Aus der Klinik für
Angeborene Herzfehler/Kinderkardiologie
des Deutschen Herzzentrums Berlin

DISSERTATION

Zytokinsekretion unter kardiochirurgischem Eingriff im Säuglingsalter: Einfluss des Immunstatus auf den postoperativen Verlauf

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von
Georgia Justus
aus Karlsruhe

Datum der Promotion: 09.09.2016

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis ... 2
Abkürzungsverzeichnis ... 4
Abbildungsverzeichnis ... 5
Tabellenverzeichnis ... 6
Abstrakt/Abstract ... 7
1 Einleitung ... 11
1.1 Hintergrund der Studie ... 11
1.2 Zytokinvermittelte Komplikationen nach herzchirugischem Eingriff mit CPB ... 12
1.2.1 Pathophysiologie der Inflammation ... 12
1.2.2 Pathophysiologie der Immunsuppression ... 14
1.3 Funktion einzelner Zytokine ... 16
1.4 Bedeutung moderater Hypothermie ... 18
1.5 Messung der Immunsuppression ... 18
1.6 Ziel dieser Arbeit ... 19
2 Methoden ... 20
2.1 Studienprotokoll ... 20
2.2 Messung der Zytokinkonzentrationen ... 23
2.3 Patientenkollektiv ... 23
2.4 Statistische Methoden ... 24
3 Ergebnisse ... 25
3.1 Immunsuppression ... 25
3.1.1 Zytokinsekretion nach LPS-Stimulation ... 25
3.1.2 Kinetik der Immunreaktion ... 28
3.2 Immunbalance ... 32
3.2.1 Gegenüberstellung der Ergebnisse von ILCS und DBS ... 32
3.2.2 Effekt von Hypothermie und Normothermie auf die Immunbalance ... 34
3.3 Zusammenhang der Zytokinreaktion mit klinischen Parametern ... 36
3.3.1 Operative Faktoren ... 36
3.3.2 Dauer der mechanischen Ventilation ... 37
3.3.3 Einfluss der intraoperativen Hypothermie ... 40
3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse ... 40
3.4.1 Immunsuppression und -aktivierung ... 40
3.4.2 Effekt der moderaten Hypothermie ... 41

3.4.3 Immunreaktion und Klinik 41
4 Diskussion 41
4.1 Immunsuppression 42
4.1.1 Zytokinsekretion nach LPS-Stimulation 42
4.1.2 Kinetik der Immunreaktion 44
4.2 Immunbalance 44
4.2.1 Gegenüberstellung von ILCS und DBS 44
4.2.2 Effekt von Hypothermie und Normothermie auf die Immunbalance 46
4.3 Zusammenhang der Zytokinreaktion mit klinischen Parametern 47
4.3.1 Operative Faktoren 47
4.3.2 Dauer der mechanischen Ventilation 48
4.3.3 Einfluss der intraoperativen Hypothermie 49
4.4 Limitationen der Studie 51
5 Schlussfolgerungen 52
6 Literatur 54
7 Erklärung an Eides Statt 62
8 Danksagung 62
9 Lebenslauf 64

Abkürzungsverzeichnis

ASD	Atriumseptumdefekt
CABG	Coronary artery bypass graft
CAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CARS	Compensatory anti-inflammatory response syndrome
CHD	Congenital heart disease
CK-MB	Creatinkinase muscle/brain
CLS	Capillary leak syndrome
COX	Cyclooxygenase
CPAP	Continuous positive airway pressure
CPB	Cardiopulmonary bypass
DBS	Dry Blood Spots
DHZB	Deutsches Herzzentrum Berlin
EK	Erythrozytenkonzentrat
ELAM-1	Endothelial leukocyte adhesion molecule-1
HIE	Hypoxisch ischemic encephalopathy
HO-1	Haemoxygenase 1
HSP 32	Hitzeschockprotein 32
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
IPS	Intensivpflegestation
IL	Interleukin
IL-1Ra	Interleukin-1 Rezeptorantagonist
ILCS	Instant Leukocyte Culture System
IQA	Interquartilsabstand
IU	International Unit
kDA	kilo Dalton
LDL	Low density lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharid
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
MODS	Multi organ dysfunction syndrome
NEC	Necrotizing enterocolitis
PDGF	Platelet derived growth factor
PICS	Persistent inflammation immunosuppression catabolism syndrome
PAR	Protease activated receptors
PGE_2	Prostaglandin E_2
PRR	Pattern recognition receptor
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome
NF-κB	Nuclear factor kappa B
TLR	Toll-like receptor
TNF-α	Tumornekrosefaktor alpha
TF	Tissue factor
VCAM-1	Vascular cell adhesion protein 1
VSD	Ventrikelseptumdefekt

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema pro- und anti-inflammatorischer Signalwege 15

Abbildung 2: Zeit-Temperatur-Protokoll 22

Abbildung 3: Zytokinausschüttung ex vivo nach LPS-Stimulation und24-stündiger Inkubation bei 37°C, normotherm versus hypotherm, n=10 27

Abbildung 4: Verlauf der Mediane zu den Zeitpunkten T1 (Einleitung Anästhesie), T2 (Ende CPB), T3 (4 Stunden postoperativ) 30

Abbildung 5: Reaktionsmuster der Aktivierbarkeit einzelner Zytokine unter und bis zu 4 Stunden nach kardiochirurgischem Eingriff (ILCS) 32

Abbildung 6: Parallelität von Inflammation und Aktivierung (ILCS und DBS) 34

Abbildung 7: Balance immunaktivierender und immunsuppressiver Zytokine nach LPS-Stimulation (ILCS) und im Serum (DBS). 35

Abbildung 8: Balance nach Temperatur, n=10. 36

Abbildung 9: Korrelation der Serumzytokine mit der CPB-Dauer 37

Abbildung 10: Korrelation perioperativer Parameter mit der Beatmungszeit, n=20 37

Abbildung 11: Korrelation von Zytokinkonzentrationen mit der Beatmungszeit, n=20 38

Abbildung 12: Unterschiede der Zytokinprofile nach Dauer der mechanischen Ventilation 39

Abbildung 13: Inflammation und Suppression unter CPB 45

Abbildung 14: Interaktion von Monozyten, Inflammation und Endothel 49

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Überblick häufig analysierter Zytokine 17
Tabelle 2: Patientendaten nach Randomisierung 23
Tabelle 3: Deskriptive Statistik der Zytokinkonzentrationen nach LPS-Stimulation 27
Tabelle 4: Studien zu Hypothermie und Inflammation nach kardiochirurgischem Eingriff 50

Abstrakt

Hintergrund: Bei Säuglingen mit angeborenem Herzfehler werden nach Herzoperationen mit kardiopulmonalem Bypass (CPB) überproportional häufig immunvermittelte Komplikationen wie Kapillarlecksyndrom und Organdysfunktion beobachtet. Der herzchirurgische Eingriff mit CPB verursacht eine starke Immunreaktion, die durch Induktion der pro- und anti-inflammatorischen Zytokine gekennzeichnet ist.

Ziel: Das Ziel dieser Studie ist es, den Zusammenhang von operativen Parametern, Immunreaktion und postoperativem klinischen Verlauf, operationalisiert als Dauer der mechanischen Ventilation, zu verstehen. Dafür soll der Einfluss von chirurgischem Trauma, Dauer, Flüssigkeitsbilanz und Temperatur am CPB auf den Immunstatus untersucht werden. Weiterhin wird der Zusammenhang von Immunstatus und postoperativem Verlauf analysiert.

Methoden: Das Studiendesign ist prospektiv randomisiert. Bei 20 Kindern mit einem angeborenen Ventrikelseptumdefekt (VSD) und einem Körpergewicht von 5 bis 10 kg wurde unter Normothermie oder Hypothermie von 32°C der VSD operativ verschlossen. Es wurden Blutproben zum Zeitpunkt der Anästhesie-Einleitung (T1), bei Abgang vom CPB (T2), 4 Stunden (T3) und 24 Stunden nach CPB (T4) entnommen. Es wurden IFN-γ, IL-1ß, IL-1Ra, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17, TNF-α und MCP-1 im Serum sowie nach Stimulation mit LPS gemessen.

Ergebnisse: Der kardiochirurgische Eingriff mit CPB induziert frühzeitig einen Immunstatus, der durch die Parallelität von Aktivierung der Serumzytokine und Suppression der Funktionalität der Monozyten gekennzeichnet ist. Im Rahmen der Reversion der Suppression werden IL-1Ra und MCP-1 überproportional induziert. Eine Aktivierung von IL-8, MCP-1, IL-10 und IL-1Ra im Serum korreliert ebenso wie eine Suppression von TNF-α nach LPS-Stimulation mit einer längeren Beatmungsdauer. Der bedeutendste Faktor für die Beatmungszeit ist die intraoperativ erhaltene Flüssigkeitsmenge (Spearman R=0,673, p=0,001). Diejenigen Kinder, die länger als 16 Stunden postoperativ beatmet werden mussten, hatten signifikant mehr Flüssigkeit (14,26ml/kg±12,37ml/kg bzw. 30,07ml/kg±15,04ml/kg, p=0,045) während der Operation

erhalten und zeigten signifikant höhere Serum-Konzentrationen an IL-1Ra zum Zeitpunkt T4 (369pg/ml, Spannweite 202-898pg/ml; bzw. 706pg/ml, Spannweite 338-2486pg/ml, p=0,016), MCP-1 zum Zeitpunkt T3 (1483pg/ml, Spannweite 1059-5033pg/ml, bzw. 2307pg/ml, Spannweite 945-6639pg/ml, p=0,049), und IL-6 zum Zeitpunkt T4 (61pg/ml Spannweite 22-98pg/ml bzw. 162pg/ml, Spannweite 56-229pg/ml, p=0,008) als die kürzer beatmeten Kinder.

Schlussfolgerung: Die überschießende Inflammationsreaktion nach CPB wird in unserem Kollektiv von einer transienten Einschränkung der monozytären Aktivierbarkeit begleitet. Immunsupprimierende Therapien wie eine pauschalisierte Gabe von Glukokortikoiden können die angeborene Immunität weiter reduzieren und sind daher kritisch zu prüfen. MCP-1 und IL-1Ra zeigen eine überragende Rolle in der Erholungsphase und könnten neue therapeutische Ansatzpunkte darstellen. Die intraoperative Flüssigkeitsgabe korreliert eng mit der Dauer der postoperativen mechanischen Beatmung. Aufgrund komplement- und zytokinvermittelter Permeabilitätsveränderungen unterliegen mit CPB operierte Kinder einem hohen Risiko für ein alveoläres Ödem, so dass ein möglichst restriktives Flüssigkeitsmanagement unter CPB empfohlen wird.

Abstract

***Background**: Complications mediated by cytokines, such as pulmonary edema, capillary leak syndrome and multiple organ dysfunction are observed after pediatric corrective surgery with cardiopulmonary bypass (CPB). Usage of CPB results in a strong inflammatory response characterized by the induction of pro- and anti-inflammatory cytokines.*

***Objectives**: This study aims to evaluate the effect of surgical parameters and immune status on postoperative outcome, i.e. length of mechanical ventilation. For this purpose, we analyzed the correlation between surgical trauma, intraoperative fluid balances and CPB temperature with cytokine concentrations measured in blood samples (in vivo) and after LPS stimulation (in vitro) at fixed time points. We evaluated whether postoperative outcome can be predicted by the immune status.*

***Methods**: In a prospective randomized trial, 20 children (5-10kg) with congenital ventricular septal defect were assigned to either normothermic (36°C) or hypothermic (32°C) heart surgery with CPB. In vivo concentrations and ex vivo monocyte capacity for IFN-γ, IL-1ß, IL-1Ra, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17, TNF-α und MCP-1 were measured before surgery (T1), immediately after bypass (T2), 4 hours(T3) and 24 hours after CPB (T4).*

***Results**: Instantly, CPB induces a transient systemic inflammatory response and concurrent status of immunodepression. IL-1Ra and MCP-1 play an important role in the reversion of immunodepression. Elevated serum concentration of IL-8, MCP-1, IL-10 and IL-1Ra as well as the suppression of TNF-α correlate with prolonged mechanical ventilation. Intraoperative fluid balance showed to be the most influential factor for a prolonged mechanical ventilation (R=0,673, p=0,001). Those children mechanically ventilated for 16 or more hours had received significantly more fluids during CPB (mean 14,26ml/kg±12,37ml/kg versus 30,07ml/kg±15,04ml/kg, p=0,045). They were also discovered to have higher serum concentrations of IL-1Ra (median 369pg/ml, range 202-898pg/ml versus 706pg/ml, range 338-2486pg/ml, p=0,016), MCP-1 (1483pg/ml, range 1059-5033pg/ml versus 2306pg/ml, range 945-6639pg/ml, p=0,049), and IL-6*

(61pg/ml range 22-98pg/ml, versus 162pg/ml, range 56-229pg/ml, p=0,008) than those children with shorter ventilation.

***Conclusions**: Pediatric cardiac surgery with CPB causes an immune status characterized by early inflammation and simultaneous suppression of monocyte function. Standardized glucocorticoid therapy should be evaluated carefully for each individual patient. MCP-1 und IL-1Ra have been shown to have an important function for monocyte recovery, eventually permitting new therapeutic options for controlling inflammation. Due to the fact that inflammation during cardiac surgery with CPB makes children more susceptible to cytokine mediated pulmonary edema, a restrictive management of intraoperative fluids is advisable.*

1 Einleitung

1.1 Hintergrund der Studie

Im Jahr 2013 wurden am Deutschen Herzzentrum Berlin (DHZB), Klinik für Angeborene Herzfehler/Kinderkardiologie, 609 Kinder am offenen Herzen operiert, davon ca. 70% mit kardiopulmonalem Bypass (CPB). Die Korrekturoperation des Ventrikelseptumdefekts (VSD) stellt mit ca. 10% einen der häufigsten pädiatrischen kardiochirurgischen Eingriffe dar. Ungefähr die Hälfte aller Korrekturoperationen erfolgte in moderater Hypothermie von 32°C.

