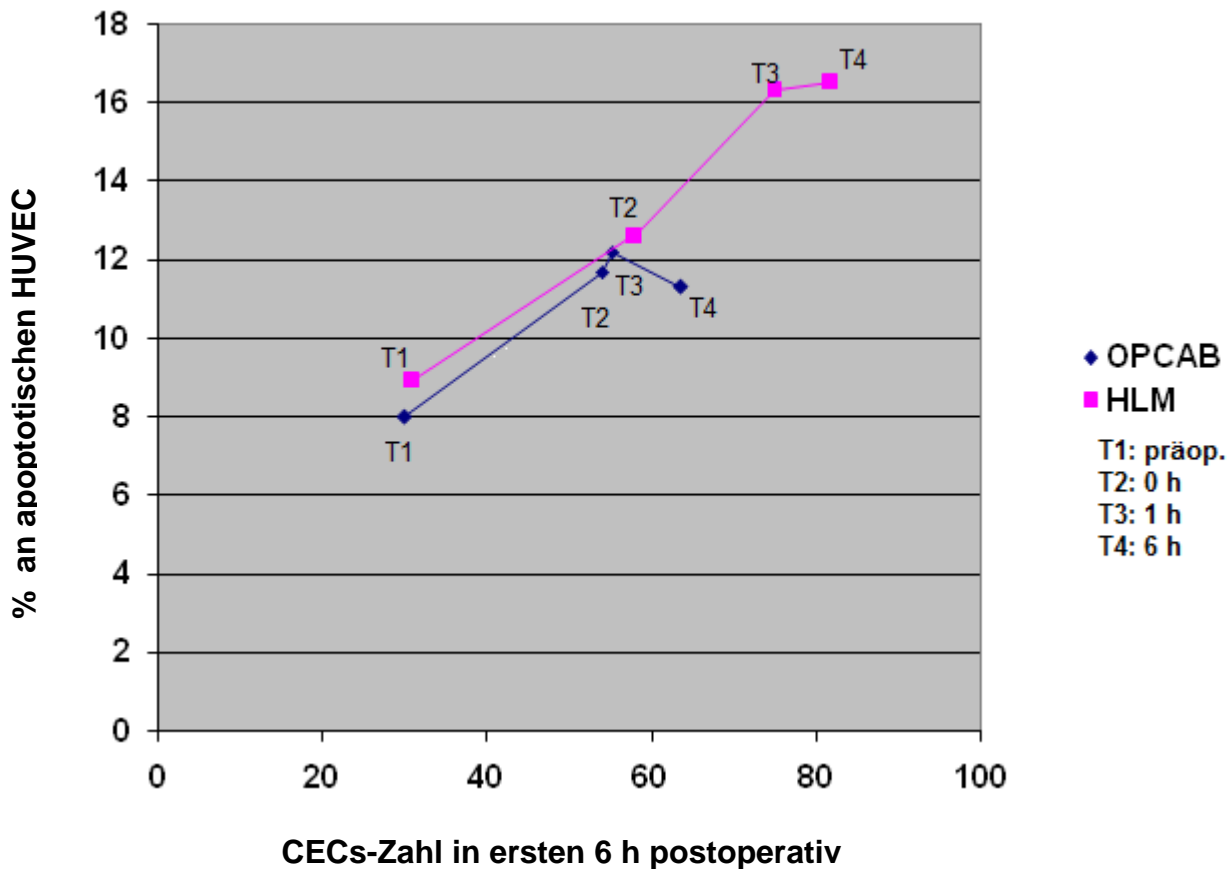
### 3.4 Korrelation CECs – Endothelzellapoptose

Aus dieser Studie ergab sich eine direkte Korrelation zwischen CECs-Zahl und apoptotischer Serumaktivität bei den Patienten, die mit oder ohne HLM operiert wurden. Hierbei wurde die höchste CECs-Zahl sowie die maximale proapoptotische Serumaktivität 6 h nach Beendigung der Operation in beiden Gruppen registriert. In



Abbildung 17 sieht man, dass die apoptotische Serumaktivität und die Zahl der CECs sowohl in der HLM-Gruppe als auch in der OPCAB-Gruppe in einem direkten Zusammenhang stehen. Während der Operation (T1 – T2) war die Zunahme der CECs und der apoptotischen Zellen für beide Studiengruppen vergleichbar. Der Einsatz der HLM bewirkte dann eine weitere Zunahme beider Zelltypen bis 1 h postoperativ, während sich die Anzahl der CECs unter OPCAB-Technik kaum änderte. Im weiteren Verlauf (T3 – T4) wurde weiterhin ein leichter Anstieg der CECs-Zahl und der apoptotischen Serumaktivität in der HLM-Gruppe im Gegensatz zur OPCAB-Gruppe gemessen, wobei die apoptotische Serumaktivität trotz eines leichten Anstiegs der CECs-Zahl sank.

Nach 6 h (postoperativ) wurde in beiden Gruppen ein Abfall sowohl der CECs-Zahl als auch der apoptotischen Aktivität des Serums registriert.



