

Klinik für Kardiologie
des Deutschen
Herzzentrums Berlin

Institut für
Nephrologie und
Intensivmedizin –
Charité
Universitätsmedizin
Berlin

Institut für
Tierpathologie am
Fachbereich
Veterinärmedizin der
Freien Universität
Berlin

Vergleichende Betrachtung des akuten Myokardinfarkts im
Tiermodell nach Apherese unter Verwendung eines
CRP-spezifischen Adsorbers

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Jens Ötvös

Tierarzt aus Stralsund

Berlin 2020

Journal-Nr.: 4127

**Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin**

Dekan: Univ. Prof. Dr. Jürgen Zentek
1.Gutachter: Prof. Dr. Robert Klopfleisch
2.Gutachter: PD Dr. Daniel Messroghli
3.Gutachterin: Prof. Dr. Heidrun Gehlen

CAB-Deskriptoren:
animal models, acute phase protein, cicatrix (MeSH),
clinical trial, myocardial infarction, pigs

Tag der Promotion: 19.02.2020

Abkürzungsverzeichnis

AACC	American Association for Clinical Chemistry
ACS	Acute Coronary Syndrom
ACT	Activated clotting time
Ak	Antikörper
AMI	Akuter Myokard Infarkt
APP	Akute-Phase-Protein
AS	Aminosteril
ASS	Acetylsalicylsäure
AT	Antithrombin
B.C.D.S.G.	Bostoner Colaborative Drug Surveillance Group
BGA	Blutgasanalyse
CA	Bundesstaat Californien USA
CH	Länderkennzeichen Schweiz
Ch	Charriere
CD	Cluster of Differentiation
CK	Creatinkinase
CO	Kohlenmonoxid
CO₂	Kohlendioxid
COMPASS	Comparative Trial of Saruplase versus Streptokinase
CPB	cardiopulmonary bypass
CRP	capsular reactive protein
CVK	Campus Virchow Klinikum
d	Tag

D	Länderkennzeichen Deutschland
DC	District of Columbia
DL	Deutsche Landrasse
DW	Deutsches Weideschwein
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	Enzym-linked Immunosorbent Assay
ELITE	Evaluation of Losartan in the Elderly
Eur.Ph.	European Pharmacopoeia
FEM	Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin
G	Gauge
Gd–DTPA	Gadolinium-diethylenetriamine pentaacetic acid
ggf	gegebenenfalls
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GUSTO	Global Use of Strategies to Open Occluded Arteries in Acute Coronary Syndrome
GV–SOLAS	Gesellschaft für Versuchstierkunde – Society of laboratory animal sciences
h	Stunde
Hb	Hämoglobin
Hg	Quecksilber
HI	Herzinfarkt
Hkt	Hämatokrit
HWZ	Halbwertszeit
H₂O	Wasser

ICAM	intercellular adhesion molecule
ICD	International Classification of Diseases
I.D.	Innendurchmesser
I.E.	Internationale Einheit
IL-6	Interleukin - 6
IL	Bundesstaat Illinois USA
IPPV	intermittent positive pressure ventilation
i.m.	intramuskulär
InTIME	Intravenous nPA treatment of infarcting myocardial early
IQR	interquartile range
i.v.	intravenous
J	Journal
K	Kalvin
kDa	Kilodalton
KHK	Koronare Herzkrankheit
Kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
KORA	Kooperative Gesundheitsforschung in der Region Augsburg
L	Liter
LDL	Low density Lipoprotein
Lp(a)	Lipoprotein (a)
LVEF	left ventricular ejection fraction
mg	Milligramm
mL	Milliliter
mm	Millimeter

MN	Bundesstaat Minnesota, USA
ms	Millisekunden
MRT	Magnetresonanztomographie
µg	Mikrogramm
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NACB	National Academy for Clinical Biochemistry
NJ	Bundesstaat New Jersey, USA
nPA	Novel Plasmin Activator
NQMI	Non q-wave myocardial infarction
ns	nicht signifikant
NSAID	non - steroidal - anti - inflammatory - drug
NSTEMI	Non ST-elevation myocardial infarction
OH	Bundesstaat Ohio USA
O₂	Sauerstoff
PAW	Pressure airway
p	pico
POD	Post operative day
PRISM	Platelet Receptor Inhibition for Ischemic Syndrome Management
PRISM-PLUS	Platelet Receptor Inhibition for Ischemic Syndrome Management in Patients Limited to very Unstable Signs and Syndromes
PTT	pattern recognition receptor
PTCA	percutane transluminal coronary angioplasty
QMI	q-wave myocardial infarction
RCX	Ramus circumflexus

RIVA	Ramus interventricularis anterior
RIVP	Ramus interventricularis posterior
s	Sekunden
s.c.	subcutan
SOLVD	Studies on Left Ventricular Dysfunktion
SPEED	Strategies for Patency Enhancement in the Emergency Department
STEMI	ST-elevation myocardial infarction
t	Zeitpunkt
TE	echo time
TIMI	Thrombolysis in Myocardial Infarction
TIVA	Total intravenöse Anästhesie
Tn	Troponin
Tn c	cardiac Troponin
TNF - <i>alpha</i>	Tumornekrosefaktor alpha
TR	repetition time
TTC	Triphenyltetracolumchlorid
USA	Länderkennzeichen United States of America
v.l.n.r.	von links nach rechts

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
1 Einleitung	17
2 Literatur	21
2.1 Epidemiologie	21
2.2 Definitionen	22
2.2.1 Koronare Herzkrankheit-KHK	22
2.2.2 Akutes Koronarsyndrom	23
2.2.3 Myokardinfarkt	24
2.2.3.1 Einteilung der Infarkte	24
2.2.3.2 Behandlungsformen des Myokardinfarktes	25
2.2.3.3 Reinfarkt und Reperfusionsschaden	25
2.3 Inflammation	26
2.3.1 Akute-Phase-Reaktion	26
2.3.2 Biomarker	28
2.3.2.1 CRP	28
2.3.2.2 Struktur	28
2.3.2.3 Physiologie und Funktion	28
2.3.2.4 Diagnostische Infarktmarker	31
2.4 Zielsetzung	36
3 Material und Methoden	37
3.1 Studiendesign und Ablaufschema	37
3.2 Versuchstiere und Haltungsmethoden	38
3.3 Versuchsvorbereitung/ Training der Tiere	39
3.4 Gruppeneinteilung	39
3.5 OP-Vorbereitung/ Prämedikation	40
3.6 Anästhesie	42
3.7 Instrumentierung	44

3.8	Infarktinduktion	45
3.9	Wechsel des Anästhesieregimes	47
3.10	MRT	48
3.10.1	MRT/ Bilderfassung	48
3.11	Aufwachphase	49
3.12	Versuchsgruppen	50
3.12.1	Standardsituation	50
3.12.2	Kontrollgruppe	50
3.12.3	Sham-Apherese Gruppe	51
3.12.4	Verum-Apherese Gruppe	53
3.13	Antikoagulationsstrategie	54
3.13.1	Antikoagulation für Sham- und Verumapheresegruppe	54
3.14	Prozeduren	55
3.14.1	Blutentnahme	55
3.14.2	Medikation	56
3.15	Finalisierung des Versuches	57
3.15.1	Organentnahme	57
3.15.2	Slicing	59
3.15.3	Planimetrie	59
3.16	Vitalfärbung mit TTC	60
3.16.1	Gewebisdifferenzierung nach TTC-Färbung	60
3.16.2	Vorbereitung der Färbelösung	60
3.16.3	Anfärbung der makroskopischen Präparate	61
3.17	Dokumentation	61
3.17.1	Herstellung der Lagebeziehung	61
3.17.2	Einzelnachweise	61
3.18	Fixierung der Präparate	62
3.19	Histologische Aufarbeitung	63
3.19.1	Dokumentation und Auswahl der Präparate	63
3.19.2	Histologische Färbungen	63
3.20	Statistische Analyse	65
4	Ergebnisse und Auswertungen	67
4.1	Organgewichte	67
4.2	Messmethoden	67
4.2.1	Vergleichbarkeit der Methoden (MRT vs. Image J)	67

4.3	Kardiale Marker	69
4.3.1	C-reaktives Protein	69
4.3.2	Troponin-T	73
4.3.3	Creatinkinase	75
4.4	Hämatologische Parameter	76
4.4.1	Gesamtpotein/ Leukozyten	76
4.5	Vergleich der Behandlungsgruppen	80
4.5.1	CRP-Senkung	80
4.5.2	Scoring	82
5	Diskussion	87
5.1	Spezifische CRP-Abreicherung	87
6	Zusammenfassung	91
6.1	Summary	93
	Literaturverzeichnis	97

Abbildungsverzeichnis

2.1	Pentamere Struktur von CRP	29
2.2	Schematische Darstellung von C1q	30
2.3	Schematische Darstellung der CRP Synthese	32
2.4	Troponinkomplex mit Untereinheiten	33
2.5	Vergleich der Infarktmarker	35
3.1	Studiendesign	37
3.2	Doppellumiger Hämodialysekatheter	44
3.3	Angiographie der linksseitigen Herzgefäßstruktur	47
3.4	Angiographie mit Okklusion	47
3.5	Primärgerät BM11 und Sekundärgerät ADASorb [®]	52
3.6	Schematische Darstellung der Systemkombination	54
3.7	Entnommenes Organ in toto	58
3.8	Justierbaren Schneidemaschine	59
3.9	Schematische Darstellung der Elektronenübertragung von TTC	60
3.10	Zuordnung der Herzpräparate	64
4.1	Verteilung der Herzgewichte post mortem	68
4.2	Graphische Darstellung des Vergleiches der Messmethoden	69
4.3	Darstellung der CRP-Verlaufskinetik	71
4.4	Darstellung der Ausgangswerte für CRP bei t0	72
4.5	Verlaufskinetik von kardialem Troponin T	74
4.6	Verlaufskinetik von Creatinkinase	76
4.7	Verlaufskinetik für Gesamtprotein	78
4.8	Verlaufskinetik für Leukozyten	79
4.9	Darstellung der CRP-Senkung	81
4.10	Vergleichsdarstellung der epikardialen Einziehungen	83
4.11	Vergleichsdarstellung der Infarkte	83
4.12	Vergleichsdarstellung der vitalen Myokardareale	84
4.13	2-Dimensionale Darstellung des Infarktverlaufes	85

Tabellenverzeichnis

3.1	Verwendete Medikamente	41
3.2	Materialien der Anästhesie	43
3.3	Materialien für Infarzierung	46
4.1	CRP-Werte in $\mu\text{g}/\text{mL}$	72
4.2	Kardiales TroponinT-Werte in pg/mL	73
4.3	Creatinkinase in U/L	75
4.4	Gesamtprotein in mg/mL	77
4.5	Leukozytenwerte in $10^3\mu\text{g}/\text{ml}$	80

Kapitel 1

Einleitung

Die moderne Medizin macht jedes Jahr Fortschritte, wenn es darum geht, neue und vor allem innovative Behandlungsmethoden für die unterschiedlichsten Krankheitsbilder zu erproben oder im besten Fall dauerhaft erfolgreich am Menschen anzuwenden. Manche dieser Methoden kommen dabei in der Entwicklung nicht über das experimentelle Stadium hinaus, andere zeigen vielversprechendes Potential und werden nach vorangegangenen tierexperimentellen Studien in ersten klinischen Orientierungsstudien am Patienten angewendet. Hierbei zeigt sich dann, ob die in vorangegangenen Versuchen erhaltenen Ergebnisse reproduzierbar sind. Für die Behandlung des akuten Herzinfarktes und in der Folge auch des Reperfusionsschadens werden heute entweder die interventionelle Therapie mit Anwendung von Stents in verschiedenen Versionen oder die medikamentöse Behandlung durch Einsatz von Fibrinolytika als Goldstandard angesehen. Die Wahl der Methode hängt dabei vor allem von den vorhandenen infrastrukturellen Möglichkeiten der jeweiligen Einrichtung ab und ist im Besonderen in den entsprechenden Leitlinien der Gesellschaft für Kardiologie geregelt. Alle derzeitigen Behandlungsmethoden zielen letztendlich auf eine Wiederherstellung der Funktion des Herzens und der Versorgung des defizitären Bereiches durch Reperfusion ab. Die Regeneration der myokardialen Struktur in Bezug auf Kontraktilität und Verkleinerung des Narbengewebes ist aber durch diese Behandlungen nicht oder nur in sehr geringem Umfang gegeben. Insbesondere zeigt sich hier, dass nach einer erfolgreichen Reperfusion durch temporäres Sauerstoffstoffdefizit im betroffenen Bereich oftmals weitere Zellschäden entstehen. Während der entstehenden Gewebshypoxie bilden sich freie Radikale. Mit dem Wiedereinsetzen der Perfusion kommt es zur Oxidationsreaktion der Sauerstoffradikale. Eine weitere Schädigung der Zellmembran findet statt und das bereits geschädigte Areal kann weiter expandieren. Neuere Forschungsarbeiten haben bereits mehrfach die These aufgestellt und bestätigt, dass das Immunsystem, hier besonders das C-reaktive Protein (CRP), einen

entscheidenden Einfluss auf die Infarktgröße und gleichzeitig auf einen Erhalt der Kontraktionsfähigkeit des myokardialen Gewebes haben kann. Da das CRP keine permanente Größe im Blut des lebenden Organismus darstellt, sondern vielmehr hauptsächlich im Zusammenhang mit Insulten unterschiedlichster Art gebildet wird und sich dabei nicht nur an untergegangene Zellen sondern auch an überlebendefähige, aber energiedefizitäre Zellen anlagert, könnte es vorteilhaft sein, das gebildete CRP möglichst schnell zu entfernen, um so die noch vitalen Zellen vor dem Abbau durch Makrophagen zu schützen. Insbesondere könnte sich dieses entscheidend für den Bereich des Reperfusionsschadens erweisen. Daher entstand die Annahme, dass eine Apherese unter Verwendung eines spezifischen CRP-affinen Adsorbens eine vielversprechende Möglichkeit sei, die Infarktgröße und die Kontraktilität nach einem akuten Myokardinfarkt positiv zu beeinflussen.

Extrakorporale Purifikationsverfahren werden seit vielen Jahren erfolgreich bei unterschiedlichen Erkrankungsbildern eingesetzt. Routinemäßig wird bei der familiären Hypercholesterinämie die LDL-Apherese zur Reduktion von Plasmalipoproteinen durchgeführt um so das Risiko von arteriosklerotischen Gefäßerkrankungen, im besonderen der Coronararterien zu verringern. Der direkte Zusammenhang zwischen den sklerotischen Veränderungen und z.B. ischämischen Herzerkrankungen ist ebenfalls bekannt [85] [109]. Antikörpereliminierende Verfahren werden heute bereits erfolgreich in der Nephrologie eingesetzt. Spezifische Adsorber stehen hier zum Einsatz nach Transplantation zur Verfügung. Nachteil der heute eingesetzten Verfahren ist eine häufig notwendige medikamentöse Immunsuppression [13] [55].

In unterschiedlichen Publikationen sind Hypothesen aufgestellt worden, ob C-reaktives Protein lediglich ein Marker des akuten Myokardinfarktes sei, oder ob es einen Zusammenhang mit der auftretenden myokardialen Schädigung gibt [8].

Andere Forschungsarbeiten auf diesem Gebiet haben sich mit erweiterten Theorien beschäftigt. So stand die Vermutung, ob es einen Zusammenhang zwischen C-reaktivem Protein und Komplement als Mediator von Zellschädigungen nach einem akuten Myokardinfarkt gibt [42].

Dieser vermutete Zusammenhang wurde um einen weiteren Faktor ausgedehnt. Es konnte eine zeitliche Abhängigkeit zum Zellschaden postuliert werden. Besonders auffällig sichtbar war der Gewebsschaden, wenn zwischen Infarkt ereignis und Untersuchung des Gewebes dies 12 h lagen. Ein Vorhandensein der gelösten Akute Phase Proteine, der Komplementaktivierung durch CRP und der Bildung von CRP-Komplement-Komplexen, die an den geschädigten Zellen der

Phospholipidmembran anlagern, wurde gezeigt [79]. Kritische Betrachtungen über die Funktion des CRP und den möglichen Einfluss, der durch das Fehlen oder den Mangel durch Funktionsverlust oder Inhibition entsteht, wurden in neueren Untersuchungen aufgestellt. Das Fehlen von *in vivo* Untersuchungen wurde aufgeführt, die den Einfluss auf das CRP, hervorgerufen durch Medikamente oder andere therapeutische Maßnahmen wie z.B. die spezifische Depletion des Proteins, belegen [19].

Zum Einsatz der CRP-spezifischen Reduktion durch Apherese gibt es bisher keine bekannten Veröffentlichungen, die über das experimentelle Stadium hinausgehen [97].

In der vorliegenden Arbeit wurden präklinischen Versuche zur therapeutischen Effizienz der CRP-Apherese im Schweinemodell durchgeführt. Das Schwein wurde als Modelltier gewählt, da es in Bezug auf das Immunsystem und den ablaufenden Reaktionsmechanismen mit dem menschlichen Immunsystem in vielen Aspekten vergleichbar ist.

Kapitel 2

Literatur

2.1 Epidemiologie

Die häufigste Todesursache im Erwachsenenalter in Deutschland war auch in den Jahren 2014 und 2015 eine Erkrankung des Kreislaufsystems. Der Komplex der koronaren Herzkrankheit (KHK) mit einem Anteil an den gesamten Todesursachen lag anteilig bei 38,9% in 2014 und 39.5 % in 2015. In absoluten Zahlen betraf das 2014 338.056 Verstorbene. 2015 waren bereits 356.61 Personen verstorben. Die wichtigste spezifische Todesursachengruppe war dabei die Gruppe der ischämischen Herzkrankheiten mit 121.166 Sterbefällen, darunter insbesondere der Akute sowie der Rezidivierende Myokardinfarkt mit insgesamt 50.104 Verstorbenen. Die Spezifikation nach der International Classification of Diseases (ICD 10) Kategorisierung des Statistischen Bundesamtes, einem Schlüssel für die Klassifikation von medizinischen Diagnosen, weist in der Ursachengruppe I 20 – I 25 -Ischämische Herzkrankheiten- mit I 21-Akuter Myokardinfarkt- eine Gesamtzahl von 48.181 Todesfällen (5,5 %) sowie in I 22 -Rezidivierende Myokardinfarkte- eine Gesamtzahl von 1.923 Todesfällen (0,2 %) aus. Der Gesamtzahl von somit 50.104 Verstorbenen stehen 50.948 im Jahr 2015 gegenüber. Insgesamt ist ein Anstieg von Todesfällen in den Ursachengruppen ersichtlich [6] [7]. Analysen von Krankenkassendaten zeigen, dass Patientinnen und Patienten nach einem Herzinfarkt seit 2000 zunehmend aber immer noch nicht hinreichend mit Leitlinien gerechter Medikation versorgt werden. Eine Leitlinien-gerechte Behandlung wird darüber hinaus nur bei einer Minderheit der Patientinnen und Patienten dauerhaft beibehalten [64][73].

Berücksichtigt man die aktuellen Standards der primären Behandlung des akuten Myokardinfarktes, ist die Suche nach weiteren Therapieansätzen und die Kombination verschiedener Therapieformen, auch unter der Evaluierung von bisher vernachlässigten

Forschungswegen, eine logische Konsequenz. Der Schritt vom „one fits all“ zur Individuum-assoziierten Therapie ist als wichtiger Link für die Weiterentwicklung und Ergänzung zu bereits etablierten Methoden zu bewerten. Daten aus mehreren deutschen Herzinfarktregistern - KORA-Augsburg, Berliner Herzinfarktregister und Deutsches Herzinfarktregister - zeigen, dass diese Leitliniengerecht differenzierten Therapien zunehmend angewendet werden [63] [72] [110].

Anhand der bekannten Daten haben sowohl der Akute Myokardinfarkt wie auch der rezidivierende Myokardinfarkt weiterhin einen hohen Forschungsbedarf in Bezug auf adäquate Behandlungsmethoden [57].

Therapeutische Apherese werden seit vielen Jahren erfolgreich bei verschiedenen Erkrankungen aus den Bereichen Neurologie, Kardiologie, Nephrologie, Transplantationsmedizin oder Hämatologie eingesetzt, um das schädigende Agens (z. B. LDL, Lp(a), Auto-Antikörper, Fibrinogen, Immunglobuline) aus dem Körper zu entfernen und so den Krankheitsverlauf zum Teil erheblich positiv zu beeinflussen [46] [47] [59] [86] [94] [112].

In unterschiedlichen kardiologischen Forschungsarbeiten wurde bereits mehrfach die These aufgestellt und auch bestätigt, dass das C-reaktive Protein (CRP) einen entscheidenden Einfluss auf die Infarktausdehnung und somit auch auf die Kontraktilität des Myokards hat. Die Entfernung von CRP aus dem Blutkreislauf im Rahmen einer therapeutischen spezifischen CRP-Apherese nach akutem Myokardinfarkt könnte daher eine vielversprechende Möglichkeit sein, die Infarktgröße zu reduzieren und die damit verbundene Kontraktilität zu steigern [24] [95].

2.2 Definitionen

2.2.1 Koronare Herzkrankheit-KHK

Die koronare Herzkrankheit ist in der weiteren Fassung der Leitlinien eine Erkrankung der Koronararterien [17]. Durch Verengung bzw. durch Verschluss von einzelnen oder auch mehreren Koronargefäßen kommt es zu einem Missverhältnis zwischen Blutbedarf und Blutangebot und somit zu einer Hypoxie in den zu versorgenden myokardialen Arealen. Die Ursache hierfür ist häufig eine stenosierende Arteriosklerose der Koronargefäße. Durch den veränderten Zellstoffwechsel kommt es im Bereich der sklerotischen Läsionen zur Bildung von Plaques, Ablagerungen in der Gefäßwand.

Daraus können Arteritiden resultieren. Bei Rupturen dieser Plaques, die im Bereich der Intima, der inneren Gefäßwandschicht der vorgeschädigten Arterie, aufgelagert sind, kommt es in der unmittelbaren Folge zu Verschlüssen der entsprechenden Koronararterien mit anschließender Thrombose der betroffenen Bereiche [76]. Relative Koronarinsuffizienz kann durch kardiale bzw. ventrikuläre Hypertrophie, insuffiziente Anastomosen von Koronargefäßen, Verminderung des diastolischen Blutdruckes, Verkürzung der Diastole bei Tachykardie, Aortenklappenstenose oder auch Koronarspasmen verursacht werden [84]. Weitere Ursachen sind die Verminderung des O₂-Gehaltes durch z.B. Apnoe, CO-Intoxikation, akute Hämorrhagien mit Volumensubstitution oder auch Amyloidose. Zu den begünstigenden Faktoren für die Koronare Herzkrankheit zählen Übergewicht und falsche Ernährung, Bewegungsmangel, übermäßiger Alkoholkonsum, Rauchen, erhöhter Cholesterinspiegel, chronische Entzündungen (z.B. Parodontitis), Stress [15] [25] [68] [80] [108].

Darüber hinaus tragen auch nicht beeinflussbare Faktoren wie genetische oder familiäre Prädispositionen, Alter und Geschlecht zum Krankheitsbild der Koronaren Herzkrankheit bei.

2.2.2 Akutes Koronarsyndrom

Unter dem Begriff Akutes Koronarsyndrom werden die Phasen der Koronaren Herzerkrankung zusammengefasst, die unmittelbar lebensbedrohlich sind. Primäre Ursache der Koronaren Herzerkrankung ist die Arteriosklerose der Herzkranzgefäße. Durch Lipidablagerungen, Bindegewebe und Kalk in der Gefäßwand kommt es zur Lumeneinengung mit Beeinträchtigung der Blutversorgung zum Myokard. Akute Manifestationen der Koronaren Herzkrankheit in der klinischen Praxis sind:

- die instabile Angina pectoris
- der akute Myokardinfarkt sowie
- der plötzliche Herztod.

Da die Übergänge dieser klinischen Formen fließend sind, hat es sich in den letzten Jahren durchgesetzt, Patienten anhand des Elektrokardiogramm (EKG) in die Gruppen mit ST-Streckenhebung (STEMI) und ohne ST-Streckenhebung (NSTEMI) zu unterteilen [4] [5] [44].

2.2.3 Myokardinfarkt

2.2.3.1 Einteilung der Infarkte

Es wird grundlegend zwischen akutem und abgelaufenem Myokardinfarkt unterschieden. Als Voraussetzung für die Diagnose eines akuten Myokardinfarktes wird der Anstieg und/ oder Abfall eines kardialen Biomarkers mit mindestens einem Wert über dem oberen Referenzwert angesehen. Zusätzlich müssen für die Diagnose eines AMI entweder klinische Symptomatik, ischämietypische EKG Veränderungen, bildgebende Nachweise von avitalem oder hypokinetischem Myokard oder ein angiographisch oder autopsisch gesicherter intrakoronarer Thrombus vorliegen [33].

Die Einteilung aus sowohl pathologischer, anatomischer als auch diagnostischer Sichtweise kann unter Berücksichtigung

- der Ausdehnung in den Wandschichten
- des Versorgungsgebietes und
- der Veränderungen im EKG

erfolgen.

Die pathologisch-makroskopisch sichtbaren Ausdehnungen in den Wandschichten des betroffenen Gewebes wird in den transmuralen Infarkt (alle Gewebeschichten sind betroffen) und den subendokardialen Infarkt unterteilt [10]. Die Einteilung unter anatomischen Gesichtspunkten erfolgt nach dem Versorgungsgebiet der Koronararterien. Hierbei unterscheidet man zwischen dem Vorderwandinfarkt, entsprechend dem Versorgungsgebiet des Ramus interventricularis anterior (RIVA) der Arteria coronaria sinistra und dem Hinterwandinfarkt, mit dem Verschluss der Arteria coronaria dextra oder des Ramus circumflexus (RCX), der aus der Arteria coronaria sinistra entspringt [49] [50].

