

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik für Anästhesiologie, operative Intensivmedizin und Schmerztherapie
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h. c. Hugo Van Aken-

**Der Einfluss der inspiratorischen Sauerstoffkonzentration auf
Thrombozytenaktivierung nach Ischämie und Reperfusion der oberen
Extremität**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Kuhn, Nicola
aus Herrenberg

2014

**Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. Wilhelm Schmitz

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Manuel Wenk

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Arne Streitbürger

Tag der mündlichen Prüfung: 23.07.2014

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik für Anästhesiologie, operative Intensivmedizin und Schmerztherapie
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h. c. Hugo Van Aken-
Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Manuel Wenk
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Arne Streitbürger

ZUSAMMENFASSUNG

Der Einfluss der inspiratorischen Sauerstoffkonzentration auf Thrombozytenaktivierung nach Ischämie und Reperfusion der oberen Extremität

KUHN, Nicola

Einleitung: Ischämie- und Reperfusionen-Ereignisse führen zur Bildung von toxischen Sauerstoffradikalen, die signifikante Endothelschäden verursachen und verstärken können. Als Folge dessen kommt es zu einer Aktivierung von Thrombozyten, die aufgrund ihrer prothrombotischen und proinflammatorischen Wirkung zu einer erhöhten perioperativen Morbidität und Mortalität beitragen können. Ziel der vorliegenden Studie war es, den Einfluss unterschiedlicher inspiratorischer Sauerstoffkonzentrationen auf das Ausmaß der Thrombozytenaktivierung im Rahmen eines Ischämie-Reperfusionen-Ereignisses zu ermitteln.

Methoden: In dieser prospektiv-randomisierten Studie wurden Patienten, bei denen intraoperativ durch einen arteriellen pneumatischen Tourniquet an der oberen Extremität ein „Ischämie-Reperfusionen-schaden“ (IRI) ausgelöst wurde, mit unterschiedlichen inspiratorischen Sauerstoffkonzentrationen (30%, 50%, 80%) beatmet. An fünf peri-ischämischen Zeitpunkten (T0-T4) wurden Blutproben entnommen und auf Thrombozytenaktivierungsmarker untersucht: Hierbei wurden Glykoprotein VI (GPVI) und Platelet-Derived Microparticles (PDMP) mithilfe eines Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) und Prokoagulate Phospholipide (PPL) mit Hilfe des Faktor Xa-Clotting Time-Tests (XACT) gemessen.

Ergebnisse: Während der Reperfusion des ehemals ischämischen Gebietes kam es zu einem signifikanten Anstieg der gemessenen Thrombozytenaktivierungsmarker. Zwischen den Gruppen verschiedener inspiratorischer Sauerstoffkonzentrationen erreichten die Unterschiede in unserem Modell keine statistische Signifikanz.

Diskussion: In der Reperfusionenphase eines IRI kommt es zu systemisch nachweisbar gesteigertem Auftreten von Surrogatmarkern für Thrombozytenaktivierung. Hierbei zeigte sich Glykoprotein VI als der spezifischste Parameter. Das Ausmaß der Aktivierung von Thrombozyten konnte durch die Höhe des inspiratorischen Sauerstoffgehaltes nicht signifikant beeinflusst werden, so dass man davon ausgehen muss, dass die inspiratorische Sauerstoffkonzentration unter normalen Druckverhältnissen weder einen wesentlichen Einfluss auf das Ausmaß der Thrombozytenaktivierung noch auf die Bildung von Sauerstoffradikalen und Endothelschäden hat. In zukünftigen Studien könnte versucht werden, die Unterschiede der Sauerstoffkonzentration im Blut durch physikalische Lösung zu verstärken, z.B. durch den Einsatz einer hyperbaren Druckkammer.

Tag der mündlichen Prüfung: 23.07.2014

Erklärung

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:

Der Einfluss der inspiratorischen Sauerstoffkonzentration auf Thrombozytenaktivierung nach Ischämie und Reperfusion der oberen Extremität

in der/im (Klinik, Institut, Krankenanstalt):

Universitätsklinikum Münster, Klinik für Anästhesiologie, operative Intensivmedizin und Schmerztherapie

unter der Anleitung von:

Priv.-Doz. Dr. med. Manuel Wenk

1. selbständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Ort, Datum

Name:

(in Druckbuchstaben)

Unterschrift

Meinen Eltern, Geschwistern und Freunden

I.	Einleitung	1
I.1.	Hintergrund	1
I.2.	Ischämie- und Reperfusionsschaden (IRI)	1
I.2.1.	Pathophysiologie.....	3
I.2.2.	Szenarien.....	8
I.2.3.	Klinische Relevanz	13
I.3.	Thrombozyten und Hämostase.....	13
I.3.1.	Aktivierung der Thrombozyten bei IRI	15
I.3.2.	Glykoprotein VI – Aufbau und Funktion	16
I.3.3.	Platelet-Derived Microparticles (PDMPs).....	19
I.3.4.	Prokoagulante Phospholipide (PPLs)	22
I.4.	Fragestellung	23
II.	Methoden	24
II.1.	Studienprotokoll	24
II.1.1.	Ethik, Studiendesign:.....	24
II.1.2.	Patientenkollektiv	26
II.1.3.	Randomisierung.....	27
II.1.4.	Anästhesie	27
II.2.	GPVI - Enzyme-linked-Immunsorbent-Assay (GPVI-ELISA).....	28
II.3.	Zymphen Enzyme-linked-Immunsorbent-Assay (ELISA).....	31
II.4.	Faktor X-activated Clotting Time (XACT)	33
II.5.	Statistik	36
III.	Ergebnisse	37
III.1.	Patientenkollektiv	37
III.2.	Demographische Daten	37
III.3.	Operationsdaten.....	40
III.4.	Glykoprotein VI	41
III.4.1.	GPVI Kumulativ	41
III.4.2.	GPVI bei unterschiedlichen inspiratorischen Sauerstoffkonzentrationen	42
III.5.	Platelet-Derived Microparticles.....	43
III.5.1.	PDMP Kumulativ.....	43
III.5.2.	PDMP bei unterschiedlichen inspiratorischen Sauerstoffkonzentrationen:	44
III.6.	Prokoagulante Phospholipide	45
III.6.1.	PPL Kumulativ.....	45
III.6.2.	PPL bei unterschiedlichen inspiratorischen Sauerstoffkonzentrationen..	46
III.7.	Zusammenfassung der Ergebnisse	47
IV.	Diskussion	49
IV.1.	Zusammenfassung der Ergebnisse	49
IV.1.1.	GPVI.....	53
IV.1.2.	PDMP.....	54
IV.1.3.	PPL.....	55
IV.2.	Limitationen und methodische Einschränkungen	55
IV.2.1.	IRI-Modell	55
IV.3.	Zusammenfassung und Ausblick	57
V.	Literaturverzeichnis	59

VI. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	72
VII. Danksagung	73

I. Einleitung

I.1. Hintergrund

Das Phänomen „Ischämie-Reperfusionsschaden“ (Ischaemia/Reperfusion Injury; IRI) wurde erstmals in den 1970er Jahren beschrieben. (28) IRI bezeichnet einen unspezifischen, überschießenden Aktivierungs- und Entzündungsprozess, der durch eine vorübergehende Sauerstoffminderversorgung des Gewebes initiiert und letztlich durch die Reperfusion des Gewebes mit sauerstoffhaltigem Blut paradoxerweise weiter verstärkt wird.

IRI kann in einer Vielzahl von Situationen im klinischen Alltag beobachtet werden und ist daher ein klinisch hochrelevantes Problem.

In der vorliegenden Studie sollte untersucht werden, ob es im Rahmen der Reperfusion einen Zusammenhang zwischen der Höhe der inspiratorischen Sauerstoffkonzentration und dem Ausmaß der Aktivierung von Thrombozyten gibt. Hierfür wurden bei operativen Patienten mit IRI spezifische Marker der Thrombozytenaktivierung (Glykoprotein VI, Platelet-Derived Microparticles, Prokoagulierende Phospholipide) gemessen.

I.2. Ischämie- und Reperfusionsschaden (IRI)

Ischämie ist die pathophysiologische Grundlage vieler im klinischen Alltag angetroffener Krankheitsbilder wie etwa dem Myokardinfarkt, dem ischämischen Schlaganfall, der peripheren Gefäßinsuffizienz oder der Minderperfusion von Organsystemen im Rahmen eines hypovolämen Schocks. (23,51)

Darüber hinaus kommt es auch bei einer Vielzahl von elektiv durchgeführten Operationen zu iatrogenen Ischämien (28,51): Arterielle Klemmen in der Gefäßchirurgie, der Einsatz eines pneumatischen arteriellen Tourniquet in der orthopädischen Chirurgie, herzchirurgische Eingriffe mit partiellem oder totalem Kreislaufstillstand, in der Transplantationsmedizin, bei hämorrhagischem Schock oder

auch die Septikämie sind einige typische Beispiele, die die tägliche Konfrontation mit Ischämie- und Reperfusionsschäden im klinischen Alltag veranschaulichen. (51)

Eine Sauerstoffminderversorgung des Gewebes führt allgemein rasch zu irreversiblen Zellschädigungen, im Falle sensibler Organe wie des Gehirns oder des Myokards reichen hier bereits wenige Minuten aus. (28,51)

Obwohl eine zeitige Reperfusion mit oxygeniertem Blut essentiell ist um irreversible Zellschäden möglichst gering zu halten, führt paradoxerweise die Reperfusion selbst zu weiteren Schäden und Zelltod in dem vormals ischämischen Gewebe. Dieses Phänomen wird durch den Begriff Ischämie-Reperfusionsschaden (IRI) beschrieben.

So konnte in experimentellen Studien gezeigt werden, dass die histologischen Veränderungen nach dreistündiger Ischämie des Intestinums oder der Leber gefolgt von einer Stunde Reperfusion wesentlich gravierender sind als die Veränderungen, die nach vier Stunden reiner Ischämie beobachtet werden können. (23,28,51)

Eine Ischämie hat gravierende Auswirkungen auf die zelluläre Homöostase: Es kommt zu Natrium- und Kalziumüberschuss, intrazellulärer Azidose, Schwellung, Verletzungen des Zytoskeletts, mitochondrialer Hyperkalzämie und weiteren Veränderungen (Verlust des sarkoplasmatischen Membranpotentials; Absinken von ATP, Glutathion; gesteigerte Expression von leukozytären Adhäsionsmolekülen; Sekretion von Zytokinen wie $\text{TNF}\alpha$, IL-1, 6, 8). (23,28,51)

Insbesondere das Gefäßsystem - und hier vor allem das Endothel - reagiert sehr empfindlich auf IRI. (51)

Die Aufgaben von Endothelzellen sind von vitaler Bedeutung: sie kontrollieren den Gefäßtonus und somit den lokalen Blutfluss, modulieren Gerinnung und Entzündung, beeinflussen das Immunsystem, kontrollieren den Transport von Mikro- und Makromolekülen ins Interstitium, wandeln Prohormone in aktive Hormone um und beeinflussen die Bildung von neuen Blutgefäßen. Die Auswirkungen von IRI auf das Endothel reichen bis zur Nekrose des Endothels. (51)

Ischämie mit anschließender Reperfusion führt aber nicht nur zu einer lokalen, sondern auch einer systemischen Entzündungsantwort, die von reaktiven Oxidationsprodukten, Komplementaktivierung, Leukozytenadhäsion und -migration, Thrombozyten- und Leukozytenaggregation, erhöhter Gefäßpermeabilität und verminderter endothelabhängiger Relaxation gekennzeichnet ist. (23,28,51,125,128)

Oft bleiben die Auswirkungen subklinisch, können aber im schlimmsten Falle in fatale Krankheitsbilder wie das Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) oder das Multiorgan Dysfunction Syndrome (MODS) münden, die bis zu 30-40% der Mortalität auf Intensivstationen ausmachen. (23,51,104) So können Ischämie-Reperfusionsschäden weit über das ursprüngliche ischämische Gebiet Auswirkungen auf unabhängige, ursprünglich nicht-ischämische Organe haben. (23)

I.2.1. Pathophysiologie

Die pathophysiologischen Auswirkungen des IRI beruht auf zwei Annahmen: Erstens, dass es eine gewisse Anzahl an Zellen gibt, die während einer Ischämie durch die Sauerstoffminderversorgung irreversibel geschädigt werden und eine weitere Gruppe Zellen, die vollständig intakt bleiben. Zweitens, dass es eine dritte Zellgruppe gibt, die nach der Ischämie zwar potentiell vital, aber gefährdet für den Zelltod durch Reperfusion ist. Diese Zellgruppe entscheidet letztlich über das Ausmaß des Reperfusionsschadens (Abb. 1). (23)

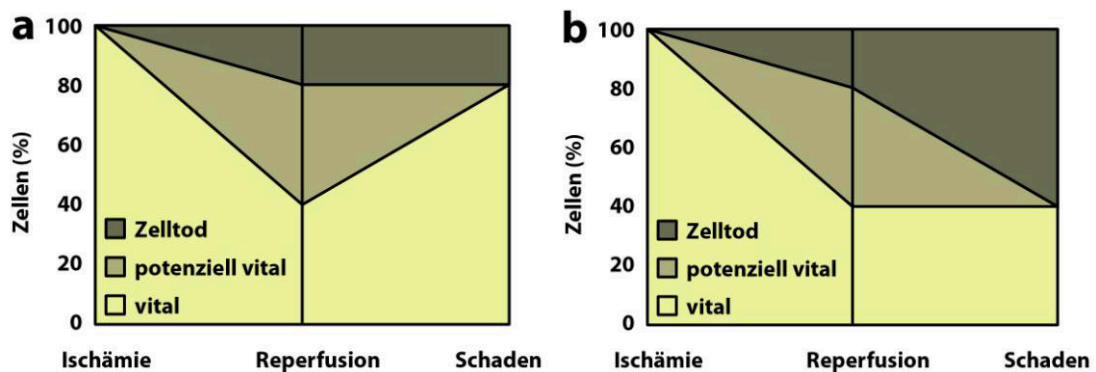


Abbildung 1 (28) - Konzept des Ischämie-Reperfusionsschadens:

Schematische Darstellung des Ischämie-Reperfusionsschadens: Die nach Ischämie noch potentiell vitalen Zellen bestimmen das Ausmaß des Reperfusionsschadens.

a: Die potenziell vitalen Zellen erholen sich bei Reperfusion komplett.

b: Die potenziell vitalen Zellen werden durch die Reperfusion weiter geschädigt, bis hin zum Zelltod.

Ischämische Phase

Ischämie (aus dem Griechischen: ischein: Aufhalten, haima: Blut) bezeichnet eine relative oder absolute Reduktion der Blutversorgung eines Organs und daraus resultierend eine im Vergleich zum Bedarf unzureichende Sauerstoffversorgung. Dies führt zu einer Vielzahl von zellulären, metabolischen und ultrastrukturellen Veränderungen, abhängig von der Intensität und Dauer der Ischämie, des Zelltyps und dessen jeweiligem metabolischen Bedarf. (23,51)

Normalerweise stellt die sauerstoffabhängige oxydative Phosphorylierung den Zellen energiereiche Phosphate in Form von Adenosintriphosphat (ATP) bereit, welches für eine große Zahl von Stoffwechselreaktionen benötigt wird. Schon ein paar Sekunden nach Unterbrechung des Blutflusses verbraucht die Zelle den Sauerstoff, der in Oxyhämoglobin, Myoglobin oder Neuroglobin gespeichert ist und ist gezwungen ihren Stoffwechsel umstellen. (67,77) Durch anaerobe Glykolyse wird so eine minimale Produktion von ATP aufrechterhalten. Trotzdem überschreitet die Nachfrage schnell die Produktion, und die intrazelluläre Konzentration von ATP sinkt weiter. ATP wird zu Adenosindiphosphat (ADP) und schließlich Adenosinmonophosphat (AMP) abgebaut, welches frei aus der Zelle diffundieren kann. (38) Hierdurch sinkt der zelluläre Anteil an Vorstufen des ATP, was zu einer verminderten ATP-Synthese während der Reperfusion führt. (51)

Durch den ATP-Mangel können die ATP-abhängigen Pumpvorgänge in der Membran nicht mehr normal ablaufen: Durch eine verminderte Aktivität der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ und eine erhöhte Aktivität des $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}\text{-Austauschers}$ kommt es zum vermehrten Einstrom von Natrium und Calcium. (84,107,143)

Die intrazelluläre Hyperkalzämie induziert den Abbau von sarkoplasmatischen Phospholipiden und Proteinen des Zytoskeletts und modifiziert unter anderem die Tertiärstruktur einiger Enzyme. So kommt es zum Beispiel zur Konformationsänderung der Xanthindehydrogenase zur Xanthinoxidase. (19,52,93) Diese zwei Enzyme katalysieren die gleichen Reaktionen, nämlich die Umwandlung von Hypoxanthin (welches durch Abbau der energiereichen Phosphate intrazellulär akkumuliert) zu Xanthin und von Xanthin zu Harnsäure. Während aber die Xanthindehydrogenase Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD^+) als Kofaktor benötigt, benötigt die Xanthinoxidase Sauerstoff als Kofaktor. (51) Sobald der Zelle in der

Reperfusionsphase wieder Sauerstoff zugeführt wird, kommt es bei Umwandlung des akkumulierten Hypoxanthin zur Bildung toxischer reaktiver Sauerstoffradikale. (28)

Sekundär zur zellulären kommt es auch zur mitochondrialen Hyperkalzämie, welche zu Schwellung und zum Verlust des Membranpotentials führt. Dies führt zur irreversiblen Öffnung der PTP (Permeabilitätsübergangspore), wodurch die Integrität des Mitochondriums zerstört ist. Dieser weite Kanal ist unspezifisch und durchlässig für Moleküle bis zu einem Molekulargewicht von 1500 Da, wie zum Beispiel Cytochrom c. Im Zytosol aktiviert Cytochrom c Caspasen und initiiert damit die Apoptose. (95)

Der intrazelluläre ATP-Mangel verhindert außerdem die Regeneration von Glutathion, Ascorbinsäure und Tocopherol, welche wichtig für die Entgiftung von Stoffwechselprodukten im Zytosol und der sarkoplasmatischen Membran sind, indem sie freie Radikale zu H₂O umwandeln. Ohne diese Schutzsysteme führt der Anstieg der reaktiven Sauerstoffradikale (ROS) zu direkten Schäden an Zellmembranen und Proteinen, zum Beispiel durch eine Lipidperoxidation. (28) Die Anhäufung von osmotisch aktiven Partikeln wie Laktat, Natrium, anorganischem Phosphat und Kreatin führen zu einer Zellschwellung. Laktat, Protonen und eine verminderte Oxidation von Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH₂) durch die Mitochondrien säuert die Zelle an und inhibiert die anaerobe Glykolyse.

Die Ischämie stimuliert die Exprimierung von Adhäsionsmolekülen an der Oberfläche der Endothelzellen und der Leukozyten (P-, L-Selektine, interzelluläre Adhäsionsmoleküle, Thrombozyto-endotheliale Zelladhäsionsmoleküle (PECAMs)) sowie die Sekretion von Zytokinen (TNF α , IL-1,6,8 und andere) und vasoaktiven Agenzien (Endothelin, Thromboxan A₂). (51) Die Ischämie induziert also einen proinflammatorischen Zustand, der das Risiko für Reperfusionsschäden erhöht. (28)

Die Zytokinproduktion steigt während der Reperfusion massiv an und initiiert so eine Entzündungsantwort. Die Oberflächenadhäsionsproteine sorgen für eine Migration der neutrophilen Granulozyten aus den Gefäßen ins Interstitium. Abgesehen von ihrer Beteiligung an der Immunabwehr sind neutrophile Granulozyten notwendig für die Heilung von entzündetem Gewebe und die Resorption des unter der Ischämie nekrotisch gewordenen Gewebes. (51)

Die Effekte der Hypoxie auf zellulärer Ebene sind vorwiegend zelluläre Azidose, Verlust des sarkoplasmatischen Membranpotentials, Zellschwellung, Desorganisation

des Zytoskeletts, ATP- und Kreatinphosphatmangel mit dessen Folgen, steigende Exprimierung von leukozytären Adhäsionsmolekülen und Sekretion von Zytokinen (TNF α , IL-1, 6, 8 und andere). (51)

Reperfusionsphase

Die Wiederherstellung des Blutflusses in einem vormals ischämischen Gewebe ist für die Erholung des Gewebes zwingend erforderlich, kann aber selber gleichzeitig erhebliche Schäden hervorrufen:

Es kommt zu einer Entzündungsantwort, die von einer Aktivierung des Komplementsystems und der neutrophilen Leukozyten sowie der massiven Produktion freier Radikale gekennzeichnet ist. Vasomotorik und Endothelfunktion werden gestört.

Die Entzündungsantwort kann sich darüber hinaus durch die Ausschüttung von Zytokinen, Chemokinen und proinflammatorischen Metaboliten in die Blutbahn und durch aktivierte Thrombozyten vom ischämischen Gebiet auf den gesamten Körper ausweiten. (51)

Reaktive Sauerstoffradikale

In den dysfunktionalen Mitochondrien des ischämischen Gewebes führt die Reperfusion durch Umwandlung des akkumulierten Hypoxanthin durch Xanthinoxidase zur Bildung von toxischen ROS wie dem Superoxidanion (O_2^-), Hydroxylradikalen (OH^\cdot , HOCl), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Stickoxidabkömmlingen. (23)

Auch die zwei wichtigsten NO-Synthetasen eNOS (Calcium-/ Calmodulin-abhängiger endothelialer Typ) und iNOS (Calcium-unabhängiger induzierbarer Typ) wandeln wegen des Mangels an ihren eigentlichen Substraten L-Arginin und Kofaktor Tetrahydrobiopterin (BH_4) Sauerstoff in hochreaktive Superoxidanionen (O_2^-) um. (28,120)

Die ansteigende Konzentration der ROS bei gleichzeitig sinkender Konzentration von Antioxidantien wie Glutathion, die als Radikalfänger wirken, führt zur direkten Interaktion der ROS mit Zelllipiden, -proteinen und Desoxyribonukleinsäure (DNA). Das führt letztlich zu Zelltod und Aktivierung von NF κ B (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells). (28,51)

Diese Aktivierung erfolgt zusätzlich über Zytokine (Tumornekrosefaktor α (TNF α) und Interleukin-1 β (IL-1 β)) und über Toll-Like-Rezeptoren-Signalwege (z.B. induziert über Hyaluron-Fragmente als Folge der Gewebeschäden). Des Weiteren führen die reaktiven Sauerstoffradikale zu DNA-Strangbrüchen, welche das Kernenzym Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) aktivieren. PARP spaltet NAD⁺ in Nicotinamid und ADP-Ribose, welches polymerisiert und für DNA-Reparaturen und für die Stabilität des Genoms sorgt.

Die Überaktivität von PARP verbraucht erneut ATP und kann dadurch wiederum zu Dysfunktionen in der Zelle oder Zelltod führen. (28)

Durch den Kalziumüberschuss im Zytosol werden eine Vielzahl von intrazellulären Enzymen wie Proteasen und Endonukleasen aktiviert, die proapoptotische Signalwege aktivieren. Ebenso wird die Phospholipase A₂ aktiviert, was zur Bildung von Arachnoidonsäureabkömmlingen führt (Leukotrien B₄, Thromboxan A₂), welche zur Vasokonstriktion beitragen und die Adhäsion von neutrophilen Granulozyten fördert. Durch deren oxydativen Burst, der zur erneuten Bildung von reaktiven oxydativen Sauerstoffradikalen führt, wird der „Teufelskreis“ geschlossen. (28,36)

Zelltod

Die Mechanismen des Zelltods während IRI können sowohl Nekrose als auch Apoptose sein. Die Nekrose ruft durch Freisetzung zytosolischer Inhalte eine Entzündungsantwort im Zentrum der Infarktzone hervor. Im Gegensatz zur Nekrose ist die Apoptose ein fein regulierter ATP-abhängiger Vorgang, der zum Zelluntergang ohne das unmittelbare Hervorrufen einer Entzündungsantwort führt. (28)

Die Produktion von TNF α durch das wiederdurchblutete Organ scheint eine ausschlaggebende Rolle für die Induktion der Apoptose zu spielen. TNF α kann einen rezeptorabhängigen Signalweg aktivieren, der zum Zelltod führt, indem es nachgeschaltete Caspasen aktiviert. Aber die TNF α -Signalwege sind nicht die einzige Ursache. Schwellung und Depolarisation der Mitochondrien, einhergehend mit Hyperkalzämie setzen zytoplasmatische Proteine wie Cytochrom C frei. Wenn dieses Protein, welches Bestandteil der Atmungskette ist, vom Mitochondrium ins Zytoplasma gelangt, interagiert es mit dem Apoptose-aktivierenden Faktor-1 (Apaf-1) und ATP und

bildet so das Apoptosom. Dies ist ein großer oligomerer Proteinkomplex, der die Caspase 9 aktivieren kann, die wiederum den Caspasensignalweg aktiviert.