**Abbildung 17:** Die Relation CECs – proapoptotische Serumaktivität im Zeitverlauf bei den Koronarpatienten, die mit oder ohne HLM operiert wurden.

## **4 Diskussion**

### **4.1 CECs bei Operationen mit und ohne EKZ**

In der vorliegenden Vergleichsstudie, die die Auswirkungen einer ACVB-OP mit Einsatz der HLM und einer OPCAB-OP untersucht, wurde anhand des Anstiegs der Anzahl der CECs im Blut eine ausgeprägte Endothelzellaktivierung dargestellt. Parallel dazu wurde gezeigt, dass gleichzeitig entnommene Serumproben bei kultivierten humanen Endothelzellen eine apoptotische Reaktion auslösen. Für den Operationszeitraum konnte sogar eine direkte Abhängigkeit zwischen Apoptoseinduktion und der Anzahl der CECs bestimmt werden.

Eine massive Endothelzellaktivierung während einer Herzoperation wurde schon in früheren Studien gezeigt (20, 47, 63, 71, 74). So gilt der Anstieg von proinflammatorischen Mediatoren, wie Zytokine und lösliche Adhäsionsmoleküle, in der frühen Phase nach EKZ als ein Maß für eine Endothelaktivierung (14, 25, 35, 42). Allerdings handelt es sich hierbei um ein indirektes Maß, da keine direkte Korrelation mit Endothelzellen und Endothelzellfunktion möglich ist. Im Gegensatz dazu gilt die Detektion einer erhöhten Anzahl von CECs als ein direkter Marker für Endothelschädigung, insbesondere bei vaskulären inflammatorischen Erkrankungen (20), akuten Myokardinfarkten (53) oder kritischen Ischämien bei Extremitäten (50). In unserer Arbeitsgruppe wurden bereits 2006 erhöhte Spiegel an CECs als eine proinflammatorische Reaktion auf eine Bypassoperation beobachtet (63). Der aktivierte Zustand der Endothelzellen kurz nach Beendigung der ACVB-OP mit HLM, der sich in einer signifikanten Zunahme der Anzahl an CECs andeutet, könnte die bekannte systemische Entzündungsreaktion widerspiegeln und theoretisch für die EKZ-assoziierte Organdysfunktion mit verantwortlich sein. Der zeitliche Verlauf der CECs während und nach einer ACVB-OP mit Maximalwerten an CECs nach 6 – 12 Stunden postoperativ gehen mit den Verläufen von proinflammatorischen Mediatoren, wie z. B. TNF- $\alpha$ , IL-6 und E-Selektin einher. Aber eine direkte Korrelation zwischen CECs und löslichen

Faktoren war bislang nicht möglich (63).

Durch Einsatz moderner Operationstechniken, wie z. B. der OPCAB-Technik, wurde eine Reduzierung der Endothelzellaktivierung erzielt (1, 58, 64), die ein entscheidender Faktor für ein besseres klinisches Outcome der Patienten sein könnte (49, 70). Eine Abnahme der proinflammatorischen Antwort und der Anzahl der CECs insbesondere in der frühen postoperativen Phase nach OPCAB-OP könnte den reduzierten Verbrauch an Gerinnungsfaktoren und danach einen reduzierten postoperativen Blutverlust und Transfusionsbedarf sowie eine geringere Inzidenz von postoperativen Nieren- und myokardialen Schädigungen erklären (7, 73). Systematische Untersuchungen wären dazu erforderlich.

Es wird vermutet, dass die Detektion von CECs im Blut von Patienten nach einer ACVB-OP einen direkten Marker für Endothelzellaktivierung und –Schädigung darstellt, und damit eine Quantifizierung der inflammatorischen Antwort in Verbindung mit der Operation möglich wird. Im Vergleich zu einer Gruppe von gesunden Probanden konnte man bereits präoperativ einen um Faktor 3,3 erhöhten Spiegel an CECs bei unseren Patienten beobachten. Der Grund dafür liegt vermutlich in der zugrunde liegenden Grunderkrankung, Atherosklerose (11) und Begleiterkrankungen, wie Diabetes mellitus (43). Außerdem besteht die Möglichkeit, dass die Anästhesie und das chirurgische Trauma während der Sternotomie die CECs-Freisetzung induzieren. In der vorliegenden Studie waren die Risikoprofile beider Studiengruppen vergleichbar, weshalb es präoperativ zwischen beiden Patientengruppen keine Unterschiede in der Zahl der CECs gab. Über die Herkunft der CECs in der Zirkulation gibt es zwei mögliche Hypothesen: Entweder handelt es sich um abgeschilferte, tote Endothelzellen, die aufgrund der Ischämie oder des Operationstraumas aus dem Zellverband abgelöst wurden und über den Blutstrom ausgeschieden werden, oder durch die ACVB-OP werden endotheliale Progenitorzellen aus dem Knochenmark mobilisiert, die dann einen Reparaturmechanismus zur Regeneration denudierter Endothelzellstellen im Gefäß auslösen (26). Um welchen Zelltyp es sich bei den CECs nach einer Bypassoperation handelt, kann im Moment nur spekuliert werden. Für die Darstellung der CECs aus dem Patientenvollblut wurden zwei relevante Marker verwendet: CD-146 und UEA-1. Beide Marker wurden bereits vielfach zur Identifizierung von CECs verwendet (10, 20, 22, 23, 32). Sowohl CD-146, als auch UEA-1 sind Oberflächenmarker, die man auf der