Eine ebenfalls mögliche Einteilung kann unter diagnostischer Berücksichtigung nach sichtbaren EKG-Veränderungen erfolgen. Die Zuordnung ist hierbei als STEMI (ST-elevation myocardial infarction), eine sichtbare Anhebung der ST-Strecke bzw. NSTEMI (Non-ST-elevation myocardial infarction) ein Infarkt ohne sichtbare ST-Streckenhebung bezeichnet [71].

Ein spezifisch hoher Status von Troponin (Tn) - T/I korreliert hierbei mit dem Infarktgeschehen [88] [89] [103].

Daher wurde die Bedeutung von Infarkten anhand von EKG-Veränderungen ebenfalls neu definiert.

Somit rückt in einer frühen Phase des Infarktgeschehens die Unterscheidung zwischen ST-Hebungsinfarkt -STEMI- und Nicht-ST-Hebungsinfarkt -NSTEMI- für eine zeitnahe Festlegung der geeigneten Therapie in den Vordergrund [22].

Darüber hinaus erlaubt auch diese Einteilung eine Einschätzung der längerfristigen Prognose [62].

2.2.3.2 Behandlungsformen des Myokardinfarktes

Als primäre invasive vs. primäre medikamentöse Behandlungsmethode stehen sich hier die percutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA) und die thrombolytische Therapie mit u.a. Streptokinase (Streptase[®]), ein thrombolytischer Wirkstoff aus der Gruppe der Fibrinolytika, zur Behandlung von Thrombosen und Embolien [1] [3] [11] [28] [33] und Alteplase (Actilyse[®]), einem ebenfalls thrombolytischen Wirkstoff aus der Gruppe der Fibrinolytika, der zur Behandlung des Herzinfarkts, der Lungenembolie und des Hirnschlags eingesetzt wird, als aktuellen Goldstandard gegenüber. Es handelt sich bei dem rekombinanten, gewebespezifischen Plasminogenaktivator um eine Serinprotease, die Plasminogen zu Plasmin überführt und zur Auflösung von Fibrin führt [2] [40] [65] [75].

Betablocker und/ oder Acetylsalicylsäure (ASS[®]) sind häufig eingesetzte Medikamente in der primären Behandlungsstrategie von akuten Myokardinfarkten [14] [105] [107]. Obwohl in Deutschland > 90 % der Myokardinfarkte invasiv, also durch Katheterintervention für die Rekanalisierung in Kombination mit Stent behandelt werden, ist dieser Anteil letztendlich von der vorhandenen Infrastruktur abhängig. Die Empfehlungen der Leitlinien geben hier ein Fenster von 120 Minuten für die Katheterinterventionelle Behandlung vor. Gerade in ländlichen Regionen ist dieses Zeitfenster oftmals nicht einzuhalten.

2.2.3.3 Reinfarkt und Reperfusionsschaden

Ein Re-Infarkt ist definiert als ein Myokardinfarkt, der innerhalb der ersten 28 Tage nach dem Indexinfarkt abläuft. Dieser stellt definitionsgemäß kein neues Infarktereignis dar. Als Kennzeichen eines Reinfarktes wird ein erneuter Anstieg von CK beobachtet [37]. Durch den Verschluss von Koronargefäßen kommt es zu einer Minderperfusion im

Versorgungsgebiet. Damit in Zusammenhang steht die einsetzende Gewebshypoxie. Der Zellstoffwechsel stellt sich von aerob auf anaerob um. Als Folge des gestörten Transports von Stoffwechselprodukten kommt es zu einer Kumulation von NADH, Laktat, CO₂, Acyl-CoA und Acyl-Carnitin. Dadurch ist die glykolytische ATP-Synthese blockiert bei gleichzeitiger Schädigung der Zellmembran, des sarkoplasmatischen Retikulums und der Mitochondrien [91]. Der Gradient der zellulären Na/ K-ATPase kann durch den ATP-Mangel nicht mehr aufrecht erhalten werden. Durch die nicht mehr vorhandenen Glycogenvorräte nach ca. 30 Minuten setzt der irreversible Zelluntergang ein. Es kommt zur einer Aktivierung des Komplementsystems bei gleichzeitiger Bildung von Hypoxiebedingten freien Radikalen. Über das geschädigte Endothel werden vermehrt Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) exprimiert. Die Folge ist eine verstärkte Granulozyten-Endothel-Interaktion mit Bildung von toxischen Sauerstoffmetaboliten und der Migration der Leukozyten in das periphere Gewebe [16] [32] [48].

Innerhalb der geschädigten Bereiche kommt es nach Wiedereinsetzen der Perfusion durch den nun wieder verfügbaren Sauerstoff zu Oxidationsreaktionen von freien Sauerstoffradikalen. Diese können durch Lipidoxidation die Zellmembran weiter schädigen. Das bereits geschädigte Areal kann so weiter expandieren. Dieser Umstand wird häufig als Reperfusionparadox bezeichnet [91].

2.3 Inflammation

2.3.1 Akute-Phase-Reaktion

Die Entzündung ist eine komplexe systemische Reaktion des angeborenen Immunsystems in vaskularisierten Geweben. Kardinalsymptome der Entzündung sind Rubor, Calor, Dolor, Tumor und functio laesa. Inflammationen führen zur Akkumulation und Aktivierung von Leukozyten und Plasmaproteinen an Orten von Infektion, Toxinexposition oder Zellverletzung. Inflammation wird durch Veränderungen der Blutgefäße ausgelöst, welche zur Leukozytenrekrutierung führt. Auch die lokale Immunantwort kann zu systemischen Entzündungsprozessen führen. Den protektivinflammatorischen Effekten, stehen gewebeschädigende Veränderungen gegenüber [8]. Während der Akute-Phase-Reaktion sind Makrophagen und Monozyten die wichtigsten Produzenten der proinflammatorischen Cytokine. Zu den eine Aktivierung des Komplementsystems auslösenden Cytokinen zählen Interleukine (IL)

wie das Interleukin-1, Interleukin-6, Interleukin-8 und Tumornekrosefaktor- α . Diese weisen ein Spektrum an Aktivitäten auf, um eine Immunantwort des Organismus bei Infektionen zu koordinieren. So aktivieren die Cytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α u.a. die Bildung von Akute-Phase-Proteinen wie CRP, Serumamyloid A, Haptoglobin, Fibrinogen, Transferrin und Albumin. Vor allem das Interleukin-6 stimuliert in den Hepatozyten die Produktion des Akute-Phase-Protein CRP [18] [51].

2.3.2 Biomarker

Biomarker sind Moleküle oder Strukturen, die z.B. in der Medizin oder Biologie als Indikatoren dienen. Charakteristische biologische Merkmale, die objektiv gemessen werden können und auf einen normalen biologischen oder pathologischen Prozess im Organismus hinweisen können [43].

2.3.2.1 CRP

Das C-Reaktive Protein, kurz CRP, ist ein ubiquitäres Plasmaprotein, das sowohl in Wirbeltieren als auch Wirbellosen zu finden ist. Trotzdem die Synthese in verschiedenen Organsystemen beschrieben wird, liegt der primäre Hauptsyntheseort in den Hepatozyten [36].

Erste Beschreibungen des Proteins wurden bereits 1930 aufgelegt. Darin wurde das Protein als eine Substanz im Serum von Patienten mit einer akuten Entzündung beschrieben, welche mit dem C-Polysaccharid der Zellwand von *Streptococcus pneumoniae* interagiert [102]. Diese beschriebene Fähigkeit der Interaktion ist gleichzeitig die Namengebende Komponente.

2.3.2.2 Struktur

Beim CRP handelt sich um ein Protein, bestehend aus 224 Aminosäure-Resten mit einem Molekulargewicht von rund 25 Kilodalton (kDa). Auf Grund seiner pentameren Scheibenförmigen Struktur, zusammengesetzt aus 5 identischen Untereinheiten, gehört CRP der Proteingruppe der Pentraxine an. (Abb. 2.1 auf der nächsten Seite)

2.3.2.3 Physiologie und Funktion

CRP ist, wie bereits beschrieben, ein Bestandteil des angeborenen Immunsystems und setzt humorale und zelluläre Abwehrmechanismen in Gang. Das C-Reaktive Protein als klassisches Akute-Phase-Protein (APP) wurde in Zusammenhang mit inflammatorischen Prozessen intensiv erforscht. Es gehört zu den Opsoninen, die das Komplementsystem aktivieren. CRP bindet dabei an Lysophosphocholin, dass nach der Spaltung aus Phosphocolin entsteht. Phosphocolin ist ein essentieller Bestandteil der Phospholipide von Zellmembranen. Dieser Vorgang ermöglicht es, dass CRP sich an

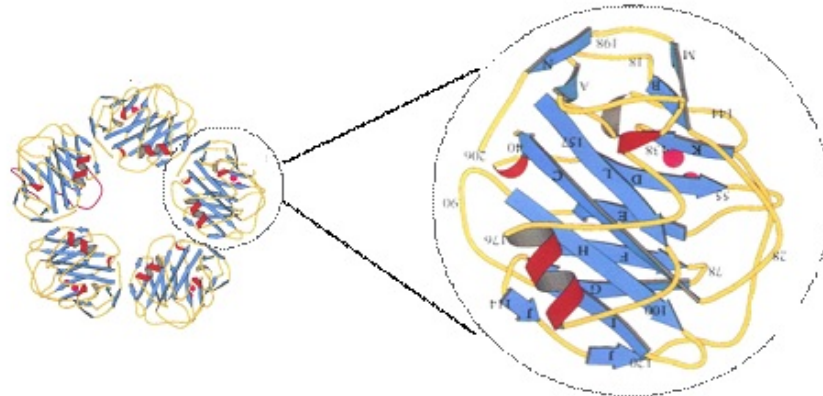


Abbildung 2.1: Pentamere Struktur von CRP Darstellung rechts: Calcium-Ionen sind als pinkfarbene Kreise dargestellt; Ausschnittsvergrößerung links: Struktur des Typ I Protomers von CRP mit Calcium-Ionen als Ausschnittsvergrößerung. Modifizierte Darstellung [96]

Bakterien und die Membranbestandteile defekter bzw. apoptotischer Zellen anlagert. Das gebundene CRP aktiviert den klassischen Weg der Komplementkaskade über die Antigen-/ Antikörperreaktion und wird von Makrophagen erkannt, die Rezeptoren für CRP exprimieren. Die Akute-Phase-Reaktion stellt eine schnelle aber trotzdem wenig spezifische Reaktion auf fast jede Art von Schädigung oder Infektion dar. CRP gehört neben weiteren Proteinen in die Klasse der löslichen Mustererkennungsrezeptoren (soluble pattern recognition receptor - PRR) [9] [52] [83].

Die Konzentration bei gesunden menschlichen Patienten liegt bei einem Serumspiegel $<1 \text{ mg/L}$ bzw. $0,1 \text{ mg/dL}$. Altersbedingt sind leichte Erhöhungen möglich [21] [61].

Der zeitliche Verlauf der CRP-Synthese im Zusammenhang mit dem akuten Myokardinfarkt bis zu einem messbaren Maximum liegt bei ca. 24-72 h nach der ersten Wahrnehmung von Brustschmerzen. Hierzu gibt es unterschiedliche zeitliche Aussagen, die sich jedoch alle im angegebenen Bereich von bis zu 72 h bewegen [26] [111].

Die Synthese von CRP wird am stärksten durch IL-6 innerhalb der Hepatozyten getriggert [30]. Interleukin-6 steht im lebenden Organismus dauerhaft, aber nur mit sehr geringer Halbwertszeit zur Verfügung. Daher ist es einfacher, das synthetisierte CRP zu messen, da dieses eine wesentlich verlängerte Kinetik aufweist. Die Halbwertszeit des im Organismus zirkulierenden CRP wird mit 19 h angegeben. Eine quantitative Bestimmung im Labor kann u.a. durch Verwendung von spezifischen

ELISA erfolgen [61].

Primäre Aufgaben des CRP sind die Modulation von systemisch entzündlichen Vorgängen und Gewebsschäden, die Abwehr mikrobieller Infektionen und die Markierung geschädigter Zellen nach apoptotischen und nekrotischen Vorgängen und damit verbundenen Stimulierung der Phagozytose. [39] [78] [81] [99].

Während des Myokardinfarktes kommt es durch den oxidativen Stress zu einem Untergang des betroffenen Gewebes. Trotzdem gibt es in diesem Bereich weitere, noch nicht untergegangenen Zellen. Der betroffene Bereich wird als area at risk (AAR) bezeichnet [87]. Kennzeichnend für diesen Bereich ist, dass er noch vitale, jedoch durch Energiedefizite hibernierende Zellen aufweist [69]. Die strukturelle Integrität der Zellmembran ist noch vorhanden. Durch den Energiemangel kommt es zu einer Konformationsänderung im Bereich der lipophilen Köpfe mit dem teilweisen Bruch der unpolaren Reste. Dadurch rotiert das polare Köpfchen und gibt eine Bindungsstelle für Pentraxine frei. (Abb.2.3 auf S.32)

Hier kann sich nun das vermehrt durch die Leber synthetisierte CRP anlagern. Ereignisse wie Infektionen aber auch Infarkte wirken als Trigger der Stimulation. Auf Grund der angeborenen Immunantwort kommt es zu einer Aktivierung des klassischen Weges mit einer Antigen- Antikörperkomplexbildung. Darüber kommt es zu einer ebenfalls erhöhten Synthese von C1q-Komplement. C1q besteht aus 2 miteinander verbundenen Strukturen, bestehend aus einem C-terminalen Ende und einem N-terminalen Ende, das wiederum die bindenden Strukturen der A,- B,- und C-Ketten enthält. (Abb.2.2 auf S.30)

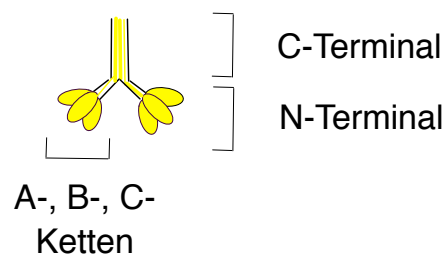


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung von C1q, und der bindenden Strukturen.

Jede der 3 schematisch dargestellten Ketten (im Bild 2.2 als A,- B,- und C-terminale Ketten bezeichnet) besteht aus einem Trimer. Dieses bindet an seinem C-terminalen

Ende u.a. auch CRP. Dadurch entsteht ein Komplex aus Membranmolekül, CRP und C1q. Dieser Komplex wird von eingewanderten Makrophagen im Infarktgebiet gebunden. Makrophagen verfügen über einen C1r/s Rezeptor, an dem das N-terminale Ende des C1q-Komplements anbindet [93]. (Abb.2.3 auf S.32)

C1q kann allerdings auch direkt an die Oberfläche von Krankheitserregern binden und den klassischen Weg so auch ohne die Hilfe von Antikörpern einleiten [29] Die Bindungsstelle ist ebenfalls für IgM, IgG, beta-Amyloidpeptide und andere Pentraxine verfügbar.

Während es auf dem Gebiet der Kardiologie zum Einfluss von CRP auf das Entzündungsgeschehen nach einem Akuten Myokardinfarkt bereits diverse Erkenntnisse gibt und in Versuchen am Tiermodell der Ratte gezeigt wurden, dass ein Zusammenhang zwischen CRP und Postinfarkt-morbidität und -mortalität besteht, sind Erkenntnisse über die Funktion des CRP bei respiratorischen Erkrankungen eher uneindeutig. In diesem Zusammenhang wird von einer möglichen Beteiligung bei der Opsonierung von infektiösen Noxen und beschädigten, energiedefizienten Zellen ausgegangen [23] [42] [58] [106].

Konsens gibt es jedoch bei der Rolle des CRP als Diagnostikum für sowohl infektiöse als auch inflammatorische Erkrankungen [21] [35] [45] [61].

Im Verlauf des akuten Myokardinfarktes steigt, wie bereits beschrieben, die CRP-Konzentration im Blut an. Kontroverse Diskussionen gibt es darüber, ob das CRP lediglich als Marker der Aktivierung des Komplementsystems [8] [27] zu betrachten sei oder ob es einen kausalen Beitrag zur Schädigung des Myokards nach AMI gibt [19] [42] [79] [82] [97].

2.3.2.4 Diagnostische Infarktmarker

Für die primäre Diagnostik des akuten Myokardinfarktes stehen neben der Elektrokardiographie die Analyse von Laborwerten zur Verfügung. Troponine bezeichnen Proteinkomplexe, die aus drei Untereinheiten bestehen und in Myozyten vorkommen. (Abb.2.4 auf S.33)

Die kardialen (c) Troponine (Tn) haben die Bezeichnung Troponin I (cTnI), Troponin T (cTnT) und Troponin C (cTnC). Hinsichtlich TnI und TnT existieren für jeden Muskeltyp gewebespezifische Isoformen, von TnC allerdings nicht [100].

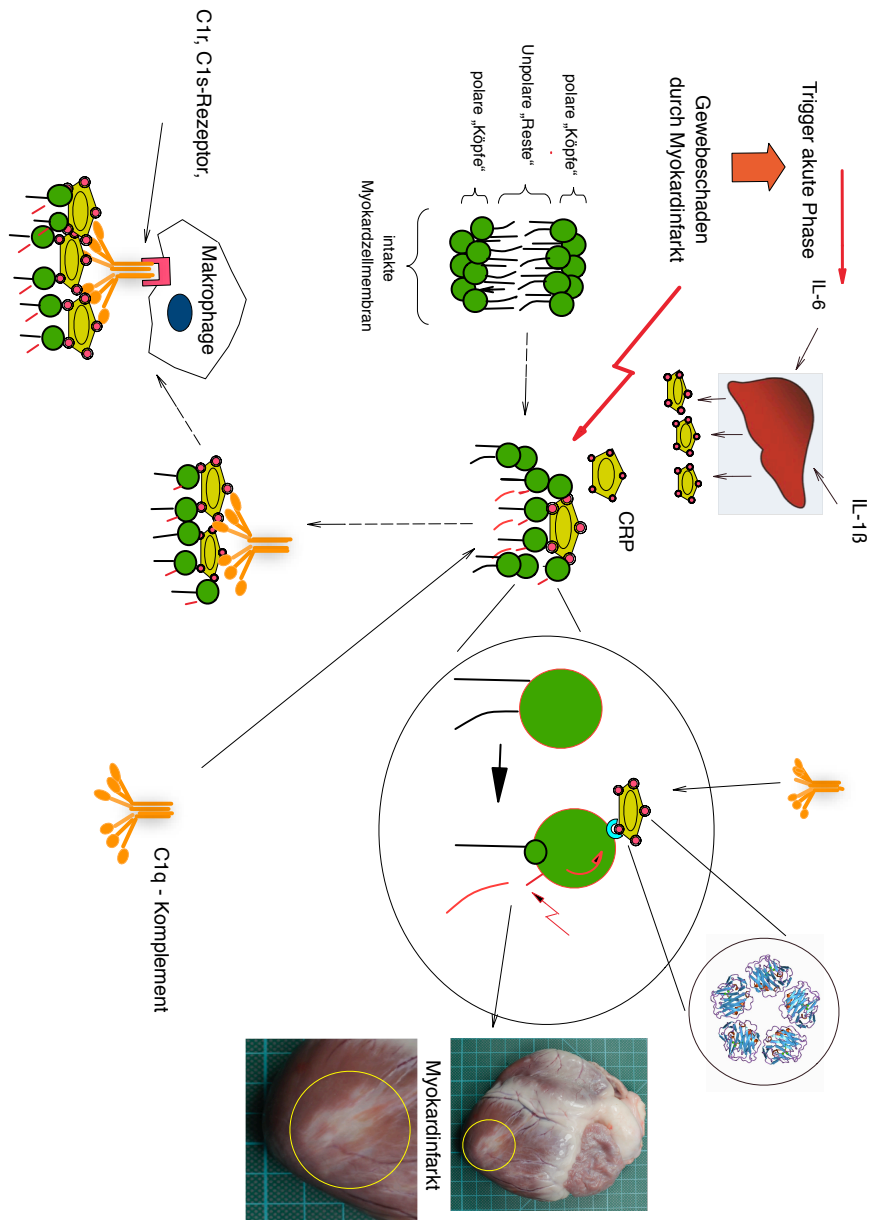


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der CRP-Synthese Die vermehrte Synthese wird durch den Myokardinfarkt getriggert. Anlagerung an die geschädigte Zellmembran mit folgender Opsonierung und Phagozytose.

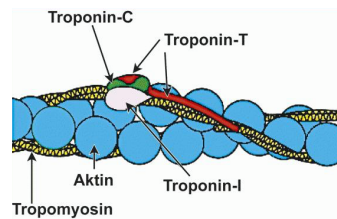


Abbildung 2.4: Troponinkomplex mit Untereinheiten als Bestandteil der kontraktile Struktur [77]. Mit freundlicher Genehmigung von Herrn Professor MM.Hirschl und dem Verlag Kraus & Pachernegg Wien, Austria

Als hochspezifischer und hochempfindlicher Diagnoseparameter wird das kardiale Troponin T/I gewertet. Troponine sind Bestandteil der kontraktile Strukturen der Muskulatur und weisen mit dem kardialen Troponin (Tnc) ein herzspezifisches Protein mit hoher Sensitivität auf. Eine Troponinerhöhung wurde daher in alle neuen Definitionen des Myokardinfarktes mit oder ohne ST-Streckenhebung eingeschlossen [4] [5].

Der größte Anteil der Troponine ist über Tropomyosin an die Actin-Filamente des Sarkomers der Kardiomyozyten gebunden. Ein kleiner Teil der Troponine liegt im gelösten Zustand vor. Bei irreversibler ischämischer Schädigung der Kardiomyozyten kommt es zuerst zu einer plötzlichen Freisetzung des Zytoplasmapools, gefolgt von einer durch die Zellyse bedingten, kontinuierlichen Freisetzung der myofibrillär gebundenen Troponine. Die Freisetzung beginnt bereits 3-6 h nach Ereigniseintritt, erreicht ihr Maximum nach ca. 12 Stunden und können für einen Zeitraum von etwa 14 Tagen vermehrt im peripheren Blut nachgewiesen werden. Trotz der Spezifität und Sensivität eignen sie sich jedoch durch Ihre lange Nachweisdauer weniger für prognostische Aussagen [20].

Differentialdiagnostisch können beim Vorliegen von erhöhten Troponin-Werten kardiale Ursachen wie Myokarditis, Herztrauma, Herzinsuffizienz oder Kardiomyopathien vorliegen. Nichtkardiale Ursachen schließen Niereninsuffizienz, Schlaganfall oder septische Patienten ein [54].

Die Creatinkinase als weiterer Laborparameter ist ein in den Muskeln und im Gehirn nachweisbares Enzym. Es überträgt die N-Phosphorylgruppe von Phospho-Kreatin auf Adenosindiphosphat. Dadurch kommt es zu einer Regeneration von Adenosintriphosphat als Energieträger und Signalmolekül [34] [41] [92].

Die Creatinkinase kann in 4 Isoenzyme unterschieden werden. Dabei findet die Verteilung in die Subtypen *MM*-Skelettmuskulatur, *MB*-Myokardmuskulatur,

BB-Gehirntyp und *MiMi*-für die Mitochondriale Creatinkinase Anwendung.

Für die Infarkt Diagnostik wird primär das CK-MB ausgewertet. CK-MB ist ein selektiver und empfindlicher Marker für reine Myokardschädigung. In der Spezifität sind die Troponine jedoch der CK-MB überlegen. Vorteilhaft gegenüber den Troponinen ist, dass nach einem akuten Ereignis der Anstieg 1-3 Stunden vor dem Troponin erfolgt, die CK-MB in der frühen klinischen Phase also deutlich sensitiver ist. Dies wirkt sich auch bei einem Reinfarkt aus, der mit der CK-MB auf Grund des deutlich schnelleren Absinkens und im Fall eines Reinfarktes deutlich schneller ansteigt, im Gegensatz zu Troponin rascher zu diagnostizieren ist.

Differentialdiagnostisch gilt es zu berücksichtigen:

Kardiale Ursachen: u.a. Myokarditis,

Nichtkardiale Ursachen: u.a. Muskelnekrosen, Muskeldystrophien, maligne Tumore, Hypothyreose, starke physische Belastung, Verletzungen.

Als weiterer diagnostischer Marker wird die Bestimmung von Myoglobin herangezogen. Untersuchungen über erhöhte Werte, die in einem Zusammenhang mit dem akuten Myokardinfarkt stehen könnten, wurden bereits 1977 durchgeführt [98].

Myoglobin ist ein Protein aus der Gruppe der Globine, die immer eine Sauerstoffbindende Hämgruppe enthalten. Das Vorkommen von Myoglobin ist auf Herz- und Skelettmuskulatur von Säugetieren beschränkt. Ein Anstieg der Myoglobinkonzentration im Blutserum kann auf eine Rhabdomyolyse hin deuten und kann ebenfalls als Indikator für einen Herzinfarkt gelten. In der Herzinfarkt Diagnostik gilt Myoglobin als schnellster sensitiver Parameter in der Frühphase des Infarktes, soweit andere Grunderkrankungen ausgeschlossen werden können. Entsprechend den aktuellen Richtlinien wird Myoglobin als Marker zur Diagnose muskulärer Schädigungen herangezogen [101].