Die Apoptose des Endothels tritt früher auf als die des anliegenden Parenchyms und beeinflusst sie. Daher verringert eine Reduktion der endothelialen Apoptose gleichzeitig die Apoptose des anliegenden Parenchyms. (23,51)

I.2.2. Szenarien

IRI an Organen

In Arteriolen führt IRI zum Auftreten von Gefäßspasmen. (51) Durch die herabgesetzte Produktion von Stickoxid fehlt das Gegengewicht zur von den Arteriolen angestrebten Vasokonstriktion. Diese Tendenz ist in einigen Geweben wie im Skelettmuskel, dem Herzen, der Lunge oder dem Gehirn besonders ausgeprägt.

Die Auswirkungen auf die Funktion eines Organs hängen von dem Grad und der Dauer der Ischämie ab und außerdem auch von der Empfindlichkeit eines Organs. Die Auswirkungen auf die gesamte Körperfunktion hängen von der Rolle des Organs in der Homöostase ab. (51)

In der Lungentransplantationschirurgie ist die Lungenschädigung durch IRI von unspezifischen alveolären Schäden, Lungenödemen und Hypoxämie gekennzeichnet. Anhand einer deutlich erhöhten Konzentration von löslichem P-Selektin, löslichem CD40-Ligand und Thrombozyten-Leukozyten-Konjugaten konnte eine signifikante Aktivierung der Thrombozyten und somit ihre wichtige Rolle für IRI nach Lungentransplantation festgestellt werden. (141)

Im schlimmsten Fall kann ein akutes primäres Transplantatversagen auftreten, und auch sonst bleibt IRI eine bedeutende Ursache von Morbidität und Mortalität nach Lungentransplantation. (27)

Auch die Niere ist ein gefährdetes Organ: IRI kann Schäden der Nierentubuli induzieren und zum Absinken der glomerulären Filtrationsrate beitragen.

Die perioperative Entwicklung eines akuten Nierenversagens ist mit hoher Morbidität und Mortalität vergesellschaftet. Die Inzidenz variiert entsprechend zu verschiedenen operativen Techniken. (51)

Auch am Herzen kommt es durch Reperfusion zu Schäden wie zum Beispiel dem „myokardialen Stunning“, einer vorübergehenden kontraktile Dysfunktion oder zu „Reperfusion Arrhythmias“, die zum Herztod führen können. (23,34) In der Herzchirurgie wird dem IRI eine bisher nicht eindeutig geklärte Rolle bei der Entwicklung einer postoperativen kognitiven Störung zugesprochen. (23,51) Ein IRI der Leber ist die Hauptursache für Morbidität bei der Leberresektion oder Lebertransplantation. (35,97) Die frühe Entzündungsphase ist von einer Aktivierung der Kupffer-Zellen (KC), die ROS generieren, gekennzeichnet. (14,56,66,86) Außerdem akkumulieren Leukozyten in der postischämischen Leber und führen zu weiterem Leberschaden. (9,65)

Die Anzahl der adhärenen Thrombozyten ist direkt nach Reperfusion proportional zur Reperfusionszeit signifikant erhöht. (35) Eine Konstriktion der Sinusoide und die Anwesenheit von aktivierten KC führen zur Adhäsion von Thrombozyten. (86) Diese induzieren dann eine Akkumulation von Leukozyten in den Sinusoiden, was zu Perfusionsstörungen und Leberversagen führen kann. Die Thrombozyten spielen also eine wichtige Rolle, indem sie zwischen KCs und Leukozyten vermitteln. Die Konstriktion der Sinusoide und die KCs selbst korrelieren stark mit der Thrombozytenadhäsion in der frühen Phase der IRI. Die Thrombozyten allein haben wenig Effekt auf einen Leberschaden, führen aber zur vermehrten Adhäsion von Leukozyten, was zu einer Progression der Leberschädigung führt. (105)

Die Mechanismen der IRI-induzierten Hirnschäden haben große Ähnlichkeit zu den IRI-induzierten Herzschäden. Viele Mediatoren und Zytokine, die bei IRI produziert werden, wie Bradykinin, Purin-Nukleotide, Stickoxid oder ROS steigern die Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke und induzieren ein Hirnödem. (1) Die leukozytäre Infiltration in das ischämische Gehirn steigert den zerebralen Schaden, und steigert bei Reperfusion das „No-Reflow“-Phänomen (s.u.).

Die indirekten Auswirkungen von IRI auf entfernte Organe können als Folge des IRI auftreten. Die neutrophilen Granulozyten und die Aktivierung von Thrombozyten und des Komplementsystems zusammen mit einer massiven Produktion von Zytokinen/Chemokinen rufen einen proinflammatorischen Zustand hervor, der die Funktion anderer Organe beeinflusst. So beschränkt sich beispielsweise ein IRI bei Operationen an der Bauchaorta nicht nur auf die unteren Extremitäten, sondern

verursacht auch Schäden an entfernten Organen und Geweben wie an Herz, Lunge, Nieren und Darm. (3,33,69,118,124) Lungenschäden, die nach Operationen an der Bauchaorta auftreten, sind von progressiver Hypoxämie, pulmonaler Hypertension, verminderter Compliance der Lunge und Ödem gekennzeichnet, oft einhergehend mit einem ARDS (Acute Respiratory Distress Syndrome). (33,124) Im Vergleich zur offenen Bauchchirurgie sind bei endovaskulärer Chirurgie abdomineller Aortenaneurysmen IRI-induzierte intestinale Mukosaschäden, Nieren- und Lungendysfunktion geringer ausgeprägt. (69)

Die Reperfusion der unteren Gliedmaßen kann die Apoptose von Kardiomyozyten hervorrufen. (88)

Die Reperfusion eines zuvor ischämischen Darms kann durch das Zusammenbrechen der physiologischen Darmbarriere zu beträchtlichen Dysfunktionen diverser Organe wie Leber, Niere und Lunge bis zur Entwicklung eines SIRS führen. (51)

Gefäßverletzung und das „No-Reflow“-Phänomen

Trotz Wiedereröffnung eines Gefäßes ist der Blutfluss zu einem ischämischen Organ oftmals nicht sofort vollständig wiederhergestellt. (129) Die Mechanismen dieses No-Reflow-Phänomens bestehen in einer erhöhten Adhäsion der Leukozyten ans Endothel, Thrombozyten- und Leukozytenaggregationen, interstitiellen Flüssigkeitsansammlungen und einer verminderten endothelabhängigen Vasorelaxation. (106,129,136,145) Durch den IRI kann die NO-Synthese durch eNOS oder iNOS aufgrund eines Mangels an der Vorstufe L-Arginin oder am Kofaktor Tetrahydrobiopterin (BH4) erniedrigt sein. (136) Die Freisetzung von Endothelin-1, dem wichtigsten Vasokonstriktor, ist nach Reperfusion drastisch erhöht. Eine weitere Gefahr für Vasospasmen geht von Leukotrien B₄, aktivierten Komplementfaktoren und Thromboxan A₂ aus, die während der durch die Reperfusion hervorgerufene Entzündungsantwort freigesetzt werden. (57) Die akute endotheliale Fehlfunktion kann durch den während der Ischämie hervorgerufenen Wasser- und Natriumeinstrom und die erhöhte Vasokonstriktion in eine Endothelschwellung münden, die zur Verkleinerung des Kapillarlumens und zu einer Erhöhung des Flusswiderstandes führt. Außerdem stört die Strukturänderung junktionaler Adhäsionsproteine die endotheliale Barriere, wodurch es zu einem vermehrten Flüssigkeitsausstrom auf Kapillarebene und

vermehrtem Ausstrom von Makromolekülen und hierdurch zu intravasaler Hämokonzentration und verminderter kapillärer Perfusion kommt („No-Reflow“). (16,28)

Das „No Reflow“-Phänomen kann nach Reperfusion für einige Wochen anhalten. (51)

Klinisch kann sich dies in einer fortbestehenden Dysfunktion des Organs in der Postreperusionsphase, einem Abstoßen des Transplantats oder einer Vergrößerung der Infarkt Narbe bemerkbar machen. (23)

Multiorgan Dysfunction Syndrome (MODS)

Das MODS ist die Haupttodesursache von schwer kranken Patienten (108) und kann die Folge eines IRI von Darm, Leber oder Skelettmuskel sein oder typischerweise nach einer Wiederbelebungsmaßnahme nach Kreislaufstillstand mit anschließender Reperfusion auftreten. (18)

Zusätzlich zu einer erhöhten Permeabilität der Mikrogefäße, ist MODS gekennzeichnet von einer Dysfunktion der Gerinnung und des Immunsystems, was durch Aktivierung von Thrombozyten zu Thrombose, disseminierter intravaskulärer Gerinnung und Immunsupprimierung führen kann. Die Mortalität auf Intensivstationen korreliert direkt mit der Anzahl der betroffenen Organsysteme: bei nur einem betroffenen Organsystem ergibt sich eine Todesrate von 30 bis 40 %, bei zwei eine Todesrate von 50 bis 60% und bei drei oder mehr von 80 bis 100%. (23)

Tourniquet

Das pneumatische Tourniquet wurde 1904 von Harvey Cushing entwickelt, um dem Chirurgen ein relativ blutleeres Feld zu schaffen, den Blutverlust zu minimieren und die Identifikation von vitalen Strukturen zu erleichtern. Seitdem ist der Gebrauch in der orthopädischen Chirurgie an Extremitäten zur Routine geworden.(75)

Allerdings kann durch ein arterielles Tourniquet ein Ischämie-Reperfusionsschaden mit potentiell fatalen lokalen und systemischen Auswirkungen hervorgerufen werden. (46,53,119,121,137,156)

Die Anwendung einer Blutsperre bei Operationen der oberen Extremitäten wird bis zu einem Maximum von zwei Stunden als sicher angesehen. (37)

Die durch den Einsatz eines Tourniquets am meisten gefährdeten Gewebe sind Nerven und Muskeln. Am häufigsten beobachtet man ischämische Neuropathien oder Neurapraxie durch Kompression. (109,133) Diese werden als grundlegende Ursache der „Tourniquet-Paralysen“ angesehen (Inzidenz: 0.15%). (96,117)

In Muskeln können vorübergehende oder länger anhaltende funktionelle und histologische Veränderungen auftreten, die zu einer verlangsamten Kraftrehabilitation führen. (134)

Durch ein Tourniquet hervorgerufene Veränderungen im Kreislauf-Volumen können zu Problemen der Zirkulation und der Respiration führen. (46,121) Hämodynamische Veränderungen werden vor allem bei gleichzeitigem Gebrauch zweier Tourniquets an beiden unteren Extremitäten beobachtet. (17) Deshalb sollte eine gleichzeitige Deflation vermieden werden.

Als weitere kardiovaskuläre Folgen drohen arterielle Hypertonie (148) und erhöhter zentraler Venendruck. (17) Außerdem können direkte Gefäßschäden entstehen. (55,94) Durch eine vermehrte Thrombozytenadhäsion kommt es zu einem Zustand der Hyperkoagulation. (153) Dies kann eine Ursache für das vermehrte postoperative Auftreten von tiefen Venenthrombosen nach totaler Kniearthroplastik sein, (25,40) wobei diese auch ohne den Gebrauch eines Tourniquets nach einer Kniearthroplastik auftreten können. (4)

Eine reaktive Hyperämie nach Deflation des Tourniquets verursacht einen Anstieg des Gliedmaßenumfangs um 10%, was zu postoperativer Schwellung und Steifheit führt. (138)

Einige Maßnahmen können getroffen werden, um die Komplikationsrate beim Gebrauch eines Tourniquets zu minimieren: Gründliche präoperative Evaluation der Patienten, ein breiter Niederdruck-Cuff, maximal zwei Stunden Ischämiezeit, Wechsel zwischen zwei Tourniquets, gute Polsterung unter dem Tourniquet, sorgfältiges perioperatives Monitoring des hämodynamischen Status von Patienten mit geringer kardiopulmonaler Reserve, oder regionale Hypothermie durch Kühlen der Extremität. (152)

I.2.3. Klinische Relevanz

Gefäßchirurgie, Herzchirurgie, Transplantationschirurgie und Extremitätenchirurgie mit Gebrauch eines arteriellen Tourniquets stellen nur einige Beispiele für Situationen dar, unter denen es zu einem IRI kommen kann. Erhöht ist diese Gefahr bei Vorliegen kardialer Risikofaktoren wie Hypercholesterinämie, Hypertonie oder Diabetes durch eine erhöhte Vulnerabilität der Mikrogefäße. Deshalb ist es wichtig, Maßnahmen zur Vermeidung oder Reduktion von IRI zu untersuchen. (23,51)

I.3. Thrombozyten und Hämostase

Thrombozyten:

Thrombozyten sind 1-4µm große zytoplasmatische Abkömmlinge von Megakaryozyten und per definitionem keine Zellen, da sie keinen Zellkern enthalten und auch keine Proteine synthetisieren können. Durchschnittlich hat ein Erwachsener etwa 150000-380000 Thrombozyten pro µl Blut mit einer Lebenszeit von 10-12 Tagen. Sie exprimieren zahlreiche Glykoproteine, die die Adhäsion an die verletzte Gefäßwand vermitteln (z.B. P-Selektin, PECAM1, Integrine wie Glykoprotein IIa und IIIb). Im Zellinneren finden sich Mitochondrien und Speichergranula unter anderem mit von-Willebrand-Faktor (vWF) und P-Selektin, deren Sekretion für die Thrombozytenfunktion notwendig ist. (91) Die Hauptfunktion von Thrombozyten besteht darin, eine Blutung möglichst schnell zu stillen.

Hämostase:

Physiologisch unterliegt die Hämostase einem komplexen Wechselspiel zwischen inhibierenden und aktivierenden Faktoren, so dass ein Gleichgewicht zwischen gerinnungsfördernden und –hemmenden Botenstoffen vorliegt. Man unterscheidet zwischen primärer und sekundärer Hämostase. Zunächst wird bei der primären Hämostase ein thrombozytenreicher, weißer Thrombus gebildet. Dieser wird in der sekundären Hämostase durch Fibrin stabilisiert.

Die primäre Hämostase kann in drei Abschnitte gegliedert werden: Adhäsion, Aktivierung, Aggregation.

Den ersten Schritt stellt die Adhäsion ruhender Thrombozyten an Strukturen im Bereich der Gefäßwandverletzung dar. Der Adhäsionsvorgang wird durch Glykoproteine der Thrombozytenmembran gesteuert. Thrombozyten binden mit dem auf ihrer Oberfläche gelegenen GP-Ib-IIa-Glykoproteinrezeptorkomplex direkt an das durch die Verletzung freigelegte Kollagen.

Der Von-Willebrand-Faktor (vWF), der subendothelial, in den Blutplättchen selbst und im Plasma an Faktor VIII gebunden vorkommt, bildet eine Brücke zwischen den durch die Verletzung freigelegten Kollagenfasern und dem GP-Ib-Glykoproteinrezeptorkomplex auf der Thrombozytenoberfläche. (21) Die Interaktion zwischen GPIb und vWF vermittelt das initiale „Tethering“ (Anbinden) der Plättchen, gefolgt von einer $\alpha_2\beta_1$ -Integrin-vermittelten Adhäsion, die eine Translokation der Plättchen verhindert und Interaktionen zwischen Kollagen und Glykoprotein VI (GPVI) erlaubt. (110)

Die Interaktion thrombozytärer Kollagenrezeptoren mit Kollagen führt zur Aktivierung und Formveränderung („shape change“) der adhärenen Thrombozyten; dabei kommt es zur Bildung von Pseudopodien, wodurch ihre Adhäsions- und Vernetzungsfähigkeit verstärkt wird.

Die aktivierten Thrombozyten setzen α -Granula mit Kalzium, Serotonin, ADP, Thromboxan A_2 und weiteren Stoffen frei, die zur weiteren Chemotaxis, Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten, zur Vasokonstriktion und zur Induktion der plasmatischen Gerinnung führen.

In der ersten Phase der Aggregation werden die Thrombozyten zunächst reversibel über Fibrinogenbrücken miteinander verbunden (primäre Aggregation). Die sekundäre Aggregation führt zur Degranulation der Thrombozyten und somit zur Verfestigung der Fibrinogenbindung. Diese Phase ist irreversibel. Eine entscheidende Rolle spielt das Oberflächenprotein Glykoprotein IIb-IIIa, das erst nach Aktivierung der Thrombozyten und deren Freisetzung von Kalzium an Fibrinogen binden kann und so über Fibrinogenbrücken die Aggregation ermöglicht. (45,91) Um eine Blutung dauerhaft zum Stillstand zu bringen, ist nach der Gefäßkontraktion und der Thrombozytenaggregation die sekundäre Hämostase erforderlich, in der das Blut gerinnt. Der hierbei entstehende Thrombus enthält ein Netzwerk aus Fibrinfäden, das auch Erythrozyten einschließt, und daher „roter Thrombus“ genannt wird. Dieses

mechanisch stabile Fibrinnetzwerk entsteht durch die Bildung von festem Fibrin aus seinem flüssigen Vorläufer, dem Fibrinogen. Hierdurch geht das Blut aus seinem flüssigen in einen gallertartigen Zustand über. Die Fibrinbildung steht am Ende der Gerinnungskaskade, einer Abfolge von Reaktionen, an denen die Gerinnungsfaktoren beteiligt sind. Bei den Gerinnungsfaktoren handelt es sich zumeist um proteolytische Enzyme, die im Plasma in inaktiver Form vorliegen.

Die zur Fibrinbildung führende sekundäre Hämostase lässt sich in 3 Phasen gliedern:

1. Aktivierungsphase: Bildung von Thrombin aus Prothrombin (extrinsisches + intrinsisches System)
2. Koagulationsphase: Bildung von löslichen Fibrinmonomeren aus Fibrinogen
3. Retraktionsphase: Stabilisierung und Kontraktion des Thrombus durch Fibronectin und Thrombostenin. (21)

Darüber hinaus setzen Thrombozyten Sauerstoffradikale (39,85,90) und proinflammatorische Mediatoren wie Thromboxan A₂, Leukotriene, Serotonin, Plättchenfaktor 4 und den PDGF (platelet-derived growth factor) frei. (49,50,87) Außerdem besitzen Plättchen die Fähigkeit, die Funktion von Leukozyten zu modulieren. (32,130,131) Das heißt, dass Adhäsion und Aktivierung von Thrombozyten in der Mikrozirkulation den Endothelzellschaden verstärken können und zur Leukozytenaktivierung und -akkumulation beitragen. (74)

I.3.1. Aktivierung der Thrombozyten bei IRI

Zusätzlich zu ihrer Funktion in der Hämostase besitzen Thrombozyten einige Eigenschaften, die eine entscheidende Rolle bei Prozessen wie Entzündung, Gewebereparatur und Regeneration, Angiogenese und IRI spielen. (26,126,127,139)

Entzündung und Hämostase sind über gemeinsame Aktivierungswege und Feedback-Mechanismen miteinander gekoppelt. Eine Entzündungsreaktion bringt das feine Gleichgewicht der Hämostase leicht durcheinander und führt in der Regel zu prothrombotischen Tendenzen. Bei Freisetzung der Granula der Thrombozyten wird eine Entzündungsantwort ausgelöst und die Gerinnungskaskade aktiviert. (43,70,141)

Des Weiteren kommt es zu atypischen Zellinteraktionen und der Produktion von Mikropartikeln. Mikropartikel, die vor allem von aktivierten Thrombozyten produziert

werden, haben einen ausgeprägten proinflammatorischen Effekt, verstärken die Gerinnung und beeinflussen die Gefäßfunktion. (132,151)

Während einer Operation kommt es in der Regel zur Hyperkoagulabilität des Blutes. (70) Das durch die OP verursachte Trauma erhöht die Plasmakonzentrationen der Gerinnungsfaktoren, senkt die gerinnungshemmenden Faktoren und fördert die Aktivierung von Thrombozyten an der Gefäßwandläsion. Die Freisetzung von Zytokinen, Katecholaminen und Serotonin induziert die Aggregation der Thrombozyten. (31,71,100) Wird zusätzlich ein Tourniquet eingesetzt, kommt es zu einer Beschleunigung und Verstärkung dieser Reaktionen. (113,122)

Degranulierte Thrombozyten binden über ihr Oberflächenprotein P-Selektin an den GP-Ligand-1 auf der Oberfläche von Monozyten oder neutrophilen Granulozyten. (43) Diese zirkulierenden Monozyten-Thrombozyten-Aggregate sind sensitivere und verlässlichere Marker der Thrombozytenaktivierung *in vivo* als das thrombozytäre Oberflächenprotein P-Selektin. (13,20,70,98)

Durch die Reperfusion werden weitere Thrombozyten aktiviert, was anhand ihrer signifikant erhöhten Aktivierungsmarker gezeigt werden konnte. (58,127,139) Diese aktivierten Thrombozyten besitzen aber herabgesetzte hämostatische Fähigkeiten. Deshalb ist die Thrombozytenzahl allein nicht ausreichend zur Beurteilung der plättchenabhängigen hämostatischen Fähigkeiten. (126)

Der Aktivierungsgrad der Thrombozyten am aktivierten Endothel korreliert mit der Organfunktion, wie sowohl anhand von Tiermodellen als auch anhand von Patienten nach Organtransplantation gezeigt werden konnte. (26,127,139) Thrombozyten scheinen an der Pathogenese von Organschäden und Organdysfunktionen beteiligt zu sein: Eine positive Korrelation konnte von Cywes et al. zwischen der Dauer der kalten Ischämie, dem Grad der Thrombozytenadhäsion zum aktivierten Endothel und dem Reperfusionsschaden festgestellt werden. (26,126)

Durch verschiedene Studien wurde eine erhöhte Aktivierung der Thrombozyten bei IRI nachgewiesen. (12,20,61,70,105,126,135,140,141)

I.3.2. Glykoprotein VI – Aufbau und Funktion

Die Plasmamembran von Thrombozyten steht derzeit im besonderen Fokus der Erforschung der Funktion und Oberflächenexprimierung von Thrombozytenrezeptoren.

