

Universitätsspital Zürich
Institut für Anästhesiologie
Direktor: Prof. Dr. med. Donat R. Spahn

Arbeit unter der Leitung von PD Dr. med. M. Zaugg und Dr. med. J. Wacker

**Inhalation von 80% Sauerstoff bewirkt einen
thrombelastographisch nachweisbaren prokoagulatorischen
Effekt bei gesunden Probanden**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von
Christian Maurer
von Zürich

genehmigt auf Antrag von Prof. Dr. med. Donat R. Spahn
Zürich 2008

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	3
2. Einleitung	5
2.1. Sauerstoff und Sauerstoffradikale	6
2.2. Einfluss der ROS auf die Thrombozytenaktivierung	7
3. Fragestellung	9
4. Methoden.....	10
4.1. Probanden.....	10
4.2. Studienprotokoll.....	10
4.3. Thrombelastographie.....	12
4.3.1. Einführung.....	12
4.3.2. Durchführung der Thrombelastographie	13
4.4. Glukoseoxidase	14
4.5. H ₂ O ₂	14
4.6. Flowcytometrie	15
4.6.1. Einführung.....	15
4.6.2. Protokoll der Flowcytometrie.....	16
4.7. Statistische Analyse	17
5. Resultate	18
5.1. Probandendaten	18
5.2. Beatmungsparameter und Blutgasanalysen.....	18
5.3. Thrombelastographie Messungen	19
5.3.1. Zunahme der maximalen Amplitude (MA) nach 80% Sauerstoffinhalation ...	20
5.3.2. Keine Änderung bei R, G und TMA	21
5.4. Flowcytometrie	22
5.4.1. Messung der Oberflächenrezeptoren.....	22
5.4.2. Keine Änderung des Glutathion und der ROS in den Thrombozyten.....	22
6. Diskussion	23
7. Schlussfolgerung	27
8. Literaturverzeichnis.....	28
9. Danksagung.....	32
10. Curriculum vitae.....	33

1. Zusammenfassung

Peri- und postoperative thromboembolische Komplikationen wie Myokardinfarkt, ischämischer Insult, Lungenembolie und tiefe Venenthrombose sind von grosser klinischer Relevanz. Andererseits wird zur Verminderung ischämischer Komplikationen perioperativ häufig ein erhöhtes Sauerstoffangebot eingesetzt. Es mehren sich jedoch die Hinweise, dass eine erhöhte inspiratorische Sauerstofffraktion (FiO_2) durch die Bildung von Sauerstoffradikalen (ROS, reactive oxygen species) auch nachteilige Auswirkungen haben kann, z.B. auf die Thrombozytenaktivierung, auf die Gewebsoxygenation und auf die Inzidenz perioperativer Wundinfektionen. Bereits länger bekannt sind die schädlichen Auswirkungen anhaltend hoher FiO_2 auf die Lunge (Tracheobronchitis, ARDS) und auf das Auge von Frühgeborenen (retrolentale Fibroplasie).

In einer früheren Studie unserer Forschungsgruppe über den Effekt von Sevofluran auf die schädliche Granulozyten-Thrombozyten Aggregation stellten wir in der Thrombelastographie einen prokoagulatorischen Effekt einer einstündigen Inhalation mit 50% Sauerstoff fest.

Es stellt sich die Frage, wie die kontrollierte Inhalation von 80% Sauerstoff versus Raumluft, appliziert während einer Stunde, die thrombelastographisch gemessene Gerinnungsfunktion beeinflusst.

Unsere aktuelle Studie wurde mit 10 Probanden im Cross-over Design durchgeführt und die einstündige Inhalation wurde unter kontrollierten Bedingungen mit einem Anästhesierespirator über eine CPAP-Maske (Continuous Positive Airway Pressure) im druckunterstützten Beatmungsmodus durchgeführt. Die Probanden wurden mittels EKG, nicht invasiver Blutdruckmessung und Pulsoxymetrie überwacht. Die Blutproben für die Thrombelastographie und die Flowcytometrie wurden vor, unmittelbar nach der einstündigen Inhalation und 24 Stunden danach entnommen.

Der primär untersuchte Parameter in der Thrombelastographie war die maximale Amplitude (MA) als Mass für die Gerinnselfestigkeit. Nach einer Stunde Inhalation von 80% Sauerstoff kam es zu einer signifikanten Zunahme der MA ($P = 0.043$) gegenüber Raumluftinhalation (21% Sauerstoff).

Zusätzlich stimulierten wir in zwei in vitro Versuchen Blutproben von Probanden direkt mit dem ROS produzierenden Enzym Glukoseoxidase und eine Blutprobe von einem Probanden mit H_2O_2 , was trotz hoher Konzentrationen keinen messbaren Einfluss auf die Thrombelastographie hatte.

In der Flowcytometrie untersuchten wir die Expression von Oberflächproteinen (CD41a, CD 62P, CD 162, CD 54), welche für die Thrombozytenaktivierung relevant sind. Trotz Stimulation der Thrombozyten mit ADP, Arachidonsäure, TRAP-6 (thrombin-receptor-agonist-peptide-6) und f-MLP (N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine) konnten wir in der Flowcytometrie keinen Unterschied zwischen der Inhalation von 21% versus 80% Sauerstoff messen.

Unser Ergebnis, nämlich eine Zunahme der MA in der Thrombelastographie, und unsere Annahme, dass Hyperoxie zu einer vermehrten ROS-Bildung mit konsekutiver Thrombozytenaktivierung führt, stehen im Einklang mit Resultaten früherer Studien.

Die Beobachtung der Zunahme der MA nach einer Stunde 80% Sauerstoffinhalation stellt einen bemerkenswerten Befund dar. Unter 80% Sauerstoffinhalation nimmt die ROS-Bildung in Abhängigkeit zur Expositionszeit zu und eine erhöhte Konzentration an ROS führt in vitro zu einer Zunahme der MA, was, wie in einer früheren Studie nachgewiesen, postoperativ mit einer erhöhten Inzidenz an Myokardinfarkten und tiefen Venenthrombosen korreliert.

Obschon einer erhöhten inspiratorischen Sauerstoffkonzentration zur Vermeidung hypoxischer Zustände in vielen Situationen eine entscheidende Bedeutung zukommt, sollte eine Reduktion der FiO_2 geprüft werden, falls die Patienten keine Anzeichen für eine Gewebsminderperfusion und Hypoxie haben.

Weitere Untersuchungen sollten die mögliche Gerinnungsaktivierung durch Hyperoxämie in grösseren Studien mit Patienten prüfen. Zusätzliche experimentelle in vitro und in vivo Studien sollten helfen, die zugrunde liegenden Mechanismen aufzuklären.

2. Einleitung

Peri- und postoperative thromboembolische Komplikationen wie Myokardinfarkt, ischämischer Insult, Lungenembolie und tiefe Venenthrombose sind häufig, verlängern den Spitalaufenthalt und erhöhen die Gesundheitskosten (1). Andererseits wird zur Verminderung ischämischer Komplikationen perioperativ häufig ein erhöhtes Sauerstoffangebot eingesetzt (z.B. Beatmung mit erhöhter Sauerstofffraktion FiO_2 oder Sauerstoff per Gesichtsmaske). Allerdings mehren sich nun vor allem tierexperimentell gewonnene Hinweise dafür, dass eine erhöhte FiO_2 mit konsekutiver Hyperoxämie auch Nachteile in vieler Hinsicht haben kann. Kontrovers diskutiert wird zum Beispiel, ob eine erhöhte FiO_2 die Inzidenz postoperativer Wundinfektionen senkt oder erhöht. Greif et al. (2) beobachteten eine um 6% geringere Inzidenz postoperativer Wundinfektionen unter 80% Sauerstoffinhalation im Vergleich zu 30% während der Operation und zwei Stunden danach. Pryor et al. (3) hingegen fanden unter den gleichen Bedingungen eine um gut 14% erhöhte Inzidenz nach Inhalation von 80% Sauerstoff. Ebenso kontrovers diskutiert wird die Applikation höherer FiO_2 bei der Reanimation von Neugeborenen (4), da eine $\text{FiO}_2 > 60\%$ als unabhängiger Prädiktor für einen fatalen Verlauf identifiziert wurde (5). Weiter kann eine Langzeittherapie mit Sauerstoff bei Frühgeborenen zur retrolentalen Fibroplasie führen (6). Es ist schon länger bekannt, dass hohe Sauerstoffkonzentrationen unter bestimmten Umständen lungenschädigende Wirkungen entfalten können. Bei Erwachsenen kann eine länger applizierte hohe FiO_2 zu Tracheobronchitis bis hin zu einem ARDS (Adult Respiratory Distress Syndrom) führen (6). Schädigungen der verbleibenden Lungenanteile nach Lungenresektionen und Pneumonektomie wurden neben anderen Risikofaktoren auch mit der Höhe der verwendeten FiO_2 in Zusammenhang gebracht (7). Bei Lungentransplantationen wurde im weiteren postuliert dass eine Reventilation des Transplantates mit höherer FiO_2 den Ischämie-Reperfusionsschaden verstärken kann, weshalb empfohlen wurde die Beatmung frisch transplantierte Lungen mit möglichst tiefer FiO_2 vorzunehmen (8). Lungenschädigungen wurden ferner auch beschrieben, wenn unter Therapie mit verschiedenen Medikamenten (z.B. Bleomycin (9), Amiodaron (10)) hohe FiO_2 zur Beatmung verwendet wurden. Eine hohe FiO_2 kann auch unerwartete zirkulatorische respektive mikrozirkulatorische Auswirkungen haben. So nahm die mittels Mikroelektroden gemessene Gewebsoxygenation in Muskelgewebe bei Zunahme des arteriellen Sauerstoffpartialdrucks ab, ein Effekt der auch bei Perfusion mittels Herz-Lungen-Maschine bei herzchirurgischen Patienten nachgewiesen wurde (11). Eine

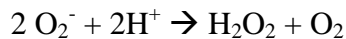
andere Studie konnte keinen klinischen Vorteil einer erhöhten FiO_2 (PaO_2 300-350mmHg) an der Herz-Lungen-Maschine gegenüber Normoxie finden (12).

