
Sylvia Kirsch

Interaktion von Thrombozyten und Leukozyten unter inhaliertem Stickstoffmonoxid (iNO) bei gesunden Probanden und Patienten mit Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS)

Geboren am 09.08.1976 in Landau i.d. Pfalz

Reifeprüfung am 19.Juni 1996 in Landau i.d. Pfalz

Studiengang der Fachrichtung Humanmedizin vom SS 1997 bis SS 2004

Physikum am 25.03.1999 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium an der Universität Heidelberg

Praktisches Jahr an der Fakultät für klinische Medizin in Mannheim

Staatsexamen am 07.05.2004 an der Fakultät für klinische Medizin Mannheim

Promotionsfach: Anaesthesiologie

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

Inhalierendes Stickstoffmonoxid (iNO), das zur Therapie des "Acute Respiratory Distress Syndrome" (ARDS) und der Pulmonalen Hypertonie (PH) eingesetzt wird, führt zu einer verbesserten Oxygenierung durch selektive pulmonale Vasodilatation und hemmt die Thrombozytenaggregation. Aktuelle Studien weisen darauf hin, dass NO über die Modulation der thrombozytären und leukozytären Adhäsionsmoleküle die Funktion und Interaktion zirkulierender Zellen beeinflussen kann. Ziel dieser Arbeit ist es, die systemische Wirkung von iNO auf die Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion, insbesondere die Plättchen-Leukozyten-Aggregatbildung bei gesunden Probanden und ARDS-Patienten zu untersuchen.

Insgesamt 30 gesunde, junge Probanden wurden nach der Reihenfolge des Studieneinschlusses in Gruppe A (8 Männer, 7 Frauen) oder B (8 Männer, 7 Frauen) eingeteilt. Gruppe A erhielt 0 (Kontrolle), 5 und 50 ppm, Gruppe B ebenso 0, 10 und 20 ppm iNO. Die Messungen erfolgten 15 min nach Inhalation eines Luft/Sauerstoff-Gemisches ($F_iO_2=0,25$) zum Zeitpunkt t_0 , nach 30 (t_{30}), 60 (t_{60}), 120 (t_{120}) min, sowie 15 min nach Applikationsende ($t_{15 \text{ post NO}}$).

Das Patientenkollektiv bestand aus 20 Patienten mit schwerem ARDS (16 Männer, 4 Frauen), die $4,6 \pm 0,4$ Tage nach Aufnahme auf die Intensivstation eine NO-Therapie

erhielten. Die Messungen erfolgten vor Start der NO-Therapie (t_0), sowie 60, 120 und 180 min nach Applikationsbeginn der im Dosisfindungstest ermittelten Optimaldosis. Non-Responder ($n=4$) im Dosisfindungstest dienten als Kontrollgruppe.

Mithilfe der photometrischen Aggregometrie wurde die Thrombozytenfunktion untersucht. Aggregationsinduzierende Substanzen waren ADP und Collagen. Flowzytometrische Messungen (FACS-Analysen) von Vollblut dienten zur Bestimmung der leukozytären CD11a-Expression und der Plättchen-Leukozyten-Aggregatbildung (PLAs). Bei Patienten wurde zusätzlich die thrombozytäre Expression von P-Selektin (PS) und die Fibrinogenbindung am GPIIb/IIIa-Rezeptor (FI) der Thrombozytenoberfläche gemessen. Hämatokrit, Thrombo- und Leukozytenzahlen wurden nur bei den Patienten, Plasma-cGMP-Spiegel bei beiden Studienkollektiven vor und nach NO-Inhalation erhoben. Bei Probanden wurden die hämodynamischen Parameter Blutdruck, Puls, Atemminutenvolumen und Sättigung beobachtet.