Seit Anfang der 1980er Jahren ist bekannt, dass der kardiochirurgische Eingriff unter CPB eine starke Immunreaktion, gekennzeichnet durch eine verstärkte Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine wie Interleukin (IL)-1, IL-6, IL-8 und Tumornekrosefaktor alpha (TNF-α) auslöst (Lindberg 2013). In den 1990ern wurde die Beobachtung der überschießenden Inflammation nach CPB um das Syndrom der Hyporeaktivität des angeborenen Immunsystems, bzw. der „Immundepression“ ergänzt.

Inflammation und Immunsuppression nach kardiochirurgischem Eingriff gewinnen zunehmend an Bedeutung als unabhängige prädiktive Faktoren für die Entwicklung postoperativer Komplikationen. Zu den auslösenden Faktoren gehören die Aktivierung des Komplementsystems und des angeborenen Immunsystems moderiert durch Monozyten, aber auch des Gerinnungssystems nach Kontakt mit der Fremdoberfläche des extrakorporalen Kreislaufs. Viele andere Ursachen wie das operative Trauma, Ischämie- und Reperfusion, Hypotonie, Hämodilution, Fremdblutübertragung, Heparin und Protamin sowie die intraoperative Temperatur beeinflussen die Sekretion von Zytokinen. Relativ zur kindlichen Körperoberfläche bzw. zum Körpergewicht spielen die Fremdoberfläche der Schläuche, die Volumina der unter CPB bilanzierten Flüssigkeiten wie Priming, Kardioplegie oder Erythrozytenkonzentrate eine überproportionale Rolle. Mit geringerem Gewicht wachsen Komplexität und Dauer des Eingriffs und damit der Verbleib am CPB. Immunassoziierte Komplikationen wie Infektionen, Kapillarlecksyndrom, nekrotisierende Enterokolitis (NEC) und Organdysfunktion bis hin zum Multiorganversagen (MODS) sind besonders in der pädiatrischen Herzchirurgie gefürchtete Risiken für Rekonvaleszenz und Lebensqualität der Patienten.

1.2 Zytokinvermittelte Komplikationen nach herzchirugischem Eingriff mit CPB

1.2.1 Pathophysiologie der Inflammation

Experimentelle und klinische Studien der vergangenen Jahre konnten zeigen, dass nach Trauma und CPB sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem aktiviert werden. Eine zunächst lokalisierte akute Entzündungsreaktion nach Gewebeschaden kann sich zu einer systemischen Inflammation bis hin zur „Immunparalyse“ ausweiten (HD Volk 2000). Die akute, insbesondere aber die systemische Inflammation, ist durch eine monozytäre Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine IFN-γ, IL-1, IL-6, IL-8, TNF-α und MCP-1 gekennzeichnet (Allan 2010). Die freigesetzten Zytokine modulieren wiederum die Immunantwort durch eine pleiotrope Aktivierung weiterer Elemente des Immunsystems wie T-Lymphozyten und Endothel.

Die wechselseitige Beeinflussung von Endothel und Zytokinen spielt in der Medikation der Entzündung eine zentrale Rolle. Obwohl der molekulare Pathomechanismus von Zytokinen auf die Dysfunktion des Endothels noch nicht vollständig geklärt ist, zeigen klinische Studien der Sepsisforschung dass die Endotheldysfunktion durch Inflammation verursacht wird. Hohe Konzentrationen von TNF-α tragen vermutlich zur Dekomposition der Zelladhäsion des Endothels bei. TNF-α induziert eine Hochregulation pro-koagulatorischer Faktoren, der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und E-Selektin sowie des pro-inflammatorischen MCP-1 durch das Endothel (Trappe 2005). Bei länger anhaltender überschwelliger Zytokinexposition kann die Aktivierung zu endothelialer Dysfunktion bzw. zu Organdysfunktion als histopathologischem Korrelat führen (Trappe 2005). Die Bindung von Thrombin an proteaseaktivierbare Rezeptoren (PAR) des Endothels induziert wiederum die Synthese inflammatorischer Zytokine durch das Endothel. Eine Folge können kleinste Thromben insbesondere im Bereich der Mikrozirkulation sein.

Neben Komplement C3 und C5 identifizierte die Arbeitsgruppe um Bocsi et al. TNF-α und IL-10 als Ursache für Schrankenstörungen des vaskulären Endothels (Bocsi 2002). Bei Säuglingen mit CLS nach einer Herzoperation konnten signifikant höhere Serumkonzentrationen von TNF-α gemessen werden (Seghaye 1996). Henrich et al. beurteilen IL-6 als möglichen Co-Initiator der Degradation der Glykokalix des Gefäßlumens, deren Bestandteile Syndecan, Heparansulfat, ICAM-1 und VCAM-1 im Plasma mit der Schwere der Entzündung korrelieren (Henrich 2010). In einer experimentellen Studie von Cromer et al. wird die verminderte Expression von VE-

Cadherin und ß-Catenin durch IFN-γ als Ursache einer lymphatischen Schrankenstörung vermutet (Cromer 2013).

Im Stadium der Sepsis erfolgt zusätzlich eine Freisetzung von Tissue Factor (TF) aus aktivierten Monozyten, wodurch das extrinsische Gerinnungssystem angeregt wird. Systemische Inflammation kann IL-6- und TNF-α-vermittelt über eine anfängliche Hyperkoagulopathie zum Auslöser einer disseminierten intravasalen Gerinnung werden (Osterud 2001). Dagegen wird als Primärreaktion auf CPB eine Thrombozytopenie beschrieben, die durch extrakorporale Thrombozytenadhäsion und -aktivierung die Koagulationskapazität bei Kindern nach Herzoperation herabsetzt (Bønding 2014). Ranucci et al. beschreiben eine heparinunabhängige Verminderung der Thrombozytenzahl, die mit der hypothermen CPB-Temperatur assoziiert ist (Ranucci 2009).

Das Kapillarlecksyndrom (CLS) ist als schwere Komplikation nach CPB insbesondere nach langen komplizierten Operationsverläufen gefürchtet. In einer klinischen Studie von Bocsi trat ein CLS nach CPB bei 29 von 75 (Bocsi 2002), laut einer Arbeit von Seghaye bei 13 von 24 pädiatrischen Patienten auf (Seghaye 1996). Bereits 10 Minuten nach Start des CPB konnte ein intravasaler Albuminverlust gemessen werden. Auch Seghaye vermutet neben präoperativ erhöhten C3- und C5-Konzentrationen als Ursache für endotheliale Permeabilitätsveränderungen TNF-α.

Für das nichtkardial verursachte Lungenödem nach CPB konnte Yang nachweisen, dass eine spezifische Domäne von TNF-α die Internalisierung des alveolaren eNAC Kanals induziert (Yang 2010). Dadurch kommt es zu einer vermehrten Ansammlung und einem vermindertem Abbau von interstitieller Flüssigkeit, dem alveolären Ödem.

Neben den beschriebenen zytokinvermittelten Effekten trägt die relative Ischämie des Splanchnikusgebiets unter CPB zur intestinalen epithelialen Funktionsstörung bei. Die Translokation von Endotoxin aus dem Darm kann eine Exazerbation des Systemic inflammatory response syndroms (SIRS) zur Sepsis verursachen. Gemäß einer klinischen Studie von Jargon et al. korrelierten IL-6 und IL-8 signifikant mit der intestinalen Permeabilität (Jargon 2005).

1.2.2 Pathophysiologie der Immunsuppression

Neben der früh und häufig geschilderten Inflammation, wird das Phänomen der Immunsuppression nach Trauma (Kimura 2010, Tschoeke 2007), chirurgischem Eingriff (HD Volk 2002, Hensler 1997), Schlaganfall (Meisel 2008), Hämorrhagie (Stephan 1987), sowie kardiochirurgischem Eingriff mit CPB (Allen 2002, Frazier 2008) beschrieben. Neben den genannten Studien zeigen auch zahlreiche andere Arbeiten einen direkten Zusammenhang der Immunsuppression mit einem erhöhten Infektions- und Sepsisrisiko (Haeusler 2008, HD Volk 2000, Monneret 2006).

Das Modell der Immunsuppression reflektiert primär die monozytäre Sekretionskapazität, die in vivo nicht isoliert vom adaptiven Immunsystem agiert. In vitro Experimente auf Basis von LPS- bzw. IL-10-stimulierten Monozyten zeigen, dass eine persistierende Herabregulation der monozytenspezifischen MHC-II Klasse Moleküle (HLA-DR, HLA-DP und HLA-DQ) mit einer gestörten Induktion der Antigen-spezifischen T-Zellproliferation assoziiert ist, wobei die LPS-induzierte Suppression stärker war und länger andauerte (Wolk 1999). Als mögliche Mediatoren einer Immundepression werden immunmodulatorische Zytokine wie IL-10, Prostaglandin E_2 (PGE_2), Transforming growth factor-β (TGF-β), die Haemoxygenase, Katecholamine und Cortisol diskutiert.

Korrelationsbasierte klinische Studien erklären die Immunsuppression als Gegenregulation einer überschießenden Inflammationsreaktion, vermittelt insbesondere durch anti-inflammatorisches IL-10 (Klava 1997, Abe 2008). IL-10 inhibiert die Gentranskription für IL-1ß, IL-6 und TNF-α (Wang 1994) bzw. die intrazelluläre Signalkaskade nach LPS-Bindung von der Tyrosinkinase p56lyn bis zu Ras (Geng 1994). Die IL-10-vermittelte Hemmung von Antigenpräsentation und Transkription scheint reversibel zu sein, es ist daher anzunehmen, dass an einer langanhaltenden Immundepression zusätzliche Mediatoren beteiligt sind (Sievers 2010). Eine über mehrere Tage anhaltende überschwellige Stimulation von Monozyten durch IL-10 induziert die Umwandlung von Monozyten zu einem neuartigen Zelltyp mit hoher HLA-DR- und niedriger CD86-Expression. In einer Untersuchung von Schönbein waren die TNF-α-Synthesekapazität dieser Monozyten sowie die Stimulationsfähigkeit der CD4(+) T-Zellen stark eingeschränkt (Schönbein 2008). Ein Modell von Li zeigt, durch welche Signalwege es nach LPS-Stimulation gleichzeitig zur Transkription pro- und anti-inflammatorischer Gene kommt (Li J 2013).

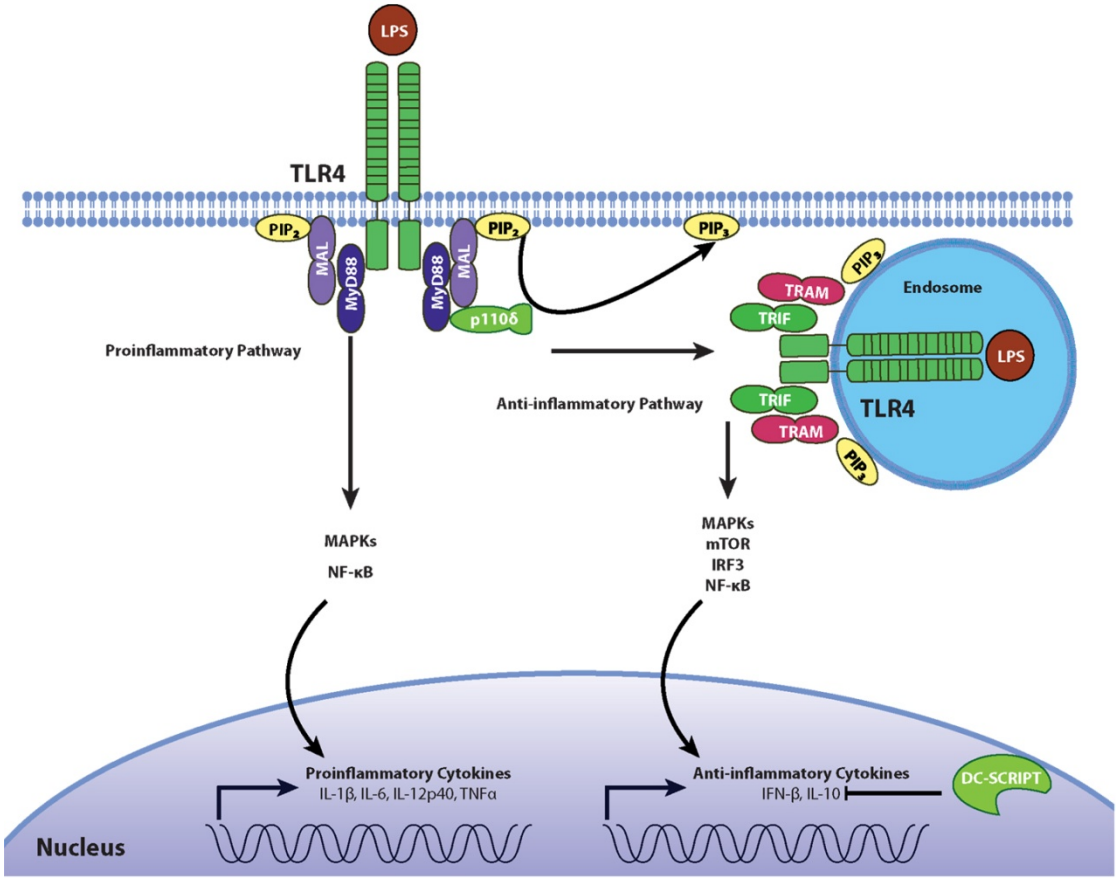


Abbildung 1: Schema pro- und anti-inflammatorischer Signalwege
Die TLR4-Aktivierung durch LPS führt zur Rekrutierung der Adaptoren TIRAP/MAL und MyD88 und induziert die Synthese inflammatorischer Zytokine durch die MAP-Kinasen JNK und p38 sowie den Trankskriptionsfaktor NF-κB. Die Phosphorylierung von PIP2 zu PIP3 durch eine Isoform der PI3-Kinase (p110δ) verursacht die Internalisierung des Rezeptor-Liganden-Komplexes in das Endosom. Endosomales TLR4 induziert über MAP-Kinasen, NF-κB, und IRF3 die Sekretion von IL-10 und IFN- (modifiziert nach Li J 2013).

