
4 PATIENTEN und METHODEN

4.1 Patientenkollektiv und Gruppeneinteilung

Alle Untersuchungen fanden in der Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin der Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Charité Mitte, mit Genehmigung der zuständigen Ethikkommission (Referenz-Nr.: 1319) statt. In dieser prospektiv, randomisiert und doppelblind durchgeführten Studie wurden 40 Patienten, die sich einer elektiven aortokoronaren Venenbypass-Operation (ACVB) mit extrakorporaler Zirkulation unterzogen, eingeschlossen. Bei allen Patienten wurden zur Evaluation präoperativ eine Thorax-Röntgenübersichtsaufnahme, Lungenfunktionstests, EKG und Blutgasanalysen, sowie eine Untersuchung der laborchemischen Parameter (Blutbild, CRP, Gerinnung) durchgeführt.

4.2 Einschluss- und Ausschlusskriterien

Die Einschlusskriterien umfassten Patienten älter als 18 Jahre mit einer Koronaren Gefäßerkrankung, stabiler Angina Pectoris und einer präoperativen links-ventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) von mehr als 40 % sowie einem links-ventrikulären enddiastolischen Druck unter 17 mmHg.

Ausschlusskriterien waren neben malignen Vorerkrankungen eine immunsuppressive Therapie am Patienten, alle Zeichen einer bestehenden Infektion (Leukozyten > 12.000/µl, Temperatur > 38°C, C-Reaktives Protein > 5 mg/dl), Leberinsuffizienzzeichen (> Child B) und Off-Pump-Operationen. Auch Patienten mit einem erhöhten intraoperativen Katecholaminbedarf (Noradrenalin > 0,15 µg/kg/min, Dopamin > 10 µg/kg/min), massiver Transfusion (> 4 allogene Transfusionen) und einer Rethorakotomie wurden aus der Studie ausgeschlossen. Patienten mit schwerer chronisch obstruktiven Lungenerkrankung und Asthma Bronchiale wurden ebenfalls nicht in die Studie mit einbezogen.

4.3. Anästhesie

Nach körperlicher Untersuchung, Anamneseerhebung, ausführlicher Aufklärung und der schriftlichen Einwilligung erhielten alle Patienten am Abend vorher eine orale Prämedikation mit 1-2 mg Flunitrazepam per os und eine halbe Stunde vor Einleitung 0,07-0,1 mg/kg Midazolam per os. Ebenso erhielten alle Patienten vor der Einleitung intravenös 7-10 ml/kg isotone Elektrolytlösung.

Alle Patienten wurden entsprechend den Standard Operating Procedures (Check up Anästhesie) mit Etomidat 0,2 mg/kg, Fentanyl 5-7 µg/kgKG und Pancuroniumbromid 0,1 mg/kgKG als Muskelrelaxans eingeleitet. Die Anästhesie wurde mit Isofluran 1,0 Vol% und Fentanyl (0,2-0,3 µg/kg/min) aufrechterhalten [69].

4.3.1 Studienprotokoll

Nach der Narkoseeinleitung erfolgte doppelblind der Beginn der Studienmedikamentengabe mit einer kontinuierlichen Dosierung von 1,0 µg/kg/h.

Alle Patienten wurden randomisiert in zwei Gruppen eingeteilt:

1: Verumgruppe

intraoperative Medikation: Clonidin 1,0 µg/kg/h

postoperative Medikation: Clonidin 1,0 µg/kg/h, Propofol 0,5-4,0 mg/kg/h,
Morphin 2-3 mg i.v

2: Placebogruppe

intraoperative Medikation: NaCl 0,9% 1 µg/kg/h

postoperative Medikation: NaCl 0,9% 1 µg/kg/h, Propofol 0,5-4,0 mg/kg/h,
Morphin 2-3 mg i.v

4.3.2 Intraoperativer Verlauf

Beatmet wurden die Patienten mit einem Tidalvolumen von 6 ml/kgKG, welches der endexpiratorischen CO₂-Konzentration angepasst wurde, die 32-34 mmHg betragen sollte. Stündliche Blutgasanalysen kontrollierten die Suffizienz der Beatmung. Alle Patienten erhielten als Antibiotika-Prophylaxe 1,5 g Cefuroxim intravenös (1. Gabe nach der Einleitung, 2. Gabe nach Beendigung der Extrakorporalen Zirkulation und 3. Gabe sechs Stunden postoperativ). Ein Membran-Oxygenator (Quadrox[®]; Jostra, Hilingen, Germany) wurde zur normothermen pulswellenlosen extrakorporalen Zirkulation verwendet. Vorbereitet wurde diese mit 800 ml isotoner Kochsalzlösung und 500 ml HES 10 %. Für die Vollheparinisierung vor dem Anschluss an den Oxygenator wurden 400 IE/kg Heparin verwendet, um eine zwei- bis dreifache Verlängerung der partiellen Thromboplastinzeit zu erreichen. Die minimale Flussrate der Pumpe betrug 2,5 l/min/m² und der mittlere arterielle Blutdruck wurde über 50 mmHg gehalten. Während der extrakorporalen Zirkulation erhielten alle Patienten zur Hemmung der Hyperfibrinolyse insgesamt 50.000 kIE/kg Aprotinin.

