

Steffen Weber

Funktion und Interaktion von Thrombozyten und Leukozyten unter inhaliertem Stickstoffmonoxid in vitro

Geboren am 08.06.1975 in Heilbronn

Reifeprüfung am 17.06.1994 in Bad Wimpfen

Studiengang der Fachrichtung Humanmedizin vom SS 1996 bis WS 2003/2004

Physikum am 15.09.1999 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium an der Universität Heidelberg

Praktisches Jahr im SLK-Klinikum Heilbronn, akademisches Lehrkrankenhaus der
Universität Heidelberg

Staatsexamen am 26.11.2003 im SLK-Klinikum Heilbronn

Promotionsfach: Anästhesiologie

Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. André Gries, DEAA

Inhaliertes Stickstoffmonoxid wird therapeutisch bei Patienten mit Acute respiratory distress syndrome (ARDS) und pulmonaler Hypertonie eingesetzt. Zu Beginn der Untersuchungen mit inhaliertem Stickstoffmonoxid (iNO) wurde eine pulmonale Selektivität postuliert. Dennoch konnten systemische Effekte auf die Hämostase und das Immunsystem trotz einer kurzen Halbwertszeit gezeigt werden. Gesichert ist eine dosis- und zeitabhängige Hemmung der Thrombozytenaggregation. Aggregate von Thrombozyten und Leukozyten spielen eine große Rolle im Rahmen von Entzündungsreaktionen, der Hämostase und im Rahmen der Immunantwort. Insbesondere bei Verschlechterung der Mikrozirkulation bei ARDS haben diese Interaktionen einen hohen Stellenwert. Obwohl iNO zur Verbesserung der Sauerstoffoxygenierung und zur Senkung des pulmonalarteriellen Widerstandes therapeutisch eingesetzt wird, sind die Effekte von iNO auf die Interaktionen zwischen Thrombozyten und Leukozyten noch nicht hinreichend erklärt. Durch neuere Studien lag die Vermutung nahe, dass im Hinblick auf die Platelet-leukocyte-aggregate-Bildung (PLA) nicht nur P-Selektin, sondern auch das auf Leukozyten exprimierte L-Selektin und das Integrin LFA-1 hierbei einen wesentlichen Einfluss haben. L-Selektin dient als Aktivierungsmarker und ist verantwortlich für das „rolling“. LFA-1 ist der entscheidende Faktor der Adhäsion und dient