Möglicherweise tragen verschiedene Mechanismen zu solchen schädigenden Wirkungen von Sauerstoff an unterschiedlichen Organsystemen bei. Eine gemeinsame Grundlage könnten dabei allerdings Einflüsse auf die mikrozirkulatorische Gewebsversorgung darstellen. Falls eine relevante Auswirkung von erhöhter Sauerstoffzufuhr und infolgedessen hoher Sauerstoffpartialdrucke auf die Interaktion von Blutbestandteilen (insbesondere Thrombozyten) und Gefäßendothel besteht, könnte damit ein Teil der oben beschriebenen negativen Effekte erklärt werden. Eine prokoagulatorische Wirkung erhöhter Sauerstoffkonzentrationen auf Thrombozyten wurde tierexperimentell beobachtet. Entsprechende Untersuchungen am Menschen jedoch fehlen unseres Wissens bisher (13, 14). In einer früheren Cross-over Probandenstudie unserer Forschungsgruppe über den Effekt von Sevofluran auf die schädliche Granulozyten-Thrombozyten-Aggregation inhalierten in der Kontrollgruppe 10 Probanden für 1 Stunde 50% Sauerstoff, worauf die Gerinnung sofort und nach einer Kontrollblutentnahme nach 24 Stunden in der Thrombelastographie (TEG[®]) untersucht wurde (15). Dabei war in der Thrombelastographie nach 24 Stunden ein prokoagulatorischer Effekt nachweisbar. Dieser prokoagulatorische Effekt trat in der Kontrollgruppe auf und war nicht als primärer Endpunkt definiert. Deshalb gingen wir in der vorliegenden Arbeit der Frage nach, ob Sauerstoffinhalation die Gerinnung thrombelastographisch nachweisbar beeinflussen kann. Dabei wollten wir auch mögliche zugrunde liegende Mechanismen untersuchen. Die applizierte FiO_2 von 80% entsprach dabei einer klinisch häufig eingesetzten FiO_2 ; die Thrombelastographie stellt ferner ein einfaches, klinisch rasch verfügbares Verfahren zur globalen Beurteilung der Gerinnung dar (16).

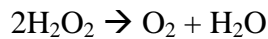
2.1. Sauerstoff und Sauerstoffradikale

Sauerstoff ist für alle aeroben Organismen lebenswichtig und dennoch ist bekannt, dass ein zu hoher Sauerstoffpartialdruck zu irreversiblen Schädigungen der Lunge und anderer Gewebe führen kann (17). Durch das erhöhte Sauerstoffangebot entstehen in den Mitochondrien als Nebenprodukt der oxidativen Phosphorylierung auch vermehrt Sauerstoffradikale, so genannte ROS (reactive oxygen species), zum Beispiel Superoxid (O_2^-), Hydroxyl (OH^\cdot) oder Wasserstoffperoxid (H_2O_2), das selbst zu Superoxid und Hydroxyl zerfallen kann (18), (19). Diese reaktiven Radikale sind in der Lage, Lipide zu oxidieren, Enzyme zu aktivieren oder zu deaktivieren, und DNA und RNA zu beschädigen (20). Für den Abbau der schädlichen ROS sind Zellen mit verschiedenen, vor allem intrazellulären antioxidativen Enzymen ausgestattet.

Die Superoxiddismutase (SOD) katalysiert die Reaktion von Superoxid (O_2^-) zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Sauerstoff (18):



Die Katalase bildet aus H_2O_2 Wasser und Sauerstoff (21):



Zusätzlich bauen nicht-enzymatische, exogen zugeführte antioxidative Stoffe wie Vitamin C und A Sauerstoffradikale ab. Der grösste Teil des H_2O_2 wird jedoch durch die Glutathion-Peroxidase zu Wasser reduziert, wobei reduziertes monomeres Glutathion (GSH) zu oxidiertem dimerem Glutathion (GSSG) wird:



Das Hydroxyl-Radikal spielt eine untergeordnete Rolle, da seine Halbwertszeit nur wenige Mikrosekunden beträgt und die Diffusionsstrecke nicht grösser ist als 10 nm. Wegen seiner negativen Ladung und der Konversion zu H_2O_2 kann auch das Superoxidradikal keinen grösseren Effekt über den Entstehungsort hinaus ausüben. H_2O_2 dagegen kann über grössere Strecken diffundieren, vor allem wenn die Kapazität der abbauenden Enzyme nicht ausreicht und dadurch die Konzentration der ROS steigt (18), (22).

Es gibt jedoch immer mehr Hinweise, dass die ROS nicht nur schädliche Nebenprodukte der oxidativen Phosphorylierung sind, sondern in geringer Konzentration auch als Teil der intrazellulären Signaltransduktion wirken (23). So führen Wachstumsfaktoren und Zytokine über spezifische Rezeptoren zu intrazellulärer Bildung von ROS in nicht phagozytierenden Zellen und beeinflussen dadurch unter anderem das Wachstum und die Differenzierung von Zellen (24). Wichtig ist auch die Abtötung von phagozytierten Bakterien durch ROS aus Granulozyten.

2.2. Einfluss der ROS auf die Thrombozytenaktivierung

Der Einfluss der ROS auf die Thrombozytenaktivierung wird nicht einheitlich beurteilt. Da es bisher nicht möglich war, die Gerinnung in vivo gezielt mit ROS zu stimulieren, wurden die meisten Studien in vitro durchgeführt. Die gewählten Versuchsanordnungen sind so vielfältig wie die Meinungen, die es zum Effekt von ROS auf die Thrombozytenaktivierung gibt. Handin et al. (25) und Iuliano et al. (26) stellten in vitro eine Zunahme der Thrombozytenaggregation durch Superoxydradikale (produziert durch Xanthinoxidase) fest.

Zum Effekt von H₂O₂ finden sich widersprüchliche Angaben in der Literatur. Stuart et al. (27) und Ambrosio et al. (20) beobachteten aggregometrisch eine Abnahme der Thrombozytenaggregation in vitro nach Stimulation mit H₂O₂ (5-600 µM). In der Aggregometrie wird die mit fortschreitender Thrombozytenaggregation zunehmende Lichtdurchlässigkeit einer Probe gemessen. Ohyashiki et al. (28) konnten einen inhibitorischen Effekt von H₂O₂ erst nach einer Stimulation mit unphysiologisch hohen Konzentrationen von 2-10 mM H₂O₂ feststellen (26). Andererseits finden sich auch mehrere Hinweise, dass H₂O₂ eine bestehende Stimulation verstärken kann. So berichten Pratico et al. (29), Iuliano et al. (26) und Del Principe et al. (30) über eine verstärkte Thrombozytenaggregation durch H₂O₂ bei zuvor mit Kollagen, AA oder Latexpartikeln stimulierten Thrombozyten.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in vitro die Thrombozytenaktivierung durch die alleinige Stimulation mit H₂O₂ abnimmt. H₂O₂ steigert jedoch die Thrombozytenaktivierung in Kombination mit anderen Stimulatoren wie Kollagen, ADP oder Latexpartikeln. Eine Ausnahme bildet hier einzig die Studie von Canoso et al.: Platelet-Rich-Plasma (PRP) wurde erst mit H₂O₂ (200 µM) und später mit ADP stimuliert, worauf die Thrombozytenaggregation abnahm.

In einem in vivo Modell mit Ratten konnten Barazzzone et al. (13) eine vermehrte Thrombozytenaktivierung in der Flowcytometrie nach 96 Stunden Sauerstoffinhalation (100%) nachweisen. Es kam dabei zu einer Überexpression von Oberflächenadhäsionsmolekülen wie CD11a auf Thrombozyten. Postma et al. (14) untersuchten den Outcome bei Reanimation von neugeborenen hypoxischen Schweinchen mit 18%, 21% und 100% Sauerstoff. Dabei stellten sie aggregometrisch eine vorübergehende Aktivierung der Thrombozyten bei Reanimation mit 100%, nicht aber mit 18% oder 21% Sauerstoff fest. Hinweise auf eine prokoagulatorische Wirkung von Sauerstoff fanden auch Wacker et al. (15). 10 Probanden inhalierten während 1 Stunde 50% Sauerstoff und in der 24 Stunden später durchgeführten Thrombelastographie (TEG[®]) war ein signifikanter Anstieg der Maximalen Amplitude (MA) zu verzeichnen. Andere Studien haben eine Korrelation der MA mit der Inzidenz postoperativer thromboembolischer Komplikationen gefunden (1). Interessant sind auch die Hinweise auf einen prokoagulatorischen Effekt von oxidiertem Fibrinogen (31).