Arterielle Blutdruckmessung und Blutgasanalysen erfolgten invasiv mittels eines Katheters, der im Rahmen des operativen Routinemonitorings in der Arteria Radialis oder Arteria Femoralis platziert wurde, ebenso wurde der zentralvenöse Blutdruck mittels zentralvenösem Venenkatheter in der Vena Jugularis interna oder Vena Subclavia gemessen. Die Gesamtmenge von intraoperativ verabreichten vasoaktiven Medikamenten, das Urinvolumen, gemessen mittels Blasenkatheter, und die Körpertemperatur, gemessen mit einem Foley-Katheter (Typ Healthcare, Neustadt, Germany), wurden ebenso dokumentiert. Erythrozytenkonzentrate wurden bei einem Hämatokritabfall unter 22 % während der extrakorporalen Zirkulation gegeben. Um myokardiale Ischämien zu erkennen, wurde die 3-Kanal ST-Strecken-Analyse (über die Ableitungen II, aVL, V5) verwendet. Intraoperative Ischämien waren definiert als ST-Strecken-Senkungen von mehr als 1 mm oder Hebungen von mehr als 2 mm, die mindestens zwei Minuten anhielten [69].

Alle Patienten wurden intraoperativ mit DDD-Schrittmacherelektroden versehen, so dass eventuell intra- und postoperativ auftretende Bradykardien kontrolliert und therapiert werden konnten.

4.3.3 Postoperativer Verlauf

Postoperativ wurden alle Patienten intubiert und beatmet auf die operative Intensivstation verlegt. Dort erfolgte die Messung der Sedierungstiefe anhand der Ramsay Sedation Scales [RSS, 104]. Dabei wird untersucht, inwieweit die Patienten fähig sind auf Ansprache oder taktile Reize zu reagieren.

Die Ramsay Sedation Scales erfassen die verschiedenen Sedierungsstadien mit Zahlenwerten [104]:

wach	0	Patient ist wach und orientiert
	1	Patient ist ängstlich, agitiert und/oder ruhelos
	2	Patient ist kooperativ, agitiert und/oder ruhelos
	3	Patient reagiert auf Anforderungen (Sedierung)
sediert	4	Prompte Reaktion auf leichtes Klopfen der Stirn oder lautes Geräusch (tiefe Sedierung)
	5	Langsame Reaktion auf leichtes Klopfen der Stirn oder lautes Geräusch (Narkose)
	6	Keine Reaktion auf leichtes Klopfen der Stirn oder lautes Geräusch (tiefes Koma)

Die Sedierungstiefe und die Vitalparameter wurden in der ersten Stunde alle zehn Minuten und ab dann stündlich dokumentiert. Die Vitalparameter umfassten Herzfrequenz, mittleren arteriellen Druck, Atemfrequenz, periphere Sauerstoffsättigung, zentralvenösen Druck, Körpertemperatur und gegebenenfalls pulmonalarteriellen Druck. Sobald die Basaltemperatur der Patienten im normothermen Bereich lag, erfolgte das Weaning (Entwöhnung von der Beatmung). Bis zum Weaning sollte der Ramsay möglichst 5 sein, sich während des Weanings zwischen 3 und 4 bewegen und nach der Extubation einem Wert von 2 folgen. War der Patient zu wenig sediert, erfolgte eine Dosiserhöhung der Studienmedikation um 0,5 µg/kg/h bis maximal 3,0 µg/kg/h, beziehungsweise eine Ergänzung durch Propofol bis maximal 4,0 mg/kg/h nach folgendem intraoperativem Studienprotokoll:

Verum-Gruppe:

(Clonidin 1,0-3,0 µg/kg/h, Propofol 0,5-4,0 mg/kg/h, Morphin 2-3 mg iv.)

Placebogruppe:

(NaCl 0,9% 1 µg/kg/h, Propofol 0,5-4,0 mg/kg/h, Morphin 2-3 mg iv.)

Nach einer Beatmungszeit von mindestens sechs Stunden wurden die Patienten, nach Erfüllung standardisierter Extubationskriterien (Weaning-Protokoll) möglichst zügig extubiert. Nach einer Studie von Ely et al. [33] beinhalteten diese Kriterien, ob der Patient bei Spontanatmung stabile respiratorische und hämodynamische Parameter aufweist. Nach Extubation erfolgte die Applikation des Studienmedikamentes über weitere sechs Stunden. Venöse Blutabnahmen zur Kontrolle von Blutbild-, Gerinnungs- und Entzündungsparametern und immunologischen Mediatoren erfolgten sofort bei Intensivaufnahme, sechs und zwölf Stunden postoperativ, sowie morgens am ersten postoperativem Tag.

Kardiovaskuläre Komplikationen wurden definiert als eine um mehr als 20-prozentige Veränderung des arteriellen Blutdrucks, Bradykardie unter 50 bpm oder Tachyarrhythmia Absoluta mit hämodynamischer Instabilität. Respiratorische Komplikationen wurden definiert anhand einer Atemfrequenz von weniger als 8 oder mehr als 25 Atemzüge/min.

4.4 Abbruchkriterien

Hämodynamische Instabilität wurde definiert als ein Abfall des arteriellen Mitteldrucks unter 50 mmHg. War es trotz ausreichender Volumentherapie nicht möglich den mittleren arteriellen Blutdruck zu stabilisieren, erfolgte eine Katecholamintherapie mit Dopamin (bis maximal 10 µg/kg/min) beziehungsweise Noradrenalin (bis maximal 0,15 µg/kg/min). Wurde eine weitere Erhöhung der Katecholamine erforderlich oder entwickelte der Patient ein Low-Output-Syndrom ($CI < 2,0$ l/min/cm²), wurde die Studie abgebrochen. Das Auftreten einer massiven Blutung (> 200 ml/h über zwei Stunden und mehr als vier autologe Erythrozytenkonzentrate) mit nachfolgender Rethorakotomie war ebenfalls ein Abbruchkriterium.