Die Halbwertszeit beträgt 10-20 Minuten mit anschließender glomerulärer Filtration. Bei einem Myokardinfarkt steigt der Wert für Myoglobin innerhalb der ersten 1-2 Stunden an und erreicht das Maximum nach 4-6 h. Nach 12 bis 24 Stunden hat sich der Wert wieder normalisiert. Der Anstieg von Myoglobin ist unspezifisch und kann auch nach starken körperlichen Belastungen, bei Muskuloskelettalen Verletzungen, intramuskulären Injektionen, Polytrauma, chronischer Niereninsuffizienz oder Muskelerkrankungen stark erhöhte Werte aufweisen [90] [104]. (Abb.2.5 auf S.35)
Die Werte für Myoglobin werden in den Auswertungen zum Versuch nicht erhoben, da das Vorhandensein des induzierten Infarktes bekannt ist und somit nicht diagnostiziert werden muss.

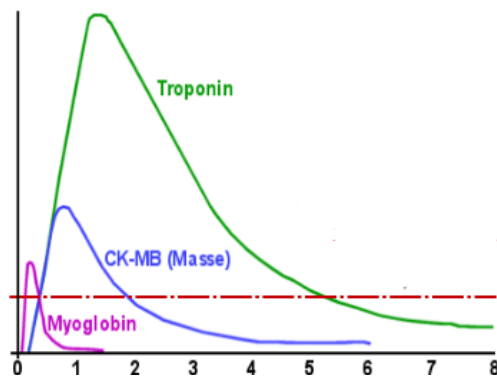


Abbildung 2.5: Vergleich der Infarktmarker im zeitlichen Verlauf.

Auf der Y-Achse sind Messbereiche dargestellt, die ein Vielfaches des oberen Normwertes erreichen. (Einheiten wurden auf Grund der unterschiedlichen SI-Einheiten nicht eingetragen.) Auf der X-Achse ist der Verlauf in Tagen dargestellt. Die horizontale rote Linie stellt die klinische Entscheidungsgrenze für die Diagnose eines Herzinfarktes dar. Modifizierte Graphik nach Jaannadha Rao Peela [31].

2.4 Zielsetzung

Mit der vorliegenden Arbeit soll die spezifische CRP-Apherese als mögliche zusätzliche Therapie des akuten Myokardinfarkts evaluiert werden. Basierend auf den progressiven Kenntnissen zu immunologischen Vorgängen und Reaktionen des Organismus auf endogene Noxe will die durchgeführte Studie die Behandlung auf immunologischer Ebene durch spezifische Reduktion von CRP als Entzündungsmarker und den damit sinkenden Einfluss auf die Folgen eines Postinfarktgeschehens nach akutem Myokardinfarkt überprüfen. Besondere Berücksichtigung in der durchgeführten Versuchsreihe finden hierbei die spezifische Reduktion von CRP, unabhängig zur tatsächlich ablaufenden Neusynthese. Die Ergebnisse der unterschiedlichen Behandlungsgruppen und die damit assoziierten Gewebsmodulationen werden im Vergleich evaluiert und dargestellt. Anhand der vorliegenden Arbeit soll der Einfluss auf die Narbenbildung durch Reduktion von zirkulierendem C-reaktivem Protein als Zellmarker für lethale aber auch für regenerationsfähige, „beschädigte“ Zellen nach einem akuten Myokardinfarkt im Tierversuchsmodell betrachtet werden. Wesentliche Hypothesen der Arbeit sind die mögliche CRP-Entfernung durch Apherese unter Verwendung eines spezifischen Adsorbers nach einem akuten Myokardinfarkt einerseits und ein dadurch sichtbarer Einfluss auf den Bereich des Reperfusionsschadens in Bezug auf Ausdehnung und Vitalität andererseits.

Kapitel 3

Material und Methoden

3.1 Studiendesign und Ablaufschema

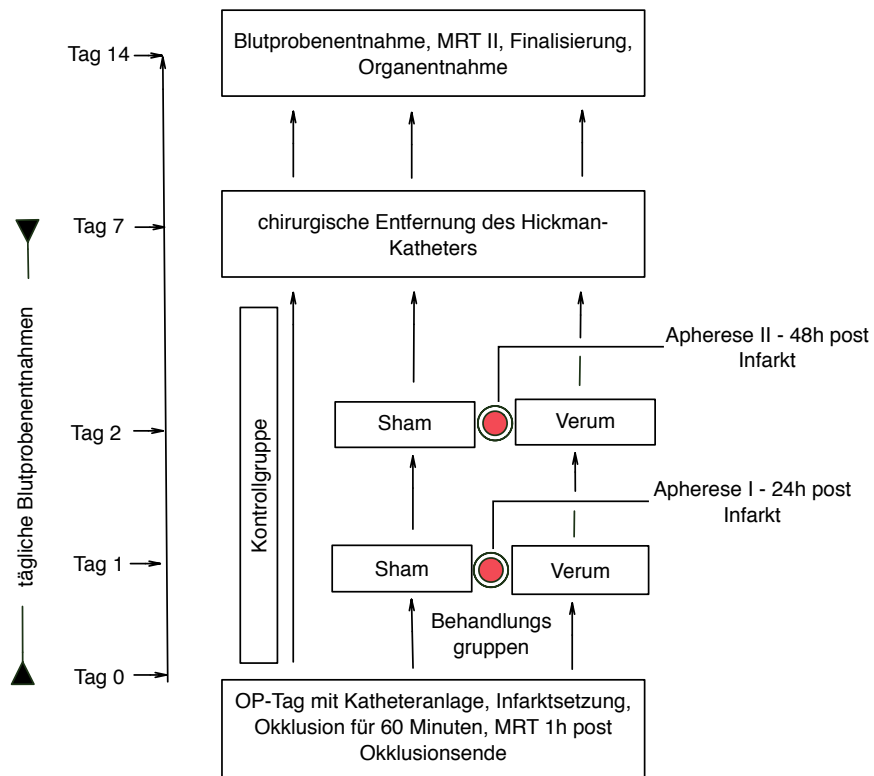


Abbildung 3.1: Darstellung des Studiendesigns in einem Ablaufschema. Die Einteilung in die jeweilige Versuchsgruppe erfolgt zufällig und zu gleichen Teilen.

3.2 Versuchstiere und Haltungsmethoden

Der Versuch orientiert am Versuch von Slagman et.al, wobei im Bereich der Anästhesie wesentlichen Modifikationen durchgeführt wurden. [97].

Für den Versuch wurden 38 junge, gesunde weibliche Schweine der Hybridrasse DW x (Deutsches Weideschwein) x DL (Deutsche Landrasse) eingesetzt. Der Versuch wurde beim LaGeSo Berlin (Landesamt für Gesundheit und Soziales) beantragt und unter der Versuchsnummer G 0256/11 genehmigt.

Bei allen eingesetzten Tieren handelte es sich um Landwirtschaftliche Nutztiere, die mit einem Ausgangskörpergewicht von ca. 33 kg - 37 kg von einem regionalen Schweinezüchter erworben wurden. Die Haltung der Tiere in der Versuchshaltung erfolgte entsprechend den gesetzlichen Bestimmungen und Vorgaben für die Versuchstierhaltung. Die Tiere wurden präoperativ in Gruppen von 3-4 Tieren gehalten. Wasser stand für alle Tiere ad libitum zur Verfügung. Die Tiere wurden 2x täglich mit pelletiertem Futter (Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG Lage, Deutschland) versorgt. Zusätzlich gab es Äpfel und Karotten. Das Hygienekonzept der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin, Charité Universitätsmedizin Berlin (FEM) sieht eine konventionelle Haltung von Hausschweinen auf durchgehend planbefestigtem Boden mit Einstreu einer Teilfläche vor. Die Tiere werden in den ersten drei Tagen nicht abgeduscht, um eine Besiedelung des Tierhaltungsraumes mit der Tier-(Bestands)spezifischen Keimflora zu ermöglichen. Die Tierhaltungsräume werden 2x täglich gemistet/gereinigt und 1x/wöchentlich, im rein/raus-Prinzip oder bei besonderem Bedarf im Projekt desinfiziert (InzidineTMN extra Ecolab Deutschland GmbH Monheim am Rhein, Deutschland bei Bedarf NeopredisanTMMenno Chemie-Vertrieb GmbH Norderstedt, Deutschland). Die Tiere stammen aus landwirtschaftlichen Nutztierhaltungen, vorzugsweise aus Muttersauen-Erzeugerbetrieben, da diese sehr gute Hygiene- und Gesundheitsprogramme haben. Außerdem handelt es sich hierbei stetes um Kreuzungszuchten, bei denen der Fokus auf Gesundheit und Belastbarkeit liegt und weniger auf den maximalen täglichen Wachstumsraten der Jungtiere. Es besteht ein regelmäßiger Austausch und Rückmeldung an den festen Lieferanten der FEM und ggf. direkt ansonsten über den Lieferanten an die Landwirte bzgl. der Tiergesundheit der gelieferten Tiere. Tiere, die bereits beim Ausladeprozess deutlich erkennbar für die Tierversuchsdurchführung relevant klinisch erkrankt sind, werden nicht angenommen. Es erfolgt stets eine gründliche adspektorische Untersuchung seitens der Tierpfleger während des Handlings und der Pflege auf mögliche, durch Bewegung und Spiel/

Beschäftigungsbelastung auslösbarer Symptome sowie der adspektorischen Untersuchung in Ruhe durch die Tierärzte des Versuchstierkundlichen Dienstes auf beginnende Symptomatiken von Erkrankungen, die noch durch Aufregung aller Art maskiert werden. Bei Zustandsänderung der Tiere, Verdacht auf Infektionserkrankungen oder einsetzenden Lahmheiten erfolgt eine weiterführende Untersuchung und Therapie in Absprache mit Versuchsleitern und Tierschutzbeauftragten sofern eine Nutzung der Tiere nach erfolgreicher Behandlung weder zu einer gesteigerten Belastung im Tierversuch führt noch die Durchführung und Aussagekraft des Versuches einschränkt oder sogar gefährdet. Die Untersuchung auf Parasiten erfolgt Halbjährlich. Dazu werden Sammelkotproben aus jeweils einem Raum der Tierhaltung entnommen. Stroh und Heu werden bei Lieferung und vor der Nutzung einer optischen und olfaktorischen Kontrolle unterzogen.

3.3 Versuchsvorbereitung/ Training der Tiere

Für die postoperative Blutentnahme war es von großer Bedeutung, den Tieren möglichst stressarm über einen zuvor intraoperativ gelegten Hämodialysekatheter einerseits Blut entnehmen zu können und andererseits notwendige Medikationen durchzuführen. Weiterhin musste so stressarm wie möglich die postoperative Analgesie in Form von Fentanylpatches aufgeklebt werden können. Jede neue Gruppe wurde dabei zeitlich gestaffelt mindestens 14 Tage vor Versuchsbeginn bereits in der Versuchseinrichtung eingestallt, um das Stressniveau möglichst gering zu halten und ein gering manipulatives Arbeiten am Tier zu ermöglichen. Um dieses zu gewährleisten, wurden die Tiere bereits am dritten Tag beginnend nach Ihrer Ankunft durch intensiven Kontakt mit den unmittelbar am Versuch beteiligten Veterinärmedizinerinnen desensibilisiert. Ein gut geeignetes Hilfsmittel zur Steigerung der Zutraulichkeit war hierbei die Gabe von Obststückchen und Zuckerwürfeln. Durch den täglichen Kontakt zu den Tieren konnten diese letztendlich stressfrei berührt und in geringem Maße manipuliert werden.

3.4 Gruppeneinteilung

Für den Versuch wurden 3 Gruppen gebildet. Alle Tiere, unabhängig von ihrer Gruppenzugehörigkeit erhielten einen Myokardinfarkt. Die Gruppen wurden im Verlauf entsprechend der Behandlungsformen in die Kategorien

1. *Kontrolle* – ohne additive Behandlung über die notwendige postoperative Intensivbetreuung hinaus
2. *Sham-Apherese* – hierbei wurden die Apherese ohne den spezifischen CRP-Adsorber durchgeführt und
3. *Verum-Apherese* – Durchführung der Apherese mit Einsatz des CRP-spezifischen Adsorbers,

eingeteilt. (Abb.3.1 auf S.37)

3.5 OP-Vorbereitung/ Prämedikation

Die Tiere wurden unmittelbar präoperativ für 12- 18 h Nahrungskarent bei freiem Zugang zu Wasser gehalten. Dieses entspricht den Empfehlungen der GV-SOLAS (Gesellschaft für Versuchstierkunde - society of laboratory animal science) [38].

Die Auswahl des Versuchstieres erfolgte bereits am Vortag und war vom gesundheitlichen Status und dem aktuellen Körpergewicht abhängig. Als Benchmark für das Körpergewicht wurde > 40 kg angesetzt. Die Prämedikation erfolgte intramuskulär und bestand aus einer Mischung aus Ketamin 10 %ig mit Xylazin 2 % und Stresnil. Zusätzlich wurde mit der Prämedikation Atropinsulfat als Parasympatholytikum zur Reduktion der Speichel- und Bronchialsekretbildung für die später folgende Endotrachealintubation injiziert. Die Dosierung erfolgte gewichtsabhängig. Über eine Trichtermaske wurden die Tieren mit 100 %igem Sauerstoff im Flow unter Pulsoxymetrischer Überwachung präoxygeniert.

Alle verwendeten Medikamente sind in tabellarischer Form zusammengefasst. (Tab.3.1 auf S.41)

Während der OP-Vorbereitung wurde zunächst ein venöser Zugang über eine geeignete periphere Vene nach Säuberung und Desinfektion der Punktionsstelle gelegt. Über diesen Zugang wurden dann sowohl Volumen (Vollelektrolytlösungen - Sterofundin[©]), die prä- und postoperative Antibiose Unacid[©] und nach dem Wechsel des Narkoseregimes die TIVA appliziert. Für die endotracheale Intubation wurden 2- 3mg/ kg Propofol 2 %ig streng i.v. injiziert. Unmittelbar darauf wurde noch Fentanyl-Injektionslösung[©] in der Dosierung von 0,3- 0,5 µg/ kg intravenös dosiert. Fentanyl als stark wirksames Analgetikum redziert in dieser Verwendung den Intubationsreiz. Nach Abflachung der Atmung wurde unter Sichtkontrolle mit einem

Tabelle 3.1: Verwendete Medikamente für Prämedikation, Einleitung, Aufrechterhaltung der Narkose, Analgetika und Antibiotika

Medikament	Verwendung	Dosierung	Hersteller
Atropin	Prämedikation	0.03mg/ kg	B.Braun Melsungen AG Melsungen, Germany
Azaperon	Prämedikation	3mg/ kg	Janssen Animal Health Beerse, Belgium
Ketamin 10%	Prämedikation	25mg/ kg	Serumwerk Bernburg Sachsen-Anhalt, Germany
Xylazin 2%	Prämedikation	3,7mg/ kg	CP Pharma Handelsgesellschaft GmbH Burgdorf, Deutschland
Unacid [©]	Antibiose	2x 1,5g	Pfizer Pharma PFE GmbH Berlin, Deutschland
Propofol 2%	Narkoseeinleitung	2- 3µg/ kg	B.Braun Melsungen AG Melsungen, Germany
Fentanyl Injektions- Lösung	Narkoseeinleitung Analgesie	0,3- 0,5µg/ kg	Janssen Animal Health Beerse, Belgium
Durogesic [©]	Analgesie	75 µg	Janssen-Cilag GmbH Neuss, Germany
Bepanthen [©] Augensalbe	Antiexsikkativ		Bayer Vital GmbH Leverkusen, Deutschland
Forene [©]	Anästhesie	1,3- 1,5 Vol. %	Baxter Healthcare Corporation Deerfield IL, USA
Veracin	Antibiose	0,04ml/ kg	Albrecht GmbH Aulendorf, Germany
Heparin	Antikoagulanz	10.000I.E.	Rotexmedica GmbH Arzneimittelwerk Trittau, Germany
ASS	NSAR	100mg/ d	Bayer AG Leverkusen, Deutschland

langen Intubationsspatel nach Miller mit integrierter Lichtquelle intubiert. Das volatile Anästhesiegas Isofluran[©] mit 1,3–1,5 Vol. % zusätzlich mit Sauerstoff/Raumluftgemisch im 75/25 Verhältnis eingeleitet. Es erfolgte eine volumenkontrollierte Normoventilation. Für die Beatmung wurde ein Narkosegerät Dräger Cato[©] eingesetzt. In Abhängigkeit vom expiratorischen CO₂ Wert, zwischen 35 und 38 mmHg, wurde das Verhältnis von Tidalvolumen und Atemfrequenz unter Analyse der Blutgase angepasst. Individuumassoziierte Schwankungsbreiten sowohl nach oben (> 38 mmHg) als auch nach unten (< 35 mmHg) waren sichtbar. Dieses hatte keinen Einfluss auf die Narkose oder die Versuchsdurchführung. Eine Magensonde wurde gelegt und in die Augen zum Schutz vor Exsikkation Bepathen[©] eingebracht. Auf Grund der mehrstündigen Narkoseführung und der notwendigen Flüssigkeitsbilanzierung wurde die Harnblase katheterisiert und ein Urinmessbehälter angeschlossen. Die folgende Instrumentierung erfolgte unter sterilen OP-Bedingungen.

3.6 Anästhesie

Alle verwendeten Materialien für die Durchführung und das Monitoring der Anästhesie wurden in Tabelle 3.2 auf Seite 43 zusammengefasst.

Zusätzlich wurde bereits in der Einleitungsphase ein Fentanylpflaster Durogesic[©] mit 75 µg Wirkstoffkonzentration im axillaren Bereich des Humerus aufgebracht, um so ein Anfluten des Wirkstoffes bis zum Erreichen der Wirkschwelle nach ca. 12 h zu ermöglichen. Das Tier wurde in Rückenlage gebracht und unter manueller Kontrolle nach erfolgter Reinigung und Desinfektion ein arterieller Zugang in Seldinger Technik mit einer Veneverweilkanüle Vasofix[©] im Inguinalbereich der Arteria femoralis für die invasive Blutdruckmessung und notwendiger Probenentnahmen zur Blutgasanalyse gelegt. Der Zugang wurde mit Leukotape[©] fixiert. Das Monitoring zur Überwachung von Vitalfunktionen wurde angeschlossen. Im einzelnen wurden überwacht:

- Sauerstoffsättigung
- CO₂ Konzentration
- Körpertemperatur (via Oesophagussonde)
- Zentralvenöser Druck
- Systolischer, Diastolischer und Mittlerer Arterieller Druck
- EKG

Tabelle 3.2: Materialien der Anästhesie für die volatile Narkose, TIVA, Monitoring, Volumenkontrolle und Hämodialysekatheter.

Material	Verwendung	Hersteller
Vasofix [©]	peripherer Venenzugang	B.Braun Melsungen AG Melsungen, Germany
Nellcor [®] Dura Y	Messclip periphere O ₂ -Sättigung	Medtronic Minneapolis MN, USA
HP 5000 Module	Überwachung Narkose	Hewlett-Packard Pablo Alto CA, USA
Hi-Lo [©]	Endotrachealtubus	Malinckrodt Pharmaceuticals Dublin, Ireland
Cato [©]	Narkosegerät	Drägerwerk AG & Co.KGaA Lübeck, Deutschland
Radiometer ABL 800	Blutgasanalyse	Radiometer Copenhagen, Denmark
Rüsch-Katheter	Blasenkatheter	Telflex Medical Europe Ltd. Athlone, Ireland
UM 500 [©]	Urimeter	Sarstedt AG & Co. Nürnbrecht, Deutschland
Hickman [©]	Doppellumen-Hämodialysekatheter	BARD Peripheral Vascular Inc. Tempe AZ, USA
Vicryl [®] -2.0	chirurgischer Faden	Ethicon LLC Cincinnati OH, USA
Prolene [®] -2.0	chirurgischer Faden	Ethicon LLC Cincinnati OH, USA
Perfusor [©]	Spritzenpumpe	B.Braun Melsungen AG Melsungen, German
Perfusor [©]	Spritze 50 mL	B.Braun Melsungen AG Melsungen, German

Die Anästhesie wurde balanciert mit einer Isoflurankonzentration von 1,3- 1,5 Vol% als Zielwert und nach Wirkung durchgeführt. Es erfolgte eine Volumenkontrollierte Normoventilation. In Abhängigkeit zum expiratorischen CO₂ Wert (zwischen 35 und 38 mmHg) wurde das Verhältnis von Tidalvolumen und Atemfrequenz nach Blutgasanalyse angepasst. Eine Magensonde wurde eingeführt. In die Augen wurde zum Schutz vor Exsikkation eine Augencreme eingebracht. Auf Grund der mehrstündigen Narkoseführung und der notwendigen Flüssigkeitsbilanzierung wurde die Harnblase katheterisiert und ein Urinsammelbehälter angeschlossen. Zusätzlich zum Narkosegas wurde eine permanente Analgesie mit Fentanyl via Spritzenpumpe gestartet. Die Fentanyllösung wurde in einer Verdünnung mit NaCl 0,9 %ig im Verhältnis 1:5 eingesetzt. Die folgenden Instrumentierung erfolgte unter sterilen OP-Bedingungen

3.7 Instrumentierung

Vor Inzision wurde ein weiterer Bolus von 2 mL Fentanyl-Injektionslösung langsam intravenös appliziert. Die Inzision erfolgte anschließend im Bereich des musculus sternocleidomastoideus, ausgehend 2 Fingerbreit vom Sternum in cranialer Richtung. Nach Durchtrennung des Hautmuskels wurden die Gefäße der Vena jugularis externa und der Arteria communis lateralis unter Schonung der umgebenden Strukturen präparativ dargestellt und eine vena sectio durchgeführt. Jeweils am cranialen und am caudalen Ende der Präparation eine Ligatur vorgelegt. Die Vene wurde im Bereich der Adventitia unter möglicher Einbeziehung der Tunica media fixiert und anschließend wenig inzisiert. Gleichzeitig wurden die vorgelegten Ligaturfäden gestrafft, um ein retrogrades Auslaufen der Vene zu verhindern.



Abbildung 3.2: Doppelluminger Hämodialysekatheter
Hickman[©] zur gleichzeitigen Entnahme und Rückgabe von Blut aus einem großlumigen peripheren Gefäß.

Der vorbereitete sterile und mit NaCl-Lösung vorgespülte Hickman[©]-Doppellumen-Hämodialysekatheter (Abb.3.2 auf S.44) wurde nun in die Vene eingeführt und eine Ligatur vorsichtig bis zur Abdichtung der Gefäßwand am Dialysekatheter vorgelegt. Der craniale Anteil der Vena jugularis wurde komplett legiert. Die Lagekontrolle des Katheters erfolgte nochmals radiologisch. Anschließend wurde der Katheter mit NaCl gespült und temporär verschlossen. In die zuvor freigelegte Arteria carotis communis wurde unter Sichtkontrolle eine Arterielle Schleuse ArrowFlex[©] mit der Seldinger-Technik gelegt. Ein rotierendes Hämostaseventil wurde konnektiert.

Der zum Beginn eingesetzte Hämodialysekatheter wurde nun in 2 Schritten durch subcutane Tunnelung von ventral nach dorsal um den Hals herumgeführt und trat später im Bereich der Scapulae caudodorsal aus. Nachdem der erste Hilfsschnitt für die Tunnelung an der lateralen Halswand erfolgte und der Katheter hier austrat, wurde intrasectio noch einmal Veracin[©] appliziert, die Wunde der Sectio chirurgisch in mehreren Schichten verschlossen und mit einem Wundverband abgedeckt. Der Katheter wurde nun in einem zweiten Schritt caudodorsal medial der Scapulae ausgeführt und befestigt. Die Enden des Katheters wurden in einer extra hergestellten und auf dem Rücken mit 4 Hautheften zuvor befestigten Stofftasche überdeckt und die Tasche mit geeignetem Klebeverband und unter Polsterung der Katheterenden mit Zellfiess abgedeckt.

3.8 Infarktinduktion

Alle anschließenden, mit dem Infarktmodell in Zusammenhang stehenden Maßnahmen wie Katheterisierung, Angiographie und Infarktinduktion wurden durch Kardiologen des DHZB durchgeführt. (Materialien in Tabelle 3.3 auf Seite 46.)

Über die zuvor angelegte arterielle Schleuse erfolgte die Koronarkatheterisierung und die temporäre Ballonokklusion mit okkludierbarem Dilatationskatheter. Unter radiologischer kontrastmittelgestützter Bildgebung wurde der Katheter bis zum 2ten Seitenast des RIVA (Ramus interventricularis anterior) vorgeführt. (Abb.3.3 auf S.47) Das Gefäß wurde nun durch Inflation des Ballonkatheters okkludiert. (Abb.3.4 auf S.47) Die Ausnahme hiervon waren 2 Tiere, bei denen der 3te Seitenast temporär verschlossen wurde, da der 2te Seitenast nur marginal ausgebildet und daher nicht für die Okklusion zur Infarktinduktion geeignet war. Die Okklusion blieb nun für 1h aufrecht. Nach dieser Zeit wurde der Gefäßverschluss geöffnet und eine weitere

Tabelle 3.3: Materialien für Infarzierung

Material	Verwendung/ Größe	Hersteller
ArrowFlex [©] Arrow	Arterielle Schleuse 8,5 F	Teleflex Medical Europe Ltd. Athlone, Ireland
Hämsotaseventil -rotierend-	0,115"	Abbot Vascular Santa Clara CA, USA
Führungsdraht	0,0014"	Abbot Vascular Santa Clara CA, USA
Sequent [©] Rapid Exxchange PTCA-Katheter	Dilatationskatheter	B.Braun Melsungen AG Melsungen, Germany
Ultravist [©] 120	Kontrastmittel	Bayer AG Pharmaceuticals Berlin, Deutschland
BD	Röntgen C-Bogen	Phillips Healthcare Best, Niederlande

angiographische Kontrolle zur Überprüfung einer Reperfusion im zuvor verschlossenen Bereich durchgeführt. Anschließend wurde die arterielle Schleuse entfernt und das Gefäß legiert.