3. Fragestellung und Hypothesen

Wie beeinflusst die kontrollierte Inhalation von 80% Sauerstoff versus Raumluft, appliziert während 1 Stunde, die thrombelastographisch gemessene Gerinnungsfunktion? Aus dieser Fragestellung ergeben sich folgende Sub-Hypothesen:

1. Die Inhalation von 80% Sauerstoff führt in der Thrombelastographie zu einer nachweisbaren Veränderung der maximalen Amplitude (MA), der Zeit bis zum Erreichen der MA (TMA), des R- und G-Parameter.
2. Die exogene Zugabe von Glukoseoxidase und H_2O_2 zu Vollblut führt zu einer nachweisbaren Veränderung der maximalen Amplitude (MA), der Zeit bis zum Erreichen der MA (TMA), des R- und G-Parameter und könnte so den Effekt durch einen ROS-vermittelten Mechanismus erklären.
3. 80% Sauerstoffinhalation führt in der Flowcytometrie zu einer Änderung der Expression von Oberflächenproteinen (CD 41a, CD 62P, CD 162, CD 54), welche für die Thrombozytenaktivierung relevant sind.

4. Methoden

4.1. Probanden

Die Studie wurde von der zuständigen Ethikkommission bewilligt und alle Probanden gaben ihre schriftliche Einwilligung. Eingeschlossen wurden nicht rauchende Männer im Alter von 25 bis 45 Jahren, welche 48 Stunden vor der Studienteilnahme bis zum Ende der Studie auf die Einnahme von koffeinhaltigen Getränken und schwarzer Schokolade verzichteten (32), (33).

4.2. Studienprotokoll

Die Studie wurde in einem Cross-over Design durchgeführt, wodurch sich die interindividuellen Unterschiede minimieren lassen. Jeder Proband durchlief die beiden Studienschlenkel mit einem Abstand von mindestens 48h Stunden, wobei zuerst der Kontrollschlenkel mit Raumluft durchgeführt wurde, um eine Beeinflussung des Kontrollschenkels durch die Sauerstoffinhalation im Interventionsschlenkel zu vermeiden. Im Kontrollschlenkel wurde Raumluft (21% Sauerstoff) inhaliert und am folgenden Tag fand eine Kontrollblutentnahme statt. Im Sauerstoffschenkel wurde 80% Sauerstoff inhaliert und am folgenden Tag fand eine Kontrollblutentnahme statt (vgl. Abb. 1). Am liegenden Patienten wurde am Vorderarm eine intravenöse Kanüle (G18 oder G20) gelegt, über welche die Blutentnahmen durchgeführt wurden. Das Blut wurde anstatt mit einem Vacuumsystem vorsichtig von Hand in Spritzen aspiriert, um eine Thrombozytenaktivierung durch Turbulenzen zu vermeiden. Zur Bestimmung der Ausgangswerte (Baseline-Werte) wurden initial 3ml Blut entnommen und verworfen, dann 4.5ml Blut für eine Blutbildbestimmung (Hb, Lc, Tc) in EDTA-Röhrchen gefüllt. Weiter wurden für die Thrombelastographie (TEG[®]) und Bestimmung des Fibrinogens je 4.5ml Blut in ein Citratröhrchen sowie für flowcytometrische Bestimmungen 10ml in ein Heparinröhrchen gegeben. Das Röhrchen für die Flowcytometrie wurde umgehend verarbeitet. Nach den Baseline-Blutentnahmen wurde für die Zeit bis zur Blutentnahme am Ende der einstündigen Inhalation eine 100ml NaCl-Lösung über die Venenkanüle langsam infundiert.

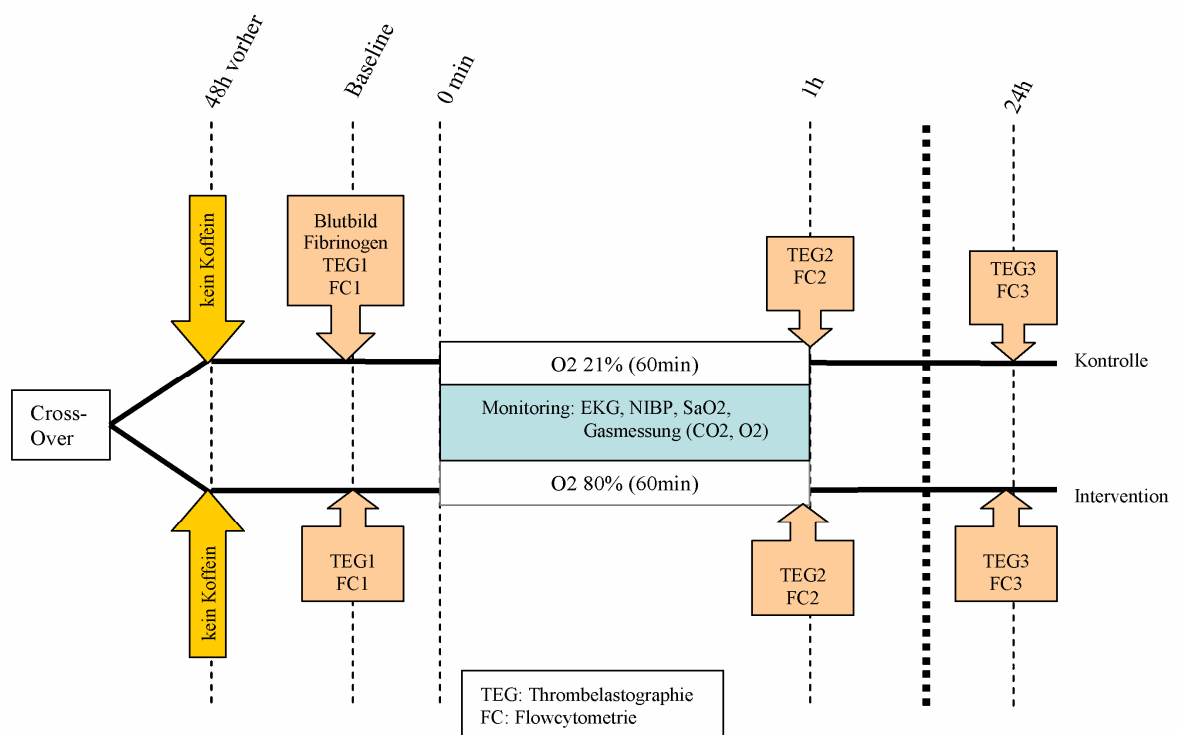


Abb. 1. Flussdiagramm des Studienprotokolls: Beim Cross-over Design durchläuft jeder Proband beide Studienschkel. Zu erst den Kontrollschkel (C) mit Raumluft und mit mindestens 48 Stunden Abstand den Interventionsschkel mit 80% Sauerstoff.

Die Inhalation wurde unter kontrollierten Bedingungen mit einem Anästhesierespirator (Siemens Servo 900 Ventilator, Siemens Life Support Systems, Sona, Sweden) über eine CPAP-Maske (Continuous Positive Airway Pressure) im druckunterstützten Beatmungsmodus durchgeführt. Die Einstellungen der Beatmungsparameter wurden dem bestmöglichen subjektiven Komfort des Probanden bei gleichzeitig dichtsitzender Maske angepasst (Trigger zwischen -2 und 0 mbar unter PEEP, Druckunterstützung zwischen 4 und 8 mbar, PEEP 0 mbar). Dies entspricht einer minimal druckunterstützten Atmung zum Ausgleich der Widerstände in den Beatmungsschläuchen. Der Proband wurde während der ganzen Zeit mit EKG, einer nicht-invasiven Blutdruckmessung am Oberarm und einer Pulsoximetrie überwacht. Die Atemgas-Messung (Draeger Infinity Delta XL, MultiGas Scio-Modul, Draeger Medical Systems, Danvers, MA) von endtidalem O₂ wurde paramagnetisch gemessen. Dabei macht man sich zu Nutzen, dass Sauerstoff durch seine zwei ungepaarten Elektronen in der äussersten Elektronenhülle paramagnetische Eigenschaften besitzt und so im Gegensatz zu Stickstoff in einem Magnetfeld abgelenkt wird, was registriert werden kann. Der Messung von CO₂ liegt die Tatsache zu Grunde, dass es proportional zum Partialdruck Infrarotstrahlung einer bestimmten Wellenlänge absorbiert (34). Die Genauigkeit der Messung liegt für CO₂ bei ± 0.5 Vol % und für O₂ bei ± 3 Vol %.

Beendigung der einstündigen Inhalation wurden über die liegende Venenkanüle folgende Blutentnahmen durchgeführt: 3ml Blut wurden zu Beginn verworfen, 4.5ml für TEG[®] und 10ml für flowcytometrische Bestimmungen. 24 Stunden später erfolgte eine Kontrollblutentnahme mit 5ml Spritzen über eine kubitale Venenkanüle (G18 oder G20). Zu Beginn wurden 3ml Blut verworfen, dann 4.5ml für TEG[®] und 10ml für flowcytometrische Bestimmungen abgenommen. Das Röhrchen für die Flowcytometrie wurde umgehend verarbeitet.

Zur direkten thrombelastographischen Untersuchung des Effektes von Sauerstoffradikalen (reactive oxygen species, ROS) auf die Gerinnung wurde zusätzlich bei zwei Probanden Vollblut mit Glukoseoxidase und bei einem Proband Vollblut direkt mit Wasserstoffperoxid (H₂O₂) inkubiert.

Zur Bestimmung der arteriellen Sauerstoffspannung wurden bei drei Probanden je zwei arterielle Blutgasanalysen durchgeführt, einmal während 80% Sauerstoffinhalation und einmal nach mindestens 30 Minuten Raumlufteinhalation.

4.3. Thrombelastographie

4.3.1. Einführung

Die Thrombelastographie ermöglicht eine globale Beurteilung der Hämostase, da sie die Interaktion zwischen Thrombozyten und plasmatischer Gerinnung bis hin zur Fibrinvernetzung wiedergibt. Klinisch wird die Thrombelastographie neben vielen anderen Bereichen in der Herz- und Leberchirurgie verwendet, um den Einsatz von Blutersatzmitteln zu optimieren. Zusätzlich wird sie jedoch auch als Screeningverfahren für hyperkoagulable Gerinnungsstörungen eingesetzt (35).

