

Tilo Harald Graf  
Dr. med.

## **Der Einfluß von Granulozyten und mononukleären Leukozyten auf die plasmatische Gerinnung bei Patienten mit akutem ischämischen Insult.**

Geboren am 07.03.1967 in Heidelberg  
Reifeprüfung am 06.06.1986 in Wiesloch  
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1988 bis WS 1994/95  
Physikum am 30.03.1990 an der Universität Heidelberg  
Klinisches Studium in Heidelberg  
Praktisches Jahr in Stony Brook, State University of New York, USA (Innere Medizin) und Ludwigsburg (Chirurgie und Psychiatrie)  
Staatsexamen am 18.05.1995 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Neurologie  
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. Armin J. Grau

### **Einleitung**

Leukozyten spielen eine wichtige Rolle bei akuten zerebrovaskulären Ischämien und besitzen pro- und antikoagulatorische Fähigkeiten. Monozyten können z.B. durch die Produktion von Gewebefaktor-III prokoagulatorisch wirken. Eine Aktivierung von Granulozyten nach zerebralen Ischämien führt u.a. zu einer verstärkten Adhärenz, erhöhten Freisetzung proteolytischer Enzyme und veränderter Freisetzung freier Sauerstoffradikale. Die vorliegende Arbeit untersucht die Frage, ob gerinnungsbeeinflussende Eigenschaften von Leukozyten nach akuten ischämischen Insulten verändert sind und insbesondere ob Leukozyten in vermehrtem Maße prokoagulatorisch wirken.

### **Untersuchungspersonen und Methoden**

Es wurden 26 Patienten innerhalb von 3 Tagen nach akuten ischämischen Insulten und 28 (geschlechts- und altersangepaßt) Kontrollpersonen untersucht. Die Leukozytenisolierung erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation aus Citrat-Blut. Für die Gerinnungsanalysen wurden Ein-Phasen-Gerinnungstests eingesetzt. Alle Medien wurden zuvor auf ihren Endotoxingehalt hin getestet. Zur statistischen Auswertung wurden nicht-parametrische Testverfahren verwendet.

## Ergebnisse

In Vorversuchen mit jungen gesunden Blutspendern ergab sich sowohl für Granulozyten als auch mononukleäre Leukozyten (Monozyten/Lymphozyten) eine konzentrationsabhängige Beschleunigung der Recalzifizierungszeit. Bei Patienten mit akuten zerebralen Ischämien und alters- und geschlechtsgleichen Kontrollpersonen war die Recalzifizierungszeit ohne Leukozyten nicht unterschiedlich ( $365 \pm 137$  Sekunden (s) versus  $377 \pm 148$  s;  $p=0,73$ ). Granulozyten ( $1 \times 10^7$ /ml) der Kontrollpersonen beschleunigten die Recalzifizierungszeit stärker (Reduktion auf  $68 \pm 10\%$ ; der jeweiligen individuellen Kontrollexperimente ohne Zellen) als die Granulozyten der Patienten ( $82 \pm 11\%$ ;  $p=0,0002$ ). Bezüglich der partiellen Thromboplastinzeit (PTT) zeigte sich ein nicht signifikanter Trend zu einem niedrigeren gerinnungsstimulierenden Potential der Granulozyten nach zerebralen Ischämien.

Nach Stimulation mit N-Formyl-Methionin-Leucin-Phenylalanin (FMLP) nahm das prokoagulatorische Potential der Granulozyten bei den Kontrollpersonen deutlicher ab als bei den Patienten, so daß die Unterschiede bezüglich der Recalzifizierungszeit mit Granulozyten zwischen den Gruppen geringer wurden (Kontrollpersonen  $77,1 \pm 22,4\%$ ; Patienten  $80,1 \pm 19,6\%$ ;  $p=0,51$ ).

Die gerinnungsbeeinflussenden Eigenschaften zirkulierender mononukleärer Leukozyten zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollpersonen.

Wegen der häufig eingesetzten Therapie mit Heparin wurde für Verlaufsuntersuchungen heterologes Plasma verwendet. Im Vergleich zu einer Untersuchung bei Aufnahme mit heterologem Plasma zeigte sich bei den Granulozyten der Patienten eine Zunahme des gerinnungsbeschleunigenden Potentials drei bis vier Tage nach der ersten Untersuchung ( $66,7 \pm 5,0\%$  versus  $61,3 \pm 4,9\%$ ;  $p=0,005$ ). Der Unterschied zu den Kontrollpersonen bestand bei der Kontrolluntersuchung nicht mehr. Bei den Versuchen mit mononukleären Leukozyten fanden sich keine Veränderungen.

Bei Gerinnungsversuchen mit Zellysaten fand sich kein Unterschied zwischen Patienten und Kontrollpersonen, weder bei den Granulozyten noch bei den mononukleären Leukozyten.

Die Aktivität freier Elastase im Überstand der Granulozyten war bei Patienten und Kontrollpersonen nicht signifikant verschieden. Der Überstand mononukleärer Leukozyten enthielt keine bedeutsamen Mengen an Elastase.

## **Diskussion**

In der Akutphase nach zerebraler Ischämie zeigten zirkulierende Granulozyten eine verminderte prokoagulatorische Aktivität, während sich bei mononukleären Leukozyten keine Unterschiede fanden. Unsere Versuche zeigten, daß eine Stimulation der Granulozyten zu einer Reduktion der prokoagulatorischen Wirkung führt. Die verminderten gerinnungsstimulierenden Eigenschaften der Granulozyten nach akuter zerebraler Ischämie sind daher Ausdruck einer vermehrten Zellaktivierung. Dies entspricht den bekannten Befunden der Granulozytenaktivierung (z.B. bezüglich Adhärenz) nach zerebraler Ischämie. Die Zunahme der prokoagulatorischen Aktivität innerhalb drei bis vier Tagen nach Ischämie deutet darauf hin, daß in zeitlichem Zusammenhang mit der Ischämie eine kurzwirksame Aktivierung der Granulozyten stattfindet. Die Mechanismen granulozyten-assoziiierter Gerinnungsbeschleunigung sind unzureichend bekannt. Die obengenannten Befunde können sowohl durch eine Vermehrung anti-koagulatorischer (z.B. Freisetzung von Proteasen), als auch durch eine Hemmung prokoagulatorischer Eigenschaften (z.B. Wirkung des Prothrombinase-Komplexes) erklärt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen nicht die Hypothese, daß aktivierte Leukozyten einen prothrombotischen Zustand in der akuten Ischämie mitbedingen. Einschränkend ist jedoch zu beachten, daß diese Arbeit lediglich zirkulierende Zellen untersuchen konnte.