Gegenwärtiges Ziel ist die Erforschung proteolytischer Regulationsmechanismen, die die Thromboseneigung in Gesundheit und Krankheit kontrollieren. (7)

Thrombozyten verfügen über membranständige Glykoproteine. Sie werden gemäß ihrer charakteristischen Molekülstruktur in verschiedene Gruppen unterteilt: Integrine, leuzinreiche Glykoproteine, Selektine, Immunglobulinähnliche Rezeptoren und lysosomale integrale Membranproteine. (45)

Der Kollagenrezeptor GPVI ist ein für Plättchen und Megakaryozyten spezifischer Kollagenrezeptor, der als Hauptrezeptor des Blutplättchens für die Interaktion mit Kollagen gilt (110,111). Er wurde 1982 durch 2-D-Gel-Elektrophorese erstmals identifiziert. GPVI ist ein Glykoprotein aus 339 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 60-65 kDa. GPVI zählt zur Familie der Immunglobulinähnlichen Rezeptoren und bildet einen Komplex mit der FcR γ -Kette an der Zelloberfläche von Thrombozyten. (45,92,110)

Die FcR γ -Kette ist für die Signalvermittlung in das Zellinnere verantwortlich. Die Signalkaskade vereint das Zusammenspiel verschiedener Kinasen wie z.B. „Lyn“ und „Fyn“. Diese sind im Ruhezustand an die intrazelluläre Domäne des GPVI-Rezeptors gebunden und phosphorylieren nach Aktivierung des Rezeptors bestimmte Regionen der FcR γ -Kette. Das ermöglicht das Binden der „Syk“-Kinase an die FcR γ -Kette, die dadurch aktiviert wird und nachfolgende Signalwege durch Phosphorylierung von Proteinen (z.B. LAT, SLP 76) in Gang setzt.

Integrine sind heterodimere transmembranöse Rezeptoren, die eine zentrale Rolle bei der Adhäsion und Aggregation der Plättchen spielen (Philips et al. 1991, Shattil et al, 1998). Erst nach Aktivierung durch andere thrombozytäre Rezeptoren wechseln sie in einen Zustand hoher Affinität und binden ihre Liganden effizient. (110)

Thrombozyten exprimieren Glykoprotein VI, welches bei einer Gefäßwandläsion freigelegtes Kollagen oder Laminin der extrazellulären Matrix bindet. Diese Bindung triggert die Thrombozytenaggregation und -aktivierung wesentlich. (5,64,111)

So erreicht auch der $\alpha 2\beta 1$ -Rezeptor erst nach vorhergehender Aktivierung des Plättchens über den GPVI-Rezeptor einen hochaffinen Bindungszustand, in dem er eine stabile Bindung mit Kollagen eingehen kann. (59)

Der thrombozytäre Rezeptor Glykoprotein VI liegt bei nicht aktivierten zirkulierenden Thrombozyten in ungespaltenem Zustand vor. (5,44) Die Bindung des

GPVI an Kollagen oder andere Liganden wie zum Beispiel Laminin, collagen-related peptide (CRP) oder Anti-GPVI-Antikörper und die Aktivierung des Fc-Rezeptors (FcγRIIIa) der Thrombozyten induziert Metalloproteinasen. (5) Diese führen zur Spaltung des Glykoprotein VI, so dass lösliches Glykoprotein VI (sGPVI) freigesetzt wird. (5,7,11)

Die über GPVI vermittelten Signalwege involvieren eine Fc-Rezeptor-γ-Kette (FcRγ), die notwendig für die GPVI-Exprimierung ist und ein „Immunorezeptor-Tyrosin-based Activation Motif“ (ITAM) innerhalb der zytoplasmatischen Domäne enthält. Die Stimulierung von entweder GPVI oder FcγRIIIa triggert sowohl die Spaltung und Freisetzung von GPVI als auch die „De-ITAM-isierung“ von FcγRIIIa, was eine mechanistische Verbindung zwischen thrombotischer und immunologischer Dysfunktion darstellt. (5)

Glykoprotein VI beeinflusst sowohl die physiologische Hämostase als auch mögliche Gefäßverschlüsse von kranken Gefäßen wie bei Myokardinfarkt oder Schlaganfall. Damit ist GPVI eine vielversprechende Zielstruktur für die antithrombotische Therapie. Vorausgegangene Studien konnten zeigen, dass Anti-GPVI-Antikörper eine irreversible Herabregulierung der Rezeptoren an zirkulierenden Thrombozyten induzieren. Dies geschieht durch Internalisierung und/oder Freisetzung von Ektodomänen. Metalloproteinasen des A Disintegrins und der Metalloproteinasenfamilie (ADAM) werden als Vermittler dieser Freisetzung von Ektodomänen vermutet. (11)

Die Aktivierung von Signalwegen, die zu der extrazellulären Abspaltung führen, geht einher mit einer Aktivierung von intrazellulären Proteinasen wie Calpain, welche ebenso Rezeptoren irreversibel deaktivieren. (7)

Diese Abspaltung reguliert möglicherweise die GPVI-abhängige Funktion der Thrombozyten während der Thrombusbildung. So wird durch die Spaltung die Reaktivität von Thrombozyten gegenüber Kollagen gesenkt.

In einer kürzlich durchgeführten Studie konnte erstmals in vivo nachgewiesen werden, dass die Spaltung von GPVI mit atherothrombotischen Krankheiten assoziiert ist. Es konnten erhöhte Spiegel von sGPVI bei Patienten mit akutem ischämischen Schlaganfall nachgewiesen werden, die 3-6 Monate nach Behandlung mit Thrombozytenaggregationshemmern wieder absinken. (6)

Nach Abspaltung des löslichen GPVI von Thrombozyten zirkuliert es im Plasma und ist nicht membrangebunden. Es gibt Hinweise darauf, dass das Metalloproteinase-abhängige Abspalten von GPVI auch im Plasma *in vivo* auftreten kann. (5,45)

I.3.3. Platelet-Derived Microparticles (PDMPs)

Schon in den 1940er Jahren wurde erkannt, dass Thrombozyten die Gerinnung unterstützen, weil thrombozytenreiches Plasma (PRP) schneller als thrombozytenarmes (PPP) gerann. Eine Hochgeschwindigkeits-Zentrifugierung des PPP führte zu einer weiteren Verlängerung der Gerinnungszeit, was die Vermutung nahe legte, dass das PPP noch einen weiteren (subzellulären) gerinnungsfördernden Faktor enthalten müsse. 1967 konnte Wolf die Anwesenheit eines „coagulant material in minute particulate form“ in „normalem Plasma, Serum und davon abgeleiteten Fraktionen“ nachweisen. Dieses von Thrombozyten abstammende Material wurde ursprünglich „Thrombozytenstaub“ genannt. Die Fähigkeit von Thrombozyten und Thrombozytenstaub, die Gerinnung zu fördern, wurde damals als Faktor-III-Aktivität beschrieben. Heute weiß man, dass der „Thrombozytenstaub“ aus kleinen Vesikeln besteht, die vor allem Thrombozyten entstammen (Platelet-derived Microparticles oder P(D)MPs) und die die gerinnungsfördernde Aktivität von PPP erklären. Im letzten Jahrzehnt kam erneut Interesse an PDMPs und deren Rolle in Gesundheit und Krankheit auf.

Mikropartikel (MP) sind kleine Membranvesikel, die von vielen verschiedenen Zelltypen durch ein exozytisches Abschnüren der Plasmamembran freigesetzt werden. Durch Freisetzung verschiedener bioaktiver Effektoren können MPs die Gefäßfunktion beeinflussen. Die PDMPs besitzen eine prothrombotische Aktivität und spielen damit eine Rolle in der normalen Hämostase, die als Antwort auf eine Gefäßverletzung auftritt. Eine erhöhte Konzentration an PDMPs kann zur Entwicklung thrombotischer Komplikationen beisteuern. (116)

Bary et al zeigten, dass PDMPs Thrombozyten, Monozyten und Endothelzellen aktivieren können und die Adhäsion zwischen Monozyten und Endothelzellen erleichtern. PDMPs, die durch Aktivierung von Thrombozyten oder durch Thrombin oder Calcimycin (A23187) entstehen, steigern in Anwesenheit des Cyclooxygenase (COX)-Inhibitors Indomethacin dosisabhängig die Aggregation der Thrombozyten, den

intrazellulären Kalziumanstieg in Thrombozyten und Monozyten und die Bildung von Inositolphosphat. (114)

PDMPs aktivieren Monozyten über eine Reaktion zwischen P-Selektin und PSGL-1 (P-Selektin Glykoproteinligand-1). Aktivierte Monozyten induzieren die Expression von Tissue Factor (TF) und CD11b auf der Zelloberfläche. Außerdem induzieren sie die Freisetzung von Monocyte-derived Microparticles (MMPs). PDMPs induzieren die Expression von COX-2 in Endothelzellen und steigern die Expression von CD54 (ICAM-1) auf der Endothelzelloberfläche. Aktivierte Endothelzellen induzieren die Freisetzung von endothelial cell-derived microparticles (EMPs), welche die Adhäsion zwischen Endothelzellen und Monozyten steigern. Schließlich induzieren Monozyten die Migration von Endothelzellen, was zu Gefäßveränderungen führt. (114)

Struktur der Mikropartikel

A. Größe

Aktivierte Thrombozyten setzen zwei Arten von Membranvesikeln frei: PMPs, die sich von der Oberflächenmembran abschnüren, und Exosomen. Die PMPs variieren in ihrer Größe zwischen 0,1 und 1 μm . (114) Die größten von ihnen erreichen fast die Größe eines Thrombozyten. Exosomen sind im Durchschnitt kleiner als PMPs und reichen von 40-100 nm. Sie werden in den alpha-Granula gespeichert und während der Sekretion freigesetzt.

B. Phospholipide

Die die Thrombozyten umgebende Zellmembran ist eine Lipiddoppelschicht, die verschiedene Arten von Phospholipiden enthält. Diese verschiedenen Typen von Phospholipiden sind asymmetrisch auf den ruhenden Thrombozyten verteilt. Ungeladene Phospholipide wie Phosphatidylcholin und Sphingomyelin liegen vor allem in der äußeren Membran vor, während die innere die negativ geladenen Aminophospholipide Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylserin (PS) enthält. Thrombozyten und andere Zellen besitzen spezifische Transporter wie Aminophospholipid-Translokasen, die aktiv diese asymmetrische Verteilung der Phospholipide aufrechterhalten. Während der Aktivierung zum Beispiel durch Kollagen wird dieser Zustand durchbrochen. Die Phospholipide verteilen sich, PE und PS treten an die Zelloberfläche. Zwaal et al konnten zeigen, dass dies einer

der Schlüsselmechanismen zur Aktivierung der Thrombozyten ist. Vor allem PS induziert Zell-Zell-Interaktionen und wirkt in Anwesenheit von Kalzium prokoagulatorisch und führt zur Freisetzung von PMPs. (114)

Wie die aktivierten Thrombozyten exponieren auch die PMP Aminophospholipide. Dies erleichtert möglicherweise ihre Entfernung aus dem Blutkreislauf, da Phagozyten mit PS-spezifischen Rezeptoren ausgestattet sind, die die PS-exponierenden Zellen und möglicherweise auch PMPs erkennen und mit ihnen interagieren.

C. Oberflächenmoleküle

Thrombozyten und PMPs besitzen zum Teil die gleichen Glykoproteinrezeptoren wie GPIb (CD42b), Thrombozyto-endotheliales-Zelladhäsions-Molekül 1 (CD3) und das Integrin α IIB β III (GPIIb-IIIa, CD41/CD6). Außerdem können Subpopulationen von PMPs Aktivierungsmarker wie P-Selektin (CD62P) aufweisen und Fibrin binden. Die Zusammensetzung und die Funktion der PMPs sind abhängig von deren Freisetzungsmechanismus. Zum Beispiel exprimieren PMPs, die von durch Kollagen und Thrombin aktivierten Thrombozyten stammen, das Integrin α IIB β III, welches Fibrinogen bindet, wohingegen PMPs, die von durch Komplement C5b-9 aktivierten Thrombozyten stammen, das Integrin α Ib β III exprimieren, welches nicht an Fibrinogen bindet. (112,114)

PMPs enthalten zusätzlich zu Glykoproteinen weitere Moleküle wie zum Beispiel den Platelet-Activating Factor (PAF) oder das Platelet-amyloid precursor protein (PAPP) oder die Kalzium-abhängige Protease Calpain. (114)

Des Weiteren besitzen PMPs Oberflächenrezeptoren für Faktor VIII, einen Kofaktor des Tenase-Enzymkomplexes und für Faktor Va, der mit Faktor Xa den Prothrombinase-Komplex bildet. Im Gegensatz zu Thrombozyten exprimieren PMPs diese Rezeptoren konstitutiv, was nahelegt, dass sie länger und auch entfernt von der ursprünglichen Aktivierungsstelle prokoagulatorisch wirken. (149) Außerdem können PMPs auch antikoagulatorische Eigenschaften haben, indem sie die Inaktivierung von Faktor Va durch das aktivierte Protein C beschleunigen. (114,149) Des Weiteren exponieren PMPs nicht grundsätzlich prokoagulante Phospholipide, möglicherweise aufgrund eines unvollständigen

„Flip-Flops“ der Phospholipide. Diese Beobachtungen verdeutlichen die Heterogenität der PMPs.

Bildung der PMP

Das derzeitige Wissen bezüglich der Mechanismen, denen die Bildung der PMPs unterliegt, ist immer noch lückenhaft. Mikropartikel verschiedenen Ursprungs sind im Plasma vorhanden: PMPs werden bei Thrombozytenaktivierung durch Thrombin und Kollagen, bei Thrombozytenalterung, bei Thrombozytenzerfall und möglicherweise auch direkt aus Megakaryozyten gebildet. (112) Des Weiteren können sie durch eine erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration (durch Komplementfaktoren C5-9, MAC) induziert oder durch hohe Scherspannung freigesetzt werden. (114)

PMPs sind ein fester Bestandteil von normalem thrombozytenarmem Plasma und können nur durch Hochgeschwindigkeitszentrifugierung vom restlichen Plasma getrennt werden.

Sie sind meist Folge von pathologischen Prozessen, können aber auch der Auslöser für klinische Komplikationen sein, indem sie die Blutgerinnung fördern. Je nach Ursprung können diese Mikropartikel eine prokoagulatorisch wirkende Oberfläche aufweisen und thrombogene Proteine wie zum Beispiel den Tissue Factor (TF).

Eine erhöhte Anzahl von PMPs im Blut konnte bei einer Reihe von Pathologien wie zum Beispiel Immuntrombozytopenie (ITP), Heparin-induzierter Thrombozytopenie (HIT), Urämie, disseminierter intravaskulärer Koagulopathie (DIC), Myokardinfarkt, Akutem Koronarsyndrom (ACS), Multipler Sklerose (MS), Alzheimer und Diabetes nachgewiesen werden. (114,149) So spielen die PMPs eine wichtige physiologische Rolle, und die Messung von PMPs hat daher in den letzten Jahren an Bedeutung als diagnostisches und für die Forschung relevantes Hilfsmittel gewonnen. (149)

I.3.4. Prokoagulante Phospholipide (PPLs)

Im Rahmen der primären Hämostase kommt es zu einem Umlagern von anionischen Phospholipiden an die Thrombozytenoberfläche, die prokoagulatorisch wirkt. Dies unterstützt die Bildung der gerinnungsfördernden Tenase und von Prothrombinase-Komplexen sowohl an der Plättchenoberfläche als auch den PMPs. Ein wichtiges Merkmal der PMPs ist die Expression von Phosphatidylserin, welches hauptsächlich für

die Aktivität der PPLs verantwortlich ist. (149) Das Phosphatidylserin erlaubt eine Bindung von aktiviertem Faktor X und V und die Konversion von Prothrombin zu Thrombin zur Bildung des Fibrinthrombus. (24,68) Das Messen der PPL-Konzentration im Plasma lässt daher einen direkten Rückschluss auf den Aktivierungsgrad der primären Hämostase zu. (149)

I.4. Fragestellung

Oxidativer Stress stellt eine Schlüsselkomponente sowohl des iatrogenen als auch des traumatischen IRI dar. Unklar ist, inwiefern die Höhe des arteriellen Sauerstoffgehaltes im Blut einen Einfluss auf den Umfang des im Rahmen eines IRI ausgelösten oxidativen Stresses - und damit indirekt auf die Thrombozytenaktivierung - hat. Bis zum heutigen Zeitpunkt gibt es keine Daten bezüglich der optimalen inspiratorischen Sauerstoffkonzentration während operativer Eingriffe, bei denen es vorhersehbar zu einem IRI kommt. Unterschiedliche Sauerstoffkonzentrationen im arteriellen Blut könnten möglicherweise die Bildung freier Radikale, die Aktivierung der Thrombozyten und die Aktivierung des Immunsystems beeinflussen.

Ziel der von uns durchgeführten Studie war es, das Ausmaß der Thrombozytenaktivierung unter unterschiedlichen inspiratorischen Sauerstoffkonzentrationen als Marker für oxidativen Stress im Rahmen der Reperfusion eines IRI zu untersuchen.

II. Methoden

II.1. Studienprotokoll

II.1.1. Ethik, Studiendesign:

Die Studie wurde von der Ethikkommission des Royal Perth Hospital, Perth, Western Australia, genehmigt (Antragsnummer: 2008/090).

Die Studie wurde als prospektive randomisierte Kohortenstudie angelegt.

Es wurden 51 Patienten, die mit einer arteriellen Blutsperre an ihrer oberen Extremität operiert wurden, in eine von drei Studiengruppen mit jeweils unterschiedlicher inspiratorischer Sauerstoffkonzentration (FiO_2 30%, 50%, 80%) eingeteilt (s. Abb.2).

Alle Patienten erhielten eine Allgemeinanästhesie. Ein Tourniquet wurde am Oberarm der zu operierenden Extremität angelegt. Vor Inflation des Tourniquets wurde ein venöser Zugang (18 Gauge) in der Ellenbeuge gelegt. Über diesen venösen Zugang konnte an fünf verschiedenen Zeitpunkten (T_0 bis T_4 (s. Abb.2)) jeweils 5ml Blut entnommen und entsprechend verarbeitet werden (s. Tab. 1).

Alle Patienten wurden zunächst mit einer inspiratorischen Sauerstoffkonzentration (FiO_2) von 30% bis 10 Minuten vor Öffnung des Tourniquets maschinell beatmet. Anschließend wurden die Patienten - je nach Randomisierung – entweder mit 30%, 50% oder 80% Sauerstoff über das Inspirationsgasgemisch beatmet.

Tabelle 1: Zeitpunkte der Probenentnahmen und anschließende Aufbereitung

Zeitpunkt			Blutproben
T0	Arm	Baseline-Probe vor Einleitung	1 x CTAD 3 x Zitrat 1 x EDTA 1 x Serum
T1	Arm	10 min vor Tourniquet-Release (vor Änderung des FiO ₂)	1 x CTAD 2 x Zitrat 1 x EDTA
T2	Arm	direkt vor Tourniquet-Release	1 x CTAD 2 x Zitrat 1 x EDTA
T3	Arm	5 min nach Tourniquet-Release (gleiches FiO ₂)	1 x CTAD 3 x Zitrat 1 x EDTA
T4	Arm	30 min nach Tourniquet-Release	1 x CTAD 2 x Zitrat 1 x EDTA

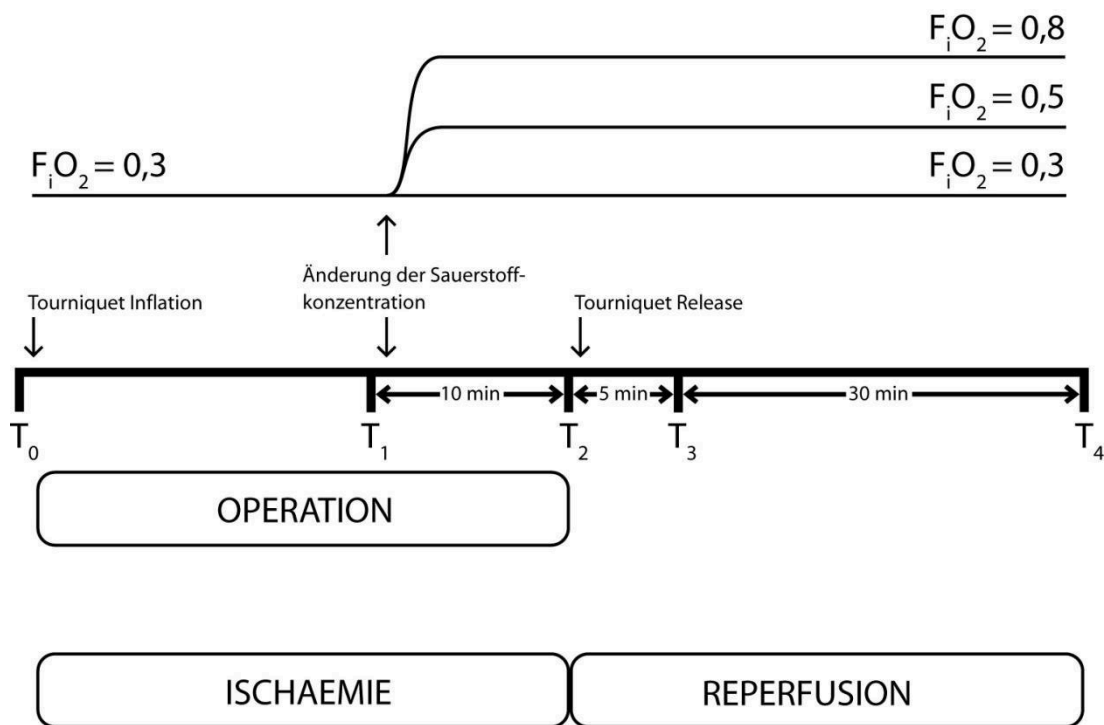


Abbildung 2: schematische Darstellung des Studienprotokolls

Primäres Endziel der Studie:

Das primäre Endziel war die Bestimmung von Markern der Thrombozytenaktivierung unter verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen nach Ischämie-Reperfusionsschaden.

II.1.2. Patientenkollektiv

Einschlusskriterien:

- Erwachsene Patienten mit Operation an der oberen Gliedmaße bei Einsatz eines Tourniquet für mindestens 45 Minuten
- ASA-Status 1 oder 2
- Einwilligung

Ausschlusskriterien:

- gerinnungsbeeinflussende Medikation
- bekannte Gerinnungsstörung
- weniger als 80.000 Thrombozyten
- Harnstoffkonzentration im Blut größer 8 mmol/l

- systemische Entzündungen (SIRS, Sepsis)
- Schwangerschaft
- Tumorleiden
- Multitraumen
- Multiple Tourniquet-Episoden
- Wahrscheinlicher intraoperativer Sauerstoffbedarf größer 30% (FiO₂)

II.1.3. Randomisierung

Mit Hilfe der Homepage www.randomization.com wurde ein Randomisierungsplan erstellt, auf dessen Grundlage die Studienmitglieder in eine der drei folgenden Gruppen eingeteilt wurden:

- 30% FiO₂ bis zum Ende der Operation
- 50% FiO₂ bis zum Ende der Operation
- 80% FiO₂ bis zum Ende der Operation

II.1.4. Anästhesie

Alle Patienten wurden an ein Routine-Monitoring, bestehend aus nicht-invasiver Blutdruckmessung, EKG und Pulsoxymeter, angeschlossen. Es wurde eine periphere Venenverweilkanüle (18 G) in die Ellenbeuge gelegt.

Zur Einleitung erhielten die Patienten Midazolam (0,05-0,1 mg/kg KG (Körpergewicht)), Fentanyl (2-3 µg/kg KG), Propofol (1-2 mg/kg KG) und Muskelrelaxantien (Rocuronium: 0,5-1,5 mg/kg KG; Succinylcholin: 1-1,5 mg/kg KG).

Die Narkose wurde mit Larynxmaske bei erhaltener Spontanatmung durchgeführt.

Zur Aufrechterhaltung der Narkose erhielten die Patienten Sevofluran (0,5-3 Vol.-%) bei einer inspiratorischen Sauerstoffkonzentration von 30%.

Bis zur Deflation des Tourniquets wurden 10 ml/kg Körpergewicht Kristalloidlösung infundiert.

Als postoperative Analgetika wurden Fentanyl (50-100 µg), Morphin (2-10mg), Paracetamol (1g) oder die lokale Infiltrationsanästhesie verwendet. Kein Patient erhielt NSAIDs oder COX-II-Inhibitoren bis zum Ende des Studienprotokolls.