Auch das durch die Cyclooxygenasen COX-1 und COX-2 synthetisierte PGE_2 wird mit der verminderten Aktivierbarkeit der primären Immunantwort in Verbindung gebracht (Harizi 2006). Erhöhtes PGE_2 supprimiert die Ia-Antigenexpression auf der Monozytenoberfläche und reduziert über eine Erhöhung des intrazellulären cAMP die membranständige IL-1 Expression auf Makrophagen (Kunkel 1988). Andere Studien wiederum berichten eine Beteiligung des Hitzeschockproteins (HSP)-32 Haemoxygenase (HO)-1 als möglichen Trigger der Immundepression (Sievers 2010). Auch das anti-inflammatorische TGF-β wird als Mediator der Einschränkung der Immunantwort diskutiert (Harizi 2006, Peters 2014). In einer Zellkulturstudie konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung von isolierten Monozyten mit TGF-β die LPS-

induzierte Differenzierung zu dendritischen Zellen hemmt, wodurch ihre Fähigkeit der T-Zell-Aktivierung vermindert wird (Fogel-Petrovic 2007).

Auch Noradrenalin, Adrenalin und Cortisol sind in der Lage, an Rezeptoren auf der Monozytenoberfläche zu binden und die intrazelluläre Weiterleitung von pro-inflammatorischen Signalwegen zu inhibieren (Neumann 2003, Madden 1995, Bone 1996). Cortisol wirkt auf die pro-inflammatorischen Zytokine IL-1, IL-6, IL-8 inhibierend, auf die anti-inflammatorischen Zytokine IL-1Ra und IL-10 aktivierend. Speziell Cortisol scheint eine Immunparalyse, also komplette und langfristige Immundepression, aufrechtzuerhalten. Volk et al. konnten zeigen, dass Methylprednisolon unter CPB zu einer stärkeren Suppression der angeborenen Immunität führte als der Bypass allein (T. Volk 2001). In diesem Zusammenhang unterscheiden manche Studien zwei Polarisierungsformen der Monozyten, M1 und M2, mit eher pro- bzw. anti-inflammatorischer Funktion (Kim 2010), andere Autoren gehen dagegen davon aus, dass es lediglich durch die Aktivierung unterschiedlicher Signaltransduktionswege zur Dominanz einer pro- bzw. anti-inflammatorischen Zytokinsynthese kommt (Mills 2000, Poloso 2013).

1.3 Funktion einzelner Zytokine

Monozyten erkennen Pathogene mit Hilfe von einer großen Anzahl an Oberflächenstrukturen (Pattern recognition receptor, PRR), u.a. Scavenger Rezeptoren für die Bindung von Low-Density-Lipoprotein (LDL), Mannose- und Glukanrezeptoren für die Bindung von Kohlehydraten, sowie Toll-like-Rezeptoren (TLR-2, TLR-4) zur Bindung von Lipopolysaccharid (LPS) aus der Zellwand Gram-negativer Bakterien. Aktivierte Monozyten sezernieren u.a. die pro-inflammatorischen Zytokine IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF-α bzw. die anti-inflammatorischen Zytokine IL-1Ra und IL-10. Abhängig von Stimulus und stimuliertem Zelltyp können Interleukine unterschiedliche Effekte haben, weshalb eine Einteilung als rein pro- bzw. anti-inflammatorisch zu kurz greift. IL-6 wird beispielsweise aufgrund der Stimulation der hepatischen Akutphasereaktion primär als pro-inflammatorisch klassifiziert, IL-6 induziert aber auch anti-inflammatorisch wirkende Glukokortikoide (Steensberg 2003, Diehl 2002). Folgende Tabelle gibt einen Überblick über Herkunft und Effekte häufig untersuchter Zytokine.

Tabelle 1: Überblick häufig analysierter Zytokine

Zytokin	Sezerniert von	Zielzellen	Immunologische Effekte	Molekular-gewicht (kDa) (Entry bei uniprot.org)
IL-1ß	Monozyten, T-Lymphozyten, B-LZ, NKZ, Endothel, Epithelzellen	T- u. B-Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten, Hepatozyten	Pro-inflammatorisch, Hochregulation von ICAM, ELAM, IL-6, IL-8, Akutphasereaktion, fördert Hämatopoese (Gearing 1992)	19,348 (P01584)
IL-1Ra	Monozyten	Endothel	Anti-inflammatorisch, Antagonist am IL-1a- und IL-1ß- Rezeptor, induziert selbst keine zelluläre Antwort, Hochregulation durch IL-10 (Perrier 2006, Cassatella 1994) , Akutphaseprotein, HWZ 60-90 min	22,055 (P18510)
IL-6	T- LZ, B-LZ, Monozyten, Endothel	B-, T- und NK-Zellen, Thymozyten	Pro-inflammatorisch, auch regulatorische Effekte auf TNF-α, IL-10, T-Zellen; induziert B-Zelldifferenzierung (Xing 1998, Steensberg 2003), HWZ 16 min	23,718 (P05231)
IL-8	T-Zellen, Monozyten, Granulozyten	T- und B-Zellen, Mastzellen und Thymozyten	Chemotaxis, Rekrutierung und Adhäsion von Neutrophilen und Monozyten zum Endothel (DeForge 1991), HWZ 60 min	11,098 (P10145)
IL-10	T-LZ, Mastzellen, Keratinozyten Monozyten,	T-, NK- und B-Zellen, Mastzellen und Monozyten	Herabregulation der Funktion von TH1 und TH2-LZ, Antagonist von Interleukin 12, induziert IL-1Ra, wird verstärkt durch Cortisol (Wang 1994) und andere Katecholamine (Platzer 2000) HWZ 60-180 min	22,517 (P22310)
IL-12 (p70)	B-Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten	Monozyten, Makrophagen, B-Zellen, Dendritische Zellen	Pro-inflammatorisch, teils anti-inflammatorisch über IL-10 Aktivierung, Induktion einer Th_1 Immunantwort, stärkster Aktivator für IFN-γ (Spolarics 2003)	73,109 (P42701)
IL-17	T-Lymphozyten	Stromazellen und Fibroblasten	Pro-inflammatorisches Zytokin, Chemokineigenschaften für Neutrophile, Migration von Neutrophilen ins Endothel (Roussel 2010)	17,504 (P16552)
IFN-γ	T-Lymphozyten, NKZ	T-, B-Lymphozyten, Monozyten, NK Zellen	Differenzierung von T-Zellen zu CD8+T-Zellen, von Monozyten zu Makrophagen, Hochregulation der MHCII-Expression, Selektion des AK Isotyps, Reversion der Immunsuppression (Thiele 2009)	19,348 (P01579)
TNF- α	Monozyten, T-Lymphozyten, NKZ,	Monozyten, Granulozyten, Gefäßendothel, alle kernhaltigen Zellen	Proinflammatorisches Zytokin, induziert Apoptose (de Jong 2012) HWZ 14-18 min	25,644 (P01375)
MCP-1 (CCL2)	Endothel, Monozyten	T-, B- und NK-Zellen, Thymozyten, Monozyten	Chemotaxis von Monozyten (auch aus dem Knochenmark) und Basophilen zum Ort der Entzündung, Leukozyten-aktivierung, -chemotaxis und –adhäsion (Deshmane 2013). Wird durch PDGF aktiviert. Hochregulation während Sepsis (Sugitharini 2013)	11,025 (P13500)

Die Angaben zu den Molekulargewichten entstammen der Proteindatenbank uniprot/proteinknowledgebase.org.

1.4 Bedeutung moderater Hypothermie

Der Einsatz der intraoperativen Hypothermie galt viele Jahre lang als Goldstandard in der Herzchirurgie. Trotz intensiver grundlagentheoretischer und klinischer Forschung sind die Ergebnisse widersprüchlich. Mittlerweile wird insbesondere die tiefe (<32°C), aber auch die moderate (32°C-34°C) Hypothermie restriktiv beurteilt, da Studien neben der erwünschten kardio- und neuroprotektiven Wirkung ein erhöhtes Risiko für einen ungünstigen postoperativen Verlauf zeigten. Eine Metaanalyse aus dem Jahr 2013 mit 900 erwachsenen Patienten kam zu dem Ergebnis, dass eine therapeutische Hypothermie von 32°C Morbidität und Mortalität nach Herzstillstand nicht beeinflusst (Nielsen 2013). Die Ergebnisse einer Meta-Analyse von Xiao befürwortet therapeutische Hypothermie nach Herzstillstand (Xiao G 2013, n=13000), die Vergleichbarkeit der zugrundeliegenden Daten wird von anderen Autoren wiederum in Frage gestellt (Patel 2012). Ein Review von Murphy zitiert zahlreiche Studien mit diskrepanten Ergebnissen klinischer Untersuchungen bezüglich des Effekts der intraoperativen Hypothermie während kardiochirurgischer Eingriffe auf Gerinnung, Transfusionsbedarf, neurologisches Outcome und Myokardprotektion. Der Autor kommt zu dem Schluss: "*Current evidence does not support one temperature management strategy for all patients*" (Murphy 2009, S.1417). Vor dem Hintergrund einer überschießenden Immunreaktion ist nun besonders eine mögliche Modulation der Zytokinsekretion durch die Bypass-Temperatur interessant. Ein Überblick über die aktuelle Studienlage wird in Kapitel 4.3.3. im Rahmen der Diskussion gegeben.

1.5 Messung der Immunsuppression

Eine Dysfunktion der angeborenen Immunität kann nicht primär durch niedrige Serumkonzentrationen gemessen werden, da die Referenzwerte der Serumzytokine eines gesunden Erwachsenen für IL-1ß unter 5pg/ml, für IL-6 unter 6pg/ml, für IL-8 unter 15pg/ml, für IL-10pg/ml unter 9pg/ml, für TNF-α unter 8pg/ml liegen (Siemens Immulite). Es ist daher notwendig, die momentane Aktivierbarkeit der Monozyten als Modell für eine Immunsuppression zu untersuchen.

Eine verminderte Expressionsdichte der monozytären HLA-DR-Moleküle korreliert stark mit dem Ausmaß einer erworbenen zellulären Immundefizienz, wobei als unterer Referenzwert 15000 AK/Monozyt gelten und unter 5000 AK/Monozyt von Immunparalyse gesprochen werden kann (Diagnostik Bulletin des Labor Berlin). Die HLA-DR Expression korreliert sowohl mit der Antigen-präsentierenden Fähigkeit als auch mit der Sekretionskapazität der Monozyten (Döcke 2005). Aufgrund ihrer einfachen Quantifizierung stellt die Messung der HLA-DR Moleküle pro Monozyt ein gutes Korrelat der Aktivierbarkeit dar.

Die Aktivierbarkeit der Monozyten lässt sich durch Messung der Zytokinausschüttung nach LPS-Stimulation darstellen. Diese Methodik ermöglicht neben der Quantifizierung auch eine Differenzierung der Monozytenfunktionalität in der Depressionsphase. Foey et al. weisen darauf hin, dass die Synthesekapazität für bestimmte Zytokine bedeutend von der Art des aktivierenden Signals abhängt (Foey 1998). Folglich sind nicht alle Signalwege gleichartig während der Suppression verändert. Die Suppression der Monozyten korreliert zwar eng mit der HLA-DR Expression, wird aber durch Veränderungen anderer Oberflächenantigene moduliert. So kann bei einer signifikanten Reduktion der HLA-DR Expression bzw. in der Phase der Immunsuppression dennoch eine unterschiedlich starke Ausschüttung einzelner Zytokine möglich sein.

1.6 Ziel dieser Arbeit

Diese Arbeit widmet sich der Charakterisierung der Immunantwort nach VSD-Korrekturoperation. Dazu ist es notwendig, die Reduktion der Monozytenkapazität im Gesamtbild einer gleichzeitig stattfindenden Aktivierung bzw. Inflammationsreaktion unter CPB zu untersuchen.

Zentrale Fragestellungen hinsichtlich des Einflusses auf das Immunsystem sind:

a. Welche Rolle spielen pro-inflammatorische (IL-1ß, IL-6, IL-8, TNF-α) bzw. anti-inflammatorische Zytokine (IL-1Ra, IL-10)?
b. Sind zytokinspezifische Reaktionsmuster identifizierbar?
c. Welchen Zusammenhang gibt es zwischen Aktivierbarkeit der Monozyten und Aktivierung der Serumzytokine?

d. Wie verschiebt sich die Balance von aktivierenden und supprimierenden Zytokinen unter Operation mit CPB?

Unsere Daten ermöglichen weiterhin eine Untersuchung des Einflusses operativer Parameter auf Immunreaktion. Hierbei ist es das Ziel, auslösende Faktoren der Immunantwort zu quantifizieren:

a. Wie korrelieren OP-Zeit, CPB-Zeit und Flüssigkeitsbilanz an der HLM mit Inflammation bzw. Reduktion der Sekretionskapazität?
b. Hat die Dauer der extrakorporalen Zirkulation einen Einfluss auf die gemessenen Zytokinkonzentrationen?

Zentral geht es in dieser klinisch orientierten Arbeit um die Frage des Zusammenhangs der Immunsuppression und Inflammation mit dem klinischen Verlauf. Der klinische Verlauf wird operationalisiert als Dauer der mechanischen Ventilation.

Eine weitere zentrale Frage ist, welche Faktoren die Dauer der Beatmung beeinflussen:

a. Welche immunspezifischen und operativen Parameter verlängern die Dauer der Beatmung?
b. Unterscheiden sich kurz bzw. lang beatmete Kinder in dem gemessenen Zytokinprofil?

Schließlich soll geprüft werden, ob es möglich ist, durch eine moderate intraoperative Kühlung der Körperkerntemperatur auf 32°C die Immunantwort zu modulieren.

2 Methoden

2.1 Studienprotokoll

Von Mai 2008 bis November 2009 wurden nach schriftlicher Einverständniserklärung durch die Eltern 20 Kinder in die prospektiv randomisierte Studie eingeschlossen. Einschlusskriterien waren ein Körpergewicht von 5-10kg sowie ein mit Echokardiographie diagnostizierter Ventrikelseptumdefekt. Ausgeschlossen wurden Kinder mit Pulmonalklappenstenose, Fallot`scher Tetralogie, univentrikulärer Herzphysiologie oder mit kardialen Anomalien mit erheblicher hämodynamischer Auswirkung. Ausgeschlossen wurden weiterhin Patienten mit fehlender Einwilligung der Eltern. Nach Randomisierung wurden 10 Patienten normotherm (36°C), 10 Patienten

unter milder Hypothermie (32°C) operiert. Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission der Charité-Universitätsmedizin Berlin im Juni 2007 (EA/082/07) genehmigt.