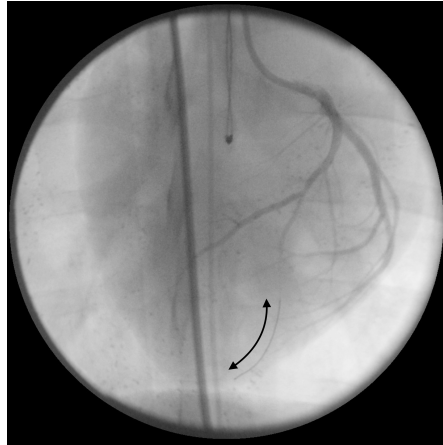


Abbildung 3.3: Angiographie der linksseitigen Herzgefäßstruktur mit Darstellung des RIVA mit vorgelegtem Führungsdraht im Bereich des Seitenastes – apikal als regelmäßig längliche Struktur erkennbar und durch einen Verlaufspfeil im Bild markiert

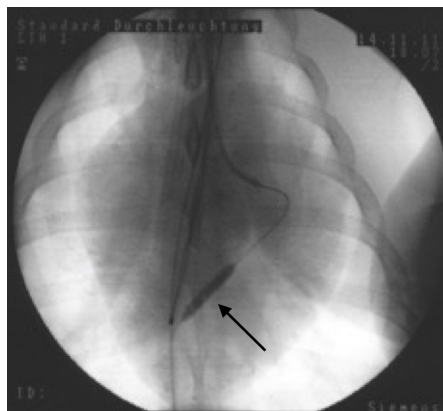


Abbildung 3.4: Angiographie mit Okklusion des 2ten Seitenastes des RIVA zur Infarktinduktion – im zentralen Bildausschnitt als zylindrische Struktur erkennbar und durch einen Pfeil markiert.

3.9 Wechsel des Anästhesieregimes

Zur vergleichbaren Darstellung des Infarktareals iim Bezug zum Verlauf und zur Behandlungsgruppe wurde am OP-Tag und am Tag 14 post-OP ein MRT-Scan mit

verschiedenen Darstellungssequenzen durchgeführt. Für den Transport zum MRT wurde das Anästhesieregime von Inhalationsnarkose auf eine intravenös applizierte Anästhesie (TIVA) umgestellt, da zum Zeitpunkt der Studie kein geeignetes MRT-taugliches Narkosegerät zu Verfügung stand. Es erfolgte ein Wechsel auf eine Mischanästhesie aus Ketamin (20-40 mg/kg/h und Propofol in der Dosierung 0,1-0,2 mg/kg/min. Weiterhin wurde Fentanyl als Analgetikum dauerhaft über eine Spritzenpumpe perfundiert. Während des Transportes zum MRT und während der Durchführung des MRT wurde entsprechend den letzten Einstellungen am Narkosegerät mit einem Beatmungsbeutel (Ambu[©]-Beutel) unter Kontrolle der Sauerstoffsättigung manuell ventiliert.

3.10 MRT

Das Fehlen einer MRT-tauglichen Beatmungseinheit wurde durch manuell frequente Beatmung mit einem Beatmungsbeutel (Ambu[©]-Beutel) ausgeglichen. Zur Verbesserung der Oxygenierung war der Beatmungsbeutel über eine Verlängerung mit einer Sauerstoffquelle mit 100 % O₂ verbunden. Die Sauerstoffsättigung wurde über eine MRT-geeignete, und an der Rüsselscheibe befestigte Messsonde kontrolliert. Die zur Umsetzung der MRT-Sequenzen notwendige Apnoe wurde einerseits durch kurzzeitiges Aussetzen der Beatmungsunterstützung und andererseits durch eine gezielte Überdosierung von Narkotika erreicht. Hierfür wurde Propofol via Perfusor[®] Spritzenpumpe über den zeitlichen Verlauf adaptiv erhöht. Über zuvor aufgeklebte, MRT geeignete EKG-Elektroden, Kendall[©] COVIDIEN (Medtronic Minneapolis MN, USA) wurde durch Anlegen einer bipolaren Ableitung nach Goldberger die Herzaktivität überwacht. Für kardiologische Notfälle waren Katecholamine (Epinephrin-Suprarenin[©], Noradrenalin-Arterenol[©] Dobutamin-Dobutrex[©] und Antiarrhythmika-Lidocain (B.Braun) und Amiodaron-Cordarex[©] vorbereitet.

3.10.1 MRT/ Bilderfassung

Die MR-tomographischen Untersuchungen wurden an einem Philips 1.5 Tesla Achieva (Philips Healthcare Best, Niederlande) durch die Medizinisch technischen Assistenten (MTA) und Kardiologen des DHZB durchgeführt. Für die Festlegung der anatomischen Achsen wurden Echtzeitbilder unter andauernder Beatmung erzeugt. Anschließend wurden Cine-Bilder (TR 3.7 ms, TE 1.7 ms, 30 Phasen) in Kurz- und Längsachsen

(2-, 3- und 4 Kammerblick) unter Apnoe gewonnen. Die Bilder der Kurzachse deckten den Bereich des linken Ventrikel beginnend von der Klappenebene bis zur Ventrikelspitze ab. Die Schnittdicke der einzelnen Schichten war lückenlos mit 7 mm justiert. Eine kontrastmittelbasierte Sequenz zur verbesserten Darstellung der Infarktzone wurde anschließend, 10 Minuten nach intravenöser Gabe von Gadolinium-DTPA, durchgeführt. Dabei wurden die gleichen Parameter in Bezug auf Lokalisation und Schichtdicke wie in der Cine-Bilddarstellung (TR 7.1 ms, TE 3.1 ms, Matrix 256 x192) angewandt. Die Inversionszeit TI als technischer Parameter zur Gewebegewichtung in der Darstellung wurde individuell justiert um einen optimalen Kontrast zwischen gesundem und infarziertem Myokard zu erreichen. Die Auswertung der MRT-Bildsequenzen erfolgte am DHZB. Dafür wurde eine spezielle Software für kardiovaskuläre MRT-Daten (CMR42 cardiovascular post-processing software for viewing and analyzing CMR images, Circle cardiovascular Imaging Inc. Calgary, Canada) eingesetzt. Nach der Zuordnung der endokardialen und epikardialen Konturen wurden die betroffenen Areale innerhalb des Myokards zunächst manuell umrissen und in der Folge durch die Software dargestellt. Dabei basierte die Darstellung auf einer nutzerspezifischen Vorgabe des Schwellenwertes oberhalb der doppelten Standardabweichung des normalen, unveränderten Myokardsignals. Die markierten Bereiche mit hohem Signalaufkommen wurden quantifiziert und in Bezug zum Volumen der jeweiligen ausgewerteten Schicht gesetzt. Für eine Berechnung der Infarktmasse wurde das spezifische Gewicht von Myokard (1.05) mit dem errechneten Volumen multipliziert. Für die Bewertung der LVEF wurden die Konturen der Enddiastole und der Endsystole herangezogen. Die dargestellten Papillarmuskel und sichtbaren Trabekel wurden in die Berechnung der Linksventrikulären Masse und des Volumens eingeschlossen.

3.11 Aufwachphase

Unmittelbar nach den durchgeführten Untersuchungen wurden die Tiere in eine speziell angefertigte und ausgepolsterte Intensivbox verbracht. Hier wurde additiver Sauerstoff eingeleitet und auf die thermische Normalisierung der Tiere durch zusätzliche Wärmequellen geachtet. Wasser stand ad libitum zur Verfügung. Diese Verfahrensweise war nötig, da die Tiere der Behandlungsgruppen in den darauffolgenden 48 h nach Initiierung des Primärfarktes im Abstand von 24 h entsprechend ihrer Versuchsgruppenzugehörigkeit durch Apherese bzw. Shamapherese behandelt wurden. Durch die Intensivbox stand eine kontrollierte Umgebung für die Aufwachphase als

Voraussetzung für die sich anschließenden Behandlungen und den damit verbundenen weiteren Narkosen für die Tiere zur Verfügung. Die Tiere der Kontrollgruppe wurden am folgenden Morgen nach veterinärmedizinischer Untersuchung auf den Gesundheitszustand und der Blutentnahme und anschließender Medikation eine mit Stroh ausgepolsterte Box gebracht.

3.12 Versuchsgruppen

3.12.1 Standardsituation

Für alle Tiere wurde, unabhängig Ihrer Gruppenzuordnung, die gleiche wie in den Abschnitten 3.4 bis 3.8 auf den Seiten 39ff. beschriebene Vorgehensweise durchgeführt. Ebenso galt für alle Tiere die partielle Entfernung des Hämodialysekatheters am Tag 7 postoperativ in Narkose. Die am Ende des Versuchszeitraumes nach 14 Tagen post-OP durchgeführte 2te MRT-Untersuchung war ebenfalls standardmäßig für alle in den Versuch eingeschlossenen Tiere angelegt. Über den Versuchsverlauf sind alle Tiere täglich entsprechend den Vorgaben der Versuchsbeantragung beurteilt worden. In Absprache mit den Tierpflegern der Einrichtung wurden täglich die aktuelle Stoffwechselsituation und das Verhalten der Tiere eingeschätzt, um so frühzeitig auf mögliche Änderungen des Gesundheitszustandes zu reagieren. Zusätzlich wurden die Ergebnisse der täglichen Blutuntersuchungen zur Beurteilung des gesundheitlichen Status ausgewertet. Gesundheitliche Veränderungen, die eine Fortführung des Versuches aus tierschutzrechtlichen Gründen nicht zulassen, wurden in den Abbruchkriterien zum Versuchsantrag definiert und bei den täglichen Kontrolluntersuchungen beurteilt.

3.12.2 Kontrollgruppe

Alle Tiere der Kontrollgruppe erhielten die notwendige postoperative Intensivbetreuung und tägliche Erhebung und Dokumentation des Gesundheitszustandes. Darüber hinaus wurden die Tiere keinen weiterführenden Behandlungen unterzogen. Behandlungen zum Erhalt des gesundheitlichen Status quo wurden bei Notwendigkeit nur dann angesetzt, wenn es durch den etwaigen Einsatz von Medikamenten zu keiner absehbaren Beeinträchtigung des Versuchsverlaufes bzw. des Versuchsergebnisses kam.

3.12.3 Sham-Apherese Gruppe

Die Durchführung der Apherese erfolgte in Unterstützung durch Dialyseschwestern der Charité. Alle Tiere der Sham-Apherese Gruppe wurden im Verlauf am ersten postoperativen Tag nach Infarzierung zur 2maligen Sham-Apherese im Intervall von 24 h an das Apheresesystem angeschlossen. Für die Sham-Apherese, also ohne Verwendung eines spezifischen CRP-Adsorbers, wurde ein Primärsystem mit einem Filter zur Plasmafiltration verwendet. Als Primärsystem wurde ein BM11[©] – Blood Monitor Pump (Baxter Healthcare Corporation Deerfield IL, USA) zur Plasmaseparation eingesetzt. (Abb.3.5 auf S.52) Zufüsse vom Tier zur Maschine und vice versa wurden über den implantierten Doppellumigen Hämodialysekatheter realisiert. Ein Gesamtplasmavolumen von 6000 mL wurde herausgefiltert und im Kreislaufverfahren rezirkuliert. Damit wurde die Gleichheit der Behandlung für die beiden Behandlungsgruppen in der Gesamtmenge des zu prozessierenden Plasmas simuliert. Für die Behandlung wurden die Tiere entsprechend der Medikation und Dosierung vom Vortag (Xylazin, Ketamin, Azaperon, Atropin) über den am Vortag implantierten Hämodialysekatheter zur Einleitung der Narkose mediziert. Zuvor wurden aus dem Katheter Blutproben für die Bestimmung von Blutparametern entnommen, nachdem die ersten 5 mL des entnommenen Blutes verworfen wurden. Eine Vermischung des Probenblutes mit dem Natriumcitrat des Katheterblocks hätte zur Fehlinterpretation der Proben geführt. Nach Transport zum OP-Bereich wurden alle für die Überwachung der Vitalparameter notwendigen Sensoren angelegt. Eine Beschreibung der überwachten Vitalparameter wurde bereits im Abschnitt 3.5 *OP- Vorbereitung/ Prämedikation* ab Seite 40 ausführlich gegeben. Das Narkoseprotokoll war äquivalent zur TIVA für die Durchführung der MRT-Sequenzen angelegt. Dieses Narkoseprotokoll wurde ebenfalls am Folgetag für die Behandlung 48 h nach Infarzierung eingesetzt. Abweichend von den Versuchen von Slagman et al. [97], hier wurde den Tieren nach dem Abschluss der Behandlung 500 mL Aminosteril N-Hepa 8 % (Fresenius Kabi) zum Ausgleich des Energiedefizits intravenös infundiert, wurde den Tieren in den aktuellen Versuchen über eine Magensonde enteral zusätzlich hochkalorische Nährlösung verabreicht. Dieses Vorgehen ist aus der Tatsache entstanden, dass es durch die Häufigkeit der Narkosen in sehr engen Zeitabständen mit jeweils vorrausgehender Nahrungskarenz zur Unterversorgung mit Nährstoffen kommt und ein andauerndes Energiedefizit zu einer Beeinträchtigung der Versuche führen könnte. Für die Berechnung der notwendigen Energiezufuhr wurde die Wachstumsrate von Mastläuferschweinen zugrunde gelegt. Eine tägliche Gewichtszunahme in der Masthaltung von 800 g für Mastschweine wurde berücksichtigt [56]. Für den Ausgleich



BM11–Baxxter als Filtersystem zur Plasmaseparation



ADASorb[©] medicap als Sekundärgerät zur Plasmabehandlung

Abbildung 3.5: Primärgerät BM11 und Sekundärgerät ADASorb[©]

des Energiedefizites ist Fresubin[®] (Fresenius Kabi Fingal Bay Balbriggan, Co. Dublin, Ireland) eingesetzt worden. 1 Liter der Lösung deckte einen Kalorienbedarf von 2000 kcal. Die Gesamtmenge wurde über den Verlauf der 5-6 stündigen Apherese appliziert. Anhand der stündlich durchgeführten Blutgasanalysen (BGA) wurde die Auswirkung der enteralen Nahrungssubstitution überprüft.

Für die Erstellung eines CRP-Profiles zur Überprüfung der in-house-Laboraauswertungen wurden aus dem Speicherhalter der Maschine für separiertes Plasma im Verlauf der Behandlung jeweils nach 1 Liter behandeltem Plasmavolumen 20 mL des Filtrates entnommen und für anschließende Diagnostik aliquotiert. Im Anschluss an die Behandlung wurden die Tiere noch im OP-Bereich nach Einsetzen der frequenten Spontanatmung extubiert. Die am Tier peripher gemessene Sauerstoffsättigung bei Raumluft wurde weiterhin kontrolliert und bei Bedarf Sauerstoff über einen Beatmungstrichter zusätzlich angeboten. Die Anschlüsse des Hämodialysekatheters wurden mit NaCl gespült, gereinigt und mit einem geeigneten Desinfektionsmittel desinfiziert. Beide Schenkel wurden mit 3%iger Natriumcitratlösung (Klinikapotheke des CVK-Charité Universitätsmedizin Berlin) geblockt und der Katheter wieder sicher in der dafür vorgesehenen Stofftasche verpackt.

Anschließend wurde das Tier in den Stall gebracht, dort auf Stroh gelagert und bis zum vollständigen Erwachen überwacht.

3.12.4 Verum-Apherese Gruppe

Alle Tiere der Verum-Apherese Gruppe wurden im Verlauf am ersten Postoperativen Tag nach Infarzierung zur 2maligen Apherese im Abstand von 24 h an das Apheresesystem angeschlossen. Für die Verum-Apherese Gruppe, also mit Verwendung eines reaktiven CRP-Adsorbers wurde eine BM11 - Baxter® Hämodialysemaschine als Primärsystem zur Plasmafiltration in Kombination mit einer ADASorb[©] - medicap homecare GmbH als Sekundärsystem mit dem CRP-Adsorber nach dem Prinzip des offenen Sekundärsystems eingesetzt. (Abb.3.6 auf S.54) Zuflüsse vom Tier zur Maschine und vice versa wurden über den Doppellumigen Hämodialysekatheter realisiert. Hier wurde ein Gesamtplasmavolumen von 6000 mL in 6 Zyklen zu je 1000 mL über den spezifischen CRP-Adsorber geleitet. Zwischen den einzelnen Zyklen gab es Regenerationsverfahren, in denen der Adsorber in einem mehrstufigen Verfahren ohne Entfernung aus dem Systemkreislauf regeneriert wurde. Nach jeweils 1000 mL behandelten Plasmavolumens wurden 20 mL des Filtrates aus dem Abfallbehälter der Maschine entnommen und für anschließende Diagnostik aliquotiert. (analog zu den CRP-Tests der Sham-Gruppe) Während der Behandlung wurde ebenfalls Fresubin[©] enteral appliziert. Im Anschluss an den Versuch wurden die Tiere noch im OP-Bereich nach Einsetzen einer suffizienten Spontanatmung extubiert. Die periphere Gewebesauerstoffsättigung bei Raumluft wurde durch ein Pulsoximeters EDAN H100B (EDAN Instruments Shenzhen, China) mit einem Ohrclip weiterhin kontrolliert und bei Notwendigkeit über einen Beatmungstrichter zusätzlich oxigeniert. Die Anschlüsse des Hämodialysekatheters wurden mit NaCl gespült, gereinigt und mit einem geeigneten Desinfektionsmittel desinfiziert. Beide Schenkel wurden mit 3%iger Natriumcitratlösung (KlinikApotheke des CVK-Charité Universitätsmedizin Berlin) geblockt und der Katheter wieder sicher in der dafür vorgesehenen Stofftasche verpackt. Anschließend wurde das Tier in den Stall gebracht und dort auf Stroh gelagert und bis zum vollständigen Erwachen überwacht.

Für die Durchführung der Verum-Apherese, wurde ein experimenteller Adsorber zur spezifischen CRP-Abreicherung eingesetzt. Die Kopplungsmatrix besteht aus einer Phosphocholin-gekoppelten Sepharose. Durch die vorliegenden Strukturen werden Kopplungsstellen bereitgestellt. CRP lagert sich an der Oberflächenstruktur der Matrix an und steht somit dem Organismus nicht mehr zur Verfügung. Dadurch wird die Menge an vorhandenem und zirkulierenden CRP reduziert.

Genauere Informationen zum funktionsspezifischen Aufbau des Adsorbers stehen aus

rechtlichen Gründen von Seiten der Entwicklungsgruppe nicht zur Verfügung.

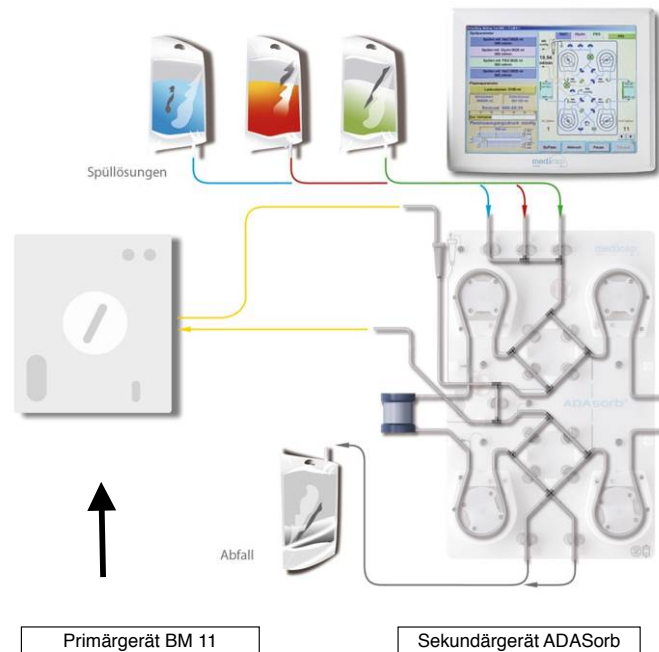


Abbildung 3.6: Schematische Darstellung der Systemkombination Primärgerät BM 11 zur Plasmasparation und Sekundärgerät ADASorb[®] mit dem CRP-spezifischen Adsorber zur Apherese, linksseitig am Sekundärgerät dargestellt. (Mit freundlicher Genehmigung der medicap homecare GmbH Ulrichstein, Germany)

3.13 Antikoagulationsstrategie

3.13.1 Antikoagulation für Sham- und Verumapheresegruppe

Durch die eingesetzte extrakorporale Zirkulation ist das Blut einem längeranhaltendem Kontakt mit dem eingesetzten Schlauchsystem ausgesetzt. Dadurch kommt es während der Apherese zu einem massiven Kontakt mit einer Fremdoberfläche, der sich stark begünstigend auf eine Aktivierung des Gerinnungssystems auswirkt. Um das Koagulieren des Blutes durch den Kontakt mit der Fremdoberfläche zu verhindern, wurde mit Natrium-Heparin in die Gerinnungskaskade eingegriffen und so die Wirkung des Antithrombin (AT) als natürlicher Inhibitor des Gerinnungssystems verstärkt. (Sofortinhibitor) Es ist in der Lage, Gerinnungsfaktoren (XII, XI, IX, VIII, X) und

Thrombin zu binden und in ihrer Wirkung zu hemmen. Dabei inhibiert es die Thrombozytenfunktion.

Heparin wird als Antikoagulans während der extrakorporalen Zirkulation bei z.B. Kardiopulmonalen Bypässen (CPB) in der Kardiochirurgie eingesetzt. Das hier verwendete Unfraktionierte Heparin hat in Abhängigkeit von Dosierung und Temperatur eine Halbwertszeit von 60–150 Minuten. Eine Kontrolle der Gerinnungsunfähigkeit fand durch Bestimmung der Activated Clotting Time (ACT) statt. Dabei wurde ein Hemochron 800[©] (ITC Edison NJ, USA) eingesetzt. Das Gerät arbeitet mit einem Gerinnungsaktivator (Kieselgur) Vor Beginn der Apherese wurde eine Basisdosis von 1000 I.E. Natrium-Heparin systemisch appliziert. Ein weiteres Volumen von 5000 I.E. Natrium-Heparin wurde für das Priming des Plasmafilters eingesetzt. Über den Verlauf der extrakorporalen Zirkulation wurde der Gerinnungsstatus durch Messung der ACT bestimmt und durch Gabe von Heparin ausbalanciert. Der Zielwert bei kontrollierter Normovolämie lag bei ACT > 180 s- 260 s.

3.14 Prozeduren

3.14.1 Blutentnahme

Blutentnahmen für die Messungen zur CRP-Synthese/ Abreicherung und zur Einschätzung des gesundheitlichen Status wurden im Verlauf bis zur partiellen Entfernung des Hämodialysekatheters nach 1 Woche täglich vorgenommen und der Katheter im Anschluss wieder mit 3%iger Citratlösung geblockt. Für die Bestimmung des CRP-Levels und weiterer hämatologischer und chemischer Parameter wurden zum Entnahmezeitpunkt jeweils die ersten 10 mL nach Abzug aus einem Schenkel des Hickman[©]-Katheter verworfen und im Anschluss 20 mL in LiHeparin Probenröhrchen (Sarstedt[®]) überführt und bei 2400 U/ min für 10 Minuten zentrifugiert. (Thermo Scientific[©] Heraeus[©] Biofuge[©] Stratos[©], Fisher Scientific GmbH Schwerte, Deutschland) Die Plasmaphase wurde danach in Aufbewahrungsröhrchen (CryoTubes[©] 1,8 mL Nunc[©] Thermo Fischer Scientific) überführt und bei Minus 20°Celsius für die Bestimmung von Laborparametern der Klinischen Chemie aufbewahrt. Gleichzeitig wurden 10 Alliquots zu je einem mL Plasma hergestellt und für weitere Analysen bei Minus 20°Celsius gelagert. Für die hämatologischen Bestimmungen wurde Vollblut in Kalium-EDTA Probenröhrchen (Sarstedt[®]) überführt und zur Bestimmung an ein geeignetes Labor innerhalb von 1h nach Blutentnahme weitergeleitet. (Laboklin GmbH & Co KG Bad Kissingen, Deuschland)

Bei den Tieren der Behandlungsgruppen Sham- und Verumapherese wurde an den beiden aufeinanderfolgenden Behandlungstagen 1 und 2 postoperativ jeweils aus dem Plasmasammelbehälter der Aphereseeinheit Plasma für die Bestimmung des C-reaktiven Proteins entnommen, da die Tiere über den Hämodialysekatheter mit der Aphereseeinheit verbunden waren. An den auf die Behandlung folgenden Tagen bis zum 7ten postoperativen Tag wurde der Dialysekatheter zur Blutentnahme genutzt. Durch die Unspezifität des Antikörpers bei kommerziell erhältlichen ELISA-Kits zur CRP-Bestimmung im porcinen Plasma wurden im Labor der PENTRACOR-GmbH ein in-house-Test entwickelt, validiert und eingesetzt.

3.14.2 Medikation

Zur Vermeidung einer Katheterassoziierten Infektion im Bereich der Hautdurchtrittsstelle des Hämodialysekatheters wurde für den Zeitraum des Verbleiben des Katheters (für 6 Tage) nach der täglichen Blutentnahme 1mL Enrofloxacin-Baytril[®] 10%ig über den Katheter systemisch appliziert.