4.5 Probengewinnung

Die Blutentnahmen für die immunologischen Mediatoren erfolgten aus dem arteriellen Katheter mittels NH₄-heparinisierter Monovetten (S-Monovette[®] 15 I.E. Heparin/ml Blut, Fa. Sarstedt) mit einem Fassungsvermögen von 4,5 ml. Die Blutproben wurden codiert und unmittelbar nach der Entnahme weiterverarbeitet.

Die Zeitpunkte der Blutabnahmen waren bei allen Patienten gleich definiert:

1. präoperativ vor der Narkoseeinleitung (Prae-OP)
2. ITS-Aufnahme
3. 6 Stunden postoperativ (ITS 6h)
4. 12 Stunden postoperativ (ITS 12h)
5. 24 Stunden postoperativ (ITS 1d)

4.6 Bestimmung der T-Zell-vermittelten Immunreaktivität

4.6.1 Stimulation

Die Stimulation der mononukleären Zellreihe erfolgte nach der in dem „BD FastImmune™ CFC Handbook“ der Firma BD Biosciences (Immunocytometry Systems, San Jose, CA, www.bdisis.com) beschriebenen Methode in den unten genannten Endkonzentrationen mit Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA, Fa. Sigma) und Ionomycin (Fa. Sigma) in Gegenwart des Zytokin-Sekretionshemmers Brefeldin A (BFA, Fa. Sigma) [5, 24, 54, 56, 64, 100, 116, 118]. Als Zellbasisnährmedium diente RPMI-1640 (+2 mM L-glutamine, 2ml, Fa. Sigma). Die Blutkulturen wurden in drei Rundbodenröhrchen (12 x 75 mm aus Polystrol, Falcon[®], BD Biosciences, San Jose CA) mit je 1 ml heparinisiertem Blut als Ansätze A, B und C angesetzt und mittels dem RPMI-1640-Medium auf ein Volumen von 2 ml nach folgenden Schemata aufgefüllt:

Ansatz A: (stimuliert ohne Sekretionshemmung)

- PMA [1 µg/ml]
- Ionomycin [50 µg/ml]

Ansatz B: (nicht stimuliert mit Sekretionshemmung)

- BFA [500 µg /ml]
- 980 µl RPMI

Ansatz C: (stimuliert mit Sekretionshemmung)

- PMA [1 µg/ml]
- Ionomycin [50 µg/ml]
- BFA [500 µg/ml]

Ansatz A diente zur Stimulationskontrolle, Ansatz B blieb als Kontrollansatz zur Bestimmung der basalen Zytokinproduktion unstimuliert, und Ansatz C war der eigentliche Stimulationsansatz.

In einem viertem Ansatz wurden in 50 ml heparinisiertem Blut die T-Lymphozyten-Subpopulationen durch direkte Zugabe von je 5 µl CD3 PerCP-, CD4 PE- und CD8 FITC-Anikörper (BD Bioscience, San Jose CA) markiert und mit Ansatz A zur FACS-Analyse vorbereitet (s. Kap. 4.6.2.1). Dieser Ansatz erfolgte stichprobenartig und stellte das Verteilungsmuster der CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen zur internen Qualitätssicherung dar.

Nach gründlichem Durchmischen (Vortexmischer VF2, Fa. JAHNKE & KUNKEL IKA[®]) der Reagenzien mit dem Blut (1500 U/min, 3 sec.) wurden die Ansätze unverdeckt für vier Stunden in einem Brutschrank (Sterikult 200, Fa. Forma Scientific), dessen Atmosphäre 37°C und 5 %CO₂ betrug, inkubiert.

4.6.2 Oberflächenfärbung

Alle Bestimmungen erfolgten bei einer Raumtemperatur von 23°C. Da zur FACS-Analyse im Anschluss an die Färbung ein Durchflusszytometer diente, das eine Dreifarbenkombination verschiedener Fluoreszenzen mittels eines Filters erfasst, waren die einzelnen Farbstoffe mit folgenden unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten ausgestattet:

<u>Farbstoff</u>	<u>Anregung (nm)</u>	<u>Emission (nm)</u>
- Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)	495	525
- Phycoerythrin (PE)	488, 565	578
- Peridinin-Chlorophyl-Protein (PerCP)	470	680

Als Farbstoffe eigneten sich monoklonale antihumane Reagenzien der Maus, die gegen das CD3-Antigen des T-Zell-Rezeptors (CD3 PerCP, BD Bioscience, San Jose CA) und gegen das CD8-Antigen bestimmter T-Zell-Populationen (CD8 FITC, CD8 PE, jeweils BD Bioscience, San Jose CA) ausgerichtet waren. Stimulationskontrolle war der Nachweis des CD69-Antigens (CD69 PE, BD Bioscience, San Jose CA), das als schneller unabhängiger Zelloberflächen-Aktivierungsmarker die Stimulation durch Ionomycin und PMA, aber auch die sekretionsinhibitorische Wirkung des BFA durch intrazelluläre Anhäufung nachweist (s. Kap. 4.6.3 Intrazelluläre Färbung) [11].