Zelloberfläche von ausdifferenzierten Endothelzellen findet. Es bleibt offen, ob diese auch bei endothelialen Progenitorzellen zu finden sind. Wie in der Einleitung ausgeführt, wären für die weitere Identifizierung des zugrundeliegenden Zelltyps weitere Oberflächenmarker notwendig, z. B. Stammzellmarker, wie CD-34 oder CD-133 (27, 30). Da dies mit der beschriebenen Beadisolierung nach Dynal nicht möglich ist, müssen wir eine Antwort auf die Frage nach der Herkunft schuldig bleiben.

Allerdings konnten wir im zweiten Teil der vorliegenden Studie zeigen, dass gleichzeitig entnommene Serumproben bei kultivierten humanen Endothelzellen eine apoptotische Reaktion auslösen können.

## **4.2 Endothezellapoptose in dieser Studie**

Aebert et al. berichteten im Jahr 2000, dass Serumproben von allen Patienten, die sich einer Bypassoperation mit Zuhilfenahme der HLM unterziehen mussten, eine vermehrte Endothelzellapoptose auslösten. Die maximale Induktion der Endothelzellapoptose lag in der vorliegenden Studie ebenfalls zwischen 6 und 12 Stunden postoperativ, also vergleichbar mit der maximalen CECs-Zahl. Die Verwendung der OPCAB-Technik führte zu einer herabgesetzten proapoptotischen Aktivität des Patientenserums. Apoptose wird durch ein komplexes Zusammenspiel zwischen Signalen auf der Zelloberfläche und der Expression von spezifischen intrazellulären Genprodukten reguliert. Verschiedene Mechanismen werden diskutiert (41, 48, 68, 75). In Zusammenhang mit ACVB-OPs spielt offensichtlich die Induktion der systemischen Entzündungsreaktion eine wichtige Rolle. Es wird darüber spekuliert, ob die durch den Blutkontakt mit Fremdoberflächen der HLM verursachte Freisetzung freier Sauerstoff-Radikale und proinflammatorischer Mediatoren (TNF- $\alpha$ , IL-1, TGF- $\beta$ , Elastase, Endotoxine) zu einer Apoptoseinduktion führt (36, 51). Man konnte in dieser Studie zeigen, dass EKZ einen Effekt auf das zelluläre Milieu von Endothelzellen ausübt. So ist offensichtlich ein oder mehrere Faktoren im Serum der Bypasspatienten für die Apoptoseinduktion bei kultivierten Endothelzellen verantwortlich. Eine eindeutige Zuordnung zu einem bestimmten Faktor ist bislang nicht möglich. Ebenso kann keine Auskunft über die Herkunft dieses Faktors gemacht werden, ob er aus dem Herzen, oder anderen Geweben stammt. Es wird vermutet, dass die

Myokardreperfusion ein Auslöser der Apoptose ist, wobei ein spezifischer Zellkernfaktor (NF- $\kappa$ B: Transkriptionsfaktor) eine wichtige Rolle spielt (69). Eine Untersuchung von Blutproben aus dem Koronarsinus hinsichtlich Endothelzellapoptoseinduktion könnte weitere Einblicke in das Konzept der Apoptoseinduktion nach Herzoperation bringen.

Man konnte in der vorliegenden Studie einen Zusammenhang zwischen Apoptoseinduktion und Freisetzung von CECs herstellen. Insbesondere im Zeitfenster der Bypassoperation bis 1 Stunde postoperativ (egal ob mit oder ohne HLM) konnte eine direkte Korrelation zwischen beiden Parametern nachgewiesen werden. Es kann darüber spekuliert werden, ob der chirurgische Eingriff an sich in der frühen postoperativen Phase zur Freisetzung von Faktoren führt, die letztlich eine Endothelzellapoptose induzieren. So wären die CECs Endothelzellen, die aus dem Zellverband gelöst werden und als tote Zellen im Blut auftauchen. Der Einsatz der HLM bei einer ACVB-OP (also mit EKZ) bedingt offensichtlich eine Verlängerung dieser Reaktion, was sich in einem weiteren Anstieg der CECs und der apoptotischen Endothelzellen widerspiegelt. Im Gegensatz dazu bedingt die OPCAB-Technik keine weitere Induktion der Endothelzellapoptose.