Die Thrombelastographie (z.B. TEG[®]) misst die physikalischen Eigenschaften des Gerinnsels dadurch, dass das Blut in ein sich drehendes Gefäß („Cup“) (6 U/min) gegeben wird, worin ein Stift („Pin“) eingetaucht wird, der mit einem Transducer verbunden ist. Die fortschreitende Gerinnung mit Vernetzung von Fibrin und Thrombozyten im Cup führt zu einer zunehmenden Verbindung zwischen Cup und Pin. Die Stärke der Vernetzung beeinflusst die Übertragung der Rotation vom Cup auf den Pin, was durch den Transducer gemessen und in ein elektrisches Signal umgewandelt wird. Diese wird computerunterstützt wiedergegeben (vgl. Abb. 2).

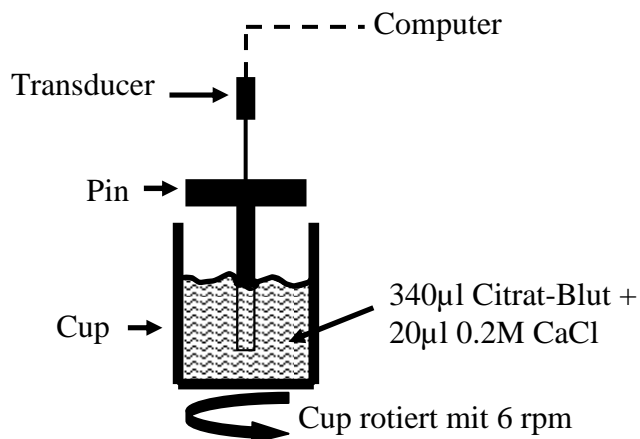


Abb. 2. Thrombelastographie: die Rotation des Cup wird mit fortschreitender Gerinnung auf den Pin und auf den Transducer übertragen, wo es in ein elektrisches Signal umgewandelt wird.

Aus der Kurve kann die Zeit bis zum Beginn der Fibrinvernetzung (R) in Minuten, die Geschwindigkeit der Gerinnelbildung (Winkel α) in Grad, der G-Parameter als Mass für die Elastizität des Gerinnsels in d/cm^2 ($1\text{d} = 1\text{Dyne} = 1\mu\text{N}$) und die maximale Amplitude (MA) in Millimeter als Mass für die maximale Gerinnselfestigkeit sowie andere Parameter abgelesen werden (vgl. Abb. 3). Die MA ist zu 80% von der Thrombozytenfunktion abhängig (36).

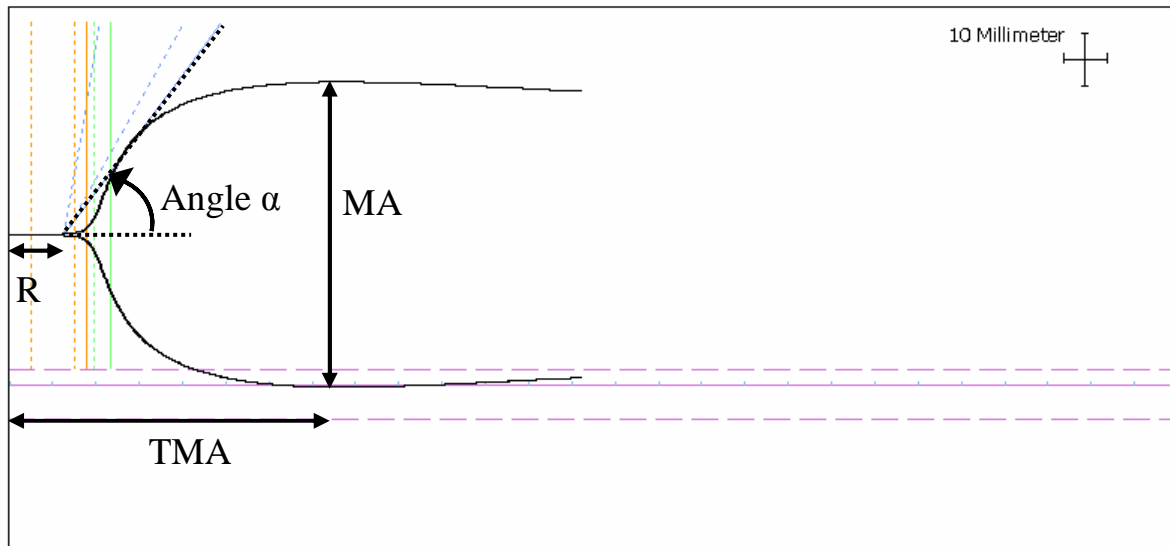


Abb. 3. Musterkurve einer Thrombelastographie: Zeit bis zum Beginn der Fibrinvernetzung (R) Norm 2-8min, Geschwindigkeit der Gerinnelbildung (Winkel α) Norm 55-78°, Mass für die Elastizität des Gerinnsels (G) Norm $4.6-10.9 \times 10^3 \text{d}/\text{cm}^2$ (nicht dargestellt), maximale Amplitude (MA) Norm 51-69mm.

4.3.2. Durchführung der Thrombelastographie

Einmal täglich vor der ersten Messung wurden die Thrombelastographen mit einem elektronischen Test und zwei verschiedenen biologischen Testsubstanzen („Level I oder II“)

überprüft, wobei die Werte immer innerhalb der vorgeschriebenen Referenzbereiche lagen. Thrombelastographien wurden in beiden Studienschenkeln jeweils vor Protokollbeginn („Baseline“), nach einer Stunde Inhalation und nach 24 Stunden parallel auf zwei Kanälen durchgeführt. Das Verwenden von zwei parallelen Kanälen bietet eine zusätzliche Qualitätskontrolle durch das Vergleichen der beiden Kurven. Nach Verwerfen von 3 ml Blut wurden mit einer 5ml Spritze 4.5ml Blut über die Venenkanüle entnommen und in ein Citratröhrchen gegeben, 5 Mal invertiert und für 75 Minuten stengelassen (37). Danach wurde das Röhrchen 5 Mal invertiert. 1ml Citratblut wurde in ein Kaolinröhrchen gegeben und erneut 5 Mal invertiert. Davon wurden 340µl in den Cup pipettiert, dem zuvor 20µl 0.2M CaCl₂ beigegeben worden waren und dann sorgfältig vermischt. Darauf wurde die Thrombelastographie gestartet und frühestens nach einer Stunde gestoppt.

4.4. Glukoseoxidase

Glukoseoxidase katalysiert die Oxidation von D-Glukose zu Glukonsäure und H₂O₂ (38). Sie kommt natürlicherweise in einigen Pilzen (*aspergillus niger*) und Insekten vor, wo H₂O₂ bakterizid und fungizid wirkt. Um den direkten Effekt des Sauerstoffradikals H₂O₂ auf die Thrombozytenaggregation in der TEG[®] zu untersuchen, wurden zwei Probanden je viermal 4.5ml Vollblut mit einer 5ml Plastikspritze entnommen, in ein Citratröhrchen gegeben und fünfmal invertiert (20). Daraus wurden je 3ml verworfen. Anschliessend wurden zur Kontrolle je 15µl PBS Pufferlösung (Phosphate buffered saline) und in die restlichen 3 Röhrchen je 15µl Glukoseoxidase in den Konzentrationen 3mU, 30mU, 300mU (nur bei Proband G2) und 3000mU (nur bei Proband G1) zugegeben. Nach einer Stunde Inkubation wurde die Thrombelastographie, wie bereits oben beschrieben, gestartet. Die Blutglukosewerte lagen bei beiden Probanden bei 5.4mmol/l.

4.5. H₂O₂

Von einem weiteren Probanden wurden vier mal 4.5ml Vollblut mit einer 5ml Plastikspritze entnommen, in ein Citratröhrchen gegeben und 5 Mal invertiert. Daraus wurden 3ml verworfen. Nach einer Stunde wurde zur Kontrolle 15µl reines Wasser und in die restlichen 3 Röhrchen je 15µl einer 1µM, 10µM und 100µM H₂O₂-Lösung gegeben, während 10 Minuten inkubiert und die Thrombelastographie gestartet. Der gleiche Versuch wurde mit hohen Konzentrationen (10, 100 und 1000µM) und einer längeren Inkubation von 1 Stunde wiederholt (21).

4.6. Flowcytometrie

4.6.1. Einführung

In einem Flowcytometer werden Zellen in einer Lösung durch eine Kapillare einzeln an einem Laserstrahl vorbeigeleitet. Die dadurch entstehende Lichtreduktion, -streuung und Fluoreszenz wird mittels verschiedener Detektoren registriert, in elektrische Signale umgewandelt und mit einem Computer verarbeitet. Das Mass der Lichtreduktion und Streuung ist abhängig von der Form, der Grösse und anderen spezifischen Merkmalen der Zelle. Weiter kann der Flowzytometer wellenlängenabhängig die Intensität emittierter Fluoreszenzen registrieren, zum Beispiel von fluoreszierenden Antikörpern. Auf diese Weise können Zellen registriert werden, an deren Oberflächenproteinen (z.B. CD, Cluster of Differentiation, Rezeptoren) spezifische fluoreszierende Antikörper haften.