Nach der Färbung wurde zur Erythrozyten-Zelllyse und Leukozyten-Fixation FACS™-Lysing Solution (BD Bioscience, San Jose CA) verwendet. Zur intrazellulären Färbung musste die Zellmembran der Lymphozyten zunächst permeabilisiert werden, dabei zeigte sich die FACS™-Perm Solution (BD Bioscience, San Jose CA) zuverlässig, die insbesondere Saponin enthält. Überschüssige Zellbestandteile beziehungsweise ein Überschuss ungebundener Antikörper wurden mit einem Waschpuffer (PBS mit 0,5 % BSA und 0,1 % Natriumazid) herausgewaschen, so dass sich die Färbekomplexe zur Zellzählung isolieren ließen [45].

Nach vier Stunden Bebrütung der Blutkulturen im Brutschrank, erfolgte die Färbung der oben genannten Oberflächen-Antigene in jeweils 100 µl stimuliertem Blut. Das inkubierte Blut der Ansätze B und C wurde in jeweils sieben Unteransätze aufgeteilt.

Die Oberflächenfärbung gestaltete sich für die Ansätze A, B (B1-B7) und C (C1-C7) in unterschiedlicher Art und Weise, wobei bei allen 10 µl CD3 PerCP als Pan-T-Lymphozytenmarker zu den CD8- und CD69-Antikörpern diente.

Die Farbstoffverteilung der einzelnen Zellreihen wird in Tabelle 1 für jeweils 100 µl Blut beschrieben.

Farbstoffzusatz	Probenkennung														
	A	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
10 µl CD3 PerCP	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
10 µl CD8 FITC	x	x	x	x					x	x	x				
10 µl CD8 PE					x	x						x	x		
10 µl CD69 PE	x														

Tab. 1: Farbstoffverteilung der Oberflächenfärbung

Anschließend erfolgte die Weiterverarbeitung. Diese umfasste zum einen die Bereitstellung des Ansatzes A zur FACS-Analyse, zum anderen die Vorbereitung der Ansätze B1-B7 und C1-C7 zur intrazellulären Färbung.

4.6.2.1 Weiterverarbeitung: Ansatz A

Die Weiterverarbeitung des Ansatzes A erfolgte mit der „Lyse-no-Wash“-Methode [118]. Dazu wurde das Blut zunächst inklusive der Farbstoffe mit einem Vortexmischer (1500 U/min, 3 sec.) gründlich durchmischt und anschließend 15 Minuten bei Raumtemperatur (23°C) und Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurden 500 µl Lyse-Lösung hinzugefügt, erneut durchmischt, 15 Minuten inkubiert und zur FACS-Analyse bereitgestellt.

4.6.2.2 Weiterverarbeitung: Ansatz B1-B7 und C1-C7

Die Weiterverarbeitung der Ansätze B1-B7 und C1-C7 geschah nach der „Lyse-and-Wash“-Methode [118], die sich von der „Lyse-no-Wash“-Methode durch zusätzliche Waschvorgänge unterscheidet, um dadurch eine Abnahme unspezifischer Bindungen zu bewirken. Das Blut wurde erneut mit den Farbstoffen gründlich durchmischt und anschließend 15 Minuten bei Raum-Temperatur (23°C) und Dunkelheit inkubiert. Danach erfolgte eine Zugabe von jeweils 2 ml Lyse-Lösung in jedes Rundbodenröhrchen. Die Inhalte wurden erneut gründlich durchmischt und 20 Minuten inkubiert. Nach erfolgter Zentrifugation der Rundbodenröhrchen, mit einer Umdrehung von 500 G für fünf Minuten, wurden ihre Überstände jeweils dekantiert. Dann erhielt jeder Ansatz 500 µl Permeabilisierungs-Lösung und nach einer weiteren Durchmischung erfolgte erneut für 15 Minuten eine Inkubation. Zum Schluss wurden die Zelllösungen mit 2 ml Waschpuffer durchmischt, bei einer Umdrehung von 500 G fünf Minuten zentrifugiert und anschließend dekantiert, um so für die intrazelluläre Färbung vorbereitet zu sein.

4.6.3 Intrazelluläre Färbung

Die Farbstoffe zur intrazellulären Färbung waren Maus-Antikörper gegen humanes IL-4 (Anti-IL-4 PE, BD Biosciences, San Jose CA) und IFN- γ (Anti-IFN- γ FITC, BD Biosciences, San Jose CA), zu denen jeweils eine Isotypenkontrolle erhoben wurde (Mouse IgG2a FITC, Mouse IgG2a PE, BD Biosciences, San Jose CA) [20, 82, 83, 98, 100]. Als Negativkontrolle diente ein Farbstoff gegen doppelt positive Zellen (Anti-IFN- γ /IL-4 FITC/PE, BD Biosciences, San Jose CA) und dessen Isotypenfarbstoff (Mouse IgG2a/IgG1 FITC/PE, BD Biosciences, San Jose CA) [102].

Da die Ansätze B und C mit BFA stimuliert wurden, wurde auch das CD69-Antigen zur Kontrolle intrazellulär nachgewiesen (CD69 PE, BD Bioscience, San Jose CA) [11].

Die Farbstoffverteilung der Ansätze B1-B2 und C1-C2 ist in Tabelle 2 dargestellt.

