

Abkürzungen	5
1. Zusammenfassung	7
2. Summary	9
3. Einleitung	10
3.1. Kryotherapie	11
3.1.1. Geschichte der Kryotherapie	11
3.1.2. Mechanismen der Zerstörung durch Kälte	12
3.1.2.1. Extra- und intrazelluläre Eiskristallbildung	12
3.1.2.2. Die drei Phasen des Frierzyklus	13
3.1.2.3. Mikrozirkulationsstörungen	14
3.1.3. Komplikationen	15
3.1.3.1. Perioperative Komplikationen	15
3.1.3.2. Die Rezidivrate	16
3.1.4. Der doppelte Frierzyklus	17
3.1.5. Selective Vascular Clamping (SVC)	18
3.2. Hämostase	19
3.2.1.1. Kaskade der plasmatischen Gerinnung	19
3.2.1.2. Thrombin	22
3.2.1.3. Inhibitoren des plasmatischen Gerinnungssystems	23
3.2.1.4. Das fibrinolytische System	23
3.2.1.5. Die disseminierte intravasale Gerinnung/das Kryoschockphänomen	25
3.2.2. Parameter des Gerinnungs- und Fibrinolyse-Systems	26
3.2.2.1. Prothrombinfragmente 1+2 (F1+2)	26
3.2.2.3. Antithrombin III (ATIII)	26
3.2.2.3. Thrombin-Antithrombin III Komplex (TAT)	27
3.2.2.4. Fibrinolyseprodukte (D-Dimere)	27
3.3. Immunologische Grundlagen	27
3.3.1. Zytokine	28
3.3.1.1. Pro-inflammatorische Zytokine	29

3.3.1.1.1.	Interleukin-6 (IL-6)	29
3.3.1.1.2.	Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α)	30
3.3.1.2.	Anti-inflammatorische Zytokine	32
3.3.1.2.1.	Interleukin-4 (IL-4)	32
3.3.1.2.2.	Interleukin-10 (IL-10)	33
3.3.1.2.3.	Transforming-growth-factor-beta (TGF-beta)	33
3.4	Aprotinin	34
3.4.1	Struktur und Wirkung des Aprotinins	34
3.4.2.	Einfluss auf das Gerinnungssystem	35
3.4.3.	Modulation der systemischen Immunantwort	37
3.4.4.	Klinische Anwendung	39
3.5.	Fragestellung	39
4.	Material und Methode	40
4.1.	Die Arbeitsgruppe	40
4.2.	Tierexperimente	40
4.2.1.	Versuchstierhaltung	40
4.2.2.	Prämedikation und Narkose	40
4.2.3.	Operationsdurchführung	41
4.2.4.	Kryogerät und Kryosonde	43
4.2.5.	Nachbeobachtung	44
4.3.	Gruppeneinteilung und Kryotherapiemethoden	45
4.3.1.	Beschreibung des Versuchsablaufs für Gruppe 1-5	45
4.3.1.1.	Gruppe 1: Sham OP	45
4.3.1.2.	Gruppe 2: "2x7,5 min Frieren"	46
4.3.1.3.	Gruppe 3: "15 min Frieren"	47
4.3.1.4.	Gruppe 4: " 15 min Frieren + Selektives vaskuläres Clamping" (SVC)	48
4.3.1.5.	Gruppe 5: " 15 min Frieren + Aprotiningabe"	49
4.3.2.	Todeszeitpunkt und Euthanasie	50
4.3.3.	Obduktion	50
4.4.	Material, Reagenzien	51

4.4.1.	Gewinnung der Proben und Entnahmezeitpunkte	51
4.4.2.	Bestimmung der Gerinnungsparameter	51
4.4.2.1.	Antithrombin III (ATIII)	51
4.4.2.2.	Thrombin-Antithrombin III-Komplex (TAT)	52
4.4.2.3.	Fibrinspaltprodukte (D-Dimere)	53
4.4.2.4.	Prothrombinfragmente 1+2 (F1-F2)	54
4.4. 3.	Bestimmung der Zytokine	55
4.4.4.	Statistik	57
5.	Ergebnisse	58
5.1.	Klinische Observation	58
5.1.1.	Intraoperativer Verlauf	58
5.1.2.	Intraoperative Komplikationen	58
5.1.3.	Postoperativer Verlauf	58
5.1.4.	Postoperative Komplikationen	58
5.2.	Hämatologische und biochemische Parameter	60
5.2.1.	Gerinnungsparameter	60
5.2.1.1	Auswertung des Verlaufs der Gerinnungsparameter	67
5.2.2.	Pro- und antiinflammatorische Zytokine	72
5.2.2.1.	Auswertung der immunologischen Parameter	76
6.	Diskussion	79
6.1.	Tiermodell	79
6.2.	Narkose	80
6.3.	Komplikationen und Überleben	81
6.4.	Beobachtungszeitraum	82
6.5.	Parameter	82
6.6.	Methodik	83
6.7.	Ergebnisse	84

6.7.1.	Die Gerinnungsparameter	85
6.7.2.	Der doppelte Frierzyklus	85
6.7.3.	Einfluss des Selektiven vaskulären Clampings (SVC)	86
6.7.4.	Die Blutgerinnung unter Aprotiningabe	88
6.7.5.	Die Zytokinmessungen	90
6.7.6.	Die Zytokinwerte unter Aprotiningabe	94
6.7.7.	Studienergebnisse der Zytokinbestimmungen	95
6.8.	Zusammenfassung, klinischer Ausblick und Bedeutung für die Klinik	98
7.	Literaturverzeichnis	99
8.	Dank und Widmung	116
9.	Lebenslauf	117
10.	Nachtrag	119

Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
Ak	Antikörper
API	Activated protease inhibitor
ATIII	Antithrombin III
BSA	Bovine serum albumin
CBP	Cardiopulmonary bypass
CSF	Colony stimulating factor
DA	Dalton
D-Dimere	Fibrinspaltprodukte
DIC	Disseminated intravascular coagulation
EGF	Epithelial growth factor
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
F 1+2	Prothrombinfragment 1+2
F II	Prothrombin
F IIa	Thrombin
F III	Gewebsthrombokinase
F IX	Christmas-factor
F V	Leidenfaktor
F VII	Plasmatischer Faktor VII
F VIII	Plasmatischer Faktor VIII
F X	Stuart-Prower-factor
F XII	Hagemann-Faktor
F XIII	Fibrinstabilisierender Faktor
F	Faktor
FI	Fibrinogen
GPIIb/IIIa	Glykoproteinrezeptor
GPIb/Ic/IIa	Glykoproteinrezeptor
HMWK	Hochmolekulares Kininogen
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IL	Interleukin
KG	Körpergewicht
KIE	Kallikrein Inhibitor Einheit

MHC	Major histocompatibility complex
MRI	Magnetic resonance imaging
NO	Stickstoffmonoxyd
OP	Operation
PAI-1	Plasminogen Aktivator Inhibitor vom Typ 1
PAR	Protease activated receptor
PBS	Phosphat buffered saline
PF	Plättchenfaktor
PI	Phospholipide
POD	Postoperative day
SVC	Selective vascular clamping
TAT	Thrombin-Antithrombin- Komplex
TF	Tissue-factor
TFPI	Tissue factor pathway inhibitor
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
tPA	Gewebetyp-Plasminogen-Aktivator
uPA	Urokinase-Plasminogen-Aktivator
ZVK	Zentraler Venenkatheter

1. Zusammenfassung

In den vergangenen 10 Jahren brachten lokal-destruktive Verfahren wie die Kryochirurgie in der Behandlung von primären und sekundären Lebermalignomen eine entscheidende Wende. Bis dahin waren die therapeutischen Möglichkeiten eher gering, 60-90% aller Metastasen von kolorektalen Tumoren werden als nicht resektabel angegeben. Die Kryochirurgie ist ein lokal-destruktives Verfahren zur Vernichtung malignen Gewebes. Das gesunde umliegende Gewebe kann durch die präzise Lokalisationsmöglichkeit der Kryosonde weitgehend erhalten bleiben. Die Resorption der Nekrosen erfolgt durch körpereigene Abbau- und Wundheilungsprozesse. Trotz der an sich Erfolg versprechenden Methode gibt es diverse Fallberichte, in denen es in Folge der Frierbehandlung zu schweren Koagulopathien bis hin zur disseminierten intravasalen Gerinnung und dem sogenannten „Kryoschockphänomen“ gekommen ist. Diesem Problem widmeten sich die Forschungsarbeiten dieser Studie. Es wurde untersucht, inwiefern der Serinproteaseinhibitor Aprotinin diese Gerinnungskomplikationen verringern kann. Aprotinin wurde besonders bekannt durch seinen Einsatz in der Herz-Thorax-Chirurgie, wo es erfolgreich zur Reduktion des Blutverlustes eingesetzt wurde. Es sind antithrombotische, antifibrinolytische und auch eine modulierende Wirkung auf das Immunsystem vorbeschrieben. Zusätzlich gibt es Überlegungen, ob das selektive unterbinden der Blutzufuhr im kryochirurgisch behandelten Gebiet die Blutungskomplikationen reduzieren kann. Dieses Verfahren wurde ebenfalls in unserer Studie untersucht. Die Studie wurde an 30 Schwäbisch-Halleschen Landschweinen durchgeführt, die in 5 Gruppen à 6 Tiere unterteilt wurden. Eine Gruppe diente als Kontrollgruppe, alle anderen wurden kryochirurgisch behandelt. Eine Gruppe erhielt eine Frierbehandlung über 15 Minuten, eine weitere einen doppelten Frierzyklus von jeweils 7,5 min Dauer, eine Gruppe erhielt zum einfachen Frierzyklus perioperativ über 15 Minuten zusätzlich 140 mg Aprotinin, und eine Gruppe wurde unter Abklemmen der Blutzufuhr des linken Leberlappens über 15 Minuten kryochirurgisch behandelt. Unmittelbar vor, während, und bis 7d nach der Behandlung wurde den Tieren an insgesamt 9 Zeitpunkten Blut abgenommen, um die Plasmakonzentration folgender Parameter zu bestimmen: Antithrombin III (ATIII), Thrombin-Antithrombin -III- Komplexe (TAT), D-Dimere, Fibrinspaltprodukte F1+F2, IL-6, IL-4, IL-10, TGF- β , TNF- α .

Die Ergebnisse konnten zeigen, dass Aprotinin offenbar ein Stimulus für eine vermehrte Bildung des Antithrombins ist. Diese Gegenregulation zum Gerinnungsgeschehen könnte den Organismus vor einer disseminierten intravasalen Gerinnung schützen. Zusätzlich zeigte sich eine leicht verringerte Fibrinolyse im Vergleich mit den Kontrolltieren. Bei den Zytokinbestimmungen fiel besonders ein Anstieg des IL-6 unter Aprotiningabe auf. Über IL-6 wird seit einiger Zeit kontrovers als pro- bzw antiinflammatorisches Zytokin diskutiert.

Das selektive Unterbinden der Blutzufuhr führte entgegen der Spekulationen in unserer Studie zum unerwünschten Effekt einer moderaten Gerinnungsaktivierung und Fibrinolyse. Der doppelte Frierzyklus dagegen erwies sich keineswegs als stärker gerinnungsaktivierend. Da im Rahmen dieser Studie von einer anderen Forschungsgruppe gezeigt werden konnte, dass der doppelte Frierzyklus eine gründlichere Nekrose der Zellen im kryochirurgisch behandelten Bereich bewirkt, spricht dieses Ergebnis sehr für die Unterteilung des 15 minütigen Friervorgangs in 2x 7,5 Minuten dauernde Behandlungen mit dazwischenliegender Pause.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass dem Serinproteaseinhibitor Aprotinin durch diese Studie nicht die erhoffte deutlich protektive Wirkung im Rahmen der Kryochirurgie nachgewiesen werden konnte. Es ergaben sich jedoch weitere interessante Aspekte, z.B. im Hinblick auf die pro- oder antiinflammatorischen Wirkung des IL-6, sowie die Erkenntnis, dass die selektive Gefäßokklusion eher negative Auswirkungen hat, als auch der bereits erwähnte positive Effekt des doppelten Frierens mit kürzeren Zeitintervallen.

2. Summary

During the last 10 years methods of local destruction of tissue like cryosurgery have gained importance especially for treatment of nonresectable liver tumors like hepatocellular cancers and colorectal liver metastases. Before, those therapeutic possibilities were limited. 60-90% of all metastases of colorectal tumors are nonresectable by conventional surgery. Cryosurgery is a method of local destruction of cancerous tissue with preservation of the surrounding tissue by the use of a cryoprobe that can be placed very precisely into the tumor. Resorption of the necrotic tissue occurs by the process of wound healing. Despite this promising aspects, some cases are reported in which cryosurgery of the liver caused fatal coagulopathies up to disseminated intravascular coagulation that has also been described as the “cryoshock phenomenon”. We focused our study to this problem. We examined whether the serine-protease-inhibitor “aprotinin” is able to reduce such complications. Aprotinin was already applied successfully in some other fields like heart surgery to reduce blood loss. Some antithrombotic, antifibrinolytic and even immune system modulating components are described.

Further, there are considerations whether a reduction of blood flow by selective vascular clamping can reduce the complications of bleeding and coagulative disorders. The vascular clamping results in a restriction of blood flow in the part of the liver which is treated cryosurgically. This method was also applied and examined in our studies. Our survey was accomplished with 30 Swedisch-Hall-pigs as experimental animals which were divided into 5 groups consisting of 6 animals. One group was treated with a freeze-thaw-cycle over 15 minutes, another with a double-freeze-thaw-cycle over 7,5 minutes. Furthermore, there was a group of animals treated with 140mg aprotinin perioperatively during a 15-minute-freeze-thaw-cycle as well as a group treated with selective vascular clamping during a 15-minute-freeze-thaw-cycle. All groups were compared to a sham group that was only laparotomized. During 7 perioperative days blood was sampled 9 times to measure the plasma-concentration of the following parameters: antithrombin III (ATIII), thrombin-antithrombin-III-complex (TAT), d-dimers, prothrombin fragments F1+F2, IL-6, IL-4, IL-10, TGF- β and TNF- α .

The results demonstrate that aprotinin stimulates the generation of antithrombin. This counterregulation towards an active coagulation process may protect the organism from disseminated intravascular coagulation. Furthermore, a slight reduction of fibrinolysis in

comparison to the sham group could be detected. The analysis of the cytokines showed an increase of IL-6 under treatment with aprotinin. In fact, IL-6 is discussed controversially as a pro- or antiinflammatory cytokine.

In our study selective vascular clamping showed the undesirable effect of a moderate activation of coagulation and fibrinolysis. In contrast to that, the double-freeze-thaw-cycle proved to be not at all an activator of coagulation. Within this study another group could show that by using a double-freeze-thaw-cycle the induction of necrosis of cells is much more efficient than after a single-freeze-thaw-cycle. Together with this, we conclude a favorable effect of interrupting the freeze-thaw-cycle.

In summary we could not prove our hypothesis of a protective effect after application of the serine-protease-inhibitor aprotinin in respect to coagulation or immune modulation, but there could be seen on the one hand some promising tendencies in particular the improved outcome after application of a double-freeze-thaw-cycle when using shorter freezing intervals. On the other hand we found some interesting aspects concerning the question whether IL-6 has a pro- or antiinflammatory effect.

3. Einleitung

3.1. Kryotherapie

Ein potentiell kurativer chirurgischer Eingriff mit Resektion des befallenen Gewebes ist bei nur 10–15 % der Patienten mit Lebermetastasen möglich. [2, 151]. Optionen für eine Tumorsektion sind limitiert, wenn die Läsionen mehrere Leberlappen einbeziehen, neben größeren Blutgefäßen liegen, der Patient eine herabgesetzte Leberfunktion hat oder die Leber durch vorausgegangene Resektionen keine weitere Verkleinerung erfahren darf [192].

Die Kryochirurgie malignen Gewebes ist ein schneller Frier-Auftau-Prozess, der aus einer Eiskristall-Formation resultiert, womit ischämische Nekrosen und Zell-Tod einhergehen. Dadurch wird es möglich mit nur geringem Kollateralschaden an multiplen Stellen auch an beiden Leberlappen und in der Nähe großer Gefäße, Tumorgewebe zu zerstören.

3.1.1. Geschichte der Kryotherapie

1960 wurde der erste kryochirurgische Apparat durch *I.S. Cooper* in die klinische Praxis eingeführt. Damals sollte er der Therapie des Morbus Parkinson dienen.

Gage et al. zeigten wenig später in einer Studie an Hunden, dass es möglich ist, größere Mengen von Lebergewebe ohne große Komplikationen zu frieren. Es wurde zunächst eine Schwellung des behandelten Areals beobachtet, 2 Wochen später erschien die Läsion demarkiert und eingeschmolzen. Nach 6 Wochen war die Läsion verheilt [51].

Weder *Gage et al.* noch später *Dutta et al.* konnten eine Wund-Heilungsstörung, wie z.B. eine Abszessbildung nachweisen [39]. *Gage et al.* konnten zusätzlich zeigen, dass das Frieren größerer Blutgefäße in der Regel ohne deren Ruptur vonstatten geht, besonders wenn in diesen der Blutfluss erhalten bleibt [51]. Diese Erkenntnis konnte der Sorge vor unkontrollierbaren Blutungen durch die Ruptur größerer Gefäße entgegengesetzt werden.

Daraufhin fühlten sich einige Chirurgen ermutigt, die Kryochirurgie in der Behandlung ansonsten unresektabler Leber-Malignome einzusetzen. Hier boten sich v.a. Patienten mit multiplen Läsionen oder Läsionen in der Nähe großer Gefäße an. *Zhou et al.* waren die ersten, die eine verlängerte Überlebensrate von durchschnittlich 23,2 Monaten bei Patienten mit unresektablen Lebertumoren nach kryochirurgischer Behandlung zeigen konnten [202].

3.1.2. Mechanismen der Zeldestruktion durch Kälte

Mitte der 60er Jahre schrieb Cooper: „... *all living tissue subjected to a temperature of -20°C or below for one minute or longer will undergo cryogenic necrosis.*“ [28]. Cooper machte noch keine weiteren Angaben, wie lange dieser Gefriervorgang dauern oder wie man im Detail vorgehen sollte, doch seine Aussage war der Beginn für die Ära der Forschung an der Vereisung von Gewebe im Hinblick auf einen möglichen therapeutischen Nutzen, sei es in vitro oder in vivo, an Tierstudien oder in der klinischen Praxis.

3.1.2.1. Extra- und intrazelluläre Eisbildung

Wenn die Temperatur in den hypothermen Bereich absinkt, beginnt extrazelluläres Wasser zu kristallisieren und es entsteht ein hyperosmotisches extrazelluläres Milieu, das den Zellen Wasser entzieht. Setzt sich dieser Prozess fort, entstehen extrazelluläre Eis-Kristalle. Entlang des osmotischen Gradienten strömt intrazelluläres Wasser nach extrazellulär, woraus eine intrazelluläre Dehydration resultiert. Zellen schrumpfen und Membranen und Zellbestandteile werden stark geschädigt. Wenn die maximale Dehydration erreicht ist, steigt die Konzentration der extrazellulären Lösung weiter an, woraufhin lösliche Teile aus dem Extrazellulärraum in das Zellinnere diffundieren, um das osmotische Gleichgewicht aufrecht zu erhalten.

Diese Wirkung der Zelldehydration und Lösungskonzentration, die so genannte Lösungs-Wirkungs-Verletzung (solution-effect-injury) [53], führt nicht immer zum Zelltod. Dagegen ist die intrazelluläre Eisbildung eine weitaus größere Bedrohung der Lebensfähigkeit von Zellen, sie ist fast immer tödlich [111, 112, 113, 114, 115, 128]. Die extrazelluläre Eisbildung mit der Dehydration der Zelle kann nur bei niedrigen Gefriereschwindigkeiten vollständig vonstatten gehen, da das gesamte Zellwasser nur dann genug Zeit hat, aus der Zelle zu diffundieren. Die intrazelluläre Eisbildung steht im Allgemeinen mit schnellen Gefriereschwindigkeiten in Zusammenhang, so schnell, dass das Wasser in der Zelle gefriert, bevor es vollständig entweichen kann [116]. Die extrazelluläre Eisbildung setzt bei etwa -7 bis -10°C ein. Intrazelluläres Eis beginnt sich bei -20°C zu bilden. Mazur beschreibt den Zustand vor der endgültigen Kristallbildung als „Supercooling“, ein Phänomen, bei dem sehr kleine Flüssigkeitsvolumina und extrem reines Wasser erst gefrieren, wenn die Temperatur schon deutlich weniger als 0°C beträgt, weil die Bildung von Eis immer an so genannten Kristallisationskernen beginnt [114]. Dabei lagern sich die Wassermoleküle an

Staubpartikeln, Molekülen oder Oberflächen an und ordnen sich zu einem Eiskristallgitter. Ab einer Temperatur von ca. -20°C dringen extrazelluläre Eiskristalle durch Membranporen in das Innere der Zelle, da sie ab dieser Temperatur klein genug sind, um die Membranporen zu passieren. Daraufhin beginnt auch die intrazelluläre Eisbildung [114, 116]. Man geht davon aus, dass in normalen, nicht entarteten Zellen alle Stoffwechselprozesse spätestens bei -40°C zum Stillstand kommen [8].

Bei der großen Variabilität der Zellstruktur verschiedener normaler und entarteter Gewebe variiert die benötigte Temperatur jedoch erheblich, wie *Gage et al.* 1998 in einer Arbeit über den damaligen Stand der wissenschaftlichen Erkenntnis ausführt [53].

3.1.2.2. Die drei Phasen des Frierzyklus

Mazur setzte sich auch damit auseinander, wie lang die optimale Frierzeit sein müsste, wenn man oben veranschaulichte Mechanismen des Zelltodes in Betracht zieht [116, 111]. Er postulierte, dass eine rasche Herabkühlung des Gewebes einen weitaus größeren Effekt habe, da dann nicht soviel intrazelluläres Wasser aus der Zelle in den Extrazellulärraum entweichen könne, wodurch sich im Intrazellulärraum die zellzerstörenden Eiskristalle bilden könnten.

Gage et al. zeigten 1967 in einer Studie an Hundehautbiopsaten nach kryochirurgischer Behandlung, dass nicht allein die Temperatur und die Geschwindigkeit des Friervorgangs für die Effektivität des Frierens ausschlaggebend sind, sondern besonders auch die Zeitdauer, in der die Probe auf eine bestimmte Temperatur heruntergekühlt bleibt. Bei -35°C zeigte sich fast das gesamte Gewebe nekrotisch, wenn es ca. 12min auf diesem Temperaturniveau gehalten wurde [51].

Die Länge der Auftauphase ist die letzte wichtige Phase des Frierprozesses. *Gage et al.* bezogen sich 1985 auf eine Publikation von *Kubota et al.* aus dem Jahre 1976, in der beschrieben wurde, dass die Überlebensrate von gefrorenen Kaninchennieren nach Replantation deutlich höher war, wenn die Auftauphase kurz gehalten wurde. Eine langsame Auftauphase führte vermehrt zu Organversagen [52, 93]. Daraus ließ sich schließen, dass eine verlängerte Auftauphase den bei der Kryochirurgie erwünschten größeren Zelluntergang begünstigt. Eine tierexperimentelle Studie konnte dies beweisen. Schon *Mazur* hatte 1963 an Hefezellen zeigen können, dass bei langsamem Aufwärmen mehr Zellen sterben als bei schnellem [111].

Gage et al. schreiben der langsamen Auftauphase eine noch wichtigere Funktion zu als der raschen Frierphase, da sich währenddessen aufgrund von Lösungseffekten, Eis-Kristall-Restrukturierung, länger andauerndem oxidativem Stress und wachsenden Eiskristallen ein

noch größerer Zellschaden entwickeln kann [52, 52, 53]. Der Prozess der so genannten Rekristallisierung, wenn kleine Eiskristalle zu größeren fusionieren und dadurch zellzerstörende Scherkräfte hervorrufen, findet hauptsächlich bei einer Temperatur von -25 bis -20°C statt. Es wird daher empfohlen, das Gewebe passiv, ohne Zufuhr von Wärme, aufzutauen.

Kurz zusammengefasst lässt sich also sagen, dass optimal angewandte Kryotherapie nach bisherigem Stand der Wissenschaft aus 3 Phasen besteht:

1. dem raschen Frieren des Gewebes auf ca. -40°C
2. dem so genannten „Holding“, dem Halten der Temperatur über ca. 12min auf diesem Temperaturniveau
3. dem passiven Auftauen bei Raumtemperatur

3.1.2.3. Mikrozirkulationsstörungen

Der durch die Kälteapplikation entstehende Gewebeschaden kann nicht nur dem unmittelbaren Zelluntergang durch die Eiskristallbildung zugeschrieben werden, sondern auch dem Persistieren der Mikrozirkulation in der Auftauphase. Während des Frierens ist das Gewebe nicht durchblutet. Die Kälte bewirkt eine Schwellung des Gefäßendothels, wodurch die strukturelle Integrität gestört wird [34, 148]. Direkt nach dem Auftauen bildet sich ein Ödem am äußeren Rand des behandelten Gewebes [59], da die Zellen nach der längeren Phase der mangelnden Durchblutung vasoaktive Stoffe freisetzen, die zur Dilatation der Blutgefäße und daraufhin zur Hyperperfusion des Gewebes führen. Die gute Sauerstoffversorgung, die aus dieser Hyperperfusion resultiert, fördert die Entstehung freier Radikale, welche weitere Endothelschäden hervorrufen [71]. Es kommt dadurch zu einer noch höheren Permeabilität der Kapillarwände, zur Plättchenaggregation und zur Stagnation des Blutflusses. Vier Stunden nach dem Auftauen sind die meisten kleinen Blutgefäße komplett durch Thromben verschlossen [10, 34, 52, 148]. Ein weiterer Mechanismus, der zur Zerstörung des Endothels führen könnte, ist nach *Hoffmann et al.* die durch die abgestorbenen Zellen ausgelöste Aktivierung von Neutrophilen, welche durch das Endothel migrieren, die abgestorbenen Zellen phagozytieren und dabei Enzyme freisetzen, die zusätzlich das Endothel beschädigen [71]. Intravitalmikroskopische Studien belegen diese Hypothese [3, 203].

Infolge der mangelnden Blutversorgung durch die Mikrozirkulationsstörung kommt es zur Apoptose der Zellen [72]. Diese Art des Zelltodes konnte mikroskopisch v.a. in der peripheren Zone der Kryoläsion beobachtet werden, in der die Temperatur nicht ausreichend

kalt war, um die Zellen direkt zu töten. Der Prozess der Apoptose kann bis zu 8h nach der Vereisung andauern [9].

Größere Blutgefäße scheinen den Kälteeinfluss ohne größere Schäden zu überstehen. *Gage et al.* stellten dies schon 1967 in ihrer Studie an Hunden fest [51].

3.1.3. Komplikationen

3.1.3.1. Perioperative Komplikationen

Die Kryochirurgie wurde inzwischen in vielen experimentellen und auch in klinischen Studien untersucht und angewandt. Es konnten bemerkenswerte Verbesserungen in Technik und praktischem Ergebnis erzielt werden, z.B. durch das Einführen der sonographisch- [126, 142] oder MRI-gesteuerten Sondenplatzierung [18] und der Einführung neuer Kryogeräte mit mehreren Kryosonden, die eine dreidimensionale Sondenplatzierung rund um den Tumor ermöglichen [11].

Trotz der technischen Verbesserungen bleiben aber bis heute Unsicherheiten und die Sorge vor Komplikationen in diesem sonst eigentlich so viel versprechenden Gebiet der Behandlung unresektabler Lebertumoren. So fehlt noch immer eine genaue Kenntnis der Pathomechanismen der Destruktion durch die Vereisung und deren mögliche systemische Folgen [45]. Es mangelt an evidenzbasierten Angaben für in vivo Experimente hinsichtlich der Frierzeit, der benötigten Temperatur und des Temperaturmonitorings, sowie über den Nutzen bzw. Schaden der Anwendung einzelner oder mehrerer Frierzyklen. Im Vergleich zur kryobiologischen, technischen und experimentellen Forschung wurden die klinischen Belange, von wenigen Ausnahmen abgesehen, vernachlässigt [45].

Die hauptsächlichen Komplikationen, die beobachtet wurden, kommen zunächst denen von Leberresektionen gleich: Hämorrhagien, Pleuraergüsse, Gallengangsfisteln, perihepatische Abszesse und Leberversagen. Das Risiko, bei einer kryochirurgischen Behandlung eine Komplikation zu erleiden, liegt mit 15-20% unter dem von Leberresektionen, wo eine Komplikationsrate von 20-30% beobachtet wurde [150].

Wenn allerdings Komplikationen auftreten, können sich diese zu lebensbedrohlichen Situationen entwickeln. Es fällt auf, dass 12% der Gesamtmortalität und 17% der Gesamtmorbidität auf perioperative Hämorrhagien zurückzuführen sind [162]. Die Angaben über die perioperative Gesamtmortalität schwanken in der Literatur zwischen 1 und 8,3% [150]. Die perioperative Mortalität ist hauptsächlich auf eine unkontrollierte Koagulopathie

zurückzuführen. Die meisten dieser perioperativen Blutungen treten in der Phase des passiven Auftauens auf, nachdem die Kryosonde entfernt wurde. Die Blutungen könnten auf Schäden der Gefäße durch die Platzierung der Sonde, auf Ruptur der Gefäße während des Frierprozesses, sowie auf Parenchymschäden der Leber zurückgeführt werden, letztere wahrscheinlich hervorgerufen durch toxische zelluläre Stoffe, die beim Frieren größerer Areale ausgeschüttet werden [150]. Thrombozytopenien nach kryochirurgischen Eingriffen wurden von sehr vielen Gruppen beschrieben [1, 30, 57, 63, 126, 160]. *Pistorius et al.* und *Kollmar et al.* beobachteten in einer klinischen Studie mit Ganzkörperszintigraphie nach Injektion von Indium-111-markierten Thrombozyten eine lokale Plättchenaggregation im Gebiet der Kryoläsion, in der sie einen möglichen Grund für die Thrombozytopenie sehen [129, 89].

Eine durch mehrere Studien belegte einheitliche Aussage über den genauen Pathomechanismus, der zu dieser Komplikation führt, fehlt bislang [30].

Eine leichte Thrombozytopenie, eine Erhöhung der Prothrombinzeit und ein Anstieg der Fibrinspaltprodukte (D-Dimere) [118, 190] kann fast immer beobachtet werden, in einigen Fällen allerdings in einem so großen Ausmaß, dass eine lebensbedrohliche Koagulopathie droht [150].

Als schwerwiegendste bisher beschriebene Form der Komplikation wird das so genannte „Kryoschockphänomen“ beschrieben. Es handelt sich um ein Syndrom, das mit Multiorganversagen und einer Koagulopathie mit disseminierter intravasaler Gerinnung (DIC) einhergeht. Die Symptome sind mit einem septischen Schock (SIRS) zu vergleichen [16, 126, 157, 158].

Eine bei ca. 50% aller Patienten auftretende, allerdings selten lebensgefährliche Komplikation ist das Entstehen von so genannten „Crackings“. Damit werden Leberkapselrisse bezeichnet, welche sich besonders dann entwickeln, wenn sich der Eisball bis an die Leberoberfläche ausdehnt. Die meisten dieser Risse können gut unter Kontrolle gebracht werden. Stärkere Blutungen sind selten [155]

3.1.3.2. Die Rezidivrate

Es gibt divergierende Aussagen, über den Einfluss der Kryochirurgie auf die lokale Tumorrezidivrate. Mehrere Gruppen beschäftigten sich mit der Frage, ob eventuell eine immunologische Komponente, die in der Remission eines Tumors eine Rolle spielt, durch die Kryochirurgie induziert werden könnte [17, 88, 143, 201]. *Kogel et al.* sprechen von der Freisetzung denaturierter Proteinkomplexe, von Oberflächenantigenen und

Zellinhaltsbestandteilen, die vorher mit dem Immunsystem keinen Kontakt hatten und nun eine Immunabwehr auslösen [88]. Dabei konnten sie einen noch stärkeren Anstieg dieser Antitumorantigene feststellen, wenn sie den Friervorgang wiederholten. Auch *Blackwood et al.* kamen zu ähnlichen Schlussfolgerungen aus ihren Beobachtungen. Sie stellten fest, dass eine sehr geringe Menge gefrorenen Tumorgewebes schon ausreicht, um eine schnelle und komplette Remission zu erreichen [17].

Andere Gruppen [1, 96] befürchten, dass die Kryochirurgie, entgegen der Aussagen der Verfechter der Immuntheorie, eine vermehrte Tumorrezidivrate nach sich zieht, die gerade wegen einer nicht ausreichenden Nekrose und dadurch überlebenden Tumorzellen entstehen soll. In der Tat kommt es in 30% der kryochirurgisch behandelten Patienten mit Lebermalignomen zu Tumorrezidiven nahe der kryochirurgisch behandelten Stelle. Die Größe des Tumors spielt hier eine wichtige Rolle. Offenbar gehen Tumoren ab einem Durchmesser von mehr als 30mm mit einer wesentlich kürzeren Überlebenszeit nach der Behandlung einher [156]. Studien unter Anwendung von Ultraschall konnten zeigen, dass das Gewebe, das letztendlich nach einer kryochirurgischen Behandlung nekrotisch wurde, immer kleiner war als das Ausmaß der gesetzten Frier-Läsion. *Dilley et al.* stellten fest, dass sogar nach wiederholtem Frieren nur 80% des involvierten Lebergewebes nekrotisch wurden [36]. Doch nicht nur die eingeschränkte Kälteweiterleitung in die Peripherie führt zum Überleben von Zellen, auch Zellen, die in der Nähe größerer Gefäße liegen, entkommen dem Kältetod durch den so genannten „heat-sink-effect“, der aus dem kontinuierlichen Fluss warmen Blutes resultiert [292]

Eine weitere interessante Feststellung machten *Kuszyk et al.* Sie zeigten in einem Mausmodell mittels CT- und MR-Bildgebung, dass bereits sieben Tage nach dem kryochirurgischen Eingriff in vielen Fällen am äußeren Rand der Kryoläsion, umgeben von reichlich Granulationsgewebe, residuelles Tumorgewebe gefunden werden kann. Des Weiteren wurde eine gute, intakte Durchblutung dieser Areale nachgewiesen. Die Gefäße reichten bis zu 6 mm in die Kryoläsionen hinein [96]. Es stellt sich also die Frage, wie eine bessere Zellabtötung erreicht werden kann.

3.1.4. Der doppelte Frierprozess

Wie bereits erwähnt, kam man schon recht bald auf die Idee, ein Gewebe auch zweimal hintereinander kryochirurgisch zu behandeln. *Gill et al.* zeigten bereits 1968, dass eine Wiederholung des Frierprozesses direkt nach der Auftauphase zu einer deutlichen Vergrößerung der Läsion führt. Es wird beschrieben, dass der zweite Frierzyklus mehr

Hämorrhagien auslöst und einen „schlammigen“ Aspekt beim Auftauen hat. Die Fähigkeit des Gewebes, die Kälte weiterzuleiten, steigt durch die wiederholte Kälteapplikation an und führt zu einem „maximalen Frier-Effekt“ [56].

Seifert et al. schrieben später, dass doppelte Frierzyklen wesentlich effektiver zur Prävention von Tumorrezidiven seien als Einmal-Zyklen [156]. Sie führen zu einem einheitlicheren Zelltod, da es zu einer verstärkten Reduktion der mikrovaskulären Perfusion kommt, woraus eine irreversible Ischämie resultiert [121, 152, 153]. *Mala et al.* und *Dilley et al.* konnten bei Anwendung zweimaligen Frierens eine Vergrößerung der Frierläsion um 20-24% erzielen [36, 106]. Dabei betonen *Dilley et al.*, dass die Kryoläsion zwar anfangs augenscheinlich genauso groß sei wie bei einmaligem Frieren, aber danach deutlich mehr Gewebe dieser Läsion tatsächlich nekrotisch werde. Daher könne man den Sicherheitsabstand zum Tumorgewebe dementsprechend verringern, wodurch weniger gesundes Gewebe in Mitleidenschaft gezogen werde. Andere Gruppen konnten dagegen keine verbesserten Resultate durch das doppelte Frieren erzielen [79, 144, 192].

Auch Nachteile dieses Verfahrens werden diskutiert, wie z.B. die Feststellung, dass wiederholtes Frieren nach einer kompletten Auftauphase zu einem schweren Leberschaden führen kann, was sich anhand von steigenden Transaminasen zeigen lässt [63, 160, 167].

Mehrere Autoren beschreiben ein, im Gegensatz zum einmaligen Frieren, deutlich verstärktes Auftreten der bereits erläuterten Gerinnungskomplikationen, zurückzuführen auf die größere Gewebszerstörung [30, 150, 167, 190]. *Seifert et al.* weisen auf mögliche Komplikationen hin, wenn bei einem Gefriervolumen von über 25% der Leber ein doppelter Frierzyklus angewandt wird, es könne zu einer, gegenüber dem einmaligen Frieren verstärkten Freisetzung inflammatorischer Zytokine durch Kupfferzellen der Leber kommen [159].

3.1.5. Slective vascular clamping (SVC)

In Bezug auf den „heat-sink-effect“ beschäftigten sich einige Gruppen mit der Idee, die zuführenden größeren Gefäße im Ligamentum hepatoduodenale vor der kryochirurgischen Behandlung abzuklemmen, entweder komplett durch das so genannte „Pringle-Manöver“ [136] oder durch selektives Abklemmen der Blutzufuhr („SVC“). Dieses Verfahren wird u.a. bei der Leberteilresektion angewandt, um Blutungskomplikationen zu reduzieren.

Neel et al. behandelten 1971 Ratten unter totaler Okklusion des Leberblutflusses mit zwei konsekutiven Frierprozessen. Sie beschreiben eine um 60% verlängerte Auftauzeit und eine Vergrößerung der Frierläsion um bis zu 50% [121].

Diese Ergebnisse konnten von *Dilley et al.* bestätigt werden [36]. Frierläsionen ohne Abklemmen der Blutzufuhr zeigten des Öfteren Irregularitäten im Übergang vom gefrorenen zum ungefrorenen Gewebe, die wahrscheinlich durch den warmen Blutfluss in den umliegenden Gefäßen bedingt wurden [105].

3.2. Hämostase

Die Hämostase umfasst die Blutstillung bei gleichzeitigem Erhalt der rheologischen Eigenschaften des Blutes. Sie kann unterteilt werden in:

- vaskuläre Reaktion
- Gerinnung (Koagulation)
 - primäre Hämostase
 - sekundäre Hämostase
- Gerinnungshemmung (Antikoagulation)
- Fibrinolyse und Fibrinolysehemmung

3.2.1.1. Kaskade der plasmatischen Gerinnung

Bei der **primären Hämostase (thrombozytäres Gerinnungssystem)** wird nach einer Verletzung der Gefäßendothelschicht der Von-Willebrand-Faktor freigesetzt. Dieser verbindet sich mit dem Glykoproteinrezeptor „GPIb/Ic/IIa“, dem wichtigsten Rezeptor für den Von-Willebrand-Faktor. Dieser Rezeptor dient als Bindeglied zwischen den Thrombozyten und dem subendothelialen Kollagen. Nach ihrer Aktivierung durch Kontakt mit diesem Rezeptor setzen die Thrombozyten folgende Substanzen frei: Plättchenfaktor 3, Plasmin-Aktivator-Inhibitor (PAI), Von-Willebrand-Faktor, Fibrinogen, Serotonin und Thromboxan A₂. Diese Mediatoren bewirken daraufhin eine Aggregation weiterer Thrombozyten sowie eine lokale Vasokonstriktion. Es entsteht ein erster Verschluss des defekten Gefäßsystems durch einen weißen Abscheidungsthrombus. Gleichzeitig wird die sekundäre Hämostase aktiviert.

Die **sekundäre Hämostase (plasmatisches Gerinnungssystem, Abb.1)** besteht aus Plasmaenzymen (Proteasen), die als Gerinnungsfaktoren bezeichnet werden. Über einen kaskadenförmigen, Ca²⁺-abhängigen Reaktionsweg erfolgt die Umwandlung inaktiver Proenzyme in aktive Enzyme, wobei durch proteolytische Spaltung aus Prothrombin

Thrombin entsteht. Thrombin, das zentrale Gerinnungsprotein, bildet den Endpunkt zweier Reaktionssysteme, des intrinsischen und des extrinsischen Systems.