Zu den fünf Zeitpunkten T0 bis T4 wurde jeweils eine Blutprobe entnommen (s. Abb. 2):

Vor Inflation des Tourniquets wurde zur Ermittlung eines Ausgangswertes die T0-Probe entnommen. Zehn Minuten vor Deflation des Tourniquets erfolgte die Entnahme der T1-Probe nach intraoperativer Beatmung mit 30% inspiratorischer Sauerstoffkonzentration. Direkt im Anschluss daran erhielten die Patienten die durch Randomisierung zugewiesene inspiratorische Sauerstoffkonzentration (30%, 50% oder 80%).

Die Entnahme der T2-Probe erfolgte unmittelbar vor Deflation des Tourniquets.

Nach Entnahme der T3-Probe (5 Minuten nach Deflation des Tourniquets) wurde für die Ausleitung die inspiratorische Sauerstoffkonzentration bei allen Patienten auf 80% erhöht.

Die T4-Probe wurde 30 Minuten nach Deflation des Tourniquets entnommen.

Die Blutproben T0 bis T4 wurden jeweils mit CTAD, Zitrat und EDTA aufbereitet, T0 zusätzlich mit Serum (s. Tab. 1).

II.2. GPVI - Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay (GPVI-ELISA)

Für das in dieser Studie durchgeführte Sandwich-ELISA zur Messung des sGPVI in humanem Plasma wurden polyklonale kanine Anti-GPVI-Antikörper für die Festphase verwendet. Für die Flüssigphase wurden monoklonale murine Anti-GPVI-Antikörper (1A12) verwendet und zur Detektion im „Enhanced Chemiluminescence“- (ECL)-Verfahren ein mit Meerrettichperoxidase-(HRP-)gekoppelter polyklonaler kaniner Anti-Maus-Antikörper (Dakocytomation, Dänemark). Der murine monoklonale Antikörper 3A2, der gegen den menschlichen Tissue-Factor gerichtet ist, wurde als Negativkontrolle verwendet. Der ELISA wurde in Bezug auf Sensitivität, Reproduzierbarkeit, Inter-und Intra-Assay-Variabilität und Belastungsgrenzen überprüft und optimiert, und es wurde eine untere Detektionsgrenze für GPVI von etwa 1ng/ml und eine obere von etwa 100ng/ml festgesetzt. Mögliche Beeinflussung der Messwerte durch unterschiedliche Antikoagulanzen (tri-Natriumcitrat-Dihydrat, ACD (acid-

citrate-dextrose), EDTA) konnte ausgeschlossen werden. Es wurde standardmäßig ACD als Antikoagulans verwendet.

Um die Genauigkeit des ELISA zu ermitteln, wurden Assays mit drei repräsentativen Konzentrationen von rekombinantem GPVI (gering 0,8ng/ml, mittel 25ng/ml, hoch 100ng/ml) nach dem Standardprotokoll durchgeführt.

Um die Belastungsgrenze des ELISAs zu erfassen, wurden humane Plasmaproben sowohl mit als auch ohne Zugabe einer bekannten Menge von rekombinantem löslichem GPVI (100ng/ml Endkonzentration) analysiert und so ein gegenüber unterschiedlichen Konzentrationen unempfindlicher Bereich zwischen 0,5 und 500 ng/ml festgestellt.

Um die Spezifität der polyklonalen Antikörper zu überprüfen, wurden Western Blots durchgeführt, einerseits mit Lysaten unbehandelter humaner Thrombozyten und andererseits mit Thrombozyten, die zwei Stunden mit monoklonalem Anti-Thrombozyten-Antikörper (CD151) 14A2 (2mg/ml) behandelt worden waren, um die FcγRIIa-abhängige Proteolyse von GPVI zu induzieren. Für den Western Blot wurden polyklonale kanine Anti-GPVI-Antikörper oder monoklonale murine anti-GPVI-Antikörpern 1A12 verwendet. Beide Antikörper wiesen in den unbehandelten Thrombozytenlösungen das GPVI in voller Länge (etwa 62kDa) und in den 14A2-behandelten Thrombozyten das Ektodomänenfragment des GPVI (etwa 55kDa) nach.
(5)

Für die Erstellung einer Standardkurve wurden die Platten mit polyklonalem kaninem Anti-GPVI-Antikörper (1µg/ml) beschichtet, gefolgt von der Zugabe einer Reihe von Verdünnungen der löslichen Ektodomäne des GPVI (0,4-200 ng/ml) in thrombozytenarmem Plasma.

Probengewinnung und -aufbereitung:

Die entnommenen Plasmaproben wurden mit frischem ACD als Antikoagulans (Acid-Citrate Dextrose; 85mM tri-Natriumcitrat-Dihydrat, 78mM Zitronensäure, 111mM Glucose; 1,4ml ACD auf 10 ml Blut) versetzt.

Das Blut wurde 20 Minuten bei 100g und das PRP (platelet-rich plasma) 15 Minuten bei 300g zentrifugiert, um PPP (platelet-poor plasma) zu erhalten.

Das GPVI-arme Plasma, welches als Verdünnungsmittel im ELISA verwendet wurde, wurde durch Batch-Absorption von 10 ml humanem Plasma mit Hilfe von 5ml einer 1 : 1 Mischung aus Affigel-10 und -15, gekoppelt an den monoklonalen Anti-GPVI-Antikörper 1G5, hergestellt. Alles wurde über Nacht bei 4°C vermischt und anschließend wurde das Harz durch 20 Minuten Zentrifugieren bei 8000g entfernt und das GPVI-arme Plasma bei -80°C gelagert.

Verwendete Reagenzien/Komponenten des Testkits:

Die jeweils 96 Vertiefungen dreier Mikrotiterplatten (Nunc, Roskilde, Dänemark) wurden eine Stunde mit einem polyklonalen kaninen Antikörper gegen GPVI in einer Bikarbonatösung (0,05M, pH 9,6) beschichtet. Anschließend wurden sie sechs Mal mit 100 µl Aliquote gewaschen, bestehend aus 0,01M Natriumphosphat und 0,15M Natriumchlorid, pH 7,4 (PBS), die 0,2% (v/v) Tween-20 enthielt (PBS-T). Danach wurde eine Stunde bei Raumtemperatur mit 1% (w/v) BSA (Sigma, St Louis, MO, USA) in PBS (200 ml) geblockt und danach sechs Mal mit PBS-T gewaschen.

Erst dann wurden die Proben in die Vertiefungen der Platten gegeben. In jeder Platte wurde routinemäßig eine Vertiefung mit einem Standard aus rekombinanter GPVI-Ektodomäne (0-100ng/ml Endkonzentration) in 10% (v/v) GPVI-armem Plasma in PBS befüllt. Aliquote des Plasmas eines einzelnen Spenders wurden bei -80°C gelagert, und der Spiegel des löslichen GPVI in diesem Plasma wurde in jeder Platte gemessen, als zusätzliche interne Kontrolle. Die Plasmaproben wurden mit PBS verdünnt, um direkte Vergleiche zu den Standards ziehen zu können. Nach einer Stunde in Raumtemperatur wurden die Vertiefungen sechs Mal mit PBS-T gewaschen und eine Detektionsflüssigkeit mit murinem monoklonalem Anti-GPVI-Antikörper 1A12 hinzugefügt (100 µl/Vertiefung).

Um die Festphase zu optimieren, wurden die Vertiefungen zunächst mit Affinitätsgereinigtem kaninem Anti-GPVI-Antikörper in mehreren Verdünnungslösungen, von 1mg/ml bis 0,5ng/ml beschichtet.

Um die flüssige Phase zu optimieren, wurden die primären anti-GPVI-Antikörper im Bereich von 0,5-1000ng/ml getestet oder mit sekundären Antikörpern verdünnt von 1/500 bis 1/2000000 (bei einer Konzentration von 1µg primären Antikörpern/ml).

II.3. Zymuphen Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay (ELISA)

Einer verdünnten Plasmaprobe wurden Kalzium, Faktor Xa und Thrombininhibitoren zugesetzt. Die Lösung wurde daraufhin in eine der Vertiefungen der Mikroplatte gegeben, die mit Streptavidin und biotinyliertem Annexin V beschichtet waren, und anschließend inkubiert. Nach Waschen wurde eine Faktor Xa-Va-Mixtur, die Kalzium enthält, und gereinigtes Prothrombin hinzugefügt. Falls in der Blutprobe vorhanden, binden die Mikropartikel an Annexin V und exponieren Phospholipide an der Oberfläche, so dass die Faktoren FXa-FVa in Anwesenheit von Kalzium Prothrombin zu Thrombin aktivieren. Die Konzentration der Phospholipide ist der limitierende Faktor. Es besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der Konzentration der Phospholipide und der Thrombinherstellung, deren Ausmaß durch die spezifische Aktivität am Thrombinsubstrat gemessen wird. Die Reaktion wurde durch zweiprozentige Zitratsäure gestoppt und die Absorption bei 405 nm gemessen.

Die Kalibrierungskurve wurde durch mehrere Messvorgänge validiert.

Die Aktivierung von Blutzellen während der Plasmagewinnung und -aufbereitung und die Anwesenheit von Thrombozyten im Plasma können die Freisetzung von Mikropartikeln induzieren. Dies kann zu falsch hohen Messwerten führen. (63)

Um ein optimales Ergebnis zu erzielen, wurden alle Vorgehensweisen strikt eingehalten.

Probengewinnung und -aufbereitung:

Über eine Venenverweilkanüle der Größe 18 G wurden 9ml Blutplasma in eine Ampulle mit 1ml Zitrat als Antikoagulans gewonnen. Der Plasmaüberstand musste innerhalb von 2h dekantiert werden, nach 15min Zentrifugierung bei 1500g bei Raumtemperatur. Der Überstand wurde dann noch einmal schnell für 2 min bei 13000g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Plasma erhielt man, indem man erneut den Überstand abpipettierte, ohne Berührung des Thrombozytenpellets. Das Plasma wurde innerhalb von 4h untersucht oder bei -80°C oder kälter bis zu 6 Monate eingefroren und dann vor Gebrauch bei 37°C für 15min aufgetaut. Die aufgetauten Proben mussten

innerhalb von vier Stunden untersucht werden, wenn sie bei Raumtemperatur gelagert wurden.

Verwendete Reagenzien/Komponenten des Testkits:

1. Coat: Micro ELISA Platte, 12 Reihen mit 8 Vertiefungen, beschichtet mit Streptavidine und biotinyliertem Annexin V, stabilisiert.
2. Sample Diluent: 2 Ampullen mit jeweils 50ml Sample Diluent (SD-MP), die FIIa- und FXa-Inhibitoren beinhalten, fertig zum Gebrauch.
3. R1: 2 Ampullen boviner FXa-FVa-Mischung, die Kalzium enthält, aufzufüllen mit 6 ml Verdünnungsflüssigkeit
4. R2: 2 Ampullen gereinigtes humanes Prothrombin; Auffüllen der Ampullen mit genau 3 ml destilliertem Wasser und gründliches Schütteln, sodass eine homogene Lösung entsteht. Inkubation bei Zimmertemperatur (18-25°C) für 30 min, und mindestens 15 min bei 37°C, Schütteln von Zeit zu Zeit. Homogenisierung des Inhalts vor jedem Gebrauch. Lagerung: für 24h bei 28°C, für 8h bei Raumtemperatur (18-25°C) oder für 2 Monate bei -20°C oder niedriger.
5. R3: 2 Ampullen Thrombin-spezifisches chromogenes Substrat; Auffüllen der Ampullen mit genau 3ml destilliertem Wasser und gründliches Schütteln, sodass eine homogene Lösung entsteht. Inkubation bei Zimmertemperatur (18-25°C) für 30 min und mindestens 15 min bei 37°C, Schütteln von Zeit zu Zeit. Homogenisierung des Inhalts vor jedem Gebrauch. Lagerung: für 24h bei 28°C, für 8h bei Raumtemperatur (18-25°C) oder für 2 Monate bei -20°C oder niedriger.
6. 2 Ampullen Kalibrierlösung: Auffüllen der Ampullen mit 2ml Sample Diluent, um die Kalibrierlösung mit „C“ (nM) Mikropartikeln zu erhalten. Diese Konzentration wird in nm Phosphatidylserin-Äquivalent ausgedrückt. Lagerung: 24h bei Raumtemperatur (18-25°C) oder zwei Monate bei -20°C oder niedriger.
7. CI: Plasma-Kontrolle I: Auffüllen mit 0,5ml destilliertem Wasser. Nach Auffüllen ist die Kontrolle stabil für 24h bei 2-8°, für 8h bei Raumtemperatur (18-25°C) oder 2 Monate bei -20° oder niedriger.
8. CII: Plasma-Kontrolle II: Auffüllen mit 0,5ml destilliertem Wasser. Nach Auffüllen ist die Kontrolle stabil für 24h bei 2-8°, für 8h bei Raumtemperatur (18-25°C) oder 2 Monate bei -20° oder niedriger.

9. Wasch-Lösungen: bei Bedarf Inkubation der Ampulle für 15-30 Minuten in einem Wasserbad bei 37°C bis zur kompletten Lösung der eventuell vorhandenen festen Bestandteile. Schütteln der Ampulle und Verdünnung der erforderlichen Menge 1:10 in destilliertem Wasser (die 50ml der Ampulle ergeben also 500ml Waschlösung). Die Waschlösung muss bei 2-8°C in seiner Originalampulle gelagert und innerhalb von den 8 darauffolgenden Wochen verbraucht werden. Die verdünnte Waschlösung muss innerhalb von 7 Tagen verbraucht werden, wenn sie vor Kontamination geschützt und bei 2-8°C gelagert wird. Dieses Reagenz enthält 0.05% Kathon CG.
10. Citratsäure 2%: fertig zum Gebrauch, zum Stoppen der Reaktion.

II.4. Faktor X-activated Clotting Time (XACT)

XACT ist ein Faktor Xa-abhängiger, Phosphatidylserin-empfindlicher Assay, bei dem der Reaktionsendpunkt die Zeit ist, die zur Bildung eines Thrombus benötigt wird. (24)

Die Gerinnungszeit verhält sich antiproportional zu erhöhten Konzentrationen von PPLs. Die Spezifität des Tests für PPLs zeigt eine positive Korrelation ($r_{21/4} 0.993$) mit der Methode der durchflusszytometrischen Messung der Annexin-V-Bindung, also der Anzahl der Mikropartikel. (149)

Die PPLs können in mit Citrat und in mit EDTA versehenen Blutproben gemessen werden, wobei sich die Messungen in EDTA-Proben als stabiler erwiesen haben. Die Messung von zirkulierenden Mikropartikeln und die XACT-Testung sollten wenn möglich an Proben, die mit Zitrat als Antikoagulans versetzt sind, innerhalb von 15 min nach Probenentnahme erfolgen. Falls dies nicht möglich ist, sollte EDTA als Antikoagulans verwendet werden. (24)

Die Zeit, die rekalkifiziertes normales Plasma benötigt, um nach Zugabe von einer bestimmten Menge an Faktor Xa zu gerinnen, verhält sich antiproportional zur Konzentration des Procoagulant Phospholipid, Faktor V und Prothrombin. Ein Mangel an einer dieser Komponenten oder die Anwesenheit von Inhibitoren verlängern die Gerinnungszeit. (68)

Dieser neue XACT-Test ist spezifisch für PPL, weil die Testproben mit phospholipidfreiem Tierplasma gemischt werden, was zu einem Exzess von Faktor V und Prothrombin führt.

Ein Heparinneutralisator im XACT-Reagenz sorgte für Widerstandsfähigkeit gegenüber mindestens 5 Einheiten/ml regulären Heparins.

Das System wurde kalibriert mit dem bereitgestellten Phospholipid oder mit Plasmen bekannter Konzentrationen von aktivierten Thrombozyten als Referenzwerten. (23)

Bei dieser Methode wurde kalzifiziertes Faktor-Xa-Reagens benutzt, um die Thrombusbildung in Anwesenheit von phospholipidfreiem Schweineplasma und der Testprobe zu stimulieren. Die hohe Konzentration von Faktor Xa im XACT-Reagens führte dazu, dass Phosphatidylserin das primäre Koagulans war, das die Gerinnungszeit beeinflusst. Gerinnungsfaktoren wurden von dem phospholipidfreien Schweineplasma geliefert, so dass eventuell vorliegende Gerinnungsstörungen ausgeglichen wurden und die Analyse von plasmafreien Zellen oder Mikropartikel-Suspensionen möglich war. Um die XACT Methoden weiter zu evaluieren, wurde XACT mit einer Vollblutprobe mit Zugabe einer bekannten Konzentration von Mikropartikeln durchgeführt. Der Zusatz von Verdünnungsreihen der Mikropartikel senkte die im XACT ermittelten Werte, und zwar abhängig von der Anzahl der zugesetzten Mikropartikel. Bei einer Mikropartikelkonzentration größer 10^4 Mikropartikel/ml erreichte der XACT-Test seine obere Messgrenze; Veränderungen der prokoagulatorischen Aktivität bei weiterem Anstieg der Mikropartikelanzahl wurden nicht mehr zuverlässig erfasst. (24)

Qualitätssicherung und Kalibrierung:

Das System wurde regelmäßig mit der 1/10 Referenz ($8\mu\text{g/ml}$) und den Verdünnungslösungen allein ($0\mu\text{g/ml}$) kontrolliert. Falls die Werte außerhalb des erwarteten Mittelwerts $\pm 2\text{SD}$ lagen, musste die Kalibrierung nochmals durchgeführt werden. (54)

Zur Kalibrierung wurden die vorbereiteten Proben (E) zur Verdünnungsreihe genutzt. An jeder der Proben wurde eine Testung durchgeführt. Die Ergebnisse des XACT wurden in einem Graphen gegen die Phospholipid-Konzentration aufgetragen. Um die äquivalenten Phospholipidkonzentrationen zu erhalten, mussten die durch den XACT erhaltenen Testwerte zur am besten passenden Linie interpoliert werden.

Probengewinnung und -aufbereitung:

Der Test kann in mit Zitrat oder mit EDTA versehenen Plasmen oder sogar an Vollblut durchgeführt werden, je nach vorhandenem Gerinnungsanalysator. Thrombozytenreiche Plasmen (PRP), die 5 Minuten bei 400G zentrifugiert wurden, stellten die besten Proben zur Messung der PPL an Thrombozyten dar. Bei normalen Thrombozyten, die in mit Zitrat versetztem Blut oder thrombozytenreichem Plasma gelagert wurden, kam es zu einer schnellen Autoaktivierung und steigenden Konzentrationen von PPL, vor allem bei kalter Lagerung. EDTA oder CTAD-Proben wurden bevorzugt, da sie stabiler sind und repräsentativer für Bedingungen in vivo. Thrombozytenarmes Plasma (PPP), welches 15 Minuten bei 2000g zentrifugiert wurde, war zur Messung der PPL an freien Mikropartikeln am besten geeignet.

Verwendete Reagenzien/ Komponenten des Testkits:

- A. FXa-Reagens: 0.01 Einheiten/ml FXa in gepufferter Kalziumlösung
- B. Phospholipidfreies Plasma: Ein Fläschchen gefriergetrocknetes phospholipidfreies Tierplasma, aufzufüllen mit 2ml Wiederherstellungsflüssigkeit.
- C. Wiederherstellungsflüssigkeit für das phospholipidfreie Plasma
- D. Phospholipid-Referenz: : Ein Fläschchen mit 2ml à 80µg/ml hochaktivem Referenz-PPL. Eine kleine Menge hiervon wird 1 zu 10 verdünnt. Dann wird durch 8 Verdünnungsreihen eine Kalibrierungskurve erstellt.
- E. Verdünnungsflüssigkeit: 4ml isotonische, leicht blaue Pufferlösung zur Verdünnung der Referenz-PPL

Alle Proben mussten bis zum Gebrauch bei 4°C gelagert werden. Das FXa-Reagens und die Referenz-PPL sind für die Dauer von einem Jahr stabil. Übriggebliebenes wiederhergestelltes PPL-freies Plasma kann bei -20°C oder kälter für ein Jahr gelagert werden.

Durchführung der Testung:

1. Zugabe von 0.025ml phospholipidfreiem Plasma (B+C) zur Reaktionsküvette.
2. Zugabe von 0.025ml der zu untersuchenden Probe. Die Mischung 2 Minuten auf 37°C erwärmen.

3. Zugabe von 0.10ml vorgewärmtem XACT-Reagens und Messung der Zeit bis zur Thrombusbildung

II.5. Statistik

Die statistische Auswertung der demographischen Daten erfolgte mit Hilfe von Microsoft Office Excel 2007.

Die statistische Auswertung der Aktivierungsparameter GPVI, PPL und PDMP erfolgte mit Hilfe des statistischen Instituts der Curtin University Perth unter Verwendung des Programmes IBM SPSS Statistics 20.0. Mit Hilfe von Paaranalysen von jeweils zwei Zeitpunkten und Regressionsanalysen der unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen wurden die Parameter auf Signifikanz untersucht.

Aufgrund der nacheinander geschalteten Messungen wurde eine Random-Effects-Regressionanalyse verwendet („Repeated Measures“ ANOVA). Weil die Ausgangswerte bei verschiedenen Patienten unterschiedlich sein können, wurde ein „Baseline“-Term in das Modell eingebracht. Für diese Variable wurde der Messwert zum Zeitpunkt T1 (direkt postoperativ) eingesetzt. Durch das Modell wurde geprüft, ob Veränderungen der Endpunkte im zeitlichen Verlauf vorlagen und ob sich etwaige Veränderungen in den verschiedenen Sauerstoffgruppen unterschieden. Folgendes Modell diente als Grundlage:

Endwerte = Ausgangsmesswert + Zeitpunkt Tx + Zeitpunkt Tx * Sauerstoffkonzentration.

III. Ergebnisse

III.1. Patientenkollektiv

51 Patienten wurden in die Studie eingeschlossen. Durch Randomisierung erhielten jeweils 17 Patienten 30%, 50% oder 80% inspiratorische Sauerstoffkonzentration.

Bei insgesamt sieben Patienten kam es zum Studienabbruch (1x multiple Tourniquetepisoden, 2x zu kurze Tourniquetzeiten, 2x nicht ausreichendes Probenmaterial, 2x Laborfehler). Die Daten von 44 Patienten waren vollständig.

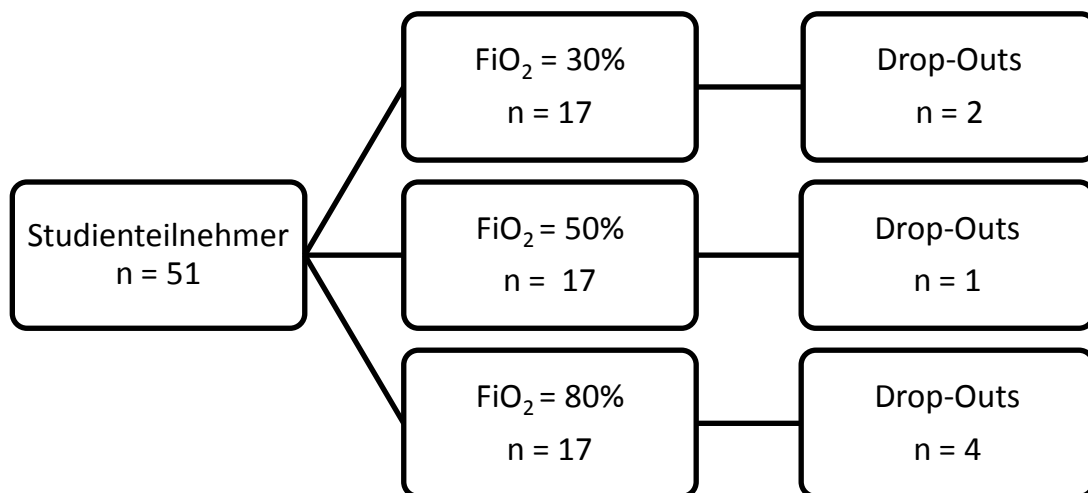


Abbildung 3: Patientenkollektiv

Bei den 51 randomisierten Studienteilnehmern waren die Daten von 44 vollständig. Aufteilung der Studienteilnehmer und Drop-Outs der jeweiligen Studiengruppe.