Die zu untersuchenden Blutproben wurden vor der Behandlung (Baseline), eine Stunde nach 80% Sauerstoff- oder Raumluftinhalation und genau 24 Stunden später entnommen und sofort verarbeitet. Wir untersuchten die Expression mehrerer Oberflächenproteine auf Thrombozyten nach Aktivierung mit den Agonisten Arachidonsäure (AA), Adenosindiphosphat (ADP), TRAP-6 (thrombin-receptor-agonist-peptide-6) und f-MLP (N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine). AA ist ein Vorläufer von Thromboxan A₂, welches von aktivierten Thrombozyten gebildet wird und die Thrombozytenaktivierung weiter fördert. ADP bindet an den P2Y₁₂ Rezeptor, ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor auf der Thrombozytenoberfläche, welcher ebenfalls die Thrombozyten aktiviert. TRAP-6 bindet an den Thrombinrezeptor und aktiviert auf diese Weise die Thrombozyten. f-MLP ist ein synthetisches Peptid, das bakterielle Oberflächenproteine imitiert und so eine vermehrte Leukozyten-Thrombozyten Aggregation induziert (39).

Wir untersuchten die folgenden Oberflächenproteine:

- GPIIb/IIIa (CD 41a) ist ein thrombozytenspezifischer Oberflächenmarker. Seine Aktivierung durch Fibrinogen und den Von-Willebrand-Faktor (vWF) führt zur Thrombozytenaggregation.
- P-Selectin (CD 62P) wird auf der Oberfläche von aktivierten Thrombozyten exprimiert und vermittelt die Interaktion zwischen aktivierten Thrombozyten und Leukozyten. (40).
- PSGL-1 (CD 162) ist ein Glykoprotein, welches auf Leukozyten und Endothelzellen gefunden wird und mit dem P-Selectin auf Thrombozyten bindet.

- ICAM-1 (intercellular-adhesion-molecule-1, CD 54) wird auf Leukozyten, Endothelzellen und Thrombozyten exprimiert. Es vermittelt den interzellulären Kontakt und die Auswanderung ins Gewebe.

Zum Nachweis von ROS (reactive oxygen species) in den Thrombozyten wurde der fluoreszierende Farbstoff 2'-7'-dichlorofluoreszin (DCF, Sigma) verwendet.

Glutathion (GSH) ist ein Antioxidans, welches durch ROS oxidiert wird und somit Sauerstoffradikale abbauen kann. GSH wurde mit Mercury-Orange [1-(4-chloromercury-phenyl-azo-2-naphthol), Sigma] markiert und gemessen.

4.6.2. Protokoll der Flowcytometrie

Je 1ml heparinisieretes Vollblut wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur folgendermassen inkubiert:

- Mediumkontrolle (unstimuliert)
- AA 30µM (Cayman Chemical Co.)
- ADP 1.0µM (Sigma)
- TRAP-6 6.0µM (Bachem)
- f-MLP 1.0µM (Sigma)

Zur anschliessenden Färbung wurden von jedem Ansatz je 50µl Vollblut mit den folgenden Antikörper-Lösungen (alle mit dem Farbstoff Phycoerythrin, PE markiert) gemischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert:

- neg-PE 3µl
- CD 62P 3µl
- CD 41a 3µl
- ICAM-1 3µl
- PSGL-1 3µl

Danach wurden die Erythrozyten mit 450µl FACS-Lysing Solution für 20 Minuten bei Raumtemperatur lysiert, anschliessend 500µl Paraformaldehyd 0.2% beigegeben und für weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschliessend wurden die Zellen 10 Minuten bei 4°C und 2000 rpm zentrifugiert und das Sediment (Pellets) in 500µl PBS Puffer (Phosphate buffered saline, ohne Ca/Mg mit 2,5% fötalem Kälberserum (FCS)) aufgenommen. Anschliessend wurden die Zellen im Flowzytometer (FACS) gemessen.

Das GSH und die ROS wurden in den mit Medium, ADP und mit f-MLP stimuliertem Blut untersucht. Zunächst wurde dem Blut (100µl) nach Stimulation 900µl FACS Lysing Solution zugeben, 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschliessend zentrifugiert (10 Minuten bei 4°C und 2000 rpm) und das Zellsediment in 100µl PBS aufgenommen.

Für die Bestimmung von GSH wurden den 100µl Blut 10µL der in Aceton vorverdünnten Mercury Orange Lösung zugegeben und die Mischung während 3 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt, anschliessend 10 Minuten bei 4°C und 2000 rpm zentrifugiert (gewaschen) und in 100µl PBS aufgenommen. Danach wurden 100µl Paraformaldehyd 0.2% zugegeben, für 30 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt, zentrifugiert, in PBS-Pufferlösung aufgenommen und im Flowzytometer gemessen.

Zur Bestimmung der ROS wurden die in 100µl PBS aufgenommenen Zellen mit 1µL DCF (1:100) für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurden 100µl Paraformaldehyd zugegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt, zentrifugiert, in PBS-Pufferlösung aufgenommen und die Fluoreszenz im FACS gemessen.

4.7. Statistische Analyse

Die Daten wurden mit Sigmastat ausgewertet und als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) dargestellt. Zum Vergleich der Kontrollgruppe (Raumluft) mit der Interventionsgruppe (80% Sauerstoff) wurde der Zweistichproben t-Test bei abhängigen Stichproben (Paarvergleichstest) verwendet. $P < 0.05$ wurde als signifikant erachtet.

5. Resultate

5.1. Probandendaten

Alle 10 in die Studie eingeschlossenen Probanden waren gesunde männliche Nichtraucher im Alter von 25 bis 43 Jahren, welche vor Studienbeginn während 48 Stunden auf Koffeineinnahme und schwarze Schokolade verzichteten (vgl. Tab. 1)

Tab. 1. Probandendaten

Alter (Jahre)	BMI (kg/m ²)	Hämoglobin (g/dl)	Thrombozyten (103/μl)	Fibrinogen (g/L)	Leukozyten (10 ³ /μl)
30.7 ± 5.6	23.5 ± 1.6	14.1 ± 0.8	225.1 ± 33.4	2.4 ± 0.4	5.0 ± 0.6

Daten als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben; n = 10.

5.2. Beatmungsparameter und Blutgasanalysen

Während der Beatmung mit der CPAP-Maske lagen alle gemessenen Vitalparameter im physiologischen Bereich. Die inspiratorische Sauerstofffraktion (FiO₂) lag im Kontrollschenkel bei 21 ± 0 % und im Sauerstoffschenkel bei 85 ± 3 % zu Beginn und bei 84 ± 2 % nach 30 Minuten (vgl. Tab. 2).

Tab. 2. Hämodynamik und Beatmung

		SBP (mmHg)	HR (bpm)	Atemfrequenz (/min)	FiO ₂ (%)	FeO ₂ (%)	SpO ₂ (%)	ETCO ₂ (kPa)
Kontrolle (Raumluft)	Baseline	120 ± 8	63 ± 9	9 ± 2	21 ± 0	15 ± 1	99 ± 1	5.0 ± 0.7
	30 min	117 ± 10	59 ± 7	7 ± 3	21 ± 0	15 ± 1	97 ± 1	5.2 ± 0.7
80% Sauerstoff	Baseline	118 ± 6	60 ± 8	10 ± 2	85 ± 3	76 ± 3	99 ± 1	5.0 ± 0.7
	30 min	117 ± 4	57 ± 7	11 ± 4	84 ± 2	77 ± 2	99 ± 1	4.8 ± 0.8

Daten als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben, Messfrequenz alle 10 Minuten, SBP (systolischer Blutdruck), HR (Herzfrequenz), FiO₂ (inspiratorische Sauerstofffraktion), FeO₂ (expiratorische Sauerstofffraktion), SpO₂ (Sauerstoffsättigung), ETCO₂ (endtidales CO₂); n = 10.

Zur Bestimmung der effektiven arteriellen Sauerstoffspannung wurde während Raumluft- und nach mindestens 30min Sauerstoffinhalation je eine arterielle Blutgasanalyse durchgeführt (vgl. Tab. 3).

Tab. 3. arterielle Blutgasanalyse (aBGA)

		sO ₂ (%)	PaO ₂ (kPa)	PaCO ₂ (kPa)	pH
Kontrolle (Raumluft)	Baseline	96.57 ± 1.31	10.37 ± 1.2	5.24 ± 1.14	7.41 ± 0.02
80% Sauerstoff	≥30min	100 ± 0	62.83 ± 3.17	4.87 ± 0.75	7.45 ± 0.05

Daten als Mittelwert ± Standardabweichung, sO₂ (Sauerstoffsättigung), PaO₂ (Sauerstoffpartialdruck), PaCO₂ (Kohlendioxidpartialdruck); n = 3.

Daraus ist ersichtlich, dass der PaO₂ unter minimal druckunterstützter Atmung mit einer dichten CPAP-Maske und einer FiO₂ von 80% (85 ± 3) um einen Faktor sechs auf 62.83 kPa gesteigert werden kann.

5.3. Thrombelastographie Messungen

Für unsere Fragestellung waren die folgenden Parameter der Thrombelastographie interessant: die maximale Amplitude (MA) als Mass für die maximale Gerinnselfestigkeit, die Zeit bis zum Erreichen der MA (Time to MA, TMA), der G-Parameter als Mass für die Elastizität des Gerinnsels und die Zeit bis zum Beginn der Fibrinvernetzung (R).

Es wurde immer das Verhältnis („Ratio“) der MA 80% Sauerstoffschenkel (O₂) zu Raumluftschenkel (Air) gebildet und zwar zum Ausgangszeitpunkt („Baseline“), nach 1 und nach 24 Stunden Inhalation (vgl. Tab. 4).