Im *intrinsischen System* (Abb.1) werden durch Kontakt mit unphysiologischen Oberflächen die oberflächensensiblen Faktoren XIIa und XI aktiviert (Kontaktaktivierung). Faktor XIIa aktiviert daraufhin Präkallikrein zu Kallikrein, welches zusammen mit HMWK (high molecular weight kininogen) in einer Ca^{2+} abhängigen Reaktion weiteren Faktor XIIa zu FXIIa aktiviert. Faktor XIIa aktiviert zudem weiteren FXI zu FXIa. FXIa aktiviert daraufhin FIX zu Faktor IXa und dieser aktiviert schließlich FX zu FXa. Die letztgenannte Reaktion wird durch die Anwesenheit des FVIII stimuliert. Durch Kopplung des FVIII an den Von-Willebrand-Faktor wird sie um ein Tausendfaches beschleunigt. FVIII und von Willebrand Faktor bilden zusammen mit Ca^{2+} und Plättchenfaktor 3 (PF 3) eine als „Tenase“ bezeichneten Komplex. Der entstandene Faktor Xa bildet mit Co-Faktor Va, Ca^{2+} und Phospholipiden den „Prothrombinaktivator-Komplex“, der bereits zur gemeinsamen Endstrecke des intrinsischen und extrinsischen Systems gehört.

Im *extrinsischen System* (Abb.1) wird nach einer Gewebsverletzung der sogenannte „Tissue-Factor“ freigesetzt. Dieser bildet zusammen mit Phospholipiden das Gewebsthromboplastin. Der aktivierte Faktor VII (FVIIa) katalysiert daraufhin in Verbindung mit Phospholipiden und Ca^{2+} die Umsetzung von Faktor X in Faktor Xa. Wie beim intrinsischen System erfolgt dann die Umsetzung von Prothrombin in *Thrombin* durch den Prothrombinaktivator-Komplex. Bei dieser Umsetzung entstehen auch die Prothrombinfragmente F1+F2.

Das im Plasma als fadenförmiges Molekül zirkulierende Fibrinogen wird durch Thrombin, nach Aktivierung des Glykoproteinrezeptors GP IIb/IIIa, zu Fibrinmonomeren gespalten. Diese Fibrinmonomere polymerisieren spontan zu langen, instabilen Fibrinsträngen. Durch die Wirkung des durch Thrombin und Ca^{2+} aktivierten Faktors XIII wird das lose Fibrinnetz verfestigt und unlöslich gemacht, es entsteht *Fibrin*. Durch diesen Prozess wird das verletzte Gefäß schließlich durch den roten Abscheidungsthrombus abgedichtet.

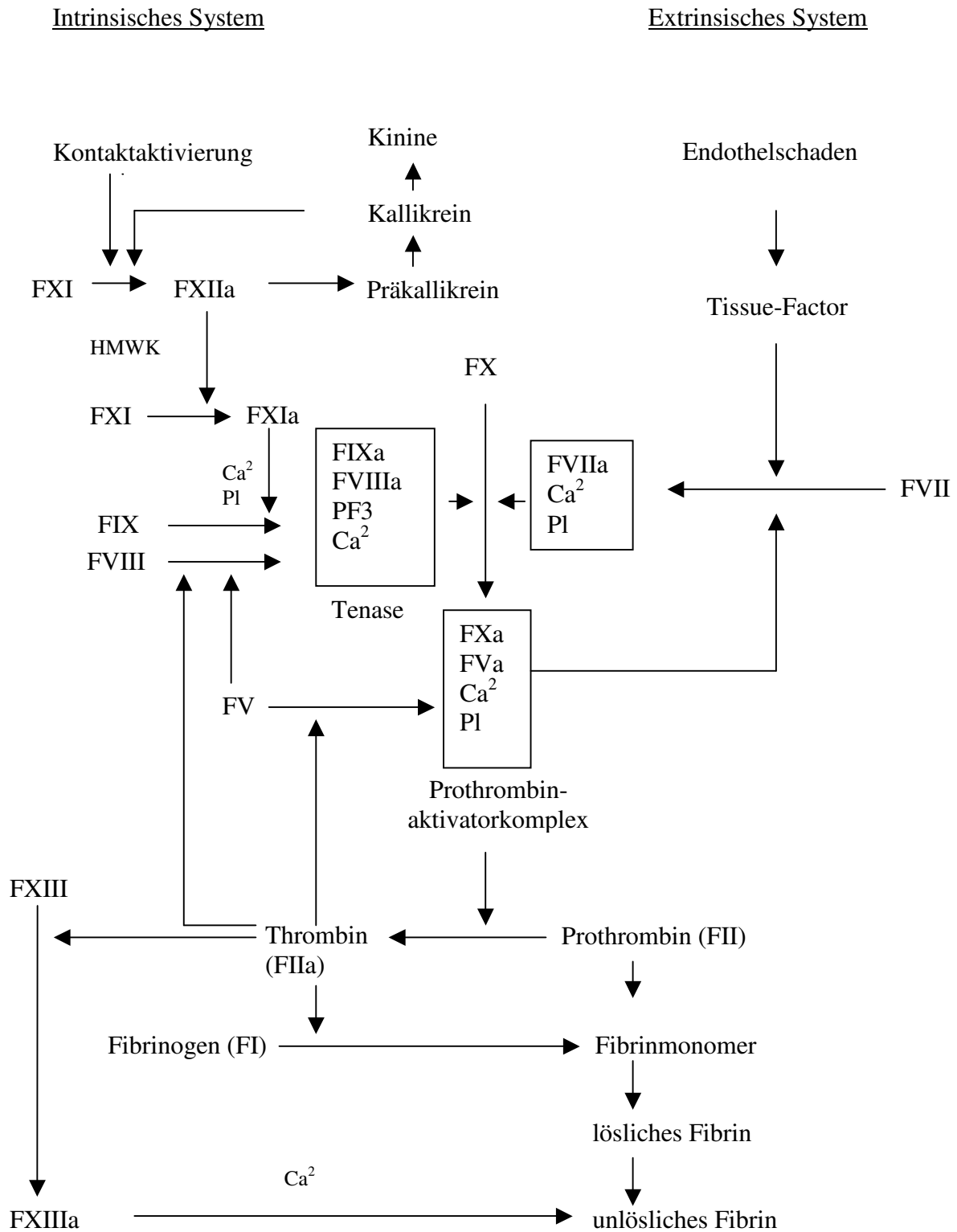
Die Gerinnungskaskade

Abb.1 Schematische Darstellung der plasmatischen Gerinnung modifiziert nach Heckl (2003) [65]

3.2.1.2. Thrombin

Im folgenden Kapitel sollen die von Thrombin beeinflussten chemischen Prozesse erläutert werden, da Thrombin eine sehr zentrale Funktion in der Gerinnungskaskade hat und demnach auch in Verbindung mit der Interaktion von Aprotinin mit dem Gerinnungsgeschehen stehen könnte. Thrombin ist eine Serinprotease, die aktiviert wird, wenn zirkulierende Gerinnungsfaktoren und der "Tissue-Factor" sich begegnen. Der Tissue-Factor ist ein Membranprotein, das als Cofaktor für die Aktivierung von Faktor X durch Faktor VIIa notwendig ist. Daraus entsteht der bereits erwähnte „Prothrombin-Aktivator-Komplex“ (Abb.1). Der Tissue-Factor kommt erst in Kontakt mit den Gerinnungsfaktoren, wenn er in das zirkulierende Blut gelangt. Dies geschieht durch eine Gefäßverletzung oder ein Gefäßleck, wobei letzteres auch durch die Wirkung von Entzündungsmediatoren entstanden sein kann. Der Tissue-Factor wird in niedrigen Dosen auch von Zellen produziert, die durch bestimmte Zytokine stimuliert wurden. In den 90er Jahren wurde der Tissue-Factor als der Hauptinitiator der entzündungsinduzierten Thrombingeneration erkannt [104]. *Coughlin* [29] beschreibt folgende Aktionen, die durch das freigesetzte Thrombin ausgelöst werden:

- Konversion des zirkulierenden Fibrins zu Fibrinmonomeren, die zu Fibrin polymerisieren
- Triggerung der Freisetzung von Chemokinen und Wachstumsfaktoren sowie der folgenden Plättchen-Aktivatoren: ADP, Serotonin und Thromboxan A₂
- prokoagulatorische Aktivität, Stimulation der Ausschüttung von weiterem Thrombin
- Regulation der Zytokinproduktion in Kulturen von Fibroblasten und glatten Gefäßmuskelzellen
- Triggerung der Ca²⁺-Signalprozesse in T-Lymphozyten

Diese Eigenschaften zeigen, dass Thrombin eine Gewebsverletzung mit einer hämostasiologischen und einer inflammatorischen Antwort verbindet [2, 24, 41].

In den letzten Jahren rückte es vermehrt ins Interesse der Forschung herauszufinden, wie Thrombin und seine Zielzellen miteinander kooperieren. Auf der Oberfläche von Thrombozyten wurde ein so genannter „protease activated receptor“ (PAR) mit 4 Untergruppen gefunden, wobei PAR1 und PAR4 beim Menschen nachgewiesen werden konnten.

Es handelt sich um einen transmembranen Rezeptor aus der Familie der G-Protein gekoppelten Signaltransduktoren. Die Serinprotease Thrombin bindet zunächst an eine

hirudinähnliche Domäne, gefolgt von einer proteolytischen Spaltung, durch welche ein weiterer Ligand frei wird, der schließlich, an ein G-Protein gekoppelt, die intrazelluläre Antwort hervorruft. Es folgt eine rasche Aggregation der Thrombozyten untereinander (Abb.2). Eine Aktivierung des Rezeptors ist irreversibel. Man nimmt an, dass diese Rezeptorfamilie eine sehr wichtige Rolle als Mediator in den durch Thrombin ausgelösten Signalkaskaden einnimmt, sowie auch in der Interaktion von Thrombin mit dem Endothel und inflammatorischen Zellen [23, 80, 134, 135].

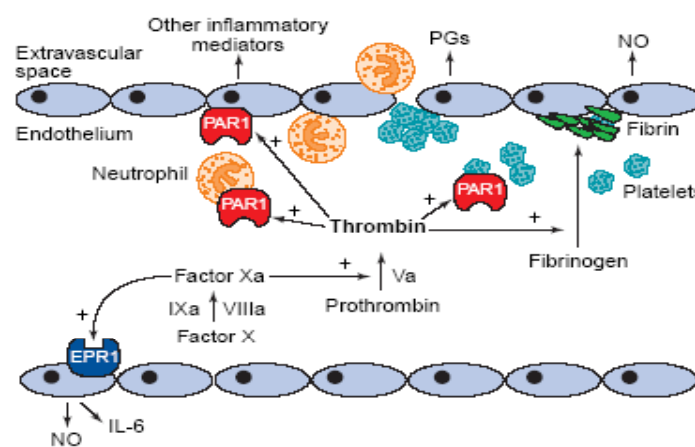


Abb.2: Interaktion von Thrombin mit dem Endothel [25]

3.2.1.3. Inhibitoren des plasmatischen Gerinnungssystems (Antikoagulation)

Der Gerinnungskaskade steht ein antagonistisches System von Inhibitoren gegenüber. Zu diesen gehören in Reihenfolge ihrer Effektivität das Antithrombin III, α -2-Makroglobulin und Antitrypsin. Die wichtigsten Funktionen dieser Inhibitoren bestehen darin, die Thrombinwirkung auf einen lokalen Prozess zu beschränken und die aktivierten Gerinnungsfaktoren zu hemmen, zu eliminieren und proteolytisch abzubauen.

3.2.1.4. Das fibrinolytische System

Das fibrinolytische System schützt den Organismus vor einer Thrombosierung der Gefäße. Die Fibrinolyse erfolgt durch das proteolytische Enzym Plasmin, das die polymerisierten Fibrinfäden spalten kann. Daneben ist Plasmin auch in der Lage, Fibrinogen, Prothrombin, sowie die Gerinnungsfaktoren V, VII und XIII proteolytisch abzubauen und kann so die Blutgerinnungsfähigkeit vermindern. Bei der Spaltung des Fibrins entstehen als kleinste Abbauprodukte die Fibrinspaltprodukte, genannt „D-Dimere“.

Plasmin, eine Serinprotease, entsteht durch die Umwandlung des Proenzym Plasminogen in die aktive Protease. Diese Umwandlung kann mittels des sofort wirksamen extrinsischen Systems durch zahlreiche physiologische und pharmakologische Aktivatoren erfolgen, sowie durch das langsamer ablaufende intrinsische System. Die Aktivierung erfolgt nach dem Prinzip der limitierten Proteolyse. Diese Aktivatoren sind:

extrinsisches System (Abb.3):

- (Gewebs-) thrombo-Plasminogen Aktivator (tPA)
- Urokinase Plasminogen Aktivator (uPA)
- Streptokinase

intrinsisches System (Abb.3):

- HMW Kininogen (HMWK)
- Faktor XII
- Faktor XI
- Präkallikrein

Gehemmt werden kann die Umwandlung von Plasminogen in Plasmin durch folgende Inhibitoren:

natürlich (Abb.3):

- Plasminogen-activator-inhibitor (PAI)
- α -2-Antiplasmin, ein Serinproteasehemmer
- α -2 Makroglobulin
- Antithrombin III
- C1-Inhibitor

medikamentös:

- Aprotinin
- Tranexamsäure
- Epsilonaminocapronsäure
- P-Aminomethylbenzosäure

Gerinnung und Fibrinolyse stehen unter normalen Umständen in einer Art Gleichgewicht, der Homöostasebalance. Überwiegt zum Beispiel aus einer Störung des Gleichgewichtes resultierend die Fibrinolyse, kann es zu massiven Blutungen kommen. Hier ist die gefürchtete disseminierte intravasale Gerinnung [59] zu nennen, die auch ein Grund für die unten näher beschriebene, gefürchtete Komplikation des so genannten „Kryoschock-Phänomens“ sein könnte [16,158].

Das Fibrinolytische System

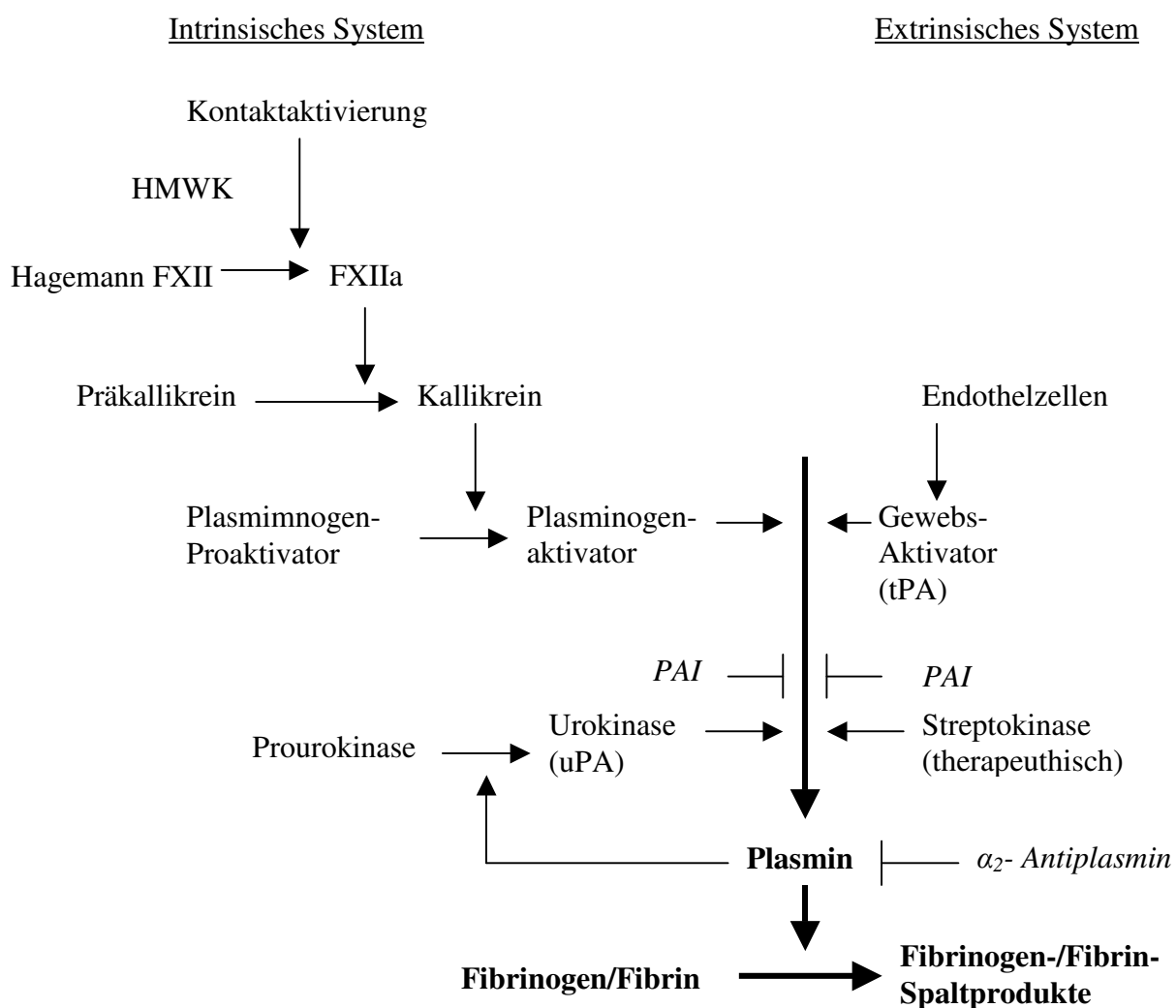


Abb.3. Schematische Darstellung der Aktivierung und Hemmung der Fibrinolyse, modifiziert nach Mersch (1988)[109]

3.2.1.5. Die disseminierte intravasale Gerinnung (DIC) / das Kryoschockphänomen

Das Kryoschockphänomen ist eine erworbene Hämostasestörung ähnlich einer Verbrauchskoagulopathie, die infolge einer massiven intravasalen Fibrininformation entsteht. Die häufigsten Ursachen dieser disseminierten intravasalen Gerinnung sind Polytrauma, Schock und Sepsis, sowie akute und chronische Leberschäden, da die Leber der Ort der Bildung und Elimination der meisten Gerinnungsparameter ist [149]. Auslösende Faktoren sind zum Beispiel Histamin, Serotonin und Adrenalin, bakterielle Endotoxine sowie zerstörte Blutplättchen, welche in größerer Menge in der Blutbahn zirkulieren. Sie fördern über die Freisetzung des Tissue-Factors eine unkontrollierte, intravasale Aktivierung der Gerinnung. Thrombin und Plasmin zirkulieren in der Blutbahn. Das zirkulierende Thrombin verursacht Thrombosierungen im Mikro- und Makrozirkulationsgebiet. Dies führt zu peripherer Ischämie und Organversagen. Durch die vermehrte Aktivierung und Adhäsion der Thrombozyten im Rahmen dieses massiven Gerinnungsgeschehens entsteht eine Verbrauchskoagulopathie mit Folge einer Thrombozytopenie. Gleichzeitig entwickelt sich eine Hypofibrinogenämie, ein Mangel an Prothrombinkomplexen und den Gerinnungsfaktoren V, VIII und X. Da ab einem bestimmten Zeitpunkt alle Gerinnungsparameter verbraucht sind, kommt es zu der gefährlichen hämorrhagischen Diathese mit Blutungsneigung, mangelndem Wundverschluss und Nachblutungen nach operativen Eingriffen. Es treten auch spontane innere Blutungen auf, die lebensbedrohliche Ausmaße annehmen können. Mit der reaktiven Fibrinolyse, durch die der Organismus versucht, die massive Gerinnung zu bekämpfen, verstärkt sich diese Blutungsneigung weiter [13, 103].

Typische Laborbefunde, die auf den Ablauf einer DIC hinweisen:

- erhöhte Werte des *Thrombin-Antithrombin-III-Komplexes (TAT)*, sowie eine daraus resultierende Verminderung des *Antithrombin III (ATIII)*
- erhöhte Werte der *Prothrombinfragmente (F1+F2)*
- erhöhte Fibrinolyseparameter, z.B. *D-Dimere*

3.2.2 Parameter des Gerinnungs- und Fibrinolysesystems

3.2.2.1. Prothrombinfragmente 1+2 (F1-F2)

Die Prothrombinfragmente werden bei der Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin durch den Faktor Xa frei. Sie sind ein Maß für den Umfang der Thrombinaktivierung.

3.2.2.2. Antithrombin III (ATIII)

Antithrombin III ist der wichtigste Inhibitor der plasmatischen Gerinnung. Er wird in der Leber gebildet [149]. Über eine irreversible 1:1 Bindung mit dem Thrombin entsteht der Thrombin-Antithrombin-III-Komplex. Außer Thrombin werden noch weitere aktivierte Proteasen wie Faktor IXa und XIa inhibiert, in geringerem Maße die Faktoren IXa, XIa und XIIa, Trypsin, Plasmin und Kallikrein. ATIII ist unter anderem erniedrigt bei hohem Verbrauch in Verbindung mit einer großen Wundfläche, einer Sepsis und/ oder einer DIC.

3.2.2.3. Thrombin-Antithrombin III-Komplex (TAT)

Aufgrund eines hohen Aktivitätsüberschusses an Antithrombin III liegt Thrombin im peripheren Blut unter normalen Umständen fast ausschließlich inaktiviert als TAT-Komplex vor. Indirekt ist also der TAT-Wert ein Maß für den Umfang der intravasalen Thrombinaktivierung. Erhöhte Werte werden, aufgrund der kurzen Halbwertszeit von TAT, nur für eine Dauer von wenigen Stunden nach Beendigung der Thrombinaktivierung gemessen. Als Ursachen einer erhöhten TAT-Konzentration werden angegeben:

- DIC [21]
- venöse und arterielle Verschlüsse [7, 69]
- Trauma
- septischer Schock
- akutes Leberversagen [97]

3.2.2.4. Fibrinspaltprodukte (D-Dimere)

Die D-Dimere entstehen bei der Spaltung bereits quervernetzter Fibrinmoleküle und sind Ausdruck einer intravasalen Fibrinbildung bei Verbrauchskoagulopathie mit sekundärer Hyperfibrinolyse [38].

Indirekt sind die D-Dimere also Indikatoren einer abgelaufenen Gerinnungskaskade und werden klinisch genutzt als Indikatoren für thrombotische und embolische Erkrankungen oder zur Kontrolle des Gerinnungsgleichgewichts nach Operationen. Ihr Anstieg korreliert positiv mit dem Anstieg proinflammatorischer Zytokine [162].

3.3. Immunologische Grundlagen

Das Immunsystem des Menschen besteht hauptsächlich aus 2 verschiedenen Komponenten, der humoralen und der zellulären Immunität. Erstere besteht aus den antigenproduzierenden

B-Zellen, letztere aus den CD8 und CD4 T-Lymphozyten (Helfer-Zellen), sowie den Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). Assoziiert mit diesen sogenannten spezifischen Immunzellen, sind unspezifische Zellen der myeloischen Stammzell-Linie, speziell die Zellen des mononukleären phagozytierenden Systems, z.B. Gewebsmakrophagen, Monozyten im Blut, Langerhans-Zellen in der Haut, dendritische Zellen in Lymphknoten, Gliazellen im ZNS u.a.. Diese akzessorischen Zellen haben die Aufgabe, Antigene zu prozessieren und ihre Epitope aus den so genannten MHC II-Molekülen so zu präsentieren, dass sie von naiven CD4-T-Zellen erkannt werden können, woraufhin diese sich entweder zu Typ1 T-Helferzellen, die die zelluläre, oder zu Typ 2-T-Helferzellen, die die humorale Abwehr regulieren, entwickeln [120].

Die T-Zellen, B-Zellen und die mononukleären Zellen beeinflussen, regulieren und inhibieren sowohl sich selbst, als auch sich untereinander durch die Produktion und Freisetzung eines komplexen Netzwerkes aus Botenstoffen, den sogenannten Zytokinen. Aktivierte CD4-T-Lymphozyten werden aufgrund der unterschiedlichen Zytokine, die von ihnen sezerniert werden, in Typ1 oder Typ2 T-Zellen unterteilt. Typ1 T-Zellen produzieren IL-2, INF- γ und TNF- β , Typ2 T-Zellen produzieren IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 und TGF- β . Beide Reihen können TNF- α sezernieren. Typ1 T-Zellen aktivieren hauptsächlich Zellen der mononukleären Abwehr, Typ2 T-Zellen stimulieren die Proliferation der B-Zellen zu Antikörper produzierenden Zellen [4].

3.3.1. Zytokine

Vor ca. 20 Jahren wurde erstmals ein Forschungsgebiet definiert, das sich mit der Übermittlung biologischer Signale nicht auf endokrinem, sondern auf para- und autokrinem Wege befasst. Übermittler dieser Signale sind die so genannten Zytokine, ein Sammelbegriff für hormonähnliche Botenstoffe, die von unterschiedlichsten Blut- und Gewebszellen produziert werden, wie T- und B-Lymphozyten, Makrophagen und Endothelzellen [154]. Es handelt sich um Polypeptide oder Glykoproteine mit einem niedrigen molekularen Gewicht (kleiner 30000kDA). Hochaffine Rezeptoren sind für die Transduktion eines Zytokinsignals in das Zellinnere und damit für die Auslösung der biologischen Wirkung verantwortlich. Diese Wechselwirkung führt zur Aktivierung einer intrazellulären Signalumwandlungskaskade mittels Tyrosin- oder Serinphosphorylierung. Dies führt letztlich zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, welche in den Kern diffundieren und dort durch Bindung an entsprechende regulatorische DNA-Elemente die Aktivierung unterschiedlicher Gene beeinflussen. Zytokine können auf diese Weise auf die produzierende Zelle (autokrin),

auf benachbarte Zellen (parakrin) und im gesamten Organismus (systemisch) wirken. Die verschiedenen Zytokine interagieren miteinander. Zelluläre Funktionen, wie Aktivierung, Proliferation, Chemotaxis, Immunmodulation, Mediatorenfreisetzung, Wachstum, Zelldifferenzierung und Apoptose, werden reguliert. Das Resultat ist ein komplexes Netzwerk, das den Zellen ermöglicht, auf spezielle pathogene Stimuli in gut kontrollierter und organisierter Art zu reagieren [19]. Inzwischen sind über 30 verschiedene Arten mit ganz unterschiedlichen biologischen Funktionen entdeckt worden. Man kann die Zytokine trotz ihrer Vielfältigkeit in drei größere Gruppen unterteilen:

1. *Growth Factors*: endothelial-growth-factor (EGF), transforming-growth-factor- β (TGF- β), Erythropoietin
2. *Lymphokine*: Interleukine, Tumor-Nekrose-Faktoren TNF- α und TNF- β , Interferon- γ
3. *Colony stimulating factors (CSF)*, Granulozyten- und Makrophagen-stimulierende Faktoren

Im Rahmen dieser Studie untersuchten wir die Zytokine der zweiten Gruppe, die Interleukine, sowie aus der ersten Gruppe das TGF- β .

Diese Zytokine lassen sich nach bisheriger, allgemeiner Auffassung ihrer Funktion, noch einmal in die, im Folgenden beschriebenen, 2 Subgruppen unterteilen.

3.3.1.1. Pro-inflammatorische Zytokine

3.3.1.1.1. Interleukin-6 (IL-6)

IL-6 ist ein pleiotropes Zytokin mit einem Gewicht von 26 kDA, das zu den Hauptmediatoren der Akute-Phase-Reaktion gehört. Es ist ein bedeutender Parameter in der Diagnostik bei Sepsis- und Trauma-Patienten. Stark erhöhte Spiegel finden sich z.B. beim septischen Schock [54, 175]. Nach einem elektiven operativen Eingriff steigt der IL-6 Spiegel nach ca. 1-3h an und bleibt bei unkompliziertem Verlauf ca. 48-72h erhöht [15]. Verschiedene Vorgänge der Immunantwort werden durch IL-6 moduliert und reguliert, wie z.B. das Auftreten von Fieber, die Synthese der Akute-Phase-Proteine, B-Zell-Differenzierung, T-Zell-Aktivierung, Induktion von GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender-Faktor), Proliferation der hämatopoetischen Zellen und Inhibition von TNF- α . Antiinflammatorische Zytokine wie IL-4, IL-10 und IL-13 können dagegen die IL-6 Produktion reduzieren [15].

Stouthard et al. [168] konnten feststellen, dass IL-6 die Gerinnung aktivieren kann, was sich an erhöhten Spiegeln an TAT-Komplexen und F1+2 Fragmenten zeigte [168]. Die Fibrinolyse ist nicht beeinflusst oder sogar vermindert, wie eine Studie an Mäusen, denen Endotoxin injiziert wurde, zeigen konnte [73]. *Van der Poll et al.* berichten, dass eine durch Endotoxine induzierte Gerinnungsaktivierung deutlich abgeschwächt war, wenn vorher eine Anti-IL-6-Therapie durchgeführt wurde [132]. *Levi et al.* schreiben der hämostatischen Wirkung des IL-6 in einer weiteren Studie eine besondere Bedeutung bei der Entwicklung einer intravasalen disseminierten Gerinnung zu [103].

Es gibt mehrere neuere Studien, die sich intensiv mit der Funktion von IL-6 in der Leber nach Ischämie/ Reperfusion beschäftigen. Alle kommen zu dem Schluss, dass IL-6 die Leber in dieser Situation vor Gewebsschäden schützt und sogar eine bedeutende Rolle in der Regeneration des Lebergewebes spielt [20, 31, 76, 138, 196].

Der Mangel an wirklichem Verständnis über die funktionellen Aspekte dieses Zytokins führte zu sich widersprechenden Aussagen, die dem IL-6 entweder proinflammatorische oder antiinflammatorische Eigenschaften zuschreiben [196].

3.3.1.1.2. Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α)

TNF- α ist ein Polypeptid mit einem Gewicht von 17 kDA. Es wurde ursprünglich als ein, von aktivierten Makrophagen produzierter, tumorzytotoxischer Faktor beschrieben, der Thrombosen in Tumorgefäßen auslöst, daher auch der Name Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) [19]. Weitere Zellen, welche TNF- α sezernieren können, sind Monozyten, hepatische Kupffer-Zellen, Mastzellen und natürliche Killerzellen [19]. Nach einer Stimulation kommt es innerhalb von 90-120min zu maximalen Werten, die nach ca. 4h bereits wieder stark abfallen. Die biologische Halbwertszeit beträgt nur 14-18min. Erhöhte Spiegel wurden unter anderem im Blut von Patienten mit parasitischen oder bakteriellen Infektionen, Tumorerkrankungen, thermalen Verletzungen, Abstoßungsreaktionen und fulminantem Leberversagen, sowie septischem und hämorrhagischem Schock gefunden [58]. Die TNF- α -Synthese unterliegt einer strikten Regulation durch INF- γ , IL-4, TGF- β und IL-6. TNF- α wird zunächst membrangebunden synthetisiert, durch Bindung einer Serinprotease an einen Rezeptor entsteht lösliches TNF- α [35].

TNF- α initiiert die Margination, die transendotheliale Passage, die Degranulation, sowie die Produktion von Superoxidasen und die Lysozymausschüttung von neutrophilen Granulozyten und fördert die prokoagulatorische Aktivität an der Oberfläche von Endothelien, sowie die Permeabilität von Gefäßen [133]. Eine der Hauptaktionen des TNF- α ist dabei die verstärkte

Expression des interzellulären Adhäsions-Moleküls-1 (ICAM-1), einem Endotheladhäsions-rezeptor für Neutrophile.

Im Hinblick auf die in den letzten Jahren immer mehr ins Interesse gerückte Frage, ob TNF- α auch eine direkte Wirkung auf die Blutgerinnung habe, gibt es bisher keine eindeutige Antwort. TNF- α soll durch Induktion des Tissue-Factors eine Gerinnung auslösen können [41, 42, 180]. Es verhindert die Freisetzung von Inhibitoren der Gerinnung, wie den „Tissue-Factor-Pathway-Inhibitor“ (TFPI) und hat zusätzlich einen antifibrinolytischen Effekt, indem es eine vermehrte Freisetzung des Plasmin-Aktivator-Inhibitors-1 (PAI-1) bewirkt (Abb.4). *Van der Poll et al.* konnten eine, durch TNF- α hervorgerufene, Induktion der Freisetzung des Von-Willebrand-Faktors (Faktor VIIIa) im gesunden Menschen feststellen [131]. Die TNF- α -Ausschüttung selbst soll durch anfallendes Thrombin ausgelöst werden [180].

Studien, die besagen, dass TNF- α eine disseminierte intravasale Gerinnung auslösen könne [78, 190], werden von anderen widerlegt [103].

Auch zur Bedeutung des TNF- α nach Ischämie/ Reperfusion der Leber gibt es Untersuchungen, die wiederum weit divergieren. Es gibt Studien, die dem TNF- α eine bedeutende Rolle als Initiator der Geweberegeneration zuschreiben [138, 197]. Neuere Studien tendieren eher dazu, dem TNF- α eine leberschädigende Wirkung nachzusagen [20, 76, 83].

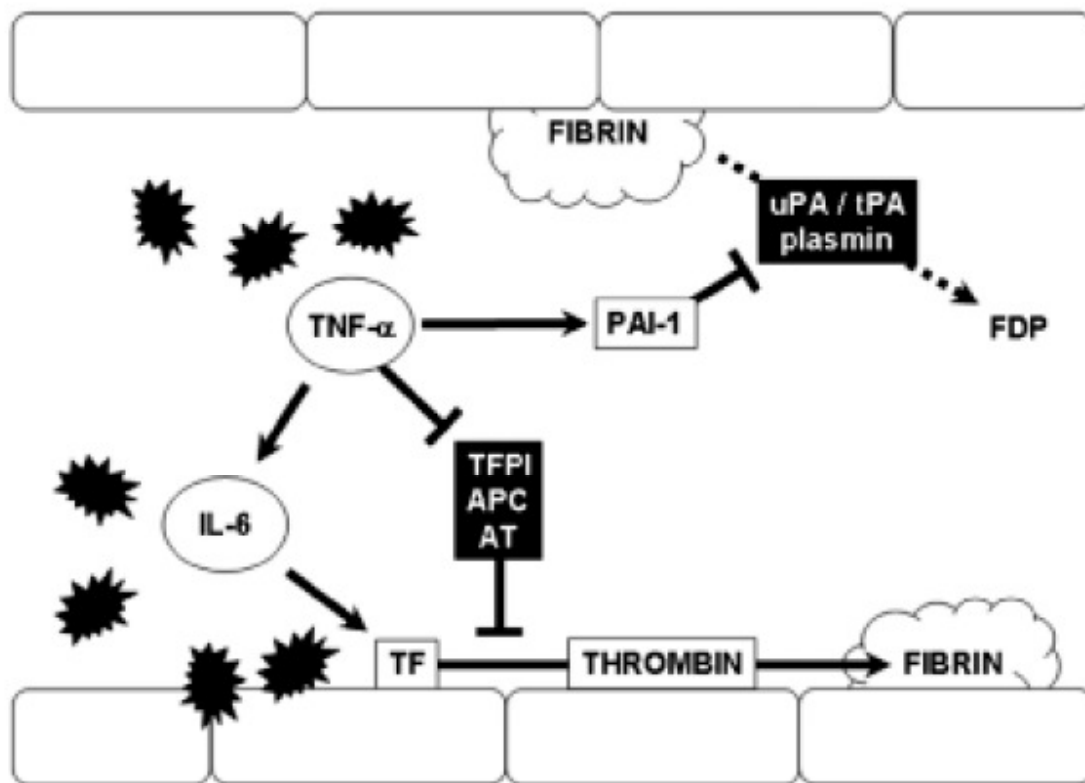


Abb.4: Modell einer entzündungsinduzierten Koagulation.

Ausgelöst durch die Aktivierung einer Immunreaktion des Körpers wird die Freisetzung des Tissue-Factors (TF) durch Monozyten induziert. Gleichzeitig beginnt die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie $\text{TNF-}\alpha$ und IL-6 . Diese bewirkt eine weitere Hochregulation der TF-Expression auf der Endothelzelloberfläche, wodurch die Gerinnungskaskade aktiviert wird und sich Fibrinnetze bilden. $\text{TNF-}\alpha$ unterbindet nun die Bildung der Inhibitoren der Gerinnung, wie „Tissue-Factor-Pathway-Inhibitor“ (TFPI), aktiviertem Protein C (APC) und Antithrombin (AT). Gleichzeitig fördert $\text{TNF-}\alpha$ die Bildung von Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1), so dass sich kein fibrinolytisches Plasmin mehr bilden kann. [24].

3.3.1.2. Anti-inflammatorische Zytokine

3.3.1.2.1. Interleukin-4 (IL-4)

IL-4 wurde erstmals 1982 als so genannter B-cell-stimulating-factor (BSF), B-cell-differentiation-factor (BCDF) und B-cell-growth-factor (BCGF) bekannt. Alle Bezeichnungen beschreiben die wohl wichtigsten immunologischen Funktionen dieses Interleukins, nämlich die Stimulation, Differenzierung und Wachstumsförderung von B-Zellen zu Antikörper-sezierenden Zellen [33]. Das hauptsächlich von T1-Helfer-Zellen gebildete Zytokin

scheint zusätzlich eine besondere Rolle in der Aktivierung von eosinophilen Mastzellen und deren Degranulation zu spielen. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass IL-4 die Sekretion anderer Zytokine, wie TNF- α (zu 100%), sowie IL-6 (zu 70-85%) [64, 183] und IL-10 (zu 70%) vermindert [196] und die Differenzierung von T-Zellen zu T2-Helfer-Zellen bewirkt. IL-4 soll die Tissue-Factor Expression auf Monozyten und Endothelzellen verhindern [124] und ein potenter Inhibitor der Angiogenese sein [185].

3.3.1.2.2. Interleukin-10 (IL-10)

IL-10 ist ein kleines Protein von 18,5kDa, das ursprünglich unter dem Namen „*Cytokine synthesis inhibiting factor*“ bekannt wurde. Es wird hauptsächlich von T2-Helfer-Zellen, einigen aktivierten B-Zellen und aktivierten Makropagen gebildet und hemmt in Monozyten und Makrophagen die Expression von MHCII-Molekülen, sowie die Synthese von anderen Zytokinen, wie IL-1, IL-6, IL-12 und TNF- α [45, 124, 186]. Es konnte frühestens 7h nach Aktivierung der Monozyten ein Anstieg festgestellt werden. Maximale Spiegel zeigten sich nach 24-48h. Damit wird klar, dass die inhibitorischen Eigenschaften von IL-10 auf proinflammatorische Zytokine erst nach deren Ausschüttung in Kraft treten und IL-10 eine wichtige Rolle in der Beendigung einer Immun- bzw. Entzündungsreaktion spielt [186]. *Taniguchi at al.* stellten fest, dass es für das Überleben des Patienten von größter Wichtigkeit ist, dass sich das Verhältnis zwischen IL-6 und IL-10 im Laufe der Erkrankung zu Gunsten des IL-10 verschiebt. Sie empfehlen daher eine prophylaktische Gabe von IL-10 in kritischen Fällen [174] .

Als Gegenspieler des proinflammatorischen TNF- α hemmt IL-10 die Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1, wodurch eine Adhäsion von Neutrophilen am Endothel abgeschwächt wird [198].

Auch auf die Gerinnung soll IL-10 einen direkten Einfluss haben, indem es die Produktion des Tissue-Factors inhibiert [78, 139].

3.3.1.2.3. Transforming growth factor- β (TGF- β)

Transforming-Growth-Factor- β ist ein 25 kDa schweres Protein mit verschiedenen Funktionen, wie der Inhibition der Proliferation von T-Zellen, der Inhibition von Proliferation und Maturation von B-Zellen, sowie der Inhibition der Aktivität von natürlichen Killerzellen [43, 189]. Es soll bei akuten Leberverletzungen die Fibrinogenese und Angiogeneese fördern und wird sogar mit chronischen fibrotischen Lebererkrankungen in Zusammenhang gebracht [75]. In einem Rattenmodell konnte gezeigt werden, dass schon eine Stunde nach

einer Verletzung des Lebergewebes TGF- β nachweisbar ist, wahrscheinlich freigesetzt aus TGF-Speichern in Granulozyten und Thrombozyten. Das sezernierte TGF- β rekrutiert daraufhin inflammatorische Zellen und Fibroblasten in das verletzte Gewebe. Diese aktivierten Zellen beginnen wiederum mit verstärkter Synthese und Freisetzung von weiterem TGF- β [44, 189]. Trotz der Funktion als Chemoattractant für inflammatorische Zellen verhindert TGF- β gleichzeitig deren Produktion von zytotoxischen Proteasen [44, 140]. Die, durch TGF- β stimulierten Fibroblasten beginnen mit der Produktion von extrazellulärer Matrix, welche das Gerüst für die Bildung von Granulationsgewebe und anderen Wundheilungsprozessen bildet. TGF soll die Produktion von Kollagen und Fibronektin anregen und die Angiogenese fördern [44, 189, 146]. TGF- β wurde zuerst in neoplastischen Zellen identifiziert [146]. Erst später wurde seine ebenfalls wichtige Funktion in der Wundheilung bekannt. Aufgrund der Tatsache, dass TGF- β die Lymphozytenproliferation hemmt, können sich Tumorzellen der Erkennung und Bekämpfung durch die spezifische Immunabwehr entziehen. Zusätzlich kann eine Neovaskularisation durch TGF- β -bedingte Stimulation Tumor-assoziiierter Makrophagen beobachtet werden [189]. Beobachtungen wie diese führten dazu, dass TGF- β neben seiner die Wundheilung fördernden Aktivität eine das Tumorstadium fördernde Eigenschaft nachgesagt wird. Eine Studie an Mäusen bestätigte eine Induktion von Tumorstadium durch TGF- β in einer mit Tumorzellen geimpften frischen Wunde [70].