Im Rahmen des standardisierten Anästhesieprotokolls erfolgte eine orale Prämedikation mit Midazolam (Roche Pharma AG Grenzach-Wyhlen; 0,5mg/kg). Für die Einleitung wurde Sufentanil (Janssen-Cilag GmbH, Neuss; 1-2,5µg/kg), Etomidat (Etomidat-Lipuro 0,2%; Braun Melsungen AG; 0,2mg/kg), und Pancuronium (Actavis GmbH&Co KG, Langenfeld; 0,1mg/kg) verwendet. Die Anästhesie wurde mit Sufentanil (0,8µg/kg/h) und Disoprivan (Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg; 5mg/kg/h) aufrechterhalten.
Die Antikoagulation während des CPB wurde mit Activated Clotting Time (ACT) gesteuert mit einem Ziel von 480sec. Für die Antagonisierung der Antikoagulation wurde Protamin (Valenant Pharmaceuticals Deutschland GmbH, Eschborn) verwendet.
Als CPB kam die Mast-Mounted Pump (Stöckert Instrumente München) zum Einsatz.
Als Priming wurde Deltajonin 200ml, Heparin 5000IE, Tranexamsäure 100mg/ml verwendet. 100ml Primingflüssigkeit enthalten: Natriumacetat 0,27g; Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat 0,156g; Natriumchlorid 0,088g; Kaliumchlorid 0,186g; Magnesiumchlorid-Hexahydrat 0,050g; Glukose-Monohydrat 5,5g; Aqua iniectabilia.
Die Temperaturkontrollen erfolgten in der Harnblase und dem Ösophagus. Die Kühlungszeit von der Ausgangstemperatur bis zur Zieltemperatur von 32°C betrug 16,6±4,4min, die Dauer der minimalen Temperatur 30,6±15,5min, die Erwärmungszeit 18,67±4,15min.
Als Kardioplegielösung wurde „Kirsch-Kardioplegie“ (Charité, Berlin, Deutschland) verwendet. 100ml enthalten: Magnesium–L-Hydrogenaspartat 2,575mg, Procain-HCl 0,3g; Xillit 4,5g; Aqua ad iniectabilia.
Methylprednisolon (MP) wurde in der Dosierung 30mg/kg Körpergewicht verabreicht.
Der CPB-Fluss war nicht-pulsatil. Mit Cellsavertechnologie (Dideco Electa Essential Concept, Sorin, Italien) gefiltertes Erythrozytenkonzentrat wurde ab einem Hämatokrit von 25% unter CPB transfundiert. Bei bestehender Blutungsneigung bei Abgang vom CPB wurde Fresh Frozen Plasma (10ml/kg) transfundiert. Zur Prävention von Blutungen am CPB wurde Tranexamsäure (50µg/kg) verwendet.

Postoperativ erfolgte die Analgesie durch Piritramid (0,1mg/kg, nach Bedarf) und Metamizol (10mg/kg). Für die Sedierung unter Beatmung wurde Midazolam (3-3,9 µg/kg/min) verwendet.
Als Extubationskriterien wurde ein PaO_2 >80mmHg, FiO_2 von 0,4 bzw. $PaCO_2$ von 35-40mmHg unter CPAP festgelegt.

Im Folgenden ist das Zeit-Temperatur-Protokoll für die Blutentnahmen dargestellt.

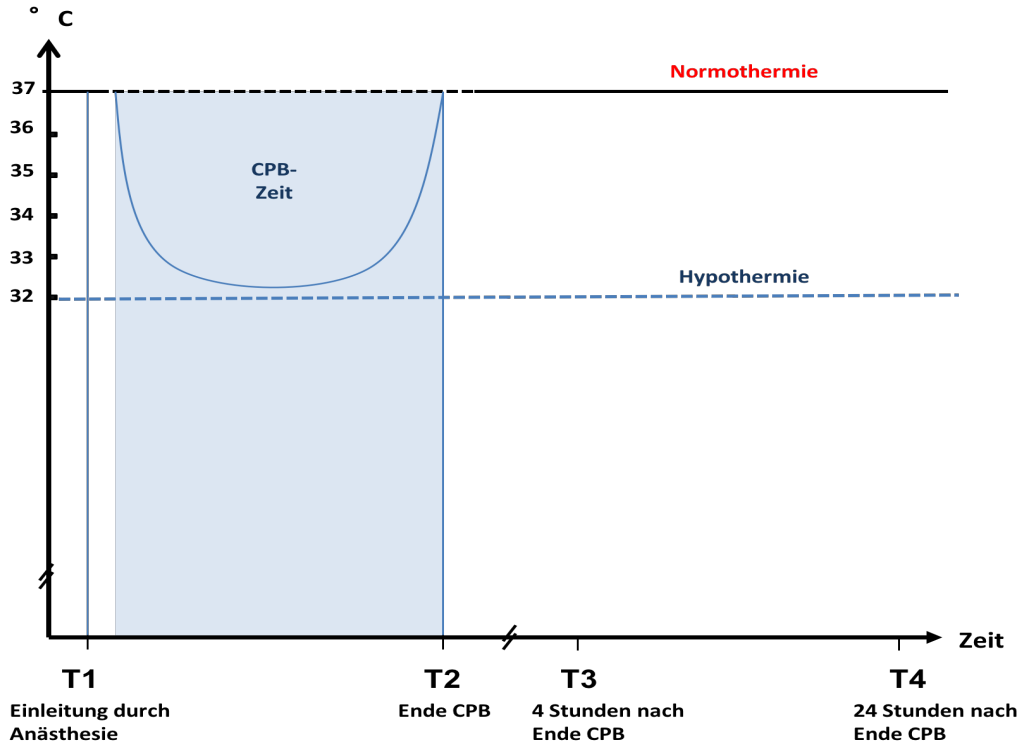


Abbildung 2: Zeit-Temperatur-Protokoll

Die Probeentnahmen erfolgten für die ILCS und DBS Messungen zu den Zeitpunkten:

T1: Einleitung der Narkose durch die Anästhesie

T2: Unmittelbar nach Abgang vom CPB

T3: 4 Stunden nach Abgang vom CPB

Eine weitere Probeentnahme wurde nur für die Serumkonzentrationen (DBS) zum Zeitpunkt

T4: 24 Stunden nach Abgang vom CPB durchgeführt.

2.2 Messung der Zytokinkonzentrationen

Ex vivo Zytokinbestimmung mit Instant Leukocyte Culture System (ILCS): Nach Blutentnahme mittels des TruCulture® Blood Collection Systems der Firma EDI/Myriad RBM wurden die Vollblutproben unzentrifugiert mit einem standardisierten LPS (100ng/ml Typ E. coli, O55:B5) stimuliert und 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Als Stimulationsfaktor wurde standardisiertes LPS verwendet, das gemäß einer experimentell getesteten Dosis-Wirkungskurve zu einer submaximalen Aktivierung der Monozyten führt. Um die Stimulation zu beenden wurde die Filtermembran innerhalb des Stempels der Teströhrchen heruntergedrückt, so dass Sediment und Plasma getrennt werden. Das Instant Leukocyte Culture System (ILCS) behält die natürlichen Umgebungsbedingungen der immunkompetenten Zellen möglichst weit bei. Die Konzentrationsmessungen von IFN-γ, IL-1ß, IL-1Ra, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, MCP-1 und TNF-α erfolgten mittels Luminex-Technologie durch die Firma EDI GmbH, Aspenhausstraße, Reutlingen.

Direkte Messung der Serumzytokine mit Dry Blood Spots (DBS): Zwei venöse Blutstropfen wurden auf eine Filterkarte getropft und nach Trocknung bei -80°C eingefroren. Zusätzlich wurde eine Probe 24 Stunden nach Abgang von der HLM (T4) entnommen. Die Konzentrationen von IFN-γ, IL-1ß, IL-1Ra, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, MCP-1 und TNF-α wurden mit Luminex-Technologie durch das Naturwissenschaftliche und Medizinische Institut (NMI) an der Universität Tübingen bestimmt.

2.3 Patientenkollektiv

Die Randomisierung der beiden Kohorten mit je 10 Patienten erfolgte anhand Lebensalter, Körpergewicht, kardiopulmonaler Bypasszeit, Aortenklemmzeit und minimaler Körpertemperatur.

Tabelle 2: Patientendaten nach Randomisierung

Demograph. Daten	Normotherm	Hypotherm	P-Werte
Alter	8,6±10,41	7,6±5,9	0,81
Körpergewicht	7,0±1,5	7,5±2,2	0,60
Körperoberfläche (m2)	0,37	0,38	0,70
Geschlecht (m/w)	5/5	7/3	

Operative Parameter	Normotherm	Hypotherm	P-Werte
OP Dauer (h)	2,3±0,9	2,31±1,3	0,99
CPB-Zeit(min)	70,4±20,9	80,6±39,3	0,48
Aortenklemmzeit (min)	46,0±18,5	49,3±24,1	0,74
Minimaltemperatur während CPB	35,9±0,8	31,8±1	0,00
CPB Fluss (l/min)	1,14±0,18	1,17±0,2	0,78
Plegielösung (ml/kg)	97,0±56,8	70,0±50,3	0,28
Bilanz CPB (ml/kg)	152,1±92,1	138,3±96,0	0,75
Adrenalin intraop. (µg/kg/min)	0,04±0,03	0,05±0,04	0,89
EK während CPB (ja/nein)	4/6	5/5	
Blutbild	**Normotherm**	**Hypotherm**	**P-Werte**
1. Blutentnahme präoperativ			
Hb präoperativ (g/dL)	11,6±0,9	12,3±1,1	0,17
Leukozyten präoperativ (*10^9/l)	13,8±3,7	14,1±9,0	0,93
Monozyten präoperativ (*10^9/l)	1,06±0,53	0,81±0,43	0,27
2.Blutentnahme (h nach CPB)	***1,25***	***1,22***	
Hb postoperativ (g/dl)	12,5±3,5	11,8±2,7	0,89
Leukozyten (*10^9/l)	16,2±6,1	15,7±5,6	0,85
Monozyten (*10^9/l)	1,28±0,42	1,02 ±0,68	0,32
Neutrophile (*10^9/l)	10,0±4,5	8,5±4,1	0,44
3.Blutentnahme (h nach CPB)	***15,3***	***17,5***	
Hb postoperativ (g/dL)	12,8±3,2	13,5±2,5	0,65
Leukozyten (*10^9/l)	12,8±2,8	16,0±5,2	0,10
Monozyten (*10^9/l)	2,31±0,94	1,50±0,74	0,05
Neutrophile (*10^9/l)	10,5±3,7	8,3±2,4	0,47
CRP präoperativ (mg/dl)	0,15±0,2	0,16±0,3	0,95

Mittelwerte ± Standardabweichung

2.4 Statistische Methoden

Zytokinkonzentrationen und klinische Daten wurden mit dem Kolmogorov-Smirnov und dem Shapiro-Wilk Test auf Normalverteilung getestet. Eine Normalverteilung wurde angenommen, wenn beide Tests die Normalverteilung nicht ablehnten ($p<0,05$). Die demographischen Daten sind weitgehend normalverteilt und wurden daher in der Übersichtstabelle als Mittelwerte mit Standardfehler angegeben. Da eine Normalverteilung für die Mehrzahl der gemessenen Zytokinkonzentrationen ausgeschlossen werden konnte, wurden für alle statistischen Berechnungen nicht-parametrische Tests verwendet. Gruppenunterschiede zwischen hypotherm und normotherm operierten Kindern wurden mit dem Mann Whitney-U Rangsummentest für nicht-parametrische Daten analysiert. Für normalverteilte Daten wurden die Ergebnisse

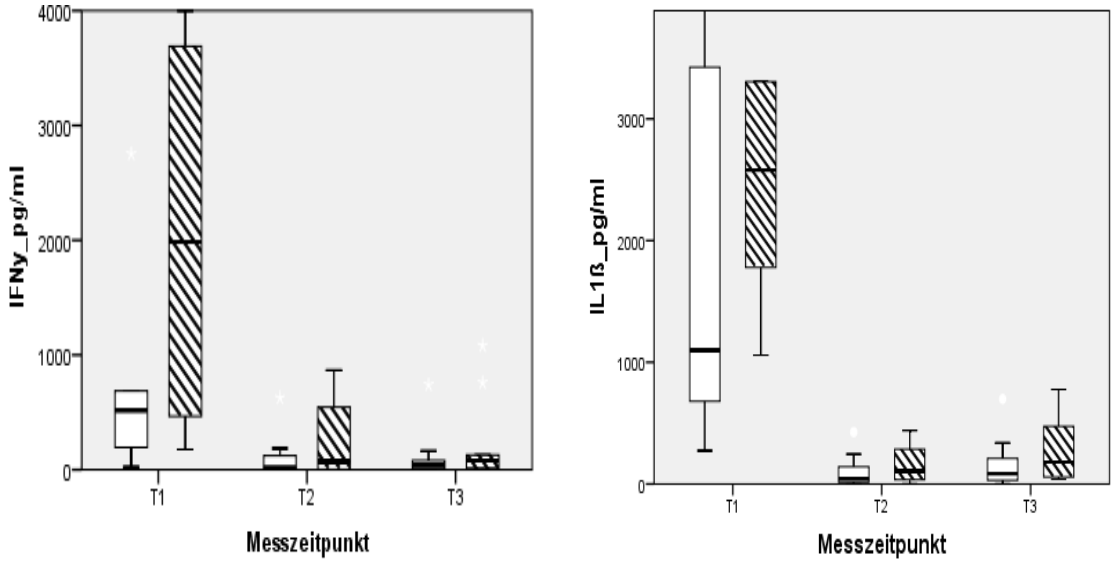
mithilfe des T-Tests überprüft. Die Zytokinkinetik wurde mit dem Wilcoxon Test für nicht-parametrische verbundene Stichproben mit Messwiederholung getestet. Die nicht-parametrische Korrelationsanalyse basiert auf Spearman. Es wurden zum einen Korrelationen innerhalb der Gesamtpopulation berechnet, zum anderen die Korrelationen innerhalb der normothermen versus hypothermen Gruppe verglichen. Die Analyse von Gruppenunterschieden nach Temperatur, CPB-Dauer und Beatmungsdauer basieren auf Rangkorrelationskoeffizienten nach Mann-Whitney-U. Autokorrelationen zwischen mehreren Variablen wurden mittels partiellen Korrelationsanalysen nach Spearman ausgeschlossen. Als Software wurden SPSS (PASW-Statistics 21; SPSS Inc.; IBM; USA), MS Excel 2007 sowie MS Office 2007 verwendet.