Die Messungen der Thrombozytenaggregation bestätigen Ergebnisse früherer Studien: iNO führt zu einer kurzwirkenden, reversiblen Hemmung der Aggregation. Bei gesunden Probanden zeigt die Kontrolle mit 0 ppm NO keine Veränderung der ADP-induzierten Aggregation mit der Endkonz. $5\mu\text{mol/l}$ ($74\pm 2\%$). Nach 60 min Inhalation wird die Aggregation unter 10 und 50 ppm ($62\pm 5\%$, bzw. $68\pm 4\%$, je $P<0,05$), nach 120 min unter 10 und 20 ppm ($62\pm 3\%$, bzw. $61\pm 2\%$, je $P<0,05$) signifikant gehemmt. Die Aggregationsmessungen mit der Endkonz. $2,5\mu\text{mol/l}$ ADP ergeben weniger deutliche Ergebnisse. Bei der Collagen-induzierten Aggregation (Endkonz. $0,19\text{mg/l}$) findet man eine spätere und weniger ausgeprägte Thrombozyteninhibition nur unter 50 ppm NO ($66\pm 2\%$ zu t_{120} vs. $71\pm 3\%$ zu t_0 , $P<0,05$). Die prae-aggregatorische Strecke bleibt konstant. Interessanterweise kann man bei der niedrigen Konz. von 5 ppm NO bei beiden Stimulanzien einen Rebound-Effekt nach Applikationsende beobachten (postinhalatorische Hyperaggregabilität 14% bei ADP bzw. 11% bei Coll., je $P<0,05$). Bei einzelnen Probanden ist dieser Effekt sehr ausgeprägt, mit Werten $>20\%$ des Ausgangswertes. Insgesamt fällt bei dem längeren Studienintervall von 2h ein individuell unterschiedliches Antwortverhalten auf iNO auf. Nach 120 min kommt es wie erwartet zu einer signifikanten Zunahme der Plasma-cGMP-Spiegel, die den NO-Effekt widerspiegeln: um 18% bei 20 ppm und um 107% bei 50 ppm NO (je $P<0,01$); unter 50 ppm NO bleiben die cGMP-Spiegel nach Applikationsende um 18% erhöht ($P<0,05$). Hämodynamische Parameter verändern sich unter NO-Inhalation nicht.

In der ARDS-Gruppe sieht man eine signifikante Abnahme der Thrombozytenaggregation unter iNO nach 60 min: es zeigt sich eine Hemmung um 27% (ADP 5µmol/l), 21% (ADP 2,5µmol/l) und 18% (Coll. 0,19 mg/ml). Im Verlauf der Inhalation bleibt die Aggregation inhibiert, ohne signifikantes Niveau zu erreichen. Man beobachtet ein niedrigeres Aggregationsniveau als bei Probanden, außerdem eine große interindividuelle Variabilität. Möglicherweise sind die Thrombozyten der maximal therapierten Patienten durch endogene und exogene Einflüsse (Toxine, Medikamente, usw.) in ihrer Funktion gestört. Die prae-aggregatorische Strecke ist nach 60 min signifikant um 13% verlängert ($P < 0,05$). Der Anstieg der cGMP-Spiegel um 67% nach 180-minütiger Inhalation ($P < 0,05$) findet sich in der ARDS-Kontrollgruppe nicht. Hämatokrit, Thrombozyten- und Leukozytenzahlen bleiben während des Studienintervalls in beiden Gruppen gegenüber den Ausgangswerten unverändert.

Bei gesunden Probanden führt iNO zu einer vermutlich dosisabhängigen, reversiblen Inhibition der Plättchen-Leukozyten-Aggregatbildung: Verglichen mit $23 \pm 6\%$ PLAs zu t_0 sind sie nach 60 min unter 10, 20 und 50 ppm NO um jeweils 31% vermindert (je $P < 0,05$). Unter 50 ppm bleiben die PLAs nach 120 min um 33% gehemmt ($P < 0,05$). Alle Werte kehren 15 min nach Inhalationsende auf Ausgangsniveau zurück. Die leukozytäre CD11a-Expression wird unter 50 ppm NO nach 60 min temporär inhibiert (121 ± 19 AU vs. 168 ± 18 AU zu t_0 , $P < 0,05$). Sie erreicht nach 120 min bereits wieder Basalniveau.