3.4. Aprotinin

3.4.1. Struktur und Wirkung des Aprotinin

Aprotinin wurde bereits 1930 von *Kraut et al.* als so genannter „Kallikrein-Inaktivator“ beschrieben [92]. Unabhängig davon entdeckten *Kunitz und Nortrop* 1936, dass aus Rinderpankreas ein „Trypsininhibitor“ gewonnen werden kann [94]. Erst viel später stellte sich heraus, dass diese beiden Stoffe identisch sind. Aprotinin ist ein unspezifischer Protease-Inhibitor mit einem Gewicht von 6512D. Es bildet Komplexe mit humanen Serinproteinasen.

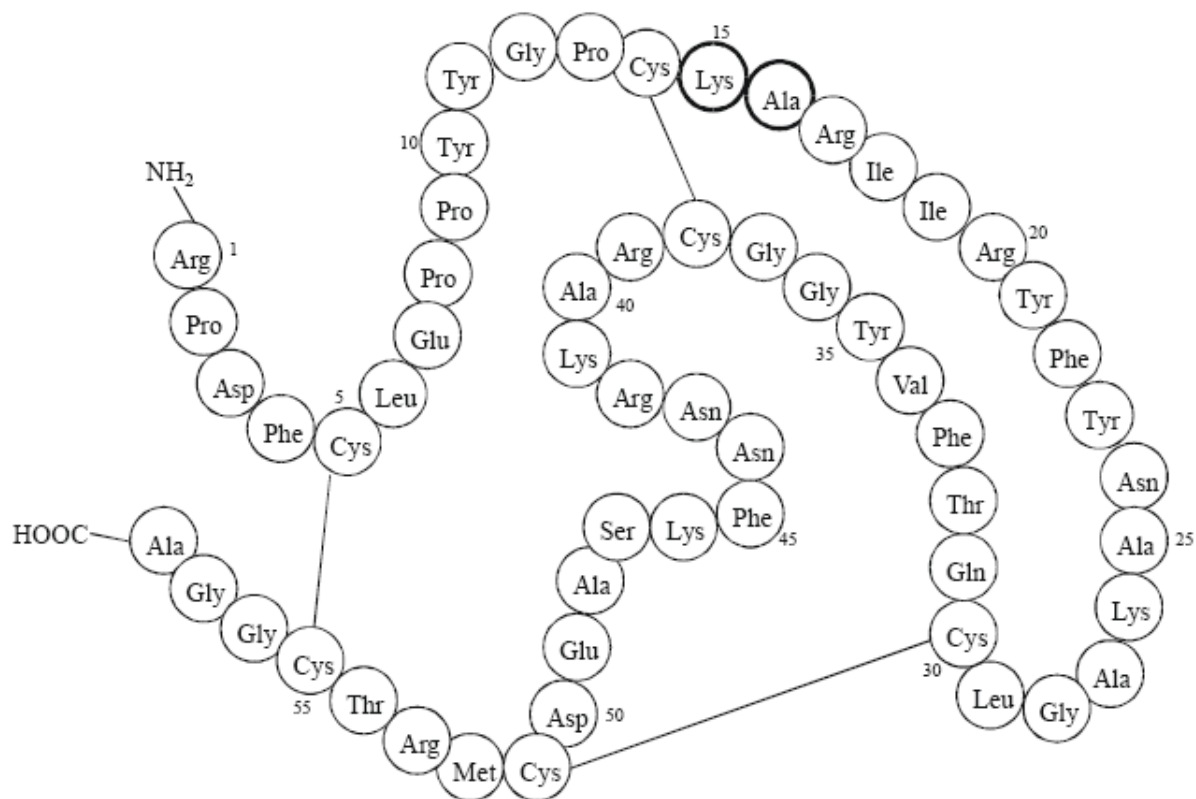


Abb.5: Primärstruktur des Aprotinins [50]

3.4.1. Einfluss auf das Gerinnungssystem

Aprotinin hemmt v.a. die Bildung von Plasmin, Kallikrein, Trypsin und Thrombin [119, 37].

Durch seine hohe Bindungsaffinität zu Plasmin greift Aprotinin, unter Bildung von Plasmin-Aprotinin-Komplexen, direkt in die Fibrinolyse ein und verhindert diese [82]. Durch hemmende Wirkung auf die Proaktivatoren (Kallikrein, Urokinase, t-PA), welche Plasminogen in aktives Plasmin überführen, wird die antifibrinolytische Wirkung des Aprotinins noch indirekt verstärkt [18, 82, 84].

Aprotinin hat jedoch nicht nur antifibrinolytische, sondern auch gerinnungshemmende Eigenschaften. Hier sei besonders die Modulation der Thrombinwirkung durch die Aktivierung des protease-activated-receptors 1 (PAR1) erwähnt. Durch die selektive Blockade dieses Rezeptors schützt Aprotinin die Thrombozyten vor einer Aktivierung durch Thrombin [96, 134, 187] und vermindert direkt die Plättchenverbindung mit dem Endothel [135, 147]. Dadurch soll u.a. die Häufigkeit und das Ausmaß perioperativ auftretender Thrombosen deutlich reduziert werden [81]. *Poullis et al.* testeten auch den Einfluss von

Aprotinin auf andere, gerinnungsfördernde Mediatoren, wie Adrenalin, Adenosin-Diphosphat, Epinephrin-Rezeptoren und Kollagen. Aprotinin hat auf deren Wirkung keinen Einfluss [135]. *Poullis et al.* beschränken somit die Beeinflussung der Gerinnung durch Aprotinin auf die alleinige Interaktion mit Thrombin, bzw. auf die durch Serinproteasen beeinflussten Mechanismen. Demnach lässt sich durch Aprotinin eine durch vermehrt anfallendes Thrombin ausgelöste Triggerung der Gerinnung verhindern, die zum Selbstläufer werden könnte, wie es z.B. bei der disseminierten intravasalen Gerinnung der Fall ist. Der normale Ablauf der Gerinnung ist aber weniger beeinflusst. *Poullis et al.* versuchen damit, die kritische Frage zu klären, ob Aprotinin prothrombotisch ist. Sie schließen mit der Feststellung, dass durch die Verhinderung der Thrombin-induzierten Plättchenaggregation sogar eine anti-thrombotische Wirkung gegeben ist, wobei die nicht durch Serinproteasen getriggerte Hämostase trotzdem aufrechterhalten bleibt. Schließt man die antifibrinolytische Wirkung des Aprotinins mit ein, kann man letztendlich von einer antithrombotischen und Fibrinolyse- hemmenden Wirkung sprechen.

Anhand dieser Fakten lässt sich nachvollziehen, dass unter Aprotiningabe ein Anstieg des ATIII, sowie eine Reduktion von TAT und D-Dimeren beobachtet werden [37, 187].

Weitere Studien über die Einflüsse des Aprotinins auf die Gerinnung brachten folgende Ergebnisse: *De Haan et al.* schreiben dem Aprotinin einen Einfluss auf die Glycoprotein-IIb/IIIa-Rezeptoren zu [61]. Dieses Glycoprotein ist, wie unter 3.2.1.1. beschrieben, ein wichtiger Rezeptor für den Von-Willebrand-Faktor in der Kaskade der Gerinnung. Die Autoren führen die bei kardiopulmonalen Bypass-Operationen beobachtete Plättchen-Dysfunktion auf eine proteolytische Degeneration dieser Rezeptoren zurück. Diese Degeneration soll durch das vermehrt anfallende Plasmin ausgelöst werden. Als Folge kommt es zu einer Störung der Gerinnungsfähigkeit des Blutes. Aprotinin hat eine den Rezeptorkomplex schützende Wirkung, indem es die Deaktivierung durch Plasmin herabsetzt. Auch hier zeigt sich die Wirkung des Aprotinins als Schutz vor einer Überstimulation des Gerinnungs- bzw. fibrinolytischen Systems und deren Folgen [61] .

Des Weiteren wird beschrieben, dass Aprotinin die Fähigkeit des Hagemann-Faktors (Faktor XII) (Abb.6) beeinträchtigt, sich an Oberflächen zu binden und sich dadurch zu autoaktivieren [99]. Dieser Faktor gehört zur Familie der Serinproteasen. Er spielt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung des intrinsischen Weges der Gerinnung und ist zusätzlich ein Stimulator der Fibrinolyse. Seine Aktivierung wird normalerweise durch Kallikrein, einer von Aprotinin inhibierten Serinprotease, amplifiziert.

Einfluss von Aprotinin auf die Gerinnung

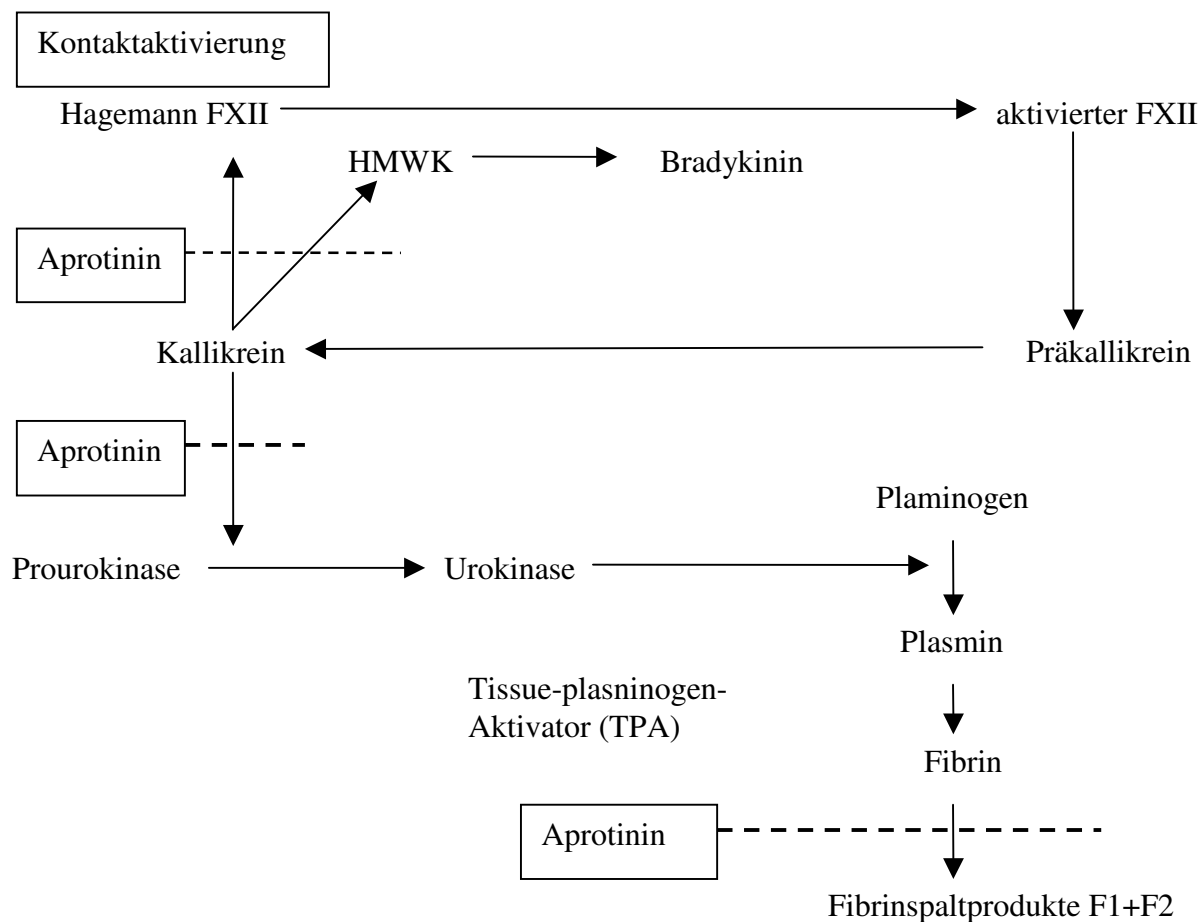


Abb.6: Inhibition des Kontaktsystems durch Aprotinin [107]. Die Pfeile bedeuten eine Aktivierung, die durchbrochenen Linien eine Inhibition. Die Aktivierung des Kontaktsystems wird durch einen negativen Einfluss auf das Gewebe ausgelöst, wodurch es zur Autoaktivierung des Hagemann-Faktor-XII kommt. Die Präsenz von bereits geringen Mengen dieses aktivierten Faktors reicht aus, um Prekallikrein in Kallikrein umzuwandeln, welches wiederum Faktor-XIII aktiviert und sich an Kininogen bindet, woraufhin das vasoaktive Bradykinin gebildet wird und Prourokinase in Urokinase umgewandelt wird.

Die Fibrinolyse besteht aus der Aktivierung von Plasminogen, welches umgewandelt in Plasmin, in der Lage ist, Fibrin zu spalten. Plasminogen wird durch Urokinase und Tissue-plasminogen-aktivator aktiviert. Aprotinin wirkt als ein Inhibitor des Kallikreins und des Plasmins.

3.4.3. Modulation der systemischen Immunantwort

In den letzten Jahren rückte außer der Modulation der Gerinnung und Fibrinolyse noch ein weiteres Wirkspektrum des Aprotinins immer mehr ins Interesse der Forschung. Es handelt sich um die Frage, wie bzw. ob Aprotinin auch auf immunologische Prozesse Einfluss nimmt und wenn ja, auf welche.

Mehrere Untersuchungen konnten zeigen, dass Aprotinin die Oberflächen-Expression von P-Selektin abschwächt. P-Selektin ist ein wichtiges Adhäsionsmolekül in der Zell-Zell-Interaktion der Immunantwort [5, 74, 96]. Es reguliert das so genannte „Rolling“ von Leukozyten entlang des Endothels. Letztendlich wandern die Leukozyten dann mit Hilfe von Integrinen durch die Gefäßwand in das verletzte Gewebe und lösen eine entzündliche Antwort aus. Zusätzlich zeigt die Expression von P-Selektin auf der Oberfläche aktivierter Thrombozyten eine chemotaktische Wirkung auf Leukozyten, die sich daraufhin an die Thrombozyten binden und aktiviert werden [74]. Diese Leukozytenaktivierung stellt eine wichtige Schlüsselfunktion in der Immunmodulation dar und spielt eine bedeutende Rolle in der Pathophysiologie des Schocks, Traumas und der Ischämie-Reperfusion [137].

Eine Stimulation der Monozyten durch P-Selektin soll eine deutlich vermehrte Expression des Tissue-Factors auslösen, einer der Hauptinitiatoren der Gerinnungskaskade [22]. In einer Studie mit anti-P-Selektin behandelten Affen fanden sich gegenüber der Kontrollgruppe nur halb so viele der zuvor mit Indium-111-markierten Leukozyten, sowie eine um ein Drittel reduzierte Fibrinmenge [127]. Oberflächenexpressionen von P-Selektin und die Konzentration des löslichen P-Selektins im zirkulierenden Blut wurden bereits als Marker für die Plättchen-Aktivierung im akuten Koronarsyndrom eingesetzt [161].

Aprotinin soll des Weiteren die Bildung von löslichem TNF- α beim Menschen reduzieren, indem es die proteolytische Spaltung des zunächst noch membrangebundenen Zytokins, zu freiem TNF- α verhindert [66, 137]. In vitro verringert Aprotinin eine TNF- α -Ausschüttung um 51% [86].

Auch auf die Ausschüttung verschiedener Interleukine soll Aprotinin einen Einfluss haben. Studien darüber beziehen sich meistens auf den Gebrauch von Aprotinin in der Herz-Thorax-Chirurgie. Zur Beeinflussung von IL-6 gibt es divergierende Aussagen. Eine klinische Studie mit 11 Patienten, die sich einer Bypassoperation unterzogen hatten, konnte eine signifikant vermehrte Freisetzung von IL-6 nachweisen [194]. Andere in-vivo-Studien zeigten, dass die IL-6 Ausschüttung zumindest durch Aprotiningabe nicht reduziert wurde [35, 193]. Eine in-vitro-Studie wies Aprotinin dagegen einen IL-6 vermindernde Wirkung nach [163]. Bei CPB-Operationen konnte eine in vitro Studie zeigen, dass es unter Aprotinin zu einer deutlich geringeren Aktivierung der neutrophilen Granulozyten kam [163]. Auf Seiten der antiinflammatorischen Zytokine zeigte sich unter Aprotiningabe ein erhöhter IL-10 Spiegel [67].

3.4.4. Klinische Anwendung

Aprotinin wurde seit 1963 in der Klinik angewandt [12]. Später wurde es hauptsächlich aufgrund seiner antifibrinolytischen Eigenschaften eingesetzt. Außerdem wurde Aprotinin bei hyperfibrinolytischen Hämostasestörungen, insbesondere bei der generalisierten Hyperfibrinolyse, angewandt, sowie bei traumatisch-hämorrhagischen Schockformen [60]. Das bekannteste Einsatzgebiet von Aprotinin war die Herz-Thorax-Chirurgie, v.a. bei kardiopulmonalen Bypass-Operationen. In zahlreichen Placebo-kontrollierten Studien wurde übereinstimmend belegt, dass Aprotinin v.a. auf den perioperativen Blutverlust, die Operationszeit und somit auch auf die Kosten positive Wirkung zeigt [14, 100].

Aber auch in der Hüftchirurgie [77] und bei Lebertransplantationen [91, 102, 108] wurde Aprotinin erfolgreich eingesetzt. Bei Lebertransplantationen werden der Gewebeplasmin-Aktivator (tPA) und Plasmin durch Aprotinin reduziert, wodurch Endothelschäden am Transplantat vermindert waren.

3.5. Fragestellung

In Anbetracht der erwähnten Komplikationen und Einschränkungen war es das Ziel unserer Studie, das Therapiekonzept im Hinblick auf eine effektivere Gewebsdestruktion und v.a. eine Reduzierung perioperativer Nebenwirkungen zu optimieren.

Hierbei sollte insbesondere die Wirkung des Medikamentes Aprotinin auf die hämostasiologische und die immunologische körperliche Reaktion während und nach der Kryotherapie beurteilt werden. Dabei stellten wir uns die folgenden Fragen:

- Welchen Einfluss hat Aprotinin auf die einzelnen Gerinnungsparameter?
- Kann durch die Gabe von Aprotinin die bei der Anwendung der Kryochirurgie häufig beobachtete Thrombozytopenie reduziert werden?
- Hat die Gabe von Aprotinin einen Einfluss auf die pro-, bzw. antiinflammatorische Systemantwort des Körpers?
- Wie reagiert das Immunsystem des Organismus auf den kryologischen Eingriff, wenn kein Aprotinin gegeben wurde?
- Lassen die Ergebnisse eine Aussage über eine eventuelle Antitumorreaktion des Organismus mit oder ohne Gabe von Aprotinin zu?
- Lassen sich Zusammenhänge zwischen hämostaseologischer und immunologischer Reaktion finden?

4. Material und Methode

4.1. Die Arbeitsgruppe

Die vorliegende Arbeit ist Teil einer umfangreichen tierexperimentellen Studie über die Anwendung der Kryotherapie an der Leber und der dadurch bedingten Thrombozytopenie. Zur Arbeitsgruppe gehörten zwei Chirurgen und zwei weitere Doktoranden deren Arbeitsbeitrag Gegenstand zweier weiterer Dissertationsarbeiten war, eine Laborassistentin und zwei Tierpfleger. Die eigenen Untersuchungen für diese Promotionsarbeit beziehen sich auf die OP-Durchführung mit Einschluss der Anästhesie der Tiere, sowie die prä-, intra- und postoperativ durchgeführten Blutentnahmen und Laborbestimmungen.

4.2. Tierexperimente

4.2.1. Versuchstierhaltung

Alle Tierversuche wurden gemäß der Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt. Als Versuchstiere dienten 30 Schwäbisch-Hallesche Landschweine aus einer regional ansässigen Schweinezucht. Das Durchschnittsgewicht der Tiere lag zum Versuchsbeginn bei 25,0 $\pm$ 0,5kg. Die Tiere waren während der Zeit der Versuchsdurchführung in der Versuchstierhaltung der Abteilung für Klinisch-Experimentelle Chirurgie untergebracht (Universität des Saarlandes, Homburg/ Saar, Direktor: Herr Prof. Dr. med. M.D. Menger, Tierschutzbeauftragte Frau Dr. med. vet. Frings). Mit Ausnahme der perioperativen Phase erfolgte die Ernährung der Tiere mit Standardfutter (Raiffeisen, Köln). Zur Operationsvorbereitung erhielten die Tiere am Tag vor der Operationsdurchführung nur Wasser.

4.2.2. Prämedikation und Narkose

Die Tiere wurden am Operationstag mit 10 mg/ kg KG Azaperon (Stresnil®; Janssen, Neuss) und 10 mg/kg KG Methomidate Hydrochlorid (Hypnodyl®; Janssen, Neuss) prämediziert. Zur Narkoseeinleitung wurde 1 mg/ kg KG Etomidate (Hypnomidate®, Janssen, Neuss) über einen peripheren venösen Zugang in die Ohrvene injiziert.

Vom Jugulum her wurde die Vena anonyma punktiert und ein zentraler Venenkathether (Certofix®, B. Braun, Melsungen) bis in die Vena cava vorgeschoben.

Zur kontinuierlichen, volumenkontrollierten Beatmung (Narkosegerät: Siemens Elena 900D) erfolgte in Rückenlage die orale Intubation mit einem 7-Charrier Tubus.

Es folgte die Anlage einer großlumigen Magensonde zur Entlastung des Magens. Die Aufrechterhaltung der Narkose während der Operation erfolgte durch die Infusion von 2-4 mg/kg KG/h Thiopenthal Natrium (Trapanal®; Byk Gulden, Konstanz), gelöst in einer isotonen NaCl-Lösung (Delta-Pharma, Pfullingen).

Die mittlere Narkosedauer betrug 130+/-4,5min. Das Schwein wurde mit einem FiO₂ von 0,30, bei einem Atemzugvolumen von 10ml/kg KG und einer Frequenz von 12 Atemzügen/min, beatmet, wobei diese Parameter intraoperativ den physiologischen Bedürfnissen der einzelnen Tiere angepasst wurden. Angestrebt wurde ein end-expiratorischer CO₂ (entspricht rel. genau dem art. pCO₂) zwischen 30-38 mmHg. Das Tier unterlag einer permanenten Überwachung durch ein Dreikanal-EKG (Siemens SC 700). Des Weiteren erfolgten vor der ersten und zweiten Kryochirurgie jeweils eine Blutgasanalyse (Chiron Diagnostics 348; Chiron Diagnostics, East Walpol, MA, USA).

Die Flüssigkeits- und Elektrolytsubstitution erfolgte durch die Infusion (10-20 ml/kg KG/h) von auf Körpertemperatur erwärmten Ringerlaktatlösungen (B. Braun, Melsungen) und 0,9% NaCl nach Bedarf. Zur perioperativen Antibiotikaprophylaxe wurden einmalig 100mg Ampicillin und 500mg Salbactam (Unacid® 1,5g; Pfizer, Karlsruhe) zu Beginn der Narkose zugeführt.

Die Ausleitung der Narkose erfolgte mit Umstellung des Respirators von CMV-Beatmung (controlled mechanical ventilation) auf CPAP-Beatmung (continous positive airway pressure = druckunterstützt). Bei adäquater Spontanatmung mit einem Wiedereintreten der Schluck- und Hustenreflexe bei einem FiO₂ von 0,21 wurde das Schwein extubiert.

4.2.3. Operationsdurchführung

Das Tier wurde auf dem Rücken auf einer elektrischen Heizmatte auf dem Operationstisch gelagert und an den Extremitäten fixiert. Die Bauchhaut wurde rasiert und mit wässriger Polyvidon-Jod-Lösung (Braunol®; B. Braun Melsungen) desinfiziert. Alle Eingriffe erfolgten unter aseptischen Bedingungen. Für die Operation wurden Instrumente benutzt, die auch in der humanen Bauch- und Leberchirurgie eingesetzt werden. Das Versuchstier wurde median laparotomiert. Es folgte ein schichtweises Öffnen der Bauchdecke unter elektrischer Blutstillung (Elektrotom 300, Erbe Elektromedizin Tübingen). Die Darstellung des Situs erfolgte nach Einbringen eines Rahmens und Mobilisation des Dünndarms, welcher in der

Folgezeit durch Bauchtücher geschützt wurde. Mittels anschließender Präparation des Ligamentum hepatoduodenale folgte das Freilegen von Vena portae und Arteria hepatica propria, um perivaskulär jeweils eine Ultraschallflussmesssonde (Transonic Systems, Ithaca USA) an den beiden Gefäßen anzubringen. Die Flussmessköpfe wurden mit Ultraschallgel bedeckt und mit einem Ultraschallvolumenflussmessgerät (T 206, Transonic Systems, Ithaca USA) konnektiert. Danach wurden der linke mittlere und der linke seitliche Leberlappen mobilisiert, um nacheinander zwei Kryotherapiezyklen im linken Leberlappen durchzuführen. Im Anschluss wurde eine Kryosonde (Erbe Elektromedizin, Tübingen) von 3,2 mm Durchmesser mit dem Kryosystem (Cryo 6, Erbe) verbunden und in der Leber des Versuchstieres platziert. Zur Temperaturerfassung wurden zusätzlich zur Kryosonde zwei Thermoelemente (Erbe) in 1 und 2 cm Entfernung zur Kryosonde ins Lebergewebe eingebracht (Abb.7). Nun folgte der erste Frierzyklus im linken seitlichen Leberlappen bei einer Temperatur der Kryosondenspitze von -168°C und anschließendem passiven Auftauen. Nach Entfernen der Sonde wurden Blutungen aus den Stichkanälen der Sonde mit PDS 3-0 (PDSTMII 3-0 needle SH, Ethicon, Johnson & Johnson Company, Norderstedt) übernäht. Ebenso wurden beim Tauvorgang auftretende Leberkapseleinrisse, so genannte „Crackings“ mittels Naht versorgt. Im Anschluss erfolgte eine 15-60min Erholungsphase, bevor der zweite Frierzyklus im linken mittleren Leberlappen durchgeführt wurde.

Am Ende des Eingriffs erfolgte die Entfernung aller Messsonden und nach Prüfung auf Bluttrockenheit der schichtweise Verschluss der Bauchdecke: Zuerst fortlaufende Naht der Muskelfaszie mit Vicryl 1 (Ethicon Norderstedt), dann fortlaufende Subkutannaht mit Vicryl 2-0 (Ethicon Norderstedt) und abschließend Tackern der Haut mit einem Klammergerät.

Um den ZVK sicher zu fixieren, wurde von der Einstichstelle am Hals bis hinter das rechte Ohr die Haut bis auf die subkutane Ebene inzidiert und der ZVK im Subkutangewebe mit Einzelknopf-Nähten fixiert (Vicryl 3-0), anschließend wurde das Hautareal zugeklammert. Zum Schluss wurden die Wunden mit einem wasserdampfpermeablen Sprühverband (Smith and Nephew) abgedeckt.

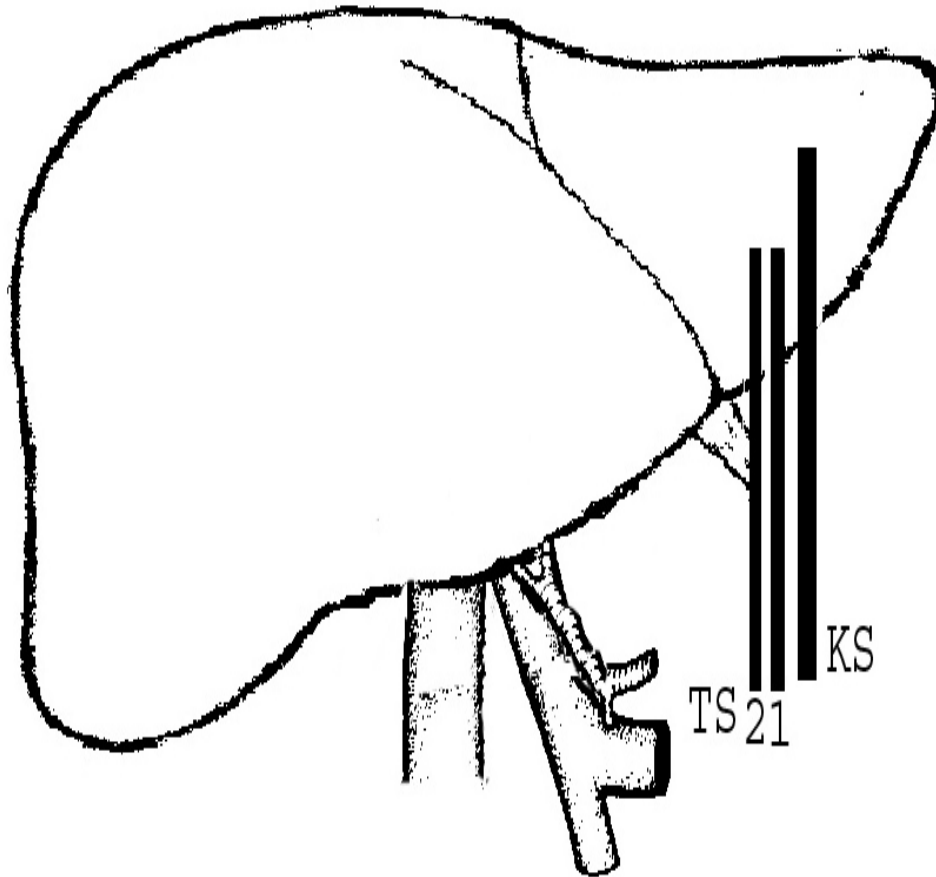


Abb.7: Intraoperative Platzierung der Kryosonde (Ks) mit Temperatursonden (TS) 1 und 2

4.2.4. Kryogerät und Kryosonde

Bei allen Versuchen wurde das ERBE CRYO 6 System verwendet (Erbe Elektromedizin GmbH, Tübingen) (Abb.8). Das Gerät nutzt flüssigen Stickstoff (N_2) als Kryogen.

Der flüssige Stickstoff wird aus einem im Gerät befindlichen Tank mittels einer Pumpe durch die Kryosonden gepumpt. Es lassen sich bis zu sechs Kryosonden gleichzeitig betreiben. In der in der vorliegenden Studie verwendeten Versuchsanordnung wurde jeweils nur eine Kryosonde eingesetzt. An der Spitze der Kryosonde befand sich eine Temperatursonde. Zwei weitere Sonden wurden im Abstand von 10 und 20mm von der Kryosonde appliziert. Das Erreichen der Zieltemperatur von $-168^{\circ}C$ wurde über die Temperatursonde an der Kryosonde ermittelt. Die zwei weiteren Temperatursonden zeigten die Ausbreitung des Eisballs an.

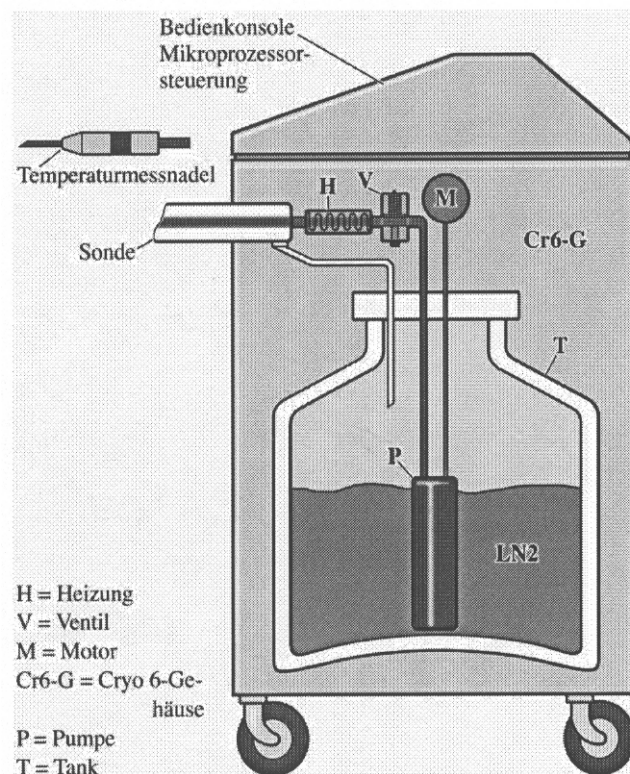


Abb. 8: Prinzipskizze Erbe Cryo 6. aus: Bedienungsanleitung und Informationsmaterial zu Erbe Cryo 6 (Fa. Erbe Elektromedizin, Tübingen)

4.2.5. Nachbeobachtung

Nach Operationsende wurden die Tiere zur weiteren Beobachtung, Infusionstherapie und Wärmeerreichung mit einem Heizstrahler in einer speziell für diesen Zweck angefertigten Holzkiste gehalten. Dieses Vorgehen war nötig, da oben genannte Bedingungen in den Stallungen wegen des zu großen Bewegungsspielraums nicht hätten gewährleistet werden können.

Nach den ersten 8h der postoperativen Nachbetreuungsphase wurden die Tiere in die normalen Einzelboxen entlassen. Hier erfolgte die tägliche Visite zur postoperativen Wundkontrolle und Blutentnahme.

4.3. Gruppeneinteilung und Kryotherapiemethoden

4.3.1. Beschreibung des Versuchsablaufs für Gruppe 1 bis 5

Gruppe 1: Diese Tiere dienten als Kontrolle (Sham-Operation), die Eröffnung des Situs und die Mobilisation der Leberlappen erfolgte wie bei den anderen Versuchsgruppen, es wurde jedoch keine Kryoläsion gesetzt.

Gruppe 2 bis: Es erfolgten entsprechend der jeweiligen Gruppe ein bis zwei Kryoläsionen, ggf. unter Gabe von Aprotinin bzw. unter Anwendung des selektiven vaskulären Clampings. An den jeweiligen Messpunkten (Abb.7) erfolgte die Dokumentation von:

- Kryosondentemperatur
- Temperatur Thermoelement 1 und 2

4.3.1.1. Gruppe 1: Sham OP

In dieser Gruppe befanden sich drei weibliche und 3 männliche Tiere. Sie wurden mit einem zentralen Venenkatheter versorgt und danach median laparotomiert.

4.3.1.2. Gruppe 2 „2x7,5min Frieren“

Die Gruppe bestand aus 6 Tieren, fünf männlichen und einem weiblichen. Nach medianer Laparotomie wurde im medialen und lateralen linken Leberlappen jeweils eine Kryoläsion gesetzt und nach folgendem Frierkonzept vorgegangen:

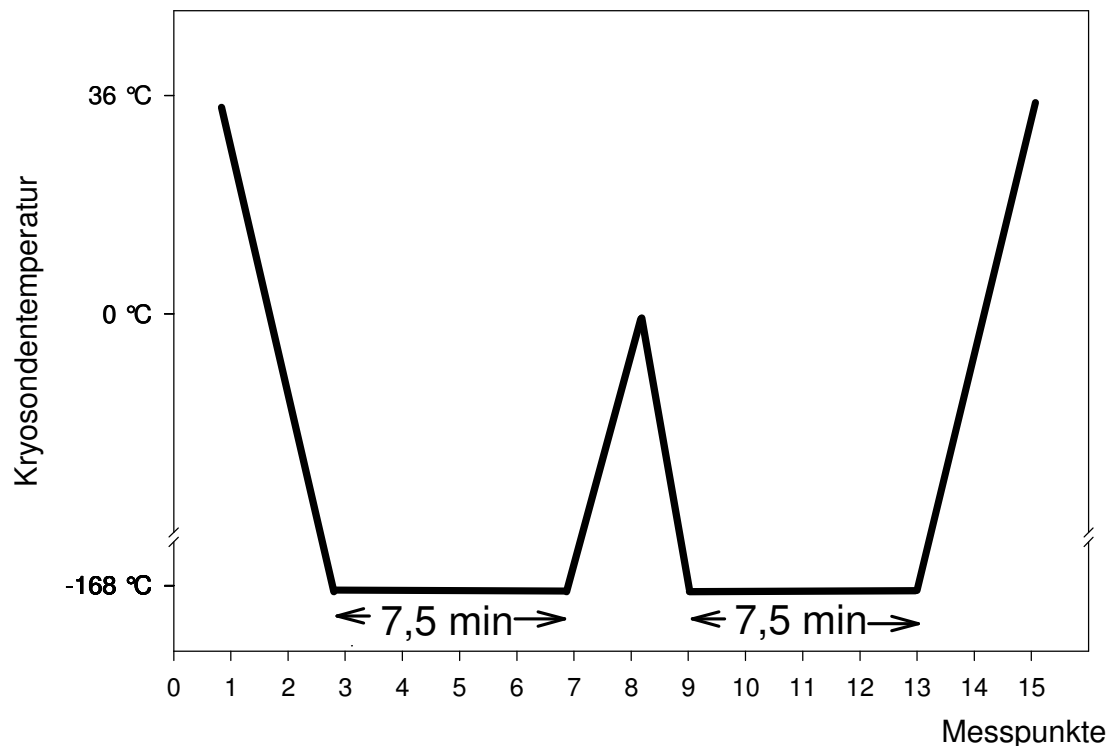


Abb.9: Gruppe 2: „2x7,5min Frieren“

- Messpunkt 1: Einschalten des Kryogerätes, das Lebergewebe hat zu diesem Zeitpunkt die normale Körpertemperatur
- Messpunkt 2: Erreichen von 0°C
- Messpunkt 3: Erreichen des Sollwerts der Frieretemperatur von -168°C
- Messpunkt 4: 2min Frieren bei -168°C
- Messpunkt 5: 4min Frieren bei -168°C
- Messpunkt 6: 6min Frieren bei -168°C
- Messpunkt 7: nach 7,5min Frieren Ausschalten des Kryogeräts bei -168°C und passives Auftauen
- Messpunkt 8: Erreichen von 0°C und Fortsetzen des Frierens
- Messpunkt 9: Wiedererreichen des Sollwerts der Frieretemperatur von -168°C
- Messpunkt 10: 2min Frieren bei -168°C

- Messpunkt 11: 4min Frieren bei -168°C
- Messpunkt 12: 6min Frieren bei -168°C
- Messpunkt 13: nach 7,5min Frieren Ausschalten des Kryogeräts bei -168°C und passives Auftauen
- Messpunkt 14: Erreichen von 0°C
- Messpunkt 15: Beenden des Frierzyklus bei Erreichen von 30°C der Leber

4.3.1.3. Gruppe 3: „15min Frieren“

Die Gruppe bestand aus sechs Tieren, alle waren männlich. Nach medianer Laparotomie wurde im medialen und lateralen linken Leberlappen jeweils eine Kryoläsion gesetzt und nach folgendem Frierkonzept vorgegangen:

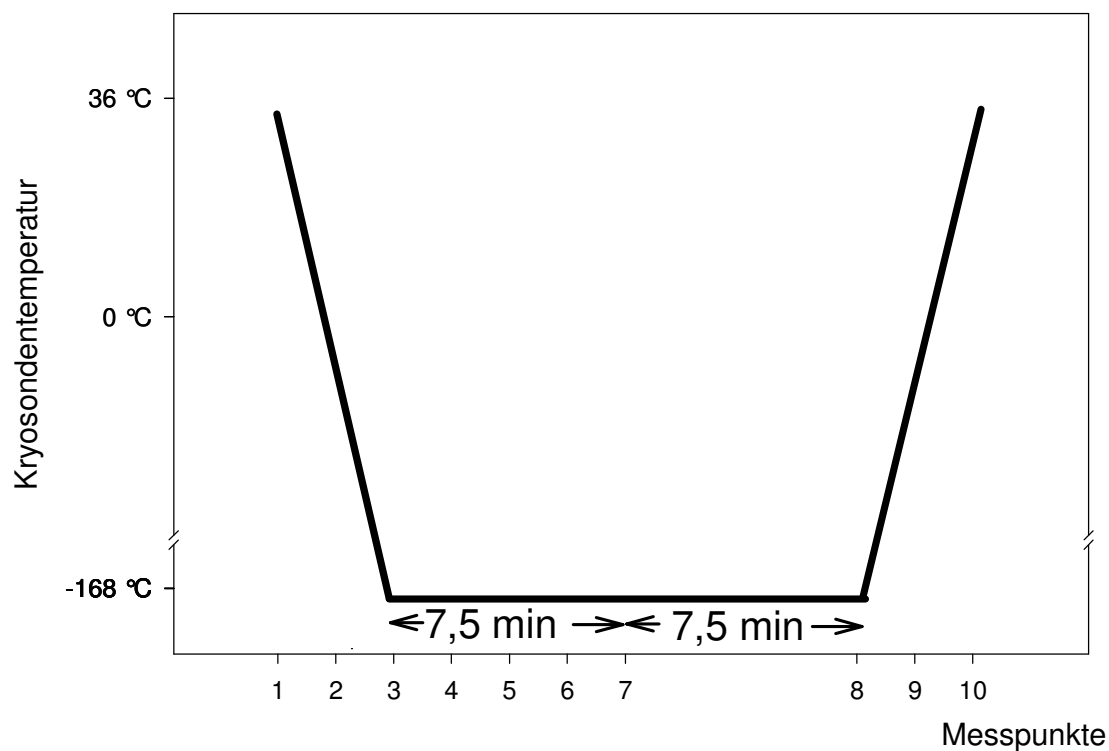


Abb.10: Gruppe 3: „15min Frieren“

- Messpunkt 1: Beginn des Frierens bei Körpertemperatur des Lebergewebes durch Einschalten des Kryogeräts
- Messpunkt 2: Erreichen von 0°C
- Messpunkt 3: Erreichen des Sollwerts der Frieretemperatur von -168°C
- Messpunkt 4: 2 min Frieren bei -168°C

- Messpunkt 5: 4 min Frieren bei -168°C
- Messpunkt 6: 6 min Frieren bei -168°C
- Messpunkt 7: 7,5 min Frieren und Umschalten des Kryogeräts auf Temperatur halten („holding“)
- Messpunkt 8: Nach zusätzlichen 7,5 min Temperatur holding Ausschalten des Kryogeräts bei -168°C und passives Auftauen
- Messpunkt 9: Erreichen von 0°C
- Messpunkt 10: Beenden des Frierzyklus bei Erreichen von 30°C der Leber

4.3.1.4. Gruppe 4: „15 min Frieren + Selektives vaskuläres Clamping“ (SVC)

Die Gruppe bestand aus sechs Tieren, davon waren drei weiblich, drei männlich. Um die Einflüsse von zirkulierendem Blut auf die Kryotherapie zu beurteilen, wurden die Tiere aus Gruppe 4 unter Abklemmung der zum linken Leberlappen führenden Gefäße kryotherapiert. Im Gegensatz zu einer kompletten Okklusion des Ligamentum hepatoduodenale, dem sogenannten Pringle-Manöver, wurde ein Selektives vaskuläres Clamping (SVC) des linken Leberlappens durchgeführt, um den venösen Abfluss über die mesenteriale Strombahn während des gewählten Zeitraums möglichst wenig zu beeinträchtigen. Mit einer Overholdklemme wurden Gummizügel sowohl um den linken Ast der V. portae als auch um die A. hepatica sinistra gelegt. Bis zum Beginn der Kryotherapie blieben diese Tourniquets geöffnet, so dass die Durchblutung des linken Leberlappens nicht beeinträchtigt war. Das SVC-Manöver wurde unmittelbar vor Beginn der Kryotherapie ausgeführt. Die Durchblutungsunterbrechung für jede Kryoläsion betrug eine Stunde. Das Frierprotokoll war identisch mit dem von Gruppe 3.