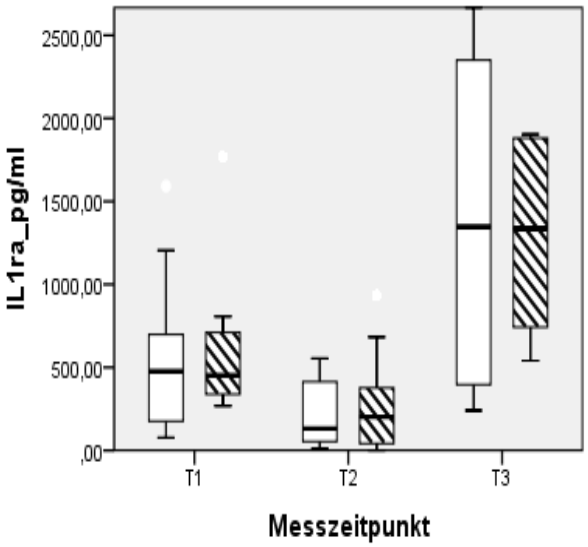
3 Ergebnisse

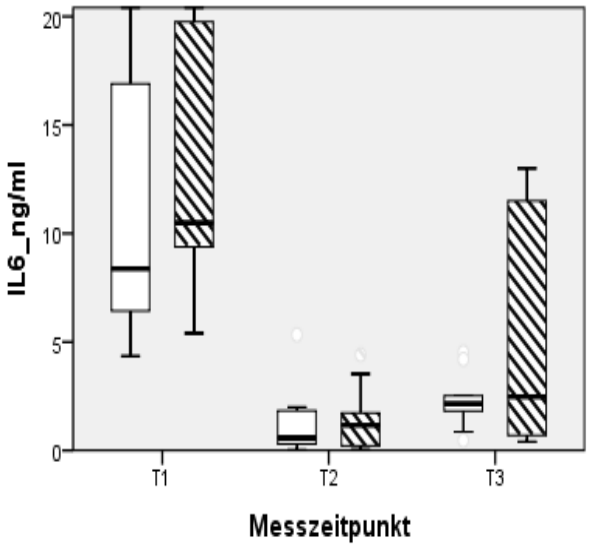
3.1 Immunsuppression

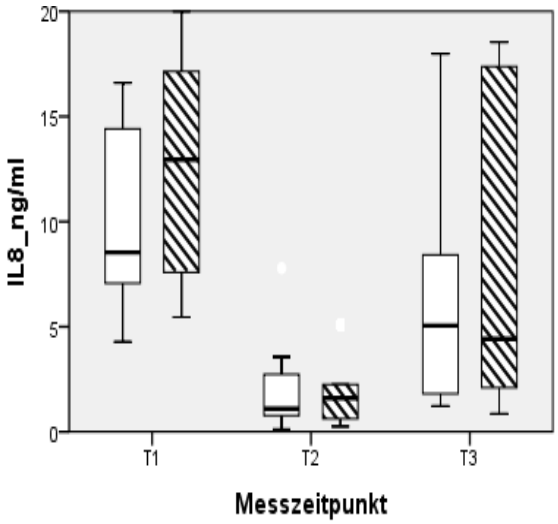
3.1.1 Zytokinsekretion nach LPS-Stimulation

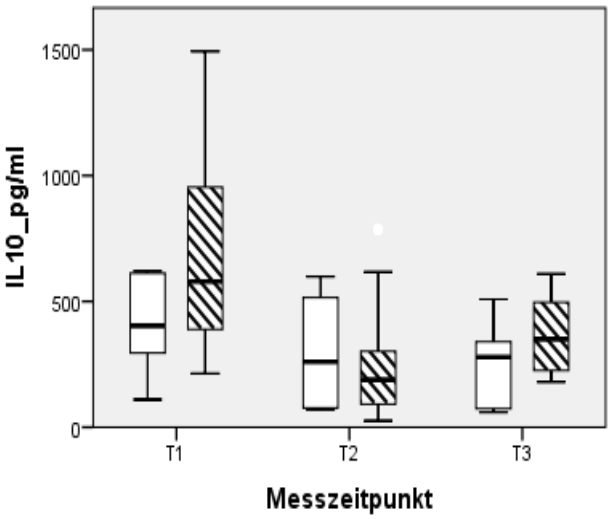
Die in Abbildung 3 dargestellten Grafiken geben Überblick über den zeitlichen Verlauf der Stimulierbarkeit der untersuchten Proben.

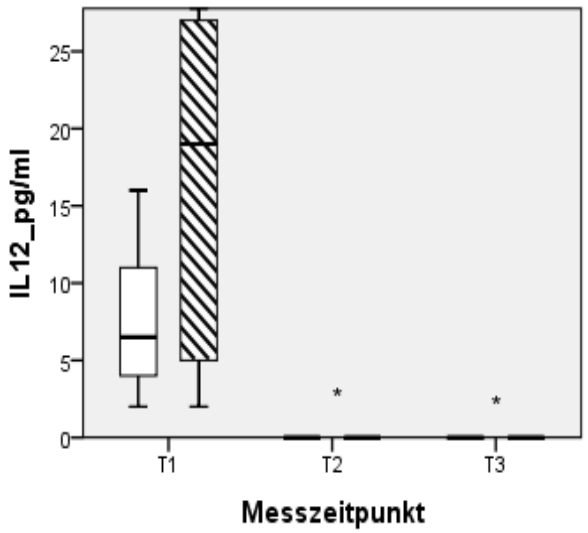


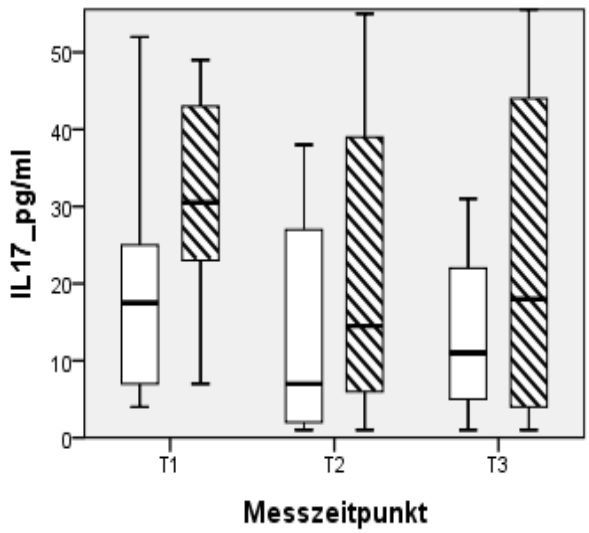

IL1ra_pg/ml
2500,00
2000,00
1500,00
1000,00
500,00
,00
T1
T2
T3
Messzeitpunkt


IL6_ng/ml
20
15
10
5
0
T1
T2
T3
Messzeitpunkt


IL8_ng/ml
20
15
10
5
0
T1
T2
T3
Messzeitpunkt


IL10_pg/ml
1500
1000
500
0
T1
T2
T3
Messzeitpunkt


IL12_pg/ml
25
20
15
10
5
0
T1
T2
T3
Messzeitpunkt


IL17_pg/ml
50
40
30
20
10
0
T1
T2
T3
Messzeitpunkt

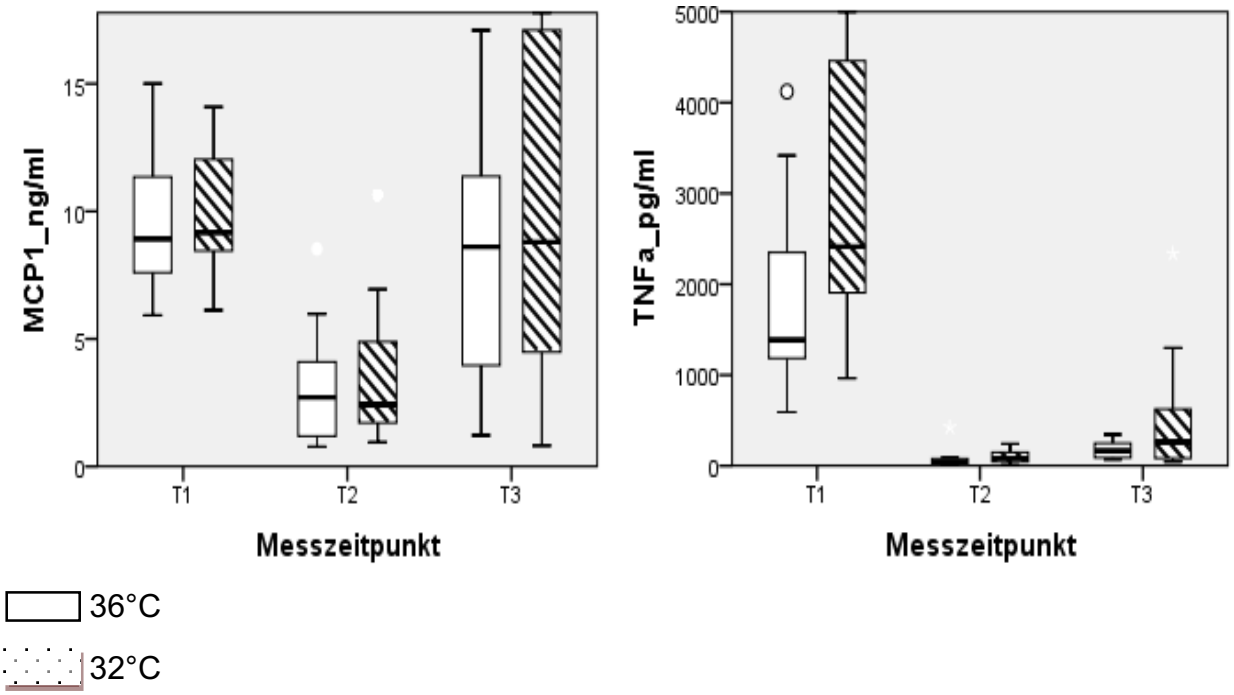


Abbildung 3: Zytokinausschüttung ex vivo nach LPS-Stimulation und 24-stündiger Inkubation bei 37°C, normotherm versus hypotherm, n=10.

Zwischen der hypotherm und normotherm operierten Gruppe bestehen zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede hinsichtlich der Zytokinkonzentration.

Tabelle 3 gibt eine Übersicht über die nach LPS-Stimulation gemessenen Zytokinkonzentrationen der gesamten Patientengruppe.

Tabelle 3: Deskriptive Statistik der Zytokinkonzentrationen nach LPS-Stimulation

Zytokin	Median	Minimum	Maximum	IQA	Spannweite
IFNγ_T1	668	24	8448	2687	8424
IFNγ_T2	28	1	868	298	867
IFNγ_T3	47	1	1081	117	1080
IL1ß_T1	1809	273	7763	2483	7490
IL1ß_T2	65	1	439	255	438
IL1ß_T3	147	1	4348	266	4347
IL1Ra_T1	452	77	1768	432	1691
IL1Ra_T2	154	1	935	359	934
IL1Ra_T3	1336	241	2912	1278	2671
IL6_T1	9906	4346	35105	11969	30759
IL6_T2	820	26	5331	1570	5305
IL6_T3	2295	407	13000	3536	12593
IL8_T1	9497	4279	40000	9683	35721
IL8_T2	1292	125	7788	1979	7663
IL8_T3	4785	857	18539	10896	17682
IL10_T1	451	110	1494	353	1384
IL10_T2	241	25	785	385	760
IL10_T3	290	60	609	272	549
IL12_1	9	2	42	0	39

Zytokin	Median	Minimum	Maximum	IQA	Spannweite
IL12_2	0	0	0	0	0
IL12_3	0	0	0	0	0
IL17_T1	24	4	198	28	194
IL17_T2	8	1	55	27	54
IL17_T3	14	1	75	25	74
MCP1_T1	9165	5922	15000	3815	9078
MCP1_T2	2528	771	10631	3352	9860
MCP1_T3	8604	818	18000	11343	17182
Tnfa_T1	2302	591	5964	1839	5373
Tnfa_T2	64	10	425	71	415
Tnfa_T3	193	46	2336	258	2290

IQA=Interquartilsabstand, alle Angaben in pg/ml

Zeitpunkt T1

Es bestehen hohe interindividuelle Unterschiede bereits in der Ausgangssituation, die Differenzen zwischen den Kindern betragen das bis zu 300fache bei IFN-γ, bei anderen Zytokinen das 10- bis 50-fache. Auffallend ist die starke Sekretion nach LPS-Stimulation von IL-6, IL-8, MCP-1 (Median ca. 10000pg/ml) im Vergleich zu den anderen Zytokinen. IL-1Ra und IL-10 werden vergleichsweise schwach sezerniert (Median ca. 500pg/ml).

Zeitpunkt T2

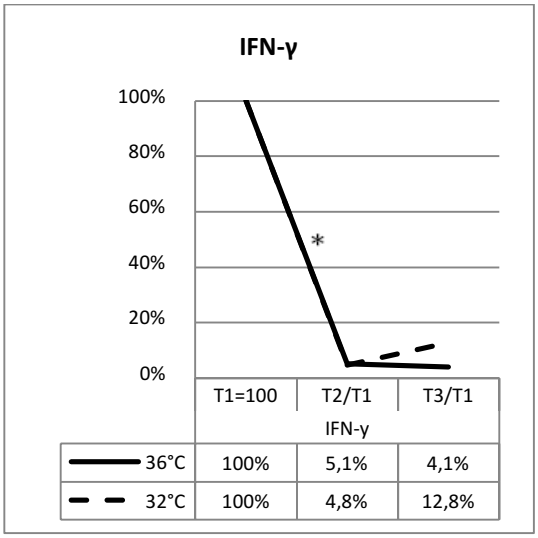
Nach Beendigung des CPB lässt sich bei den meisten Zytokinen nach LPS-Stimulation ein starker Abfall der aktivierenden Zytokine IFN-γ, IL-1ß, IL-6, IL-8 und TNF-α beobachten. IL-17, IL-1Ra, IL-10 und MCP-1 werden nicht vollständig supprimiert.