Für die postoperative Analgesie wurde bereits am OP-Tag ein Transdermalpflaster Durogesic[®] - 75µg aufgeklebt. (Siehe Material und Methoden 3.5 ab S.40) Allen Tieren wurde nach 72 h unter Entfernung des vorrangegangenen Transdermalpflasters jeweils ein neues Pflaster für weitere 72 h geklebt. Dieses Vorgehen wurde nach weiteren 72 h nochmals wiederholt. Durch die zeitlich aufeinander bezogene Erneuerung des Transdermalpflasters konnte eine Analgesie ohne Absinken des Wirkstoffspiegels unter die Wirkschwelle für bis zu 216 h (9 Tage) aufrechterhalten werden. Die Wirkdauer eines korrekt angebrachten Transdermalpflasters ist für bis zu 72 h angegeben [53].

Zur Verhinderung von postoperativen Reinfarkten nach einem Akutem Myokardinfarkt wurde Acetylsalicylsäure (ASS) als Oralpräparat in der Dosierung von 100 mg verabreicht. Durch die Acetylsalicylsäure wird auch die Bildung von Thromboxan, eines Bestandteils der Thrombozyten, gehemmt. Dadurch verringert sich die Gefahr arterieller Thrombosen. ASS wird unter anderem zur Herzinfarktprophylaxe routinemäßig genutzt. Die Hemmung der Cyclooxygenase COX - 1 wirkt sich auf die Thrombozytenaggregation aus.. Bei höheren Dosen wird zusätzlich der COX - 2 Rezeptor gehemmt. Dadurch wirkt ASS sich negativ regulierend auf die Bildung von Prostaglandinen, analgetisch, antirheumatisch und antipyretisch aus. Die ersten Mitteilungen zum Protektiven Effekt von ASS stammen aus den Jahren 1953 und 1956 [66] [67]. Ähnliche Ergebnisse wurden 2 Jahrzehnte später durch die Bostoner

Colaborative Drug Surveillance Group präsentiert [12]. Im Verlauf wiederkehrender Untersuchungen zur protektiven Wirkung von ASS wurden zahlreiche Studien initiiert, die eine Reduktion der Mortalität unter Einsatz von ASS nachgewiesen haben [70]. ASS gehört zur Gruppe der Cyclooxygenasehemmer und wird pharmakologisch den NSAID (non-steroidal-anti-inflammatory-drugs) zugeordnet. Die Tiere der Kontrollgruppe bekamen unmittelbar ab dem ersten POD 100mg ASS oral verabreicht. Ausnahme am 1. und 2. POD bildeten die Behandlungsgruppen. Hier wurde ASS erst ab dem 3. POD verabreicht. An den Tagen 1 und 2 post operationem wurde die Antikoagulation für die Behandlungsgruppen über die kontrollierte Applikation von Natrium-Heparin während den Behandlungen gewährleistet. (siehe hierzu 3.10.1 Antikoagulation für Sham- und Verumapheresegruppe) Eine Therapiebegleitende Kontrolle des Gerinnungsstatus über die durchgeführten Behandlungen hinaus erfolgte nicht.

3.15 Finalisierung des Versuches

Das Vorgehen, die Narkoseeinleitung und -führung entspricht der in 3.4 beschriebenen Prozedur zur OP-Vorbereitung. Nach der Vergleichsbildgebung durch MRT 14 Tage post Infarkt, die durchgeführten Sequenzen entsprachen der MRT Bildgebung am Initialtag, wurden die Tiere in tiefer Narkose belassen. Zum Versuchsende wurde allen Tieren über die zur Einleitung in die Vena auricularis lateralis bzw. medialis gelegte Venenverweilkanüle während der tiefen Narkose 2 mL des depolarisierendes Muskelrelaxans Pancuronium (Inresa Arzneimittel GmbH Freiburg, Deutschland) gefolgt von Kaliumchlorid, 8,45 %ig (B.Braun) in Überdosis injiziert. Durch das Kalium kam es zu einer Depolarisation am Myokard mit der Folge des Herzstillstandes. Um eine Koagulation des Blutes in den Ventrikeln zu verhindern, wurde vor Applikation von Kaliumchlorid ein Bolus von 10.000 I.E. Natrium-Heparin über den Venenzugang injiziert. Die Finalisierung des Versuches erfolgte entsprechend der geltenden Tierschutzgesetzgebung.

3.15.1 Organentnahme

Zur Entnahme des Herzens wurde der Brustkorb durch Entfernung von Sternum und Durchtrennung der Rippengelenke der entsprechenden Sternalrippen geöffnet und das Herz mit Anteilen der großen zu- und ableitenden Gefäße entnommen. Anschließend wurde das Herz unter Schonung der Strukturen mit lauwarmem Wasser gespült, bis

keine blutigen Ablagerungen mehr erkennbar waren. (Abb.3.7 auf S.58) Danach wurde das Organgewicht durch Wiegen bestimmt. (Abb.4.1 auf S.68)

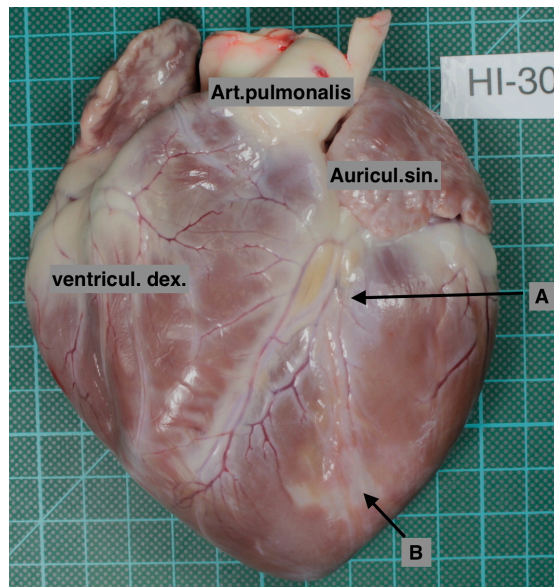


Abbildung 3.7: Entnommenes Organ in toto. In der Gesamtübersicht bedeuten:
A: Darstellung des Gefäßabganges zur Infarktinduktion,
B: Darstellung des vom infarzierten Gefäß versorgten Myokardbereiches mit sichtbarem Myokardinfarkt im Vorderwandbereich.
Zur Orientierung wurden Pulmonalarterie, rechter Ventrikel und das linke Atrium gekennzeichnet.

3.15.2 Slicing

Das Herz wurde in einer speziell anpassbaren, circumferenten Haltevorrichtung manuell fixiert und anschließend in 7 mm starke Scheiben von apikal beginnend im 90° Winkel quer zur apiko-basalen Längsachse des Organs auf einer Schneidemaschine (Abb.3.8 auf S.59) geschnitten. Auf eine exakte Einhaltung der Bezugswinkel wurde geachtet, um so die Darstellung der Schnittebene mit den einschließenden Strukturen nicht Winkelbezogen zu verändern. Dabei orientierte sich die Stärke von 7mm am Minimal möglichen Schneidevorgang, ohne das frisch entnommene Organ zu beschädigen oder zu zerreißen. Eine Stabilisierung durch z.B. starkes Herunterkühlen, um so eine erhöhte Rigidität zu erzielen wurde nicht durchgeführt, da alle Organstrukturen beschädigungsfrei für folgende Vitalfärbungen und anschließende histologische Auswertung benötigt wurden.

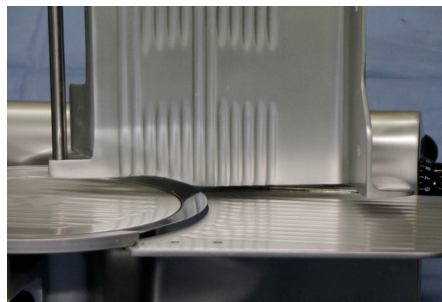


Abbildung 3.8: Justierbare Schneidemaschine zur MRT-korrelierten Aufarbeitung der Organpräparate. Die sichtbare Breite des Schneideblattes entspricht der Organpräparatestärke von 7 mm und entspricht der MRT-Darstellung.

3.15.3 Planimetrie

Für die Postmortale Berechnung der Infarktareale der einzelnen Präparatescheiben ausserhalb der MRT-Berechnungen wurde das Verfahren der Planimetrie angewandt. Dafür wurde mit der Open Source Software Image-J, Image and Processing Analysis in Java (<https://imagej.nih.gov>) gearbeitet. Image-J ist ein Programm, das über installierbare Plugins anwenderspezifische Funktionen bereitstellt. Das Program ist fester Bestandteil bei wissenschaftlichen Berechnungen.

3.16 Vitalfärbung mit TTC

3.16.1 Gewebsdifferenzierung nach TTC-Färbung

Für die Darstellung des frischen Infarktes wurde eine Vitalfärbung unter Verwendung von Triphenyltetrazoliumchlorid durchgeführt. Dabei kommt es zu einer Redox-Reaktion mit einem durch zelluläre Dehydrogenasen induzierten Farbumschlag des vitalen Gewebes. (Abb.3.9 auf S.60) Nach dem Zelluntergang kommt es schnell zu einer Inaktivierung der Dehydrogenasen und somit zur ausbleibenden Farbreaktion. Dieser Effekt wurde genutzt, um vitale Bestandteile des Gewebes von den untergegangenen Bestandteilen zu marginalisieren. Vitales Gewebe wird rot angefärbt, geschädigtes bzw. frisch infarziertes Gewebe stellt sich in Abhängigkeit des Organisationsgrades milchig-weiß bis lehmig gelb dar.

3.16.2 Vorbereitung der Färbelösung

Für die Färbung wird wasserlösliches TTC, im Ausgangszustand als weißes kristallines Pulver vorliegend (Sigma Aldrich) in Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS) 1-fach gelöst. Es wurde eine 0,5-0,7 %ige Lösung hergestellt. Das Solvens wurde auf 37 °C in einem Wärmekasten (Heidolph Polymax 1000, Heidolph Inkubator 1000) erwärmt und bei dieser Temperatur kurzzeitig bis zum Einsatz gelagert. Die ideale Reaktionstemperatur liegt bei 37 °C.

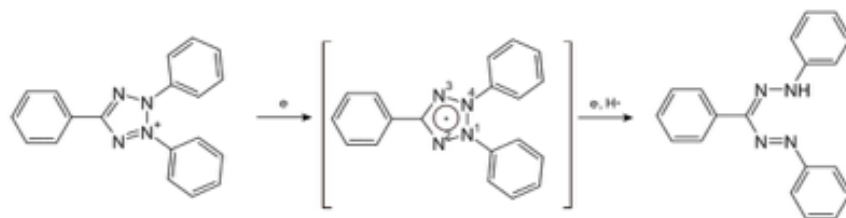


Abbildung 3.9: Schematische Darstellung der Elektronenübertragung von TTC zu Formazan bei der Redoxreaktion von wasserlöslichem TTC-Pulver zu wasserunlöslichem Formazan.

3.16.3 Anfärbung der makroskopischen Präparate

Die 7 mm starken Präparate wurden in einer flachen, mit leicht saugfähigem Papier ausgelegten Schale entsprechend der Schnittebene ausgelegt und anschließend mit der warmen TTC-Lösung überdeckt. Das zuvor ausgelegte Papier hatte die Funktion der Dochtwirkung, um so den Kontakt mit der Färbelösung auf der Unterseite zu erhalten und Zonen mit ungleichmäßiger Anfärbung zu vermeiden. Die Schale wurde anschließend für 3 Minuten in den Wärmekasten gestellt, um hier die eingestellte Reaktionstemperatur von 37°C während des gesamten Färbevorganges aufrecht zu halten. Nach der Reaktionszeit von 3 Minuten wurden die Präparate zügig der Färbelösung entnommen und entsprechend Ihrer Lagezuordnung zum Organ in eine zweite, mit leicht saugfähigem Papier ausgelegte Schale überführt und mit einer gepufferten 4 %igen Formalinlösung (Sigma-Aldrich Chemie GmbH München, Germany) zum Abstoppen der Färbereaktion überschichtet.

3.17 Dokumentation

3.17.1 Herstellung der Lagebeziehung

Alle Scheiben wurden auf einer Schneidematte mit cm Rasterung ausgelegt. Dabei wurden die Scheiben in zwei Reihen so ausgelegt, dass als erstes die apiko-basale Ansicht aller Scheiben sichtbar war. Eine Kennzeichnung der Versuchsnummer wurde oberhalb der Präparate so ausgelegt, dass die spätere Zuordnung des Versuches erfolgen konnte. Dieser Gesamtüberblick wurde mit einer Digitalspiegelreflexkamera, die auf einem Stativ über Kopfhängend montiert war, aufgenommen und gespeichert. Das Setting wurde durch 2 Tageslichtleuchten mit jeweils 3500 K ausgeleuchtet. Nach der ersten Aufnahme wurden alle Scheiben ohne Veränderung Ihrer Position auf die baso-apikale Ansicht gewendet und wieder entsprechend dokumentiert.

3.17.2 Einzelnachweise

Nach der Gesamtübersicht wurden alle Präparate nochmals einzeln jeweils von beiden Ansichtsseiten ausgehend im möglichst gleichen Abstand zum Objektiv ohne Veränderung der Brennweite aufgenommen. Hier wurde besonders auf die Darstellung des gesamten Präparates in der Bildübersicht für eine vergleichbare Auswertung geachtet. Die Abweichungen in der Brennweite wurde später während der Messung der

TTC-gefärbten Einzelpräparate über Image-J berücksichtigt und anhand von Pixel zu Längenkoeffizienten angeglichen.

3.18 Fixierung der Präparate

Alle Präparate eines Organs wurden nach der makroskopischen Dokumentation vorsichtig auf einen Formaldehyd stabilen Faden (Prolene[®]) durch die Ventrikel hindurch aufgefädelt und in ein geeignetes Gefäß für Organpräparate gelegt und anschließend mit Formaldehyd 4%ig übergossen. Dabei wurde darauf geachtet, dass das Verhältnis von Präparat zu Flüssigkeit bei ca. 1:3 lag. Die Behälter wurden entsprechend der Notwendigkeit Möglichkeit der Zuordnung nach weiterer Bearbeitung beschriftet. Alle Probenbeschriftungen enthielten:

1. Nummer des Versuches z.B. *HI-15* – Herzinfarkt, Versuch 15
2. Datum der Organentnahme z.B. *17.02.2013*
3. Dauer des Versuches z.B. *14d*
4. Herzgewicht: z.B. *237g*

3.19 Histologische Aufarbeitung

3.19.1 Dokumentation und Auswahl der Präparate

Die histologischen Färbungen wurden durch das Labor der Pathologie des Deutschen Herzzentrum Berlin (DHZB) entsprechend der vorgegebenen Fragestellung nach den geltenden Standards und Bestimmungen durchgeführt. Nach einer hinreichend langen Zeit bis zur sichtbaren kompletten Entfärbung vom TTC wurden die Präparate auf einer Schneidematte ausgelegt und im Formaldehyd fixierten Zustand erneut sowohl apiko-basal als auch baso-apikal fotografiert und dokumentiert. Ein Vergleich zu den unfixierten Präparaten wurde dadurch ermöglicht. Unter Zuhilfenahme der Bilddokumentation der zuvor durch TTC eindeutig sichtbaren Schädigungsbereiche der Präparate wurden die Infarktareale an den fixierten Präparatescheiben bestimmt und aus dem Gesamtpräparat herausgeschnitten. Die so entstandenen Blöcke wurden in dafür geeignete und vorher nummerierte Einbettkassetten eingelegt. Die Kassetten wurden sicher verschlossen und bis zur Anfärbung erneut in gepufferter 4%iger Formaldehydlösung aufbewahrt. Um geeignete histologische Kontrollproben herzustellen, wurde für jedes Organpräparat eine Negativkontrolle angelegt. Dabei wurde aus der Präparatscheibe mit der sichtbar größten Ausdehnung des Infarktes und unter Verifizierung durch die Bilder zu den Nativaufnahmen der Präparate die größte Ausdehnung optisch bestimmt und anschließend entnommen und zusammen mit den anderen entstandenen Proben in die vorbereiteten Einbettkassetten überführt. (Abb.3.10 auf S.64)

3.19.2 Histologische Färbungen

Für die Darstellung und die folgende Auswertung des akuten Myokardinfarktes haben sich 2 Standardfärbeprotokolle als geeignet erwiesen. Alle Färbevorgänge wurden nach den in der Pathologie des DHZB geltenden Bestimmungsstandards durchgeführt. Zur Differenzierung von Zellen wurde eine Färbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE) eingesetzt. Eine klare Abgrenzung des Infarktareals, also die Darstellung von vitalem, avitalem und umgebautem Gewebe ist in der Färbung mit Sirius-Rot sichtbar. Daher wurde diese Färbemethode als 2te Methode der Wahl eingesetzt. Zur Kontrolle einer möglichen Neovaskularisation wurde eine Ak-Färbung mit Aktin verwendet. Weitere Färbeprotokolle zur immunologischen Darstellung waren: CD 68 als Makrophagenmarker und die Darstellung von intrazellulärem C-reaktivem Protein.

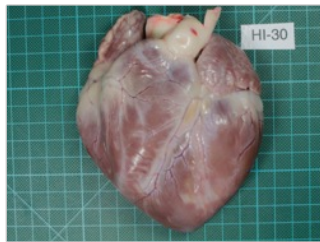


Bild 1: Herz mit Infarkt



Bild 2: Herzscheiben in 7mm Stärke (TTC gefärbt)



Bild 3: Segment mit Infarktareal (TTC gefärbt)



Bild 4: Fixiert/ Segmentiert

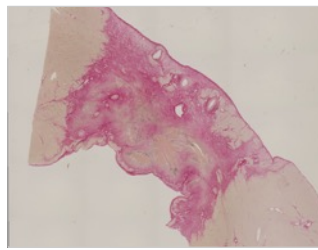


Bild 5: Sirius-Rot-Färbung

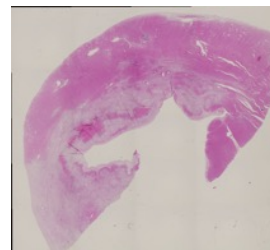


Bild 6: HE-Färbung

Abbildung 3.10: Zuordnung der Herzpräparate ausgehend vom Organ in toto (Bild 1) Nach der Segmentierung erfolgte die Dokumentation der apikalen und basalen Ansicht - hier die apikale Ansicht. (Bild 2) Es erfolgte die Darstellung der Einzelsegmente zur planimetrischen Vermessung. (Bild 3) Die histologische Zuordnung des Infarktbereiches erfolgte auf Basis der vorangegangenen Bilddokumentation. Parallel hierzu die Auswahl des Infarktareals vor Einbettung in Paraffin in Histokinetten. (Bild 4) Die histologischen Anfärbeprotokolle für Sirius-Rot (Bild 5) und HE (Bild 6) dienen als Grundlage zur Beurteilung des Infarktbereiches.

3.20 Statistische Analyse

Für die statistischen Berechnungen und den äquivalenten graphischen Darstellungen wurden die Open-Source-Software "R" (www.r-project.org) und das Programm "PRISM" for mac OS X (www.graphpad.com) eingesetzt. Die Angabe des Körpergewichts erfolgte im Mittelwert mit Standardabweichung. Alle anderen Werte sind als Median mit Interquartilsabstand (IQR) in den Percentilen 25 und 75 angegeben. Für die Überprüfung auf Vorliegen einer Gauß'schen Normalverteilung wurde der D'Agostino-Pearsons-Test und der Shapiro-Wilk-Test (U-Test) eingesetzt. Da nicht alle Parameter normalverteilt vorlagen, wurden für die statistische Analyse nur Nichtparametrische Tests verwendet. Für den Vergleich von 2 gepaarten Stichproben (Vorher-Nacher) wurde der Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest genutzt. Die einzelnen Behandlungsgruppen untereinander wurden mit dem Mann-Whitney-Test für unabhängige Stichproben ausgewertet. Die Kriterien *Einziehung* und *vitale Areale* des zusätzlichen Scorings wurden mit dem Chi-Quadrat-Test und Fisher's Exakt-Test auf signifikante Unterschiede in den Behandlungsgruppen überprüft.

P-Werte $p \leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen. Das Signifikanzniveau lag bei $\alpha = 0,05$, das Konfidenzintervall bei 95 %. Alle verwendeten Rohdaten wurden mit Grubb's Test auf Extremwerte bzw. Ausreißer überprüft. Ausreißerwerte wurden nicht berücksichtigt.

Kapitel 4

Ergebnisse und Auswertungen

4.1 Organgewichte

Das Gewicht jedes einzelnen Herzen wurde nach der Säuberung durch Wiegen bestimmt. Das erhaltene Ergebnis war weitestgehend kongruent mit den bekannten Körpergewichten der Tiere. (Abb.4.1 auf S.68) Gleichzeitig konnten so erste Rückschlüsse auf mögliche, bereits vor Versuchsbeginn vorhandene Erkrankungen, die einen Einfluss auf das Ergebnis der Versuche hätten haben können, gezogen werden. So wurde bei einem Tier hochgradige hypertrophische Veränderungen des Myokards mit starker Verdickung der linksseitigen Ventrikelmuskulatur festgestellt. Dieses Organ wurde in der Folge nicht für weitere Auswertungen berücksichtigt.

4.2 Messmethoden

4.2.1 Vergleichbarkeit der Methoden (MRT vs. Image J)

Für die Auswertung der MRT-Aufzeichnungen wurde durch das eingesetzte Bildprogramm eine phasengenaue Abbildung der Enddiastole, des Bereichs der maximalen Ventrikelfüllung, zur Darstellung aller Strukturen wie z.B. der Papillarmuskulatur ermöglicht. Da die Fragestellung dieser Arbeit sich im wesentlichen auf die bestmögliche makroskopische Darstellung des Infarktareals bezog, wurde die Methode der Planimetrie als Mittel der Wahl angesehen. Die postmortal entnommenen Organe befanden sich größtenteils in der Endsystole bzw. einem nicht näher zu definierendem Stadium zwischen Diastole und Systole und konnten dadurch nicht direkt mit der MRT-Darstellung verglichen werden. Hierfür war es notwendig, eine

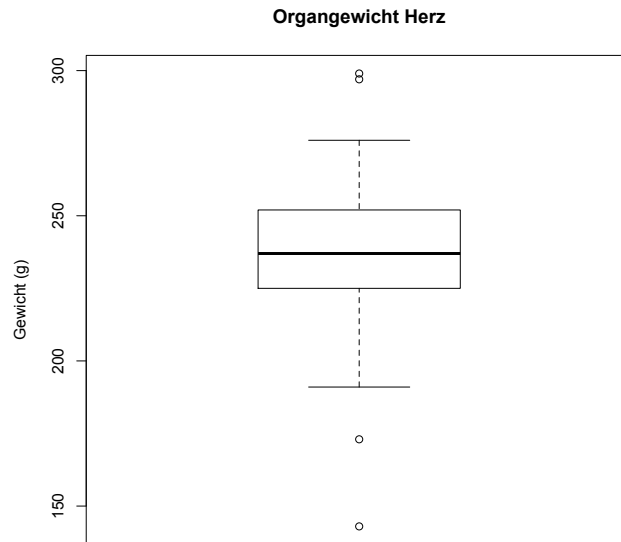


Abbildung 4.1: Verteilung der Herzgewichte post mortem mit einem Mittelwert von 236 g und einer Standardabweichung von ± 31.2 g

Bezugssituation herzustellen. Ausgehend davon, dass sich das Herz hauptsächlich entlang einer Längsachse kontrahiert, waren die durch Planimetrie gemessenen Werte der Aussenkonturen der einzelnen Präparate annähernd vergleichbar zu denen der Berechnungssoftware CMR42. Bei der Vermessung der Innenkonturen wurde eine Abweichung zu den MRT-Berechnungen sichtbar. (Rigor mortis zum Zeitpunkt der Endsystole bzw. in einem Stadium zwischen Diastole und Systole.) Dadurch ergab sich bei der Berechnung der geschädigten Fläche eine Differenz. Um eine Vergleichbarkeit der beiden Methoden in Bezug auf den prozentualen Anteil des geschädigten Myokard zu haben, wurden die berechneten Werte der Schädigung in einer graphischen Abbildung gegen einander aufgetragen. Nachdem alle Werte der jeweiligen Auswertungsmethode miteinander verbunden wurden, entstand annähernde Parallelität. Das resultierende Verhältnis der Einzelwerte ergab eine 1,5–1,7-fache Differenz zueinander. (Abb.4.2 auf S.69) Massive Abweichungen von diesem Verhältnis um mehr als das 2-fache wurden überprüft. Dazu wurden die Bilder der MRT-Auswertung nochmals mit den makroskopischen und für Image J verwendeten Schnitten korreliert und neu berechnet.

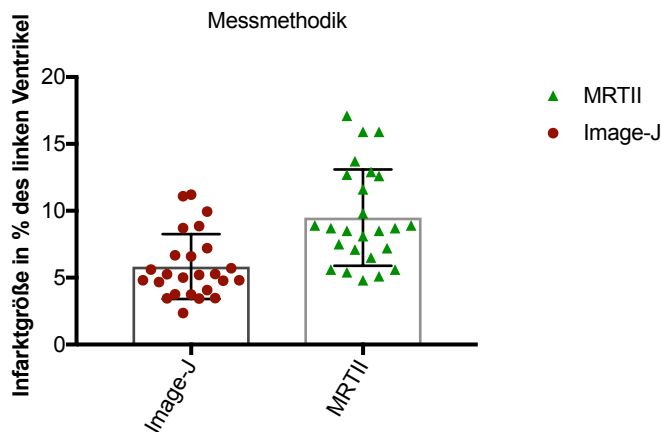


Abbildung 4.2: Graphische Darstellung des Vergleiches der Messmethoden zwischen MRT-gestützter Messung und Planimetrischer Messung mit Image J.