Farbstoffzusatz	Probenkennung													
	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
10 µl CD69 PE	x							x						
10 µl IFN γ FITC				x							x			
10 µl IFN γ Iso					x							x		
10 µl IL4 PE		x							x					
10 µl IL4 Iso			x							x				
20 µl IFN γ /IL4						x							x	
20 µl IFN γ /IL4 Iso							x							x

Tab. 2: intrazelluläre Farbstoffverteilung (Iso: Isotypenkontrolle)

Nach Zugabe der Farbstoffe wurden die Rundbodenröhrchen mit dem Vortexmischer (1500 U/min, 3 sec) gründlich durchmischt und 30 Minuten bei Raumtemperatur (23°C) und Dunkelheit inkubiert. Danach wurde in jedes Röhrchen 1 ml Waschpuffer pipettiert und dieses nach erneutem Durchmischen mit einer Drehzahl von 500 g für fünf Minuten zentrifugiert. Nach erfolgtem Dekantieren des Überstandes wurde in jedes Röhrchen 500 µl Cell-Fix[™]-Solution (1 % Paraform-aldehyd-Lösung in PBS, BD Bioscience, San Jose CA) hinzugegeben, vermischt und zur FACS-Analyse bereitgestellt. Die Proben waren anschließend für 24 Stunden bei 2°-8°C im Dunkeln ohne wesentliche Fluoreszenzintensitätsverluste haltbar.

4.6.4 FACS-Messung

Die direkte Bestimmung der CD8⁺- und die indirekte Bestimmung der CD4⁺-Zellen über deren intrazelluläre Zytokine IFN- γ und IL-4 erfolgte anhand eines Durchflusssytometers (FACScan[®], Fa. Becton Dickinson). Dieses war mit einem 488 nm Argon-Laser (15 mW) ausgestattet, dessen Emissionsbanden den Anregungsbereichen der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe entsprachen. Gemessen wurden die drei verschiedenen Fluorochrom-Lichtintensitäten (FITC, PE, PerCP) und die Lichtbrechungen im Seitwärts- (Side Scatter, SSC) sowie im Vorwärts-Streulicht-Kanal

(Forward Scatter, FSC), die zugleich als Zelltrigger dienten, um die Zellen entsprechend ihrer Größe, Dichte und Granularität zu selektieren [4, 113]. Die Messeinstellungen wurden über den gesamten Messzeitraum konstant gehalten, indem die Stabilität regelmäßig mit Fluoreszenz-Beats (CaliBRITE™ 3, Fa. Becton Dickinson) kontrolliert wurde. Die Signalverarbeitung erfolgte durch einen Power Macintosh G4 (Running System 9.1) mit der BD-CellQuest®-„Software for acquisition and analysis“ (Version 3.3) und der FACS-Comp®-„Software for instrument-setting“. Die erfassten Messdaten wurden in Form einer korrelierten Zweiparameterdarstellung als Punktehistogramm (Dotplot) dargestellt, so dass sich die Zellpopulationen auf diese Weise identifizieren ließen. In definierten Auswertefenstern (Gates) mit einem Minimum von 10.000 Ereignissen konnten diese bezüglich ihrer Fluoreszenzmarkierung und Zelleigenschaften getrennt dargestellt und anschließend gezählt werden.

4.6.5 FACS-Analyse

Die Lymphozytenpopulationen wurden als Dotplot dargestellt, wobei jede Zelle einem einzelnen Punkt (dot) entsprach und in ein Koordinatenkreuz zweier frei wählbarer Parameter eingeordnet war. Mittels der Quadrantenstatistik von CellQuest® konnten die antigenpositiven Zellen der gewählten Parameter gezählt und in Prozentzahlen der einzelnen Populationen angegeben werden. Das Quadrantenkreuz wurde für Messungen derselben Zelleigenschaften in der gleichen Position gehalten. Der Pan-T-Lymphozytenmarker CD3 diente bei allen Ansätzen zur sicheren Identifizierung der T-Lymphozyten [82]. Zu Beginn der Auswertung wurden die T-Lymphozyten-Populationen zunächst in drei Dotplots durch Gates eingegrenzt (1. forward light scatter/side scatter, 2. forward light scatter/CD3, 3. CD3/side scatter), um sie von Zelltrümmern und anderen unspezifischen Färbekomplexen zu unterscheiden. Diese Gates lieferten die Grundlage aller weiteren Analysen.

Die stichprobenartige Auswertung des Subpopulationsansatzes ohne Stimulation im CD3/CD8- und CD3/CD4-Dotplot erfasste die Anzahl der CD4⁺-T-Helfer-Zellen und CD8⁺-zytotoxischen T-Zellen. Zur internen Kontrolle musste die Summe aus beiden T-Zellen stets $CD3 \pm 5 \%$ sein. Diese Kontrolle war wichtig, da eine alleinige CD4-

Färbung auf Grund der Dimerisation des CD4-Antikörpers nach Stimulation mit PMA nicht möglich ist und somit in den stimulierten Ansätzen lediglich die CD8-Oberflächenantigene markiert wurden. So errechnete sich die Anzahl der CD8⁺-Zellen als prozentualer Wert der CD3-gezählten Zellen (Abb. 4 und Abb. 5), woraus gleichzeitig die Anzahl der CD8⁻- bzw. CD4⁺-Zellen ermittelt wurde.