Der Zeitverlauf der proapoptotischen Aktivität und der Freisetzung von CECs nach ACVB-OP in dieser Studie korrespondiert mit dem klinischen Phänomen der postoperativen Myokarddysfunktion und der erhöhten Kapillärpermeabilität, die ihren Tiefpunkt etwa 5 h nach Beendigung der EKZ erreicht. Dies entspricht der maximalen Erschlaffung der Herzpumpfunktion und des niedrigsten peripheren Gefäßwiderstandes (13). Das Zusammenspiel von erhöhten Spiegeln an proinflammatorischen Zytokinen, Endothelzellaktivierung und Endothelzellapoptose bedingt eine Schädigung der Integrität der Endothelzellschicht. Die resultierenden „Lücken“ im Endothelzellverband könnten das Koagulationssystem beeinflussen. Die Bildung von Mikrothromben und Mikroembolien während der EKZ könnte das Ergebnis aggregierender Blutplättchen an diesen Stellen sein. Schädigungen im Endothelzellverband von venösen Bypassgefäßen ( z. B. durch mechanischen, osmotischen und thermalen Stress gefolgt von ungewohnter Hypertension) könnten ebenfalls für die lokale Thrombusbildung und damit für den Verschluss des Bypasses verantwortlich sein. Letzteres kann in dieser

Studie ausgeschlossen werden, da es bei keinem Patienten postoperativ zu einem Verschluss der Bypässe kam.

### **4.3 Ausblick auf mögliche Therapien**

In den frühen achtziger Jahren beschrieben mehrere Arbeiten die Beteiligung der Komplementaktivierung und der pulmonalen Sequestration von Leukozyten mit der HLM-assoziierten Morbidität (42). Hierbei entstand die Hypothese, dass der menschliche Organismus mit einer "whole body inflammatory response" variabler Stärke auf die EKZ reagiere. Trotz der technischen Verbesserungen findet immer noch eine beträchtliche Aktivierung der Plasmaproteine und korpuskulären Blutbestandteile statt. Ein Fernziel ist daher die Entwicklung optimal biokompatibler Oberflächen, die vom Blut nicht mehr als unphysiologisch erkannt werden können, und somit keine pathologische Aktivierung der humoralen und zellulären Abwehr- und Abstoßungsreaktionen stattfindet. Das vom Körper vorgegebene, technisch bisher noch lange nicht erreichte Optimum stellt nach wie vor das intakte Endothel dar.

Weitere Untersuchungen der apoptotischen Aktivität des Serums aus dem Koronarsinus während der Myokardprotektion könnten einen weiteren Einblick in die Pathophysiologie der Endotheldysfunktion geben. Es ist klar, dass die HLM-induzierte Apoptose eine zentrale Rolle in der Entstehung der Organdysfunktion spielt, aber ihre Ausweitung und ihr Mechanismus sind noch ungeklärt. Die weitere Abklärung der auslösenden Mechanismen und eine eventuelle „antiapoptotische Therapie“ könnten in Zukunft eine Reduktion der systemischen Entzündungsreaktion mit sich bringen und dadurch ein besseres klinisches Outcome nach Operationen mit HLM erzielen.

Die Identifizierung von CECs als zuverlässiger Marker für eine Endothelschädigung könnte zu einer Optimierung und Monitorisierung der Therapie nach offener Herzchirurgie beitragen. Studien von Del Papa und De Palma haben gezeigt, dass es anhand von CECs möglich ist, die therapeutische Effizienz (z. B. in systemischer Sklerose) zu monitorisieren (18, 19). Darüberhinaus könnte die Isolierung von CEPs (Vorläuferzellen) in der näheren Zukunft auch zur Förderung von

Reendothelialisierungsprozessen bei den Patienten mit gestörter Gefäßfunktion dienen (30).

Das Verständnis der Endothelreaktion ist essentiell, um die perioperativen Folgeerscheinungen im Rahmen einer Herzoperation zu erkennen.

## 5 Zusammenfassung

Der Einsatz der HLM löst postoperativ eine systemische Entzündungsreaktion des Körpers aus. Diese führt zu einer Aktivierung und zu einer Schädigung des Endothels. Als klinische Folge kommt es zu einer Instabilität der peripheren Gefäßregulation. Ziel der vorliegenden Studie war der Nachweis, dass CECs Marker für eine Endothelschädigung bei Herzoperationen sein können. In diese Studie wurden 30 Patienten, die elektiv einer aortokoronaren Bypassoperation mit (HLM-Gruppe) oder ohne (OPCAB-Gruppe) Einsatz der HLM unterzogen wurden, eingeschlossen. Die Kontrollgruppe bestand aus 10 gesunden Probanden. Bei jedem Patienten wurden 7 Blutproben (die erste präoperativ, die letzte 48 Stunden postoperativ) abgenommen. Die CECs wurden immunomagnetisch bestimmt (Marker: CD-146, UEA-1). Die endotheliale Apoptoseaktivität wurde durch Inkubation einer Kultur HUVEC („human umbilical vein endothelial cell“) mit Patientenserum induziert. Apoptotische Zellkerne wurden mit dem Kernfarbstoff DAPI quantifiziert. Im Zeitverlauf wurde ein signifikanter Anstieg der Anzahl der CECs und der Apoptoseinduktion 6 h nach Beendigung der Operation beobachtet. Die Zellzahlen erreichten nach 48 h in etwa das präoperative Niveau, das signifikant höher war, als bei den gesunden Probanden.