4.3 Kardiale Marker

4.3.1 C-reaktives Protein

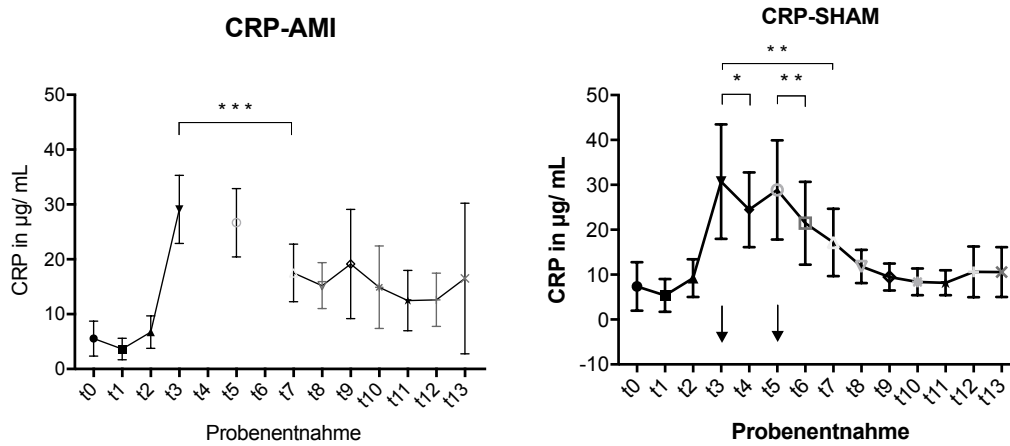
Anhand der spezifischen Abreicherungskurve für CRP ist die Depletion im Gruppenvergleich gut erkennbar. (Abb.4.3 auf S.71)

Unter Verwendung des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang Tests für abhängige Stichproben zeigen sowohl die Ergebnisse der Verum-Apheresegruppe als auch die der Sham-Apheresegruppe einen absinkenden Werteverlauf zu den Zeitpunkten t3 -> t4 und t5 -> t6. Für die Verumgruppe wurde zum Zeitpunkt t3 und t4 (vor und nach durchgeführter Behandlung - 24 h nach Infarzierung) ein im Vergleich der Proben von P signifikant verschiedener Wert mit $p = 0,0195^*$ auf der Grundlage von $n = 10$ Paaren erhalten. Der Zeitpunkt der 2ten Behandlung 48 h nach Infarzierung ergab zu den Zeitpunkten t5 vor Apherese gemessen zu t6 nach Apherese im Vergleich der Proben einen von P signifikant verschiedenen Wert mit $p = 0,0039^{**}$ (Stichprobenumfang $n = 9$).

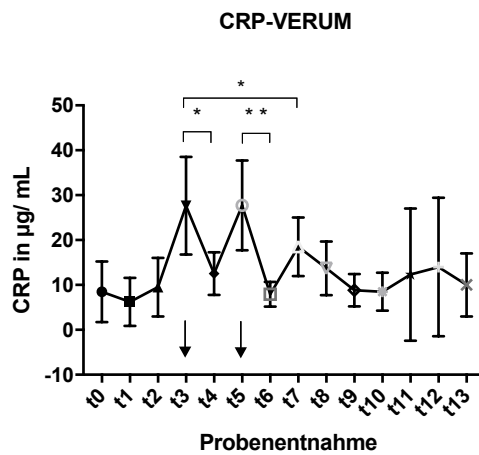
Im Vergleich zur Shamgruppe ($n = 9$) wurde zu den Zeitpunkten t3 vor und t4 nach der ersten Behandlung ein von P signifikant verschiedener Wert mit $p = 0,0273^*$ errechnet. Die Gegenüberstellung der Zeitpunkte t5 vor und t6 nach der zweiten Behandlung ergaben einen von P signifikant verschiedenen Wert mit $p = 0,0078^{**}$ mit dem Stichprobenumfang von $n = 9$. Die Betrachtung auf Signifikanz P der Proben beim Vergleich der Zeitpunkte t3 vor der ersten Behandlung zu t7, 24 h nach erfolgter 2ter

Behandlung, ergab für die Verumgruppe $p = 0,0186^*$, für die Shamgruppe $p = 0,0020^{**}$ und für die Kontrollgruppe $p = 0,0010^{***}$.

Für die Beurteilung der einzelnen Werte im zeitlichen Verlauf des Versuches wurde der Mann-Whitney-Test für unabhängige Stichproben zur Beurteilung der Tendenz der Verschiedenheit der erhaltenen Ergebnisse angewendet. Die Betrachtung der Zeitpunkte t0 bis t3 ergaben in keiner Gruppe signifikant verschiedene Werte für P mit $p \leq 0,05$. Der Zeitpunkt t4 nach Behandlung 1 zeigte für die Proben der Verumbehandlung eine Signifikanz verschieden von P mit $p = 0,0015^{**}$. Die Werte der Kontrollgruppe standen zum Zeitpunkt t4 nicht zur Verfügung. Die Auswertung der Proben zu t4 der Shambehandlung waren mit $p = 0,6126$ nicht signifikant verschieden für P. Zum Zeitpunkt t5 vor der 2ten Behandlung waren alle Stichproben nicht signifikant verschieden von P. Der Vergleich zum Zeitpunkt t6, nach Behandlung 2 ergab für die Gruppe der Verumbehandlung einen von P signifikant verschiedenen Wert mit $p < 0,0001^{****}$. Für die Gruppe der Shambehandlung war der Wert $p = 0,6126$ und somit nicht verschieden von P mit $p \leq 0,05$. Für die Kontrollgruppe wurden keine Stichproben für t6 erhoben. Die Zeitpunkte t7 und t8 wurden jeweils im Abstand von 24 Stunden nach der 2ten Behandlung durch Probenentnahme ausgewertet. Alle ausgewerteten Stichproben waren nicht signifikant verschieden zu P mit $p \leq 0,05$. Die zu den Zeitpunkten t9 und t10, wieder jeweils im Abstand von 24 h zur vorangegangenen Probenentnahme erfolgte Wertebestimmung ergab für die Gruppe der Verumbehandlung $p = 0,5882$ für t9 und $p = 0,9243$ für t10 und damit nicht signifikant verschieden von P mit $p \leq 0,05$. Die Proben der Shambehandlung zeigte zum Zeitpunkt t9 eine Signifikanz von $p = 0,0009^{***}$. Die Proben der Kontrollgruppe wiesen einen Wert von $p = 0,0006^{***}$ auf. Beide Ergebnisse waren damit verschieden von P mit $p \leq 0,05$. Gemessen zum Zeitpunkt t10 waren für die Gruppe der Shambehandlung die Werte für P mit $p = 0,0045^{**}$ und für die Kontrollgruppe mit $p = 0,0372^*$ ebenfalls signifikant verschieden für $p \leq 0,05$. Für die Zeitpunkte t11 bis t13, wobei t11 und t12 jeweils wiederum nach 24 Stunden zum Vorwert gemessen wurden und t13 zum Versuchsende am Tag 15 nach Infarktinduktion erhoben wurde, waren alle erhaltenen Proben mit $p \geq 0,05$ und damit nicht signifikant verschieden für P mit $p \leq 0,05$. (bei $ns > 0,05$, $* \leq 0,05$, $** \leq 0,01$, $*** \leq 0,001$, $**** \leq 0,0001$)



(a) Verlaufskurve für CRP ohne Apherese (AMI) (b) Verlaufskurve für CRP Sham-Apherese



(c) Verlaufskurve für CRP Verum-Apherese

Abbildung 4.3: Darstellung der CRP-Verlaufskinetik. Die in den Verlaufskurven eingesetzten Pfeile verweisen auf die Zeitpunkte t3 und t5 des Behandlungsbeginns 24 h und 48 h nach Infarktsetzung unabhängig von Sham- bzw. Verumbehandlung. Für die Gruppe der unbehandelten Tiere wurden zu den Zeitpunkten t4 und t6, jeweils nach Behandlungsende, keine Blutentnahmen durchgeführt. Die Verbindungsclammern zwischen den Zeitpunkten weisen auf ein unterschiedliches Signifikanzniveau P mit $p < 0,05$ hin.

(bei ns > 0,05, * ≤ 0,05, ** ≤ 0,01, *** ≤ 0,001, **** ≤ 0,0001)

Tabelle 4.1: CRP-Werte in $\mu\text{g}/\text{mL}$ für die Versuchsgruppen Darstellung der Werte für CRP als Median mit IQR (in den Percentilen 25 und 75). Zu den Zeitpunkten t4 und t6 (nach der jeweiligen Behandlung) wurden für die Gruppe der Kontrolltiere (AMI) keine Wertebestimmungen vorgenommen.

Zeitpunkte	AMI		Sham		Verum	
t0	4,22	(2,970–7,718)	4,52	(4,010–6,153)	9,06	(7,480–12,870)
t1	2,90	(1,883–4,088)	3,45	(2,800–4,475)	6,28	(6,130–8,510)
t2	6,98	(3,543–7,560)	7,19	(5,935–9,580)	9,41	(8,770–13,250)
t3	28,41	(27,720–34,990)	29,14	(9,580–32,890)	29,59	(26,050–41,450)
t4	–	–	24,92	(23,390–29,310)*	11,12	(10,890–13,870)*
t5	25,56	(22,360–26,550)	26,25	(23,140–37,950)	28,72	(27,320–39,130)
t6	–	–	19,75	(16,740–25,760)**	9,60	(7,530–11,380)**
t7	15,98	(11,970–17,880)***	18,81	(13,940–21,450)**	24,50	(12,410–25,980)*
t8	15,28	(12,060–18,770)	12,87	(11,290–14,100)	16,61	(11,940–22,640)
t9	19,05	(13,420–29,110)	10,83	(7,798–12,630)	11,12	(9,290–14,830)
t10	26,99	(11,350–29,930)	11,30	(6,785–12,090)	12,57	(8,550–14,340)
t11	16,40	(7,363–42,330)	8,98	(6,638–11,330)	15,02	(8,493–60,270)
t12	14,29	(8,863–20,610)	9,93	(7,955–18,140)	15,65	(9,610–51,650)
t13	11,32	(4,520–16,670)	13,35	(9,945–68,750)	10,38	(9,910–64,770)

(bei ns > 0,05, * \leq 0,05, ** \leq 0,01, *** \leq 0,001, **** \leq 0,0001)

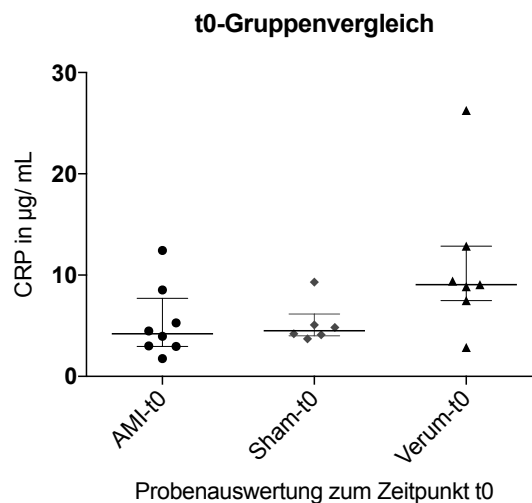


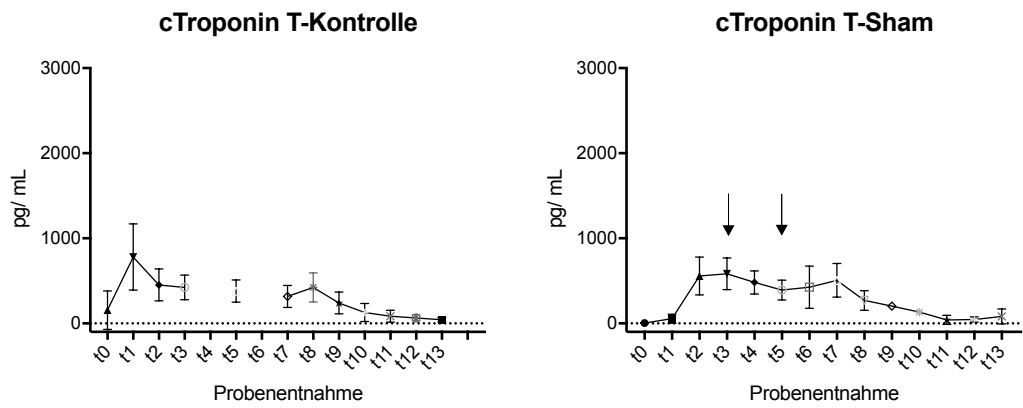
Abbildung 4.4: Darstellung der Ausgangswerte für CRP zum Zeitpunkt t0. Die Blutentnahme erfolgte unmittelbar nach Narkoseeinleitung. Die Darstellung der Werte für t0 erfolgt als Median mit Interquartilsabstand und sind in der Tabelle 4.1 auf S.72 ersichtlich

4.3.2 Troponin-T

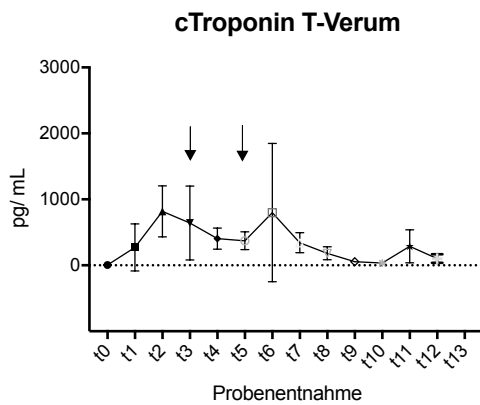
In den aktuell geltenden Leitlinien zur Infarkt Diagnostik wird das kardiale Troponin T als spezifischer Laborparameter für das Vorhandensein eines manifesten Infarktes neben weiteren hinzugezogen. Im Verlauf der Versuchsdauer konnte neben der bildgebenden Darstellung des Infarktes auch anhand der Laborwerte für erhöhtes kardiales Troponin T der Myokardinfarkt abgebildet werden. (Tab.4.2, Abb.4.5 auf S.74)

Tabelle 4.2: Kardiales TroponinT in pg/ mL in den Behandlungsgruppen. Darstellung der Werte für kardiales TroponinT als Median mit IQR (in den Perzentilen 25 und 75).

Zeitpunkte	AMI		Sham		Verum	
t0	66,65	(12,93-229,9)	25,75	(14,78-108,2)	4,35	(3-5,62)
t1	680,4	(399-901,3)	597,5	(363,3-722)	83	(15,45-576,9)
t2	421,8	(297,9-577)	528	(369,2-749)	768,7	(563,7-958)
t3	351	(312,5-569)	476,3	(346,8-603,6)	437,4	(360,9-733,1)
t4	–	–	486,7	(372,6-624,3)	338,5	(305,8-568,5)
t5	369	(241,5-457)	421,9	(297,8-448)	363	(240,8-432)
t6	–	–	481,9	(282,7-502,1)	317,5	(211,3-1868)
t7	266	(214,9-443)	506	(323,6-624,2)	276,7	(244,6-481,3)
t8	440	(266-598,7)	260,3	(163,2-360,5)	210,3	(101,4-1191)
t9	287,1	(102,3-380)	203	(203)	54,5	(54,5)
t10	128,8	(54,5-203)	134	(134)	35,1	(35,1)
t11	84,55	(35,1-134)	14,9	(7,79-102)	216	(80,3-565)
t12	68,4	(30,33-96,58)	49,9	(16,4-68,7)	102,6	(57,1-148)
t13	57,1	(14,8-60,1)	82,08	(19,1-145)	–	–



(a) Verlaufskurve für kardiales Troponin T in ohne Apherese (AMI) (b) Verlaufskurve für kardiales Troponin T Sham-Apherese



(c) Verlaufskurve für kardiales Troponin T Verum-Apherese

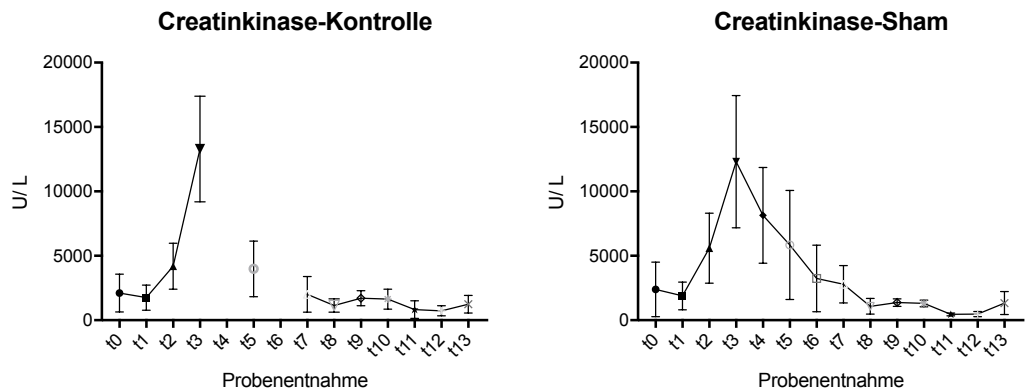
Abbildung 4.5: Verlaufskinetik von kardialem Troponin T. Die in den Verlaufskurven eingesetzten Pfeile verweisen auf die Zeitpunkte t3 und t5 des Behandlungsbeginns 24 h und 48 h nach Infarktsetzung unabhängig von Sham- bzw. Verumbehandlung. Für die Gruppe der unbehandelten Tiere wurden zu den Zeitpunkten t4 und t6, jeweils nach Behandlungsende, keine Blutentnahmen im Versuchsverlauf durchgeführt.

Tabelle 4.3: Creatinkinase in U/L in den Behandlungsgruppen. Darstellung der Werte für Creatinkinase als Median mit IQR (in den Perzentilen 25 und 75). Die Normwerte für Creatinkinase bei Schweinen liegen bei >1250 U/l [74].

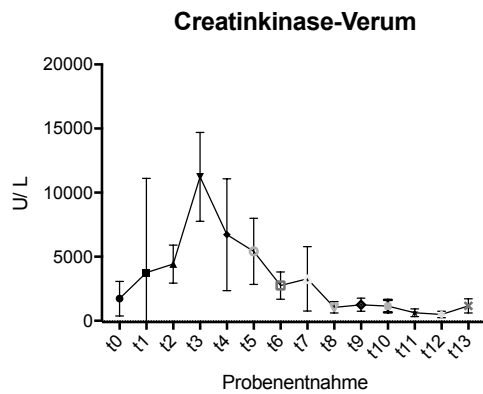
Zeitpunkte	AMI		Sham		Verum	
t0	1395	(1006-2775)	1892	(1249-3614)	1999	(1520-2849)
t1	1545	(878,5-2020)	1482	(1287-2237)	1690	(1183-2969)
t2	3665	(3043-4434)	4163	(3835-5159)	4645	(3256-5263)
t3	13692	(8674-16143)	12894	(9078-16838)	11668	(8050-13012)
t4	–	–	7194	(4973-9803)	5968	(3864-7471)
t5	2688	(2302-3085)	4756	(2790-7230)	6159	(3695-6415)
t6	–	–	2337	(1546-3459)	3136	(1606-3435)
t7	1119	(864,3-1929)	2741	(1805-4276)	4096	(1079-7429)
t8	964,5	(576,3-1462)	1119	(659,8-1570)	1198	(750-1590)
t9	1827	(1039-2167)	1497	(1301-1662)	1170	(1052-1558)
t10	1895	(792-2427)	1404	(1212-1602)	1013	(678,3-1819)
t11	482,5	(346,8-905,8)	538,5	(390-985)	710,5	(452,5-976,3)
t12	594,5	(394,3-920)	512,5	(364,8-1038)	477	(404,8-840,8)
t13	1252	(714,3-1637)	931	(654-3157)	953	(695,5-1004)

4.3.3 Creatinkinase

Die Bedeutung der Creatinkinase CK-MB als diagnostischer Parameter des frühen Herzinfarktes sowie als Indikator des Reinfarktes wurden bereits beschrieben. Eine Erhebung wurde als Reinfarkt-Indikator durchgeführt. Die gemessenen Werte zeigten keinen erneuten Anstieg im Versuchsverlauf (Tab.4.3 auf S.75, Abb.4.6 auf S.76). Es kann davon ausgegangen werden, dass kein Reinfarkt ereignis stattgefunden hat. Die Auswertung der histologischen Präparate im Pathologischen Institut des DHZB ergaben ebenfalls keine Hinweise auf erneute Infarkt ereignisse während der Versuchsdauer.



(a) Verlaufskurve für Creatinkinase ohne Apherese (AMI) (b) Verlaufskurve für Creatinkinase Sham-Apherese



(c) Verlaufskurve für Creatinkinase Verum-Apherese

Abbildung 4.6: Verlaufskinetik der Creatinkinase. Die in den Verlaufskurven eingesetzten Pfeile verweisen auf die Zeitpunkte t3 und t5 des Behandlungsbeginns 24 h und 48 h nach Infarktsetzung unabhängig von Sham- bzw. Verumbehandlung. Für die Gruppe der unbehandelten Tiere wurden zu den Zeitpunkten t4 und t6, jeweils nach Behandlungsende, keine Blutentnahmen im Versuchsverlauf durchgeführt.

4.4 Hämatologische Parameter

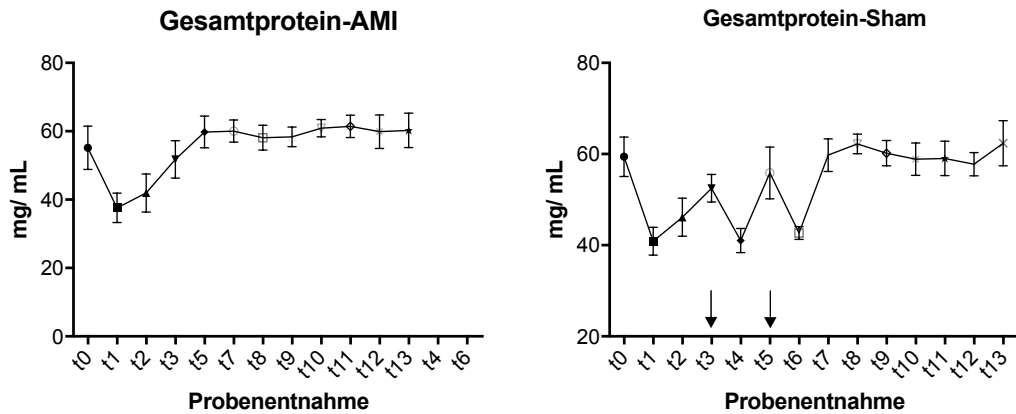
4.4.1 Gesamtprotein/ Leukozyten

Bei der Auswertung der Blutproben wurde neben den Markern, die hinweisend für den Myokardinfarkt bzw. einem möglichen Reinfarkt stehen, auf die Ergebnisse für die Parameter Protein gesamt (Tab.4.4 auf S.77, Abb.4.7 auf S.78) als Nachweis der

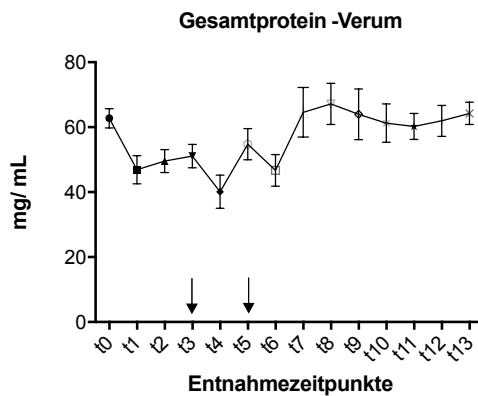
Tabelle 4.4: Gesamtprotein in mg/mL Die Werte sind als Median mit IQR dargestellt. Die Normwerte für Gesamtprotein bei Schweinen liegen bei 72-85 mg/mL [74].

Zeitpunkte	AMI		Sham		Verum	
t0	55,72	(42,28 – 60,96)	63,28	(56,74 – 62,09)	63,09	(60,42 – 63,69)
t1	36,75	(32,44 – 41,59)	45,13	(38,88 – 42,79)	46,52	(43,28 – 50,35)
t2	41,78	(32,15 – 44,44)	52,01	(42,94 – 50,95)	49,41	(46,26 – 51,26)
t3	52,18	(45,09 – 55,14)	57,27	(50,17 – 55,7)	50,37	(47,68 – 54,63)
t4	–	–	44,3	(38,53 – 43,57)	41,43	(36,39 – 42,29)
t5	60,02	(0 – 62,73)	63,69	(51,87 – 60,56)	55,18	(49,62 – 58,77)
t6	–	–	43,86	(41,85 – 43,75)	46,93	(44,84 – 47,75)
t7	59,35	(56,37 – 61,52)	65,13	(56,76 – 62,72)	64,18	(57,55 – 69,23)
t8	58,09	(53,73 – 61,86)	65,94	(60,26 – 63,97)	68,04	(63,48 – 71,82)
t9	58,87	(53,35 – 60,81)	63,75	(57,56 – 63,09)	64,89	(56,79 – 69,1)
t10	60,63	(57,92 – 63,73)	65,6	(56,81 – 61,01)	63,52	(53,53 – 65,12)
t11	61,32	(57,62 – 63,89)	66,14	(56,58 – 61,88)	61,36	(55,49 – 63,6)
t12	59,35	(0 – 64,02)	60,05	(56,4 – 59,98)	63,23	(57,38 – 64,23)
t13	60,01	(0 – 61,82)	70,04	(58,04 – 66,88)	63,88	(61,78 – 66,67)

spezifischen Abreicherung und Leukozyten (Abb.4.5 auf S.80, Abb.4.8 auf S.79) als Indikator für mögliche Infektionen geachtet, die nicht mit dem Infarktgeschehen in Zusammenhang zu betrachten sind, aber einen erneuten Anstieg der CRP-Werte generieren.