Ziel des Stimulationsansatzes (Ansatz A) war es zu kontrollieren, ob die Stimulation erfolgreich war. Dazu wurde der Ansatz zusätzlich zur CD8- und CD3-Färbung durch den CD69-Antikörper markiert. Im CD3/CD69-Dotplot wurden mittels der Quadrantenstatistik somit nur diejenigen Zellen ermittelt, die CD69-positiv waren. Wenn es mehr als 90 % der analysierten Lymphozyten waren, galt die Stimulation als erfolgreich. Bei einem geringeren Anteil wurden die übrigen Ansätze der B- und C-Reihe zu keiner weiteren Analyse herangezogen (Abb. 5).

Die Permeabilitätskontrollen Ansätze B1 und C1 wurden ebenfalls bezüglich ihrer CD69-Expression untersucht. Somit durfte das sowohl intra- als auch extrazellulär gelegene CD69-Antigen im unstimulierten Ansatz B1 lediglich dem nativen Aktivierungszustand der Lymphozyten entsprechen. Dagegen musste nach erfolgreicher Permeabilisierung im stimulierten Ansatz C1 die CD69-Expression bei mehr als 90 % der Lymphozyten nachweisbar sein, andernfalls wurden die übrigen Ansätze ebenfalls verworfen.

Die IL-4- und IFN- γ -Produktionen wurden jeweils für die T-Helfer-Lymphozyten und zytotoxischen T-Lymphozyten getrennt ermittelt. Dazu wurden die T-Lymphozyten-Subpopulationen zunächst im CD3/CD8⁺- und CD3/CD8⁻-Dotplot mit Gates eingegrenzt, um anschließend die Zytokinproduktionen anhand den CD3-markierten T-Lymphozyten darzustellen. In den folgenden zwei Abbildungen (Abb. 2 und Abb. 3) sind die CD3/IL-4- und CD3/IFN- γ -Dotplots exemplarisch dargestellt.

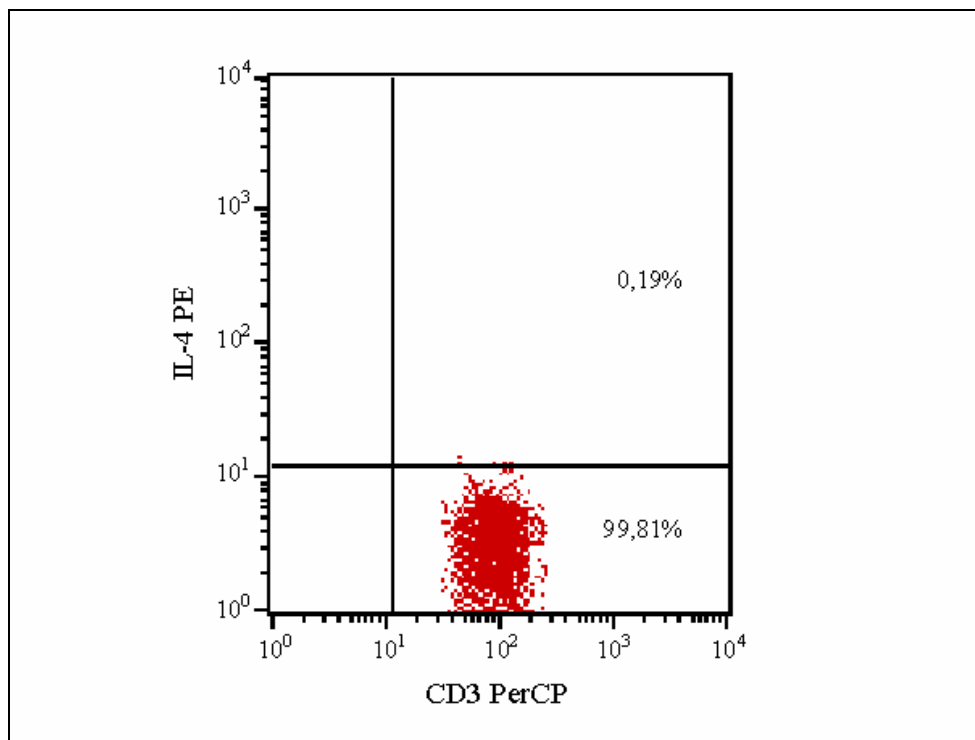


Abb. 2: Exemplarische Darstellung von intrazellulärem IL-4 in CD3⁺CD8⁻ Lymphozyten