Zeitpunkt T3

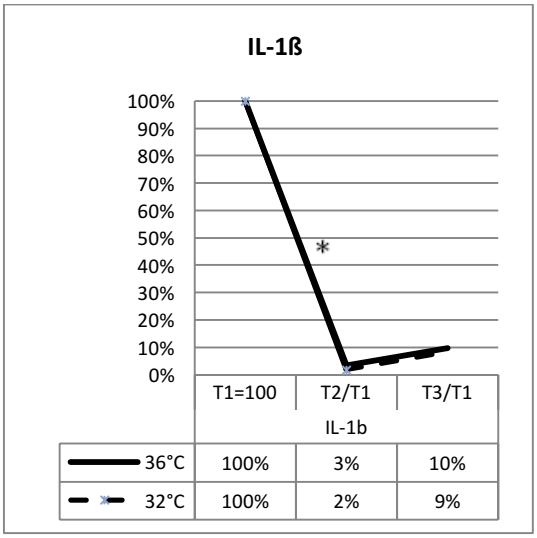
Es ist eine Tendenz zur Umkehr der Suppression bei IL-6 (36°C), IL-8 (36°C), sowie IL-1Ra (32°C) zu erkennen. IFN-γ, IL-1ß, IL-10, IL-17 und TNF-α steigen zum Zeitpunkt T3 leicht an ($p>0,05$). MCP-1 und IL-1-Ra reagieren hochsensibel auf den operativen Einfluss und zeigen eine besonders schnelle Erholung.

3.1.2 Kinetik der Immunreaktion

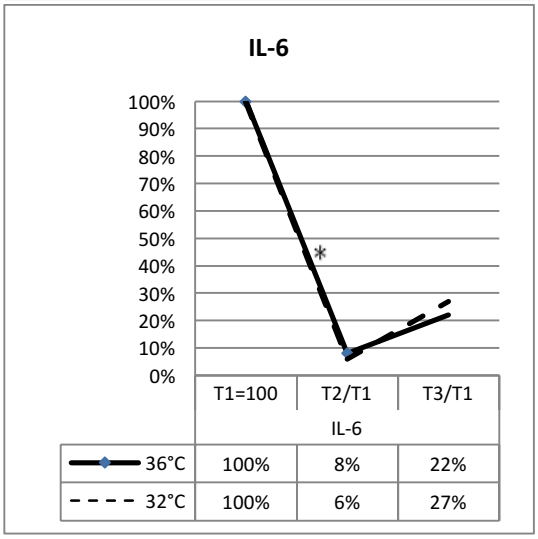
Aufgrund der parametrischen Verteilung mit hohen Streuweiten und Ausreißern erhält man leicht ein verzerrtes Bild von der zentralen Tendenz der Monozytenfunktionalität. Im Folgenden werden daher die Mediane der Veränderungsraten in Relation zu T1 (100%) dargestellt.



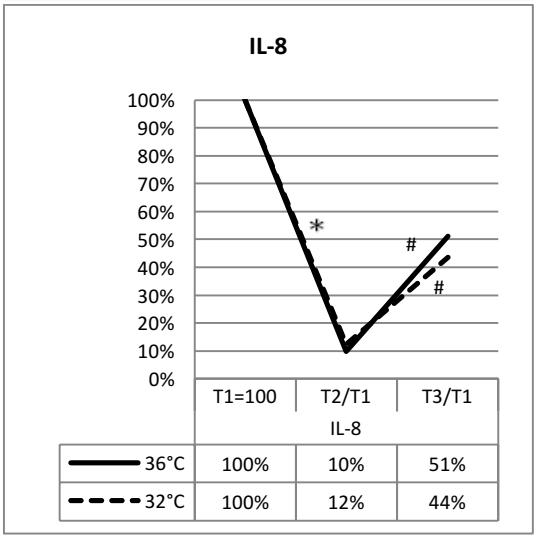
	T1=100	T2/T1	T3/T1
	IFN-γ		
36°C	100%	5,1%	4,1%
32°C	100%	4,8%	12,8%



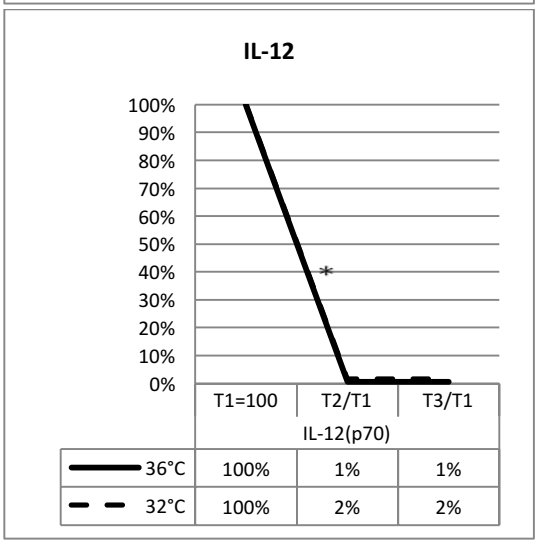
	T1=100	T2/T1	T3/T1
	IL-1b		
36°C	100%	3%	10%
32°C	100%	2%	9%



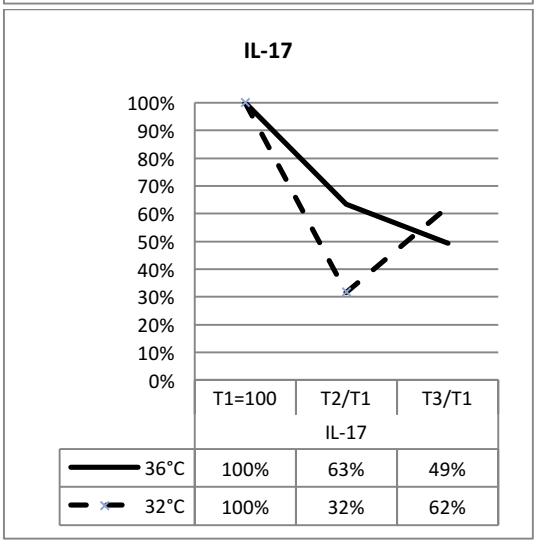
	T1=100	T2/T1	T3/T1
	IL-6		
36°C	100%	8%	22%
32°C	100%	6%	27%



	T1=100	T2/T1	T3/T1
	IL-8		
36°C	100%	10%	51%
32°C	100%	12%	44%



	T1=100	T2/T1	T3/T1
	IL-12(p70)		
36°C	100%	1%	1%
32°C	100%	2%	2%



	T1=100	T2/T1	T3/T1
	IL-17		
36°C	100%	63%	49%
32°C	100%	32%	62%

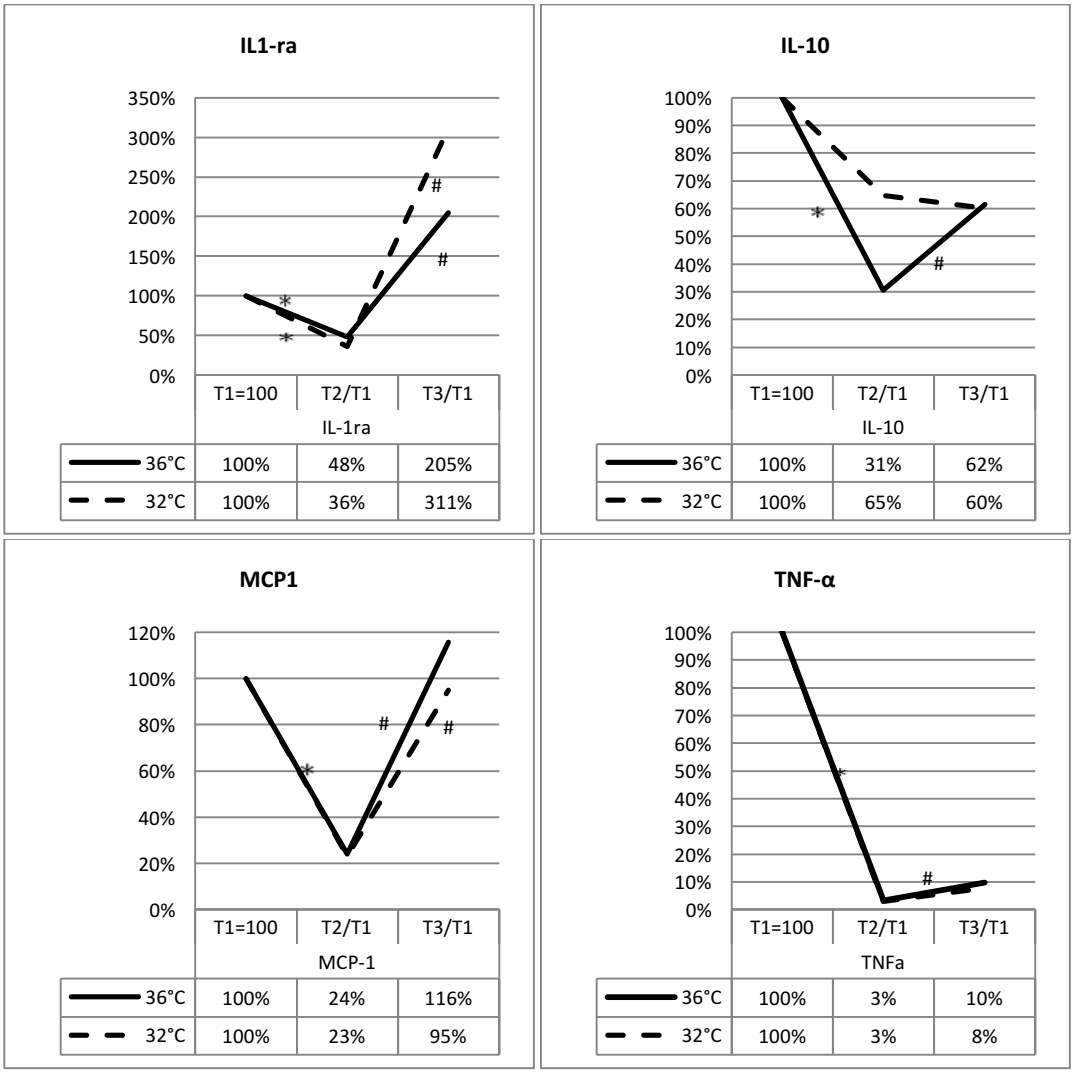


Abbildung 4: Verlauf der Mediane zu den Zeitpunkten T1 (Einleitung Anästhesie), T2 (Ende CPB), T3 (4 Stunden nach CPB)

36°C

32°C

* Signifikanter Abfall (p<0,05)
# Signifikanter Anstieg T3/T2 (p<0,05)
Bei keinem der gemessenen Zytokine besteht ein signifikanter Gruppen-Unterschied zwischen 32°C und 36°C.

T1: Vollständige Monozytenfunktionalität

Die Analyse der LPS-Stimulierbarkeit zeigt in T1 die volle Funktionalität der Monozyten mit differenzierter Zytokinsekretion nach LPS-Stimulation.

T2: Suppression

Bereits innerhalb der ersten Stunde nach OP-Beginn zeigt sich eine hochsignifikante Suppression des gesamten Panels ($p<0,01$ für T2/T1). Alle untersuchten Zytokine fallen zum Zeitpunkt T2, d.h. innerhalb der ersten Stunde nach Einleitung, signifikant ab ($p<0,01$). Eine fast identische Kinetik in T2/T1 (Werte unterhalb 10% der Ausgangswerte) zeigen IFN-γ, IL-1ß, IL-6, IL-8, IL-12 und TNF-a. Signifikant weniger stark verringert werden IL1-Ra, IL-17, IL-10 und MCP-1 ($p<0,01$). Hier ist eine Verschiebung der Balance zugunsten der immunsuppressiven Zytokine zu beobachten.

T3: Paralyse und Regeneration

Nur IL-1Ra und MCP-1 erreichen in T3 wieder mindestens das Ausgangsniveau. Auffällig ist eine starke Überkompensation von IL-1Ra auf über das 3-fache des Ausgangswertes. Damit ist IL-1Ra das einzige Zytokin der untersuchten Reihe, das trotz der beobachteten Immunsuppression über sein Anfangsniveau ansteigt. Eine deutliche Erholungstendenz zeigen die Monozyten für IL-8, IL-17 und IL-10, die mindestens 50% ihrer Ausgangswerte erreichen. Innerhalb der ersten 4 Stunden erholen sich nicht (T3 zu T1 unter 10 %): IFN-γ, IL-1ß, IL-12, TNF-α, insbesondere IL-12 verbleibt im ganzen Zeitraum supprimiert.

Reaktionsmuster

Für diese Studie stellt sich das Sekretionsverhalten nach LPS-Stimulation folgendermaßen dar. Auf der x-Achse ist der Quotient T3/T1 dargestellt, also die Reversibilität der Immunsuppression 4 Stunden nach Abgang von CPB. Auf der y-Achse zeigt die T2/T1 Ratio das Ausmaß des Abfalls der Aktivierbarkeit.