Tab. 4. Mittelwerte der Ratios 80% Sauerstoff/Raumluft

Messzeitpunkt	MA (mm)		R (min)		TMA (min)		G (d/sc)	
	MW ± SD	P	MW ± SD	P	MW ± SD	P	MW ± SD	P
BL	0.99 ± 0.08		0.99 ± 0.16		0.99 ± 0.06		0.98 ± 0.19	
1h	1.02 ± 0.1	0.043*	0.91 ± 0.16	0.105	0.97 ± 0.07	0.354	1.07 ± 0.25	0.071
24h	1.01 ± 0.07	0.497	1.02 ± 0.29	0.705	1.02 ± 0.15	0.599	1.03 ± 0.18	0.504

Es wurde jeweils zu Messbeginn (Baseline, BL), nach der Stunde Inhalation (80% Sauerstoff oder Raumluft) und nach 24 Stunden eine Blutprobe für die Thrombelastographie entnommen und verarbeitet. Dargestellt sind die Verhältnisse der einzelnen Parameter vom Interventionsschenkel (80% Sauerstoff) zum Kontrollschenkel (Raumluft) zu den jeweiligen Zeitpunkten als MW (Mittelwerte) ± SD (Standardabweichung). * es ist eine signifikante (P = 0.043) Erhöhung der MA nach einer Stunde im Vergleich zu Baseline feststellbar. Alle anderen Parameter zeigten zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Veränderung.

5.3.1. Zunahme der maximalen Amplitude (MA) nach 80% Sauerstoffinhalation

Nach einer Stunde Inhalation von 80% Sauerstoff kam es zu einer signifikanten Zunahme der MA (P = 0.043) gegenüber der Raumluftinhalation. Sieben Probanden zeigten eine relative Zunahme der MA, drei eine relative Abnahme. Die Veränderung bei den sieben Probanden mit Anstieg der MA betrug im Mittel 5.5% (SD ± 3.8). Am grössten war die Zunahme bei Proband S3 mit 12.8%, am geringsten bei Proband S4 mit 1.7%. Die Abnahme bei drei Probanden betrug im Mittel 1.1% (SD ± 0.6%) (vgl. Tab. 5).

In der Kontrollblutentnahme nach 24 Stunden konnte kein signifikanter Effekt auf die MA mehr nachgewiesen werden (vgl. Tab. 4 und Abb. 4).

Tab. 5. Änderung der Ratio MA (80% O₂)/(Raumluft) nach 1h gegenüber dem Ausgangswert

Total		Zunahmen		Abnahmen	
Proband		Proband		Proband	
S1	0.077	S1	0.077		
S2	0.052	S2	0.052		
S3	0.128	S3	0.128		
S4	0.017	S4	0.017		
S5	0.041	S5	0.041		
S6	-0.015			S6	-0.015
S7	-0.015			S7	-0.015
S8	0.050	S8	0.050		
S9	-0.004			S9	-0.004
S10	0.020	S10	0.020		
MW	0.035	MW	0.055	MW	-0.011
SD	0.045	SD	0.038	SD	0.006

Mittelwerte (MW) der Zunahme der MA 3.5% (SD ± 4.4). Unter den Probanden mit einer Zunahme der MA beträgt der MW 5.5% (SD ± 3.8), die maximale Zunahme bei 12.8%, die minimale Zunahme bei 1.7%. Unter den Probanden mit einer Abnahme der MA beträgt der MW 1.1% (SD ± 0.6), die maximale Abnahme 1.5%, die minimale 0.4%.

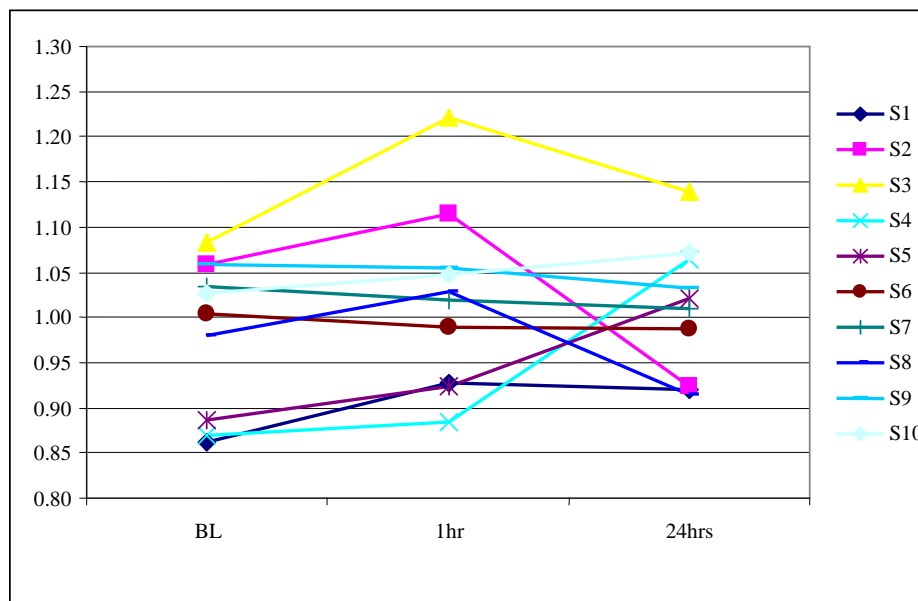


Abb. 4. Ratio MA (80% O₂)/(Raumluft): Probanden 1-10 (S1-S10); die MA nimmt nach 1 Stunde Sauerstoffinhalation gegenüber den Ausgangswerten signifikant (P = 0.04) zu. 24 Stunden nach der Inhalation ist kein signifikanter Effekt auf die MA messbar. BL = Baseline.

5.3.2. Keine Änderung bei R, G und TMA

Die anderen untersuchten Parameter wie R und TMA zeigten keine konsistenten Veränderungen unter 80% Sauerstoffinhalation, weder nach einer noch nach 24 Stunden. Beim G-Parameter ist jedoch eine nicht signifikante (P = 0.071) Tendenz zur Zunahme nach

einer Stunde zu beobachten. Als einfaches in vitro Modell für den Effekt von höheren Konzentrationen von ROS im Blut, stimulierten wir zwei Proben Vollblut wie oben beschrieben mit dem Enzym Glukoseoxidase, welches durch Glukoseabbau H_2O_2 produziert. Die exogene Zufuhr von Glukoseoxidase sowie auch die direkte Zufuhr von H_2O_2 zeigten trotz verlängerter Inkubationszeit und hohen Konzentrationen keinen messbaren Einfluss auf die Thrombelastographie.

5.4. Flowcytometrie

5.4.1. Messung der Oberflächenrezeptoren

Um eine Änderung der Aktivierbarkeit der Thrombozyten nachzuweisen, bestimmten wir die Expression bestimmter für die Thrombozytenaggregation relevanter Oberflächenproteine. Die Thrombozyten wurden mit den Stimulatoren AA, ADP, TRAP-6 und f-MLP inkubiert und es konnte trotz der Stimulation bei keinem der gemessenen Oberflächenproteine (CD41a, CD62P, ICAM-1, PSGL-1) zu keinem Messzeitpunkt eine signifikante Änderung der Expression festgestellt werden.

5.4.2. Keine Änderung des Glutathion und der ROS in den Thrombozyten

Der Gehalt an antioxidativem Glutathion wurde durch die Markierung mit Mercury-Orange in der Flowcytometrie gemessen. Es konnte kein Unterschied in Abhängigkeit von der inhalierten Sauerstoffkonzentration nachgewiesen werden. Die Menge an produzierten ROS wurde durch Markierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff DCF im Flowzytometer gemessen. Es konnte kein Unterschied der ROS Konzentration in den Thrombozyten in Abhängigkeit von der inhalierten Sauerstoffkonzentration gezeigt werden.

6. Diskussion

Die vorliegende Studie im Cross-over Design mit 10 jungen, gesunden männlichen Probanden zeigt, dass eine ventilatorassistierte druckunterstützte Inhalation von 80% Sauerstoff während einer Stunde im Vergleich zu Raumluft nach einer Stunde zu einer signifikanten Zunahme (3.5%, SD \pm 4.4, P = 0.04) der maximalen Amplitude in der Thrombelastographie führt. Bei sieben Probanden nahm die MA im Mittel um 5.5% (SD \pm 3.8) zu und bei drei Probanden nahm die MA um 1.1% (SD \pm 0.6) ab. Die arterielle Sauerstoffspannung war mit 80% Sauerstoffinhalation sechs mal höher (62.83 \pm 3.17 kPa) als unter Raumluftinhalation (10.37 \pm 1.2 kPa).

Die in einer früheren Studie unserer Forschungsgruppe gemessene relative Zunahme der MA um 4.5% bei 50% Sauerstoffinhalation nach 24 Stunden konnten wir nicht bestätigen (15). Die unterschiedliche Wirkung von 50% gegenüber 80% Sauerstoffinhalation könnte auf einer nicht linearen Dosis-Wirkungskurve beruhen. Es ist denkbar, dass 50% Sauerstoffinhalation nach mehreren Stunden zu einer Änderung der Genexpression mit anschließender Veränderung der Proteinexpression verschiedener am Sauerstoffmetabolismus beteiligter Enzyme wie Superoxiddismutase oder Katalase führen könnte. Der in der jetzigen Studie nachgewiesene Effekt nach einer Stunde scheint dagegen eher eine direkte Wirkung des Sauerstoffs auf die ROS produzierenden Enzyme zu sein.

Flowcytometrisch zeigte sich nach Sauerstoffinhalation keine Änderung der Expression von Oberflächenproteinen der Thrombozyten, auch nicht nach Stimulation mit AA, ADP, TRAP-6 und f-MLP.