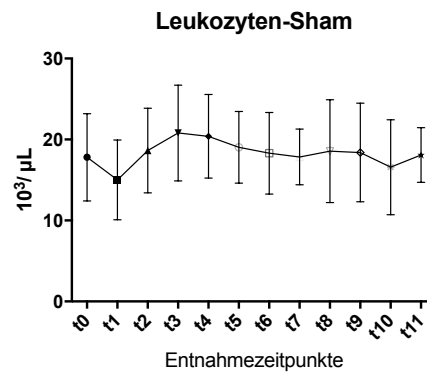
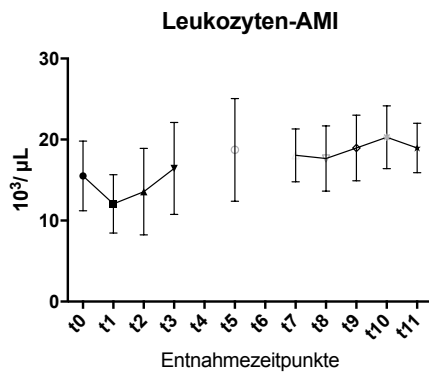


(a) Verlaufskurve für Gesamtprotein ohne Apherese (AMI) (b) Verlaufskurve für Gesamtprotein Sham-Apherese



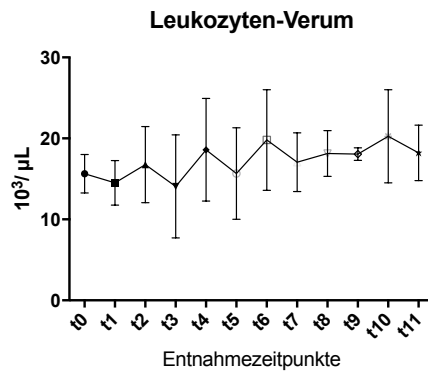
(c) Verlaufskurve für Gesamtprotein Verum-Apherese

Abbildung 4.7: Verlaufskinetik für Gesamtprotein. Anhand der gemessenen Laborwerte für Protein gesamt konnte gezeigt werden, dass spezifisch CRP abgereichert wurde. Das Absinken der Kurven zu den Zeitpunkten t3→t4 und t5→t6 in den Behandlungsgruppen Sham und Verum entspricht den durchgeführten Behandlungen. Für die Gruppe AMI ohne Behandlung wurden für die Zeitpunkt t4 und t6, also nach Behandlung keine Probenentnahme durchgeführt.



(a) Verlaufskurve für Leukozyten ohne Apherese (AMI)

(b) Verlaufskurve für Leukozyten Sham-Apherese



(c) Verlaufskurve für Leukozyten Verum-Apherese

Abbildung 4.8: Verlaufskinetik für Leukozyten

Tabelle 4.5: Leukozytenwerte in $10^3 \mu\text{g/ml}$. Darstellung der Werte für Leukozyten als Median mit IQR. Die Normwerte für Leukozyten bei Schweinen liegen bei $8,2-17,0$ (G/l) [74]. Andere Quellen legen die Normwerte bei $10-22$ (G/l) an [60].

Zeitpunkte	AMI		Sham		Verum	
t0	14,65	(12-18,48)	19,9	(13,4-21,15)	15,7	(13,3-16,8)
t1	11,7	(9,52-13,75)	14,8	(10,35-19,8)	14	(11,8-17,4)
t2	13,1	(9,52-17,55)	18,9	(14,5-22,65)	11,6	(11,5-18,7)
t3	15,35	(12,2-20,23)	22,2	(16-24,9)	12	(9,1-18,4)
t4	–	–	21,4	(15,55-24,75)	18,4	(13,2-26,1)
t5	18	(15,3-25,4)	22,2	(14,2-22,3)	16,7	(10,8-18,7)
t6	–	–	20,1	(13,05-22,65)	21,8	(13,7-25,4)
t7	17,7	(15,5-18,93)	18,2	(14,85-20,65)	16,9	(13,6-19,1)
t8	16,1	(15,6-19,05)	21,4	(13,15-22,55)	18,6	(16-19,6)
t9	16,33	(16,33-22,88)	20,4	(12,25-23,55)	17,7	(17,4-18,9)
t10	19,7	(17,08-23,45)	17,6	(10,95-21,7)	19,3	(15,6-25,4)
t11	18	(16,9-22,4)	18,7	(14,8-21,05)	18,95	(14,6-21,1)
t12	–	–	–	–	–	–
t13	–	–	–	–	–	–

4.5 Vergleich der Behandlungsgruppen

4.5.1 CRP-Senkung

Neben der Betrachtung der einzelnen Laborparameter wurden die Ergebnisse zwischen den Behandlungsgruppen Verum- und Shampaherese in Bezug auf Reduktion des CRP gegeneinander ausgewertet. Dafür wurden die CRP-Werte der jeweiligen Gruppe in Box-Wiskers-Diagrammen zusammengefasst und die Zeitpunkte vor bzw. nach den Behandlungen I und II ausgewertet, um so die prozentuale Abreicherung unabhängig vom Status zum Zeitpunkt t0 zu erhalten. (Abb.4.9 auf S.81)

Um eine Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Gruppen zu gewährleisten, wurde jeweils die prozentuale Abreicherung in Bezug zum Ausgangswert vor der jeweiligen Behandlung 1 bzw. 2 berücksichtigt. In der Gruppe der Verumapherese mit dem Probenumfang n mit $n = 10$ ist nach der ersten Behandlung eine Reduzierung auf $37.2\% \pm 5.56$ im Mittelwert der Ausgangswerte und nach Behandlung 2 eine Reduzierung auf $27.85\% \pm 6.51$ im Mittelwert der Ausgangswerte gemessen worden.

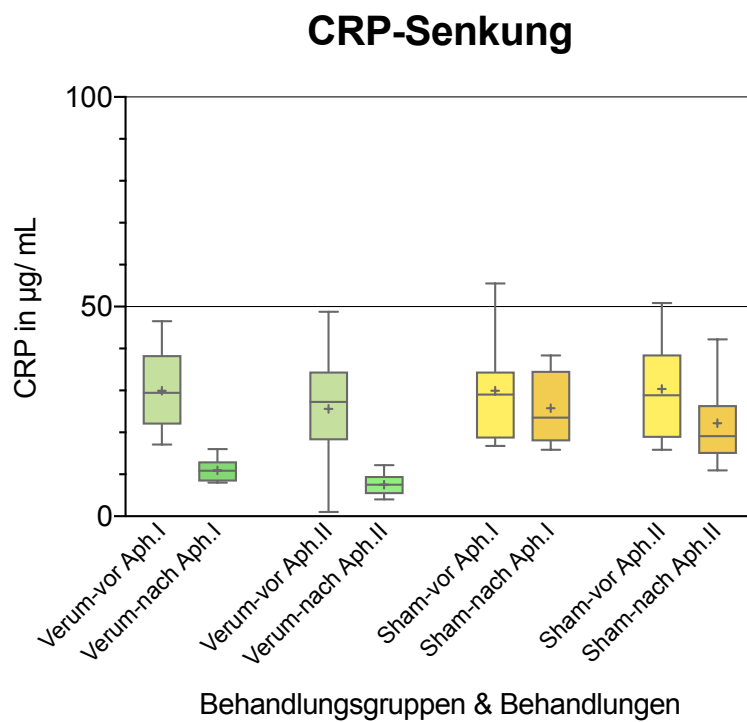


Abbildung 4.9: Darstellung der **CRP-Senkung** vor und nach Behandlung. Senkungsvergleich des CRP vor und nach den Behandlungen I bzw.II für die Gruppen der Verum- bzw. Shambehandlung im Box-Whiskersplot mit Darstellung der Min-Maxwerte und des Mittelwertes als Symbol "+".

Die erste Behandlung wurde 24 h nach Infarzierung, die zweite Behandlung 48 h nach Infarzierung durchgeführt.

In der Gruppe der Shamapherese mit dem Probenumfang $n = 11$, ebenfalls jeweils 24 h und 48 h nach Infarktsetzung durchgeführt, wurde eine Reduzierung auf $70.58\% \pm 35.82$ des Ausgangswertes vor Behandlung und nach der Behandlung 2 eine Reduktion des Ausgangswertes im Mittelwert auf $76.98\% \pm 9.70$ sichtbar.

In der Kontrollgruppe (Probenumfang $n = 11$) wurde keine Versuchsbehandlung durchgeführt. Hier wurden lediglich Blutproben zum korrelierten Zeitpunkt der Ausgangswertbestimmung der Behandlungsgruppen zur CRP-Wertbestimmung entnommen. Dabei korrespondierte die CRP-Synthese innerhalb von 24 - 72 h nach Infarkt ereignis mit der Halbwertszeit von 19 h. Das Maximum lag hier bei 48 h.

4.5.2 Scoring

Um eine morphologische Vergleichsmöglichkeit der unterschiedlichen Behandlungsgruppen untereinander zu haben, wurde ein Scoring erstellt. Das Scoring orientierte sich an den primären Merkmalen:

- Transmuralität
- epikardiale Einziehung
- vitale Areale

Zusätzlich wurde der geometrische Verlauf des Infarktes ausgewertet.

Transmuralität

In allen Versuchsgruppen war eine Transmuralität des Infarktes durch alle kardialen Schichten - Epikard, Myokard,-Endokard hindurch sichtbar. Die Vergleichbarkeit der Ausgangssituation nach Infarkt konnte dadurch vorausgesetzt werden. Gleichzeitig kann die in allen Gruppen sichtbare Transmuralität für die Etablierung des verwendeten pathologischen Modells herangezogen werden.

Epikardiale Einziehung

Epikardiale Einziehungen, wie sie häufig bei Myocardinfarkten in der postmortalen histopathologischen Beurteilung sichtbar werden (Abb.4.11 auf S.83), waren in den Gruppen der Shamapherese und der Kontrolle vermehrt nachweisbar. In der Gruppe der Verum-Apherese gab es insgesamt weniger epikardiale Einziehungen. (Abb.4.10 auf S.83) Die Bestimmung der statistischen Signifikanz P ergab einen Wert von $p = 0,0056^{**}$ und damit signifikant verschieden von P mit $p > 0,05$.

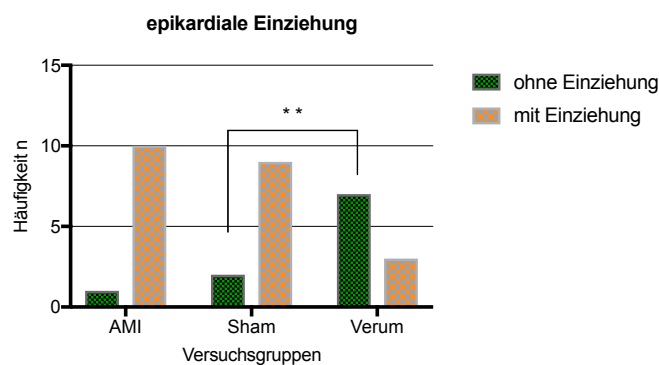
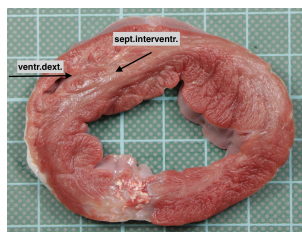


Abbildung 4.10: Vergleichsdarstellung der epikardialen Einziehungen innerhalb des Infarktes für die einzelnen Behandlungsgruppen mit einer Signifikanz verschieden von P mit $p = 0,0056^{**}$.

(bei ns > 0,05, * ≤ 0,05, ** ≤ 0,01, *** ≤ 0,001, **** ≤ 0,0001)



Kontrollgruppe



Sham-Behandlung



Verum-Behandlung

Abbildung 4.11: Vergleichsdarstellung der Infarkte. Anhand der epikardialen Einziehung des infarzierten Gewebes ist zwischen den Gruppen Kontrolle und Shamapherese kein Unterschied ersichtlich. Abweichend hierzu die Darstellung der Verumgruppe. Diese unterscheidet sich deutlich in der fehlenden Ausprägung der epikardialen Einziehung.

Vitale Areale

Vitale Bereiche innerhalb des transmuralen Infarktareals waren gehäuft bei der Gruppe der Verum Apherese nachweisbar. (Abb.4.12 auf S.84) Hier zeigten 60 % der Proben vitale Areale. 40 % wiesen keine bzw. indifferente Zuordnungen auf. Bei der Gruppe der Sham-Apherese lag das Verhältnis bei 33 % der vitalen Areale zu 67 % der fehlenden bzw. nicht klar abgrenzbaren Vitalbereiche. Für die Gruppe ohne additive Apheresetherapie (Kontrollgruppe) lag das Verhältnis bei 27 % der vitalen Areale zu 73 % der fehlenden bzw. nicht zuordenbaren Vitalbereiche. Die Berechnung des Signifikanzniveaus ergab hier eine fehlende Signifikanz P mit $p = 0,2759$ und somit keinen signifikanten Unterschied.

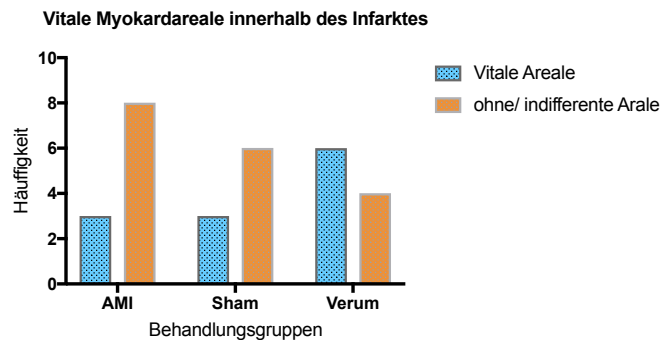


Abbildung 4.12: Vergleichsdarstellung der vitalen Myokardareale innerhalb des Infarktes für die einzelnen Behandlungsgruppen mit fehlender Signifikanz P mit $p = 0,2759$.

(bei $ns > 0,05$, * $\leq 0,05$, ** $\leq 0,01$, *** $\leq 0,001$, **** $\leq 0,0001$)

Für die Berechnungen wurde die Präparatescheiben mit der jeweils größten transmuralen Infarktausdehnung berücksichtigt.

Geometrischer Verlauf

Während der Vermessungen der Infarkte fiel auf, dass es ein scheinbares Muster der Ausdehnung gab. Auch wenn dieses nicht Bestandteil der eigentlichen Fragestellung war, wurden alle Schnitte erneut vermessen. Um die ungleichmäßigen Ausdehnungen

des Infarktes in den einzelnen Schnitten zu berücksichtigen, wurde Konvention gesetzt, dass der Verlauf geometrisch zylindrisch bzw. konisch durch die betroffenen Schichten verläuft. Das Ziel war es zu überprüfen, ob es einen möglichen Zusammenhang zwischen Verlauf und Ausdehnung des Infarktes in Abhängigkeit zur Gruppenzugehörigkeit gibt. Die Auswertung ergab hier jedoch keine eindeutigen Belege für behandlungsspezifische geometrische Verläufe des Infarktes. Allenfalls lassen sich Tendenzen in Richtung des kleinsten geometrischen Verlaufs überwiegend in der Gruppe der Verum-Apherese erkennen. (Abb.4.13 auf S.85)

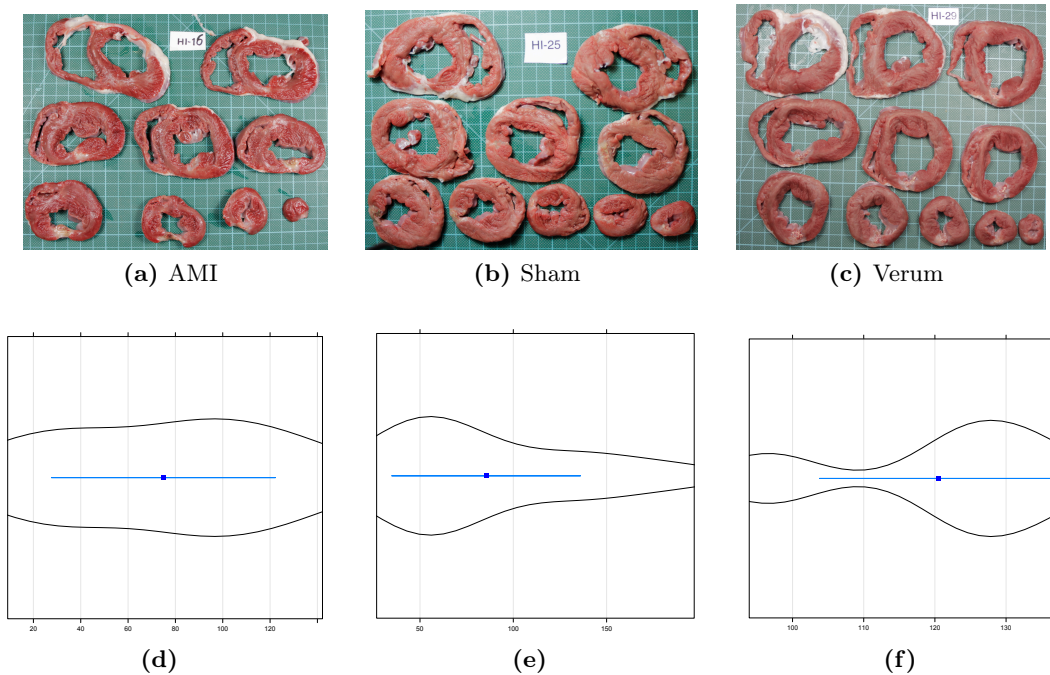


Abbildung 4.13: 2-Dimensionale Darstellung des Infarktverlaufes bezogen auf die Größe der Infarktareale in den einzelnen Präparatescheiben.
a - c: Behandlungsgruppen Kontrolle, Sham, Verum (v.l.n.r.)
d - f: Violinplots der Behandlungsgruppen in der gleichen Reihenfolge. Es wurden jeweils die apikale und die basale Ansicht für die Vermessung berücksichtigt.

Kapitel 5

Diskussion

5.1 Spezifische CRP-Abreicherung

Obwohl der Zusammenhang von CRP in Verbindung mit verschiedenen Erkrankungen bereits seit langem bekannt ist, beschäftigte sich die vorliegende Arbeit mit dem Zusammenhang von CRP und dem Einfluss auf die Narbenbildung im akuten Herzinfarkt und der zunehmenden Bedeutung in der Behandlung von Myokardinfarkten [82] [97].

Durch die erhaltenen Daten konnte belegt werden, dass die extrakorporale Behandlung durch Apherese zu einer Abreicherung von C-reaktivem Protein führt. Dieses Ergebnis deckt sich somit mit den Ergebnissen des Vorversuches von Slagman et al. [97].

Die Nullhypothese (H_0), nach der es keine Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen gibt, wurde aufgestellt. Die Irrtumswahrscheinlichkeit, nach der die Nullhypothese (H_0) abzulehnen wäre, obwohl sie wahr ist, lag bei 5%. Nach der Auswertung der Ergebnisse konnte die Nullhypothese nicht bestätigt werden. Da es bereits sichtbare Unterschiede in den Gruppen gab, ohne dass hierzu Berechnungen durchgeführt wurden oder Messwerte analysiert wurden, konnte die Alternativhypothese angenommen werden.

Die durchgeführten Versuche und die daraus erhaltenen Ergebnisse sollten einerseits die Reproduzierbarkeit des durchgeführten *in vivo* Versuches belegen und andererseits verlässliche Erkenntnisse für die klinische Anwendung nach akutem Myokardinfarkt ergeben [95]. Durch den zeitlich versetzten Anstieg von CRP nach 24–72 h kann eine mögliche Behandlung durchgeführt werden, ohne dabei die klinische Routine zur Behandlung von Myokardinfarkten zu behindern. Die Patienten sind vor Beginn der CRP-Anstiegsperiode bereits Maximalversorgt.

Für die weitere Auswertung wurde dann eine erneute Nullhypothese (H_0) mit einer Alternativhypothese (H_1) aufgestellt. Die zweite Nullhypothese (H_0) lautete, dass das Ergebnis der unterschiedlichen Ausprägung des Infarktes bzw. der gehäuft

vorkommenden epikardialen Einziehung in den Gruppen der Sham-Apherese und der Kontrollgruppe im Vergleich zur Verum-Apheresegruppe ein zufälliges Ereignis darstellte. Das Confidenzintervall lag auch hier bei 95 % und der Fehler der ersten Art wurde mit der Irrtumswahrscheinlichkeit α mit $\alpha = 5\%$ angegeben.

Es konnte belegt werden, dass innerhalb der Verumgruppe eine regelmäßige Reduktion des CRP innerhalb der ersten 24 h nach einem akuten Myokardinfarkt mit einer prozentualen Reduktion auf über die Hälfte $35\% \pm 5.36$, des initial vorhandenen CRP und einer zweiten Apherese nach weiteren 24 h mit einer prozentualen Reduktion auf $26\% \pm 10.82$ sichtbar ist.

Für die Shamgruppe sehen die erhobenen Daten genau gegenteilig aus. Eine Reduktion des CRP-Levels ist hier nach der ersten Behandlung auf $94\% \pm 12.62$ bezogen auf den Ausgangswert nicht sichtbar. Nach der zweiten Behandlung nach 48 h post infarctem wird eine Reduktion auf lediglich $70\% \pm 10.49$ bezogen auf den Ausgangswert sichtbar. (Abb.4.9 auf S.81) Da es im Bereich des Mittelwertes (dargestellt als Kreuz im Box-Whiskers-Diagramm) zwischen der Wertedarstellung vor und nach Behandlung im Gegensatz zur Verumgruppe kaum Verschiebungen gibt, kann die Differenz als Folge der Infusion mit Dilutionseffekt betrachtet werden, der eine relative Verringerung von CRP erzeugt. Für die Gruppe der Shambehandlung wurde kein spezifischer Adsorber eingesetzt.

Aus den erhaltenen Daten zur Abreicherung von im Blutplasma vorliegendem CRP ließ sich die Aussage herleiten, dass eine nachweisbare und sichtbare Depletion unter Verwendung eines CRP-spezifischen Adsorbers möglich war. Der durchgeführte Versuch konnte das belegen. Die Alternativhypothese (H_1) konnte somit angenommen und die Nullhypothese (H_0) abgelehnt werden, nach der die Reduktion von CRP ein zufälliges Ereignis wäre.

Ein Einsatz innerhalb der ersten 24 h nach dem Einsetzen der Symptome bzw. wie im vorliegenden Versuch nach Infarzierung führte zu einer eindeutigen Reduktion des frei im Blutplasma vorliegenden Akute Phase Proteins. Während der Behandlungen, unabhängig zur Behandlungsgruppenezuordnung, konnte ebenfalls gezeigt werden, dass der Einsatz des Adsorbers in Kombination mit dem extrakorporalen Verfahren ohne Risiko verwendet werden konnte.

Kritisch bei der Betrachtung des Versuches wurde die Versuchsdauer bewertet. Der Versuch war für 15 Tage geplant. Eine längere Versuchsdauer, die die Ergebnisse deutlicher belegen bzw. sichtbare Tendenzen in der Auswertung, wie z.B. die Ausprägung von vitalen Arealen innerhalb des Infarktareals, eindeutiger darstellen, konnten mit der vorhandenen Infrastruktur und den technischen Voraussetzungen nicht umgesetzt werden. Ideal wäre eine Versuchsdauer von 3 Monaten mit einer

bildgebenden Darstellung des Infarktareals im MRT. Möglich wäre hier die Verwendung von Göttinger Minipigs, um eine Langzeitversuch auch mit adulten Tieren durchführen zu können und nicht durch technische Limitationen begrenzt zu werden.

Kapitel 6

Zusammenfassung

Anhand der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob es möglich ist, nach einem akuten Myokardinfarkt den unspezifischen Entzündungsmarker CRP durch Apherese zu reduzieren. Gleichzeitig sollte evaluiert werden, ob durch die Reduktion von CRP eine veränderte Morphologie der Infarktnarbe in Abhängigkeit zur Behandlungsgruppe sichtbar wird. Zwischen CRP und Narbenbildung besteht ein direkter Zusammenhang. Die geschädigten Zellen werden mit Einsetzen der Komplementkaskade durch vermehrte Synthese von CRP „markiert“ und somit für proinflammatorische Makrophagen präsentiert. Dabei wird jedoch nicht zwischen letalen bzw. beschädigten und energiedefizienten, aber intakten Zellen unterschieden. Eine Reduktion des Narbenareals führt in der Folge zu einer besseren Rekrutierung von vitalem Gewebe bei gleichzeitiger besserer Kontraktilität im Verhältnis zum unbehandelten Infarkt. Für die Beantwortung der Fragestellungen wurden weibliche Hybridschweine eingesetzt, die in 3 Behandlungsgruppen nach

- Kontrollgruppe (ohne spezifische Behandlung)
- Sham-Apherese
- Verum-Apherese eingeteilt wurden.

Das durch den myokardialen Infarkt vermehrt synthetisierte Akute-Phase-Protein CRP sollte durch 2-malige Apheresebehandlung des separierten Blutplasmas im Abstand von jeweils 24 h nach Infarkt ereignis reduziert werden. Durch die Reduktion von CRP als Marker sollte energiedefizitären Zellen die Möglichkeit der Erholung gegeben werden. Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigten, dass eine signifikante Reduktion von CRP in der Gruppe der Verumapherese möglich war. Nach der ersten Behandlung 24 h nach Infarkt ereignis wurden die CRP-Werte auf 35 % des Ausgangswertes gesenkt. Die zweite Behandlung nach 48 h ergab eine weitere Reduktion auf 26 % zum Bezugswert. Darüber hinaus war in der Gruppe der Verumapheresebehandlung gegenüber den

Tieren der Sham- bzw. der Kontrollgruppe eine deutliche Reduktion der epikardialen Narbe erkennbar. Im Ausblick ergeben sich nun die Fragen, wie sich das Gewebe im Infarktareal nach CRP-Apherese über eine Laufdauer von 8–12 Wochen verhält und welche Makrophagensubtypen am Umbauprozess des infarzierten Gewebes beteiligt sind und wie ihre Differenzierung durch die CRP-Reduktion beeinflusst wird. Über die wissenschaftliche Fragestellung hinaus könnte in weiteren präklinischen Studien geklärt werden, ob es einen direkten Zusammenhang zwischen einer verkleinerten Narbenfläche und einer Verbesserung von kardialer Pumpfunktion und klinischer Prognose gibt.