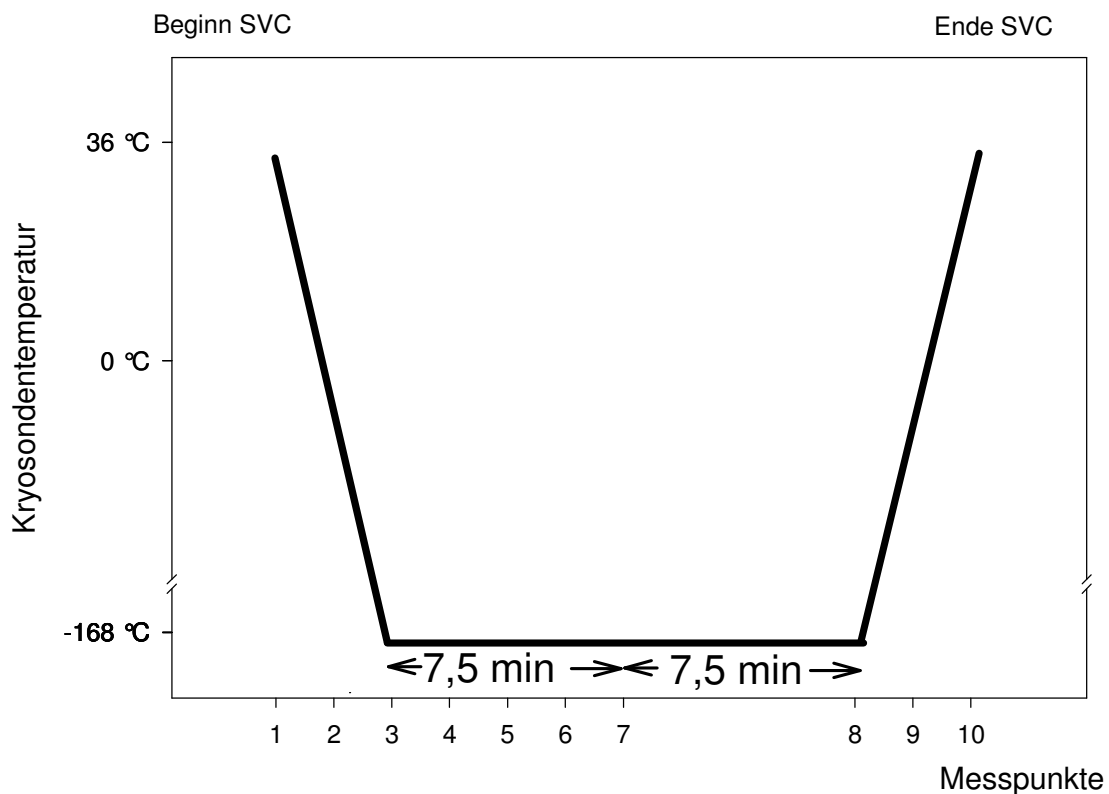


Abb.11: Gruppe 4: „15min Frieren+SVC“

4.3.1.5. Gruppe 5 „15 min Frieren + Aprotiningabe

Die Gruppe bestand aus sechs Tieren, drei waren weiblich, drei männlich. Die Tiere erhielten zusätzlich zur Kryotherapie 2x 70 mg Aprotinin = 500000 Kallikrein inaktivierende Einheiten (Trasylol® 500000 KIE; Bayer AG, Leverkusen, 1 KIU0 277, 8 European pharmacopoeia units). Direkt vor Beginn der Laparotomie wurde ein intravenöser Bolus von 500,000 KIE verabreicht. Über einen Zeitraum von 3h folgte mittels eines Perfusors (Infusomat SL, Braun, Melsungen) diesem eine weitere Gabe von 500000 KIE durch kontinuierliche Infusion. Das Frierprotokoll war identisch mit dem der Gruppe 3.

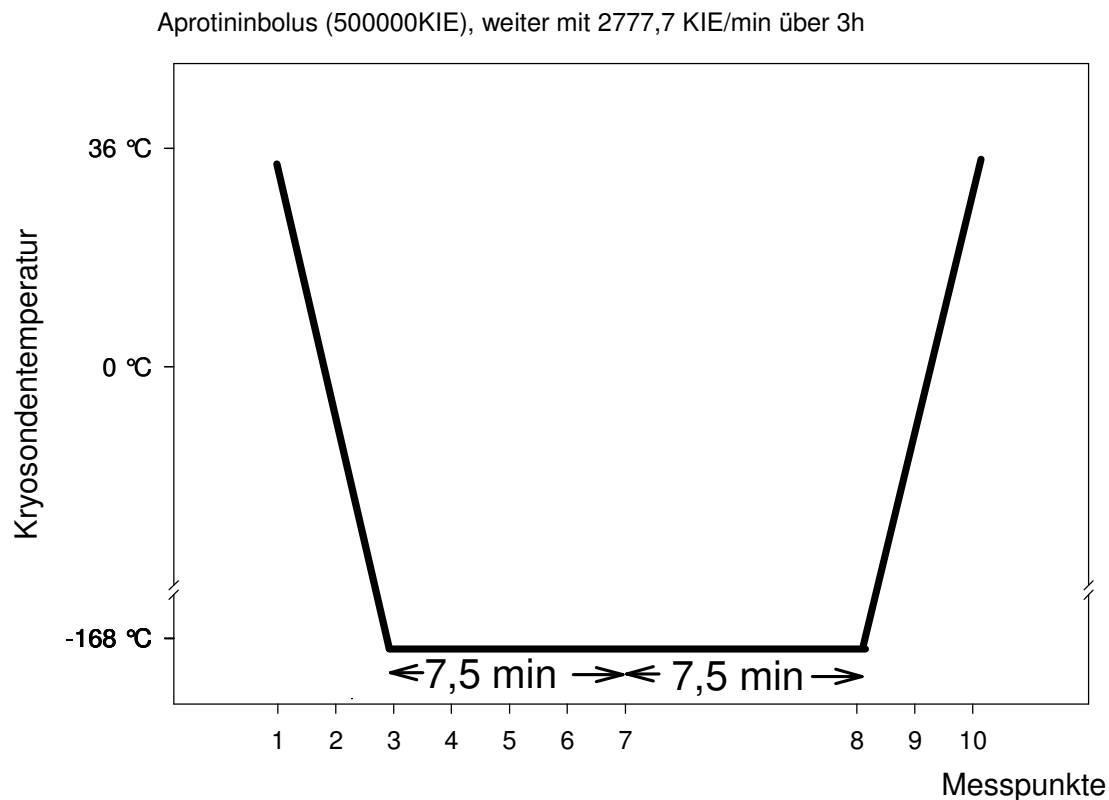


Abb.12: Gruppe 5: „15min Frieren+Aprotinin“

4.3.2. Todeszeitpunkt und Euthanasie

Am Ende des Versuchs (7d nach der Operation) wurden die Schweine nach sedativer Prämedikation mit 0,1mg/kg KG Midazolam (Dormicum[®], Roche, Grenzach-Whylen) und anschließender Barbituratnarkose mit 35mg/kg KG Narcoren[®] (Merial, Hallbergmoos) durch 2mmol/kg KG KCl i.v. (Kaliumchlorid-Braun[®]) in tiefer Narkose euthanasiert.

4.3.3. Obduktion

Nach Tötung der Tiere wurden diese in Rückenlage laparotomiert, und die Bauchhöhle inspiziert. Die Leber wurde nach Durchtrennen der Leberpforte, sowie aller fixierenden Bandstrukturen, in toto entnommen. Nach Begutachtung der Leber und Auffinden der Kryoläsionen im linken Leberlappen wurde dieser lamelliert und die Größe der Läsionen vermessen. Die gesamte Vorgehensweise während der Obduktion wurde photodokumentiert.

4.4. Material, Reagenzien

4.4.1. Gewinnung der Proben und Entnahmezeitpunkte

Über den in der Vena cava liegenden zentralen Venenkatheter wurde den Tieren zu folgenden Zeitpunkten Blut in Serum- und Citratmonovetten (Sarstedt, Nümbrecht) abgenommen:

- Präoperativ vor Eröffnen der Bauchhöhle („*Base*“)
- Zwischen dem 1. und 2. Kryotherapiezyklus („*Cryo*“)
- 0,5h min nach Kryotherapie *
- 1h nach Kryotherapie
- 3h nach Kryotherapie
- 6h nach Kryotherapie
- 24h nach Kryotherapie
- am 3. und 7. postoperativen Tag

*zu diesem frühen Zeitpunkt wurden nur die Gerinnungsparameter bestimmt, die Interleukine wurden erst 1h nach dem Beginn der Kryotherapie und von da an zu gleichen Zeitpunkten wie die Gerinnungsparameter bestimmt.

Für die Blutentnahmen über den ZVK mussten die Tiere je nach Bedarf mit bis zu 2mg Dormicum® i.v. sediert werden. Danach wurde der ZVK mit 0,6ml Heparin gefüllt, um eine Thrombosebildung am ZVK zu vermeiden

4.4.2. Bestimmung der Gerinnungsparameter

4.4.2.1. Antithrombin III (ATIII)

Verwendetes Messkit: Berichrom Antithrombin III, Dade-Behring Marburg, Germany

Testausführung: Das Antithrombin III der Probe wurde durch Heparin in einen Sofort-Inhibitor überführt, welcher hinzugegebenes Thrombin inaktiviert. Der überschüssige restliche Thrombin-Gehalt wurde photometrisch im Extinktionsbereich von 405nm gemessen

und gegen einen Referenzmesswert aufgetragen, der mit einem Bezugsplasma mit Sollwertangabe für ATIII (Standard-Human-Plasma) bestimmt wurde.

Referenzbereich: gesunde Erwachsene 75 -125% der Norm

Messbereich: 0-140% der Norm

Verwendetes Gerinnungsmessgerät: BCS, Dade Behring Marburg, Germany

Verwendete Reagenzien und Chemikalien:

- bovines Thrombin-Reagenz, lyophilisiert (gefriergetrocknet), mit Zusatz von Heparin, Mannit, Aprotinin, NaCl
- Substrat-Reagenz, lyophilisiert: Tosylglycyl-Prolyl-Arginyl-5-Amino-2-Nitrobenzoesäure-Isopropylamid
- Pufferlösung: Tris, NaCl, pH: 8,2
- Human-ATIII-Standard-Plasmen
- Essigsäure 20%
- NaCl

4.4.2.2. Thrombin-Antithrombin III-Komplex (TAT)

verwendetes Messkit:

Enzygnost TAT micro, Dade Behring Marburg, Germany

Testausführung: Es handelte sich um ein Enzymimmunoassay nach dem Sandwich-Prinzip zur in-vitro-Bestimmung des Human-Thrombin/Antithrombin III Komplex (TAT).

Während der ersten Inkubation band sich das in der Probe vorhandene TAT an die Kaninchen-Antikörper gegen Human-Thrombin, die an der Oberfläche der Mikrotiterplatte fixiert waren. Nach einer Inkubation von 15min bei 37°C und zweimaligem Waschen wurden in einer 2. Reaktion Peroxidase-konjugierte Antikörper gegen Human-ATIII an die freien ATIII Determinanten gebunden. Die überschüssigen Enzym-konjugierten Antikörper wurden ausgewaschen. Zuletzt wurden 100µl der Chromogen-Puffer/Substrat Lösung hinzugefügt und bei Raumtemperatur unter Lichtschutz 30min inkubiert. Die enzymatische Farbreaktion wurde mit 100µl Stopplösung gestoppt.

Anschließend wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 492nm photometrisch gemessen. Diese war direkt proportional zur TAT-Konzentration der Proben. Aus den TAT-Standard-Plasmen S1-S4 (Konzentrationsbereich von 2-60µg/l) wurde eine Referenzkurve erstellt, an der die TAT-Konzentration der Proben ermittelt werden konnte.

Referenzbereich: gesunde Erwachsene: 1,0-4,1µg/l, gesunde Schweine: 2,9+/-1,2

Messbereich: 2-60 µg/l

Verwendetes Gerinnungsmessgerät: Mikrotiterplattenreader Dynatech, MR 7000 (Dynatech, Denkendorf)

Verwendete Reagenzien und Chemikalien:

- Enzymogast TAT micro: mit Kaninchen-Antikörper gegen Human-Thrombin beschichtete Mikrotiterplatten
- Anti-Human-ATIII/POD-Konjugat: Anti-Human-ATIII, Peroxidase-konjugiert, Kaninchen
- Konjugat-Puffer: Tris-Pufferlösung (50mmol/l), BSA
- TAT-Standard-Plasmen S1-S4 (human): Konzentrationsbereich 2-60µg/l
- Proben-Puffer (TAT): Tris-Pufferlösung (100mmol/l), Tween (10ml/l), EDTA(37g/l)
- Waschlösung POD (konzentrat): Tween-haltige (18g/l) Phosphat-Pufferlösung (90mmol/l)
- Puffer/ Substrat POD: Wasserstoffperoxid (0,3g/l) in Citrat-Pufferlösung
- Chromogen POD: o-Phenylendiamin-Dihydrochlorid
- Stopplösung POD: 0,5N Schwefelsäure

4.4.2.3. Fibrinspaltprodukte (D-Dimere)

Verwendetes Messkit: Asserachrom D-Dimer, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany

Testausführung: Es handelte sich um einen Sandwich-Test. Bei der ersten immunologischen Reaktion band der auf den Mikrotitrationsstreifen fixierte spezifische Anti-Fragmin-D-Antikörper (Kaninchen) die Fibrinspaltprodukte der Probe, reagierte aber nicht mit Fibrinogen und dessen Spaltprodukten.

D-Dimere besitzen mehrere antigene Determinanten. Daher wurden in der anschließenden 2. Immunreaktion mit Peroxidase-markierten anti-FDP-D-Antikörpern Sandwichkomplexe gebildet, deren Menge proportional zum D-Dimer-Gehalt der Probe war.

Im nachfolgenden Waschschrift (Trennung von gebundenem und freiem Antigen) wurde das nicht gebundene Peroxidase-Konjugat entfernt. Die Aktivität der wandgebundenen Peroxidase wurde photometrisch nach Zufügen von Harnstoffperoxid und Chromogen-o-Phenylendiamin bestimmt.

Referenzbereich: gesunde Erwachsene: < 400ng/ml

Messbereich: 10-1150 ng/ml

Verwendetes Gerinnungsmessgerät: Mikrotiterplattenreader Dynatech, MR 7000 (Dynatech, Denkendorf)

Verwendete Reagenzien und Chemikalien:

- spezifischer, an Peroxidase gekoppelter, anti-Fragment-d-Antikörper (Kaninchen)
- Chromogen POD: o-Phenylendiamin-Dihydrochlorid
- konzentrierter Phosphatpuffer
- konzentrierte Waschlösung
- D-Dimer-Standard Lösung (zur schrittweisen Verdünnung)

4.4.2.4. Prothrombinfragmente 1+2 (F1+F2)

verwendetes Messkit: Enzygnost F1+2 micro, Dade Behring Marburg, Germany

Testausführung: Es handelte sich um ein Enzymimmunoassay nach dem Sandwich-Prinzip zur in-vitro-Bestimmung der Human-Prothrombin-Fragmente F1+F2.

Während der ersten Inkubation band sich das in der Probe vorhandene TAT an die Kaninchen-Antikörper gegen Human-F1+F2, die an der Oberfläche der Mikrotiterplatte fixiert waren. Nach einer Inkubation von 15min bei 37°C und zweimaligem Waschen wurden in einer 2. Reaktion Peroxidase-konjugierte Antikörper gegen Human-Prothrombin an die freien F1+F2 Determinanten gebunden. Die überschüssigen Enzym-konjugierten Antikörper wurden ausgewaschen. Zuletzt wurden 100µl der Chromogen-Puffer/Substrat Lösung hinzugefügt und bei Raumtemperatur unter Lichtschutz 15min inkubiert. Die enzymatische Farbreaktion wurde mit 100µl Stopplösung gestoppt.

Anschließend wird die Extinktion bei einer Wellenlänge von 492nm photometrisch gemessen. Diese ist direkt proportional zur F1+F2 Konzentration der Proben. Aus den F1+F2-Standard-Plasmen S1-S4 (Konzentrationsbereich von 0,04 bis 10nmol/l) wurde eine Referenzkurve erstellt, an der die F1+F2-Konzentration der Proben ermittelt werden konnte.

Referenzbereich: gesunde Erwachsene: 0,4-1,1nmol/l

Messbereich: 0,04-10nmol/l

Verwendetes Gerinnungsmessgerät: Mikrotiterplattenreader Dynatech, MR 7000 (Dynatech, Denkendorf)

Verwendete Reagenzien und Chemikalien:

- Enzymogast F1+F2 micro: mit Kaninchen-Antikörper gegen Human- F1+F2 beschichtete Mikrotiterplatten

- Anti-Prothrombin/POD-Konjugat: Anti-Human-Prothrombin, Peroxidase-Konjugat vom Kaninchen
- Konjugat-Puffer: Tris-Pufferlösung (50mmol/l), BSA
- F1+F2 Standards S1-S4 (human): Konzentrationsbereich 0,04-10nmol/l
- Proben-Puffer (F1+F2): Tween-haltige Tris-Pufferlösung, NaCl
- Waschlösung POD (Konzentrat): Tween-haltige (18g/l) Phosphat-Pufferlösung (90mmol/l)
- Puffer/ Substrat POD: Wasserstoffperoxid (0,3g/l) in Citrat-Pufferlösung
- Chromogen POD: o-Phenylendiamin-dihydrochlorid
- Stopplösung POD: 0,5N Schwefelsäure

4.4.3. Bestimmung der Zytokine

Verwendete Messkits:

- 1) Biosource, USA: *Swine IL-4 CytoSets*, 10-Plate Format
- 2) Biosource, USA: *Multispecies TGF- β CytoSets*, 10-Plate Format *porcine TNF- α / TNFSF1A*

Inhalt:

- Monoantikörper
- biotinylierter Detektions-Antikörper
- Standards
- Streptavidin HRP-Konjugat
- die folgenden Chemikalien und Reagenzien:

Chemikalien und Reagenzien:

PBS-Puffer (Phosphate Buffered Saline):

- 8,0g NaCl
- 1,42g Na₂PO₄
- 0,2g KH₂PO₄
- 0,2g KCl
- auffüllen zu 1l mit destilliertem H₂O, pH7,4

Blockerlösung:

- PBS-Puffer + 5,0g bovines Serum-Albumin (BSA)

Standardverdünnungspuffer:

- PBS
- 0,5g BSA
- 1ml Tween 20

Waschpuffer:

- 9,0g NaCl
- 1ml Tween 20
- q.s. zu 1l mit destilliertem H₂O

Stopplösung:

- 1,8 NH₂SO₄

Testausführung: Die Bestimmung der Zytokine (IL-4, IL-6, IL-10, TGF- β , TNF- α) aus den Seren erfolgte mittels eines Doppelsandwich-ELISA.

Im ersten Schritt wurden 96-Well-Mikrotiterplatten von hoher Proteinbindungskapazität mit 100 μ l der jeweiligen monoklonalen Antikörperverdünnung (PBS) beschichtet. Diese wurden über Nacht bei 4°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Antikörper von den Platten aspiriert und auf Absorberpapier von überschüssiger Flüssigkeit befreit. Daraufhin wurden 300 μ l Blockerlösung zu jeder Platte hinzugegeben und diese über 2h bei Raumtemperatur inkubiert, um freie Bindungsstellen zu blockieren. Gemäß der Herstellerinformation wurden die Platten danach 3-4mal mit 400 μ l Waschpufferlösung pro Well gewaschen.

Im nächsten Schritt wurden 100 μ l der Serumproben sowie 100 μ l der jeweils mit dem Standardverdünnungspuffer verdünnten Zytokin-Standards hinzugegeben. Die schrittweise Verdünnung erfolgte jeweils in einem Verhältnis von 1:2. Es folgte eine Inkubation über 2h. Während dieser Zeit band der an die Platte gebundene Antikörper das in der Probe vorhandene Antigen. Daraufhin wurden 50 μ l des biotinylierten Detektions-Antikörpers (in entsprechender Verdünnung) in die Mikrotiterplatten pipettiert. Dieser zweite Antikörper band sich ebenfalls an das Antigen, so dass ein Antikörper-Antigen-Antikörper Komplex entstand. Die Platten wurden abermals über 2h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationsphase wurden die Platten erneut 3mal gewaschen. Die ungebundenen

Bestandteile der Probe wurden dadurch entfernt, zurück blieb nur das am (*coating*-) Antikörper gebundene Antigen.

Nach dem Waschen wurden pro Well 100µl einer Avidin-Peroxidase (Streptavidin-HRP) in jeweils geforderter Verdünnung hinzugegeben und die Platten über 30min unter ständigem Schütteln inkubiert.

Durch erneutes Waschen der Platte wurde der überschüssige zweiter Antikörper gewaschen und danach 100µl des Chromogens TMB (Tetramethylbenzidin) pro Well hinzugegeben. Es wurde wiederum über 30min inkubiert. Dann wurde die Farbreaktion mit 100µl Stopperlösung gestoppt. Anschließend wurde im ELISA-Reader die optische Dichte bei 450nm gemessen.

4.4.4. Statistik

Die statistischen Berechnungen und die graphischen Darstellungen wurden mit Hilfe der Computerprogramme SigmaStat® bzw. SigmaPlot® (Jandel Scientific Corp., Calif.) vorgenommen. Alle Werte wurden auf Normalverteilung und Varianzgleichheit geprüft. Die Ergebnisse der Zeitpunktvergleiche innerhalb einer Gruppe wurden mit Hilfe des One Way Repeated Measures ANOVA bzw. dem Friedman Repeated Measures ANOVA on Ranks getestet. Mit der „Kruskal-Wallis analysis of variance on ranks“ wurden die verschiedenen Gruppen gegeneinander verglichen. Signifikante Änderungen wurden mit Hilfe der Dunn's Methode ermittelt. Bei allen Tests wurde ein Signifikanzniveau von $P < 0.05$ festgelegt. Die Shamgruppe wurde als Kontrollgruppe jeweils gegen alle anderen Messwerte der Versuchsreihe getestet.

5. Ergebnisse

5.1. Klinische Observation

5.1.1. Intraoperativer Verlauf

Alle 30 Schweine überlebten die Operation. Chirurgische Komplikationen oder Blutungen, die zum Abbruch der Operation geführt hätten, blieben aus. Respiratorische Insuffizienz oder klinische Zeichen einer Hypothermie traten nicht auf.

5.1.2. Intraoperative Komplikationen

Es kam bei allen Tieren während und nach der Kryotherapie zu bereits beschriebenen Leberkapseleinrissen (Crackings). Durch rasches Übernähen konnte die Komplikation beherrscht werden. Bei einem Schwein aus Gruppe 4 trat nach Narkoseeinleitung und ZVK-Anlage ein Kammerflimmern auf. Nach einmaligem Defibrillieren mit 240J kehrte die Herzaktion in einen Sinusrhythmus zurück. Ein Schwein aus Gruppe 3 entwickelte durch eine Fehllage des ZVK einen Serothorax rechts, woraufhin 2l Flüssigkeit aus diesem Areal abpunktiert und die Fehllage des ZVK korrigiert wurden.

5.1.3. Postoperativer Verlauf

Alle Tiere wurden nach Beendigung der Operation bei suffizienter Spontanatmung extubiert und über 6h überwacht. Für die Blutentnahmen über den ZVK mussten die Tiere, je nach Bedarf, mit bis zu 2mg *Dormicum*[®] i.v. sediert werden. Danach wurde der ZVK mit 0,6ml Heparin gespült. Weitere Medikamente wurden nicht verabreicht. Spätestens 4h nach der Operation wurde Spontanurin produziert. Mit Ausnahme eines Schweins aus Gruppe 1 und zwei Schweinen aus Gruppe 2 waren 24h später normale Nahrungsaufnahme und Defäkation möglich. Komplikationen wie Leberversagen, Blutungen, Wundheilungsstörungen, Peritonitis oder Gallelecks blieben aus.

5.1.4. Postoperative Komplikationen

Nach der Operation wurden Komplikationen bei Tieren aus folgenden Therapiegruppen festgestellt:

Gruppe 1:

Ein Schwein dieser Gruppe wurde mit Exitus letalis am 1. POD aufgefunden. Die Obduktion ergab keinen Hinweis auf die Todesursache. Es wird angenommen, dass nach zu raschem Entlassen des Schweins in den Stall ein Narkoseüberhang zum Tode geführt hat.

Gruppe 2:

Ein Schwein dieser Gruppe wurde mit Exitus letalis am 5. POD aufgefunden. Die Obduktion ergab als Todesursache einen hohen Dünndarmileus.

Ein weiteres Schwein dieser Gruppe wurde mit Faszien dehiscenz im Laparotomiegebiet am 2. POD aufgefunden. Es erfolgte eine problemlose Revision in Kurznarkose.

Gruppe 3, 4 und 5:

Es traten keine Komplikationen auf.

5.2. Hämatologische und biochemische Parameter

5.2.1. Gerinnungsparameter

Abb.9a.1: Doppelter Frierzyklus versus einfachen Frierzyklus und Shamgruppe

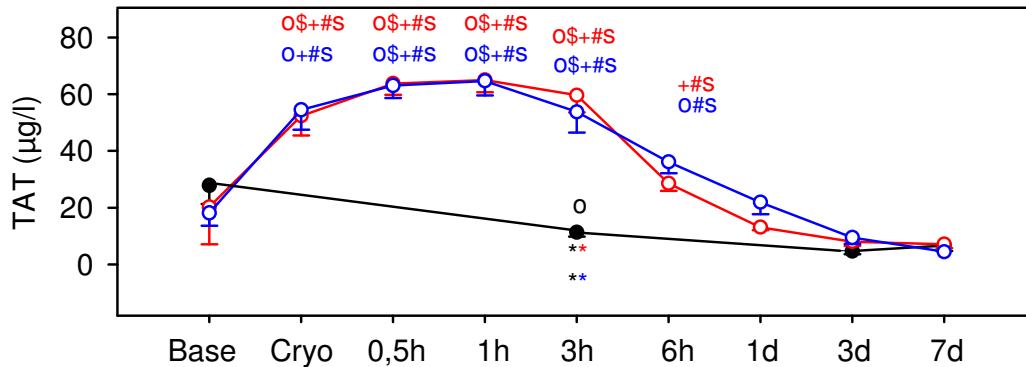


Abb.9a.2: Frierzyklus unter Aprotiningabe versus einfachen Frierzyklus und Shamgruppe

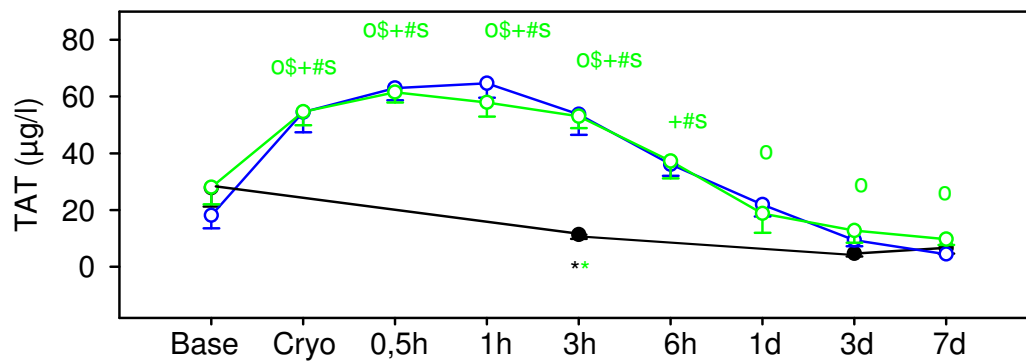


Abb.9a.3: Frierzyklus unter SVC versus einfachen Frierzyklus und Shamgruppe

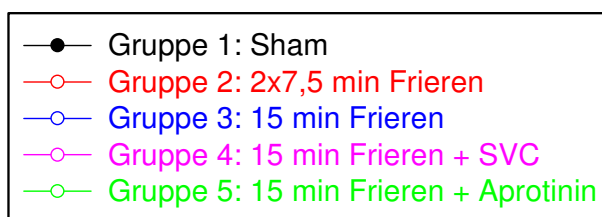
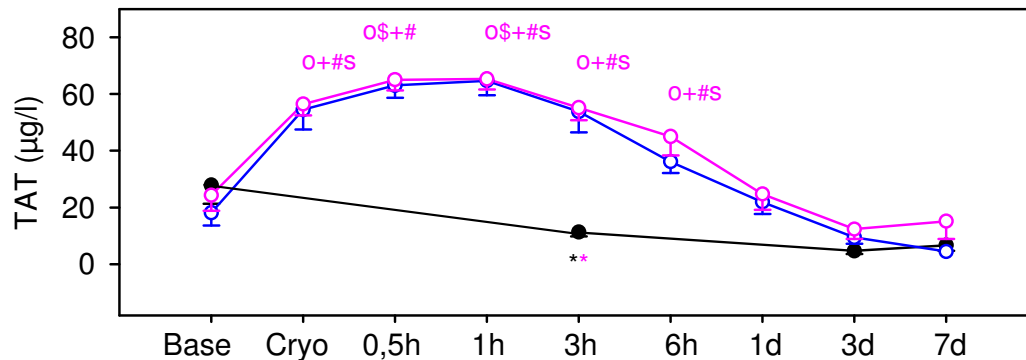


Abb.9a: Thrombin-Antithrombin-III-Komplex

O= p < 0.05 vs „Base“, \$= p < 0.05 vs „6h“, += p < 0.05 vs „24h“, #: p < 0.05 vs „3d“, S=p < 0.05 vs „7d“, *=P > 0,05 zu bestimmtem Zeitpunkt im Gruppenvergleich

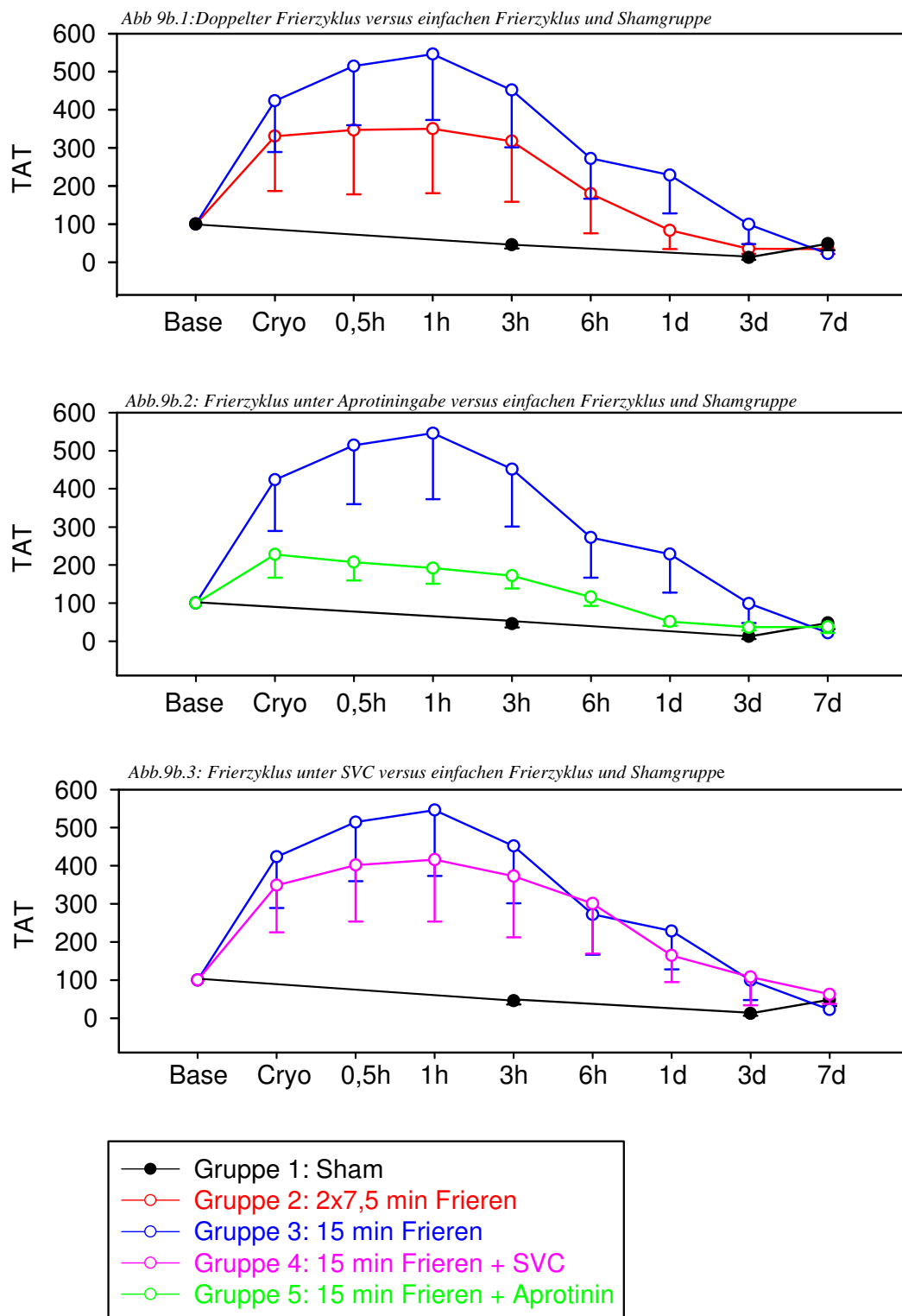
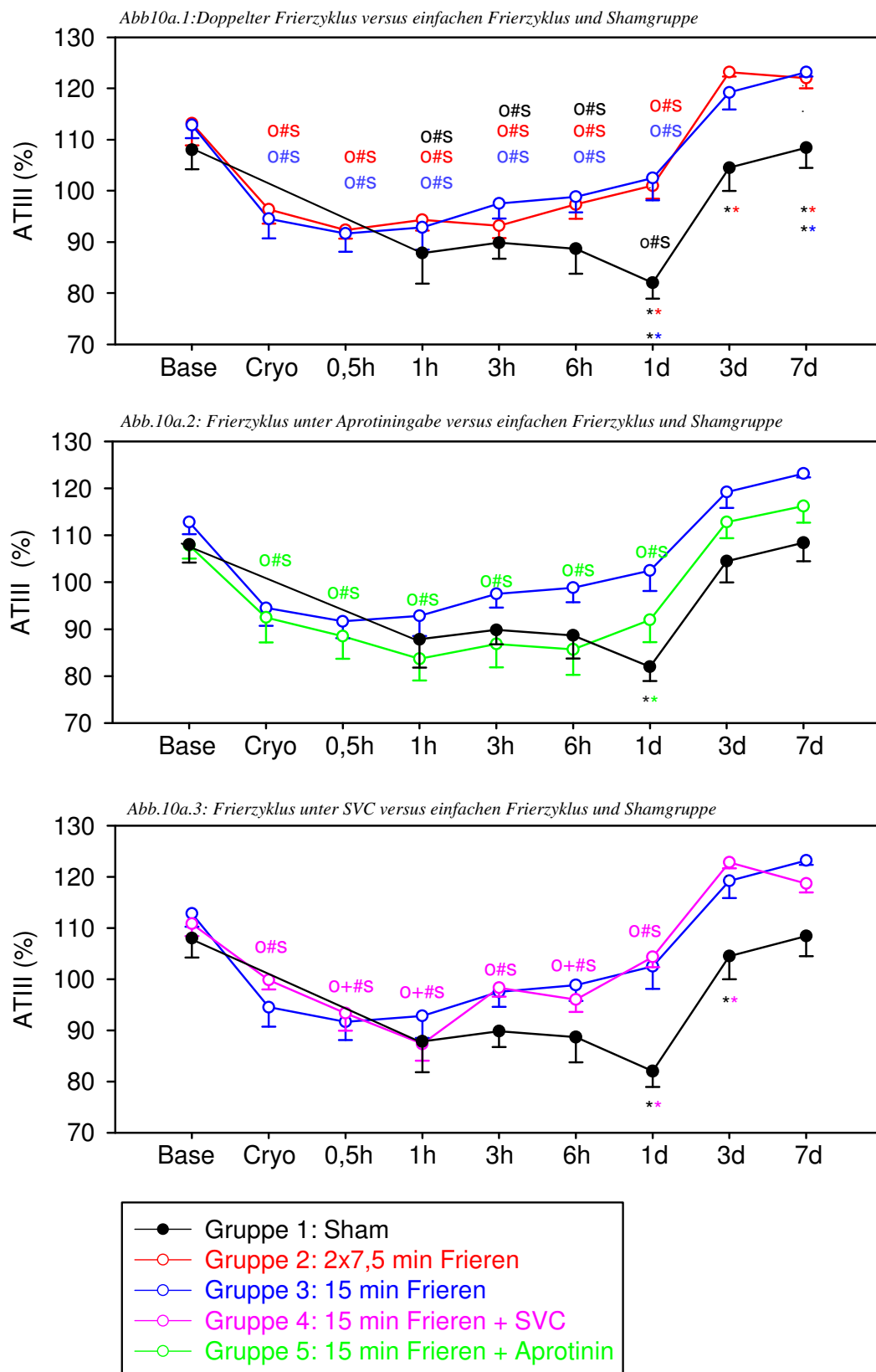


Abb.9b: Thrombin-Antithrombin-III-Komplex unter Normierung der Ausgangswerte auf 100%

**Abb.10a: Antithrombin III**

O= $p < 0.05$ vs „Base“, += $p < 0.05$ vs „24h“, #: $p < 0.05$ vs „3d“, S= $p < 0.05$ vs „7d“