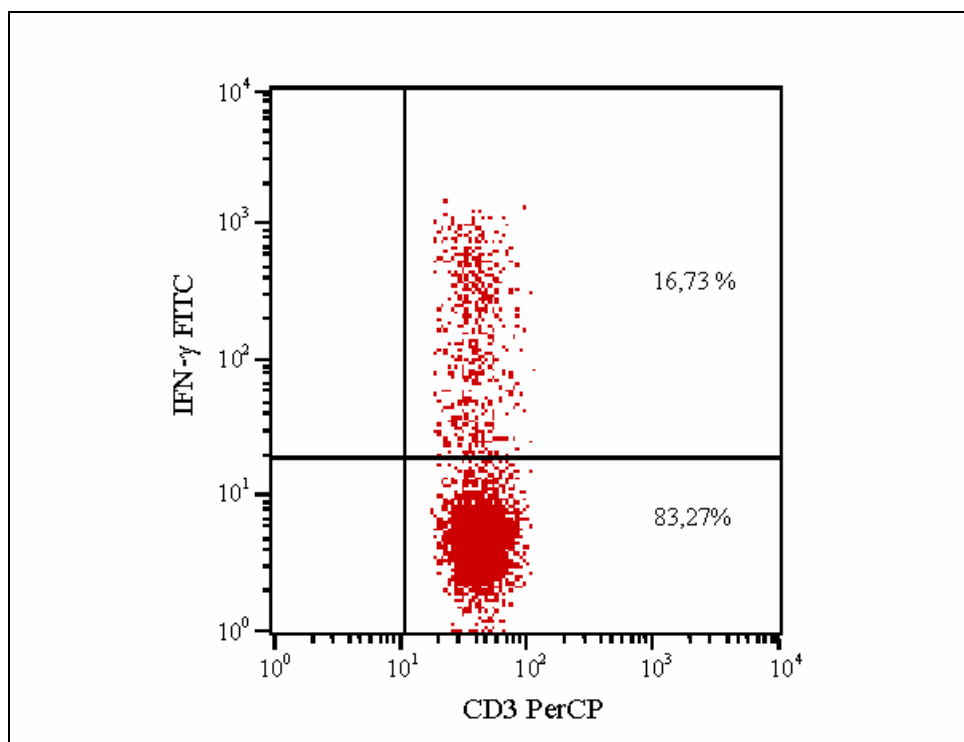


Abb. 3: Exemplarische Darstellung von intrazellulärem IFN γ in CD3⁺CD8⁻ Lymphozyten

Um die genaue intrazelluläre Zytokinproduktion zu ermitteln, wurden die basal exprimierten Zytokine der B-Reihe von den unter Stimulationsbedingungen detektierten Zytokinen der C-Reihe subtrahiert. Ebenso wurden die IL-4- und IFN- γ -Werte durch Subtraktion ihrer Isotypen-Werte, die unspezifische Bindungen darstellen [59, 111], in den Ergebnissen verifiziert (s. Abb. 6). Die Bestimmung der Koexpression von IL-4 und IFN- γ erfolgte mit der CD3-Färbung, so dass doppelt positive Zellen im IFN- γ /IL-4-Dotplot dargestellt und gezählt werden konnten. Um deren Endwerte zu erhalten, wurden von diesen ebenfalls ihre Isotypen-Werte subtrahiert.

Die Dokumentation der ermittelten Zellmengen erfolgte in einem Auswertungsprotokoll (s. Kap. 4.7).

4.7 Auswertungsprotokoll

Zelltypen	Zellreihen gesamt
Alle Zelltypen	
CD3 absolut	
CD3 in %	

Abb. 4: Zellreihen gesamt

Zelltypen	A – Reihe (mit Stimulation ohne BFA) in %
CD8 ⁺	
CD8 ⁻ (CD4 ⁺)	
CD69/CD3	

Abb. 5: Protokoll der A-Reihe

Zelltypen	B - Reihe (ohne Stimulation mit BFA) in %	C - Reihe (mit Stimulation mit BFA) in %	Differenzen (C-Reihe – B-Reihe) in %
CD69 / CD3	(B1)	(C1)	
IL-4 / CD8 ⁺	(B2)	(C2)	
IL-4-Iso / CD8 ⁺	(B3)	(C3)	
Differenz	(B2 – B3)	(C2 – C3)	[(C2–C3)–(B2–B3)] IL-4 / CD8⁺
IL-4 / CD4 ⁺	(B2)	(C2)	
IL-4-Iso / CD4 ⁺	(B3)	(C3)	
Differenz	(B2 – B3)	(C2 – C3)	[(C2–C3)–(B2–B3)] IL-4 / CD4⁺
IFN-γ / CD8 ⁺	(B4)	(C4)	
IFN-γ-Iso / CD8 ⁺	(B5)	(C5)	
Differenz	(B4 – B5)	(C4 – C5)	[(C4–C5)–(B4–B5)] IFN-γ / CD8⁺
IFN-γ / CD4 ⁺	(B4)	(C4)	
IFN-γ-Iso / CD4 ⁺	(B5)	(C5)	
Differenz	(B4 – B5)	(C4 – C5)	[(C4–C5)–(B4–B5)] IFN-γ / CD4⁺
IFN-γ + IL-4 / CD3	(B6)	(C6)	
IFN-γ + IL-4-Iso / CD3	(B7)	(C7)	
Differenz	(B6 – B7)	(C6 – C7)	[(C6–C7)–(B6–B7)] doppelt +

Abb. 6: Protokoll der B- und C-Reihe (Iso: Isotypenkontrolle)

Zur anschließenden Berechnung der endgültigen Ergebnisse diente die TH₁(IFN- γ)/TH₂(IL-4)-Ratio. Die relevanten Werte sowohl für die CD8⁺- als auch die CD4⁺-Zellen wurden mittels folgender Formel ermittelt:

$$\text{TH}_1/\text{TH}_2\text{-Ratio der CD4}^+\text{-Zellen: } \frac{\text{IFN-}\gamma / \text{CD3}^+\text{CD4}^+}{\text{IL-4} / \text{CD3}^+\text{CD4}^+}$$

$$\text{Tc}_1/\text{Tc}_2\text{-Ratio der CD8}^+\text{-Zellen: } \frac{\text{IFN-}\gamma / \text{CD3}^+\text{CD8}^+}{\text{IL-4} / \text{CD3}^+\text{CD8}^+}$$

Um natürliche Killerzellen, Monozyten und dendritische Zellen auszuschließen, war die Voraussetzung der Verwendung dieser Formel, dass sowohl die Ratios aus CD3/CD8⁺ und CD3/CD4⁺ als auch die Ratios CD3/CD8⁺ und CD3/CD4⁺ $\leq 5\%$ waren.