Zusätzlich untersuchten wir in zwei einfachen in vitro Modellen den direkten Effekt von Sauerstoffradikalen auf die Thrombelastographie. Wir stimulierten das Blut mit dem H₂O₂ produzierenden Enzym Glukoseoxidase, was trotz aufsteigender Konzentrationen und verlängerter Inkubationszeit zu keiner Veränderung in der Thrombelastographie führte. Auch die direkte Zugabe von H₂O₂ in grossen Konzentrationen führte zu keiner Veränderung der Thrombelastographie.

Dass Sauerstoff in höheren Konzentrationen einen Effekt auf die Gerinnung haben kann, wurde jedoch schon früher in tierexperimentellen Studien gezeigt. So führen 72 Stunden Exposition mit reinem Sauerstoff tierexperimentell zu einer Thrombozytenaktivierung (13) und die Reanimation hypoxischer Schweinchen mit 100% Sauerstoff induziert eine vermehrte Thrombozytenaktivierung, gemessen als erhöhter Thromboxan B₂ Spiegel, was bei Reanimation mit 21% Sauerstoffbeatmung nicht beobachtet wurde (4).

Mit unserem Ergebnis, nämlich einer Zunahme der MA in der Thrombelastographie, und der Annahme, dass Hyperoxie zu einer vermehrten ROS-Bildung mit konsekutiver Thrombozytenaktivierung führt, stehen die Resultate früherer Studien im Einklang: Brueckel et al. (41) konnten in einem Tiermodell mit Ratten zeigen, dass bereits weniger als 30 Minuten Inhalation von 70% Sauerstoff zur Bildung von ROS führt und diese mit der Expositionszeit ansteigen. Dass ROS in vitro Thrombozyten aktivieren, zeigten Pratico et al. (29), Iuliano et al. (26) und Del Principe et al. (30).

Unsere Studie zeigt nun zum ersten Mal mit einem gut abgestützten Studiendesign, dass 80% Sauerstoff im gesunden Menschen (in vivo) einen prokoagulatorischen Effekt hat. Die Tatsache, dass wir in unserer Studie die ROS-Bildung nicht direkt nachweisen konnten liegt wohl daran, dass ROS in vivo äusserst schnell abgebaut werden und das Gewebe und insbesondere das Blut nachgewiesenermassen eine ausgeprägte Pufferkapazität besitzen.

Der fehlende Effekt von exogen zugeführtem H_2O_2 oder von H_2O_2 produzierenden Enzymen wie Glukoseoxidase könnte schliesslich darauf zurückzuführen sein, dass die Thrombelastographie weniger sensitiv ist auf exogen zugeführte ROS als auf endogen produzierte ROS. Im Gegensatz zur früher häufig verwendeten Aggregometrie, wird bei der Thrombelastographie Vollblut mit einer grossen ROS Pufferkapazität und nicht ein Thrombozytenkonzentrat verwendet. Dadurch wird in der Thrombelastographie die komplette Gerinnung untersucht, das heisst Thrombozyten inklusive aller plasmatischer Gerinnungsfaktoren. Das in der Thrombelastographie verwendete Vollblut verfügt klar über die grössere Pufferkapazität als reine Thrombozytenkonzentrate. Die zugegebenen ROS werden gepuffert und können so keinen Effekt auf die Gerinnung mehr entfalten.

Unsere vorliegenden Ergebnisse müssen allerdings mit Vorsicht interpretiert werden, da die gemessenen Effekte im Bereich der in der Literatur erwähnten Variationsbreiten der Thrombelastographie mit Zitratblut und Kaolin von 3.5-6% (42, 43) liegen. Dennoch konnten wir mit dem Cross-over Design der Studie einen signifikanten Unterschied zwischen 21% und 80% Sauerstoffinhalation nachweisen. Obwohl dieses Design die interindividuelle Variabilität und den Einfluss von Störvariablen minimiert, kann nicht sicher ausgeschlossen werden, dass geringe Unterschiede zum Beispiel in der Ernährung, der physischen Aktivität oder dem Gesundheitszustand einen Einfluss auf die Thrombelastographie haben könnten, insbesondere bei einer kleinen Probandenzahl. Die Beurteilung und vollständige Kontrolle aller exogenen Faktoren mit Einfluss auf die Gerinnung ist praktisch aber unmöglich (44). Das Studienprotokoll könnte hingegen so angepasst werden, dass der Kontrollschenkel vor dem Interventionsschenkel am gleichen Tag durchgeführt wird, womit der unterschiedliche

Einfluss exogener Faktoren wie die Ernährung zu verschiedenen Zeitpunkten minimiert würde. Weitere Messfehler wegen einer artifiziellen Aktivierung oder Inaktivierung der Thrombozyten durch die Blutentnahme, durch das Pipettieren oder durch die Aufbewahrung des Vollblutes in einem Citratröhrchen mit anschliessender Rekalzifizierung müssen ebenfalls als potentielle Fehlerquelle erwähnt werden. Das Risiko einer Beeinflussung der Resultate durch die Rekalzifizierung könnte mit der Verwendung einer nativen Thrombelastographie unmittelbar nach der Blutentnahme minimiert werden. Zusammenfassend darf man jedoch feststellen, dass das verwendete Cross-over Design uns erlaubt hat, die interindividuellen Unterschiede zu minimieren und durch den Verzicht auf Koffein und dunkle Schokolade während der Studie wenigstens zwei wichtige Ernährungsfaktoren kontrolliert wurden (32), (33).

Unsere Studie zeigt auch, dass die Thrombelastographie als globale Gerinnungsanalyse und wegen ihrer einfachen Verfügbarkeit und klinischer Relevanz eine interessante Methode für in vivo Experimente zur Erfassung der Koagulation darstellt.

Die in der Einleitung erwähnte Häufigkeit und Bedeutung von peri- und postoperativen thromboembolischen Komplikationen wie Myokardinfarkt, ischaemischer Insult, Lungenembolie und tiefer Venenthrombose sind vor allem in einer polymorbiden, älteren Patientenpopulation von Bedeutung. Unsere Daten aus einer homogen jungen, gesunden Probandenstichprobe erlauben daher keine uneingeschränkten Rückschlüsse auf das Sauerstoffmanagement solcher Patienten. Allerdings sind gerade diese älteren multimorbiden Patienten besonders durch einer Zunahme der Thrombozytenadhäsion gefährdet. Eine vermehrte Thrombozytenaktivität spielt in der Pathophysiologie der Plaqueinstabilität im ganzen Gefässbaum eine herausragende Rolle und nicht zuletzt leiden viele ältere Patienten, die zu operativen Eingriffen kommen, an einer ausgeprägten Arteriosklerose (45). Die Arteriosklerose manifestiert sich häufig als akutes Koronarsyndrom, bei welchem zur Minimierung der kardialen Hypoxie standardmässig hohe Sauerstoffkonzentrationen verabreicht werden. Eine zusätzliche Aktivierung der Thrombozyten durch hohe Sauerstoffkonzentrationen wäre in diesem Zusammenhang schädigend.

Die Beobachtung der Zunahme der MA nach einer Stunde 80% Sauerstoffinhalation stellt deshalb einen bemerkenswerten Befund dar. Unter 80% Sauerstoffinhalation nimmt die ROS-Bildung in Abhängigkeit zur Expositionszeit zu (41). Erhöhte Konzentrationen an ROS führen in vitro zu einer Zunahme der MA (26, 29, 30), und eine Zunahme der postoperativ gemessenen MA > 68 mm korreliert mit einer höheren postoperativen Inzidenz an Myokardinfarkten und tiefen Venenthrombosen (1). Möglicherweise korreliert bereits ein

geringerer Anstieg der MA durch einen Synergismus von hoher FiO₂ und anderen prothrombotischen Faktoren mit einer erhöhten Inzidenz an thromboembolischen Komplikationen.

7. Schlussfolgerung

Unsere methodisch einwandfreie Studie (Cross-over Design) dokumentiert einen thrombelastographisch nachweisbaren prokoagulatorischen Effekt nach einstündiger Inhalation von 80% Sauerstoff bei jungen gesunden männlichen Probanden. Einer erhöhten inspiratorischen Sauerstoffkonzentration zur Vermeidung lokaler oder generalisierter hypoxischer Zustände kommt in vielen klinischen Situationen eine wichtige Bedeutung zu. Falls Patienten jedoch keine Anzeichen für eine Gewebsminderperfusion und Hypoxie haben, sollte eine Reduktion der FiO_2 geprüft werden. Weitere Untersuchungen sollten die mögliche Gerinnungsaktivierung durch Hyperoxämie in grösseren Studien mit Patienten prüfen. Zusätzliche experimentelle in vitro und in vivo Studien sollten die zugrunde liegenden Mechanismen aufklären helfen.