als Mediator der Leukozyten-Extravasation, Antigen-Präsentation und der T-Zell-vermittelten Zytolyse. Ziel der Studie war es, die Wirkung von iNO auf die Leukozytenfunktion und Leukozyten-Thrombozyten-Interaktion näher zu beleuchten. Gesichert ist ein kausaler Zusammenhang zwischen P-Selektin-Expression auf Thrombozyten und der Bildung von Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten (PLA) unter iNO. Plättchenreiches Plasma (PRP) und Vollblut von gesunden 20 Frauen und 20 Männern wurde daher mit 0, 40, 80, 400 und 800ppm NO für 240 Minuten inkubiert. Zur Messung der Wirkung von iNO auf die Thrombozytenaggregation wurde die Aggregometrie verwendet. Sie wurde parallel zur Sicherstellung eines möglichst korrekten Versuchsablaufes durchgeführt. Photometrisch wurde die Aggregation durch ADP- und collageninduzierte Stimulation mit jeweils 2 verschiedenen ADP/Collagenkonzentrationen bestimmt. Flowzytometrisch wurden die LFA1- und die L-Selektin-Expression auf Leukozyten gemessen, sowie die Bildung von Thrombozyten/Leukozyten-Aggregaten unter den verschiedenen Bedingungen quantifiziert. Die Studie bestätigt eine zeit- und dosisabhängige aggregationshemmende Wirkung von iNO auf Thrombozyten. Nach 240-minütiger Inkubation lag die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation mit 5 $\mu\text{mol/l}$ unter 40, 80, 400 und 800 ppm NO um 18 ± 10 ($P<0,05$), 68 ± 10 ($P<0,001$), 87 ± 10 ($P<0,05$) und 88 ± 6 % ($P<0,001$) niedriger als die Kontrolle mit Raumluft. Bei Aggregationsstimulation mit Collagen war die gemessene Aggregationshemmung bei denselben NO-Inkubationszeiten mit 8 ± 8 (nicht signifikant), 12 ± 5 ($P<0,001$), 39 ± 10 ($P<0,001$) und 56 ± 14 ($P<0,01$) im Vergleich mit Raumluft etwas weniger ausgeprägt. Diese Ergebnisse waren mit früheren Untersuchungen vergleichbar. Sie lassen den Schluss zu, dass die Begasung und Inkubation von thrombozytenreichem Plasma richtig durchgeführt wurde. Die Vollblutproben wurden in einem Gefäß mit 0 ppm NO (Raumluft) und in einem weiteren Gefäß mit einer zuvor festgelegten iNO-Konzentration begast. Die LFA-1-Expression lag zu Beginn unter Raumluft, 40, 80, 400 und 800 ppm NO zum Zeitpunkt 0 bei 88 ± 4 , 93 ± 4 , 88 ± 4 , 93 ± 6 und 91 ± 2 % und nach 240 Minuten bei 82 ± 6 , 92 ± 4 , 89 ± 4 , 96 ± 4 und 80 ± 12 %. Zu keinem Zeitpunkt war eine signifikante Änderung messbar. Ähnliche Ergebnisse lieferte die Messung der L-Selektin-Expression. Zu Beginn lag die Expression auf Leukozyten unter gleichen Bedingungen zu gleichen Zeitpunkten und gleichen iNO-Konzentrationen zum Zeitpunkt 0 bei 83 ± 4 , 85 ± 4 , 81 ± 5 , 82 ± 5 und 84 ± 4 % und nach 240 Minuten bei 76 ± 12 , 73 ± 13 , 72 ± 5 , 77 ± 7 und 72 ± 9 %. Auch hier waren keine signifikanten Änderungen nachweisbar. Die Konzentrationen der PLA zum Zeitpunkt 0 waren mit den Messungen anderer Studien vergleichbar und lagen mit 15 ± 2 , 18 ± 4 , 14 ± 4 , 20 ± 3 und 18 ± 4 durchaus im vorbeschriebenen Bereich. Nach 240-minütiger Inkubation mit Raumluft

oder den jeweiligen iNO-Konzentrationen lag die PLA-Bildung bei 26 ± 3 , 22 ± 2 , 21 ± 2 , 37 ± 6 und 32 ± 7 %. Es zeigte sich eine kontinuierliche Zunahme der PLA-Bildung ohne dass sich spezifische Änderungen ergeben hätten. Dass die Bildung von PLA durch mechanische Stimulation hervorgerufen wurde, kann daher nicht ausgeschlossen werden, obwohl die physiologischen Verhältnisse durch die Anwendung von Dialysemembranen zur Imitation von Alveolarmembranen benutzt wurden. Die in einer anderen Studie beschriebene Expressionsminderung von PLA in vitro wurde mit PRP durchgeführt und unterlag nicht dem Einfluss von NO-verstoffwechselnden Häm-Gruppen.

Die in vitro-Untersuchungen untermauern einen thrombozyteninhibierenden Effekt. Dadurch, dass keine signifikante Expressionsänderung von LFA-1 und L-Selektin bei nichtsignifikanter PLA-Bildung nachweisbar war, kann durch diese Studie eine Beteiligung der gemessenen Integrine/Selektine an der Bildung von Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten weder ausgeschlossen noch bestätigt werden. Es erscheint daher eher wahrscheinlich, dass andere Integrine und Selektine eine Rolle bei Interaktionen zwischen Leukozyten und Thrombozyten spielen.