*= $P > 0,05\%$ zu bestimmtem Zeitpunkt im Gruppenvergleich

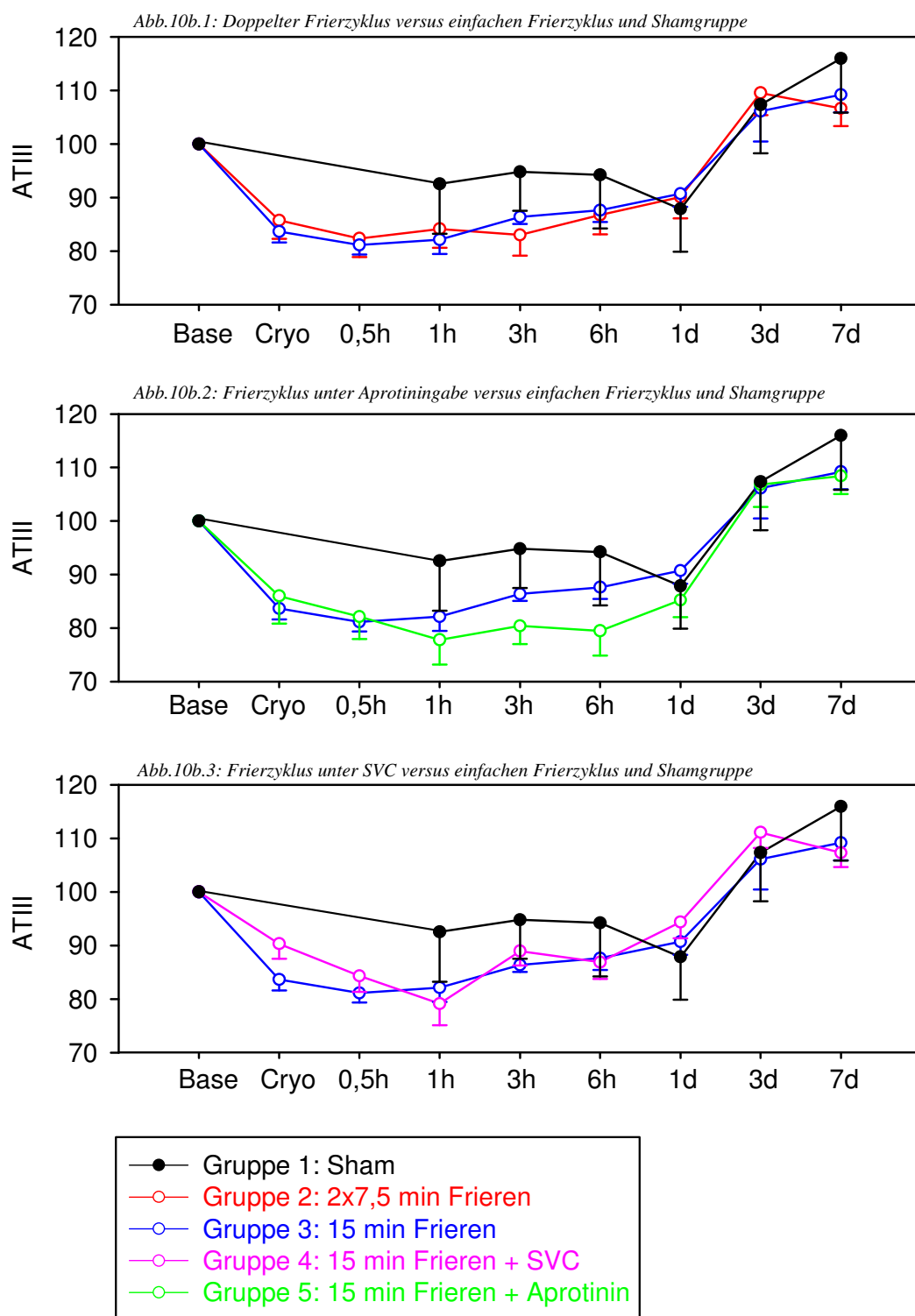


Abb. 10b: Antithrombin III unter Normierung der Ausgangswerte auf 100%

Abb.11.1: Doppelter Frierzyklus versus einfachen Frierzyklus und Shamgruppe

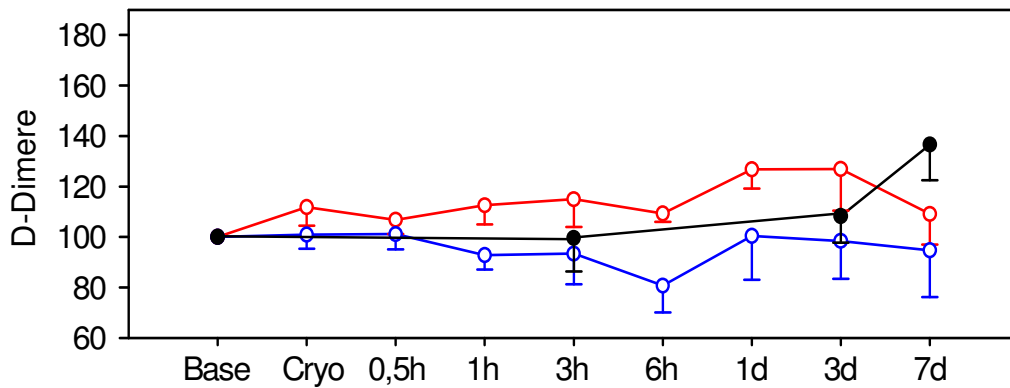


Abb.11.2: Frierzyklus unter Aprotiningabe versus einfachen Frierzyklus und Shamgruppe

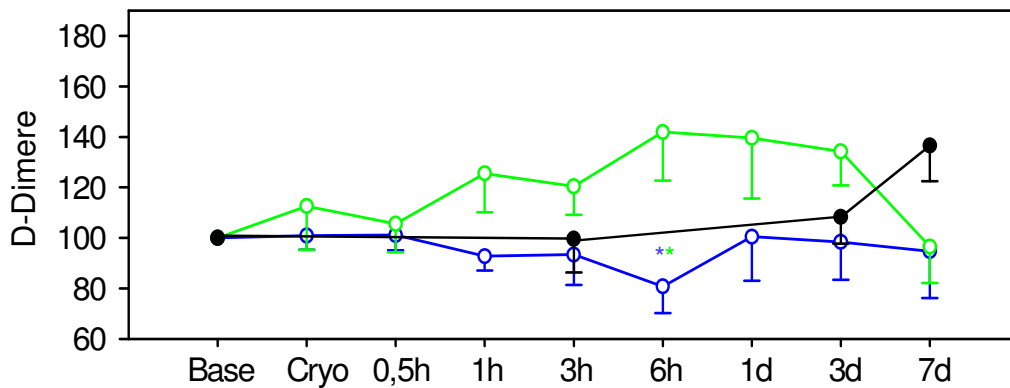


Abb.11.3: Frierzyklus unter SVC versus einfachen Frierzyklus und Shamgruppe

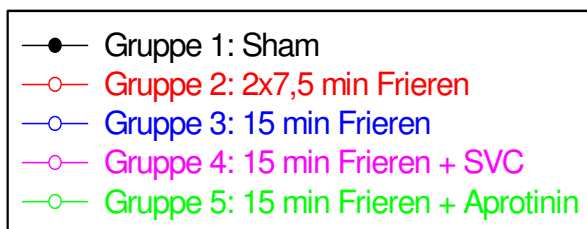
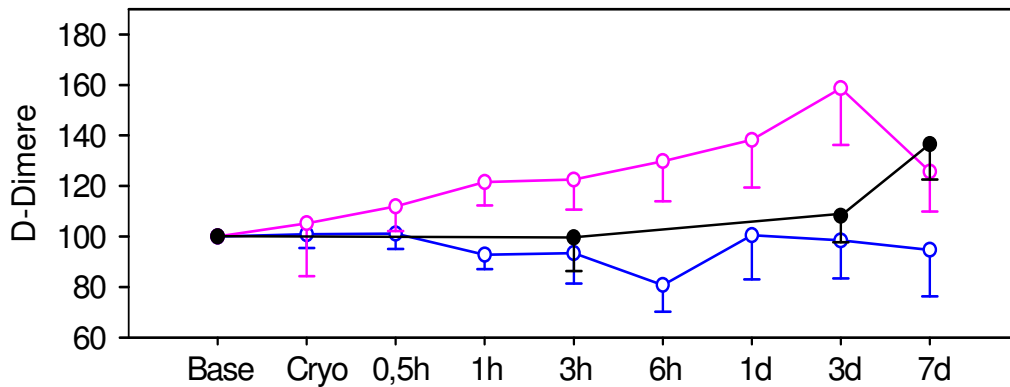


Abb.11: D-Dimere unter Normierung der Ausgangswerte auf 100%

*= $P > 0,05\%$ zu bestimmtem Zeitpunkt im Gruppenvergleich

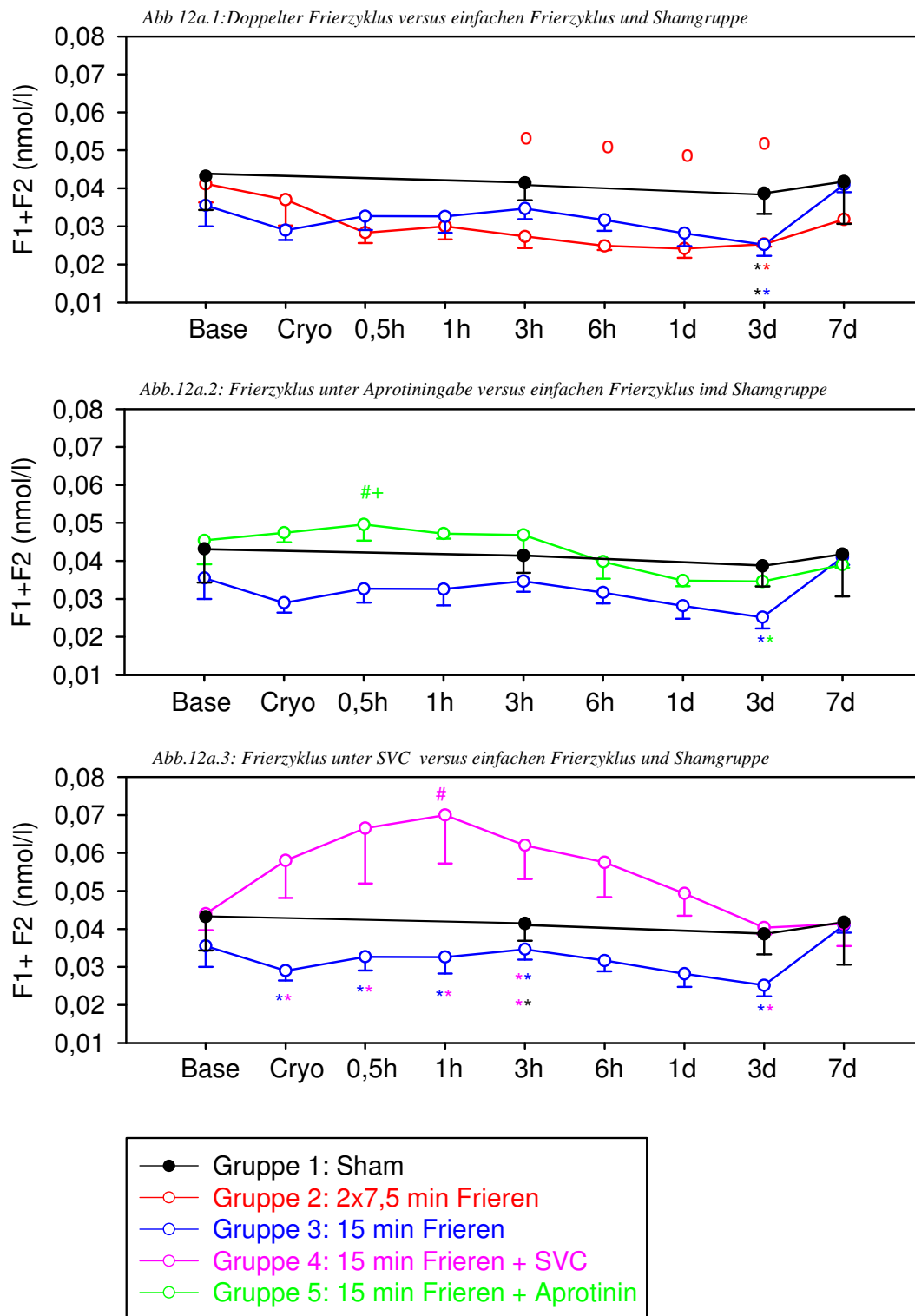


Abb.12a: Prothrombinfragmente F1+F2

O= $p < 0.05$ vs „Base“, += $p < 0.05$ vs „24h“, #: $p < 0.05$ vs „3d“, S= $p < 0.05$ vs „7d“

*= $P > 0,05\%$ zu bestimmtem Zeitpunkt im Gruppenvergleich

Abb.12b.1: Doppelter Frierzyklus versus einfachen Frierzyklus und Shamgruppe

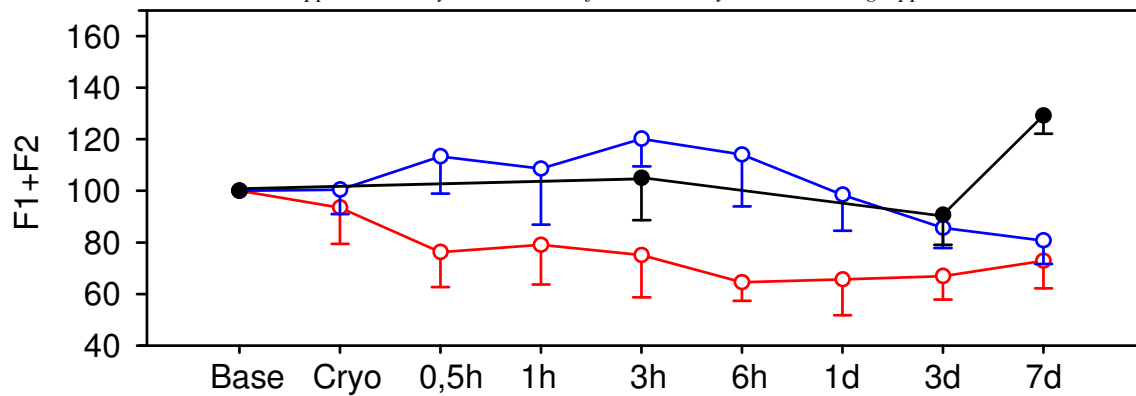


Abb.12b.2: Frierzyklus unter Aprotiningabe versus einfachen Frierzyklus und Shamgruppe

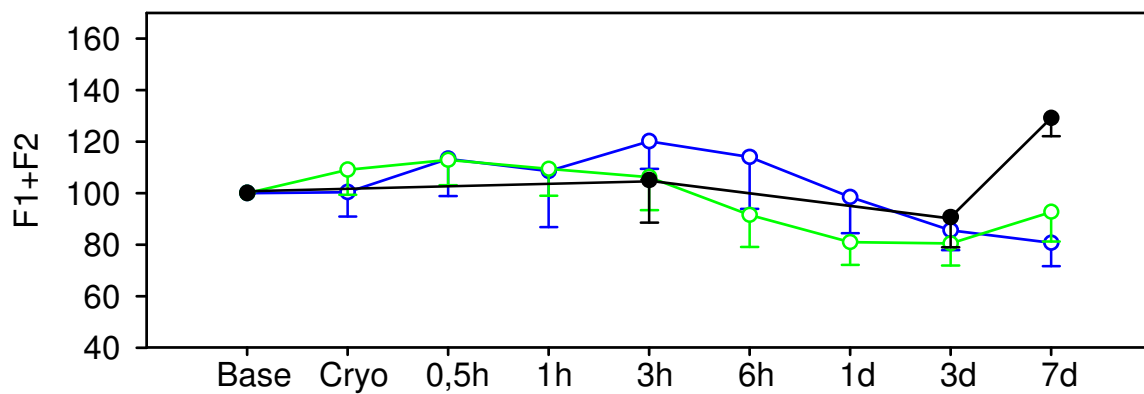


Abb.12b.3: Frierzyklus unter SVC versus einfachen Frierzyklus und Shamgruppe

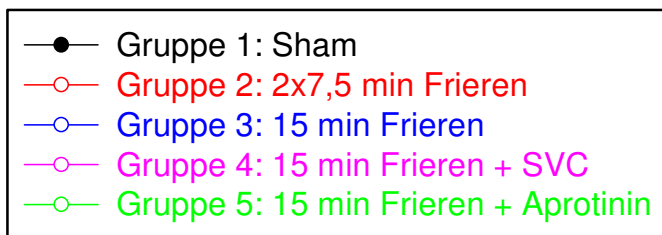
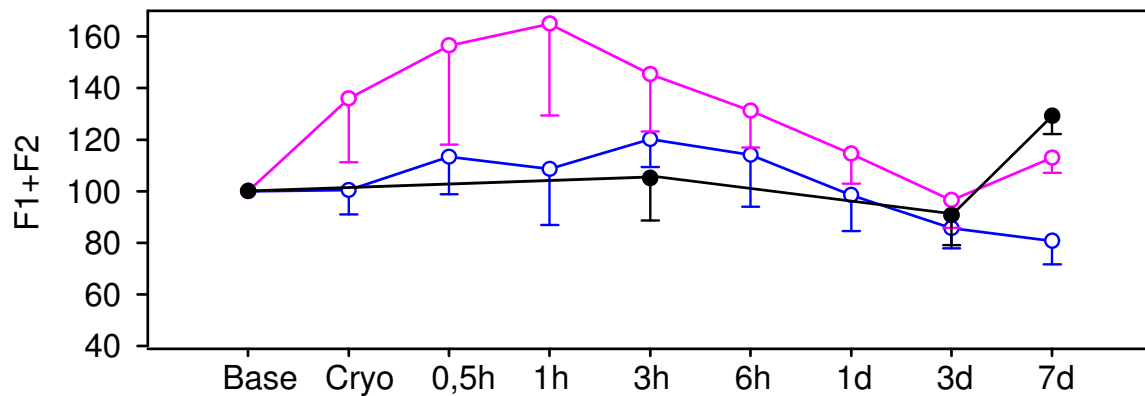


Abb.12b: Prothrombinfragmente F1+F2 unter Normierung der Ausgangswerte auf 100%

5.2.1.2. Auswertung des Verlaufs der Gerinnungsparameter

Nach Bestimmung der Gerinnungs-Parameter wurden die Ergebnisse jeweils innerhalb einer Gruppe untersucht und die Daten der einzelnen Messtage miteinander verglichen. Es wird zusätzlich auf Ähnlichkeiten sowie Unterschiede gegenüber den anderen Gruppen hingewiesen. Eine Errechnung der statistischen Unterschiede im Vergleich der verschiedenen Gruppen jeweils mit der Shamgruppe sowie mit der Gruppe nach einmaligen Frieren soll die Unterschiede, die sich durch die verschiedenen Behandlungen ergaben, noch genauer darstellen.

Normierung auf 100%

Da die Ausgangswerte der Gerinnungsparameter der einzelnen Tiere und damit auch der einzelnen Gruppen vor Beginn des kryochirurgischen Eingriffs trotz gleicher Ausgangslage variierten, wurden zusätzlich alle Gruppen so dargestellt, dass der Ausgangswert jeweils bei 100% liegt. Dies dient zur Anschauung, Signifikanzen wurden nicht berechnet.

Thrombin-Antithrombin-Komplexe /TAT (Abb.9a/ 9.b)

1. Unterschiede innerhalb einer Gruppe zu verschiedenen Zeitpunkten

Die Shamgruppe startet mit einem TAT Wert von 27µg/l und zeigt von Beginn des Experiments an einen leichten Abfall der TAT-Werte bis zum 3. Tag. Die Werte steigen bis zum 7. Tag wieder leicht an, der letzte Wert liegt mit 6,6µg/l unter dem Ausgangsniveau (Abb.9a.1).

Die Gruppe „15min Frieren“ startet mit einem TAT Wert von 18,1µg/l, zeigt einen signifikanten TAT-Anstieg bis zur 1. postoperativen Stunde auf 53,7µg/ml und fällt dann ab. Am 7. postoperativen Tag liegen die TAT-Werte mit 4,4µg/ml unter dem Ausgangsniveau (Abb.9a.1).

Der doppelte Frierzyklus „2x15min Frieren“ bewirkt einen dem einmaligen Frierzyklus vergleichbaren Verlauf des TAT (Abb.9a.1).

Auch die Tiere in der mit Aprotinin behandelten Gruppe sowie die mit SCV behandelten Tiere haben TAT-Werte deren Kurvenverlauf nicht wesentlich von den anderen Kryogruppen abweicht (Abb.9a.2/3).

2. Unterschiede an gleichen Zeitpunkten zwischen den verschiedenen Gruppen

Vergleich mit der Shamgruppe :

Alle Gruppen, die kryochirurgisch behandelt wurden, zeigen gegenüber der Shamgruppe einen signifikanten Anstieg der TAT-Werte drei Stunden postoperativ (Abb.9a.1/2/3).

Vergleich mit dem einmaligen Frierzyklus:

Es ergeben sich keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich der Kryogruppen untereinander.

3. Normierung auf 100% (Abb.9b)

Nach „15 min Frieren“ (Abb.9b.1) zeigt sich in dieser Darstellung der deutlichste TAT-Anstieg von allen Gruppen, gefolgt von der Gruppe „2x7,5 min Frieren + SVC“ (Abb.9b.3), die nur leicht höhere TAT-Werte zeigt als die Tiere nach „2x7,5 min Frieren“. Die Gruppe der mit Aprotinin behandelten Tiere (Abb.9b.2) zeigt den geringsten Werteanstieg von allen kryochirurgisch behandelten Gruppen.

Antithrombin III/ATIII (Abb.10a/10b)

1. Unterschiede innerhalb einer Gruppe zu verschiedenen Zeitpunkten

Die Shamgruppe startet mit einem ATIII Wert von 96% und zeigt einen stetigen ATIII-Abfall bis zum tiefsten Punkt am 1. postoperativen Tag (82%). Danach erfolgt ein steiler Anstieg. Am letzten Messtag ist das Ausgangsniveau leicht überschritten (108%) (Abb.10a.1).

Der einfache Frierzyklus „15 min Frieren“ startet mit einem ATIII Wert von 112%, es kommt wie bei der Shamgruppe zum Abfall der ATIII-Werte (91%), die Werte beginnen hier aber bereits nach 30 Minuten wieder anzusteigen und liegen am 7. Tag leicht über dem Ausgangsniveau (123%) (Abb.10a.1).

Beim doppelten Frierzyklus „2x15min Frieren“ verhält sich die Kurve fast identisch zur Kurve nach einmaligem Frieren (Abb.10a.1).

Die mit Aprotinin behandelten Tiere zeigen bei einem Ausgangsniveau von 107% zunächst ebenfalls den raschen Abfall der ATIII-Werte bis zur 1. postoperativen Stunde (bis auf 85%). Dann kommt es zu einem deutlich geringeren Kurvenanstieg von der 1. postoperativen Stunde bis zum 1. Tag als bei den anderen Kryogruppen. Nach dem 1. Tag erfolgt ein steiler Anstieg bis zum Erreichen des Ausgangsniveaus nach 7 Tagen (117%) (Abb.10a.2).

Die mit SVC behandelten Tiere zeigen bis zur ersten Stunde einen vergleichbar deutlichen ATIII-Abfall wie die Shamgruppe. Nach 3 Stunden erfolgt der weitere Verlauf dann nahezu identisch mit dem einfachen Frierzyklus (Abb.10a.3).

2. Unterschiede an gleichen Zeitpunkten zwischen den verschiedenen Gruppen

Vergleich mit der Shamgruppe:

Die Shamgruppe zeigt gegenüber allen anderen Gruppen signifikant niedrigere ATIII-Werte am 1. Tag.

Vergleich mit dem einmaligen Frierzyklus:

Nach „15 min Frieren“ sind keine signifikanten Unterschiede des ATIII-Verlaufs beim Vergleich mit den weiteren Gruppen erkennbar.

3. Normierung auf 100% (Abb.10b)

Durch die Normierung auf 100% zeigt die Shamgruppe bis zur 6. postoperativen Stunde die höchsten ATIII-Werte, es kommt auch hier zum Abfall der ATIII-Werte bei den mit Aprotinin behandelten Tieren am 1. Postoperativen Tag, die ATIII-Werte der Shamgruppe und die der Gruppe nach einmaligem Frieren liegen hier aber auf dem gleichen Niveau (Abb.10.b.2).

D-Dimere (Abb.11)

1. Unterschiede innerhalb einer Gruppe zu verschiedenen Zeitpunkten

Die Messergebnisse der D-Dimere mussten auf 100% normiert werden, da die Tiere stark variierende Ausgangswerte zeigten. Das Ausgangsniveau ist jeweils 100% (Abb.11.1). Beim Vergleich der einzelnen Messpunkte jeweils einer Gruppe ergaben sich keine statistischen Signifikanzen.

Die Shamgruppe zeigt bis zum 3. Tag einen nahezu horizontalen Verlauf und steigt dann bis zum 7. Tag deutlich über das Ausgangsniveau an (136%) (Abb.11.1).

„15 min Frieren“ bewirkte einen Abfall der Werte unter die Werte der Shamgruppe ab 30 Minuten postoperativ. Nach 6 Stunden erfolgt ein leichter Anstieg, das Ausgangsniveau der D-Dimere bleibt jedoch unterschritten (94%) (Abb.11.1).

Die mit dem doppelten Frierzyklus behandelten Tiere zeigen im Gegensatz zum einfachen Frierzyklus einen leichten Anstieg der D-Dimere über die der Shamgruppe. Die Werte steigen

direkt zu Beginn des Experiments an und halten sich während der Folgezeit bei 112-126%. Am 7. Tag liegen sie noch leicht über dem Ausgangsniveau (109%) (Abb.11.1).

Die mit Aprotinin behandelten Tiere reagieren zunächst noch deutlicher als nach Behandlung mit dem doppelten Frierzyklus mit einem Anstieg der D-Dimere. Diese liegen deutlich über den Werten der Shamgruppe (141%). Auch hier erfolgt ein Abfall der Werte zwischen dem 3. und 7. postoperativen Tag bis auf das Ausgangsniveau (96%) (Abb.11.2).

Die SVC-Gruppe zeigt einen nahezu linearen Werteanstieg bis zum 3. postoperativen Tag, erreicht hier den höchsten Wert aller Gruppen (158%), fällt dann bis zum 7. Tag wieder leicht ab, bleibt aber deutlich über dem Ausgangsniveau (125%) (Abb.11.1).

2. Unterschiede an gleichen Zeitpunkten zwischen den verschiedenen Gruppen

Vergleich mit der Shamgruppe:

Der doppelte Frierzyklus sowie die Behandlung mit Aprotinin und SVC bewirken rasch einen Anstieg der Werte über die der Shamgruppe. Am 7. postoperativen Tag liegen dagegen die D-Dimer-Werte der Shamgruppe am höchsten von allen Gruppen. Nach einmaligem Frierzyklus liegen die Werte nach 30 min bis zum letzten Meßtag unter denen der Shamgruppe (Abb.11.1/2/3).

Vergleich mit dem einmaligen Frierzyklus:

Es ergibt sich nach einmaligem Frieren ein statistisch signifikanter Unterschied nach der 6. postoperativen Stunde zu den mit Aprotinin behandelten Tieren. Letztere zeigen deutlich höhere D-Dimer-Werte (Abb.11.1). Am 7. postoperativen Tag treffen sich die Ergebnisse der beiden Gruppen in fast exakt dem gleichen Punkt, wobei die D-Dimere knapp unter dem Ausgangsniveau liegen und damit tiefer als bei allen anderen Gruppen. Deutlich erhöht gegenüber dem einfachen Frierzyklus bleibt dagegen der letzte Messwert nach Behandlung mit „15 min Frieren + SVC“ (Abb.11.3).

Prothrombinfragmente F1+F2 (Abb.12a/12b)

1. Unterschiede innerhalb einer Gruppe zu verschiedenen Zeitpunkten

Die Shamgruppe beginnt mit einem F1+F2 Wert von 0,043nmol/l und zeigt einen nahezu horizontalen Verlauf. Am 7. Tag liegen die Werte auf dem Ausgangsniveau (0,042nmol/l) (Abb.12a.1).

Die Gruppe „15 min Frieren“ beginnt mit einem F1+F2 Wert von 0,035 nmol/l, zeigt dann einen leichten Abfall von F1+F2 bis zum 3. postoperativen Tag, woraufhin die Werte wieder

deutlich ansteigen und am 7. postoperativen Tag über dem Ausgangsniveau liegen (0,041nmol/l) (Abb.12a.1).

Die mit dem doppelten Frierzyklus behandelten Tiere beginnen mit einem F1+F2-Wert von 0,041nmol/l. Es zeigt sich ein ähnlicher Kurvenverlauf wie beim einfachen Frierzyklus, jedoch liegt der letzte Wert leicht unter dem Ausgangsniveau (0,032nmol/l) (Abb.12a.1).

Die mit Aprotinin behandelten Tiere starten mit einem Ausgangswert von 0,045nmol/l, zeigen dann im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Gruppen einen leichten Anstieg von F1+F2 (bis auf 0,050nmol/l), der sich konstant bis zur 3. postoperativen Stunde hält. Daraufhin erfolgt ein Abfall der Werte bis leicht unter das Ausgangsniveau (0,039nmol/l) (Abb.12a.2).

Die SVC-Gruppe hat einen F1+F2-Ausgangswert von 0,044nmol/l und zeigt dann einen sehr deutlichen Anstieg der Werte bis zur ersten postoperativen Stunde auf 0,070nmol/l. Es folgt dann bis zum 7. postoperativen Tag ein stetiger F1+F2-Abfall bis auf das Ausgangsniveau (0,041) (Abb.12a.3).

2. Unterschiede an gleichen Zeitpunkten zwischen den verschiedenen Gruppen

Vergleich mit der Shamgruppe:

Nach „15min Frieren“ sowie „2x15 min Frieren“ ergeben sich signifikant niedrigere F1+F2-Werte ab der 3. postoperativen Stunde als in der Shamgruppe. Nach Behandlung mit SVC zeigt sich dagegen direkt nach Beginn der Messungen ein deutlicher Anstieg der F1+F2-Werte über die der Shamgruppe. Die Aprotinigruppe zeigt nur einen leichten Anstieg bis zur 3. postoperativen Stunde über die F1+F2-Werte der Shamgruppe.

Vergleich mit dem einmaligen Frierzyklus:

Nach 3 Tagen ergeben sich signifikant höhere F1+F2-Werte bei den mit Aprotinin und SVC behandelten Tieren als nach einmaligem Frieren (Abb.12a.2/3).

3. Normierung auf 100% (Abb.12.b)

Hier bestätigen sich die für die nicht normierten F1+F2 Werte vorherbeschriebenen Verläufe, Nach „2x7,5“ min Frieren zeigen sich die niedrigsten Werte, nach „15 min Frieren + SVC“ kommt es zu einem deutlichen Anstieg von F1+F2 direkt nach Beginn des kryochirurgischen Eingriffs.

5.2.2. Pro- und antiinflammatorische Zytokine

Abb.13.1: Doppelter Frierzyklus versus einfachen Frierzyklus und Shamgruppe

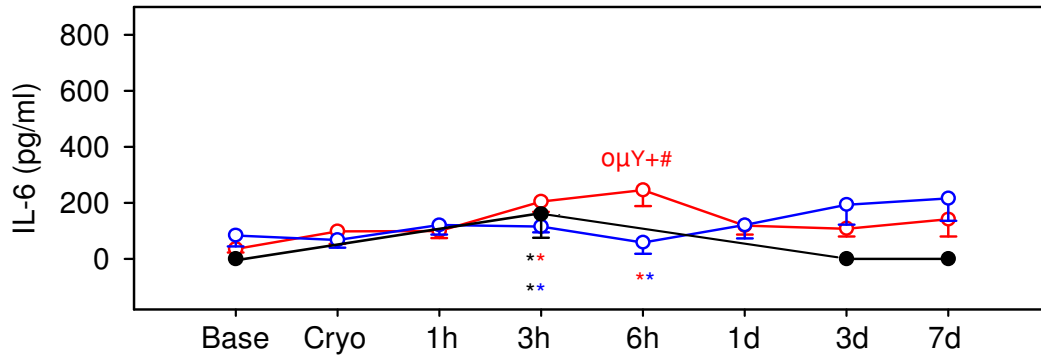


Abb.13.2: Frierzyklus unter Aprotiningabe versus einfachen Frierzyklus und Shamgruppe

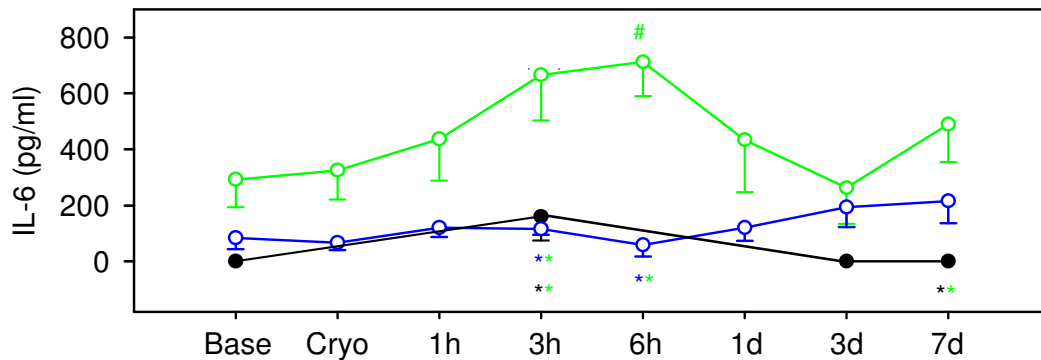


Abb. 13.3: Frierzyklus unter SVC versus einfachen Frierzyklus und Shamgruppe

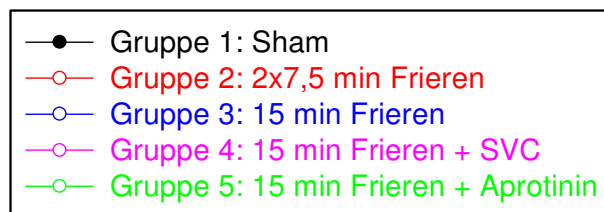
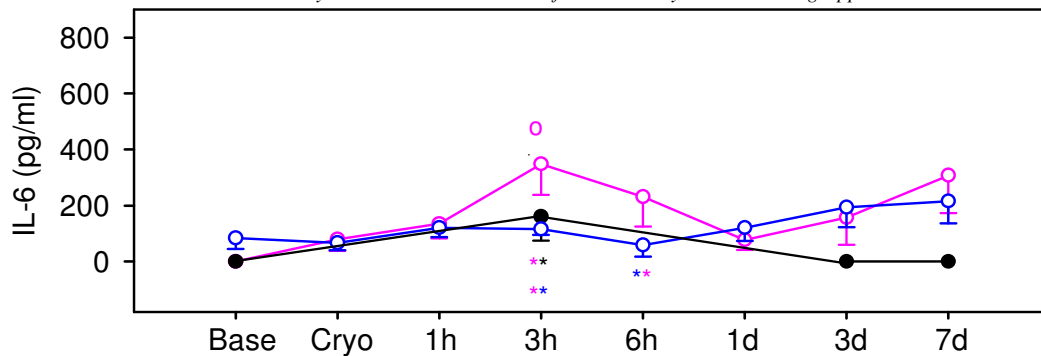


Abb.13: Interleukin-6

O= $p < 0.05$ vs „Base“, μ = $p < 0.05$ vs „Cryo“, Y= $p < 0.05$ vs „1h“, += $p < 0.05$ vs „24h“, #: $p < 0.05$ vs „3d“, *= $P > 0,05$ zu bestimmtem Zeitpunkt im Gruppenvergleich

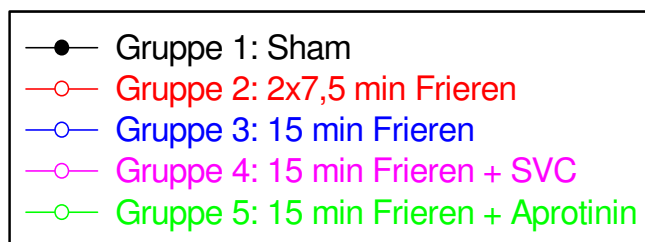
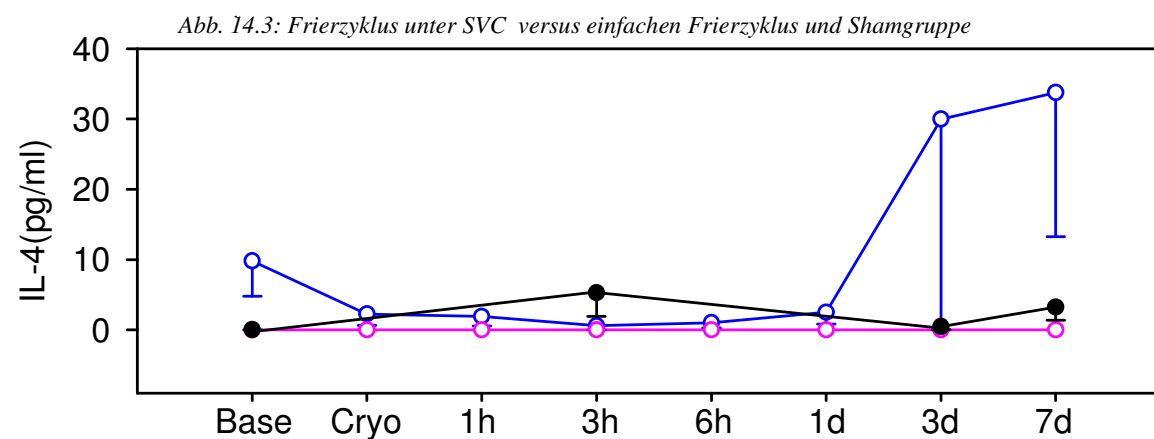
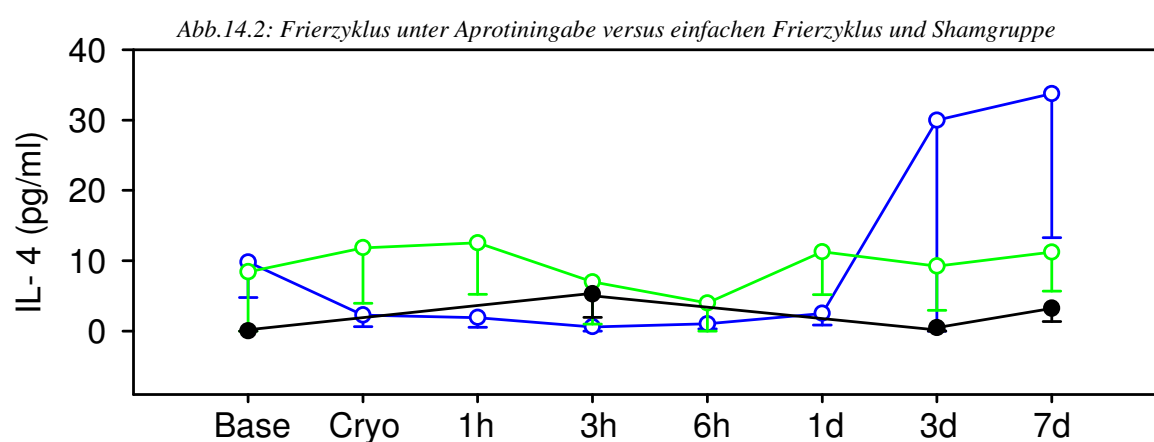
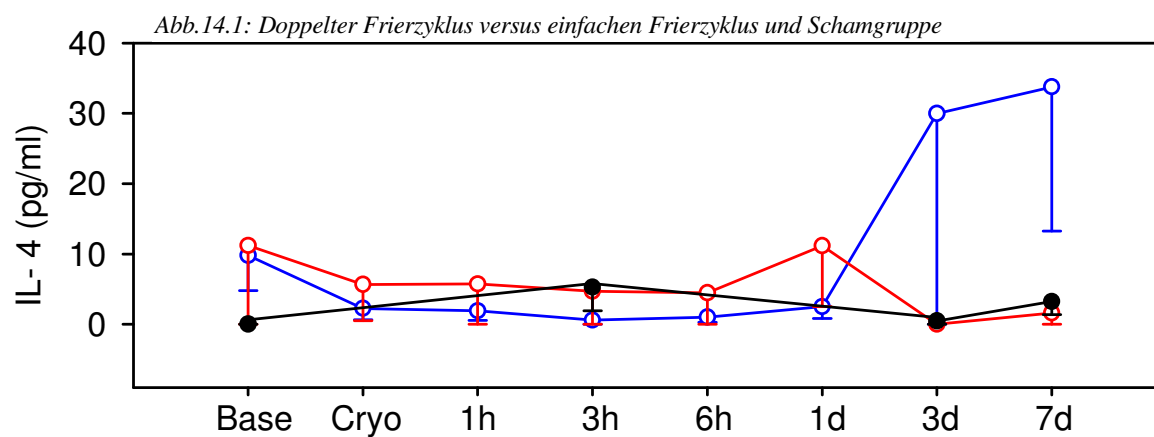