III.2. Demographische Daten

Altersverteilung:

Das Durchschnittsalter aller Studienteilnehmer betrug 39 ± 18 Jahre, bei einer Altersspanne zwischen 18 und 78 Jahren. Das Durchschnittsalter der Studienteilnehmer

in der Gruppe mit 30% FiO₂ betrug 40 ± 22 Jahre, bei einer Altersspanne zwischen 18 und 78 Jahren.

Das Durchschnittsalter der Studienteilnehmer in der Gruppe mit 50% FiO₂ betrug 38 ± 18 Jahre, bei einer Altersspanne zwischen 19 und 75 Jahren.

Das Durchschnittsalter der Studienteilnehmer in der Gruppe mit 80% FiO₂ betrug 38 ± 16 Jahre, bei einer Altersspanne zwischen 21 und 68 Jahren (s. Abb.4).

Das Durchschnittsalter in den Gruppen war nicht signifikant unterschiedlich.

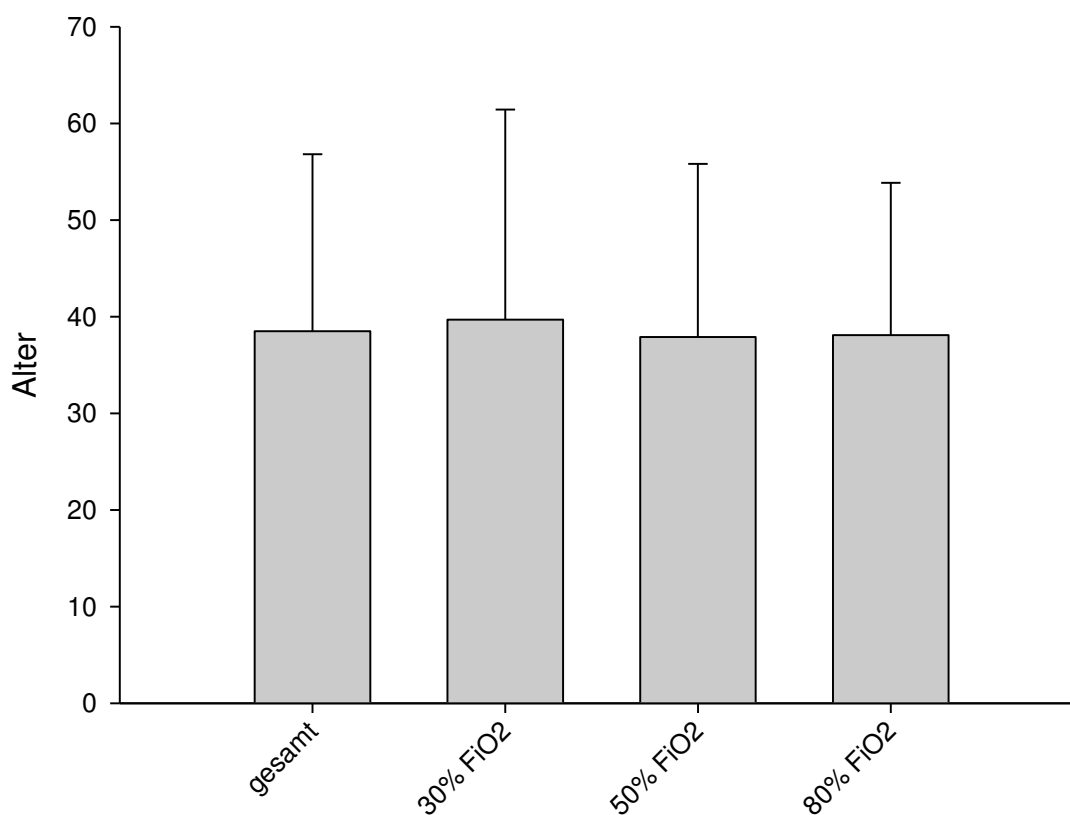


Abbildung 4: Patientendaten - Altersverteilung

Altersverteilung der Studienteilnehmer insgesamt und in Subgruppen.

FiO₂ = inspiratorische Sauerstoffkonzentration. Alter als Mittelwert ± Standardabweichung

Geschlechterverteilung:

Von den 44 ausgewerteten Studienteilnehmern waren 31 Männer und 13 Frauen, darunter in der Gruppe mit 30% FiO₂ 13 Männer und 2 Frauen, in der Gruppe mit 50%

FiO₂ 9 Männer und 7 Frauen und in der Gruppe mit 80% FiO₂ 9 Männer und 4 Frauen (s. Abb. 5).

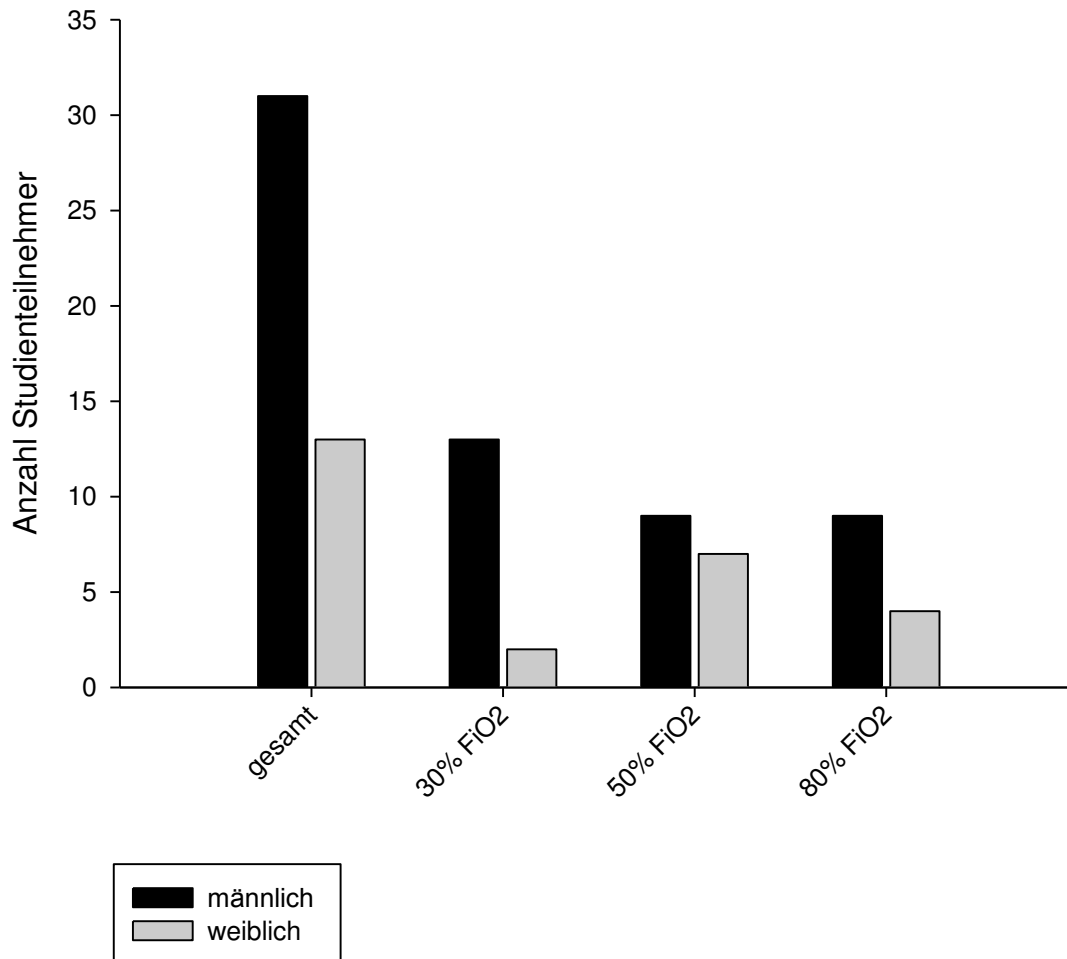


Abbildung 5 : Patientendaten - Geschlechterverteilung

Anzahl der männlichen (schwarzer Balken) und weiblichen (grauer Balken) Studienteilnehmer insgesamt und in den Subgruppen.

FiO₂ = inspiratorische Sauerstoffkonzentration.

ASA-Klassifikation:

28 Patienten wurden als ASA 1, 15 Patienten als ASA 2 und ein Patient als ASA 3 eingestuft.

III.3. Operationsdaten

Art des Eingriffs:

Der am häufigsten durchgeführte Eingriff war die „Offene Reposition und Interne Fixierung“ (ORIF) an verschiedenen Knochen des Unterarms und der Hand. Weitere Eingriffe waren Operationen an Sehnen und Nerven, außerdem Wunddebridements und die Knochendrahtung mit Hilfe von Kirschner-Drähten (s. Tab. 2).

Tabelle 2: Operationsdaten – Art des Eingriffs

Auflistung der verschiedenen Eingriffe mit jeweiliger Anzahl, absteigende Häufigkeit.
ORIF: Open Reduction Internal Fixation (Offene Reposition und Interne Fixation).

Art des Eingriffs	Anzahl
ORIF Unterarm	20
Operationen an Sehnen	13
Knochendrahtung (Kirschner-Draht)	4
Operationen an Nerven	3
Wunddebridement	3
Dekompression Karpaltunnel	1

Tourniquet- und Anästhesiedauer:

Die durchschnittliche Tourniquetdauer betrug 68 ± 25 Minuten bei einer durchschnittlichen Anästhesiedauer von 104 ± 45 Minuten. (s. Abb. 6).

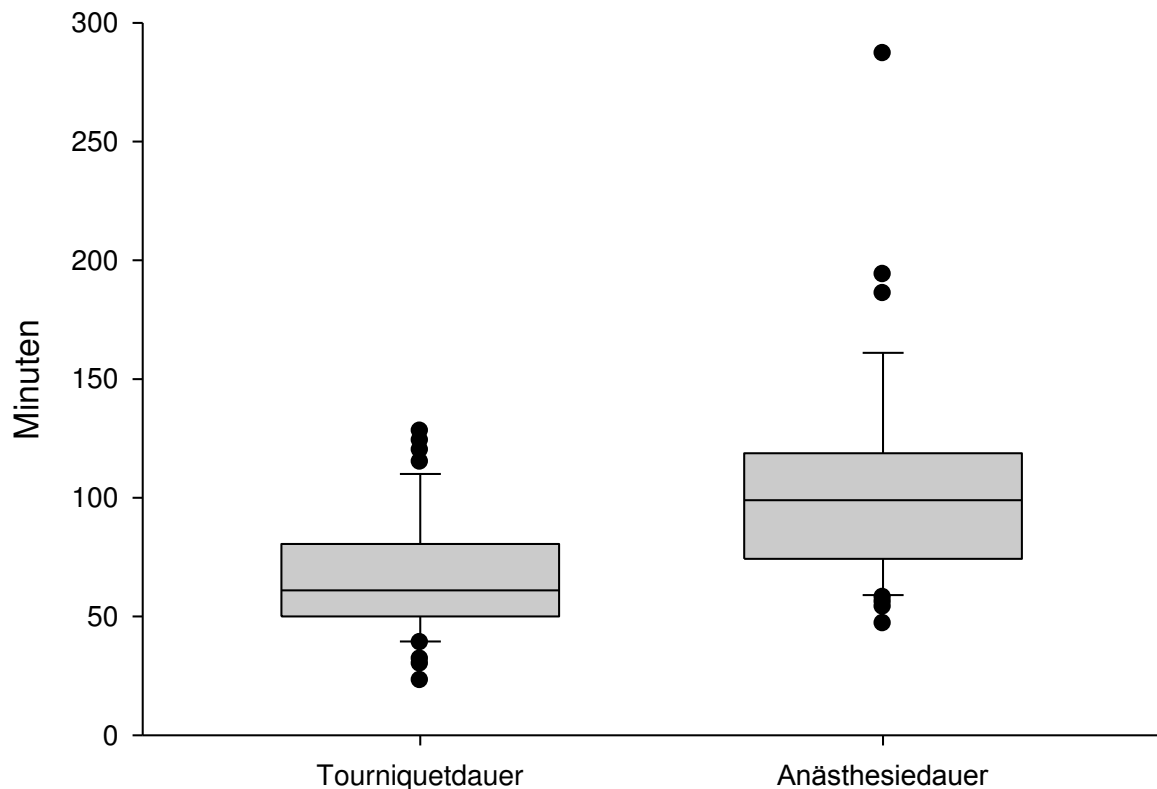


Abbildung 6: Operationsdaten – Tourniquet- und Anästhesiedauer

Die Box-Whisker-Diagramme stellen die Tourniquet- und Anästhesiedauer in Minuten dar.

Der Median der Tourniquetdauer lag bei 61 Minuten, die 25%-Quartile bei 50 Minuten und die 75%-Quartile bei 77,5 Minuten. Der Interquartilsabstand betrug 27,5 Minuten.

Der Median der Anästhesiedauer lag bei 99 Minuten, die 25%-Quartile bei 74,75 Minuten und die 75%-Quartile bei 118,25 Minuten. Der Interquartilsabstand betrug 43,5 Minuten.

III.4. Glykoprotein VI

III.4.1. GPVI Kumulativ

Zwischen T2 und T3 kam es zu einem signifikanten Anstieg der GPVI-Konzentration ($p=0,0339$). Ebenso war ein signifikanter Anstieg von T2 zu T4 zu erkennen ($p=0,0152$).

Die GPVI-Konzentration fiel zwischen T1 und T2, allerdings wurde keine statistische Signifikanz erreicht. (s. Abb. 7)

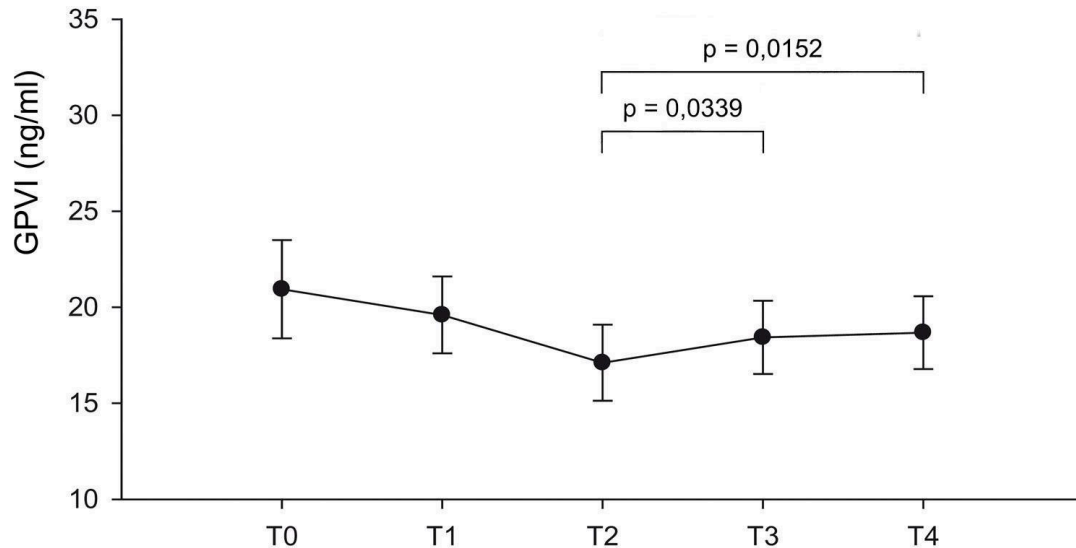


Abbildung 7: Glykoprotein VI Kumulativ

Glykoprotein VI (GPVI) in ng/ml im zeitlichen Verlauf.

Signifikanter Anstieg zwischen den Zeitpunkten T2 und T3 sowie T2 und T4.

III.4.2. GPVI bei unterschiedlichen inspiratorischen Sauerstoffkonzentrationen

Der Anstieg der GPVI-Konzentration war bei höherer inspiratorischer Sauerstoffkonzentration in der Gruppe mit 80% FiO₂ stärker als bei den anderen Gruppen mit niedrigeren inspiratorischer Sauerstoffkonzentration. Insgesamt erreichten die Unterschiede der Konzentrationen zwischen den Gruppen verschiedener inspiratorischer Sauerstoffkonzentrationen allerdings keine statistische Signifikanz (s. Abb. 8).

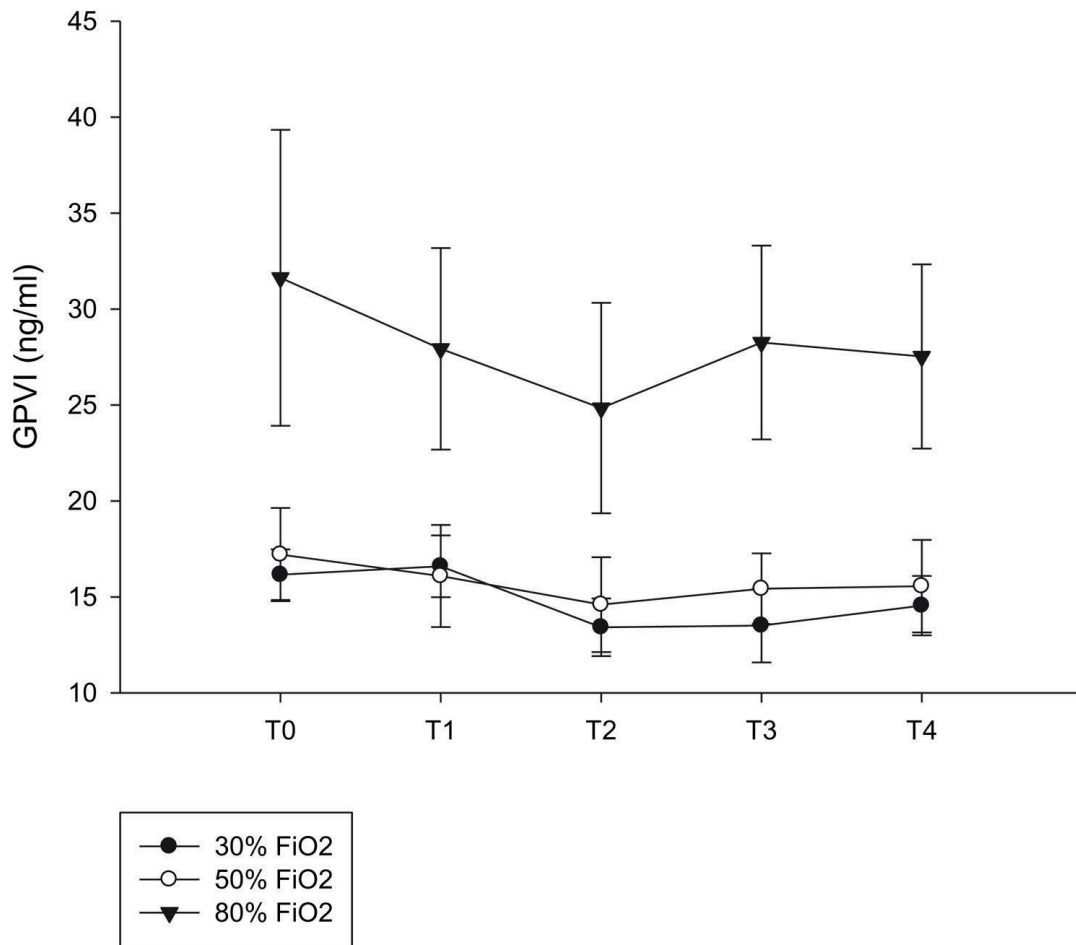


Abbildung 8: Glykoprotein VI bei unterschiedlichen FiO₂
 Glykoprotein VI (GPVI) in ng/ml bei unterschiedlichen inspiratorischen Sauerstoffkonzentrationen (FiO₂) im zeitlichen Verlauf.
 Kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bei unterschiedlicher FiO₂.

III.5. Platelet-Derived Microparticles

III.5.1. PDMP Kumulativ

Die Messwerte für die PDMP im Zymuphen ELISA unterschieden sich signifikant zwischen den Zeitpunkten T2 und T3 ($p=0,0299$; Einfluss des Lösens der Blutsperrre bei unterschiedlichem FiO₂), T2 und T4 ($p<0,0001$) und T3 und T4 ($p=0,0169$) (s. Abb. 11).

Der Abfall zwischen T0 und T1 erreichte keine statistische Signifikanz.

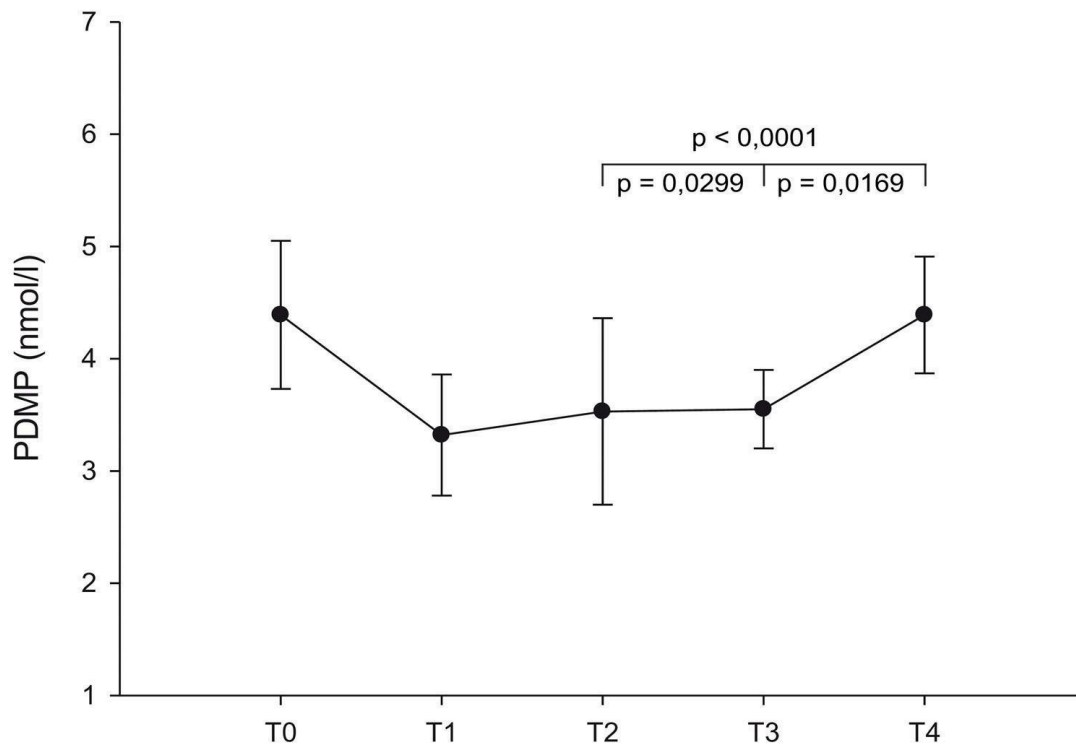


Abbildung 9: Platelet-Derived Microparticles Kumulativ

Platelet-Derived Microparticles (PDMP) in nmol/l im zeitlichen Verlauf.

Signifikanter Anstieg zwischen den Zeitpunkten T2 und T3, T2 und T4 und T3 und T4.

III.5.2. PDMP bei unterschiedlichen inspiratorischen

Sauerstoffkonzentrationen:

Der stärkste Konzentrationsanstieg war von T2 zu T3 beziehungsweise T3 zu T4 in der Gruppe mit einer inspiratorischen Sauerstoffkonzentration von 30% zu erkennen. Insgesamt erreichten die Unterschiede der Konzentrationen zwischen den Gruppen verschiedener inspiratorischer Sauerstoffkonzentrationen allerdings keine statistische Signifikanz (s. Abb. 12).