A comparative study in a porcine model of acute myocardial infarction after apheresis by use of a crp-specific adsorber

6.1 Summary

In this investigation, the feasibility of intentional reduction of unspecific acute phase protein capsular-reactive-protein (CRP) after acute myocardial infarction was tested. Testing was conducted by applying a CRP-specific adsorption plasma filter. Simultaneous evaluation of CRP removal and the change of morphology according to treatment, was evaluated. A direct correlation between CRP and scar tissue is known. The initiation of the complement cascade leads to an increased flagging of injured cells and is the direct event prior to presentation for inflammatory macrophages. Through this there is no differentiation between lethally injured cells and intact cells in a hibernating state. A reduction of scar tissue leads to an increased recruitment of vital tissue and concomitant to a better contractility at the level of untreated infarction. For these questions we used female hybrid pigs in 3 treatment groups

- control (without specific treatment)
- sham-apheresis
- verum-apheresis where scaled.

Augmented synthesized CRP through the myocardial infarction should be decreased by double treatment of the separated blood plasma in intervals of 24h after the event. Reduction of soluble CRP decreased the amount for flagging. Time for cell recovery is given. A significant reduction of CRP in the verum treatment was shown to be successful. The research results shown, that a significant reduction of CRP in the verum-treatment group was successful. After the first depletion 24 h post infarction the amount of CRP was decreased to 35%. Between the control, sham and verum treated animals, a considerable reduction of the pericardial scar was visible. For further research we wish to address how tissue regeneration occurs over 8 to 12 weeks and

which subtypes of macrophages are involved in the reconstruction. An additional question of interest is to determine if there is an influence on differentiation of macrophages by CRP-depletion? The questions previously suggested here, as well as, current preclinical studies may elucidate a direct correlation between reduced scar area and improved cardiac output.

Danksagung

Viele Menschen haben mich auf dem Weg zum Abschluss dieser Arbeit begleitet. Sie haben mich unterstützt, beraten und auch immer wieder gefordert. Sie alle haben eines gemeinsam. Sie haben mir das gegeben, was mir oft gefehlt hat. Das Vertrauen in meine eigenen Fähigkeiten.

Mein besonderer Dank gilt Birgit Vogt und Dr. Ahmed Sheriff, die mir diese Arbeit ermöglicht haben.

Meinem Betreuer am Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin, Prof. Dr. Robert Klopffleisch, danke ich für seine Geduld und die fachliche Unterstützung.

Für die externe Betreuung durch das Herzzentrum Berlin bedanke ich mich bei Herrn PD Dr. Daniel Messroghli.

Ich bedanke mich bei Frau Dr. Katharina Wassilew und den Damen des Labors der Pathologie des Deutschen Herzzentrums für die Anfertigung der unendlich vielen histologischen Präparate. Aufrichtiger Dank gilt meinen Kollegen der gesamten Forschungsgruppe für die gemeinsame Zeit, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ich danke meiner Familie für das Vertrauen und die Unterstützung.

Und ich danke Freunden, die mir zur Seite gestanden haben.

Ohne diese Menschen und auch diejenigen, die hier nicht aufgeführt sind, wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Danke.

Literaturverzeichnis

- [1] *Arzneimittel-Fachinformationen (CH, D)*.
- [2] *Arzneimittel-Fachinformationen (CH, USA)*.
- [3] Europäisches Arzneimittelbuch PhEur.
- [4] Kommentar zu den Leitlinien der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie (ESC) zur Diagnostik und Therapie von Patienten mit ST-Streckenhebungsinfarkt (STEMI). (4), 2010.
- [5] Kommentar zu den Leitlinien der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie (ESC) zur Diagnostik und Therapie des akuten Koronarsyndroms ohne persistierende ST-Streckenhebung. 6, 2012.
- [6] *Todesursachen in Deutschland 2014*. Statistisches Bundesamt D-STATIS, 2015.
- [7] *Todesursachen in Deutschland 2015*. Statistisches Bundesamt D-STATIS, 2015.
- [8] Ansardi D Macon K.J Volanakis J.E Agrawal A, Xu Y. Probing the phosphocholine-binding site of human c-reactive protein by site directed mutagenesis. *J Biol Chem*, 267:25352–25358, 1992.
- [9] Bottazzi B Garlanda C Mantovani A Agrawal A, Singh PP. *Pattern Recognition by Pentraxins*, volume 653. 2009.
- [10] Phibbs B. “transmural” versus “subendocardial” myocardial infarction: an electrocardiographic myth. *J Am Coll Cardiol*, 1:561–4, 1983.
- [11] Goa KL Battershill PE, Bernfield P. Streptokinase. a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in acute myocardial infarction in older patients. *Drugs Aging*, 4(1):63–86, 1994.
- [12] B.C.D.S.G. Regular aspirin intake and acute myocardial infarction,. *British Medical Journal*, 1:440–443, 1974.

- [13] Moosmayer I Offermann G Zidek W Beige J, Perez-Canto A. *Immunoabsorbtion With Tryptophan Adsorbers for Successful Treatment of Late Steroid-Refractory Recurrent Focal Glomerulosclerosis*, volume 3. Blackwell Munksgaard, 2003.
- [14] Fox K.A.A et al Bertrand M.E, Simoons M.L. Management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistentst-segment elevation. *Eur Heart J*, 23:1809–1840, 2002.
- [15] Babyak MA et al. Blumenthal JA, Jiang W. Stress management and exercise training in cardiac patients with myocardial ischemia. *Arch Intern Med.*, 157:2213–2223, 1997.
- [16] Marban E. Bolli R. Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol Rev*, 79(2):609–34, 1999.
- [17] Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften(AWMF) Bundesärztekammer(BÄK), Kassenärztliche Bundesvereinigung(KBV). Nationale versorgungsleitlinie chronische khk-langfassung. DOI:10.6101/AZQ/000267, 2016.
- [18] Gabay C. Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Res Ther*, 8 Suppl(2):3, 2006.
- [19] Hingorani AD Danesh J Pepys M.B Casas J..P, Shah T. C-reactive protein and coronary heart disease: a critical review. *J Intern Med*, 264:295–314, 2008.
- [20] Popp S et al. Christ M, Bertsch T. High-sensitivity troponin assays in the evaluation of patients with acute chest pain in the emergency department. *Clin Chem Lab*, 49(19), 2011.
- [21] Olshaker JS Clyne B. The c-reactive protein. *J Emergency Medicine*, 6:1019–1025, 1999;.
- [22] Cannon CP. Defining acute myocardial infarction by st segment deviation. *Eur Heart J*, 21:266–7, 2000.
- [23] Hirschfield GM Eda S Eiriksdottir G Rumley A Lowe GDO Pepys MB Gudnason V Danesh J, Wheeler JG. C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. *New England Journal of Medicine*, 350:1387–1397, 2004.

- [24] Baltz ML Trayner IM Feinstein A Pepys MB De Beer FC, Soutar AK. Low density lipoprotein and very low density lipoprotein are selectively bound by aggregated c-reactive protein. the journal of experimental medicine. *The Journal of Experimental Medicine*, 156:230–242, 1982.
- [25] Martin JL Monjaud J Delaye J Mamelle N De Longeril M, Salen P. Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction. final report of the lyon diet heart study. *Circulation*, 99:779–785, 1999.
- [26] Ignjatović S Singh NM Dimitrijević O, Stojcevski BD. Serial measurements of c-reactive protein after acute myocardial infarction in predicting one-year outcome. *Int Heart J.*, 47(6):833–42, Nov 2006.
- [27] Wright J.R Dong Q. Expression of c-reactive protein by alveolar macrophages. *J Immunol*, 156:4815–4820, 1996.
- [28] Butcher K et al. Thrombolysis in the developing world: Is there a role for streptokinase? *Int J Stroke*, 8(7):560–565, 2013.
- [29] Diebolder C.A et al. Complement is activated by igg hexamers assembled at the cell surface. *Science*, 343(6176):1260–63, März 2014.
- [30] Hoffmann J.A et al. Phylogenetic perspectives in innate immunity“. *Science*, 284:1313–1318, 1999.
- [31] Jagannadha Rao Peela et al. Cardiac biomarkers: the troponins and ck.mb. *Ibnosiana Journal of Medicine and Biomedical Sciences*, 2(5):190–197, July 2010.
- [32] Pinckard R.N et al. Consumption of classical complement components by heart subcellular membranes in vitro and in patients after acute myocardial infarction. *J Clin Invest*, 56(3):740–50, 1975.
- [33] Schofer N et al. Kommentar zur dritten allgemeinen Definition des Myokardinfarktes der gemeinschaftlichen ESC/ ACCF/ AHA/ WHF Task Force, 2014.
- [34] Wallmann T et al. *The Phosphocreatine Circuit: Molecular and Cellular Physiology of Creatine Kinases, Sensitivity to Free Radicals, and Enhancement by Creatine Supplementation*. Number ISBN 978-3-527-31787-5. Valdur Saks, Wiley, 2007.

- [35] Epstein F. Acute phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med*, (340):448–454, 1999.
- [36] Kolb-Bachofen V Fehsel K, Plewe D. Nitric oxide-induced expression of c-reactive protein in islet cells as a very early marker for islet stress in the rat pancreas. *Nitric Oxide Jun*, 1(3):254–62, 1997.
- [37] Ravkilde J et al. Gerhardt W, Katus H. S-troponin t in suspected ischemic myocardial injury compared with mass and catalytic concentrations of s-creatinine kinase isoenzyme mb. *Clin Chem*, 37(8):1405–1411, 1991.
- [38] Gesellschaft für Versuchstierkunde GV-SOLAS. *Fütterungskonzepte und -methoden in der Versuchstierkunde und im Tierversuch*. Ausschuss für Ernährung der Versuchstiere, Juni 2001.
- [39] Siegel J Fiedel B Gewurz H, Mold C. C-reactive protein and the acute phase response. *Adv Int Med*, 27:345–372, 1982.
- [40] Goa K.L Gillis J.C, Wagstaff A.J. Alteplase. a reappraisal of its pharmacological properties and therapeutic use in acute myocardial infarction. *Drugs*, 50(1):102–36, 1955.
- [41] Dreyer C Göthert M, Bischoff D. The influence of inhalation anaesthetics on catecholamine secretion from the adrenal medulla in vivo. *Anaesthesist. PMID 1130636.*, 24(1):19–26, Januar 1975.
- [42] Hutchinson W.L Taylor K.M Sohail M Krausz T Pepys M.B Griselli M, Herbert J. C-reactive protein and complement are important mediators of tissue damage in acute myocardial infarction. *J Exp Med.*, 190(12):1733–40, December 1999.
- [43] Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*, 69(3):89–95, March 2001.
- [44] Agewall S et al. Hamm CW, Bassand JP. Esc guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients present ing without persistent stsegment elevation: The task force for the management of acute coronary syndromes (acs) in patients presenting without persistent stsegment elevation of the euro pean society of cardiology (esc). *European heart journal*, 32:2999–3054, 2011.

- [45] Lindquist L. Hansson LO. C-reactive protein: its role in the diagnosis and follow-up of infectious diseases. *Current Opinion Infectious Diseases*, 10:196–201, 1997.
- [46] van der Ven C Birkmann C Haupt W.F, Rosenow F. Immunoabsorption in guillain-barré syndrome and myasthenia gravis. *Ther Apher.*, 4(3):195–7, June 2000.
- [47] Krieger J Haap M Häring H.U Heyne N, Guthoff M. High cut-of renal replacement therapy for removal of myoglobin in severe rhabdomyolysis and acute kidney injury: a case series. *Nephron Clin Pract.*, 121(3-4):159–64, 2012.
- [48] Ward P.A Hill J.H. The phlogistic role of c3 leukotactic fragments in myocardial infarcts of rats. *J Emerg Med*, 133(4):885–900, 1971.
- [49] Waldemar Hort. *Pathologie des Endokard, der Kranzarterien und des Myokard*, volume 22. Springer, 2000.
- [50] Werner Böcker (Hrsg.):. *Pathologie*. Urban und Fischer, 4.aufgabe, s479 edition, 2008.
- [51] Kushner I. Regulation of the acute phase response by cytokines. *Perspect Biol Med*, 36(4):611–22, 1993.
- [52] Walport M Shlomchik MJ Janeway CA, Travers P. *Immunobiology-the immune system in health and disease*. Galand Science, 6th edition, 2005.
- [53] JANSSEN-CILAG GmbH. *Fachinformation für DUROGESIC SMAT 75µg/h transdermales Pflaster*, stand 07/2015 edition.
- [54] Gibson CM Jeremias A. Narrative review: alternative causes for elevated cardiac troponin levels when acute coronary syndromes are excluded. *Ann Intern Med.*, 142(9):786–91, May 2005.
- [55] Zhihua Y Weizhen H Lijuan Z Weihong K Zhizhong Y Jinxian H, Guoxiang S. Rapid reduction of antibodies and improvement of disease activity by immunoabsorption in chines patients with severe systemic lupus erythematosus. *Clin.Rheumatol*, 35:2211–2218, 2016.
- [56] E.Kienzle J.Pallauf O.Simon J.Zentek J.Kamphues, M.Coenen. *Supplemente zu Vorlesungen und Übungen in der Tierernährung*. Verlag M&H Scharper, 10. überarbeitete auflage edition, 2004.

- [57] Schüren K.-P. *Berliner Ärzte*, 37(13), 2000.
- [58] Volanakis J.E Kaplan M.H. Interaction of c-reactive protein complexes with the complement system. / consumption of human complement associated with the reaction of c-reactive protein with pneumococcal c-polysaccharide and with the choline phosphatides, lecithin and sphingomyelin. *J Immunol*, 112:2135–2147, 1974.
- [59] Schwarting A Himmelsbach F Straube R Klingel R, Göhlen B. Differential indication of lipoprotein apheresis during pregnancy. *Ther Apher Dial.*, 7(3):359–64, June 2003.
- [60] Dürr UM Kraft W. *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*. Schattauer GmbH, 2005.
- [61] Welte T Krüger S. Biomarkers in community-acquired pneumonia. *Expert Rev Resp med.*, 6(2):203–214, 2012.
- [62] von Scheidt W Kuch B, Löwel H. Einteilung des akuten Herzinfarktes nach EKG-morphologischen Kriterien - epidemiologische Daten und prognostische Implikationen. *Journal für Kardiologie - Austrian Journal for Cardiology*, 10(3):103–106, 2003.
- [63] von Scheidt W et al. Kucher B, Heier M. 20-year trends in clinical characteristics, therapy and short-term prognosis in acute myocardial infarction according to presenting electrocardiogram: the monika/ kora ami registry (1995-2004). *J Intern Med*, 264(3):254–264, 2008.
- [64] Abbas S Kuepper-Nybelen J, Hellmich M et al. Association of long-term adherence to evidence-based combination drug therapy after acute myocardial infarction with all-cause mortality. a prospective cohort study based on claims data. *Eur J Clin Pharmacol*, 68(10):1451–1460, 2012.
- [65] Ellaiah P Kunamneni A, Abdelghani T.T. Streptokinase - the drug of choice for thrombolytic therapy. *Int J Stroke*, 8(7):9.23, 2013.
- [66] Craven L.L. Experiences with aspirin (acetylsalicylic acid) in the nonspecific prophylaxis of coronary thrombosis. *Miss Valley Med J*, 75(1):38–44, Jan 1953.
- [67] Craven L.L. Prevention of coronary and cerebral thrombosis. *Miss Valley Med J*, 78(5):213–5, Sept 1956.

- [68] Morrison LM. Diet in coronary atherosclerosis. *JAMA*, 173:884–888, 1960.
- [69] Borgers M. Hibernating myocardium: Programmed cell survival or programmed cell death? *Exp Clin Cardiol*, 7(2-3):69–72, August 2002.
- [70] Jick M. Regular aspirin use and myocardial infarction; acetylsalicylic acid in cerebral ischemia and coronary heart disease. Master's thesis, IV Colfarit-Symposium Berlin, 1977.
- [71] McKenna CJ O'Rourke C McCann HA Sugrue DD. Mahon NG, Codd MB. Characteristics and outcomes in patients with acute myocardial infarction with st- segment depression on initial electrocardiogram. *Am Heart J*, 139:311–9, 2000.
- [72] Schoeller R Maier B, Thimme W et al. Improved therapy and outcome for patients with acute myocardial infarction data of the berlin myocardial infarction registry from 1999 to 2004. *Int J Cardiol*, 130(2):211–219, 2008.
- [73] Busse R. Mangiapane S. Prescription prevalence and continuing medication use for secondary prevention after myocardial infarction. the reality of care revealed by clames data analysis. *Dtsch.Ärztebl Int*, 108(50):856–862, 2011.
- [74] Gerichtliche Veterinärmedizin. Medizinische Tierklinik Klinik für innere Krankheiten der Pferde, Wiederkäuer und Schweine. Referenzbereich schwein - labordiagnostik.
- [75] Tosi P.A Micieli G, Marcheselli S. Safety and efficacy of alteplase in the treatment of acute ischemic stroke. *Vasc Health Risk Manag*, 5(1):397–409, 2009.
- [76] Misc. Guidelines on management stable coronary artery disease. *Eur Heart J*, 2013.
- [77] Hirschl MM. Troponine. *Journal für Kardiologie - Austrian Journal for Cardiology*, 13:301–305, 2006.
- [78] Nakayama S Edwards KM Gewurz H Mold C, Clos du TW. C-reactive protein reactivity with complement and effects on phagocytosis. *Ann NY Acad Sci*, 389:251–261, 1982.
- [79] Lubbers YT Visser CA Meijer CJ Niessen HW Hack CE Nijmeijer R, Lagrand WK. C-reactive protein activates complement in infarcted human myocardium. *Am J Pathol*, 163:269–275, 2003.

- [80] Yusuf S. et.al O'Connor GT, Buring I. An overview of randomised trials of rehabilitation with exercise after myocardial infarction. *Circulation*, 80:234–244, 1989.
- [81] Baltz M.L Pepys M.B. Acute phase proteins with special reference to c-reactive protein and related proteins (pentaxins) and serum amyloid a protein. *Adv Immunol*, 34:141–212, 1983.
- [82] Hirschfeld G.M Pepys M.B. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest*, 111:1805–1812, 2003.
- [83] Baron D Playfair J.H.L. *Immunologie*. Blackwell, 1995.
- [84] Merliss A Prinzmetal R, Kennamer R. A variant form of angina pectoris. *In Am J Med*, (27):375–388, 1959.
- [85] Lipid Research Clinics Program. The lipid research clinics coronary primary prevention trial results: 1. reduction in incidence of coronary heart disease. *JAMA*, 251:351–364, 1984.
- [86] Weinstein R. Therapeutic apheresis in neurological disorders. *J Clin Apher.*, 15(1-2):74–128, 2000.
- [87] Omerovic E Redfors B, Shao Y. Myocardial infarct size and area at risk assessment in mice. *Exp Clin Cardiol*, 17(4):268–272, 2012.
- [88] Bassetti S et al. Reichlin T, Hochholzer W. Early diagnosis of myocardial infarction with sensitive cardiac troponin assays. *The New England journal of medicine*, 361:858–67, 2009.
- [89] Drexler B et al. Reichlin T, Schindler C. Onehour ruleout and rulein of acute myocardial infarction using highsensitivity cardiac troponin t. *Arch Intern Med*, 172:1211–8, 2012.
- [90] Harald Renz. *Praktische Labordiagnostik- Lehrbuch zur Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Hämatologie*. ISBN 978-3-11-019576-7. Walther de Gruyter, Berlin, 2009.
- [91] Schaefer Hans-Eckart Riede Ursus-Nikolaus. *Allgemeine und spezielle Pathologie*. Number ISBN 3-13-129684-4. Georg Thieme Verlag, 4.aufgabe edition, 1999/2001.

- [92] Wallimann T Schlattner U, Tokarska-Schlattner M. Mitochondrial creatine kinase in human health and disease. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1762(2):164–180, February 2006.
- [93] Reid KB Sellar GC, Blake DJ. "characterization and organization of the genes encoding the a-, b- and c-chains of human complement subcomponent c1q. the complete derived amino acid sequence of human c1q". *Biochem J*, 274(2):481–90, March 1991.
- [94] Tullius S Sauer I Frei U Schindler R Senf R, Klingel R. Billirubin-adsorption in 23 critically ill patients with liver failure. *Int J Artif Organs*, 27(8):717–22, August 2004.
- [95] Vogt B Abdel-Aty H Unger JK Bock C Gebauer F Slagman A Jerichow T Mans D Yapici G Janelt G-Schröder M Kunze R Möckel M. Sheriff A, Schindler R. Selective apheresis of c-reactive protein: a new therapeutic option in myocardial infarction? *J Clin Apher.*, 30(1):15–21, February 2015.
- [96] Holden D Turnell WG Volankis JE Pepys MB Bloomer AC Greenthough TJ Shrive AK, Cheetham GM. Three dimensional structure of human c-reactive protein. *Nat Struct Biol*, 3(4):346–54, April 1996.
- [97] Abdel-Aty H Vogt B Gebauer F Janelt G Wohlgemuth F Morgenstern R Yapici G Puppe A Modersohn D Mans D-Jerichow T Ott S Kunze R Schrödl W Christina Janko C Hermann M Kalden JR Kern P Parsch H Kirschfink M Schulz-Menger J Röttgen R Unger JK Frei U Schindler R Möckel M Ahmed Sheriff A Slagman AC, Bock C. Specific removal of c-reactive protein by apheresis in a porcine cardiac infarction model. *Blood Purif*, 31:9–17, 2011.
- [98] Harimoto D et al. Stone MJ, Waterman MR. Serum myoglobin level as diagnostic test in patients with acute myocardial infarction. *British Heart Journal*, 39(4):375–80, April 1977.
- [99] Volonakis J.E Szalai A.J, Briles D.E. C-reactive protein is protective against fatal streptococcus pneumoniae infection in transgenic mice. *J Immunol*, 155:2557–2563, 1995.
- [100] Maeda K Maeda Y Takeda S, Yamashita A. Structure of the core domain of human cardiac troponin in the ca(2+)-saturated form. *Nature*, 424(6944):35–41, 2003.

- [101] Jaffe AS Simoons ML Chaitman BR Thygesen K, Alpert JS. Third universal definition of myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology.*, 60(16):1581–1598, 2012.
- [102] Francis Jr.T Tillett W.S. Serological reactions in pneumonia with a nonprotein somatic fraction of pneumococcus. *In J Exp Med*, 52:561–585, 1930.
- [103] Reiter M Muller C. Twerenbold R, Reichlin T. Highsensitive cardiac troponin: friend or foe? *Swiss medical weekly*, 141:13202, 2011.
- [104] Felix Unger. *Herzerkrankungen und Interventionsmöglichkeiten*. ISBN 13:978-3-642-80405-2. Springer-Verlag, Berlin, 1998.
- [105] Betriu A Cokkinos D Falk E Fox K Julian D Lengyel M Neumann F-J Ruzyllo W Thygesen C Underwood S Vahanian A Verheugt F Wijn W Vande Werf F, Ardissino D. Management of acute myocardial infarction in patients presenting with st-segment elevation. task force of the esc. *Eur Heart J*, 24:28–66, 2003.
- [106] Mensa J Sanchez F Marcos M.A de Roux A. Torres A. Vazquez E.G, Martinez J.A. C-reactive protein levels in community-acquired pneumonia. *European Respiratory Journal*, 21:702–705, 2003.
- [107] Schiele R.et al. Wagner S, Schneider S. Akuter Myokardinfarkt in Deutschland im Zeitraum zwischen 1996 und 1998: Therapie und hospitaler Verlauf Ergebnisse des Myokardinfarktregisters (MIR) in Deutschland. *Zeitschrift für Kardiologie*, 88(10):857, Oktober 1999.
- [108] Willan N Cook D Wilson K, Gibson N. Effect of smoking cessation on mortality after myocardial infarction. *Arch Int Med.*, 160:939–944, 2000.
- [109] Satani M Yamamoto A Yokoyama S, Hayashi R. Selective removal of low density lipoprotein by plasmapheresis in familial hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis*, 5:613–622, November/ December 1985.
- [110] Theres H et al. Zeymer U, Hambrecht R. Treatment of st-segment elevation acute myocardial infarction in hospitals with and without cardiac catheterization laboratory. *Deutsche Medizinische Wochenschrift (DMW)*, 138(39):1935–1940, 2013.
- [111] Giannoglou G Souliou E Gemitzis K Kalampalika D Vayona MA Pidonia I Parharidis G Louridas G Ziakas A, Gavriliadis S. In-hospital and long-term prognostic value of fibrinogen, crp, and il-6 levels in patients with acute

myocardial infarction treated with thrombolysis. *Angiology*, 57(3):283–93, May-Jun 2006.

- [112] Kalb K Bunia J Heibges A Klingel R Zolotov D, Wagner S. Long-term strategies for the treatment of refsum´s disease using therapeutic apheresis. *J Clin Apher.*, 27(2):99–105, Jan 2012.

Selbstständigkeitserklärung

Es wurden keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet. Die selbstständige und eigenhändige Anfertigung wird versichert an Eides statt.

Berlin, den 20. Februar 2020

Jens Ötvös