Abb.14: Interleukin-4

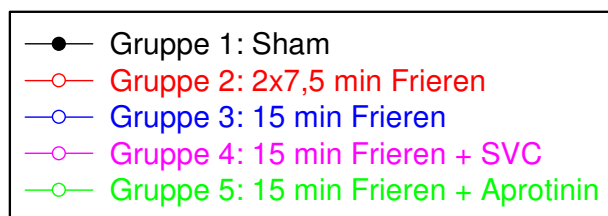
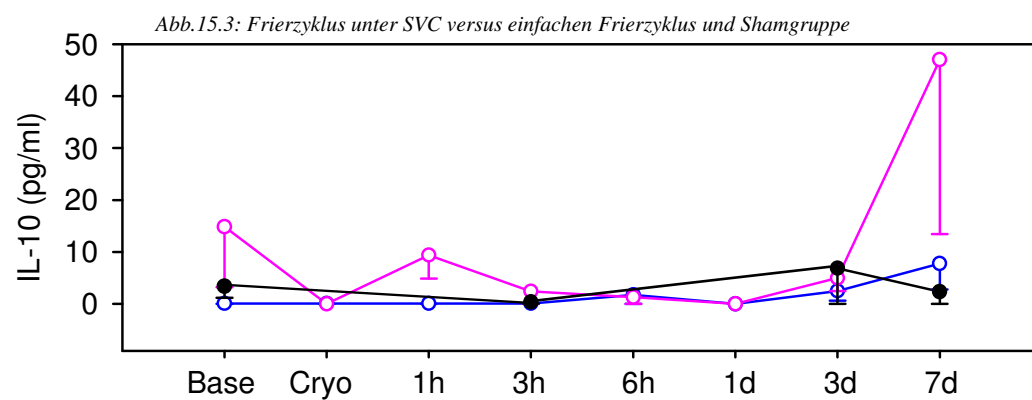
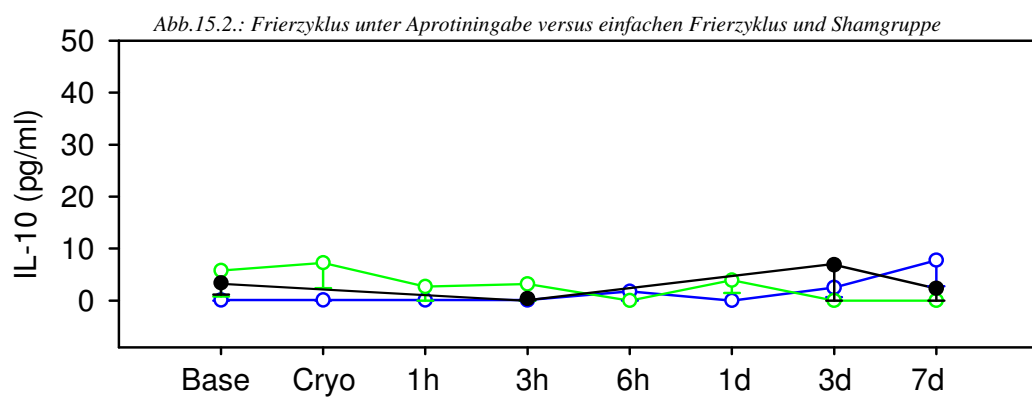
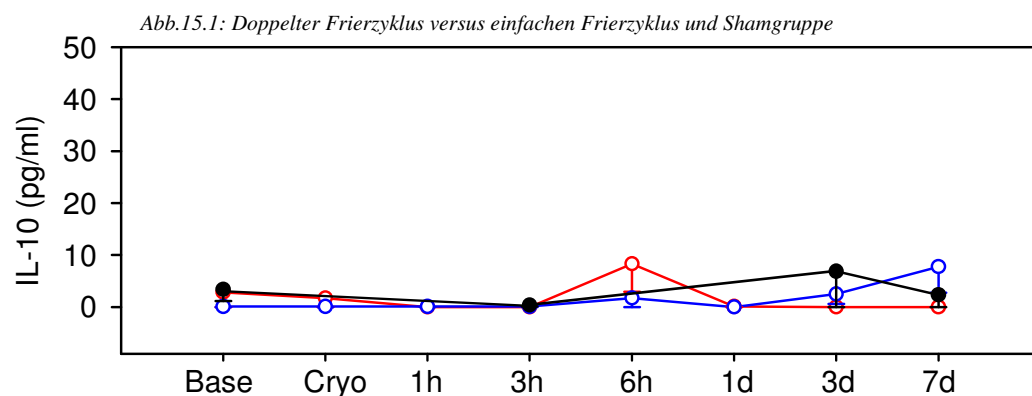
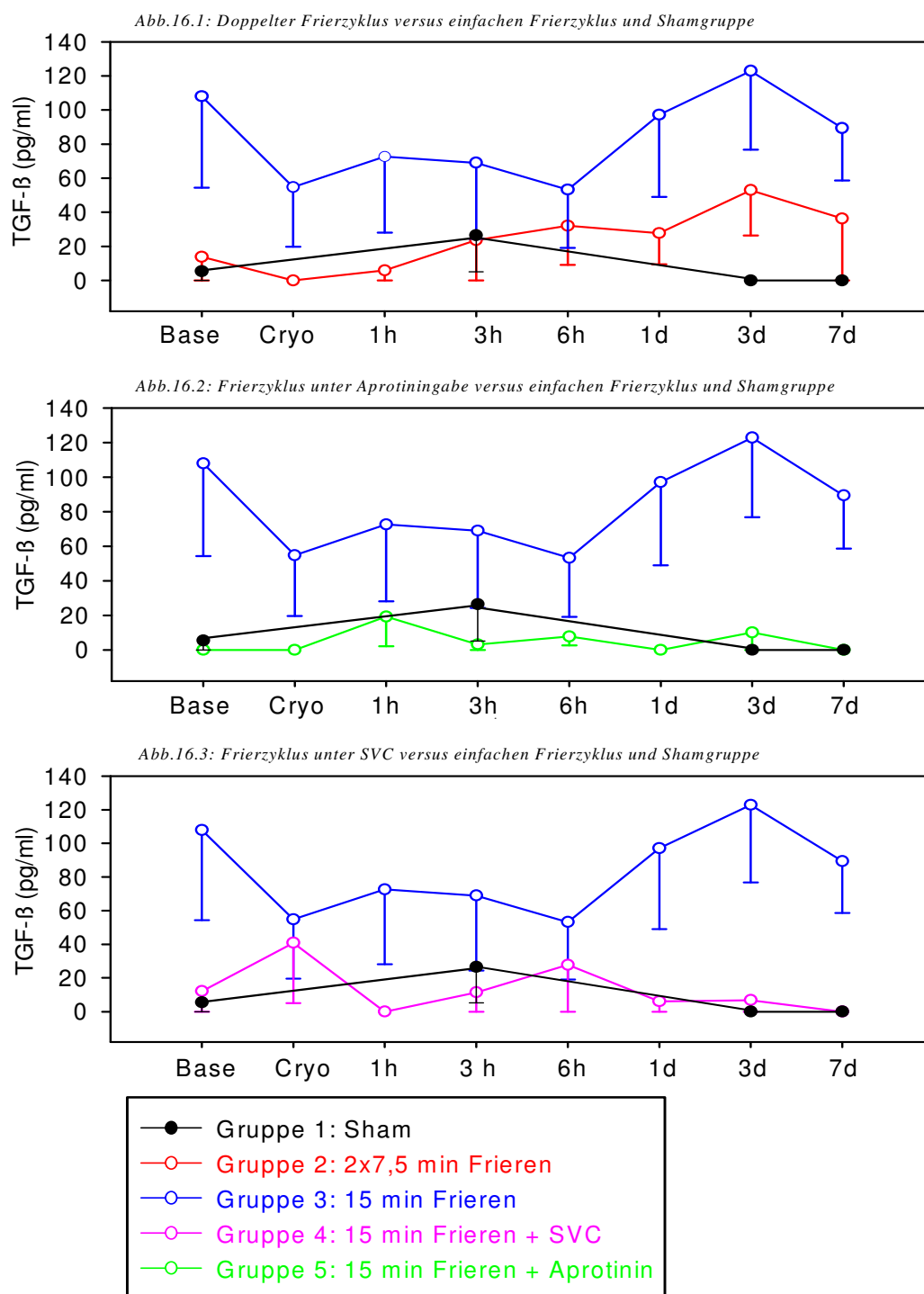


Abb.15: Interleukin-10

Abb.16: TGF- β

5.2.1.2. Auswertung des Verlaufs der Immunologischen Parameter

Nach Bestimmung der immunologischen Parameter wurden die Ergebnisse jeweils innerhalb einer Gruppe untersucht und die Daten der einzelnen Messtage miteinander verglichen. Es wird zusätzlich auf Ähnlichkeiten sowie Unterschiede gegenüber den anderen Gruppen hingewiesen. Eine Errechnung der statistischen Unterschiede im Vergleich der verschiedenen Gruppen jeweils mit der Shamgruppe sowie mit der Gruppe nach einmaligem Frieren soll die Unterschiede, die sich durch die verschiedenen Behandlungen ergaben, noch genauer darstellen.

Interleukin-6 (Abb.13.1)

1. Unterschiede innerhalb einer Gruppe zu verschiedenen Zeitpunkten

Bei der Shamgruppe liegt der IL-6-Wert vor dem Eingriff bei Null, danach kommt es zu einem geringen Anstieg des IL-6 bis zur 3. postoperativen Stunde (160 pg/ml). Ab dem 3.Tag war wieder kein IL-6 in den Proben messbar. (Abb.13.1).

Vor dem einmaligen Frieren zeigten die Tiere IL-6-Werte von 86 pg/ml Bis zur 1. postoperativen Stunde kommt es auch hier zu einem leichten Werteanstieg bis auf 120pg/ml und anschließend zu einem leichten Abfall. Am 7. Tag liegt der IL-6-Wert mit 307pg/ml deutlich über dem Ausgangsniveau.

Vor dem doppelten Frierzyklus liegen die IL-6 Werte in dieser Gruppe bei 35pg/ml, steigen bis zur 6. postoperativen Stunde deutlicher an als beim einmaligen Frierzyklus (auf 240 pg/ml), fallen dann wieder ab und liegen am 7. Tag mit 140pg/ml über dem Ausgangsniveau (Abb.13.1).

Vor der Behandlung der Tiere mit Aprotinin wurden sehr hohe IL-6-Werte gemessen (292mg/ml). Nach Beginn der Kryotherapie kommt es zu einem signifikanten Anstieg von IL-6, der im Vergleich zu allen anderen Gruppen am deutlichsten ausgeprägt ist (712mg/ml nach der 6. postoperativen Stunde). Die IL-6-Werte fallen dann relativ steil bis zum 3. postoperativen Tag ab und steigen bis zum 7. Tag wieder über das Ausgangsniveau an (auf 489mg/ml) (Abb.13.2).

Vor der Behandlung mit SVC wurde wie bei der Shamgruppe kein IL-6 in den Proben gemessen. Es kommt dann zu einem signifikanten Werteanstieg bis zur 3. postoperativen Stunde auf 348pg/ml. Dann erfolgt ein Abfall bis auf das Ausgangsniveau und ein erneuter IL-6-Anstieg bis auf 307pg/ml am 7. postoperativen Tag (Abb.13.3).

2. Unterschiede an gleichen Zeitpunkten zwischen den verschiedenen Gruppen

Vergleich mit der Shamgruppe:

Die Shamgruppe zeigt 3 Stunden postoperativ signifikant höhere Werte verglichen mit dem einmaligen Frierzyklus, nach 6 Stunden fallen die IL-6-Werte jedoch ab und liegen zuletzt unter denen nach einmaligem Frieren. Verglichen mit der Behandlung mit dem doppelten Frierzyklus zeigen sich in der Shamgruppe bereits nach 3 Stunden signifikant niedrigere Werte (Abb.13.1). Auch die mit Aprotinin und SVC behandelten Tiere haben bis 6 Stunden postoperativ signifikant erhöhte IL-6 Werte verglichen mit der Shamgruppe.

Vergleich mit dem einmaligen Frierzyklus:

Die Kurve der mit dem einmaligen Frierzyklus behandelten Tiere verläuft deutlich flacher als die Kurve nach Behandlung mit SVC und Aprotinin. Der Unterschied ist jeweils nach der 3. und 6. postoperativen Stunde statistisch signifikant. Am 7. postoperativen Tag ergibt sich erneut ein statistisch signifikant geringerer IL-6-Wert als nach Behandlung mit SVC, auch die Werte der Aprotinigruppe bleiben am letzten Tag leicht über denen nach einmaligem Frieren. Nach doppeltem Frierzyklus sind die IL-6-Werte nach der 6. postoperativen Stunde signifikant höher als nach einmaligem Frieren.

2.2.2. IL-4 (Abb.14)

Die IL-4-Werte zeigen in allen Gruppen ähnliche Kurvenverläufe mit geringen Kurven-An- und Abstiegen. Es zeigen sich in keinem Fall signifikante Veränderungen. Die mit einfachem Frierzyklus behandelten Tiere zeigen vom 3.-7. postoperativen Tag stark variierende Messergebnisse des IL-4, es ergaben sich dabei einige sehr hohe Werte, die einen deutlichen Kurvenanstieg in diesem Zeitraum bewirkten, aber auch einige sehr niedrige Werte, was zu einer hohen Standardabweichung führte (Abb.14.1.).

Den deutlichsten Anstieg des IL-4 Wertes zeigen die mit Aprotinin behandelten Tiere. Dieser erfolgte bis zur 1. postoperativen Stunde. Bei den mit SVC behandelten Tieren konnte IL-4 zu keiner Zeit nachgewiesen werden (Abb.14.3).

2.2.3. IL-10 (Abb.15)

Die IL-10-Werte zeigen keine signifikanten Veränderungen während der Messzeit. Alle Kurven folgen einem nahezu horizontalen Verlauf bis zum letzten Messtag. Die mit SVC behandelten Tiere zeigen dagegen am 7. Tag einen starken Anstieg des IL-10, allerdings besteht hier auch eine hohe Varianz der Werte (Abb.15.3).

2.2.4. TGF- β (Abb.16)

Die Ergebnisse von TGF- β sind zwischen allen Gruppen außer beim einfachen Frierzyklus recht ähnlich. Die Kurven verlaufen mit geringen Schwankungen relativ horizontal. Das Ausgangsniveau liegt außer beim einfachen Frierzyklus bei einem TGF- β -Wert von ca. 10 pg/ml. Es kommt zu einigen Anstiegen der TGF- β -Werte bis auf maximal 25 pg/ml. Die mit Aprotinin- und SVC-behandelten Tiere sowie die Shamgruppe erreichen am 7. Tag wieder das Ausgangsniveau. Die mit dem doppelten Frierzyklus behandelten Tiere liegen am 7. Tag bei 36 pg/ml. Beim einmaligen Frierzyklus ergibt sich gleich bei der ersten Messung ein auffallend höherer Wert als bei allen anderen Gruppen (108 pg/ml). Die Standardabweichungen sind in dieser Gruppe sehr hoch, es kommt zunächst zu einem Abfall der TGF-beta-Werte auf ca. 53 pg/ml. Auf diesem Niveau hält sich die Kurve bis zur 6. postoperativen Stunde, dann steigen die TGF- β -Werte wieder an und erreichen am 7. Tag 89pg/ml.

6. Diskussion

6.1. Tiermodell

Kryochirurgische Untersuchungen, wie die Kryochirurgie der Leber, können an einer Vielzahl von Modellen durchgeführt werden. Die meisten Studien wurden bis jetzt an in-vitro-Modellen mit verschiedenen Tierlebern, in einem Wasserbad von 37°C unternommen, welches die normale Körpertemperatur im Umfeld der Leber nachahmen sollte. Es zeigte sich aber im Vergleich von verschiedenen Versuchen, in denen Kryochirurgie sowohl in vivo als auch in vitro angewandt wurde, dass bei den in vitro Versuchen weitaus kältere Temperaturen erreicht wurden als in der durchbluteten Leber in vivo. Das allein zeigt schon, dass das Zusammenspiel des ganzen Organismus einen Einfluss auf das Ausmaß der Kryoläsion hat, und es lässt sich annehmen, dass die Kryoläsion selbst ebenfalls systemische Wirkungen auf den gesamten Organismus haben könnte. Der Nachteil von in vitro Modellen jedoch liegt in der mangelhaften Berücksichtigung der innerhalb eines Organismus typischen Interaktionen zwischen den einzelnen Organsystemen, welche durch makro- und mikrozirkulatorische Parameter, neuronale Steuermechanismen, metabolische Faktoren sowie humorale Kaskadensysteme vermittelt werden [117]. Versuche, die sich auf Zellen, Gewebe oder Organe beschränken, erlauben eine Betrachtungsweise [195], die sich eher auf spezifische Ursache-Wirkungs-Beziehungen reduziert. Grundsätzlich muss die Wahl des Modells problembezogen erfolgen [195], also abhängig von den der Studie zugrundeliegenden Fragestellungen und Hypothesen.

In dieser Studie interessieren wir uns besonders für die sich überlagernden, lokalen und systemischen, positiven und negativen Rückkoppelungsmechanismen in der Regulation und Kontrolle komplexer physiologischer oder pathophysiologischer Prozesse während und nach dem Friervorgang. Deshalb fiel unsere Wahl auf ein in vivo-Modell mit Schweinen. Aufgrund der anatomischen und physiologischen Ähnlichkeiten zum Menschen werden Schweine (Minipigs oder normale Hausschweine) in der medizinischen Forschung gerne als Versuchstiere eingesetzt [166, 169, 181]. Biomedizinische Modelle sind oft beschrieben und Publikationen über Anästhesie, Analgesie und über das prä- und postoperative Arbeiten mit Schweinen zu Forschungszwecken sind zahlreich vorhanden [170, 171, 181]. Forschungsgebiete, in denen Schweine als Versuchstiere genutzt werden, umfassen unter anderem die Anästhesiologie, die Kardiologie, die Pharmakologie, die Nephrologie, die

Transplantationsmedizin und die Chirurgie. Da die Leber beim Menschen und beim Schwein sehr ähnlich aufgebaut ist, sind diese Tiere für die leberchirurgische Forschung gut geeignet. Die Blutgefäßversorgung entspricht derjenigen des Menschen. Wie beim Menschen bildet eine Bindegewebskapsel die äußere Begrenzung der Leber [164]. Auch erlaubt das Schwein als Versuchstier die intrahepatische Anwendung der Kryotherapie durch das in der Klinik verfügbare Equipment. Da die Leberkapsel und das Leberparenchym des Schweins nicht so fest wie beim Menschen sind und kein Tumor penetriert werden musste, war die Anwendung des Applikationssets mit Dilatator, wie in der Klinik üblich, nicht erforderlich. Die wenigen anatomischen Unterschiede der Schweineleber, verglichen mit der menschlichen Leber, werden wie folgt dargestellt: Die menschliche Leber ist nicht in einzelne Leberlappen gegliedert [153], während beim Schwein die Leber durch Incisurae interlobulares in die einzelnen, leicht gegeneinander beweglichen Leberlappen, den Lobus hepatis sinister lateralis und medialis sowie den Lobus hepatis dexter lateralis und medialis, auffallend deutlich unterteilt ist [40, 122].

6.2. Narkose

Zur Prämedikation wurden in dieser Studie Azaperon und Methomidate Hydrochlorid injiziert. Azaperon ist ein oral applizierbares Neuroleptikum vom Typ der Butyrophenone mit langer Halbwertszeit, das zur Beruhigung unter anderem bei Schweinetransporten gebräuchlich ist [49]. Die Narkoseeinleitung erfolgte mit Etomidate. Anschließend wurde die Narkose mit Thiopental Natrium (*Trapanal*[®]) aufrechterhalten. Wegen des gewünschten sofortigen Wirkungseintritts kamen in dieser Studie intravenös applizierbare Narkosemittel zur Anwendung. Zalunardo [200] berichtet, dass alle gebräuchlichen intravenösen Anästhetika zur Anästhesie bei Leberresektionen und Kryochirurgie prinzipiell geeignet sind. Grundsätzlich seien Medikamente besonders gut geeignet, deren Elimination unabhängig vom Leberblutfluss, der Enzymaktivität und der Proteinbindung ist, da sie die Leber nicht belasten. Die Clearance von Etomidate wird durch die Leberdurchblutung (Flow) limitiert. Aufgrund dieser hepatischen Metabolisierung wurde die Anwendung auf die Narkoseeinleitung begrenzt. Der Abbau von *Trapanal*[®] ist zwar von der Proteinbindung unabhängig, aber von der Leberenzymaktivität abhängig [200]. Die wasserlöslichen Bestandteile werden nach Oxidation und Konjugation mit Glukuronsäure renal ausgeschieden. Wegen seiner nicht beeinflussbaren Abbaukinetik wurde *Trapanal*[®] stark verdünnt in 500 ml NaCl zugeführt. Während der Zufuhr erfolgt nach und nach eine Umverteilung des Medikaments aus dem

ZNS in andere Kompartimente (Muskulatur und Fettgewebe). Durch die Aufsättigung dieser Kompartimente verringert sich der Bedarf, die Zufuhr des Medikamentes muss sich also perioperativ immer an den aktuellen Anforderungen des Organismus orientieren [99]. Aus diesem Grund wurde auch in unserer Studie die Infusionsgeschwindigkeit stets an die Narkosetiefe angepasst. Durch die Umverteilung des Anästhetikums, vor allem in das Fettgewebe, kommt es zu einer verlängerten Abbauphase, da sich dieses Gewebe nur langsam, wieder entsättigt. Es wird also immer wieder Restanästhetikum zum Abbau ins Blut umverteilt. Daher besteht die Gefahr eines Narkosenachhanges, der im schlimmsten Fall zu einem Atemstillstand führen kann. Bei einem Schwein der Gruppe 1 führte wahrscheinlich ein solcher Narkosenachhang zum Exitus Letalis am 1. POD. Bei allen anderen Versuchstieren traten keine Probleme in dieser Hinsicht auf.

Als weitere Nebenwirkung von *Trapanal*[®] sei zu erwähnen, dass es am Herzen eine negativ inotrope Wirkung zeigt, wodurch das Herzzeitvolumen abnimmt und die Herzfrequenz reflektorisch ansteigt [98]. Ein Schwein aus der Gruppe 5 musste wegen Kammerflimmern kardiovertiert werden. Diese Komplikation könnte von dem Anästhetikum mitverursacht gewesen sein.

6.3. Komplikationen und Überleben

Bei fast allen Tieren kam es intraoperativ zu etwas stärkeren Blutungen, wobei es sich um die bereits beschriebenen parenchymalen Blutungen, die so genannten „Crackings“ handelte [32, 150, 157, 190]. In allen Fällen war eine Blutstillung durch Naht und/oder Verwenden eines *Tabotamp*[®] Vlieses möglich.

Wie im vorherigen Kapitel erwähnt, wurde ein Schwein der Gruppe 1 mit Exitus letalis am 1. POD aufgefunden. Ein Schwein der Gruppe 2 wurde am 5. POD tot aufgefunden. Die Obduktion ergab als Todesursache einen hohen Dünndarmileus. *Kahlenberg et al.* berichten ebenso von einem Todesfall nach Kryochirurgie der Leber bei Schweinen durch Eingeweideobstruktion, bringen diese Komplikation aber nicht in Zusammenhang mit der zuvor durchgeführten Leberkryochirurgie [79]. Weitere Autoren [192, 101] hatten keine Todesfälle nach Leberkryochirurgie bei Schweinen zu beklagen, jedoch waren auch die postoperativen Nachbeobachtungszeiträume kürzer und die Anzahl der therapierten Schweine geringer. In einer Studie, die sich ausschließlich mit Komplikationen nach Kryochirurgie an der Leber des Menschen befasst [157], ereigneten sich Ileus und Mesenterialinfarkt jeweils mit einer Häufigkeit von 3%, bezogen auf die gesamte Komplikationsrate. Die Ursache dieser

Komplikationshäufigkeit wurde nicht der Kryochirurgie zugeschrieben, da bei allen abdominalchirurgischen Eingriffen, die die Mobilisation des Dünndarms erforderlich machen, ein gewisses Risiko für postoperative Passagestörungen besteht.

6.4. Beobachtungszeitraum

Wir entschieden uns in dieser Studie für einen Beobachtungszeitraum von sieben Tagen nach Kryotherapie, da Forschergruppen, die kryochirurgische Ergebnisse veröffentlichten, Folgendes festgestellt haben:

Die Abweichung der Serumlaborparameter und Gerinnungsfaktoren von den Normalwerten ereignet sich in den ersten Tagen nach der Therapie. Danach werden wieder die Ausgangswerte erreicht. Langanhaltende nachteilige Folgen durch die Abweichung sind nicht üblich [1, 30, 57, 63, 121, 129, 145, 150, 160, 167].

In Bezug auf die Kryoläsionsgröße wird, wie bereits erwähnt, berichtet, dass die Kryonekrose während der Tauphase, also noch intraoperativ, mit Ödem und Rötung des Gewebes beginnt. Während der nächsten Stunden kommt es zu vaskulärer Stase, Thrombose und Ischämie. Nach dem 2. und 3. POD ist die Kryoläsion komplett und erscheint histologisch wie ein ischämischer Infarkt. In dem darauf folgenden Zeitraum folgen Umbauprozesse, wie z.B. die Angiogenese [8, 95, 145].

Die Zytokinwerte erreichen in dem Zeitraum zwischen 30 min (TNF-alpha, IL-6, TGF-beta) und 24-48 (IL-4, IL-10) Stunden ihr Maximum [15, 47, 48].

6.5. Parameter

Bereits in der Einleitung wurde ausführlich auf die verschiedenen, in dieser Arbeit näher zu betrachtenden, gerinnungs- und immunologischen Parameter eingegangen. In Bezug auf die hämostaseologischen Fragestellungen untersuchten wir Parameter, die auf eine abgelaufene Blutgerinnung hinweisend sind, nämlich TAT, ATIII und die Thrombinspaltprodukte F1+F2 sowie Parameter, die dann erhöht nachweisbar sind, wenn es zu einer fibrinolytischen Aktion gekommen ist. In diesem Falle sind die Fibrinspaltprodukte (D-Dimere) zu nennen. Durch die nähere Betrachtung des Verlaufs dieser Parameter, erhofften wir uns Erkenntnisse über den Einfluss der perioperativen Applikation des Serinproteaseinhibitors Aprotinin auf die Gerinnung und Fibrinolyse. Dabei sollte auch eine mögliche Veränderung der Parameter bei zweimaligem Frieren, sowie bei limitiertem Leberblutfluss (SVC) dargestellt und diskutiert werden.

Zusätzlich sollten in dieser Studie die zwei verschiedenen Phasen der Immunreaktion des Körpers näher betrachtet werden:

1. Die unmittelbar nach einer Aktivierung auftretende proinflammatorische Immunantwort, die wir anhand der Messung der Freisetzung der Zytokine IL-6, und TNF- α , darstellen wollten.
2. Die Beobachtung der antiinflammatorischen Immunantwort anhand der Marker IL-4, IL-10 und TGF- β .

Durch Abdeckung dieser beiden Bereiche erhofften wir uns Erkenntnisse über den Einfluss von Aprotinin auf das immunologische Geschehen, sowie mögliche Rückschlüsse auf eine Interaktion zwischen dem hämostaseologischen und dem immunologischen Geschehen während der kryochirurgischen Behandlung.

6.6. Methodik

Zur Bestimmung der Gerinnungsparameter wurden Kits benutzt, die eigentlich für Messungen in humanem Citratblut hergestellt werden. Dies ist eine in der Forschung durchaus akzeptierte Maßnahme. Die in unserer Studie verwandten Messkits wurden auf ihre Übertragbarkeit auf Schweineblut getestet [119, 184].

Die Cytokine TNF- α , IL-4, IL-6 und IL-10 wurden mit schweinespezifischen Testkits bestimmt, TGF- β ist als multispezifisches Kit erhältlich, das sowohl bei Schweinen als auch bei anderen Säugetieren angewandt werden kann.

Leider konnten wir bei der Bestimmung des TNF- α keine Messergebnisse erzielen. Angesichts der Tatsache, dass andere Gruppen in Experimenten mit der Kryochirurgie durchaus einen deutlichen Anstieg dieses Parameters verzeichnen konnten, fällt unser Ergebnis unerwartet aus [158, 167, 182]. Gleichzeitig zu den Messungen zu dieser Studie wurden auch von einer anderen, mit unserem Projekt nicht im Zusammenhang stehenden Gruppe, TNF- α Messungen an Schweinen durchgeführt. Auch hier konnte kein TNF- α nachgewiesen werden, was allerdings, wie in unserem Fall, durchaus zu erwarten gewesen wäre.

Alle Messungen wurden im Institut der Experimentellen Chirurgie der Universitätsklinik des Saarlandes durchgeführt. Da keine methodischen Fehler nachzuvollziehen sind, drängt sich letztendlich die Vermutung auf, dass die Messkits trotz ihrer angeblichen Spezifität für Schweineproben nicht in der Lage sind, porcines TNF- α zu messen. *Martin et al.* kritisieren

an ihrer eigenen Methode zum Nachweis von TNF- α , der auch ihnen nicht gelang, dass sie ein Immunoassay und kein Bioassay für die Bestimmung benutzt haben. Der Immunoassay könne in seiner Fähigkeit, die Bioaktivität von TNF- α zu reflektieren, durch die Anwesenheit von TNF- α -bindenden Proteinen, wie dem löslichen TNF- α -Rezeptor, beeinträchtigt werden. Bei Anwendung eines Bioassays sei dies kein Problem. Auch in unserer Studie wurde ein Immunoassay verwendet [110].

6.7. Ergebnisse

6.7.1. Gerinnungsparameter

Die Leber spielt eine dominierende Rolle in der Regulation der Hämostase. Sie produziert die meisten Gerinnungsfaktoren, mit Ausnahme des Tissue-Factors, sowie die Inhibitoren der Gerinnung, wie Antithrombin III und Protein C [165, 85]. Es liegt nahe, dass ein operativer Eingriff, wie die von uns gesetzten Kryoläsionen, die Synthese der Gerinnungsfaktoren und Inhibitoren beeinflussen könnte.

Wie bereits erwähnt stellt eine Thrombozytopenie, die im schlimmsten Fall zu einer starken Blutung führt, eine der Hauptkomplikationen der Kryochirurgie dar.

Will man nun versuchen, dieses Problem medikamentös zu verhindern, so sind Informationen über die Mechanismen, die zu den hämostatischen Veränderungen bei akuter Lebergewebsverletzung führen, essentiell. 2003 schrieben *Kerr et al.*, dass über eben diese Mechanismen im Detail noch wenig bekannt sei [85]. Dennoch konnten eingehende Literaturrecherchen letztendlich einige wichtige Grundinformationen liefern. Bereits Anfang der 70er Jahre beschäftigten sich verschiedene Gruppen mit dem Einfluss eines Leberschadens auf die Gerinnung. *Rake et al.* untersuchten die Blutparameter von 13 Patienten, die eine akute hepatische Nekrose entwickelt hatten. Sie konnten feststellen, dass eine Nekrose von Leberzellen eine intravaskuläre Gerinnung auslöst. Sie erklärten die hohe Inzidenz für starke Blutungen bei Lebereingriffen mit einem vermehrten Verbrauch von Gerinnungsfaktoren zu einem Zeitpunkt, wenn gleichzeitig deren Synthese reduziert ist. Bei ihren Untersuchungen fanden sie eine Thrombozytopenie, ein niedriges Plasma-Fibrinogen sowie einen moderaten Anstieg der Fibrin-Spaltprodukte (D-Dimere) [141]. Diese Ergebnisse sind charakteristisch für den Status einer disseminierten intravasalen Gerinnung, wo es zu einem Anstieg der D-Dimere kommt, der durch die reaktive Fibrinolyse zu erklären ist. In unserer Studie lassen sich durchaus Tendenzen erkennen, die eine verstärkte Aktivierung der Gerinnung nach kryochirurgischer Behandlung widerspiegeln. Die Bildung des

Antithrombins fiel in den beiden Gruppen, in denen lediglich einfach bzw. doppelt gefroren wurde, zunächst deutlich signifikant ab, um bereits eine Stunde postoperativ wieder leicht, und nach einem Tag wieder rasch anzusteigen. Dieser Verlauf ist typisch für den vermehrten Verbrauch der Gerinnungsparameter, den andere Gruppen ebenfalls feststellen konnten.

Unerwartet ist dagegen das Ergebnis, dass die Werte des ATIII in den Gruppen 2: „2x7,5min Frieren“, und 3: „15 min Frieren“ zunächst leicht höher und ab dem 1. postoperativen Tag sogar signifikant höher als in der Shamgruppe waren (Abb.10a.1). Möglicherweise ist also der kryochirurgische Eingriff ein Stimulus für eine vermehrte Bildung des Antithrombins, eventuell ausgelöst durch die gleichzeitig vermehrte Thrombin-Antithrombin-III-Komplex-Bildung, da der Thrombin-Antithrombin- Komplex parallel zum ATIII Abfall in den ersten postoperativen Stunden deutlich angestiegen war (Abb.9a). Diese Gegenregulation könnte den Organismus vor einer disseminierten intravasalen Gerinnung schützen, wobei es fraglich ist, ob dieser Mechanismus auch bei einem größeren Trauma aufrechterhalten bliebe. Ein Einfluss auf die Fibrinolyse, ersichtlich an einem Anstieg der D-Dimere war in Gruppe 3: „15 min Frieren“ nicht festzustellen (Abb.11.1). Damit konnten wir die Tendenz zu einer disseminierten intravasalen Gerinnung bei Anwendung eines normalen, einmaligen Frierzyklus in unsere Studie verneinen. In Gruppe 2: „2x7,5 min Frieren“ zeigte sich ein leichter, jedoch nicht statistisch signifikanter Anstieg der D-Dimere (Abb.11.1).

6.7.2. Der doppelte Frierzyklus

In den bisherigen Veröffentlichungen über die Anwendung eines doppelten Frierzyklus war die Gesamtfrierzeit stets länger als bei einem einzelnen Zyklus [36, 167]. Es kam zu vermehrter Freisetzung von Leberenzymen und zu einer größeren Gewebsläsion. In unserer Studie war beim doppelten Frieren ein einzelner Zyklus jeweils nur halb so lang (7,5min) wie der Gesamtzyklus beim einmaligen Frieren (15min). *Kollmar et al.*, die dieses Projekt geleitet haben, haben die Größe der Kryoläsionen gemessen und kamen zu dem Ergebnis, dass die Frierläsion unter diesen Umständen nach doppeltem Frieren nicht größer ist als nach einmaligem Frieren und dass kein Anstieg der Leberenzyme zu verzeichnen ist [90]. Dennoch war die Zerstörung der nukleären hepatozellulären Morphologie im gesamten kryochirurgisch behandelten Bereich, im Gegensatz zur inkompletten Zerstörung der Zellen nach einmaligem Frieren, nahezu vollständig [90]. Bedenkt man den ausbleibenden Anstieg der Leberenzyme, der in anderen Studien als Parameter des zugeführten Leberschadens diskutiert wird [63, 158, 160, 167] und mit dem Abfall der Thrombozyten korreliert [30], wäre es durchaus möglich,

dass die verkürzte Frierzeit der beiden Frierzyklen auch einen positiven Einfluss auf die Gerinnungskomplikationen hat, die besonders nach doppeltem Frieren verstärkt beobachtet wurden [30, 150, 158, 167, 191].

Unsere Ergebnisse zeigen eine leicht gesteigerte Fibrinolyse gegenüber der Shamgruppe und der Gruppe 3: „15 min Frieren“. Die darauf hindeutenden Fibrinspaltprodukte zeigten bereits 30 Minuten nach dem Eingriff einen Anstieg und ab dem dritten Tag wieder einen moderaten Abfall. Von statistischer Signifikanz waren diese Ergebnisse jedoch nicht. Diese Tendenz könnte mit der verstärkten Nekrose nach zweimaligem Frieren zu erklären sein, da die Fibrinolyse ein Teil der Wundheilung ist. Die Thrombin-Antithrombin-III-Komplexe ließen bei der Normierung auf 100% eine geringere Thrombin-Antithrombin Bindung und damit eine geringere Gerinnungsaktion nach zweimaligem Frieren erkennen (Abb.9b.1). Wiederum lässt sich eine Tendenz erkennen, die die Theorie der größeren Gerinnungsbeeinflussung nach doppeltem Frieren, welche durch andere Gruppen aufgestellt wurde, widerlegen würde. Möglicherweise regt ein unterbrochener Frierzyklus die Gerinnung nicht so stark an wie ein durchgehender. Vielleicht wäre die verstärkte Thrombozytopenie, die andere Gruppen beobachten konnten, allein auf die längere Gesamtfrierzeit bei zweimaligem Frieren zurückzuführen. Dies spräche zusammen mit dem von *Kollmar et al.* beobachteten Ergebnis, dass die Gewebsektrose nach der Doppelfrieremethode gleichmäßiger und vollständiger ist als bei einmaligem Frieren, ohne dabei die Läsionsfläche zu vergrößern, sehr für eine Anwendung eines doppelten Frierzyklus mit jeweils nur halb so langer Dauer der einzelnen Zyklen [90].

Einfluss des Selektiven Vaskulären Clamping (SVC)

In dieser Therapiegruppe wurde während des Frierens der Blutfluss des therapierten Lebergewebes reduziert, indem die zuführende Abzweigung des Pfortaderastes und die arterielle Blutversorgung selektiv für diesen Zeitraum abgeklemmt wurden (SVC). Dadurch konnte die Wirkung des so genannten „Heat-sink-effects“ während des Frierens eliminiert werden. Darunter versteht man eine Verminderung der Frierleistung der Kryosonde durch das vorbeifließende warme Blut in benachbarten größeren Gefäßen [150]. Unter Anwendung des SVC kommt es zunächst zu einer Kryoläsion, deren Durchmesser direkt nach der Operation genauso groß erscheint wie ohne SVC. Schon nach einigen Tagen wird jedoch deutlich, dass hier das tatsächlich nekrotisch gewordene Gewebe von einem deutlich größeren Umfang ist [36, 121]. Aufgrund der größeren Nekrose und der bestehenden Ischämie während des

Eingriffs stellte sich uns die Frage, ob diese Methode auch verstärkte Auswirkungen auf das Gerinnungsgeschehen haben könnte.

Die Bestimmung der Gerinnungsparameter zeigte bei den Prothrombinfragmenten F1+F2 signifikant höhere Werte gegenüber der Kontrollgruppe und der Gruppe 3: „15 min Frieren“, (Abb.12a.3). Es kam zu einem recht raschen Anstieg direkt zu Beginn des Frierens mit folgendem langsamen Abfall ab einer Stunde nach Ende des Eingriffes bis auf das Ausgangsniveau am siebten postoperativen Tag. Des Weiteren ließ sich ein signifikanter Anstieg des ATIII gegenüber der Kontrollgruppe feststellen (Abb.10a.3), und auch die D-Dimere zeigten unter dem Einfluss des SVC den höchsten Anstieg im Vergleich zu den anderen Gruppen mit Höhepunkt am dritten Tag nach dem Frieren (Abb.11.3).

Zusammenfassend kann demnach gezeigt werden, dass die Reduktion des Blutflusses unter SVC offenbar sowohl einen gerinnungsaktivierenden (Anstieg von F1+F2, ATIII), als auch einen leicht fibrinolytischen (Anstieg der D-Dimere) Effekt auf die Homöostase hat.

Beim selektiven Gefäßverschluss kommt es zu einer starken Drosselung der Gewebsdurchblutung. Folglich wird das Gewebe des behandelten Leberlappens deutlich mit Sauerstoff unterversorgt. Es stellt sich demnach die Frage, was für einen Einfluss eine Hypoxie auf das Gerinnungssystem hat. In einer in vitro Studie an bovinen Zellen des Endothels der Aorta konnten *Ogawa et al.* [125] zeigen, dass zwei hämostaseologische Veränderungen besonders auffallen, nämlich eine erhöhte vaskuläre Permeabilität und eine prothrombotische Tendenz. Sie beschreiben die Formation venöser Thromben bei lokaler Ischämie im venösen Flussbereich und führen diese Entwicklung auf eine Verschiebung des Gleichgewichts der Zelloberfläche zur Neigung zur Koagulation zurück, indem vermehrt ein „Faktor X-Aktivator“ produziert wird und der antikoagulatorische Faktor Thrombomodulin bis zu 80% unterdrückt wird. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass Thrombomodulin im Komplex mit Thrombin die Fibrinolyse inhibiert, indem es den „Thrombin-activatable-fibrinolysis-inhibitor“ (TAFI) in seine aktive Form bringt. Eine durch die Ischämie bedingte verminderte Produktion des Thrombomodulins könnte also eine Erklärung für die leicht erhöhte Fibrinolyse in dieser Studie sein [62].