Es wurde gezeigt, dass der Einsatz der HLM im Vergleich mit dem OPCAB-Verfahren mit einer signifikanten Endothelschädigung in unmittelbaren postoperativen Verlauf einhergeht. Ein Faktor im Serum der operierten Patienten scheint dabei eine Endothelzellapoptose zu induzieren. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Endothelzellen in Folge der Apoptose aus dem Gefäßverband gelöst werden und als CECs im Blut auftauchen.

Die Anzahl an CECs dienen als direkter Marker für eine Endothelzellschädigung nach EKZ, ausgelöst über eine Apoptoseinduktion. Somit können CECs als ein Maß für die Abschätzung einer vaskulären Endothelaktivierung benutzt werden.



## 6 Literaturverzeichnis

1. Abu-Omar M. S., Nalk M. J., MacCarthy N., Standing S., Taggart D. P. (2005) Evaluation of cystatin C as marker of renal injury following on-pump and off-pump coronary surgery. *Eur J Cardiothorac Surg* 27: 893-898
2. Aebert H., Kirchner S., Keyser A., Birnbaum D. E., Holler E., Andreesen E., Eissner G. (2000) Endothelial apoptosis is induced by serum of patients after cardiopulmonary bypass. *Eur J Cardiothorac Surg* 18: 589-593
3. Allt G., Lawrenson J. G. (2001) Pericytes: cell biology and pathology. *Cells Tiss Org* 169: 1-11
4. Anfosso F., Bardin N., Vivier E. (2001) Outside in signalling pathway linked to CD-146 engagement in human endothelial cells. *J Biol Chem* 276: 1564-1569
5. Ardawan J. R., Thomas W., Volkmar F., Gummert J. F., Eckenstein J. I., Mohr W. F. (2006) Off-Pump-Koronarrevaskularisation - „State of the art“ 2006 und Ergebnisse im Vergleich zur konventionellen Bypassoperation. *Herz* 31 Heft 5, Nr. 5
6. Asahara T., Takahashi T., Masuda H., Kalka C., Chen D., Iwaguro H., Inai Y., Silver M., Isner J. M. (1999) VEGF contributes to postnatal neovascularisation by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Embo J* 18: 3964-3972
7. Asclone R., Williams S., Lloyd C. T. (2001) Reduced postoperative bloodless and transfusion requirement after beating heart coronary operations: a prospective randomized study. *Eur J Cardiothorac Surg* 121: 689-696
8. Assmus B., Urbich C., Aicher A., Hofmann W. K., Haendeler J., Rossig L., Spyridopoulos I., Zeiher A. M., Dimmeler S. (2003) HMG-CoA reductase inhibitors reduce senescence and increase proliferation of endothelial progenitor cells via regulation of cell cycle regulatory genes. *Circ Res* 92: 1049-1055
9. Ballieux B. E., Hiemstra P. S., Klar-Mohamad N. (1994) Detachment and cytolysis of human endothelial cells by proteinase 3. *Eur J Immunol* 24: 3211-3215
10. Bardin N., Frances V., Lesaule G., Horschowski N., George F., Sampol J. (1996) Identification of the S-Endo1 endothelial-associated antigen. *Biochem Biophys Res Commun* 218: 210-217

11. Boilson B. A., Kiernan T. J., Harbuzariu A., Nelson R. E., Lerman A., Simari R. D. (2008) Circulating CD34(+) cell subsets in patients with coronary endothelial dysfunction *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* im Juni, in press.
12. Bouvier C. A., Gaynor E., Cintron J. R., Bernhardt B., Spaet T. H. (1970) Circulating endothelium as an indication of vascular injury. *Thromb Diath Haemorrh* 40: 163-169
13. Breisblatt W. M., Stein K. L., Wolfe C. J., Follansbee W. P., Capozzi J., Armitage J. M., Hardesty R. (1990) Acute myocardial dysfunction and recovery: a common occurrence after coronary bypass surgery. *J Am Coll Cardiol*. 15: 1261-1269
14. Butler J., Rocker G. M., Westaby S. (1993) Inflammatory response to cardiopulmonary bypass. *Annals Thorac Surg* 55: 552-559
15. Camoin-Jau L., Kone-Pau I., Sampol J., Dignat-George F. (1999) Circulating endothelial cells in Behcet' s disease with cerebral thrombophlebitis. *Thromb Haemost* in press.
16. Caroline Schmidt-Lucke et al (2004) Statine reduzieren den apoptotischen Endothelzelluntergang bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung – unabhängig von der Cholesterin-Senkung. *Pressemitteilung Frankfurt*
17. Cremer J., Schöttler J., Fraund S., Schöneich F., Böning A. (2005) Stand der minimalinvasiven Herzchirurgie. *Ärzteblatt* Heft 16: 1137-1143
18. Del Papa N., Colombo G., Francchiolla N., Moronetti L. M., Ingegnoli F., Maglioni W., Comina D. P., Vitali C., Fantini F., Cortelezzi A. (2004) Circulating endothelial cells as a marker of ongoing vascular disease in systemic sclerosis. *Arthritis & Rheumatis* 50: 1296-1304
19. De Palma L., McIntosh Y. M., Swain C. L., Davey J. A. (1991) Changes in lymphocyte subpopulation as a result of cardiopulmonary bypass. *J Thorac and Cardiovasc Sur* 101: 240-244
20. Dignat-George F, Sampol J. (2000) Circulating endothelial cells in vascular disorders: new insights into an old concept. *Eur J Haematol* 65: 215-220
21. Dignat-George F., Brouqui P., Boffa M. C., Mutin M., Drancourt M., Brisson C. (1993) Demonstration of Rickettsia conorii-induced endothelial injury in vivo by measuring circulating endothelial cells, thrombomodulin, and von Willebrand factor in patients with Mediterranean spotted fever. *Blood* 82: 2109-2116