4.8 Zytokinbestimmung

Die Bestimmung von Interleukin-10 (IL-10) erfolgte mit einem Enzym Linked Immuno Sorbend Assay (ELISA) (IL-10-EIA-Kit, TiterZyme[®], PerSeptive Diagnostics, Cambridge, MA, USA) [118].

Die lypophylisierten Standards wurden zunächst mit 1 ml Serumverdünner aufgelöst und mittels einer Standardreihe in IL-10-Konzentrationen von 0 pg/ml, 5 pg/ml, 10 pg/ml, 25 pg/ml, 50 pg/ml, 100 pg/ml, 250 pg/ml und 500 pg/ml aufgeteilt. Eine mit monoklonalen IL-10-Antikörpern beschichtete Mikrotiterplatte wurde mit je 100 μ l der Standardreihe und 100 μ l der Patientenproben beschickt. Nach Abdeckung der Platte wurde diese eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem horizontalem Schüttler (DSG 304/M4 /Heidolph) bei 150 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Platte mit 400 μ l Waschpuffer pro Vertiefung mit einem Mikrotiterplatten-Waschgerät (Mikrotitration plate washer, 812 SW1, SLT Labinstruments, Deutschland) gewaschen. Nach dreimaliger Wiederholung dieses Vorgangs wurde die Platte auf einem Papierhandtuch

vorsichtig ausgeschlagen, um eventuell noch verbliebenen Waschpuffer zu entfernen. Dann wurde 100 µl IL-10-Antikörperlösung in jede Vertiefung pipettiert, die Platte erneut abgedeckt und bei 150 rpm auf dem Schüttler bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Die Mikrotiterplatte wurde anschließend wie zuvor gewaschen und ausgeschlagen.

Um die später stattfindende Enzymreaktion zu verstärken, wurden zunächst 100 µl an Peroxidase gebundenes Streptavidin (horseradish peroxidase, HRP) in die Vertiefungen hinzugegeben. Die Platte wurde wieder abgedeckt auf dem Schüttler bei Raumtemperatur mit 150 rpm für 30 Minuten inkubiert. Danach erfolgte erneut ein Waschvorgang mit drei Durchgängen mit 400 µl Waschpuffer pro Vertiefung mit dem Mikrotiterplatten-Waschgerät und anschließender Entleerung der Platte mittels vorsichtiger Ausschlagung auf einem Papierhandtuch. Zur enzymatischen Umwandlung mit einer Farbreaktion wurden nun 100 µl TMB-Substrat-Lösung (Tetramethylbenzidin und Hydrogenperoxidase) in jede Vertiefung zugegeben und die Platte abgedeckt für 15 Minuten auf dem Schüttler bei Raumtemperatur mit 150 rpm inkubiert. Diese Reaktion wurde nach der Inkubationszeit durch die Zugabe von 100 µl Stopplösung (Lösung aus 91,4 ml destilliertes Wasser und 8,6 ml konzentrierter HCl-Lösung) beendet. Leichtes Beklopfen der Platte führte dabei zu einer besseren Verteilung der Stopplösung.

Die Absorption der Farbreaktion wurde innerhalb von 30 Minuten nach dem oben beschriebenen Prozedere bei einer Wellenlänge von 450 nm mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät (Dynatech MRT500, Guernsey, Channel Island) gemessen, welches nach Eingabe der Standardwerte eine halblogarithmische Standardgerade erstellte. So konnten anschließend die optische Dichte auf der Ordinate (Y-Achse) und die Konzentration von IL-10 logarithmisch auf der Abszisse (X-Achse) linear aufgezeichnet werden. Die IL-10-Konzentrationen der Proben wurden dabei automatisch aus der gemessenen optischen Dichte und der Standardgeraden von dem Gerät errechnet.

Eine Messgrenze für die IL-10-Konzentration lag bei 5 pg/ml bei einem Intra-Assay-Variationskoeffizienten von 3,0 % und Inter-Assay-Variationskoeffizienten von 7,0 %.

4.9 Statistik

Die normalverteilten Daten (demographische Daten, Operationsverlauf und Entzündungsparameter) wurden als Mittelwert mit Standardabweichung, alle nicht-normalverteilten Daten (Vitalparameter, Medikamentenverbrauch und Immundaten) als Median mit Interquartilen (interquartil range) angegeben. Zur statistischen Analyse der Parameter zwischen den beiden Gruppen dienten der t-Test und der Man-Whitney-U-Test. Die Analyse der Verlaufsdaten zu festgelegten Zeitpunkten (Vitalparameter, RSS und Mediatoren) erfolgte mit einer einfaktoriellen nicht parametrischen Varianzanalyse mit Mess-wiederholungen (MANOVA) [13]. Ein $p \leq 0,05$ galt als statistisch signifikant. Zur Auswertung wurden die Statistikprogramme SPSS (PC-Version 10.0) und SAS V (PC-Version 8.2) verwendet.