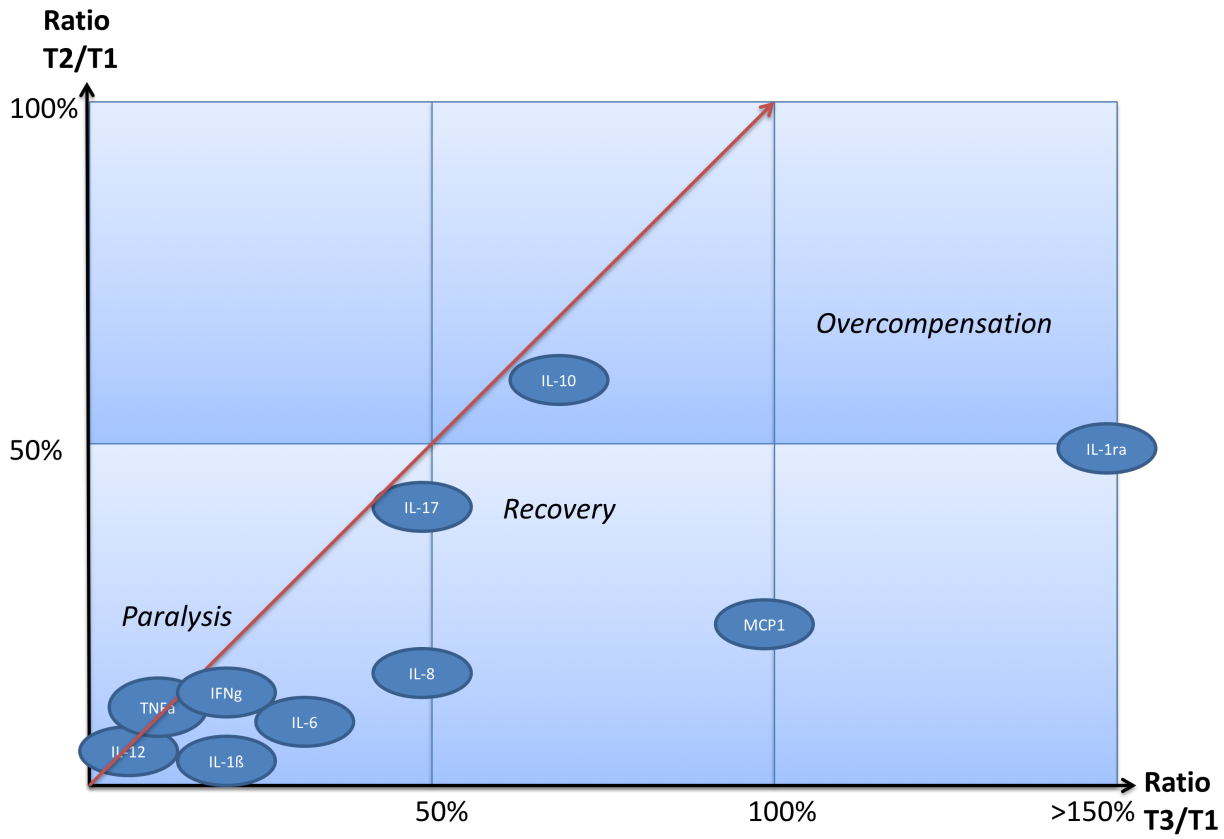


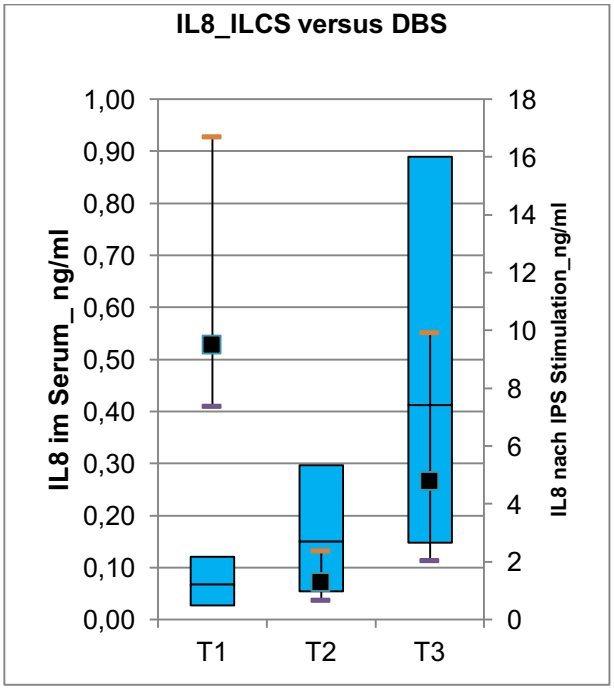
Abbildung 5: Reaktionsmuster der Aktivierbarkeit einzelner Zytokine unter und bis zu 4 Stunden nach kardiochirurgischem Eingriff (ILCS)

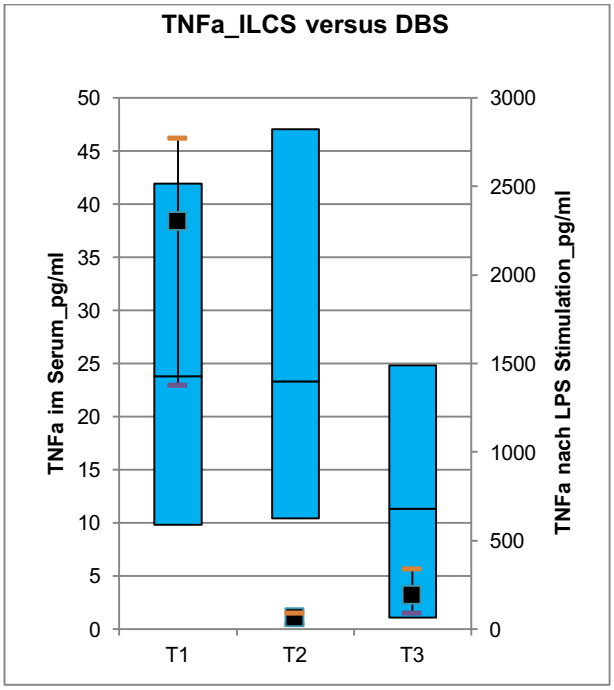
In der Grafik wird nochmals die überragende Rolle der Zytokine IL-1Ra und IL-10 im Zustand der Immunsuppression deutlich. Während sich von den aktivierenden Zytokinen MCP-1 am stärksten erholt, werden IL-10 und IL-1Ra überproportional synthetisiert. IL-12, IL-6, TNF-α, IL-1ß und IFN-γ sind in T2 nicht, bzw. kaum durch LPS induzierbar und verbleiben auch in T3 stark supprimiert. MCP-1 wird auch in der Suppressionsphase synthetisiert und erreicht bereits zum Zeitpunkt T3 wieder seine Ausgangswerte.

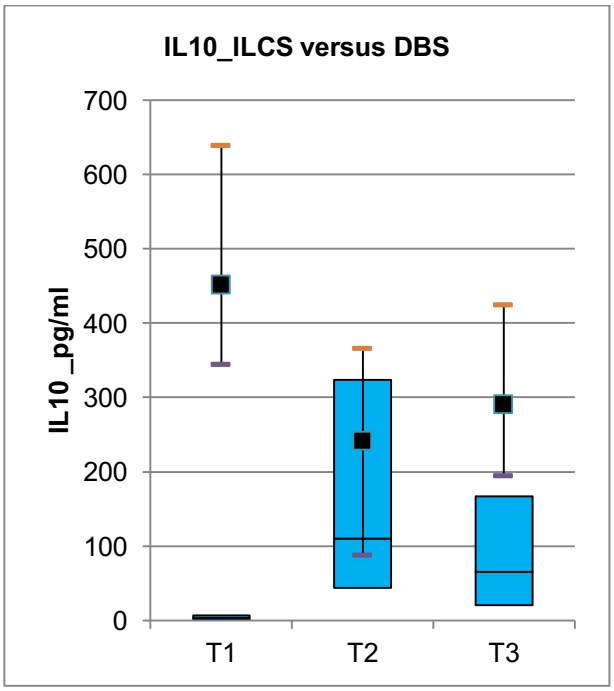
3.2 Immunbalance

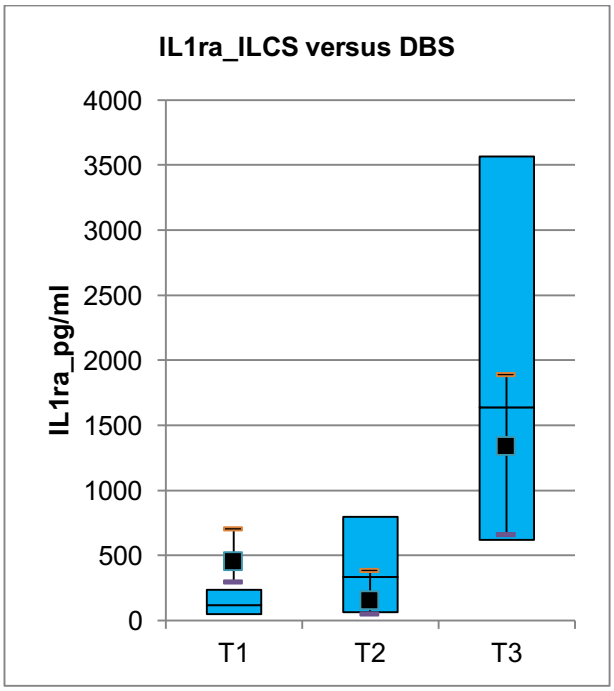
3.2.1 Gegenüberstellung der Ergebnisse von ILCS und DBS

Die Gegenüberstellung der Zytokinkonzentrationen im Serum (DBS) und nach LPS-Stimulation (ILCS) für IL-8, TNF-α, IL-10, IL-1Ra und MCP-1 zeigt, dass Immunaktivierung und –depression gleichzeitig stattfinden.


IL8_ILCS versus DBS
IL8 im Serum_ ng/ml
IL8 nach IPS Stimulation_ng/ml
1,00
0,90
0,80
0,70
0,60
0,50
0,40
0,30
0,20
0,10
0,00
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
T1
T2
T3


TNFa_ILCS versus DBS
TNFa im Serum_pg/ml
TNFa nach LPS Stimulation_pg/ml
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
T1
T2
T3


IL10_ILCS versus DBS
IL10 _pg/ml
700
600
500
400
300
200
100
0
T1
T2
T3


IL1ra_ILCS versus DBS
IL1ra_pg/ml
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
T1
T2
T3

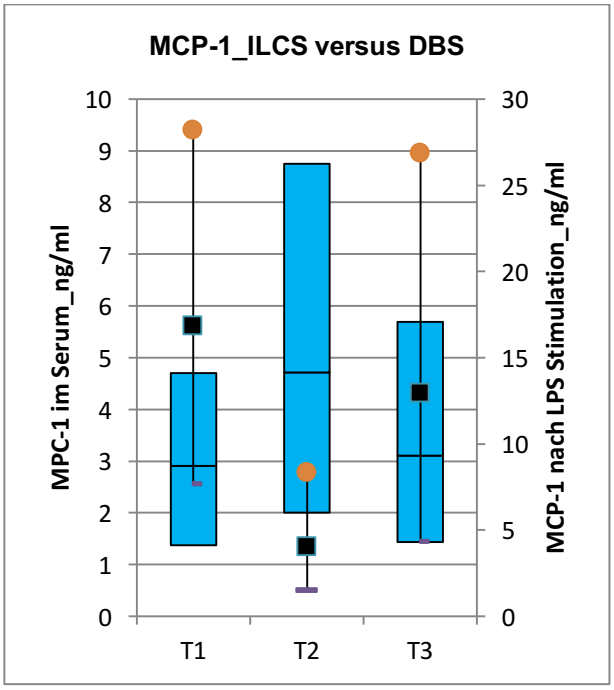


Abbildung 6: Parallelität von Inflammation und Aktivierung (ILCS und DBS)

(DBS: Primärachse, ILCS: Sekundärachse)

Zytokinkonzentration im Serum (IQA)

Median DBS

Zytokinkonzentration nach LPS-Stimulation (IQA)

Median LPS

Die Kinetik von Serumzytokinen und Sekretionskapazität verläuft gegenläufig. Nach einer Inflammation bzw. Immunsuppression in T2 beginnt zum Zeitpunkt T3 eine tendenzielle Verbesserung der Sekretionskapazität nach LPS, während die Reduktion der Inflammationsreaktion erst in T4 zu erkennen ist. Während die ILCS-Methode eine Momentaufnahme der Funktionalität der Monozyten ermöglicht, zeigt sich die Abschwächung der Inflammationsreaktion teilweise erst zum Zeitpunkt T4 (nicht dargestellt). TNF-α bildet eine Ausnahme, insofern als Aktivierbarkeit und Serumspiegel unter CPB abnehmen.

3.2.2 Effekt von Hypothermie und Normothermie auf die Immunbalance

Da eine Darstellung der Immunbalance auf einem Vergleich unterschiedlicher Zytokine basiert, wurden die Zytokinkonzentrationen von pg/ml in nmol/ml umgerechnet. Alle Daten zu den molekularen Gewichten entstammen der Datenbank uniprot/proteinknowledgebase.org (siehe Tabelle 1).

Innerhalb des kardiochirurgischen Eingriffs verschiebt sich die Immunbalance bzw. das Verhältnis aktivierender und supprimierender Zytokine. Als pro-inflammatorisch wurden die Zytokine IL-1ß, IL-6, IL-8 und TNF-α zusammengefasst, als anti-inflammatorisch IL-1Ra und IL-10.