22. Dignat-George F. et al. (1991) Cytometric detection of human endothelial cells in whole human blood using S-Endo 1 monoclonal antibody. *Immunol Methods* 139: 65-75
23. Dignat-George F., Brisson C., Poncelet P., Laurent J. C., Massot O., Arnoux D., Ambrosi P., Klein-Soyer C., Cazenave J. P., Sampol J. (1992) Rapid isolation of human endothelial cells from whole blood using S-Endo1 monoclonal antibody coupled to immuno-magnetic beads: Demonstration of endothelial injury after angioplasty. *Thromb Haemost* 67: 147-154
24. Dvorak H. F., Brown L. F., Detmar M., Dvorak A. M. (1995) Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 146: 1029-1039
25. Eikemo H., Sellevold O. F. M., Videm V. (2003) Markers for endothelial activation during open heart surgery. *Ann Thorac Surg* 77: 214-219
26. Erdbruegger U., Haubitz M., Woywodt A. (2006) Circulating endothelial cells: a novel marker of endothelial damage. *Clin Chim Acta*. 2006 373: 17-26.
27. Ferrara N., Gerber H. P. (2003) The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis. *Acta Haematol* 106: 148-156
28. Folkman J. (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 285: 1182-1186
29. Folkman J. (1997) Addressing tumor blood vessels. *Nat Biotechnol* 15: 510-515
30. Gill M., Dias S., Hattori K., Rafii S. (2001) Vascular trauma induces rapid but transient mobilisation of VEGFR2+ AC133+ endothelial precursor cells. *Circulation Research* 2: 167-174
31. Grefte A., van der Giessen M., van Son W. (1993) Circulating cytomegalovirus (CMV)-infected endothelial cells in patients with a CMV infection. *J Infect Dis* 167: 270-277
32. Hewett P. W., Murray J. C. (1993) Immunomagnetic purification of human microvessel endothelial cells using DynaBeads coated with monoclonal antibodies to PECAM-1. *Eur J Cell Biol* 62: 451-154
33. Hladovec J. (1978) Circulating endothelial cells as a sign of vessel wall lesions. *Physiol Bohemoslov* 27: 140-147
34. Holler E., Ertl B., Hintermeier-Knabe R. (1997) Inflammatory reactions induced by pretransplant conditioning - an alternative target for modulation of acute GvHD and

complications following allogenic bone marrow transplantation? *Leuk Lymphoma* 25: 217-224

35. Howard R. J., Crain C., Franzini D. A., Hood C. I., Hugli T. E. (1998) Effects of Cardiopulmonary Bypass on Pulmonary Leukostasis and Complement Activation. *Arch Surg* 123: 1496-1501

36. Jacob A. K., Hotchkiss R. S., Buchman T. G. (1997) Endothelial cell apoptosis is accelerated by inorganic iron and heat via an oxygen radical dependent mechanism. *Surgery* 122: 243-253

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

38. Janssens D., Michiels C., Guillaume G., Cuisinier B., Louagie Y., Remacle J. (1999) Increase in circulating endothelial cells in patients with primary chronic venous insufficiency: protective effect of Ginkor Fort in a randomized double-blind, placebo-controlled clinical trial *J Cardiovasc Pharmacol* 33: 7-11

39. Kaeng W. L., Lip G. Y., Tayebjee M., Foster W., Blann A. D. (2005) Circulating endothelial cells, von Willebrand factor, interleukin-6, and prognosis in patients with acute coronary syndromes. *Blood* 105: 526-532

40. Kalka C., Takahashi T., Masuda H., Asahara T., Isner J. (1999) Vascular endothelial factor (VEGF): therapeutic angiogenesis and vasculogenesis in the treatment of cardiovascular disease. *Med Klin* 94: 193-201

41. Karsan A., Harlan J. M. (1996) Modulation of endothelial cell apoptosis: mechanisms and pathophysiological roles. *J Atheroskler Thromb* 3: 75-80

42. Kirklin J. K., Westaby S., Blackstone E. H., Kirklin J. W., Chenoweth D. E., Pacifico A. D. (1983) Complement and the damaging effects of cardiopulmonary bypass. *J Thorac and Cardiovasc Surg* 86: 845-857

43. Koç M, Bihorac A. (2003) Circulating endothelial cells as potential markers of the state of the endothelium in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 42: 704 – 712