Auch bei den ARDS-Patienten führt die NO-Inhalation zu einer signifikanten Inhibition der Plättchen-Leukozyten-Aggregate: Die PLAs nehmen in der NO-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe nach 60 min um 32% ($P < 0,01$) und nach 120 min um 23% ($P < 0,05$) ab. Nach 180 min bleiben sie reduziert ($14 \pm 5\%$ vs. $19 \pm 8\%$ in der Kontrollgruppe, $P < 0,08$). Ebenso ist die thrombozytäre PS-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant gehemmt ($38 \pm 4\%$ vs. $43 \pm 5\%$ zu t_{120} , $P < 0,05$ und $34 \pm 5\%$ vs. $43 \pm 6\%$ zu t_{180} , $P < 0,01$) und zeigt eine enge Korrelation mit den Veränderungen der PLAs unter iNO ($R^2 = 0,91$; $P < 0,001$). Die FI-Bindung ist unter iNO gegenüber der Kontrollgruppe signifikant inhibiert ($29 \pm 6\%$ vs. $43 \pm 8\%$ zu t_{120} , $P < 0,01$ und $29 \pm 6\%$ vs. $42 \pm 6\%$ zu t_{180} , $P < 0,01$). Eine temporäre Inhibition findet sich bei der Expression von CD11a nach 60 min (152 ± 22 AU vs. 187 ± 36 AU in der Kontrollgruppe, $P < 0,05$). Sie erreicht nach 120 min wieder Basalniveau.

Neben der bereits nachgewiesenen Inhibition der Thrombozytenaggregation bei gesunden Probanden und ARDS-Patienten belegt die Studie erstmals eine reversible

Hemmung der Plättchen-Leukozyten-Aggregatbildung unter iNO. Bei Patienten liegt das basale PLA-Niveau um 25% geringer als bei gesunden Probanden. Das zeigt die Beteiligung der Aggregate im Rahmen schwerer Krankheitszustände. Die enge Korrelation mit der Hemmung der PS-Expression gibt Hinweise darauf, dass iNO die Minderung der PLA-Bildung über die Hemmung des thrombozytären Adhäsionsmoleküls P-Selektin moduliert. Wie erwartet sieht man eine Minderung der Fibrinogenbindung am aggregationsvermittelnden GPIIb/IIIa-Rezeptor unter iNO, die aber keine Korrelation zur PLA-Bildung aufweist.

CD11a wurde als Parameter für die Veränderungen der Integrinexpression eingesetzt, das für die feste Adhäsion von Leukozyten verantwortlich ist. Die nur temporäre Hemmung der CD11a-Expression lässt vermuten, dass CD11a nicht wesentlich an der Modulation der PLA-Bildung durch iNO beteiligt ist, sich aber als leukozytärer Aktivitätsparameter eignet. Effekte unter prolongierter NO-Inhalation können wegen des relativ kurzen Studienintervalles von 3 Stunden nicht ausgeschlossen werden. Die FACS-Analyse mit Vollblut ohne Notwendigkeit von Zellisolierung mit möglicher Störung der Zellinteraktion stellt dabei eine effiziente Methode zur Reflektion der in-vivo Rezeptorexpression dar.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass iNO durch die Modulation von Adhäsionsmolekülen systemische, aber reversible antileukozytäre Effekte besitzt. Neben seinen positiven hämodynamischen und thrombozyteninhibierenden Eigenschaften kann dies von praktischem klinischen Nutzen sein. Die Rekrutierung aggressiver, aktivierter Leukozyten in das bereits geschädigte pulmonale Gewebe von ARDS-Patienten könnte vermindert und die Mikrozirkulation verbessert werden. Ein früher Einsatz von iNO kann auch bei pulmonaler Hypertonie, ischämischen Herzerkrankungen, Herzinfarkt und Herzklappenersatz, bei kardiopulmonalen Bypassoperationen und unter Hämodialyse, bei denen von einer vermehrten Bildung von PLAs berichtet wurde, eine attraktive Erweiterung der antileukozytären und antiinflammatorischen Therapie sein.