8. Literaturverzeichnis

1. McCrath DJ, Cerboni E, Frumento RJ, Hirsh AL, Bennett-Guerrero E. Thromboelastography maximum amplitude predicts postoperative thrombotic complications including myocardial infarction. *Anesthesia and analgesia*. 2005 Jun;100(6):1576-83.
2. Greif R, Akca O, Horn EP, Kurz A, Sessler DI. Supplemental perioperative oxygen to reduce the incidence of surgical-wound infection. Outcomes Research Group. *The New England journal of medicine*. 2000 Jan 20;342(3):161-7.
3. Pryor KO, Fahey TJ, 3rd, Lien CA, Goldstein PA. Surgical site infection and the routine use of perioperative hyperoxia in a general surgical population: a randomized controlled trial. *Jama*. 2004 Jan 7;291(1):79-87.
4. Cheung PY, Stevens JP, Haase E, Stang L, Bigam DL, Etches W, et al. Platelet dysfunction in asphyxiated newborn piglets resuscitated with 21% and 100% oxygen. *Pediatric research*. 2006 May;59(5):636-40.
5. Mathur NB, Garg P, Mishra TK. Predictors of fatality in neonates requiring mechanical ventilation. *Indian pediatrics*. 2005 Jul;42(7):645-51.
6. Marroni A, Oriani, G., Longoni, C. Pulmonary Effects. *Handbook on Hyperbaric Medicine: Oriani, Marroni, Wattel; 1996. p. 75-80.*
7. Grocott HP. Oxygen toxicity during one-lung ventilation: is it time to re-evaluate our practice? *Anesthesiology clinics*. 2008 Jun;26(2):273-80, v.
8. Lohser J. Evidence-based management of one-lung ventilation. *Anesthesiology clinics*. 2008 Jun;26(2):241-72, v.
9. Gilson AJ, Sahn SA. Reactivation of bleomycin lung toxicity following oxygen administration. A second response to corticosteroids. *Chest*. 1985 Aug;88(2):304-6.
10. Donaldson L, Grant IS, Naysmith MR, Thomas JS. Acute amiodarone-induced lung toxicity. *Intensive care medicine*. 1998 Jun;24(6):626-30.
11. Joachimsson PO, Sjoberg F, Forsman M, Johansson M, Ahn HC, Rutberg H. Adverse effects of hyperoxemia during cardiopulmonary bypass. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 1996 Sep;112(3):812-9.
12. Brown DM, Holt DW, Edwards JT, Burnett RJ, 3rd. Normoxia vs. hyperoxia: impact of oxygen tension strategies on outcomes for patients receiving cardiopulmonary bypass for routine cardiac surgical repair. *The Journal of extra-corporeal technology*. 2006 Sep;38(3):241-8.
13. Barazzone C, Tacchini-Cottier F, Vesin C, Rochat AF, Piguet PF. Hyperoxia induces platelet activation and lung sequestration: an event dependent on tumor necrosis factor-alpha and CD11a. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 1996 Jul;15(1):107-14.

14. Postma S, Emara M, Obaid L, Johnson ST, Bigam DL, Cheung PY. Temporal platelet aggregatory function in hypoxic newborn piglets reoxygenated with 18%, 21%, and 100% oxygen. *Shock* (Augusta, Ga. 2007 Apr;27(4):448-54.
15. Wacker J, Lucchinetti E, Jamnicki M, Aguirre J, Harter L, Keel M, et al. Delayed inhibition of agonist-induced granulocyte-platelet aggregation after low-dose sevoflurane inhalation in humans. *Anesthesia and analgesia*. 2008 Jun;106(6):1749-58.
16. Kabon B, Kurz A. Optimal perioperative oxygen administration. *Current opinion in anaesthesiology*. 2006 Feb;19(1):11-8.
17. Altemeier WA, Sinclair SE. Hyperoxia in the intensive care unit: why more is not always better. *Current opinion in critical care*. 2007 Feb;13(1):73-8.
18. G. De Martino ML, R.C. De Rosa. Toxic Effects of Oxygen. In: Orrani M, Wattel, editor. *Handbook on Hyperbaric Medicine*; 1996. p. 59-74.
19. Jamieson D, Chance B, Cadenas E, Boveris A. The relation of free radical production to hyperoxia. *Annual review of physiology*. 1986;48:703-19.
20. Ambrosio G, Golino P, Pascucci I, Rosolowsky M, Campbell WB, DeClerck F, et al. Modulation of platelet function by reactive oxygen metabolites. *The American journal of physiology*. 1994 Jul;267(1 Pt 2):H308-18.
21. Krotz F, Sohn HY, Pohl U. Reactive oxygen species: players in the platelet game. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2004 Nov;24(11):1988-96.
22. Muller FL, Lustgarten MS, Jang Y, Richardson A, Van Remmen H. Trends in oxidative aging theories. *Free radical biology & medicine*. 2007 Aug 15;43(4):477-503.
23. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2007;39(1):44-84.
24. Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *American journal of physiology*. 2000 Dec;279(6):L1005-28.
25. Handin RI, Karabin R, Boxer GJ. Enhancement of platelet function by superoxide anion. *The Journal of clinical investigation*. 1977 May;59(5):959-65.
26. Iuliano L, Colavita AR, Leo R, Pratico D, Violi F. Oxygen free radicals and platelet activation. *Free radical biology & medicine*. 1997;22(6):999-1006.
27. Stuart MJ, Holmsen H. Hydrogen peroxide, an inhibitor of platelet function: effect on adenine nucleotide metabolism, and the release reaction. *American journal of hematology*. 1977;2(1):53-63.
28. Ohyashiki T, Kobayashi M, Matsui K. Oxygen-radical-mediated lipid peroxidation and inhibition of ADP-induced platelet aggregation. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1991 Jul;288(1):282-6.
29. Pratico D, Iuliano L, Ghiselli A, Alessandri C, Violi F. Hydrogen peroxide as trigger of platelet aggregation. *Haemostasis*. 1991;21(3):169-74.

30. Del Principe D, Menichelli A, De Matteis W, Di Corpo ML, Di Giulio S, Finazzi-Agro A. Hydrogen peroxide has a role in the aggregation of human platelets. *FEBS letters*. 1985 Jun 3;185(1):142-6.
31. Azizova OA, Aseichev AV, Piryazev AP, Roitman EV, Shcheglovitova ON. Effects of oxidized fibrinogen on the functions of blood cells, blood clotting, and rheology. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2007 Sep;144(3):397-407.
32. Steptoe A, Gibson EL, Vuononvirta R, Hamer M, Wardle J, Rycroft JA, et al. The effects of chronic tea intake on platelet activation and inflammation: a double-blind placebo controlled trial. *Atherosclerosis*. 2007 Aug;193(2):277-82.
33. Hermann F, Spieker LE, Ruschitzka F, Sudano I, Hermann M, Binggeli C, et al. Dark chocolate improves endothelial and platelet function. *Heart (British Cardiac Society)*. 2006 Jan;92(1):119-20.
34. Davis K. *Basic Physics and Measurement in Anaesthesia*. 5. ed: Butterworth and Heinemann; 2003.
35. Zambruni A, Thalheimer U, Leandro G, Perry D, Burroughs AK. Thromboelastography with citrated blood: comparability with native blood, stability of citrate storage and effect of repeated sampling. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2004 Jan;15(1):103-7.
36. Corporation H. *TEG 5000 Hemostasis System 2006*: Haemoscope Corporation, Niles IL 60714 USA; 2006.
37. Camenzind V, Bombeli T, Seifert B, Jamnicki M, Popovic D, Pasch T, et al. Citrate storage affects Thrombelastograph analysis. *Anesthesiology*. 2000 May;92(5):1242-9.
38. Wong CM, Wong KH, Chen XD. Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications. *Applied microbiology and biotechnology*. 2008 Apr;78(6):927-38.
39. Falanga A, Marchetti M, Vignoli A, Balducci D, Barbui T. Leukocyte-platelet interaction in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Experimental hematology*. 2005 May;33(5):523-30.
40. Curvers J, de Wildt-Eggen J, Heeremans J, Scharenberg J, de Korte D, van der Meer PF. Flow cytometric measurement of CD62P (P-selectin) expression on platelets: a multicenter optimization and standardization effort. *Transfusion*. 2008 May 13.
41. Brueckl C, Kaestle S, Kerem A, Habazettl H, Krombach F, Kuppe H, et al. Hyperoxia-induced reactive oxygen species formation in pulmonary capillary endothelial cells in situ. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2006 Apr;34(4):453-63.
42. Bochsén L, Wiinberg B, Kjølgaard-Hansen M, Steinbruchel DA, Johansson PI. Evaluation of the TEG platelet mapping assay in blood donors. *Thrombosis journal*. 2007;5:3.
43. Ganter MT, Hofer CK. Coagulation monitoring: current techniques and clinical use of viscoelastic point-of-care coagulation devices. *Anesthesia and analgesia*. 2008 May;106(5):1366-75.

44. Holt RR, Actis-Goretta L, Momma TY, Keen CL. Dietary flavanols and platelet reactivity. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2006;47 Suppl 2:S187-96; discussion S206-9.
45. Langer HF, Gawaz M. Platelet-vessel wall interactions in atherosclerotic disease. *Thrombosis and haemostasis*. 2008 Mar;99(3):480-6.

9. Danksagung

Ich möchte allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, herzlich danken:

PD Dr. med. Michael Zaugg für die intensive und gute Betreuung

Dr. med. Johannes Wacker für die stetige Hilfe bei der Durchführung und Organisation der Studie, für die Einführung in die Thrombelastographie und die unzähligen interessanten Diskussionen

Dr. Eliana Lucchinetti für die Unterstützung bei der Datenauswertung und der Durchführung der Studie

Dr. Luc Härter und Ursula Steckholzer für die Durchführung der Flowcytometrie

Dr. med. Konrad Maurer für die Gesellschaft im Labor und die spontane Hilfe

Allen Probanden, die ihre Freizeit für dieses Projekt geopfert haben

Meiner Freundin Julia Rytka und meinen Eltern Barbara und Robert Maurer

10. Curriculum vitae

Christian Heinrich Maurer von Zürich

11. Februar 1980	geboren in Winterthur
1987-1993	Primarschule Illnau
1993-2000	Kantonsschule Rychenberg, Winterthur, Matura Typus B
2001-2007	Medizinstudium an der Universität Zürich und Charité Berlin
2007	Staatsexamen Universität Zürich
2008	Dissertation am Institut für Anästhesiologie Universitätsspital Zürich