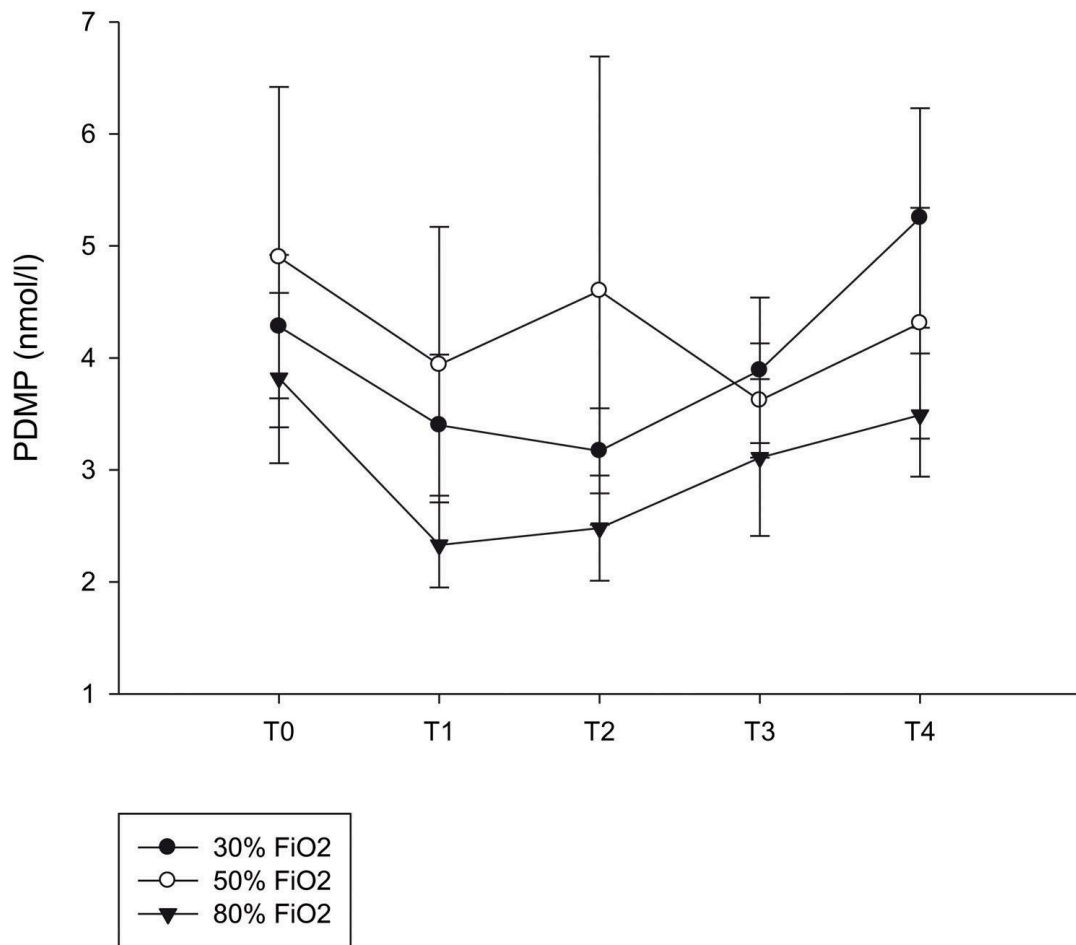


Abbildung 10: Platelet-Derived Microparticles bei unterschiedlichen FiO₂

Platelet Derived Microparticles (PDMP) in nmol/l bei unterschiedlichen inspiratorischen Sauerstoffkonzentrationen (FiO₂) im zeitlichen Verlauf.

Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen mit unterschiedlichem FiO₂.

III.6. Prokoagulante Phospholipide

III.6.1. PPL Kumulativ

Die Messwerte für die PPL im XACT-Test fielen zwischen Zeitpunkt T0 und T1 signifikant ab. Die statistische Signifikanz zwischen diesen beiden Zeitpunkten wurde sowohl ohne als auch mit Einbeziehung von Operationsdauer, Alter und Geschlecht erreicht (p unkorrigiert = 0,0071 versus p korrigiert = 0,0259).

Ebenso waren signifikante Unterschiede zwischen Zeitpunkt T2 und Zeitpunkt T4 erkennbar (p=0,0014) (s. Abb. 9).

Die Anstiege zwischen T1 und T2 beziehungsweise T2 und T3 erreichten keine statistische Signifikanz.

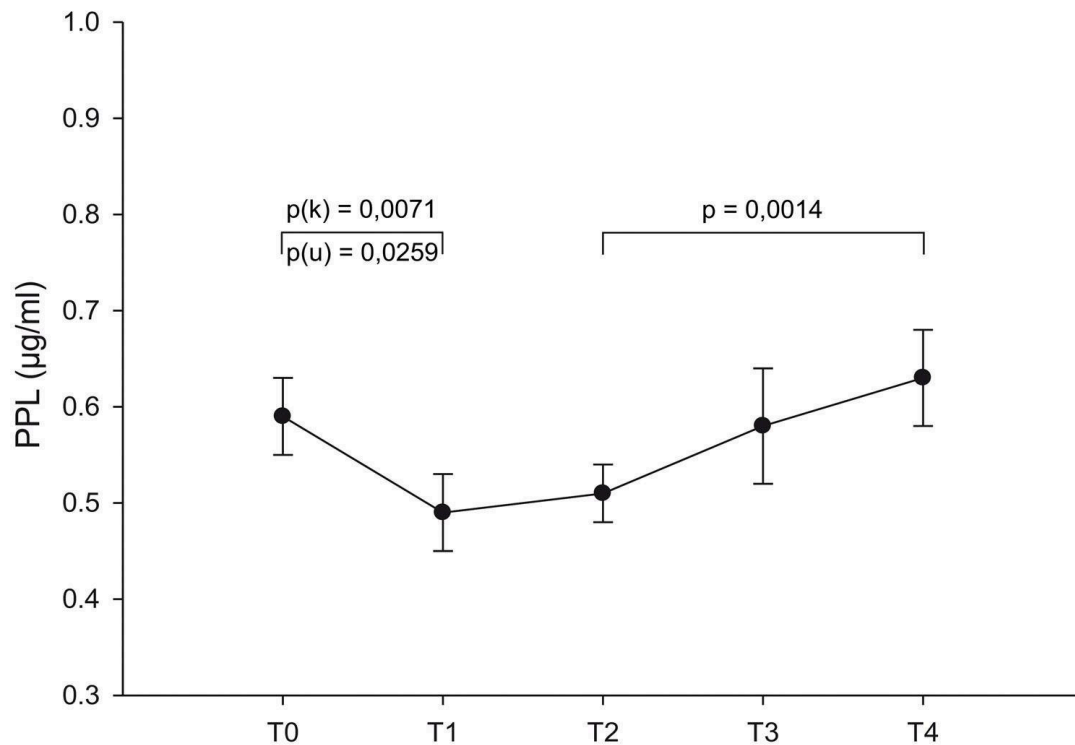


Abbildung 11: Prokoagulante Phospholipide Kumulativ

Prokoagulante Phospholipide (PPL) in µg/ml im zeitlichen Verlauf.

Signifikanter Abfall zwischen T0 und T1.

Signifikanter Anstieg zwischen T2 und T4.

III.6.2. PPL bei unterschiedlichen inspiratorischen

Sauerstoffkonzentrationen

Der Anstieg der PPL-Konzentration schien bei höherer inspiratorischer Sauerstoffkonzentration in der Gruppe mit 50% stärker als bei den anderen Gruppen inspiratorischer Sauerstoffkonzentration zu sein.

Insgesamt erreichten die Unterschiede der Konzentrationen zwischen den Gruppen verschiedener inspiratorischer Sauerstoffkonzentrationen allerdings keine statistische Signifikanz. (s. Abb. 10)

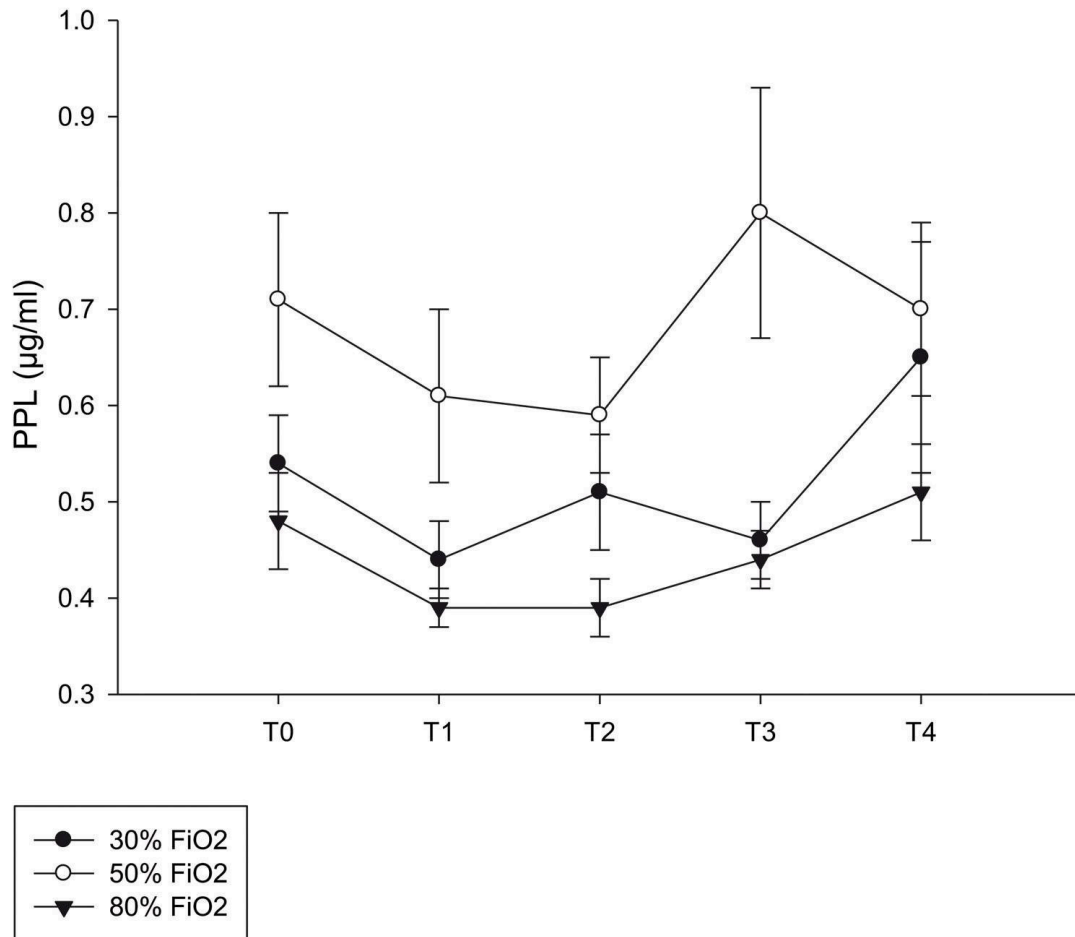


Abbildung 12: Prokoagulante Phospholipide bei unterschiedlichen FiO₂

Prokoagulante Phospholipide (PPL) in µg/ml bei unterschiedlichen inspiratorischen Sauerstoffkonzentrationen (FiO₂) im zeitlichen Verlauf.

Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen mit unterschiedlichem FiO₂.

III.7. Zusammenfassung der Ergebnisse

Sowohl GPVI, als auch PDMP und PPL stiegen bei Reperfusion signifikant an und bestätigten somit ihre Funktion als wichtige Aktivierungsmarker von Thrombozyten nach IRI:

Glykoprotein VI stieg sowohl von T2 zu T3 als auch T3 zu T4 signifikant an.

Dies entspricht zeitlich dem Lösen der Blutsperre und damit den Folgen der Reperfusion.

Die Platelet-Derived Microparticles stiegen im Laufe der Reperfusion signifikant von T2 zu T3, T2 zu T4 und T3 zu T4 an.

Die prokoagulanten Phospholipide fielen unter Blutsperre während der Operation zunächst signifikant ab und stiegen anschließend von T2 zu T4 signifikant an, der Reperfusion entsprechend.

Unterschiede zwischen den Gruppen verschiedener inspiratorischer Sauerstoffkonzentrationen erreichten allerdings bei keiner der drei Aktivierungsparameter statistische Signifikanz.

Am ehesten konnten bei der GPVI-Konzentration Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen erkannt werden: In der Gruppe mit hoher inspiratorischer Sauerstoffkonzentration von 80% stieg die GPVI-Konzentration stärker an als in den anderen Gruppen, allerdings wurde auch hier die statistische Signifikanz nicht erreicht.

IV. Diskussion

IV.1. Zusammenfassung der Ergebnisse

IRI ist eine relevante Komplikation vieler Eingriffe im klinischen Alltag, welches von vorübergehender Muskel- oder Nervenschwellung bis zum Multiorganversagen führen kann. In verschiedenen Studien sind bereits die Pathophysiologie des IRI und verschiedene Ansätze untersucht worden, um möglicherweise auftretende Schäden möglichst gering zu halten. (23,28)

In der vorliegenden prospektiven randomisierten Kohortenstudie wurden an einem standardisiert reproduzierbaren Ischämie-Reperusionsmodell bei unterschiedlichen inspiratorischen Sauerstoffkonzentrationen (30%, 50%, 80%) das GPVI, die PDMP und die PPL als Marker der Thrombozytenaktivierung als Surrogat des Ausmaßes oxidativen Stresses beobachtet. Bis zum heutigen Zeitpunkt gibt es keine Studien, die den Einfluss unterschiedlicher inspiratorischer Sauerstoffkonzentration auf die Thrombozytenaktivierung in einem Ischämie-Reperusionsmodell untersucht haben. Dies ist insbesondere deshalb eine wichtige Fragestellung, da die Gabe von „therapeutischem“ Sauerstoff in übernormalen Konzentrationen zum Beispiel bei zerebralen Ischämien und Schlaganfall, Rückenmarkischämie oder aber Herz- oder Lebertransplantationen ein Standardverfahren ist. (28,48,60,73)

Die Rolle der Thrombozyten im Rahmen des IRI ist ein vielversprechendes Forschungsfeld. Durch die Gabe unterschiedlicher inspiratorischer Sauerstoffkonzentrationen könnte möglicherweise der Ausprägungsgrad des IRI direkt beeinflusst werden. In unserer Studie konnte ein signifikanter Anstieg von Markern der Thrombozytenaktivierung bei der Verwendung eines arteriellen Tourniquets gezeigt werden. Bei der Verwendung verschiedener inspiratorischer Sauerstoffkonzentrationen waren zwischen den Gruppen zwar Unterschiede erkennbar, allerdings erreichten diese in unserem Modell keine statistische Signifikanz. Insbesondere die GPVI-Konzentration zeigte bei hoher inspiratorischer Sauerstoffkonzentration von 80% einen stärkeren Anstieg im Rahmen der Reperfusion als die beiden anderen Gruppen. Dies könnte dafür

sprechen, dass das Glykoprotein VI für unsere Fragestellung der spezifischste Parameter ist.

In den 1980er Jahren wurde postuliert, dass Sauerstoff ein Antibiotikum sei. Eine vermehrte Sauerstoffzufuhr könne grundlegende Vorzüge ohne offensichtliche Risiken bieten und zum Beispiel zu einer gesteigerten Immunabwehr beitragen. (62,78,80) So konnten Knighton et al. beispielsweise zeigen, dass die Gabe von normobarem Sauerstoff die Rate von infektiösen Nekrosen genauso effektiv senkte wie eine prophylaktische Gabe von Antibiotika. (79)

Ab welcher Konzentration und Einwirkdauer Sauerstoff dagegen toxisch wirken kann, wird unterschiedlich beschrieben, zwischen 30% und 100% beziehungsweise 45 Minuten und 48h. Den Hauptgrund der Toxizität stellt die Produktion freier Radikale dar.

Der subkutane Sauerstoffvorrat variiert auch bei vollständig gesättigtem Hämoglobin stark, abhängig von unterschiedlicher Körpertemperatur, Raucheranamnese, Anämie, Adipositas und vielem mehr, was möglicherweise die interindividuellen Unterschiede in der Regeneration des Gewebes oder der Infektionsrate erklären könnte. Dies führte zunächst zu der Idee, zusätzlichen Sauerstoff zuzuführen. Die bisher hierzu durchgeführten Studien zeigen insgesamt widersprüchliche Ergebnisse:

Dugall et al. konnten in einer in der Gynäkologie durchgeführten randomisiert kontrollierten Studie keine Unterschiede der Infektionsrate oder des Auftretens von Endometritis nach Kaiserschnitten zwischen 2 Gruppen feststellen, die perioperativ jeweils entweder 30% oder 80% inspiratorische Sauerstoffkonzentration erhielten. (30)

Eine sehr ähnliche Studie führten Williams et al. durch, auch sie konnten keinen Unterschied der Wundinfektionsrate bei Frauen nach Kaiserschnitt zwischen den zwei Gruppen von 30% beziehungsweise 80% FiO₂ feststellen. (159)

Klingel et al. führten schließlich eine Metaanalyse anhand von fünf Studien bezüglich der Wundinfektionsrate nach Kaiserschnitt bei unterschiedlichen inspiratorischen Sauerstoffkonzentrationen durch. Sie konnten keinen signifikanten Unterschied der Wundinfektionsrate zwischen Patientinnen mit hoher (60%) im Vergleich zu niedriger (40%) inspiratorischer Sauerstoffkonzentration erkennen. (76)

Hovaguimian et al. hingegen beschrieben in einer Metaanalyse, dass eine erhöhte intraoperative Sauerstoffkonzentration (80%-100%) im Gegensatz zu niedriger (30-40%) Vorteile auf verschiedenen Ebenen mit sich bringt: Wundinfektionsrate sowie postnarkotische Übelkeit und Erbrechen (PONV) zeigten sich signifikant niedriger, ohne weitere Verstärkung einer Atelektasenbildung in der Lunge. (60)

Patientinnen, die einen Kaiserschnitt bekommen, sind meist junge, ansonsten gesunde Frauen. Möglicherweise beeinflusst die Auswahl des Patientenkollektivs das Outcome der Studien stark, und bestimmte Gruppen von Patienten profitieren stärker von einer erhöhten inspiratorischen Sauerstoffkonzentration als andere.

Dies könnte auch eine Erklärung dafür sein, dass in der von uns durchgeführten Studie keine signifikanten Unterschiede bei Gabe unterschiedlicher Sauerstoffkonzentrationen zu beobachten waren, denn das Durchschnittsalter der operierten Patienten war mit 39 Jahren verhältnismäßig niedrig. Möglicherweise würde ein anderes Kollektiv mit beispielsweise älteren Patienten zu anderen Ergebnissen führen.

Aktuelle Therapieansätze des IRI

Ischämische Präkonditionierung

„Ischämisches Präkonditionieren“ wurde 1986 erstmals beschrieben und bezeichnet eine kurze Exposition gegenüber Hypoxie vor einer längeren Ischämiephase. (10) Dies schützt vor einem möglicherweise ansonsten später auftretenden IRI. Die Schutzmechanismen sind bis heute nicht vollständig verstanden. Die Präkonditionierung scheint in Zellen eine gewisse Toleranz gegenüber Ischämie zu induzieren.

Wahrscheinlich spielen freie Radikale eine signifikante Rolle: Erstens werden weniger ROS und neutrophile Granulozyten während der Reperfusion freigesetzt, und zweitens gehen bei der Gabe von Antioxidantien die positiven Effekte der Präkonditionierung verloren. (150)

Verringerte Apoptose, verminderte Gefäßschäden, geringer ausgeprägtes „No-Reflow-Phänomen“ und weniger systemische Auswirkungen des IRI sind weitere Vorteile der Ischämischen Präkonditionierung. (123)

Die meisten Daten bezüglich der Ischämischen Präkonditionierung wurden in Studien an kardialen Reperfusionssyndromen gewonnen: (34)

Im Jahr 1996 zeigten Kaeffer et al. anhand von isolierten Koronararterien von Ratten, dass die Ischämische Präkonditionierung protektiv auf die Myokardzellen wirkte und sowohl vor akuten als auch chronischen durch IRI hervorgerufene Veränderungen am Endothel schützte.

Wang et al. konnten 1999 in einer Studie anhand eines IRI-Modells an Herzen von Hunden zeigen, dass die Ischämische Präkonditionierung die Apoptose und die Freisetzung von neutrophilen Granulozyten und damit die Größe der Infarktnarbe verringert. (154)

Wu et al. führten im Jahr 2000 eine randomisiert kontrollierte klinische Studie durch, in der sie einen protektiven Effekt der Ischämischen Präkonditionierung auf die Erholung der ventrikulären Funktion nach Bypass-Operation nachweisen konnten. (68,154,160)

Bis heute existieren allerdings nur wenige in Tierversuchen gewonnene Daten bezüglich des Effekts der Ischämischen Präkonditionierung beim Gebrauch von Tourniquets während Operationen an den oberen oder unteren Extremitäten.

Endogene Antioxidantien

Die Gabe von endogenen Antioxidantien wurde in der Prävention von IRI gezielt untersucht. (23,51) In experimentellen Tierversuchen senkte eine Gabe von Enzymen wie Superoxid-Dismutase, Katalase, von Chelatoren wie Desferrioxamin oder Mannitol, von Antioxidantien wie Vitamin C und E oder von Inhibitoren der Xanthinoxidase wie Allopurinol während der Reperfusion den Einfluss der ROS. (51,93) Entsprechende klinische Studien zeigten leider geringere Erfolge, sodass der therapeutische Nutzen eingeschränkt ist. (10,23,29,51,82,83,146,157)

Inhibierung des Na⁺/H⁺-Austauschers

Die Inhibierung des Na⁺/H⁺-Austauschers schien Tierversuchen zufolge ein anderer vielversprechender Angriffspunkt zu sein. Doch auch hier konnten die positiven Ergebnisse in klinischen Studien nicht reproduziert werden. (144)

Zukünftige Studien werden zeigen, ob dieser Therapieansatz erfolgreich sein wird oder nicht.

Andere

Auch das Komplementsystem spielt eine entscheidende Rolle bei IRI (22) und ist somit zum Hauptangriffspunkt für Therapieansätze geworden. So zeigten Weisman et al. 1990 in einem IRI-Modell am Myokard von Ratten, dass die Infarktgröße um 44% gesenkt werden konnte durch die Gabe von C3-Konvertase-Inhibitor und löslichem Komplementrezeptor 1. (158)

Vakeva et al. konnten 1998 anhand von einem IRI-Modell am Myokard von Ratten einen protektiven Effekt einer Anti-C5-Therapie nachweisen: Apoptose, Nekrose und Leukozyteninfiltration ins Myokard konnten signifikant gesenkt werden. (147)

Fitch et al. beschrieben 1999 eine Reduktion der Komplementaktivierung, Leukozytenaktivierung und Myokardschädigung, geringeren Blutverlust und weniger kognitive Dysfunktionen bei Patienten mit Bypass-OP durch Gabe eines humanisierten rekombinanten C5-Inhibitors. (36) Leider konnten auch hier die in Tierversuchen erfolgreich gewonnenen Daten in klinischen Studien nicht reproduziert werden. (158)

IV.1.1. GPVI

Die Rolle von GPVI als wichtigster Kollagenrezeptor der Thrombozyten wurde in mehreren Arbeiten belegt: (59,110)

Massberg et al. zeigten 2003, dass bei GPVI-negativen Thrombozyten keine kollageninduzierte Plättchenaktivierung durch physiologische Kollagenkonzentrationen ausgelöst werden kann. Die Inhibierung von GPVI durch den monoklonalen Antikörper JAQ1 in Mäusen reduzierte das Tethering der Plättchen ans Subendothel um 89%. (92) Außerdem konnten Arai et al, Boylan et al und Moroi et al. bei Patienten mit GPVI-Mangel zeigen, dass sie nur eine geringgradig verlängerte Blutungszeit aufweisen und es zu verminderter kollageninduzierter Thrombozytenaktivierung, -aggregation und Thrombusbildung kommt. (8,15,102) Diese Erkenntnisse bestätigen, dass GPVI ein für die Adhäsion, Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten notwendiger Kollagenrezeptor ist. (11,45,92,110)

In unserer Studie zeigte sich ein signifikanter Anstieg der löslichen GPVI-Konzentration von Zeitpunkt T2 nach T3. Dies entspricht dem Lösen der Blutsperre und korreliert somit mit einer vermehrten Aktivierung der Thrombozyten bei Reperfusion.