44. Larsen R. (1999) Extrakorporale Zirkulation. *Anästhesie* 6. Auflage; 1156-1165

45. Lefevre P., George F., Durand J. M., Sampol J. (1993) Detection of circulating endothelial cells in thrombotic thrombocytopenia purpura. *Thromb Haemost* 69: 522-530

46. Linder H., Holler E., Multhoff G., Schreglmann M., Klauke I., Schultz-Hector S., Eissner G. (1997) Peripheral blood mononuclear cells induce programmed cell death in human endothelial cells and may prevent repair: role of cytokines. *Blood* 89: 1931-1938
47. Lo B., Fijnheer R., Castiglione D. (2004) Activation of haemostasis after coronary artery bypass grafting with or without cardiopulmonary bypass. *Anesth Analg* 99: 634-640
48. MacLellan W. R., Schneider M. D. (1997) Death by design. Programmed cell death in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 81: 137-144
49. Magee M. J., Jablonski K. A., Stamou S. C. (2002) Elimination of cardiopulmonary bypass improves early survival for multivessel coronary artery bypass patients. *Ann Thorac Surg* 73: 1196- 1202
50. Makin A., Chung N. A. Y., Silverman S. H., Blann A., Lip G. Y. (2004) Assessment of endothelial damage in atherosclerotic vascular disease by quantification of circulating endothelial cells. Relationship with von Willebrand factor and tissue factor. *Eur Heart J* 25: 371-376
51. Maulik N., Yoshida T. (2000) Oxidative stress developed during open heart surgery induces apoptosis: reduction of apoptotic cell death by ebselen, a glutathione peroxidase mimic. *J Cardiovasc Pharmacol* 36: 601-608.
52. Miller B. E., Levy J. H. (1997) The inflammatory response to cardiopulmonary bypass. *J Cardiothoracic and Vascular Anaesthesia* 11: 355-366
53. Mutin M., Canavy I., Blann A., Bory M., Sampol J., Dignat-George F. (1999) Direct evidence of endothelial injury in acute myocardial infarction and unstable angina by demonstration of circulating endothelial cells. *Blood* 93: 2951-2958
54. Paparella D., Yau T. M., Young E (2002) Cardiopulmonary bypass induced inflammation: pathophysiology and treatment. An update. *European Journal of Cardiothoracic Surgery* 21: 232-244
55. Percivalle H., Revello G., Vago L., Morini F., Germa G. (1993) Circulating endothelial giant cells permissive for human cytomegalovirus (HCMV) are detected in disseminated HCMV infection with organ involvement. *J Clin Invest* 92: 663-670
56. Rafii S., Lyden D. (2003) Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med* 9: 702-712

57. Rafii S. (2000) Circulating endothelial precursors: mystery, reality, and promise. *J Clin Invest* 105: 17-19
58. Rastan A. J., Bittner A. B., Gummert J. F., Walther T., Schewick C. V., Girdauskas E., Mohr F. W. (2005) On-pump beating heart versus off-pump coronary artery bypass surgery- evidence of pump-induced myocardial injury. *Eur J Cardiothorac Surg* 27: 1057-1064
59. Re F., Zanetti A., Sironi M. (1994) Inhibition of anchorage-dependent cell spreading triggers apoptosis in cultured human endothelial cells. *J Cell Biol* 127: 537-546
60. Royston D. (1997) The inflammatory response and extracorporeal circulation. *J Cardiothoracic and Vascular Anaesthesia* 11: 341-354
61. Scheubel R. J., Zorn H., Silber R. E., Kuss O., Morawietz H., Holtz J., Simm A. (2003) Age dependent depression in circulating endothelial progenitor cells in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *Journal of the american college of cardiology* 42: 2073-2080
62. Schmid C. (2007) Leitfaden Erwachsenen-Herzchirurgie 2. Auflage
63. Schmid F. X., Floerchinger B., Vudattu N. K., Eissner G., Haubitz M., Holler E., Andreesen R., Birnbaum D. E. (2006) Direct evidence of endothelial injury during cardiopulmonary bypass by demonstration of circulating endothelial cells. *Perfusion* 21:133-137
64. Schulze C., Conrad N., Schüz A., Egi K., Reichenspurner H., Reichart B., Wildhirt S. (2000) Reduced expression of systemic inflammatory cytokines after off-pump versus conventional coronary artery bypass grafting. *Thorac Cardiovasc Surg* 48: 364-369
65. Shi Q., Rafii S., Wu M. H., Wijelath E. S., Yu C., Ishida A., Fujita, Y., Kothari, S., Mohle R., Sauvage L. R., Moore M. A., Storb R. F., Hammond W. P. (1998) Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* 92: 362-367
66. Solovey A., Lin Y., Browne P., Choong S., Wayner E., Hebbel R. P. (1997) Circulating activated endothelial cells in sickle cell anaemia. *N Engl J Med* 337: 1584-1590
67. Sowemimo-Coker S. O., Meiselman H. J., Francis R. B. (1989) Increased circulating endothelial cells in sickle cell crisis. *Am J Hematol* 31: 263-270