Thomas et al. stellten fest, dass eine relativ kurze Periode totaler Stase eine inflammatorische Antwort hervorruft [176]. Sie fanden eine deutlich gesteigerte Aktivität der polymorphonukleären Leukozyten (PNM). *Todoroki et al.* veröffentlichten eine Studie, die zeigt, dass Fibrinbildung nicht nur durch den endothelial exprimierten Tissue-Factor ausgelöst wird, sondern ebenso durch eine Expression des Tissue-Factors durch stimulierte neutrophile

Granulozyten. In der Umgebung dieser Neutrophilen fanden sie in der Leber Fibrinablagerungen [180]. *Kollmar et al.* beobachteten auch ohne den Einfluss von SVC bereits einen Anstieg der Leukozyteninfiltration in das kryochirurgisch behandelte Gewebe [90]. Eine Studie an der Retina konnte zeigen, dass nach Ischämie und Reperfusion ein deutlicher Anstieg des P-Selektins und des intrazellulären Adhäsionsrezeptors für Leukozyten (ICAM-1) zu verzeichnen ist [123]. *Hoffmann et al.* vermuten in einer durch die abgestorbenen Zellen ausgelösten Aktivierung von Neutrophilen einen wichtigen Mechanismus, der zur Zerstörung des Endothels direkt nach dem kryochirurgischen Eingriff führen könnte. Insgesamt kommt es durch diese Mechanismen zu einer erhöhten Permeabilität der Kapillarwände, zur Plättchenaggregation und zur Stagnation des Blutflusses [71]. *Pistorius et al.* beobachteten in einer klinischen Studie mit Ganzkörperszintigraphie nach Injektion von Indium-111-markierten Thrombozyten eine lokale Plättchenaggregation im Gebiet der Kryoläsion, in der sie einen möglichen Grund für die Thrombozytopenie vermuten [129]. Bringt man diese Studien in Zusammenhang, lässt sich schließen, dass die durch die Stase ausgelöste Aktivierung der PNM durchaus eine Aktivierung der Gerinnung hervorrufen könnte, dass aber auch die Kryochirurgie ohne SVC offenbar einen Stimulus für eine Monozytenaktivierung darstellt, welche daraufhin einen nicht unbedeutenden Einfluss auf das Gerinnungsgeschehen haben könnten. *Brown et al.* demonstrieren, dass unmittelbar nach dem Frierprozess der Blutfluss bis zu 24h vermindert ist [18]. In der Einleitung wurde bereits von den mikrovaskulären Veränderungen und ihren Folgen berichtet. Möglicherweise wird durch das Abklemmen der Blutzufuhr dieser Pathomechanismus weiter verstärkt. Diese These ist mit den Ergebnissen unserer Studie vereinbar.

6.7.4. Die Blutgerinnung unter Aprotiningabe

Das primäre Ziel dieser Arbeit sollte sein, die Wirkung eines bestimmten Medikamentes auf die Kryotherapie zu untersuchen, das schon in anderen Gebieten erfolgreich zur Eindämmung von Gerinnungsstörungen eingesetzt wurde: Aprotinin, ein Serinproteaseinhibitor.

Aprotinin bewies bisher vor allem in der Herz-Thoraxchirurgie seine Wirkung, indem es den perioperativen Blutverlust verringert.

Betrachtet man die unter 3.4. beschriebenen Wirkweisen des Aprotinins genauer, wird schnell offensichtlich, dass es eine positive Auswirkung auf die unerwünschten Nebenwirkungen in der Kryochirurgie haben könnte. Durch die Blockade des Protease-activated-Receptors-1 (PAR-1) hemmt Aprotinin direkt die Aktivierung der Thrombozyten [25, 96, 134]. Um diesen

Einfluss auch unter Anwendung des Aprotinins in der Kryochirurgie zu untersuchen, wurden zunächst die Prothrombinfragmente gemessen. Unter der Gabe von Aprotinin konnten wir jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede gegenüber den anderen Gruppen ausmachen, lediglich eine Tendenz zur geringeren Ausschüttung ab der sechsten postoperativen Stunde gegenüber der Kontrollgruppe (Abb.12a.2) und in der Normierung auf 100% erkennbar auch gegenüber der Gruppe 2: „2x7,5 min Frieren“ (Abb.12b.1).

Da ATIII der wichtigste Inhibitor der Gerinnung ist, der mit dem Thrombin den Thrombin-Antithrombin-III- Komplex bildet, bestimmten wir auch diese beiden Parameter unter Gabe von Aprotinin. Bei ATIII zeigt sich nach Aprotiningabe zunächst sogar ein gegenüber der Kontrollgruppe leicht erhöhter Verbrauch. Dagegen kommt es aber ab dem dritten postoperativen Tag dann zu einem statistisch signifikanten ATIII-Anstieg. Nach einmaligem Frieren ohne Aprotinin fällt das ATIII insgesamt geringer ab als nach zusätzlicher Gabe von Aprotinin (Abb.10a.2). In der Darstellung der Thrombin-Antithrombin-III-Komplexe spiegelt sich die Verminderung des Antithrombins umgekehrt proportional wider (Abb.9a/b). Direkt nach dem Eingriff stieg der Thrombin-Antithrombin-III-Komplex in der Gruppe ohne Aprotinin deutlich an und erreichte den maximalen Wert eine Stunde postoperativ. Die Kurve der mit Aprotinin behandelten Tiere verläuft dagegen flacher. Hier zeigte sich jedoch keine Signifikanz. Erkennbar ist also in der nicht mit Aprotinin behandelten Gruppe ein höherer Anstieg sowohl für ATIII als auch für den Thrombin-Antithrombin-Komplex.

Anhand dieser Ergebnisse lassen sich Tendenzen erkennen, die für eine Abschwächung der Gerinnungsaktivierung während der Kryotherapie nach Gabe von Aprotinin sprechen. In wieweit diese Ergebnisse klinisch relevant sind, müssten weitere Studien zeigen.

Eine weitere Eigenschaft des Aprotinins ist die Inhibition der Fibrinolyse, indem sich direkt Plasmin-Aprotinin-Komplexe bilden [82] und indem die Proaktivatoren der Fibrinolyse (Kallikrein, Urokinase, t-PA) gehemmt werden [18, 82, 84]. Durch das gehäuft anfallende Plasmin soll es bei Cardiopulmonalen-Bypass-Operationen zu einer proteolytischen Degradation der Glycoprotein-IIbIIIa-Rezeptoren kommen und als Folge zu einer gestörten Gerinnungsfähigkeit des Blutes [61]. Zu unseren Überlegungen gehörte auch die Tatsache, dass die Leberkryochirurgie fast ausschließlich dazu dient, Malignome zu behandeln. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, gibt es Studien, die eine höhere Rezidivrate nach Anwendung der Kryochirurgie belegen. *Kuszyk et al.* [95] beobachteten in einem Mausmodell durch CT-und MR-Bildgebung eine rasche Bildung von Granulationsgewebe, eine angiogene Aktivität nach drei Tagen, sowie das Wachstum residuellen Tumorgewebes am äußeren Rand

der Kryoläsion nach sieben Tagen. *Thompson et al.* zeigten in mehreren Studien, dass Fibrinspaltprodukte (D-Dimere) die Angiogenese fördern. Sie schreiben ihnen eine Funktion als Hauptwachstumsfaktor in der Pathologie von chronischer Entzündung und in der Wundheilung zu. Die angiogene Aktivität sei am dritten Tag am höchsten [177, 178]. Eine Reduktion der Fibrinolyse durch Aprotinin könnte also in dieser Hinsicht ebenfalls von Vorteil sein. Wir haben in unserer Studie den Verlauf der Fibrinspaltprodukte in den verschiedenen Gruppen gemessen. Unsere Ergebnisse lassen durchaus eine Beeinflussung der Fibrinolyse durch Aprotinin erkennen, auch wenn wir keine statistische Signifikanz ermitteln konnten (Abb.12a.2). Die Fibrinspaltprodukte stiegen bis zur sechsten postoperativen Stunde an und fielen dann zunächst langsam und nach drei Tagen rasch bis zum siebten Tag auf den präoperativ gemessenen Wert ab. In der Shamgruppe waren dagegen nach der Operation zunächst keine steigenden F1+F2-Werte zu verzeichnen, dafür aber ein leichter Anstieg vom dritten bis zum siebten Tag, wobei in der Normierung auf 100% der letzte Wert deutlich höher als der Ausgangswert war (Abb.12b.1). Interessant ist, dass Gruppe 3: „15 min Frieren“ einen ähnlichen, fast horizontalen Kurvenverlauf wie die Shamgruppe zeigt, wobei es vom 3. bis zum 7. Tag zu einem etwas stärkeren Anstieg als in der Shamgruppe kam. Diese Ergebnisse zeigen also, dass ein einmaliger Frierzyklus keine aktivierende Eigenschaft auf die Fibrinolyse hat, da die Werte sogar leicht unterhalb derer der Kontrollgruppe liegen. Die zusätzliche Gabe von Aprotinin stimuliert diese offenbar dagegen bis zum dritten Tag, erkennbar anhand der deutlich steigenden D-Dimer-Werte vom Beginn der Therapie bis zu diesem Zeitpunkt (Abb.11.2).

Es gibt keine entsprechenden Aussagen in der veröffentlichten Literatur über Aprotinin und dessen Einfluss auf das Gerinnungssystem. Da diese Studie offenbar die erste ist, die sich mit der Kryochirurgie unter Aprotiningabe beschäftigt, gibt es keine Vergleichswerte.

6.7.5. Die Zytokinmessungen

Aufgrund der Tatsache, dass Gerinnungskomplikationen und Entzündungsvorgänge des Körpers oft in Zusammenhang stehen und sich gegenseitig verstärken können, untersuchen wir in dieser Studie zusätzlich zu den Gerinnungsparametern auch das Verhalten der Entzündungsparameter während und nach der Kryotherapie an der Leber bei Anwendung von ein- und zweimaligen Frierprozessen, sowie einmaligen Frierprozessen unter Gabe von Aprotinin bzw. unter Durchführung eines selektivem Gefäßverschlusses (SVC).

Es stellt sich die Frage, wie speziell die Leber als Organ mit der größten Syntheseleistung in die Ausschüttung der Zytokine involviert ist.

Wenn es zu einem Gewebsschaden kommt, folgen sogleich Veränderungen von einzelnen Zell-Populationen oder sogar ganzen Organsystemen, die als „akute Phase Reaktion“ (APR) bezeichnet werden. Ein Großteil der Mechanismen der APR läuft in der Leber ab [138]. In den letzten Jahren wurde deutlich, dass ein traumatischer hepatozellulärer Schaden in den meisten Fällen nicht primär auf die akute Gewebsverletzung zurückzuführen ist, sondern auf die Wirkung von inflammatorischen Zellen, wie Kupferzellen oder eingewanderte Leukozyten [138]. Zytokine spielen eine Schlüsselrolle in der Vermittlung der APR. Sie werden von aktivierten Zellen (hauptsächlich Monozyten) als Antwort auf den Gewebsschaden freigesetzt und binden an spezifische Zelloberflächenrezeptoren auf Zielzellen.

In der Leber sind die Kupffer-Zellen der Hauptort der Zytokinsynthese. Diese Zellen stellen die größte sessile Makrophagenpopulation des Körpers dar [27]. Zytokine werden erst kurz vor ihrer Freisetzung gebildet, daher scheint es eher unwahrscheinlich, dass das durch die kryochirurgische Vereisung nekrotische Gewebe noch in der Lage ist, diese zu bilden. Es wird deshalb angenommen, dass überlebende Kupfferzellen in der Peripherie noch zur Bildung und Freisetzung der Zytokine fähig sind [159]. Diese Hypothese wird unterstützt durch die Feststellung, dass 30 Minuten nach dem Frieren von 30% des Lebervolumens in Ratten der Transkriptionsfaktor „nuclear factor kappaB“ (NFkB), der die Transkription der mRNA von IL-6 und TNF- α reguliert, im nichtgefrorenen Gewebe aktiviert ist [159].

Im Folgenden wird die Bedeutung der verschiedenen Zytokine, die für dieses Modell von Interesse sein könnten, erläutert.

Der Schaden, der durch die Vereisung gesetzt wird, verursacht eine akute Gewebsverletzung mit daraus resultierender Ischämie, bedingt durch die Stagnation des Blutflusses durch die Eisbildung und den später resultierenden Schaden der Gefäße [18]. Als Reaktion auf die Gewebsverletzung folgt zunächst eine vermehrte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, vor allem von TNF- α [83] durch die aktivierten Kupfferzellen. Daraufhin werden die neutrophilen Granulozyten aktiviert. TNF- α soll in der Lage sein, eine Expression des intrazellulären Adhäsionsmoleküls (ICAM-1) zu bewirken, das den Neutrophilen die Migration durch das Gewebe ermöglicht [27, 66]. Auch die Produktion der gewebsschädigenden Peroxidasen und Lysozyme in den Monozyten soll durch TNF- α initiiert

werden. Durch die Freisetzung dieser Oxidantien und Proteasen kommt es zu weiteren Zellschäden [76].

Etwas später als TNF- α wird auch IL-6 ausgeschüttet, dessen Bildung durch TNF- α angeregt wird [26]. *Cressman et al.* beobachteten in einer Studie mit IL-6-knock-out-Mäusen nach Leberteileresektion die Entwicklung von ausgedehnten nekrotischen Leberarealen und ballonförmigen Degenerationen von Leberzellen. Waren die Mäuse aber in der Lage, IL-6 zu bilden, kam es zu einer raschen Initiation der Gewebsproliferation [31]. *Camargo et al.* konnten in einem Ischämie/Reperfusionen-Modell zeigen, dass IL-6 die Gewebsnekrose nach der Reperfusion verhindern kann, was sie auf die durch IL-6 induzierte Verminderung der TNF- α Wirkung zurückführen [20]. *Tilg et al.* berichteten, dass IL-6 die Freisetzung des löslichen TNF- α -Rezeptors TNFRs1-p55 bewirkt, ein Molekül, das mit den membrangebundenen Rezeptoren TNFR1-p55 für zirkulierendes TNF- α kompetitiert und damit die Aktivität des TNF- α einschränkt [179]. *Colletti et al.* zeigten, dass TNF- α -Antikörper eine deutliche Reduktion von hepatischen und pulmonalen Schäden nach der hepatischen Reperfusion bewirken [27].

Interessant ist im Hinblick auf die oft beobachtete Thrombozytopenie nach der Kryotherapie die Tatsache, dass der TNF- α -Rezeptor TNFR1-p55 in einer Studie an infizierten Mäusen für eine 30 prozentige Reduktion der zirkulierenden Thrombozyten verantwortlich gemacht wird. Dieser Rezeptor soll nach Bindung von TNF- α in der Lage sein, die Tissue-Factor Expression deutlich zu verstärken, was zu einer hohen lokalen Thrombinansammlung führt [87, 130, 173]. Weitere Studien konnten zeigen, dass über einen ähnlichen Mechanismus durch TNF- α auch die Fibrinolyse aktiviert wird [68, 87, 130]. Eine Freisetzung des löslichen TNF- α -Rezeptors TNFRs1-p55 durch IL-6, der das zirkulierende TNF- α bindet und funktionsuntüchtig macht, könnte also demnach auch eine Verhinderung der Thrombozytopenie bewirken, die durch Aktivierung des membrangebundenen Rezeptors TNFR1-p55 ausgelöst wird. Zusätzlich könnte eine vermehrte Fibrinolyse verhindert werden. Trotz der bisher genannten positiven Eigenschaften wird des öfteren beobachtet, dass stark erhöhte IL-6-Spiegel mit dem Tod des Patienten durch eine fulminante Sepsis einhergehen [15, 54, 176]. Aus diesem Grund ist man sich auch bis heute nicht einig, ob man IL-6 nun primär eine pro- oder eine antiinflammatorische Komponente zuschreiben soll. Viele Autoren sprechen IL-6 ausschließlich eine negative Bedeutung zu. Sie stellen meistens nur dessen Anstieg fest, machen aber keine Angaben über die mögliche Wirkung dieses Interleukins. Möglicherweise kommt der erhöhte Wert auch dadurch zustande, dass ein großer Schaden

eine vermehrte Entzündungsreaktion mit einer ebenfalls vermehrten Gegenregulation hervorruft. Auch IL-10 zeigt höhere Werte, wenn eine Entzündung im Körper abläuft, doch wird IL-10 als eindeutig antiinflammatorisches Zytokin keine Bedeutung als Indikator einer drohenden Sepsis zugesprochen. Möglicherweise ist allein die Höhe des IL-6 ausschlaggebend und nur eine zu starke Freisetzung führt zu einer lebensbedrohlichen Überreaktion des Immunsystems.

Es gibt Zytokine, denen primär eine antiinflammatorische Wirkung zugeschrieben wird, wie IL-4 und IL-10. Wie bereits erwähnt spielt der Transkriptionsfaktor „nuclear factor kappaB“ (NFkB) eine Schlüsselrolle in der Bildung zahlreicher proinflammatorischer Zytokine, wie TNF- α und IL-6. Die Aktivität dieses Faktors wird von IL-4 und IL-10 vermindert [83, 199]. Als Folge dessen wird die *Bildung des TNF- α* verhindert. Im Unterschied zu IL-4 und IL-10 inhibiert IL-6 dagegen bereits *vorhandenes TNF- α* . Interessant ist aber, dass auch die Bildung von IL-6 durch die Supprimierung des NFkB verhindert wird. Hier könnte ein wichtiger Schlüssel zur Klärung der Frage nach der pro-oder-antiinflammatorischen Wirkung von IL-6 liegen. *Taniguchi et al.* stellten fest, dass es für das Überleben des Patienten von größter Wichtigkeit ist, dass sich das Verhältnis zwischen IL-6 und IL-10 im Laufe der Erkrankung zugunsten des IL-10 verschiebt [174]. Möglicherweise führt die immunmodulierende Wirkung von IL-6 zu einer Immunsuppression, z.B. durch die Ausschaltung von zirkulierendem TNF- α , wenn sie nicht rechtzeitig durch antiinflammatorische Zytokine beendet wird [172]. Ein Anstieg des IL-10-Spiegels konnte frühestens sieben Stunden nach Aktivierung der Monozyten festgestellt werden, maximale Spiegel zeigten sich nach 24-48 Stunden. Damit wird klar, dass die inhibitorischen Eigenschaften von IL-10 auf proinflammatorische Zytokine erst nach deren Ausschüttung in Kraft treten, womit seine Bedeutung in der Beendigung einer Immunreaktion deutlich wird [186].

Eine besondere Rolle in der akuten Entzündungsreaktion nimmt TGF- β ein. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, fördert es vor allem eine rasche Wundheilung und Narbenbildung, soll aber zusätzlich eine fördernde Wirkung auf das Wachstum von Tumorzellen haben. Da die Fibrinogen-induzierende Aktivität von TGF- β schon sehr kurz nach der Entstehung eines Gewebsschadens zu beobachten ist [75] und sowohl die zytotoxische Aktivität der Monozyten als auch die Aktivität von TNF- α [140, 44] durch TGF- β inhibiert werden, scheint TGF- β ein Inhibitor der akuten-Phase-Reaktion der Leber zu sein. Dies wäre nicht im Sinne der Tumorbekämpfung durch die Kryochirurgie, weil eine kontrolliert ablaufende Entzündungsreaktion nach oben beschriebenen Mechanismen wichtig ist für eine

gleichmäßige Nekrose des neoplastischen Gewebes. Eine frühzeitige fibrotische Umwandlung der Kryoläsion mit der damit gleichzeitig einhergehenden Angiogenese könnte das Überleben von einzelnen Tumorzellen fördern und für Rezidive sorgen.

6.7.6. Die Zytokinwerte unter Aprotiningabe

Aprotinin greift bekanntlich in mehrere Schritte der Entzündungsreaktion und der damit in Zusammenhang stehenden Gerinnungsaktivierung ein. Zunächst sei hier die signifikante Verminderung der für die Entstehung einer Entzündung wichtigen Interaktionen zwischen Leukozyten und Endothelzellen genannt, indem durch Aprotinin effektiv die Expression von Zelloberflächenmolekülen wie P-Selektin inhibiert wird [74, 137].

Aprotinin soll des Weiteren die Bildung von löslichem TNF- α beim Menschen reduzieren, indem es die proteolytische Spaltung des zunächst noch membrangebundenen Zytokins zu freiem TNF- α verhindert [35, 137, 66]. In vitro konnte durch Aprotinin eine um 51% reduzierte TNF- α -Ausschüttung erreicht werden [86]. *Kollmar et al.* konnten feststellen, dass eine nach der Kryotherapie aufgefallene Leukozyteninfiltration in das Gewebe deutlich vermindert werden kann, wenn Aprotinin gegeben wird [89]. Sowohl die Inhibition von P-Selektin, als auch von TNF- α könnten dafür die Ursache sein.

P-Selektin und TNF- α greifen zusätzlich beide durch eine Induktion des Tissue-Factors in das Gerinnungsgeschehen ein [22, 41, 42, 180] und TNF- α verstärkt zusätzlich die Fibrinolyse. Wenn Aprotinin diese beiden Faktoren vermindert, könnte durch Aprotiningabe neben der direkten Wirkung auf die Gerinnungsfaktoren auch eine deutliche Reduktion der Gerinnungskomplikationen zu erwarten sein, die durch die Entzündungsvorgänge hervorgerufen werden. Das antiinflammatorische Zytokin IL-10 soll unter Aprotiningabe vermehrt freigesetzt werden [67, 118]. Zur Beeinflussung von IL-6 gibt es divergierende Aussagen. Eine klinische Studie mit 11 Patienten, die sich einer Bypassoperation unterzogen hatten, konnte eine signifikant vermehrte Freisetzung von IL-6 nachweisen [194]. Andere in-vivo-Studien zeigten, dass die IL-6 Ausschüttung zumindest durch Aprotiningabe nicht reduziert wurde [35, 193]. Eine in-vitro-Studie wies Aprotinin dagegen einen IL-6 vermindernde Wirkung nach [163]. Im Hinblick auf unseren Einsatz von Aprotinin in der Leberkryochirurgie und unter Einbeziehung der bislang erläuterten Erkenntnisse über die Funktion dieses Interleukins im Zusammenhang mit Leberschäden nach Ischämie/Reperfusion war die Auswirkung der Aprotiningabe durchaus von besonderem Interesse.

Ebenso fehlen Studienangaben zur Wirkung von Aprotinin auf TGF- β . Im Zusammenhang mit der These, dass ein Anstieg von TGF- β sich negativ auf den Behandlungserfolg der Kryotherapie auswirken könnte, erhofften wir uns aufschlussreiche Messergebnisse, insbesondere im Hinblick auf IL-4, welches in den erläuterten Studien ähnliche Aktivitäten wie IL-10 zeigte, dessen Wirkung unter Aprotiningabe jedoch noch nicht untersucht ist.

6.7.7. Die Studienergebnisse der Zytokinbestimmungen

Alle bisher diskutierten Fakten zusammenfassend, lassen sich für unsere Studie folgende Erwartungen aussprechen:

Eine vermehrte Produktion von TNF- α sollte möglichst ausbleiben oder sehr gering bleiben, die IL-6 Produktion sollte ansteigen, aber gegen Ende der Studie wieder ihre Ausgangswerte erreicht haben und die antiinflammatorischen Zytokine IL-4 und IL-10 sollten in der Zeitabfolge einen Anstieg etwas später als TNF- α und IL-6 zeigen. TGF- β sollte eine möglichst geringe Aktivität zeigen.

Da es unter zweimaligem Frieren zu einem mehrfach beschriebenen größeren Gewebsschaden kommt, wäre ein Anstieg der inflammatorischen und als Gegenregulation auch der antiinflammatorischen Zytokine zu erwarten.

Die selektive Unterbindung der Blutzufuhr bedeutet eine größere Gewebischämie und einen daraus resultierenden größeren Gewebsschaden. Folglich müsste es nach oben beschriebenen Mechanismen zu ähnlichen Veränderungen wie beim doppelten Frieren kommen. *Seifert et al.* konnten in ihrer Studie zur Leberkryotherapie feststellen, dass bei dieser Methode sowohl TNF- α , als auch IL-6 einen Anstieg zeigen. Dieser korrelierte mit den ebenfalls ansteigenden Leberenzymen als Indikatoren für das Ausmaß des Gewebsschadens [158].

Leider war die Bestimmung der Zytokine weniger aussagekräftig als erhofft. Im Falle von TNF- α konnten wir, wie bereits erwähnt, keinerlei Aktivität verzeichnen, weder in der Kontrollgruppe noch in einer der kryochirurgisch behandelten Gruppen.

Die Bestimmung von IL-6 brachte tatsächlich signifikante Ergebnisse (Abb.13), welche die zuvor beschriebene Theorie unterstützen. Die Gruppe 2: „2x7,5 min Frieren“ zeigte einen signifikanten Anstieg gegenüber der Shamgruppe und dem einfachen Frierzyklus, wahrscheinlich kam es hier wegen der stärkeren Gewebsverletzung zu einer vermehrten IL-6 Ausschüttung (Abb.13.1). Den deutlichsten IL-6 Anstieg hatten die Tiere der Gruppe 5: „15 min Frieren + Aprotinin“ (Abb.13.2). Der höchste Wert wurde nach 6 Stunden erreicht. Aus

diesem Ergebniss lässt sich schließen, dass Aprotinin ein Stimulus für die IL-6 Produktion sein könnte. Dieser Aspekt ist insofern besonders interessant da Aprotinin sich in zahlreichen anderen Studien positiv auf die Entzündungsreaktion ausgewirkt hatte [5, 74, 96]. Wenn Aprotinin nun eine vermehrte Ausschüttung von IL-6 bewirkt, könnte hiermit die Theorie der immunmodulatorischen und antiinflammatorischen Bedeutung des IL-6 unterstützt werden. Es gibt wie erwähnt eine in-vivo-Studie, in der es nach Aprotiningabe ebenfalls zu einer vermehrten Ausschüttung von IL-6 gekommen war [194].

Beim SVC kam es zu einem rascheren IL-6 Anstieg als bei den anderen Gruppen sowie zu einem früheren Abfall des IL-6, möglicherweise, weil die Gefäßokklusion zunächst einen verstärkten Stimulus für die Entzündungsreaktion darstellt (Abb.13.3). Der raschere Kurvenabfall des IL-6 Spiegels gegenüber den anderen Gruppen lässt sich durch obige Überlegungen nicht erklären, der allgemeine Zeitpunkt des Anstiegs nach drei Stunden stimmt jedoch mit den Ergebnissen anderer Forschungsgruppen überein.

Bei IL-4 ließ sich im Vergleich mit der Kontrollgruppe und dem einmaligen Frieren über 15min ein leicht verstärkter Anstieg des Zytokins bei den mit Aprotinin behandelten Tieren verzeichnen (Abb.14). Obwohl dieses Ergebnis nicht von statistischer Signifikanz ist, zeigt diese Tendenz, dass Aprotinin offenbar einen Stimulus für die IL-4 Ausschüttung darstellt. Der starke Anstieg drei Tage nach Behandlung mit dem einfachen Frierzyklus ist ebenfalls nicht statistisch signifikant und weist in Anbetracht der hohen Standardabweichung auf eine starke Wertevarianz zu diesem Zeitpunkt hin. Interessant ist, dass nach der Behandlung mit SVC kein IL-4 messbar war, wogegen alle anderen Gruppen zumindest geringe Werte aufwiesen. Dies deutet darauf hin, dass SVC keinen Stimulus für die Ausschüttung dieses antiinflammatorischen Interleukins darstellt, ein eher ungünstiges Ergebnis, da IL-4 die Angiogenese hemmt und einer überschießenden Entzündungsreaktion entgegenwirkt.

Die Werte der IL-10 Messungen zeigten keinerlei statistisch signifikante Ergebnisse oder Tendenzen (Abb.15). Es lässt sich demnach in diesem Fall kein Einfluss durch die angewandten Methoden oder durch die Gabe von Aprotinin verzeichnen. Da sich dieses Ergebnis sowohl in der Kontrollgruppe als auch in allen kryochirurgisch behandelten Gruppen zeigte, war möglicherweise der inflammatorische Stimulus in unserer Studie so moderat, dass eine vermehrte IL-10 Ausschüttung zur Beendigung der Reaktion nicht essentiell war.

Bei den Ergebnissen zu TGF- β zeigten sich bei allen Gruppen außer beim einfachen Frierzyklus gleiche Ausgangswerte (Abb.16). Vor dem einmaligen Frieren gab es eine breite

Werteverianz, so dass der Mittelwert höher ausfiel als nach Beginn der Kryotherapie. Nach 6 Stunden zeigte sich sowohl nach der Behandlung mit dem einfachen Frierzyklus als auch etwas schwächer nach dem doppelten Frieren ein Anstieg von TGF- β . Hier konnten aufgrund erheblicher Varianzen ebenfalls keine Signifikanzen gefunden werden. Im Bezug auf die oben erwähnte These, dass ein Anstieg von TGF- β sich im Hinblick auf die Rezidivbildung nach der Kryotherapie negativ auswirken könnte, wäre es möglich, dass der einfache Frierzyklus durch die stärkste Stimulierung der TGF- β -Ausschüttung in dieser Hinsicht am ehesten negative Folgen mit sich bringt. Die Behandlung mit Aprotinin und SVC führten dagegen nicht zu einem TGF- β -Anstieg, was sich positiv verzeichnen lässt.

6.8. Zusammenfassung, klinischer Ausblick und Bedeutung für die Klinik

Diese Studie befasst sich mit einem äußerst komplexen Netzwerk physiologischer Vorgänge, da sowohl die Hämostase als auch die Immunreaktion des Körpers jeweils ein kompliziertes Zusammenspiel aus sich gegenseitig beeinflussenden Aktionen und Reaktionen darstellen. Es gibt viele Studienergebnisse mit teilweise widersprüchlichen Aussagen. Ein Großteil dieser Arbeit besteht daher daraus, eine möglichst strukturierte und fundamentierte Übersicht über die wichtigsten bisher erforschten und veröffentlichten Erkenntnisse und deren Zusammenhang mit den Ergebnissen dieser Studie darzustellen.

Fasst man die vielen untersuchten und diskutierten Unterpunkte dieser Arbeit zusammen, kommt man zu dem Ergebnis, dass die Kryotherapie, wenn sie unter den von uns angewandten Bedingungen durchgeführt wird, eine durchaus sichere und die Hämostase und das Immunsystem nicht übermäßig beeinflussende Methode ist. Die Gerinnungsparameter zeigten keine Veränderungen, die eine deutliche Tendenz zur intravasalen disseminierten Gerinnung darstellen, und auch die Entzündungsparameter zeigten ausschließlich moderate Kurvenverläufe. Der Einfluss des Aprotinins brachte nicht die erhoffte bedeutende Abschwächung der Gerinnungsaktivierung, wobei diese in unserer Studie auch ohne Aprotiningabe so moderat ausfiel, dass sie ohnehin keine bedrohliche Situation darstellte. In der Immunreaktion kam es unter Aprotiningabe zu einem signifikanten Anstieg von IL-6. Ich möchte diesem Ergebnis die größte Bedeutung aller Studienergebnisse zusprechen, da die wissenschaftlichen Erkenntnisse über dieses Interleukin noch sehr vage und oft widersprüchlich sind. Aprotinin hatte sich in zahlreichen anderen Studien positiv auf die Entzündungsreaktion ausgewirkt. Wenn es nun in einer weiteren in-vivo-Studie eine vermehrte Ausschüttung von IL-6 bewirkt, könnte hiermit die Theorie der immunmodulatorischen und antiinflammatorischen Bedeutung des IL-6 unterstützt werden. Was die anderen Entzündungsparameter betrifft, lassen sich wenig Rückschlüsse auf eine bedeutende Aprotininwirkung ziehen. Generell zeigt diese Studie keinerlei Anhalt für die Bestätigung der Theorie eines septischen Schocks, oder eine durch Entzündungsparameter ausgelöste verstärkte Gerinnungsreaktion unter Anwendung der Kryotherapie. Aufgründessen und auch in Anbetracht der Ergebnisse von *Kollmar et al.* stellt die Kryochirurgie weiterhin eine wertvolle und relativ komplikationslose Methode in der Behandlung maligner Lebertumoren dar.

7. Literaturverzeichnis

1. Adam R, Akpınar E, Johann M, Kunstlinger F, Majno P, Bismuth H (1997) *Place of cryosurgery in the treatment of malignant liver tumors*. Ann Surg;225(1):39–50.
2. Adam R (2004) *Multimodality treatment of liver metastases from colorectal cancer*. Oncología (Barc);27(4): 139-140
3. Aliev G, Ragazzi E, Smith MA, Mironov A, Perry G (1999) *Morphological features of regeneration of rabbit aortic endothelium after cryoinduced vascular damage*. J Submicrosc Cytol Pathol;31(4):495-502
4. Arai K, Lee F, Miyajima A, Miyatake S, Arai N, Yokota N (1990) *Cytokines: Coordinators of Immune and Inflammatory Responses* Annual Review of Biochemistry;59:783-736
5. Asimakopoulos G, Thompson R, Nourshargh S, Lidington EA, Mason JC, Ratnatunga CP, Haskard DO, Taylor KM, Landis RC. (2000) *An anti-inflammatory property of aprotinin detected at the level of leukocyte extravasation*. J Thorac Cardiovasc Surg;120(2):361-369.
6. Bagia J, Perera D, Morris D (1998) *Renal Impairment in Hepatic Cryotherapy*. Cryobiology;36:263-267
7. Barthels M, Möller W, Oestereich C (1990) *Thrombin/Antithrombin III Komplex (TAT), Plasminogen-Aktivator-Inhibitor (PAI): Neue Erkenntnisse zur klinischen Relevanz*. Wiss H Neue Methoden in der Labordiagnostik. Medizinische Verlagsbesellschaft, Marburg:121-132
8. Baust JG, Gage AA (2005) *The molecular basis of cryosurgery*. BJU Int;95(9):1187-1191
9. Baust JG, Gage AA (2004) *Progress toward optimization of cryosurgery*. Technol Cancer Res Treat;3(2):95-101
10. Bayjoo P, Jacob G (1992) *Hepatic cryosurgery: biological and clinical considerations*. J R Coll Surg Edinb;37(6):369-372
11. Berger W, Poledna J (2001) *New strategies for the placement of cryoprobes in malignant tumors of the liver for reducing the probability of recurrences after hepatic cryosurgery*. International Journal of Colorectal Disease;16 (5):331-339
12. Beuchelt H (1963) *Trasylol, ein Proteinase-Inhibitor, in Experiment und klinischer Anwendung*. Med Chem;7:763–768.

-
13. Bick RL, Arun B, Frenkel EP (1999) *Disseminated intravascular coagulation. clinical and pathophysiological mechanisms and manifestations*. Haemostasis;29(2-3):111-134
 14. Bidstrup BP, Royston D, Sapsford RN, Taylor KM (1989) *Reduction in blood loss and blood use after cardiopulmonary bypass with high dose aprotinin (Trasylol)*. J Thorac Cardiovasc Surg;97(3):364-372
 15. Biffl WL, Moore EE, Moore FA, Peterson VM (1996) *Interleukin-6 in the injured patient. Marker of injury or mediator of inflammation?* Ann Surg;224(5):647-664
 16. Blackwell TS, Debelak JP, Venkatakrishnan A, Schot DJ, Harley DH, Pinson CW, Williams P, Washington K, Christman JW, Chapman WC (1999) *Acute lung injury after hepatic cryoablation: correlation with NF-kappa B activation and cytokine production*. Surgery;126(3):518-526
 17. Blackwood CE, Cooper IS (1972) *Response of experimental tumor systems to cryosurgery*. Cryobiology;9(6):508-515
 18. Brown NJ, Gainer JV, Murphey LJ, Vaughan DE (2000) *Bradykinin stimulates tissue plasminogen activator release from human forearm vasculature through B(2) receptor-dependent, NO synthase-independent, and cyclooxygenase-independent pathway*. Circulation;102(18):2190-2196
 19. Bühlmann (2006) *Zytokine*; http://www.dpcbuehlmann.at/html/modules.php?op=modload&name=Page&file=index&page_id=74
 20. Camargo CA Jr, Madden JF, Gao W, Selvan RS, Clavien PA (1997) *Interleukin-6 protects liver against warm ischemia/reperfusion injury and promotes hepatocyte proliferation in the rodent*. Hepatology;26(6):1513-1520
 21. Carmassi F, Morale M, de Negri F, Puccetti R, Pistelli F, Mariani G, Pazzagli M, Palla A, Giuntini C (1996) *Thrombin-antithrombin III complexes as an additional diagnostic aid in pulmonary embolism*. Haemostasis;26(1):16-22
 22. Celi A, Pellegrini G, Lorenzet R, De Blasi A, Ready N, Furie BC, Furie B (1994) *P-selectin induces the expression of tissue factor on monocytes*. Proc Natl Acad Sci USA;91(19):8767-8771
 23. Di Cera E (2003) *Thrombin Interactions*. Chest;124:11S-17S
 24. Choi G, Schultz MJ, Levi M, van der Poll T (2006) *The relationship between inflammation and the coagulation system*. Swiss Med Wkly;136:139-144

-
25. Cirino G, Napoli C, Bucci M, Cicala C (2000) *Inflammation-coagulation network: are serine protease receptors the knot?* Trends Pharmacol Sci;21(5):170-172(3)
 26. Clavien PA (1997) *IL-6, a key cytokine in liver regeneration.* Hepatology;25(5):1294-1296
 27. Colletti LM; Remick DG; Burtch GD; Kunkel SL; Strieter RM; Campbell DA (1990) *Role of tumor necrosis factor-alpha in the pathophysiologic alterations after hepatic ischemia/reperfusion injury in the rat.* J Clin Invest;85(6):1936-1943
 28. Cooper IS (1964) *Cryobiology as Viewed by the Surgeon.* Cryobiology;51(1),44-51
 29. Coughlin SR (1999) *How the protease thrombin talks to cells.* Proc Natl Acad Sci U S A;96(20):11023-11027
 30. Cozzi PJ, Stewart GJ, Morris DL (1994) *Thrombocytopenia after hepatic cryotherapy for colorectal metastases: correlates with hepatocellular injury.* World J Surg;18(5):774-776
 31. Cressman DE, Greenbaum LE, Haber BA, Taub R. (1994) *Rapid activation of post-hepatectomy factor/nuclear factor kappa B in hepatocytes, a primary response in the regenerating liver.* J Biol Chem;269(48):30429-30435
 32. Cushieri, A, Crosthwaite, G, Shimi, S, Pietrabissa, A, Joypaul, V, Tair, I and Naziri, W (1995) *Hepatic Cryotherapy for Liver Tumors.* Surg Endosc;9(5):483-489
 33. D'Andrea A, Ma X., Aste Amezaga M, Paganin C, Trinchieri G (1995) *Stimulatory and inhibitory effects of interleukin (IL)-4 and IL-13 on the production of cytokines by human peripheral blood mononuclear cells: priming for IL-12 and tumor necrosis factor alpha production.* J Exp Med;181:537-546
 34. Daum PS, Bowers WD Jr, Tejada J, Hamlet MP (1987) *Vascular casts demonstrate microcirculatory insufficiency in acute frostbite.* Cryobiology;24(1):65-73
 35. Defraigne JO, Pincemail J, Larbuisson R, Blaffart F, Limet R. (2000) *Cytokine release and neutrophil activation are not prevented by heparin-coated circuits and aprotinin administration.* Ann Thorac Surg;69(4):1084-1091
 36. Dilley AV, Dy DY, Warlters A, Copeland S, Gillies AE, Morris RW, Gibb DB, Cook TA, Morris DL (1993) *Laboratory and animal model evaluation of the Cryotech LCS 2000 in hepatic cryotherapy.* Cryobiology;30(1):74-85
 37. Dietrich W, Spannagl M, Jochum M, Schramm W, Barankay A, Sebening F, Richter JA (1990) *Influence of high-dose aprotinin treatment on blood loss and coagulation*

-
- patterns in patients undergoing myocardial revascularization. Anesthesiology* 73:1119-1126
38. Dörner K (1999) *Klinische Chemie und Hämatologie* Ferdinand Enke Verlag Stuttgart 3. Auflage
39. Dutta MM, Gage AA (1979) *Large volume freezing in experimental. hepatic cryosurgery. Cryobiology*;16:50–55
40. Dyce KM, Sack WO, Wensing CJ (1991) *Anatomie der Haustiere: „Das Abdomen des. Schweines“*, übersetzt von Budras KD, Goller H, Goller I, Hofmann RR, Hummel G, Weyrauch KD, Ferdinand Enke Verlag Stuttgart :814-819,
41. Esmon CT (1999) *Possible involvement of cytokines in diffuse intravascular coagulation and thrombosis. Baillieres Best Pract Res Clin Haematol*;12(3):343-359
42. Esmon CT (2000) *Does inflammation contribute to thrombotic events? Haemostasis*;30 (Suppl 2):34-40
43. Espevik T, Figari IS, Ranges GE, Palladino MA (1988) *Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) and recombinant human tumor necrosis factor-alpha reciprocally regulate the generation of lymphokine-activated killer cell activity. The Journal of Immunology*;140(7) 2312-2316
44. Faler BJ (2006) *Transforming Growth Factor- β and Wound Healing. Perspectives in Vascular Surgery and Endovascular Therapy*;18(1), 55-62
45. Feifel G, Schüder G, Pistorius G (1999) *Kryochirurgie - Renaissance oder echter Fortschritt? Chirurg*;70:154-159
46. Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, Moore KW, O'Garra A (1991) *IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. J Immunol*;146:10:3444-3445
47. Fong Y, Moldawer LL, Shires GT, Lowry SF (1990) *The biologic characteristics of cytokines and their implication in surgical injury. Surg Gynecol Obstet*;170(4):363-378
48. Fossum C, Wattrang E, Fuxler L, Jensen KT, Wallgren P (1998) *Evaluation of various cytokines (IL-6, IFN-alpha, IFN-gamma, TNF-alpha) as markers for acute bacterial infection in swine- a possible role for serum interleukin-6. Vet Immunol Immunopathol*;8;64(2):161-172
49. Frey HH, Löschner W (2003) *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für Veterinärmediziner. 2. Auflage, Ferdinand Enke Verlag Stuttgart: 93-123*