Eine weitere Differenzierung zwischen den unterschiedlichen Gruppen inspiratorischer Sauerstoffkonzentration war statistisch nicht signifikant.

IV.1.2. PDMP

Die Funktion und Rolle der PDMP ist bereits in verschiedenen klinischen Studien untersucht worden. (101,114,115) Die Mikropartikel spielen sowohl eine Rolle bei der normalen Hämostase als auch bei klinisch relevanten Erkrankungen: Sie exprimieren Phospholipide, die prothrombotisch wirken. In nahezu allen Studien konnte bei Erkrankungen mit Thromboseneigung eine Erhöhung der PDMP, der EDMP (endothelial cell-derived MP) und der MDMP (Monocyte-derived MP) sowohl im venösen als auch im arteriellen Blut nachgewiesen werden.

Trotzdem ist die Relevanz dieser Erhöhung für den klinischen Alltag bislang nicht klar. Ebenso ist unsicher, ob die Erhöhung Ursache oder Folge der Thrombosen ist. (115)

Die am weitesten verbreitete Methode zur Untersuchung der PDMPs ist die Durchflusszytometrie. (116) Die Hauptvorteile der Durchflusszytometrie sind ihre Sensitivität und die Fähigkeit, Kombinationen von monoklonalen Antikörpern (mAbs) und/oder Annexin-V mit einzubeziehen, wodurch die Kombinationen exponierter Antigene untersucht und ihre Subpopulationen identifiziert werden können. (112) Allerdings ist sie zu teuer und die Standardisierung der PDMP-Quantität noch nicht ausgereift. (116)

Die PMPs können auch wie in der hier vorliegenden Studie durch ein ELISA, einem funktionellen Assay zur Messung der prokoagulanten Aktivität von Mikropartikeln in menschlichem Plasma *in vitro*, erfasst werden. Im Vergleich zur Flowzytometrie kann einfacher eine größere Anzahl von Proben analysiert werden.

Der Assay von Mikropartikeln kann als Marker für kardiovaskuläre Krankheiten, Tumorleiden, und/oder für infektiöse oder entzündliche Prozesse verwendet werden (Untersuchung oder Follow-Up der Pathologieentwicklung, Diagnostik, Prognostik der Krankheitsrekurrenz, Therapiemonitoring).

Die Plasmakonzentration wird als pathologisch betrachtet, wenn die Konzentration der Mikropartikel mehr als doppelt so hoch wie in normalem Plasma ist. Hohe Konzentrationen von Mikropartikeln werden bei verschiedenen krankhaften Zuständen wie kardiovaskulären Krankheiten, Tumorleiden, infektiösen oder entzündlichen Geschehnissen beobachtet. (115)

In unseren Untersuchungen zeigte sich erwartungsgemäß ein signifikanter Anstieg der PDMP-Konzentration bei Lösen der Blutsperre. So konnte auch hier eine vermehrte Aktivierung der Thrombozyten bei Reperfusion gezeigt werden. Zwischen den Gruppen mit verschiedenen inspiratorischen Sauerstoffkonzentrationen konnte allerdings auch hier kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

IV.1.3. PPL

Der XACT-Assay zur Messung der PPLs ist bereits mehrfach in Studien untersucht worden. Es wurde eine deutlich erniedrigte XACT bei Patienten mit ACS und eine deutlich erhöhte PPL-Aktivität und erniedrigte Plättchenaktivität nach Ballondilatation (PCI), wahrscheinlich aufgrund der gerinnungshemmenden Medikation, beobachtet. (24)

Das Messen der PPL-Konzentration im Plasma lässt einen direkten Rückschluss auf den Aktivierungsgrad der primären Hämostase zu. (149)

In unseren Untersuchungen zeigte sich ein signifikanter Abfall der PPL-Konzentration zwischen T0 und T1. Des Weiteren war ein signifikanter Anstieg zwischen T2 und T4 als Zeichen einer vermehrten Thrombozytenaktivierung nach Reperfusion zu beobachten.

Zwischen den Gruppen verschiedener inspiratorischer Sauerstoffkonzentrationen waren allerdings keine statistisch signifikanten Unterschiede feststellbar.

IV.2. Limitationen und methodische Einschränkungen

IV.2.1. IRI-Modell

Im Studienprotokoll waren Mindestwerte für die Tourniquetdauer, welche der Ischämiedauer entspricht, festgelegt worden. Allerdings variierte die Dauer bei den Studienteilnehmern mitunter recht stark: So konnten wir Tourniquetzeiten von minimal 45 bis maximal 124 Minuten beobachten.

Hier wäre eventuell ein engeres Fenster der Ischämiedauer sinnvoll. Dies ist im operativen Modell allerdings schwierig, da diese vom Operationsverlauf abhängig ist und selten standardisiert werden kann, so dass vermutlich viele Studienteilnehmer ausgeschlossen werden müssten, da ihre Tourniquetzeiten nicht im engen Fenster lägen.

Auch die Temperatur im ischämischen Gebiet kann entscheidenden Einfluss auf das Ausmaß des IRI haben:

So konnten Mowlavi et al in einer Studie an einem isolierten Muskel von Ratten zeigen, dass Hypothermie während Ischämie und Reperfusion den später auftretenden Schaden an peripheren Nerven und Skelettmuskeln signifikant verringert. (99,103)

Auch Mitsui et al. zeigten an einem zuvor von ihnen etablierten IRI-Modell an peripheren Nerven von Ratten, dass Hypothermie während IRI neuroprotektiv wirkt. (99)

Genauso ist wahrscheinlich die Thrombozytenaktivierung von der Temperatur abhängig (81,142,155), sodass hier Unterschiede in der Raumtemperatur von wenigen Grad entscheidend sein könnten.

Die jeweils verabreichten Anästhetika können eine weitere mögliche Quelle von zufälligen Fehlern darstellen: Die Produktion von Sauerstoffradikalen ist durch Preconditioning (Gabe von vor allem volatilen Anästhetika und Opioiden) deutlich herabgesetzt.

In einer im Jahre 2002 von Kato durchgeführten Metaanalyse wurden alle bis dato durchgeführten Studien zu unterschiedlichen Anästhetika und ihrer protektiven Wirkung auf IRI am Myokard verglichen. Isofluran, Sevofluran und Morphin zeigten den stärksten positiven Effekt. (72)

Ma et al. konnten 2012 an einem IRI-Modell am Myokard von Ratten zeigen, dass die Gabe von Sevofluran als Preconditioning einen nachhaltigen kardioprotektiven Effekt hat. (89)

Insofern könnten auch die in dieser Studie verabreichten Narkosemittel einen Einfluss auf das Ausmaß des IRI gehabt haben. (2,41,47)

Ein weiterer Faktor, der das IRI beeinflusst, ist die Flüssigkeitszufuhr während der Narkose. So konnte gezeigt werden, dass eine Hämodilution zu einer Verringerung der möglicherweise auftretenden Schäden führt. (42) Deshalb ist auch hier im Protokoll eine Richtmenge festgelegt worden.

Die Messung der Parameter wurde in venösem Blut durchgeführt, welches aus einer Venenverweilkanüle der kontralateralen oberen Extremität entnommen worden war. Dementsprechend hatte das Blut zuvor den systemischen Kreislauf, insbesondere das Lungen- und Handkapillarnetz, durchwandert. Möglicherweise waren die Marker für Thrombozytenaktivierung in der entnommenen Blutprobe seit Beginn der Reperfusion bis zur Entnahme bereits durch Metabolisierung verändert oder teilweise in Kapillarnetzen sequestriert worden und wichen daher von den ursprünglichen Messgrößen ab.

IV.3. Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Studie konnten wir anhand von Markern der Thrombozytenaktivierung zeigen, dass es bei der Verwendung arterieller Tourniquets an der oberen Extremität zu einer Aktivierung der Thrombozyten kommt, vermutlich am ehesten ausgelöst durch ein IRI der oberen Extremität. Dieser Anstieg konnte unter verschiedenen inspiratorischen Sauerstoffkonzentrationen gezeigt werden, war allerdings nicht signifikant unterschiedlich in Bezug auf die Höhe der inspiratorischen Sauerstoffkonzentration.

Eine mögliche Weiterentwicklung für zukünftige Studien, könnte sein, die Unterschiede in der inspiratorischen Sauerstoffkonzentration zu verstärken.

Erreichen könnte man dies beispielsweise durch eine hyperbare Druckkammer.

Eine Anhebung des Sauerstoffpartialdrucks in der Atemluft von 21 auf 100% (etwa fünffach), bewirkt eine proportionale Erhöhung der im Blut gelösten Sauerstoffmenge. Eine weitere Steigerung des Sauerstoffpartialdrucks ist durch Erhöhung des Umgebungsdruckes möglich. Atmet der Mensch in einer hyperbaren Kammer an der Meeresoberfläche 100% Sauerstoff, wird ein Partialdruck von ungefähr 600mmHg erreicht. Wird die Druckkammer in eine Tiefe von zum Beispiel 15 Metern verlegt, also einem Druck von 2,5 bar, und reiner Sauerstoff verabreicht, gelangt ungefähr die 20-fache Menge an Sauerstoff im Blut in Lösung (etwa 1800 mmHg).

Der Sauerstoffpartialdruck in Luft auf Meereshöhe, also bei einer inspiratorischen Sauerstoffkonzentration von etwa 21%, beträgt etwa 160 mmHg. Der

Sauerstoffpartialdruck im arteriellen Blut liegt niedriger und beträgt altersabhängig zwischen etwa 75 mmHg und 100 mmHg.

Bei unserem Modell betragen die unterschiedlichen inspiratorischen Sauerstoffkonzentrationen 30%, 50% und 80%.

Das heißt, in unserer Studie variierten die Sauerstoffpartialdrücke bei den unterschiedlichen inspiratorischen Sauerstoffkonzentrationen zwischen ungefähr 120-150 mmHg, 240-300 mmHg und 500-525 mmHg.

Durch eine hyperbare Druckkammer in der Tiefe könnte man den arteriellen Sauerstoffpartialdruck beispielsweise auf bis zu 1800 mmHg erhöhen und somit wahrscheinlich gravierendere Unterschiede in der Aktivierung der Thrombozyten zwischen den verschiedenen Gruppen beobachten.

Des Weiteren könnte man die Zeitpunkte der Probenentnahme gegebenenfalls verändern beziehungsweise weitere hinzufügen. Möglicherweise wäre eine Entnahme 24 Stunden post OP aufschlussreich, um längerfristig anhaltende Veränderungen der Aktivierung zu erkennen.

V. Literaturverzeichnis

- (1) Abbott NJ (2000) Inflammatory mediators and modulation of blood-brain barrier permeability. *Cell.Mol.Neurobiol.* 20 (2): 131-147
- (2) Addison PD, Neligan PC, Ashrafpour H, Khan A, Zhong A, Moses M, et al. (2003) Noninvasive remote ischemic preconditioning for global protection of skeletal muscle against infarction. *Am.J.Physiol.Heart Circ.Physiol.* 285 (4): H1435-43
- (3) Adembri C, Kastamoniti E, Bertolozzi I, Vanni S, Dorigo W, Coppo M, et al. (2004) Pulmonary injury follows systemic inflammatory reaction in infrarenal aortic surgery. *Crit.Care Med.* 32 (5): 1170-1177
- (4) Aglietti P, Baldini A, Vena LM, Abbate R, Fedi S, Falciani M (2000) Effect of tourniquet use on activation of coagulation in total knee replacement. *Clin.Orthop.Relat.Res.* (371) (371): 169-177
- (5) Al-Tamimi M, Mu FT, Moroi M, Gardiner EE, Berndt MC, Andrews RK (2009) Measuring soluble platelet glycoprotein VI in human plasma by ELISA. *Platelets* 20 (3): 143-149
- (6) Al-Tamimi M, Gardiner EE, Thom JY, Shen Y, Cooper MN, Hankey GJ, et al. (2011) Soluble glycoprotein VI is raised in the plasma of patients with acute ischemic stroke. *Stroke* 42 (2): 498-500
- (7) Andrews RK, Karunakaran D, Gardiner EE, Berndt MC (2007) Platelet receptor proteolysis: a mechanism for downregulating platelet reactivity. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 27 (7): 1511-1520
- (8) Arai M, Yamamoto N, Moroi M, Akamatsu N, Fukutake K, Tanoue K (1995) Platelets with 10% of the normal amount of glycoprotein VI have an impaired response to collagen that results in a mild bleeding tendency. *Br.J.Haematol.* 89 (1): 124-130
- (9) Arai S, Teramoto K, Kawamura T (2003) Current progress in the understanding of and therapeutic strategies for ischemia and reperfusion injury of the liver. *J.Hepatobiliary.Pancreat.Surg.* 10 (3): 189-194
- (10) Becker LB (2004) New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovasc.Res.* 61 (3): 461-470
- (11) Bender M, Hofmann S, Stegner D, Chalaris A, Bosl M, Braun A, et al. (2010) Differentially regulated GPVI ectodomain shedding by multiple platelet-expressed proteinases. *Blood* 116 (17): 3347-3355

- (12) Berend KR, Lombardi AV, Jr (2006) Multimodal venous thromboembolic disease prevention for patients undergoing primary or revision total joint arthroplasty: the role of aspirin. *Am.J.Orthop.*(Belle Mead NJ) 35 (1): 24-29
- (13) Berger G, Hartwell DW, Wagner DD (1998) P-Selectin and platelet clearance. *Blood* 92 (11): 4446-4452
- (14) Bilzer M, Roggel F, Gerbes AL (2006) Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver Int.* 26 (10): 1175-1186
- (15) Boylan B, Chen H, Rathore V, Paddock C, Salacz M, Friedman KD, et al. (2004) Anti-GPVI-associated ITP: an acquired platelet disorder caused by autoantibody-mediated clearance of the GPVI/FcRgamma-chain complex from the human platelet surface. *Blood* 104 (5): 1350-1355
- (16) Boyle EM, Jr, Pohlman TH, Cornejo CJ, Verrier ED (1996) Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: ischemia-reperfusion. *Ann.Thorac.Surg.* 62 (6): 1868-1875
- (17) Bradford EMW (1969) Haemodynamic changes associated with the application of lower limb tourniquets. *Anaesthesia* 24 (2): 190-197
- (18) Carden DL, Granger DN (2000) Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J.Pathol.* 190 (3): 255-266
- (19) Chambers DE, Parks DA, Patterson G, Roy R, McCord JM, Yoshida S, et al. (1985) Xanthine oxidase as a source of free radical damage in myocardial ischemia. *J.Mol.Cell.Cardiol.* 17 (2): 145-152
- (20) Chirinos JA, Heresi GA, Velasquez H, Jy W, Jimenez JJ, Ahn E, et al. (2005) Elevation of endothelial microparticles, platelets, and leukocyte activation in patients with venous thromboembolism. *J.Am.Coll.Cardiol.* 45 (9): 1467-1471
- (21) Christian Hick AH (2009) Hämostase. In: Hämostase. Intensivkurs Physiologie. Elsevier, Urban&FischerVerlag, 6. Aufl., S. 26-27
- (22) Collard CD, Lekowski R, Jordan JE, Agah A, Stahl GL (1999) Complement activation following oxidative stress. *Mol.Immunol.* 36 (13-14): 941-948
- (23) Collard CD, Gelman S (2001) Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology* 94 (6): 1133-1138
- (24) Connor DE, Exner T, Ma DD, Joseph JE (2009) Detection of the procoagulant activity of microparticle-associated phosphatidylserine using XACT. *Blood Coagul.Fibrinolysis* 20 (7): 558-564
- (25) Crenshaw AG, Hargens AR, Gershuni DH, Rydevik B (1988) Wide tourniquet cuffs more effective at lower inflation pressures. *Acta Orthop.Scand.* 59 (4): 447-451

- (26) Cywes R, Packham MA, Tietze L, Sanabria JR, Harvey PR, Phillips MJ, et al. (1993) Role of platelets in hepatic allograft preservation injury in the rat. *Hepatology* 18 (3): 635-647
- (27) de Perrot M, Liu M, Waddell TK, Keshavjee S (2003) Ischemia-reperfusion-induced lung injury. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 167 (4): 490-511
- (28) Dorweiler B, Pruefer D, Andrasi TB, Maksan sM, Schmiedt W, Neufang A, et al. (2007) Ischemia-Reperfusion Injury Pathophysiology and Clinical Implications. *European Journal of Trauma and Emergency Surgery*
- (29) Drossos G, Lazou A, Panagopoulos P, Westaby S (1995) Deferoxamine cardioplegia reduces superoxide radical production in human myocardium. *Ann.Thorac.Surg.* 59 (1): 169-172
- (30) Duggal N, Poddatorri V, Noroozkhani S, Siddik-Ahmad RI, Caughey AB (2013) Perioperative Oxygen Supplementation and Surgical Site Infection After Cesarean Delivery: A Randomized Trial. *Obstet.Gynecol.*
- (31) Eriksson BI, Eriksson E, Risberg B (1991) Impaired fibrinolysis and postoperative thromboembolism in orthopedic patients. *Thromb.Res.* 62 (1-2): 55-64
- (32) Faint RW (1992) Platelet-neutrophil interactions: their significance. *Blood Rev.* 6 (2): 83-91
- (33) Fantini GA, Conte MS (1995) Pulmonary failure following lower torso ischemia: clinical evidence for a remote effect of reperfusion injury. *Am.Surg.* 61 (4): 316-319
- (34) Ferdinandy P, Schulz R, Baxter GF (2007) Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning. *Pharmacol.Rev.* 59 (4): 418-458
- (35) Ferguson D, McDonagh PF, Biewer J, Paidas CN, Clemens MG (1993) Spatial relationship between leukocyte accumulation and microvascular injury during reperfusion following hepatic ischemia. *Int.J.Microcirc.Clin.Exp.* 12 (1): 45-60
- (36) Fitch JC, Rollins S, Matis L, Alford B, Aranki S, Collard CD, et al. (1999) Pharmacology and biological efficacy of a recombinant, humanized, single-chain antibody C5 complement inhibitor in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery with cardiopulmonary bypass. *Circulation* 100 (25): 2499-2506
- (37) Flatt AE (1972) Tourniquet time in hand surgery. *Arch.Surg.* 104 (2): 190-192
- (38) Fleet WF, Johnson TA, Graebner CA, Gettes LS (1985) Effect of serial brief ischemic episodes on extracellular K⁺, pH, and activation in the pig. *Circulation* 72 (4): 922-932

- (39) Forde RC, Fitzgerald DJ (1997) Reactive oxygen species and platelet activation in reperfusion injury. *Circulation* 95 (4): 787-789
- (40) Francis CW, Pellegrini VD, Jr, Stulberg BN, Miller ML, Totterman S, Marder VJ (1990) Prevention of venous thrombosis after total knee arthroplasty. Comparison of antithrombin III and low-dose heparin with dextran. *J.Bone Joint Surg.Am.* 72 (7): 976-982
- (41) Freas W, Llave R, Hart J, Golightly D, Nagel J, Muldoon S (1991) Interactions of volatile anesthetics and reactive oxygen intermediates on vascular smooth muscle. *Adv.Exp.Med.Biol.* 301: 247-255
- (42) Frost-Arner L, Wellander E, Mattsson E, Bergqvist D (1998) Isovolemic hemodilution and skeletal muscle function during ischemia and reperfusion. *Microsurgery* 18 (2): 79-85
- (43) Furie B, Furie BC (2004) Role of platelet P-selectin and microparticle PSGL-1 in thrombus formation. *Trends Mol.Med.* 10 (4): 171-178
- (44) Gardiner EE, Karunakaran D, Shen Y, Arthur JF, Andrews RK, Berndt MC (2007) Controlled shedding of platelet glycoprotein (GP)VI and GPIb-IX-V by ADAM family metalloproteinases. *J.Thromb.Haemost.* 5 (7): 1530-1537
- (45) Geiger MA (2009) Glykoprotein VI als neuer prädiktiver Biomarker für das akute Koronarsyndrom
- (46) Gielen M (1991) Cardiac arrest after tourniquet release. *Can.J.Anaesth.* 38 (4 Pt 1): 541
- (47) Glantz L, Ginosar Y, Chevion M, Gozal Y, Elami A, Navot N, et al. (1997) Halothane prevents postischemic production of hydroxyl radicals in the canine heart. *Anesthesiology* 86 (2): 440-447
- (48) Goldstein LJ (2013) Hyperbaric oxygen for chronic wounds. *Dermatol.Ther.* 26 (3): 207-214
- (49) Golino P, Ashton JH, Buja LM, Rosolowsky M, Taylor AL, McNatt J, et al. (1989) Local platelet activation causes vasoconstriction of large epicardial canine coronary arteries in vivo. Thromboxane A2 and serotonin are possible mediators. *Circulation* 79 (1): 154-166
- (50) Golino P, Ambrosio G, Ragni M, Pascucci I, Triggiani M, Oriente A, et al. (1993) Short-term and long-term role of platelet activating factor as a mediator of in vivo platelet aggregation. *Circulation* 88 (3): 1205-1214
- (51) Gourdin MJ, Bree B, De Kock M (2009) The impact of ischaemia-reperfusion on the blood vessel. *Eur.J.Anaesthesiol.* 26 (7): 537-547

- (52) Granger DN (1988) Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am.J.Physiol.* 255 (6 Pt 2): H1269-75
- (53) Greene TL, Louis DS (1983) Compartment syndrome of the arm--a complication of the pneumatic tourniquet. A case report. *J.Bone Joint Surg.Am.* 65 (2): 270-273
- (54) Haematex RUO XACT Test for Procoagulant Phospholipid. Mit freundlicher Genehmigung von Haematex Research Pty Ltd (Australian Biotechnology), Hornsby, New South Wales, Australia
- (55) Hagan PF, Kaufman EE (1990) Vascular complication of knee arthroplasty under tourniquet. A case report. *Clin.Orthop.Relat.Res.* (257) (257): 159-161
- (56) Hasegawa T, Malle E, Farhood A, Jaeschke H (2005) Generation of hypochlorite-modified proteins by neutrophils during ischemia-reperfusion injury in rat liver: attenuation by ischemic preconditioning. *Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver Physiol.* 289 (4): G760-7
- (57) Hill JH, Ward PA (1971) The phlogistic role of C3 leukotactic fragments in myocardial infarcts of rats. *J.Exp.Med.* 133 (4): 885-900
- (58) Himmelreich G, Hundt K, Neuhaus P, Roissant R, Riess H (1992) Decreased platelet aggregation after reperfusion in orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 53 (3): 582-586
- (59) Hoffmann CHW (2008) Die Rolle der thrombozytären Kollagenrezeptoren Glycoprotein VI und alpha2beta1-Integrin für die Thrombozytenadhäsion und Thrombusformation an atheromatöser Plaque
- (60) Hovaguimian F, Lysakowski C, Elia N, Tramer MR (2013) Effect of Intraoperative High Inspired Oxygen Fraction on Surgical Site Infection, Postoperative Nausea and Vomiting, and Pulmonary Function: Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *Anesthesiology*
- (61) Hughes SF, Hendricks BD, Edwards DR, Middleton JF (2010) Tourniquet-applied upper limb orthopaedic surgery results in increased inflammation and changes to leukocyte, coagulation and endothelial markers. *PLoS One* 5 (7): e11846
- (62) Hunt TK, Linsey M, Grislis H, Sonne M, Jawetz E (1975) The effect of differing ambient oxygen tensions on wound infection. *Ann.Surg.* 181 (1): 35-39
- (63) HYPHEN RUO (2007) ZYMUPHEN MP-Activity: Functional assay for the measurement of microparticles' procoagulant activity in plasma (# 521096). Mit freundlicher Genehmigung von HYPHEN, BioMed, Neuville-Sur-Oise, France