68. Thompson C. B. (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267: 1456-1462
69. Valen G., Paulsson G., Vaage J. (2001) Induction of inflammatory mediators during reperfusion of the human heart. *Ann Thorac Surg* 71: 226-232
70. van Dijk D., Nierich A. P., Jansen E. W. (2001) Early outcome after off-pump versus on-pump coronary bypass surgery: results from a randomized study. *Circulation* 104: 1761-1766
71. van Mourik J. A., Boertjes R., Huisveld I. A., Fijnvandraat K., Pajkrt D. (1999) von Willebrand factor propeptide in vascular disorders: A tool to distinguish between acute and chronic endothelial cell perturbation. *Blood* 94:179-185.
72. Vane J. R. (1994) The endothelium: maestro of the blood circulation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 343: 225-246
73. Wan I. Y., Arifi A. A., Wan S., Yip J. H., Sihoe A. D., Thung K. H., Wong E. M., Yim A. P. (2004) Beating heart revascularisation with or without cardiopulmonary bypass: evaluation of inflammatory response in a prospective randomized trial. *Thorac Cardiovasc Surg* 127: 1624-1631
74. Wan S., LeClerc J. L., Vincent J. L. (1997) Inflammatory Response to Cardiopulmonary Bypass: Mechanisms Involved and Possible Therapeutic Strategies. *Chest* 112: 676-692
75. Weber P. C. Herz-Kreislauf-Prophylaxe und Therapie Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislauf-Krankheiten- August Lenz-Stiftung, *Wissenswertes*
76. Woywodt A., Streiber F., de Groot K., Regelsberger H., Haller H., Haubitz M. (2003) Circulating endothelial cells are markers for ANCA-associated small-vessel vasculitis. *Lancet* 361: 206-210
77. Woywodt A., Bahlmann F., de Groot K., Haller H., Haubitz M. (2002) Circulating endothelial cells: Life, death and repair of the endothelial cell layer. *Nephrology, Dialysis, Transplantation* 17: 1728-1730
78. Woywodt A., Scheer J., Hambach L., Buchholz S., Ganzer A., Haller H., Hertenstein B., Haubitz M. (2004) Circulating endothelial cells as a marker of endothelial damage in allogenic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 103: 3603-3605
79. Woywodt A., Schroeder M., Gwinner W. (2003) Elevated numbers of circulating endothelial cells in renal transplant recipients. *Transplantation* 76: 1-4

80. Woywodt A., Schroeder M., Mengel M. (2003) Circulating endothelial cells are a novel marker of cyclosporine-induced endothelial damage. *Hypertension* 41: 720-723



## **7 Danksagung**

Herrn Prof. Dr. med. C. Schmid danke ich für die Überlassung des Themas, die freundliche und stets gewährte Unterstützung, die Korrektur und die Berichterstattung.

Besonders möchte ich mich bei Fr. PD. Dr. rer. nat. K. Lehle für die Hilfe bei den labortechnischen Untersuchungen bedanken.

Ferner danke ich den Kollegen Dr. med. M. Shahin und Dr. med. B. Flörchinger für die freundliche Hilfsbereitschaft, sowie die geleistete Unterstützung bei dieser Arbeit.

Für die computertechnische Unterstützung bei der endgültigen Formgebung der Arbeit gebührt meinem Kollegen Dr. med. B. S. Puthenveetil ganz besonderer Dank.

Mein herzlicher Dank gilt weiterhin allen Mitarbeitern des Forschungslabors für Herz-Thorax-und herznahe Gefäßchirurgie der Universitätsklinik Regensburg, nicht nur für die tatkräftige Unterstützung, sondern auch für die freundliche und kollegiale Zusammenarbeit.

## **8 Lebenslauf**

**Name :** Lucian George Costin

**Geburtsdatum:** 29.05.1974 in Vaslui, Rumänien

**Familienstand:** verheiratet, 2 Kinder

### **Schulbildung:**

1980-1984 Grundschule Vaslui

1984-1992 Gymnasium in Vaslui, Abitur

### **Studium/Berufsausbildung:**

10/1992-09/1998 Studium der Humanmedizin und Staatsexamen (Approbation als Arzt)  
an der „Gr. T. Popa“ Universität, Iasi, Rumänien

01/1999-02/2000 Arzt im Praktikum: Kreiskrankenhaus Vaslui, Rumänien, Wahlfach:  
Allgemeinchirurgie

02/2000-02/2004 Assistenzarzt an der Universitätsklinik „C. C. Iliescu“-Fundeni,  
Bukarest, Rumänien; chirurgische Abteilungen: Allgemeinchirurgie, Gefäßchirurgie,  
Thoraxchirurgie.

Seit 03/2004 Wissenschaftlicher Mitarbeiter und Assistenzarzt  
in der Abteilung für Herz-, Thorax- und herznahe Gefäßchirurgie an der  
Universitätsklinik Regensburg, Leiter: Prof. Dr. med. Christof Schmid.

## **9 Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der jeweiligen Quelle gekennzeichnet.

Insbesondere habe ich für das Verfassen dieser Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- oder Beratungsdiensten in Anspruch genommen.

Niemand hat von mir geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der hier vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.













,