-
50. Fritz H, Wunderer G (1983) *Biochemistry and applications of aprotinin, the kallikrein inhibitor from bovine organs*. *Arzneimittelforschung*;1983;33(4):479-494
 51. Gage AA, Fazekas G, Riley EE Jr (1967) *Freezing injury to large blood vessels in dogs. With comments on the effect of experimental freezing of bile ducts*. *Surgery*;61(5):748-754
 52. Gage AA, Guest K, Montes M, Caruana JA, Whalen DA Jr (1985) *Effect of varying freezing and thawing rates in experimental cryosurgery*. *Cryobiology*;22(2):175-182
 53. Gage AA, Baust J (1998) *Mechanisms of tissue injury in cryosurgery*. *Cryobiology*;37(3):171-186
 54. Gebhard F, Pfetsch H, Steinbach G, Strecker W, Kinzl L, Bruckner UB (2000) *Is interleukin 6 an early marker of injury severity following major trauma in humans*. *Arch Surg*;135(3):291-295
 55. Gilbert JC, Rubinsky B, Roos MS, Wong ST, Brennan KM. 1993. *MRI-monitored cryosurgery in the rabbit brain*. *Magn Reson Imaging*;11:1155-1164
 56. Gill W, Fraser J, Carter D (1968) *Repeated freeze/thaw cycles in cryosurgery*. *Nature*;219:410-413
 57. Goodie D, Horton A, Morris R, Nagy L, Morris D (1992) *Anaesthetic Experience with Cryotherapy for Treatment of Hepatic Malignancy*. *Anaesth Intens Care*;20: 491-496
 58. van Griensven M, Krettek C, Pape HC (2003) *Immune Reactions after Trauma*. *European Journal of Trauma*;29(4):181-192
 59. Größle R, Geiger S, *Perioperative Gerinnungsstörung*. Interdisziplinäre Arbeitsgemeinschaft für Hämotherapie, [www.iakh.de/Handreichungen/Gerinnungsst % F6rungenTUDres.pdf](http://www.iakh.de/Handreichungen/Gerinnungsst%F6rungenTUDres.pdf)
 60. Gulba DC, Dechend R (1994) *Thrombolysis in thromboembolic diseases*. *Ann Hematol*;69:41-57
 61. de Haan J, van Oeveren W. (1998) *Platelets and soluble fibrin promote plasminogen activation causing downregulation of platelet glycoprotein Ib/IX complexes: protection by aprotinin*. *Thromb Res*;15;92(4):171-179
 62. Hall SW, Nagashima M, Zhao L, Morser J, Leung LL (1999) *Thrombin interacts with thrombomodulin, protein C, and thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor via specific and distinct domains*. *J Biol Chem*;274(36):25510-25516
 63. Hamad GG, Neifeld JP (1998) *Biochemical, hematologic, and immunologic alterations following hepatic cryotherapy*. *Semin Surg Oncol*;14(2):122-128

-
64. Hart PH, Vitti GF, Burgess DR, Whitty GA, Piccoli DS, Hamilton JA (1989) *Potential antiinflammatory effects of interleukin 4: suppression of human monocyte tumor necrosis factor alpha, interleukin and prostaglandin E2*. Proc Nat Acad Sci U S A;86: 3803-3807
 65. Heckl U. (2003) "*Pilotstudie zur intraoperativen Aprotininapplikation bei Patienten mit Rektumtumoren und ihre Auswirkung aus Transfusionsbedarf und Blutverlust*" Dissertation, LMU München, Medizinische Fakultät: 8
 66. Hill GE, Alonso A, Spurzem JR, Stammers AH, Robbins RA (1995) *Aprotinin and methylprednisolone equally blunt cardiopulmonary bypass-induced inflammation in humans*. J Thorac Cardiovasc Surg;110(6):1658-1662
 67. Hill et al. (1998) *Aprotinin Enhances the Endogenous Release of Interleukin-10 After Cardiac Operations*. Ann Thorac Surg;65:66-69
 68. van Hinsbergh VW, Bauer KA, Kooistra T, Kluft C, Dooijewaard G, Sherman ML, Nieuwenhuizen W (1990) *Progress of fibrinolysis during tumor necrosis factor infusions in humans. Concomitant increase in tissue-type plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor type-1, and fibrin(ogen) degradation products*. Blood;1;76(11):2284-2289
 69. Hoek JA, Nurmohamed MT, ten Cate JW, Buller HR, Knipscheer HC, Hamelynck KJ, Marti RK, Sturk A. (1989) *Thrombin-antithrombin III complexes in the prediction of deep vein thrombosis following total hip replacement*. Thromb Haemost;62(4):1050-1052
 70. Hofer SO, Shraye D, Reichner JS, Hoekstra HJ, Wanebo HJ (1998) *Wound-induced tumor progression: a probable role in recurrence after tumor resection*. Arch Surg;133(4):383-389
 71. Hoffmann NE, Bischof JC (2002) *The cryobiology of cryosurgical injury*. Urology;60(2 Suppl 1):40-49
 72. Hollister WR, Mathew AJ, Baust JG, Van Buskirk RG (1998). *The effects of freezing on cell viability and mechanisms of cell death in an in vitro human prostate cancer cell line*. Mol Urol;2:13-18
 73. Inoue K, Takano H, Yanagisawa R, Sakurai M, Shimada A, Sato M, Yoshino S, Yoshikawa T (2006) *Role of interleukin-6 in fibrinolytic changes induced by lipopolysaccharide in mice*. Blood Coagul Fibrinolysis;17(4):307-309

-
74. Inui K, Shimazaki Y, Watanabe T, Kuraoka S, Uesho K, Uchida T, Shiono S (1998) *Aprotinin reduces the expression of p-selectin on the surface of platelet and leukocyte-platelet conjugates*. Artif Organs;22(12):1018-1022
 75. Inuzuka S, Ueno T, Tanikawa K (1994) *Fibrogenesis in acute liver injuries*. Pathol Res Pract;190(9-10):903-909
 76. Jaeschke H (2003) *Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol;284(1):15-26
 77. Janssens M, Joris J, David JL, Lemaire R, Lamy M (1994) *High-dose aprotinin reduces bloodloss in patients undergoing total hip replacement surgery*. Anesthesiology;80(1):23-29
 78. Joseph L, Fink LM, Hauer-Jensen M (2000) *Cytokines in coagulation and thrombosis: a preclinical and clinical review*. Blood Coagul Fibrinolysis;13(2):105-116
 79. Kahlenberg MS, Volpe C, Klippenstein DL, Penetrante RB, Petrelli NJ, Rodriguez-Bigas MA (1998) *Clinicopathologic effects of cryotherapy on hepatic vessels and bile ducts in a porcine model*. Ann Surg Oncol;5(8):713-718
 80. Kahn ML, Zheng YW, Huang W, Bigornia V, Zeng D, Moff S, Farese R, Coughlin SR, Carmen T (1998) *A dual thrombin receptor system for platelet activation*. Nature;394:690-694
 81. Khan TA, Bianchi C, Voisine P, Sandmeyer J, Feng J, Sellke FW (2005) *Aprotinin inhibits protease-dependent platelet aggregation and thrombosis*. Ann Thorac Surg;79(5):1545-1550
 82. Kang HM, Kalnoski MH, Frederick M, Chandler WL (2005) *The kinetics of plasmin inhibition by aprotinin in vivo*. Thromb Res;115(4):327-340
 83. Kato A, Yoshidome H, Edwards MJ, Lentsch AB (2000) *Reduced hepatic ischemia/reperfusion injury by IL-4: potential anti-inflammatory role of STAT6*. Inflamm Res;49(6):275-279
 84. Kawasuji M, Ueyama K, Sakakibara N, Tedoriya T, Matsunaga Y, Misaki T, Watanabe Y (1993) *Effect of low-dose aprotinin on coagulation and fibrinolysis in cardiopulmonary bypass*. Ann Thorac Surg;55(5):1205-1209
 85. Kerr R, Newsome P, Germain L, Thomson E, Dawson P, Stirling D, Ludlam CA. (2003) *Effects of acute liver injury on blood coagulation*. J Thromb Haemost;1(4):754-759

-
86. Kim KU, Kwon OJ, Jue DM (1993) *Pro-tumour necrosis factor cleavage enzyme in macrophage membrane/particulate*. Immunology;80(1):134-139
 87. Kirchhofer D, Tschopp TB, Hadvary P, Baumgartner HR (1994) *Endothelial cells stimulated with tumor necrosis factor-alpha express varying amounts of tissue factor resulting in inhomogenous fibrin deposition in a native blood flow system. Effects of thrombin inhibitors*. J Clin Invest 93(5):2073-2083
 88. Kogel H, Grundmann R, Fohlmeister I, Pichlmaier H (1986) *Cryotherapy of rectal cancer. Immunologic results*. Zentralbl Chir;110(2-3):147-154
 89. Kollmar O, Richter S, Czyborra J, Menger MD, Dietrich S, Schilling MK, Kirsch CM, Pistorius GA (2004) *Aprotinin inhibits local platelet trapping and improves tissue destruction in hepatic cryosurgery*. Surgery;136(3):624-632
 90. Kollmar O, Richter S, Schilling MK, Menger MD, Pistorius GA (2004) *Advanced hepatic tissue destruction in ablative cryosurgery: potentials of intermittent freezing and selective vascular inflow occlusion*. Cryobiology;48(3):263-272
 91. Kratzer MA, Azad SC, Groh J, Welte M, Haller M, Pratschke E (1997) *Die Wirkung von Aprotinin. Blutverlust und Gerinnungsparameter bei orthotoper Lebertransplantation: Eine klinisch-experimentelle, prospektive und randomisierte Doppelblindstudie*. Anaesthesist;46:294-302
 92. Kraut H, Frey EK, Werle E. (1930) *Über die Inaktivierung des Kallikreins*. Z Physiol Chem;192:1-21
 93. Kubota S, Graham F, Crabo BG, Lillehei RC, Dietman RH (1976) *The effect of freeze rate, duration of phase transition, and warming rate on survival of frozen canine kidneys*. Cryobiology;13(4):455-462
 94. Kunitz M, Northrop J.H. (1936) *Isolation from beef pancreas of crystalline trypsinogen, trypsin, trypsin inhibitor, and an inhibitor trypsin compound*. J Gen Physiol;19: 991–1007.
 95. Kuszyk BS, Boitnott JK, Choti MA, Bluemke DA, Sheth S, Magee CA, Horton KM, Eng J, Fishman EK (2000) *Local Tumor Recurrence Following Hepatic Cryoablation: Radiologic-histopathologic Correlation in a Rabbit Model*. Radiology;217:477-486
 96. Landis CR, Dorian PhD, Haskard O, Taylor KM (2001) *New antiinflammatory and platelet-preserving effects of aprotinin*. Ann Thorac Surg.;72:1808-1813

-
97. Langley PG, Forbes A, Hughes RD, Williams R (1990) *Thrombin-antithrombin III complex in fulminant hepatic failure: evidence for disseminated intravascular coagulation and relationship to outcome*. Eur J Clin Invest;20(6):627-631
 98. Larsen (2002), *Anästhesie*, 7. Auflage, Urban und Schwarzenberg:62-63
 99. Laurel MT, Ratnoff OD, Everson B (1992) *Inhibition of the activation of Hageman factor (factor XII) by aprotinin (Trasylol)*. J Lab Clin Med;119(5):580-585
 100. Lazzara RR, Kidwell FE, Kraemer MF, Wood JA, Starr A (1997) *Reduction in costs, blood products, and operating time in patients undergoing open heart surgery*. Arch Surg;132(8):858-860
 101. Lee F, Chosy S, Littrup P, Warner T, Kuhlmann J, Mahvi D (1999) *Ct-monitored Percutaneous Cryoablation in a Pig Liver Model: Pilot Study*. Radiology;211: 687-92
 102. Lentschener C, Roche K, Ozier Y (2005) *A review of aprotinin in orthotopic liver transplantation: can its harmful effects offset its beneficial effects?* Anesth Analg;100(5):1248-1255
 103. Levi M, Ten Cate H (1999) *Disseminated intravascular coagulation* N Engl J Med;19;341(8):586-592
 104. Levi M, ten Cate H, van der Poll T (2002) *Endothelium: interface between coagulation and inflammation*. Crit Care Med;30(5 Suppl):220-224
 105. Mala T, Frich L, Aurdal L, Clausen OP, Edwin B, Soreide O, Gladhaug IP (2003) *Hepatic vascular inflow occlusion enhances tissue destruction during cryoablation of porcine liver*. J Surg Res;115(2):265-271
 106. Mala T, Edwin B, Tillung T, Kristian Hol P, Soreide O, Gladhaug I (2003) *Percutaneous cryoablation of colorectal liver metastases: potentiated by two consecutive freeze-thaw cycles*. Cryobiology;46(1):99-102
 107. Mannucci PM (1998) *Drug Therapy: Hemostatic Drugs*. New England Journal of Medicine;339(4):245-253
 108. Marcel RJ, Stegall WC, Suit CT, Arnold JC, Vera RL, Ramsay MA, O'Donnell MB, Swygert TH, Hein HA, Whitten CW (1996) *Continuous small-dose aprotinin controls fibrinolysis during orthotopic liver transplantation*. Anesth Analg;82(6):1122-1125
 109. Marsh NA, Francis JL (ed.), (1988) *The fibrinolytic enzyme system*. In: Francis JL, (ed.):*Fibrinogen, fibrin stabilisation, and fibrinolysis: clinical, biochemical, and laboratory aspects*. Chichester (England), Ellis Horwood Series in Biomedicine: Chap. 8, 223-236,

-
110. Martin C, Boisson C, Haccoun M, Thomachot L, Mege JL (1997) *Patterns of cytokine evolution (tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6) after septic shock, hemorrhagic shock, and severe trauma*. Crit Care Med;25(11):1813-1819
 111. Mazur P (1963) *Studies on rapidly frozen suspensions of yeast cells by differential thermal analysis and conductometry*. Biophys J;3:323-353
 112. Mazur P, Schmidt JJ (1968) *Interactions of cooling velocity, temperature, and warming velocity on the survival of frozen and thawed yeast*. Cryobiology;5(1):1-17
 113. Mazur P (1970) *Cryobiology: the freezing of biological systems*. Science;168(3934):939-949
 114. Mazur P (1977) *The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates*. Cryobiology;14(3):251-272
 115. Mazur P, Rall WF, Rigopoulos N (1981) *Relative contributions of the fraction of unfrozen water and of salt concentration to the survival of slowly frozen human erythrocytes*. Biophys J;36(3):653-675
 116. Mazur P (1984) *Freezing of living cells: mechanisms and implications*. AJP - Cell Physiology; 247(3) 125-142
 117. McCuskey RS (1986) *Microscopic methods for studying the microvasculature of internal organs*. Microcirculatory technology; Academic Press, Orlando:247-264
 118. Mojcić CF, Levy JH (2001) *Aprotinin and the systemic inflammatory response after cardiopulmonary bypass*. Ann Thorac Surg;71(2):745-754
 119. Mueller XM, Tevæarai HT, Jegger D, Tucker O, von Segesser LK (2001) *Are Standard Human Coagulation Tests Suitable in Pigs and Calves During Extracorporeal Circulation?* Artificial Organs;25:579-584
 120. National Cancer Institute NIH (2003) *Understanding the immune system: How it works*. Publication 03:5423 www.niaid.nih.gov/publications/immune/the_immune_system.pdf
 121. Neel HB, Ketcham AS, Hammond WG (1971) *Ischemia potentiating cryosurgery of primate liver*. Ann Surg;174(2):309-318
 122. Nickel R, Schummer A (2004) *Eingeweide. Lehrbuch der Anatomie der Haustiere 2*; Verlag Paul Parey, Berlin Hamburg :157-167
 123. Nishiwaki A, Ueda T, Ugawa S, Shimada S, Ogura Y (2003) *Upregulation of P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 after retinal ischemia-reperfusion injury*. Invest Ophthalmol Vis Sci;44(11):4931-4935

-
124. Noble KE, Harkness D, Yong KL (2000) *Interleukin 10 regulates cellular responses in monocyte/endothelial cell co-cultures*. Br J Haematol;108(3):497-504
 125. Ogawa S, Gerlach H, Esposito C, Pasagian-Macaulay A, Brett J, Stern D (1990) *Hypoxia modulates the barrier and coagulant function of cultured bovine endothelium. Increased monolayer permeability and induction of procoagulant properties*. J Clin Invest;85(4):1090-1098
 126. Onik G, Rubinsky B, Zemel R, Weaver L, Diamond D, Cobb C, Porterfield B (1991) *Ultrasound-guided hepatic cryosurgery in the treatment of metastatic colon carcinoma. Preliminary results*. Cancer;15;67(4):901-907
 127. Palabrica T, Lobb R, Furie BC, Aronovitz M, Benjamin C, Hsu YM, Sajer SA, Furie B (1992) *Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by P-selectin on adherent platelets*. Nature;29;359(6398):848-851
 128. Pegg DE (1987) *Mechanisms of freezing damage*. Symp Soc Exp Biol;41:363-378
 129. Pistorius GA, Alexander C, Krisch CM, Feifel G, Schilling MK, Menger MD (2005) *Local Platelet Trapping as the Cause of Thrombocytopenia after Hepatic Cryotherapy*. World Journal of Surgery; 29(5):657-660
 130. van der Poll T, Buller HR, ten Cate H, Wortel CH, Bauer KA, van Deventer SJ, Hack CE, Sauerwein HP, Rosenberg RD, ten Cate JW (1990) *Activation of coagulation after administration of tumor necrosis factor to normal subjects*. N Engl J Med;7;322(23):1622-1627
 131. van der Poll T, van Deventer SJ, Pasterkamp G, van Mourik JA, Buller HR, ten Cate JW (1992) *Tumor necrosis factor induces von Willebrand factor release in healthy humans*. Thromb Haemost;67(6):623-626
 132. van der Poll T, Levi M, van Deventer SJ, ten Cate H, Haagmans BL, Biemond BJ, Buller HR, Hack CE, ten Cate JW (1994) *Differential effects of anti-tumor necrosis factor monoclonal antibodies on systemic inflammatory responses in experimental endotoxemia in chimpanzees*. JW Blood;83(2):446-451
 133. van der Poll T, Jansen PM, Van Zee KJ, Welborn MB, de Jong I, Hack CE, Loetscher H, Lesslauer W, Lowry SF, Moldawer LL (1996) *Tumor necrosis factor-alpha induces activation of coagulation and fibrinolysis in baboons through an exclusive effect on the p55 receptor*. Blood;88(3):922-927

-
134. Poullis M, Manning R, Laffan M, Haskard DO, Taylor KM, Landis RC (2000) *The antithrombotic effect of aprotinin: actions mediated via the proteaseactivated receptor 1*. J Thorac Cardiovasc Surg;120(2):370-378
 135. Poullis M, Landis RC, Taylor KM (2001) *Aprotinin: is it prothrombotic?* Perfusion;16(5):401-409
 136. Pringle JH (1908) *Notes on the arrest of hepatic hemorrhage due to trauma*. Ann Surg;48:541
 137. Pruefer D, Makowski J, Dahm M, Guth S, Oelert H, Darius H, Buerke M. (2003) *Aprotinin inhibits leukocyte-endothelial cell interactions after hemorrhage and reperfusion*. Ann Thorac Surg;75(1):210-215
 138. Ramadori G, Armbrust T (2001) *Cytokines in the liver*. Eur J Gastroenterol Hepatol;13(7):777-784
 139. Ramani M, Ollivier V, Khechai F, Vu T, Ternisien C, Bridey F, de Prost D (1993) *Interleukin-10 inhibits endotoxin-induced tissue factor mRNA production by human monocytes*. FEBS Lett ;334(1):114-116
 140. Ranges GE, Figari IS, Espevik T, Palladino MA (1987) *Inhibition of cytotoxic T cell development by transforming growth factor beta and reversal by recombinant tumor necrosis factor alpha*. Jr J Exp Med;166(4):991-998
 141. Rake MO, Flute PT, Pannell G, Williams R (1970) *Intravascular coagulation in acute hepatic necrosis*. Lancet 14;1(7646):533-537
 142. Ravikumar TS, Buenaventure S, Salem, D'Andrea B (1994) *Intraoperative ultrasonography of liver: detection of occult liver tumors and treatment by cryosurgery*. Cancer Detect Prev;18:131-138
 143. Reddy KP, Ablin RJ (1979) *Immunologic and morphologic effects of cryosurgery of the monkey (macaque) prostate*. Res Exp Med. ;175(2):123-138
 144. Richter S, Pistorius G, Seidel R, Feifel G, Schilling MK, Vollmar B, Menger MD (2005). *Arteriolo-venular shunting critically determines shutdown of microcirculation upon cryotherapy in tumor-bearing rat liver*. Ann Surg Oncol;12(4):303-312
 145. Rivoire M, De Cian F, Meeus P, Gignoux B, Frering B, Kaemmerlen P (2000) *Cryosurgery as a means to improve surgical treatment of patients with multiple unresectable liver metastases*. Anticancer Res;20(5C):3785-3790
 146. Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, Heine UI, Liotta LA, Falanga V, Kehrl JH (1986) *Transforming growth factor type beta: rapid*

-
- induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro.* Proc Natl Acad Sci U S A;83(12):4167-4171
147. Royston BD, Royston D, Pearson JD (1992) *Aprotinin inhibits platelet adhesion to endothelial cells.* Blood Coagul Fibrinolysis;3(6):737-742
148. Rubinsky B, Lee CY, Bastacky J, Onik G (1990) *The process of freezing and the mechanism of damage during hepatic cryosurgery.* Cryobiology;27(1):85-97
149. Sallah S, Bobzien W (1999) *Bleeding problems in patients with liver disease Ways to manage the many hepatic effects on coagulation.* Postgraduate medicine;106(4):187-190, 193-195
150. Sarantou T, Bilchik A, Ramming KP (1998) *Complications of hepatic cryosurgery.* Semin Surg Oncol;14:156-162
151. Schlag PM, Benhidjeb T, Kilpert B (1999) *Prinzipien der kurativen Lebermetastasenresektion.* Der Chirurg;70:123-132
152. Schüder G, Vollmar B, Richter S, Pistorius G, Fehringer M, Feifel G, Menger MD (1999) *Epi-illumination fluorescent light microscopy for the in vivo study of rat hepatic microvascular response to cryothermia.* Hepatology;29(3):801-808
153. Schüder G, Pistorius G, Fehringer M, Feifel G, Menger MD, Vollmar B (2000) *Complete shutdown of microvascular perfusion upon hepatic cryothermia is critically dependent on local tissue temperature.* Br J Cancer;82(4):794-799
154. Schwarzmeier J D, Berger R, Shehata M, Hilgarth M *Zytokine*; www.haarzell-leukaemie.de/zytokine.htm
155. Seifert JK, Junginger T, Morris DL (1998) *Collective review of the world literature on hepatic cryotherapy.* J R Coll Surg Edinb;43(3):141-154
156. Seifert JK, Morris DL (1999) *Indicators of recurrence following cryotherapy for hepatic metastases from colorectal cancer.* Br J Surg;86(2):234-240
157. Seifert JK, Morris DL (1999) *World survey on the complications of hepatic and prostate cryotherapy.* World J Surg;23(2):109-113
158. Seifert JK, Stewart GJ, Hewitt PM, Bolton EJ, Junginger T, Morris DL (1999) *Interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha levels following hepatic cryotherapy: association with volume and duration of freezing.* World J Surg;23(10):1019-1026
159. Seifert JK, France MP, Jing Z, Bolton EJ, Findlay I, Junginger T, Morris DL (2002) *Large volume hepatic freezing: Association with significant release of the cytokines*

-
- interleukin-6 and tumor necrosis factor α in a rat model*. World journal of surgery;26(11):1333-1341
160. Shafir M, Shapiro R, Sung M, Warner R, Sicular A, Klipfel A (1996) *Cryoablation of unresectable malignant liver tumors*. Am J Surg;171(1):27-31
161. Shebuski RJ, Kilgore KJ (2002) *Role of Inflammatory Mediators in Thrombogenesis*. Pharmacology;300(3):729-735
162. Shorr AF, Thomas SJ, Alkins SA, Fitzpatrick TM, Ling GS (2002) *D-dimer Correlates With Proinflammatory Cytokine Levels and Outcomes in Critically Ill Patients*. Chest;121(4):1262-1268
163. Soeparwata R, Hartman AR, Frerichmann U, Stefano GB, Scheld HH, Bilfinger TV (1996) *Aprotinin diminishes inflammatory processes*. Int J Cardiol;26: 55-63
164. Smollich A, Michel G (1992) *Mikroskopische Anatomie der Haustiere*. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, 2. Auflage
165. Soultati A, Dourakis SP (2006) *Coagulation disorders in liver diseases*. Haema;9(1):31-44
166. Stanton HC, Mersmann HJ (1986) *Swine in cardiovascular research*. In: CRC Press, Boca Raton (Florida): Band 1 und 2
167. Stewart G, Preketes A, Horton M, Ross W, Morris D (1995) *Hepatic cryotherapy: double-freeze cycles achieve greater hepatocellular injury in man*. Cryobiology;32:215-219
168. Stouthard JM, Levi M, Hack CE, Veenhof CH, Romijn HA, Sauerwein HP, van der Poll T (1996) *Interleukin-6 stimulates coagulation, not fibrinolysis, in humans*. Thromb Haemost;76(5):738-742
169. Swindle MM (1992) *Swine as models in biomedical research*. In: Iowa State University Press, Ames (Iowa): 1-312
170. Swindle MM, Smith AC, Hepburn BJ (1988) *Swine as models in experimental surgery*. J. Invest Surg;1(1):65-79
171. Swindle MM, Smith AC, Laber Laird K, Dungan L (1994) *Swine in biomedical research: management and models*. Ilar News;36(1):361-365
172. Szabo G, Kodys K, Miller-Graziano CL (1991) *Elevated monocyte interleukin-6 (IL-6) production in immunosuppressed trauma patients. I. Role of Fc gamma RI cross-linking stimulation*. J Clin Immunol;11(6):326-335

-
173. Tacchini-Cottier F, Vesin C, Redard M, Buurman W, Piguet PF (1998) *Role of TNFR1 and TNFR2 in TNF-induced platelet consumption in mice*. J Immunol;160(12):6182-6166
 174. Taniguchi T, Koido Y, Aiboshi J, Yamashita T, Suzuki S, Kurokawa A (1999) *Change in the ratio of interleukin-6 to interleukin-10 predicts a poor outcome in patients with systemic inflammatory response syndrome*. Crit Care Med; 27(7):1262-1264
 175. Terregino CA, Lopez BL, Karras DJ, Killian AJ, Arnold GK (2000) *Endogenous mediators in emergency department patients with presumed sepsis: are levels associated with progression to severe sepsis and death?* Ann Emerg Med;35(1):26-34
 176. Thomas D (1994) *Venous thrombogenesis*. Br Med Bull;50(4):803-812
 177. Thompson WD, Campbell R, Evans T (1985) *Fibrin degradation and angiogenesis: quantitative analysis of the angiogenic response in the chick chorioallantoic membrane*. J Pathol;145(1):27-37
 178. Thompson WD, Harvey JA, Kazmi MA, Stout AJ (1991) *Fibrinolysis and angiogenesis in wound healing*. J Pathol;165(4):311-318
 179. Tilg H, Trehu E, Atkins MB, Dinarello CA, Mier JW (1994) *Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55*. Blood;1;83(1):113-118
 180. Todoroki H, Nakamura S, Higure A, Okamoto K, Takeda S, Nagata N, Itoh H, Ohsato K (2000) *Neutrophils express tissue factor in a monkey model of sepsis*. Surgery;127(2):209-211
 181. Tumbleson ME (1986) *Swine in biomedical research*. In: Plenum Press New York, Band 1: 1-468
 182. Urano M, Tanaka C, Sugiyama Y, Miya K, Saji S (2003) *Antitumor effects of residual tumor after cryoablation: the combined effect of residual tumor and a protein-bound polysaccharide on multiple liver metastases in a murine model*. Cryobiology;46(3):238-245
 183. te Velde AA, Huijbens RJ, Heije K, de Vries JE, Figdor CG (1990) *Interleukin-4 (IL-4) inhibits secretion of IL-1 beta, tumor necrosis factor alpha, and IL-6 by human monocytes*. Blood;76(7):1392-1397
 184. Velik-Salchner C, Schnurer C, Fries D, Mussigang PR, Moser PL, Streif W, Kolbitsch C, Lorenz ICH (2006) *Normal values for thrombelastography (ROTEM) and selected coagulation parameters in porcine blood*. Thromb Res;117(5):597-602

-
185. Volpert OV; Fong T; Koch AE; Peterson JD, Waltenbaugh C; Tepper RL; Bouck NP (1998) *Inhibition of Angiogenesis by Interleukin 4*. J Exp Med;188(6):1039-1046
 186. De Waal Malefyt R, Abrams J, Bennet B, Figdor CG, De Vries JE (1991) *Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes*. J Exp Med;174:1209-1220
 187. Wachtfogel YT, Kucich U, Hack CE, Glusko P, Niewiarowski S, Colman RW, Edmunds LH (1993) *Aprotinin inhibits the contact, neutrophil, and platelet activation systems during simulated extracorporeal perfusion*. J Thorac Cardiovasc Surg;106(1):1-9
 188. Wada H, Ohiwa M, Kaneko T, Tamaki S, Tanigawa M, Takagi M, Mori Y, Shirakawa S. (1991) *Plasma level of tumor necrosis factor in disseminated intravascular coagulation*. Am J Hematol;37(3):147-151
 189. Wahl SM, Hunt DA, Wong HL, Dougherty S, McCartney-Francis N, Wahl LM, Ellingsworth L, Schmidt JA, Hall G, Roberts AB (1988) *Transforming growth factor-beta is a potent immunosuppressive agent that inhibits IL-1-dependent lymphocyte proliferation*. J Immunol;140(9):3026-3032
 190. Weaver ML, Atkinson D, Zemel R (1995) *Hepatic cryosurgery in treating colorectal metastases*. Cancer;15;76(2):210-214
 191. Weaver ML, Ashton JG, Zemel R (1998) *Treatment of colorectal liver metastases by cryotherapy*. Semin Surg Onkol;14:163-170
 192. Weber SM, Lee FT Jr, Chinn DO, Warner T, Chosy SG, Mahvi DM (1997) *Perivascular and intralesional tissue necrosis after hepatic cryoablation: results in a porcine model*. Surgery;122(4):742-747
 193. Wei M, Kuukasjarvi P, Laurikka J, Pehkonen E, Kaukinen S, Laine S, Tarkka M (2001) *Pump prime aprotinin fails to limit proinflammatory cytokine release after coronary artery bypass surgery*. Scand Cardiovasc J;35(1):50-54
 194. Whitten CW, Latson TW, Allison PM, et al. (1992) *Does Aprotinin inhibit cardiopulmonary bypass-induced inflammation?* Anesthesiology;77:A266
 195. Wortha H.-P, Adams J (1992) *Die Rolle von Modellen in der Wissenschaft*. In: *Einführung in die medizinische Biometrie* (ed.: Adams, J.) , Gustav Fischer, Jena: 18-19

-
196. Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF, Achong MK (1998) *IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses*. J Clin Invest;15;101(2):311-320
 197. Yamada Y, Kirillova I, Peschon JJ, Fausto N (1997) *Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A;94(4):1441-1446
 198. Yang Z, Zingarelli B, Szabo C (2000) *Crucial role of endogenous interleukin-10 production in myocardial ischemia/reperfusion injury*. Circulation;101(9):1019-1026
 199. Yoshidome H, Kato A, Edwards MJ, Lentsch AB (1999) *Interleukin-10 suppresses hepatic ischemia/reperfusion injury in mice: implications of a central role for nuclear factor kappaB*. Hepatology;30(1):203-208
 200. Zalunardo MP (2003) *Anästhesiologisches Management bei Leberresektionen und Kryochirurgie der Leber*. Anästhesist;52:89-97
 201. Zappi E, Nemirovsky M, Shulman S (1974) *Cellular and humoral responses of autosensitized rabbits to a testis cryo-injury*. Immunology;26(3):477-488
 202. Zhou X, Tang Z, Yu Y, Weng J, Ma Z, Zhang B, Zheng Y (1993) *The role of cryosurgery in the treatment of hepatic cancer: a report of 113 cases*. J Cancer Res Clin Oncol;120:100-102.
 203. Zook N, Hussmann J, Brown R, Russell R, Kucan J, Roth A, Suchy H (1998) *Microcirculatory studies of frostbite injury*. Ann Plast Surg;40(3):246-253

8. Dank und Widmung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Michael D. Menger für die Übernahme der Betreuung dieser Arbeit, für die Beratung, und die Möglichkeit, an seinem Institut für Klinisch- Experimentelle Chirurgie den praktischen Teil dieser Arbeit durchzuführen. Ich danke auch Herrn Professor Dr. Georg Pistorius für die Überlassung des Themas.

Mein persönlich größter Dank gilt Herrn Dr. Sven Richter. Mit großer Geduld stand er mir stets mit Rat und Tat zur Seite. Des weiteren möchte ich Herrn PD Dr. Otto Kollmar danken, für seine Hilfe und die Möglichkeit an dieser Studie mitzuarbeiten. In diesem Rahmen bedanke ich mich auch herzlich bei Herrn Dr. Stefan Dietrich für die Vorarbeit, von der ich profitieren durfte. Danken möchte ich auch den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie. Mein besonderer Dank gilt Frau Janine Becker.

Ich bedanke mich auch bei meinem Freund Peter Altenkirch, seiner Mutter Frau Helga Altenkirch und Frau Brigitte Steinmann, die den Schreibfehlern, die sich eingeschlichen hatten, auf die Spur gekommen sind.

Zu guter Letzt möchte ich meinen Eltern danken, die mich stets unterstützt und immer wieder ermutigt haben, wenn es mal schwierig aussah. Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.

9. Lebenslauf

Lea Bracker

Raiffeisenstraße 4
67655 Kaiserslautern
0177-6772821
lea.bracker@gmx.de

Persönliche Daten

Geburtsdatum/ -ort 26.08.1980 in Rheine
Familienstand ledig
Konfession römisch katholisch

Ausbildung

06/ 2007 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
10/ 2000-06/ 2007 Medizinstudium an der **Universität des Saarlandes**
10/ 2002-07/ 2003 Studium an der **Università degli Studi Di Perugia, Italien**
09/ 2002 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Physikum),
1991-2000 Gymnasium Dionysianum, Rheine
1987-1991 Canisius Grundschule, Rheine

Praktisches Jahr

08/ 2005-07/ 2006

- **Chirurgie**, Kantonsspital Altdorf, Schweiz
- **Innere Medizin**, Pulmologische Klinik (2 Monate) und Internistische Notaufnahme (2 Monate), Universitätsklinikum des Saarlandes
- **Anästhesiologie**, Universitätsklinikum des Saarlandes

Berufliche Ausbildung

seit 08/ 2007

Assistenzärztin am Institut für Anästhesiologie und Notfallmedizin des
Westpfalzkrankums Kaiserslautern

10. Nachtrag

Donnerstag, 15. Mai 2008, Deutsches Ärzteblatt:

„BART-Studie publiziert: Endgültiges Ende von Trasylol®“



„Ottawa – Ein halbes Jahr nach der weltweiten Marktrücknahme des Antifibrinolytikums Aprotinin (Trasylol®) hat der Hersteller Bayer angekündigt, die letzten Vorräte von Kliniken und Apotheken zurückzunehmen. Damit erscheint eine Wiedereinführung des Medikamentes mehr als unwahrscheinlich. Anlass dürfte die zeitgleiche Publikation der Ergebnisse der BART-Studie im New England Journal Of Medicine (2008; doi: 10.1056/NEJMoa0802395) sein.

Der Blood Conservation using Antifibrinolytics in a Randomized Trial (BART) war eine der größten randomisierten klinischen Studien, die bisher in der Herzchirurgie durchgeführt wurden. An 19 Zentren in Kanada beteiligten sich mehr als 100 Herzchirurgen. 2.331 kardiochirurgische Patienten, bei denen ein erhöhtes Blutungsrisiko während der Operation bestand, wurden auf eine prophylaktische Therapie mit Aprotinin, Tranexamsäure oder Aminocaproinsäure randomisiert.

Ziel war die Vermeidung von schweren Blutungen während der Operation. Hierbei war Aprotinin den beiden anderen Antifibrinolytika überlegen. Massive Blutungskomplikationen traten nur bei 9,5 Prozent der Patienten auf, während die Rate unter Tranexamsäure und Aminocaproinsäure mit jeweils 12,1 Prozent deutlich höher war, auch wenn das relative Risiko (0,79; 95-Prozent-Konfidenzintervall 0,59 bis 1,05) das Signifikanzniveau verfehlte.

Gleichwohl wurde die Studie im Oktober letzten Jahres vorzeitig beendet. Allerdings nicht, weil Aprotinin sich (wie in früheren kleineren Studien und einer Meta-Analyse der Cochrane Collaboration) als der bessere Blutstiller erwiesen hatte.

Grund war die signifikant höhere Mortalität der Patienten unter Aprotinin: Nach 30 Tagen waren 6,0 Prozent der mit Trasylol® behandelten Patienten gestorben, gegenüber 3,9 Prozent im Tranexamsäure-Arm und 4,0 Prozent im Aminocaproinsäure-Arm. Die Gruppe um Paul Hébert vom Ottawa Health Research Institute errechnete ein um 53 Prozent signifikant erhöhtes Sterberisiko (relatives Risiko 1,53; 1,06 bis 2,22).

Eine Erklärung für dieses Paradox (höhere Sterblichkeit trotz weniger Blutungskomplikationen) fällt den Forschern noch immer schwer. In den Beobachtungsstudien, in denen 2006 – nach 13 Jahren erfolgreicher Vermarktung – zuerst der Verdacht auf eine Schädlichkeit von Aprotinin geäußert wurde, waren Patienten vermehrt an Nierenversagen erkrankt. In der BART-Studie konnte dies nicht verifiziert werden, auch wenn es unter Aprotinin häufiger als in den anderen Gruppen zu einem Anstieg der Kreatininwerte kam. Die Editorialisten Wayne Ray und Michael Stein von der Vanderbilt Universität in Nashville vermuten, dass die unspezifische Wirkung von Aprotinin dazu geführt haben könnte, dass nicht nur die fibrinolytischen Enzyme im Plasma gehemmt wurden, sondern auch andere verwandte Enzyme wie etwa das vasoaktive Kallikrein, was die häufigeren kardialen Komplikationen erklären könnte (NEJM 2008; doi: 10.1056/NEJMe0803514).

Die Studie zeigt nach Ansicht von Ray und Stein erneut, dass klinische Surrogate (und seien sie noch so plausibel) kein geeigneter Endpunkt für klinische Studien sind, in denen neben der Wirksamkeit auch immer die Sicherheit der Medikamente untersucht werden muss. Bei Aprotinin wurde es außerdem lange versäumt, die Wirkung mit der anderer verfügbarer Wirkstoffe zu vergleichen. © rme/aerzteblatt.de“

Mit der Rücknahme von Aprotinin vom weltweiten Markt könnte nun das Fazit gezogen werden, dass die Kernfrage dieser Arbeit im Nachhinein hinfällig geworden ist. Dennoch möchte ich betonen, dass mir durch die wissenschaftliche Arbeit zu diesem umfassenden Studienprojekt verschiedene Dinge deutlich geworden sind, wie die Erkenntnis, dass Forschung nicht einfachen Regeln folgt, dass viele wichtige Unterfaktoren zusammenspielen, die abgesehen von der Hauptfrage ebenfalls interessante Erkenntnisse erbringen, die aber auch zeigen, wie viele noch unerforschte oder kontrovers diskutierte Themen es auch heute noch gibt und wohl auch immer geben wird.

„Aber unsere Wirrnisse sind seit je ein Teil unserer Reichtümer gewesen, und wo wir vor ihrer Gewalt uns entsetzten, erschreckten wir doch nur vor ungeahnten Möglichkeiten und Spannungen unserer Kraft-; und das Chaos, wenn wir nur ein wenig Abstand davon gewinnen, erregt in uns sofort die Ahnung neuer Ordnungen und, sowie unser Mut an solchen Ahnungen nur im mindesten sich beteiligen mag, auch schon die Neugierde und die Lust, jenes noch unvorsehliche künftige Ordnen zu leisten.“

Rainer Maria Rilke (1922)

Ich bin dankbar, diese Studie gemacht haben zu dürfen.