- (64) Inoue O, Suzuki-Inoue K, McCarty OJ, Moroi M, Ruggeri ZM, Kunicki TJ, et al. (2006) Laminin stimulates spreading of platelets through integrin alpha6beta1-dependent activation of GPVI. *Blood* 107 (4): 1405-1412
- (65) Jaeschke H, Farhood A (1991) Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Am.J.Physiol.* 260 (3 Pt 1): G355-62
- (66) Jaeschke H (2006) Mechanisms of Liver Injury. II. Mechanisms of neutrophil-induced liver cell injury during hepatic ischemia-reperfusion and other acute inflammatory conditions. *Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver Physiol.* 290 (6): G1083-8
- (67) Jennings RB, Murry CE, Steenbergen C,Jr, Reimer KA (1990) Development of cell injury in sustained acute ischemia. *Circulation* 82 (3 Suppl): II2-12
- (68) Jerome SN, Akimitsu T, Gute DC, Korthuis RJ (1995) Ischemic preconditioning attenuates capillary no-reflow induced by prolonged ischemia and reperfusion. *Am.J.Physiol.* 268 (5 Pt 2): H2063-7
- (69) Junnarkar S, Lau LL, Edrees WK, Underwood D, Smye MG, Lee B, et al. (2003) Cytokine activation and intestinal mucosal and renal dysfunction are reduced in endovascular AAA repair compared to surgery. *J.Endovasc.Ther.* 10 (2): 195-202
- (70) Kageyama K, Nakajima Y, Shibasaki M, Hashimoto S, Mizobe T (2007) Increased platelet, leukocyte, and endothelial cell activity are associated with increased coagulability in patients after total knee arthroplasty. *J.Thromb.Haemost.* 5 (4): 738-745
- (71) Kambayashi J, Sakon M, Yokota M, Shiba E, Kawasaki T, Mori T (1990) Activation of coagulation and fibrinolysis during surgery, analyzed by molecular markers. *Thromb.Res.* 60 (2): 157-167
- (72) Kato R, Foex P (2002) Myocardial protection by anesthetic agents against ischemia-reperfusion injury: an update for anesthesiologists. *Can.J.Anaesth.* 49 (8): 777-791
- (73) Kellar RS, Audet RG, Roe DF, Rheins LA, Draelos ZD (2013) Topically delivered dissolved oxygen reduces inflammation and positively influences structural proteins in healthy intact human skin. *J.Cosmet.Dermatol.* 12 (2): 86-95
- (74) Khandoga A (2002) Analyse der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion bei hepatischer Ischämie-Reperfusion [zugl. Dr. med.]. Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität München, München
- (75) Klenerman L (1995) Is a tourniquet really necessary for knee replacement? *J.Bone Joint Surg.Br.* 77 (2): 174-175

- (76) Klingel ML, Patel SV (2013) A meta-analysis of the effect of inspired oxygen concentration on the incidence of surgical site infection following cesarean section. *Int.J.Obstet.Anesth.* 22 (2): 104-112
- (77) Kloner RA, Jennings RB (2001) Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 1. *Circulation* 104 (24): 2981-2989
- (78) Knighton DR, Halliday B, Hunt TK (1984) Oxygen as an antibiotic. The effect of inspired oxygen on infection. *Arch.Surg.* 119 (2): 199-204
- (79) Knighton DR, Halliday B, Hunt TK (1986) Oxygen as an antibiotic. A comparison of the effects of inspired oxygen concentration and antibiotic administration on in vivo bacterial clearance. *Arch.Surg.* 121 (2): 191-195
- (80) Knighton DR, Fiegel VD, Halverson T, Schneider S, Brown T, Wells CL (1990) Oxygen as an antibiotic. The effect of inspired oxygen on bacterial clearance. *Arch.Surg.* 125 (1): 97-100
- (81) Krajewski S, Kurz J, Geisler T, Peter K, Wendel HP, Straub A (2012) Combined blockade of ADP receptors and PI3-kinase p110beta fully prevents platelet and leukocyte activation during hypothermic extracorporeal circulation. *PLoS One* 7 (6): e38455
- (82) Larsen M, Webb G, Kennington S, Kelleher N, Sheppard J, Kuo J, et al. (2002) Mannitol in cardioplegia as an oxygen free radical scavenger measured by malondialdehyde. *Perfusion* 17 (1): 51-55
- (83) Lassnigg A, Punz A, Barker R, Keznickl P, Manhart N, Roth E, et al. (2003) Influence of intravenous vitamin E supplementation in cardiac surgery on oxidative stress: a double-blinded, randomized, controlled study. *Br.J.Anaesth.* 90 (2): 148-154
- (84) Lazdunski M, Frelin C, Vigne P (1985) The sodium/hydrogen exchange system in cardiac cells: its biochemical and pharmacological properties and its role in regulating internal concentrations of sodium and internal pH. *J.Mol.Cell.Cardiol.* 17 (11): 1029-1042
- (85) Leo R, Pratico D, Iuliano L, Pulcinelli FM, Ghiselli A, Pignatelli P, et al. (1997) Platelet activation by superoxide anion and hydroxyl radicals intrinsically generated by platelets that had undergone anoxia and then reoxygenated. *Circulation* 95 (4): 885-891
- (86) Liu P, McGuire GM, Fisher MA, Farhood A, Smith CW, Jaeschke H (1995) Activation of Kupffer cells and neutrophils for reactive oxygen formation is responsible for endotoxin-enhanced liver injury after hepatic ischemia. *Shock* 3 (1): 56-62
- (87) Lopez JA, Armstrong ML, Piegors DJ, Heistad DD (1989) Effect of early and advanced atherosclerosis on vascular responses to serotonin, thromboxane A2, and ADP. *Circulation* 79 (3): 698-705

- (88) Lu X, Hamilton JA, Shen J, Pang T, Jones DL, Potter RF, et al. (2006) Role of tumor necrosis factor-alpha in myocardial dysfunction and apoptosis during hindlimb ischemia and reperfusion. *Crit.Care Med.* 34 (2): 484-491
- (89) Ma LL, Zhang FJ, Yan M (2012) Sevoflurane preconditioning produces delayed cardioprotection effect through up-regulation of inducible nitric oxide synthase in rats. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 41 (5): 553-558
- (90) Marcus AJ, Safier LB (1993) Thromboregulation: multicellular modulation of platelet reactivity in hemostasis and thrombosis. *FASEB J.* 7 (6): 516-522
- (91) Marino PL (2002) Kapitel 37: Störungen der Thrombozyten und deren Substitution. In: Taeger K (Hrsg) *Das ICU-Buch: Praktische Intensivmedizin.* Elsevier, Urban & Fischer, 3. Aufl., S. 521-521
- (92) Massberg S, Gawaz M, Gruner S, Schulte V, Konrad I, Zohlhofer D, et al. (2003) A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo. *J.Exp.Med.* 197 (1): 41-49
- (93) Maxwell SR, Lip GY (1997) Reperfusion injury: a review of the pathophysiology, clinical manifestations and therapeutic options. *Int.J.Cardiol.* 58 (2): 95-117
- (94) McAuley CE, Steed DL, Webster MW (1984) Arterial complications of total knee replacement. *Arch.Surg.* 119 (8): 960-962
- (95) McCully JD, Wakiyama H, Hsieh YJ, Jones M, Levitsky S (2004) Differential contribution of necrosis and apoptosis in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am.J.Physiol.Heart Circ.Physiol.* 286 (5): H1923-35
- (96) McEwen JA (1981) Complications of and improvements in pneumatic tourniquets used in surgery. *Med.Instrum.* 15 (4): 253-257
- (97) Menger MD, Pelikan S, Steiner D, Messmer K (1992) Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "reflow paradox". *Am.J.Physiol.* 263 (6 Pt 2): H1901-6
- (98) Michelson AD, Barnard MR, Hechtman HB, MacGregor H, Connolly RJ, Loscalzo J, et al. (1996) In vivo tracking of platelets: circulating degranulated platelets rapidly lose surface P-selectin but continue to circulate and function. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 93 (21): 11877-11882
- (99) Mitsui Y, Schmelzer JD, Zollman PJ, Mitsui M, Kihara M, Low PA (1999) Hypothermic neuroprotection of peripheral nerve of rats from ischemia-reperfusion injury: intraischemic vs. reperfusion hypothermia. *Brain Res.* 827 (1-2): 63-69
- (100) Mizobe T (1999) Haematological effects of anaesthetics and anaesthesia. *Curr.Opin.Anaesthesiol.* 12 (4): 437-441

- (101) Morel O, Morel N, Freyssinet JM, Toti F (2008) Platelet microparticles and vascular cells interactions: a checkpoint between the haemostatic and thrombotic responses. *Platelets* 19 (1): 9-23
- (102) Moroi M, Jung SM, Okuma M, Shinmyozu K (1989) A patient with platelets deficient in glycoprotein VI that lack both collagen-induced aggregation and adhesion. *J.Clin.Invest.* 84 (5): 1440-1445
- (103) Mowlavi A, Neumeister MW, Wilhelmi BJ, Song YH, Suchy H, Russell RC (2003) Local hypothermia during early reperfusion protects skeletal muscle from ischemia-reperfusion injury. *Plast.Reconstr.Surg.* 111 (1): 242-250
- (104) Mura M, Andrade CF, Han B, Seth R, Zhang Y, Bai XH, et al. (2007) Intestinal ischemia-reperfusion-induced acute lung injury and oncotic cell death in multiple organs. *Shock* 28 (2): 227-238
- (105) Nakano Y, Kondo T, Matsuo R, Hashimoto I, Kawasaki T, Kohno K, et al. (2008) Platelet dynamics in the early phase of postischemic liver in vivo. *J.Surg.Res.* 149 (2): 192-198
- (106) Nanobashvili J, Neumayer C, Fuegl A, Blumer R, Prager M, Sporn E, et al. (2003) Development of 'no-reflow' phenomenon in ischemia/reperfusion injury: failure of active vasomotility and not simply passive vasoconstriction. *Eur.Surg.Res.* 35 (5): 417-424
- (107) Nawada R, Murakami T, Iwase T, Nagai K, Morita Y, Kouchi I, et al. (1997) Inhibition of sarcolemmal Na⁺,K⁺-ATPase activity reduces the infarct size-limiting effect of preconditioning in rabbit hearts. *Circulation* 96 (2): 599-604
- (108) Neary P RH (1999) Ischaemia reperfusion and the systemic inflammatory response syndrome. In: Grace PA MR (Hrsg) *Ischaemia Reperfusion Injury*. Blackwell Science, London, S. 123-136
- (109) Newman RJ (1984) Metabolic effects of tourniquet ischaemia studied by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J.Bone Joint Surg.Br.* 66 (3): 434-440
- (110) Nieswandt B, Brakebusch C, Bergmeier W, Schulte V, Bouvard D, Mokhtari-Nejad R, et al. (2001) Glycoprotein VI but not alpha2beta1 integrin is essential for platelet interaction with collagen. *EMBO J.* 20 (9): 2120-2130
- (111) Nieswandt B, Watson SP (2003) Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood* 102 (2): 449-461
- (112) Nieuwland R, Sturk A (2007) Platelet Derived Microparticles. In: Michelson AD (Hrsg) *Platelets*. Elsevier inc., Burlington, USA, 2. Aufl., S. 403-407

- (113) Nishiguchi M, Takamura N, Abe Y, Kono M, Shindo H, Aoyagi K (2005) Pilot study on the use of tourniquet: a risk factor for pulmonary thromboembolism after total knee arthroplasty? *Thromb.Res.* 115 (4): 271-276
- (114) Nomura S (2001) Function and clinical significance of platelet-derived microparticles. *Int.J.Hematol.* 74 (4): 397-404
- (115) Nomura S, Ozaki Y, Ikeda Y (2008) Function and role of microparticles in various clinical settings. *Thromb.Res.* 123 (1): 8-23
- (116) Nomura S, Shouzu A, Taomoto K, Togane Y, Goto S, Ozaki Y, et al. (2009) Assessment of an ELISA kit for platelet-derived microparticles by joint research at many institutes in Japan. *J.Atheroscler.Thromb.* 16 (6): 878-887
- (117) Ochoa J, Fowler TJ, Gilliatt RW (1972) Anatomical changes in peripheral nerves compressed by a pneumatic tourniquet. *J.Anat.* 113 (Pt 3): 433-455
- (118) O'Donnell D, Clarke G, Hurst P (1989) Acute renal failure following surgery for abdominal aortic aneurysm. *Aust.N.Z.J.Surg.* 59 (5): 405-408
- (119) Ogino Y, Tatsuoka Y, Matsuoka R, Nakamura K, Nakamura H, Tanaka C, et al. (1999) Cerebral infarction after deflation of a pneumatic tourniquet during total knee replacement. *Anesthesiology* 90 (1): 297-298
- (120) Olas B, Wachowicz B (2007) Role of reactive nitrogen species in blood platelet functions. *Platelets* 18 (8): 555-565
- (121) O'Leary AM, Veall G, Butler P, Anderson GH (1990) Acute pulmonary oedema after tourniquet release. *Can.J.Anaesth.* 37 (7): 826-827
- (122) Parmet JL, Horrow JC, Pharo G, Collins L, Berman AT, Rosenberg H (1995) The incidence of venous emboli during extramedullary guided total knee arthroplasty. *Anesth.Analg.* 81 (4): 757-762
- (123) Pasupathy S, Homer-Vanniasinkam S (2005) Surgical implications of ischemic preconditioning. *Arch.Surg.* 140 (4): 405-9; discussion 410
- (124) Paterson IS, Klausner JM, Pugatch R, Allen P, Mannick JA, Shepro D, et al. (1989) Noncardiogenic pulmonary edema after abdominal aortic aneurysm surgery. *Ann.Surg.* 209 (2): 231-236
- (125) Pearson PJ, Schaff HV, Vanhoutte PM (1990) Long-term impairment of endothelium-dependent relaxations to aggregating platelets after reperfusion injury in canine coronary arteries. *Circulation* 81 (6): 1921-1927
- (126) Pereboom IT, Lisman T, Porte RJ (2008) Platelets in liver transplantation: friend or foe? *Liver Transpl.* 14 (7): 923-931

- (127) Porte RJ, Blauw E, Knot EA, de Maat MP, de Ruiter C, Minke Bakker C, et al. (1994) Role of the donor liver in the origin of platelet disorders and hyperfibrinolysis in liver transplantation. *J.Hepatol.* 21 (4): 592-600
- (128) Quillen JE, Sellke FW, Brooks LA, Harrison DG (1990) Ischemia-reperfusion impairs endothelium-dependent relaxation of coronary microvessels but does not affect large arteries. *Circulation* 82 (2): 586-594
- (129) Reffelmann T, Hale SL, Dow JS, Kloner RA (2003) No-reflow phenomenon persists long-term after ischemia/reperfusion in the rat and predicts infarct expansion. *Circulation* 108 (23): 2911-2917
- (130) Ruf A, Schlenk RF, Maras A, Morgenstern E, Patscheke H (1992) Contact-induced neutrophil activation by platelets in human cell suspensions and whole blood. *Blood* 80 (5): 1238-1246
- (131) Ruf A, Patscheke H (1995) Platelet-induced neutrophil activation: platelet-expressed fibrinogen induces the oxidative burst in neutrophils by an interaction with CD11C/CD18. *Br.J.Haematol.* 90 (4): 791-796
- (132) Sabatier F, Darmon P, Hugel B, Combes V, Sanmarco M, Velut JG, et al. (2002) Type 1 and type 2 diabetic patients display different patterns of cellular microparticles. *Diabetes* 51 (9): 2840-2845
- (133) Sapega AA, Heppenstall RB, Chance B, Park YS, Sokolow D (1985) Optimizing tourniquet application and release times in extremity surgery. A biochemical and ultrastructural study. *J.Bone Joint Surg.Am.* 67 (2): 303-314
- (134) Saunders KC, Louis DL, Weingarden SI, Waylonis GW (1979) Effect of tourniquet time on postoperative quadriceps function. *Clin.Orthop.Relat.Res.* (143) (143): 194-199
- (135) Schulte V, Reusch HP, Pozgajova M, Varga-Szabo D, Gachet C, Nieswandt B (2006) Two-phase antithrombotic protection after anti-glycoprotein VI treatment in mice. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 26 (7): 1640-1647
- (136) Seal JB, Gewertz BL (2005) Vascular dysfunction in ischemia-reperfusion injury. *Ann.Vasc.Surg.* 19 (4): 572-584
- (137) Shenton DW, Spitzer SA, Mulrennan BM (1990) Tourniquet-induced rhabdomyolysis. A case report. *J.Bone Joint Surg.Am.* 72 (9): 1405-1406
- (138) Silver R, de la Garza J, Rang M, Koreska J (1986) Limb swelling after release of a tourniquet. *Clin.Orthop.Relat.Res.* (206) (206): 86-89
- (139) Sindram D, Porte RJ, Hoffman MR, Bentley RC, Clavien PA (2000) Platelets induce sinusoidal endothelial cell apoptosis upon reperfusion of the cold ischemic rat liver. *Gastroenterology* 118 (1): 183-191

- (140) Sobieszczyk P, Fishbein MC, Goldhaber SZ (2002) Acute pulmonary embolism: don't ignore the platelet. *Circulation* 106 (14): 1748-1749
- (141) Sternberg DI, Shimbo D, Kawut SM, Sarkar J, Hurlitz G, D'Ovidio F, et al. (2008) Platelet activation in the postoperative period after lung transplantation. *J.Thorac.Cardiovasc.Surg.* 135 (3): 679-684
- (142) Straub A, Krajewski S, Hohmann JD, Westein E, Jia F, Bassler N, et al. (2011) Evidence of platelet activation at medically used hypothermia and mechanistic data indicating ADP as a key mediator and therapeutic target. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 31 (7): 1607-1616
- (143) Tani M, Neely JR (1989) Role of intracellular Na⁺ in Ca²⁺ overload and depressed recovery of ventricular function of reperfused ischemic rat hearts. Possible involvement of H⁺-Na⁺ and Na⁺-Ca²⁺ exchange. *Circ.Res.* 65 (4): 1045-1056
- (144) Tardif JC, Mercier LA, Theroux P, GUARDIAN Investigators (2004) Effect of inhibition of the Na⁺/H⁺ exchanger with cariporide on left ventricular function in acute coronary syndromes: results from the echocardiographic substudy of the GUARDIAN trial. *Can.J.Cardiol.* 20 (3): 317-322
- (145) Tauber S, Menger MD, Lehr HA (2004) Microvascular in vivo assessment of reperfusion injury: significance of prostaglandin E(1) and I(2) in postischemic "no-reflow" and "reflow-paradox". *J.Surg.Res.* 120 (1): 1-11
- (146) Turan R, Yagmurdu H, Kavutcu M, Dikmen B (2007) Propofol and tourniquet induced ischaemia reperfusion injury in lower extremity operations. *Eur.J.Anaesthesiol.* 24 (2): 185-189
- (147) Vakeva AP, Agah A, Rollins SA, Matis LA, Li L, Stahl GL (1998) Myocardial infarction and apoptosis after myocardial ischemia and reperfusion: role of the terminal complement components and inhibition by anti-C5 therapy. *Circulation* 97 (22): 2259-2267
- (148) Valli H, Rosenberg PH, Kytta J, Nurminen M (1987) Arterial hypertension associated with the use of a tourniquet with either general or regional anaesthesia. *Acta Anaesthesiol.Scand.* 31 (4): 279-283
- (149) van Dreden P, Rousseau A, Fontaine S, Woodhams BJ, Exner T (2009) Clinical evaluation of a new functional test for detection of plasma procoagulant phospholipids. *Blood Coagul.Fibrinolysis* 20 (7): 494-502
- (150) Vanden Hoek TL, Becker LB, Shao Z, Li C, Schumacker PT (1998) Reactive oxygen species released from mitochondria during brief hypoxia induce preconditioning in cardiomyocytes. *J.Biol.Chem.* 273 (29): 18092-18098
- (151) VanWijk MJ, VanBavel E, Sturk A, Nieuwland R (2003) Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovasc.Res.* 59 (2): 277-287

- (152) Wakai A, Winter DC, Street JT, Redmond PH (2001) Pneumatic tourniquets in extremity surgery. *J.Am.Acad.Orthop.Surg.* 9 (5): 345-351
- (153) Wakankar HM, Nicholl JE, Koka R, D'Arcy JC (1999) The tourniquet in total knee arthroplasty. A prospective, randomised study. *J.Bone Joint Surg.Br.* 81 (1): 30-33
- (154) Wang NP, Bufkin BL, Nakamura M, Zhao ZQ, Wilcox JN, Hewan-Lowe KO, et al. (1999) Ischemic preconditioning reduces neutrophil accumulation and myocardial apoptosis. *Ann.Thorac.Surg.* 67 (6): 1689-1695
- (155) Wang Z, Shi Q, Li S, Du J, Liu J, Dai K (2010) Hyperthermia induces platelet apoptosis and glycoprotein Ibalpha ectodomain shedding. *Platelets* 21 (3): 229-237
- (156) Ward CM (1976) Oedema of the hand after fasciectomy with or without tourniquet. *Hand* 8 (2): 179-185
- (157) Weimert NA, Tanke WF, Sims JJ (2003) Allopurinol as a cardioprotectant during coronary artery bypass graft surgery. *Ann.Pharmacother.* 37 (11): 1708-1711
- (158) Weisman HF, Bartow T, Leppo MK, Marsh HC,Jr, Carson GR, Concino MF, et al. (1990) Soluble human complement receptor type 1: in vivo inhibitor of complement suppressing post-ischemic myocardial inflammation and necrosis. *Science* 249 (4965): 146-151
- (159) Williams NL, Glover MM, Crisp C, Acton AL, McKenna DS (2013) Randomized Controlled Trial of the Effect of 30% versus 80% Fraction of Inspired Oxygen on Cesarean Delivery Surgical Site Infection. *Am.J.Perinatol.*
- (160) Wu ZK, Tarkka MR, Pehkonen E, Kaukinen L, Honkonen EL, Kaukinen S (2000) Beneficial effects of ischemic preconditioning on right ventricular function after coronary artery bypass grafting. *Ann.Thorac.Surg.* 70 (5): 1551-1557

VI. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1 (28) - Konzept des Ischämie-Reperfusionsschadens:	3
Abbildung 2: schematische Darstellung des Studienprotokolls	26
Abbildung 3: Patientenkollektiv	37
Abbildung 4: Patientendaten - Altersverteilung	38
Abbildung 5 : Patientendaten - Geschlechterverteilung	39
Abbildung 6: Operationsdaten – Tourniquet- und Anästhesiedauer	41
Abbildung 7: Glykoprotein VI Kumulativ	42
Abbildung 8: Glykoprotein VI bei unterschiedlichen FiO₂	43
Abbildung 9: Platelet-Derived Microparticles Kumulativ	44
Abbildung 10: Platelet-Derived Microparticles bei unterschiedlichen FiO₂	45
Abbildung 11: Prokoagulante Phospholipide Kumulativ	46
Abbildung 12: Prokoagulante Phospholipide bei unterschiedlichen FiO₂	47
Tabelle 1: Zeitpunkte der Probenentnahmen und anschließende Aufbereitung	25
Tabelle 2: Operationsdaten – Art des Eingriffs	40

VII. Danksagung

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Manuel Wenk möchte ich ganz herzlich danken für die Überlassung des Themas und die Chance, Forschungsarbeit in Australien durchzuführen. Auch für die Betreuung bei der Ausarbeitung der Arbeit trotz zeitweise großer räumlicher Entfernung, bedanke ich mich herzlich.

Dem statistischen Institut der Curtin University, Perth danke ich für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Meinen Eltern danke ich für das Korrekturlesen und das Ermöglichen einer so sorgenfrei wie möglichen Studienzeit.

Nick Henschke und Johannes Kuhn danke ich für die technische Unterstützung bei Erstellung der Graphen.

Ansonsten danke ich allen soeben Erwähnten und meiner restlichen Familie und Freunden für die Unterstützung während der gesamten Studienzeit und für die Geduld, mein Gejammer anzuhören und zu ertragen.