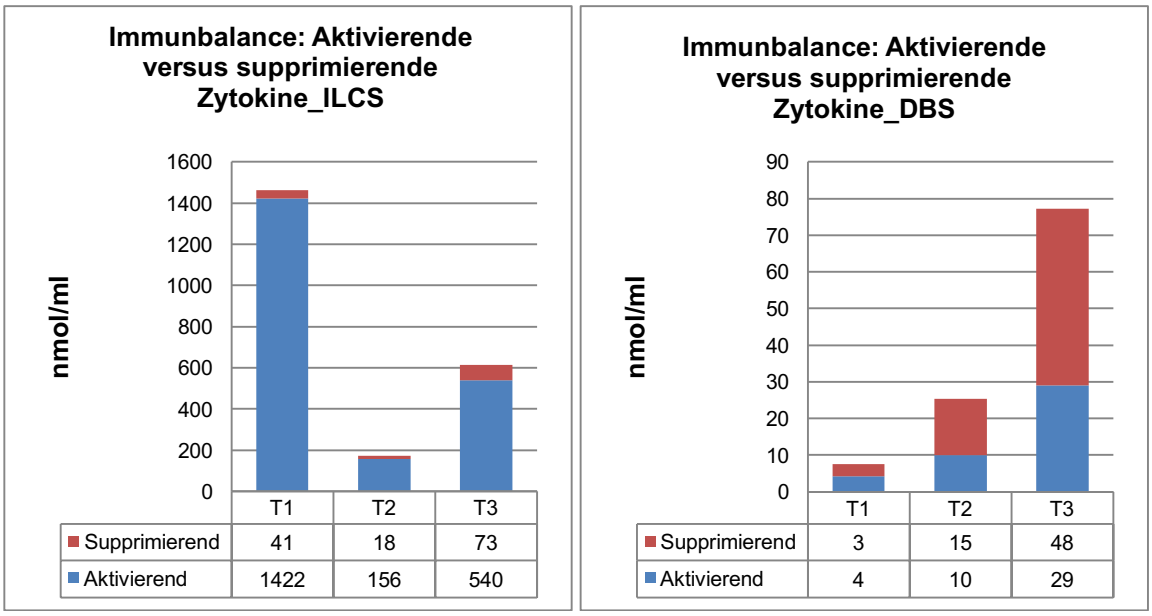
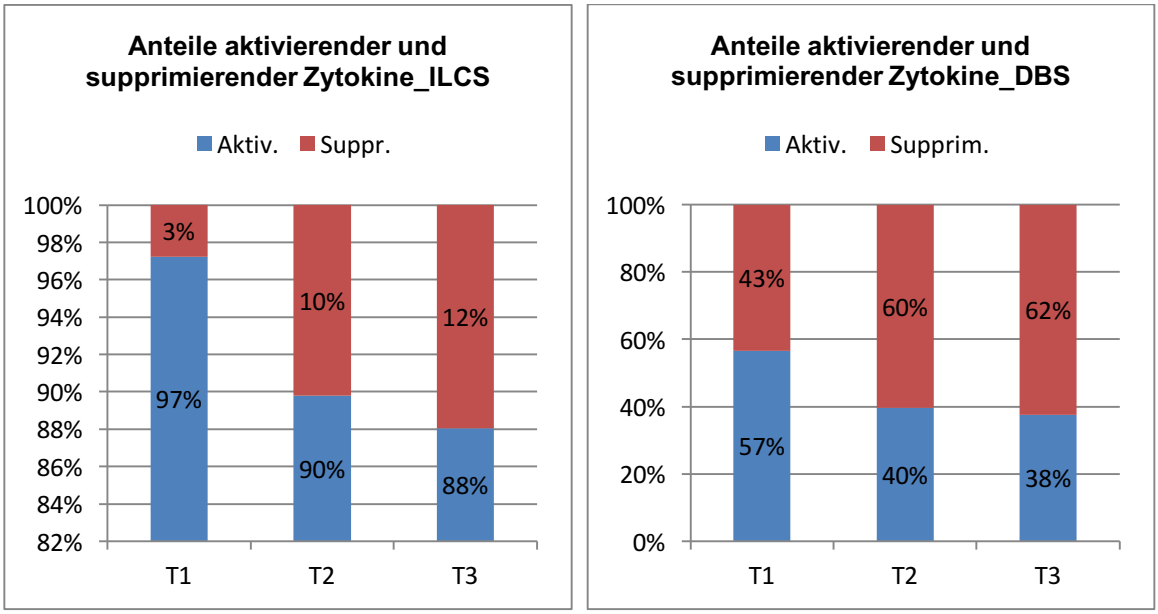


Abbildung 7: Balance immunaktivierender (IL-1ß, IL-6, IL-8, TNF-α) und immunsuppressiver (IL-10, IL-1Ra) Zytokine nach LPS-Stimulation (ILCS) und im Serum (DBS). Dargestellt sind die Mediane in nmol/ml.



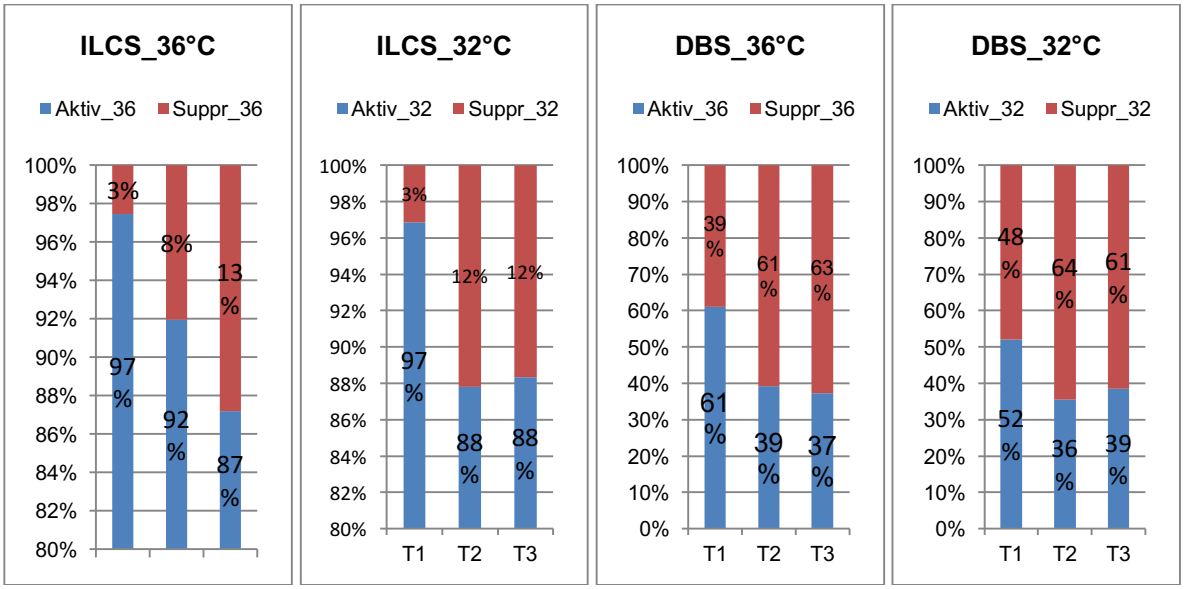


Abbildung 8: Balance nach Temperatur, n=10.
Unter kardiochirurgischer Operation mit CPB verschieben sich sowohl Aktivierbarkeit als auch Aktivierung zugunsten der immunsuppressiven Zytokine. Die intraoperative Hypothermie zeigt keinen signifikanten Effekt auf die Verschiebungen der Balance.

3.3 Zusammenhang der Zytokinreaktion mit klinischen Parametern

Im Folgenden sind die Korrelationskoeffizienten der Korrelationsanalyse nach Spearman als Balkendiagramme dargestellt. Es werden nur die signifikanten Korrelationen gezeigt ($p<0,05$). Die Zahlen hinter den Zytokinen entsprechen den Messzeitpunkten.

3.3.1 Operative Faktoren

ILCS: Die Dauer des extrakorporalen Kreislaufs zeigt keinen signifikanten Zusammenhang mit dem Ausmaß der Zytokinreduktion während der Suppression (nicht graphisch dargestellt). Eine Ausnahme bildet IFN-γ, das mit zunehmender Dauer des CPB ansteigt ($p<0,05$).

DBS: Eine längere extrakorporale Zirkulation korreliert mit einer höheren Ausschüttung von anti- und proinflammatorischen Zytokinen. Es besteht ein enger Zusammenhang ($p<0,01$) zwischen der Dauer des CPB und den in vivo Konzentrationen von IL-6, IL-10, IFN-γ und IL-8 zum Zeitpunkt T2 sowie IL-1Ra zum Zeitpunkt T4.

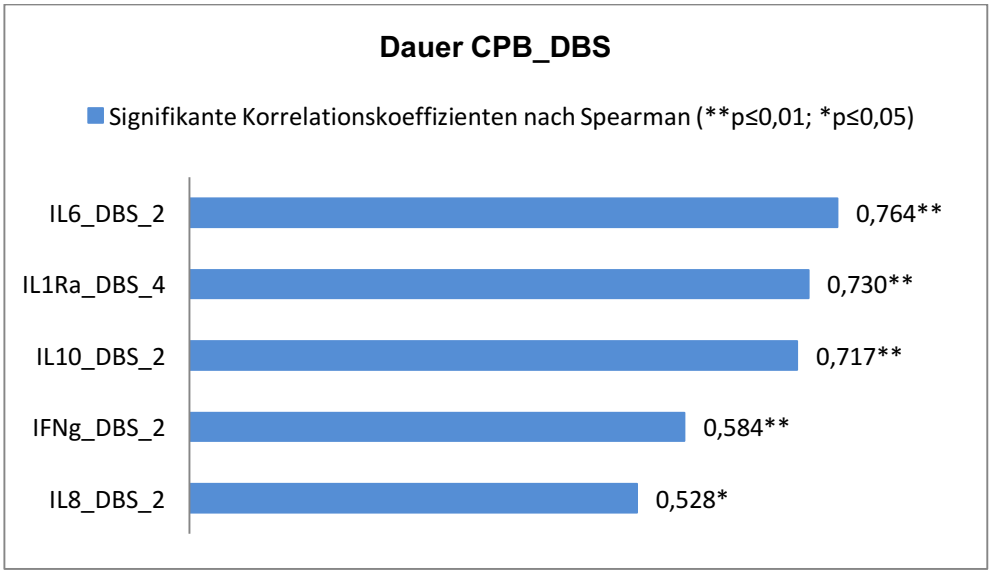


Abbildung 9: Korrelation der Serumzytokine mit der CPB-Dauer
Korrelationskoeffizienten für p*≤0,05 bzw. **p≤0,01, n=20

3.3.2 Dauer der mechanischen Ventilation

Als primärer Endpunkt wurde die Beatmungsdauer definiert. Folgende Abbildungen zeigen Faktoren, die mit einer längeren Beatmungsnotwendigkeit korrelieren. Dargestellt sind die signifikanten Korrelationskoeffizienten nach Spearman (*p<0,05 bzw. **p<0,01).

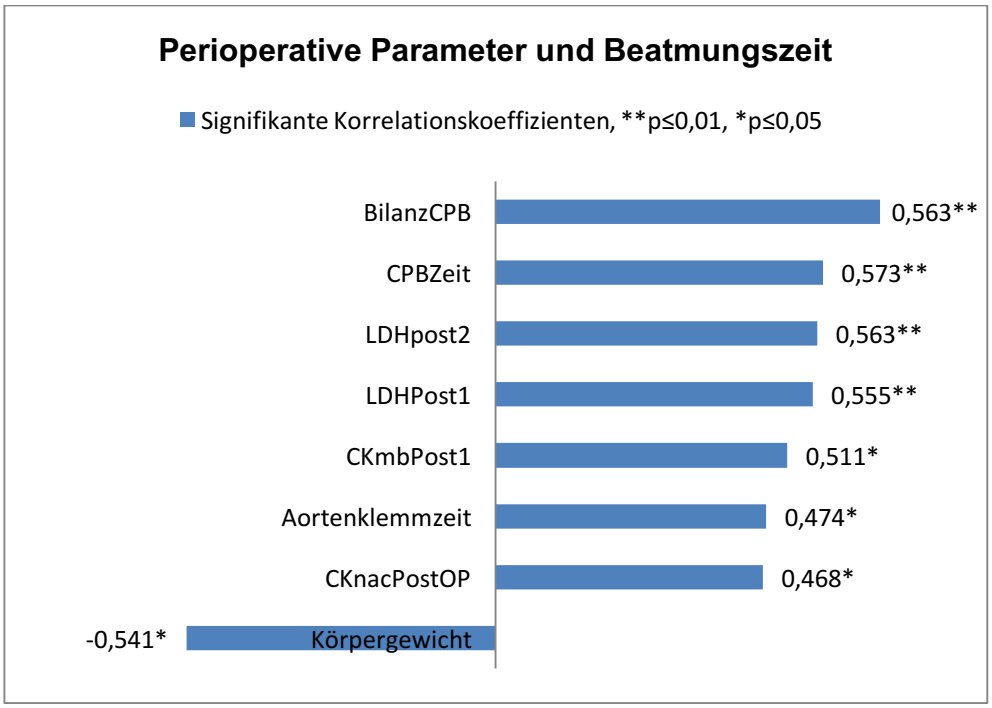


Abbildung 10: Korrelation perioperativer Parameter mit der Beatmungszeit, n=20

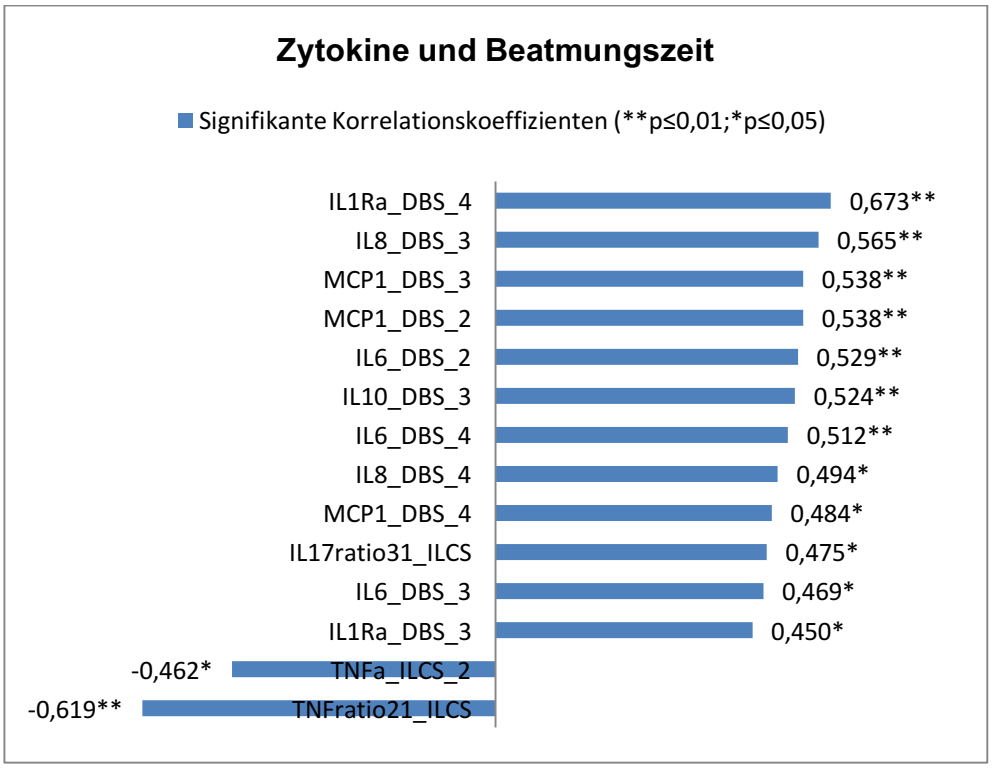


Abbildung 11: Korrelation von Zytokinkonzentrationen mit der Beatmungszeit, n=20

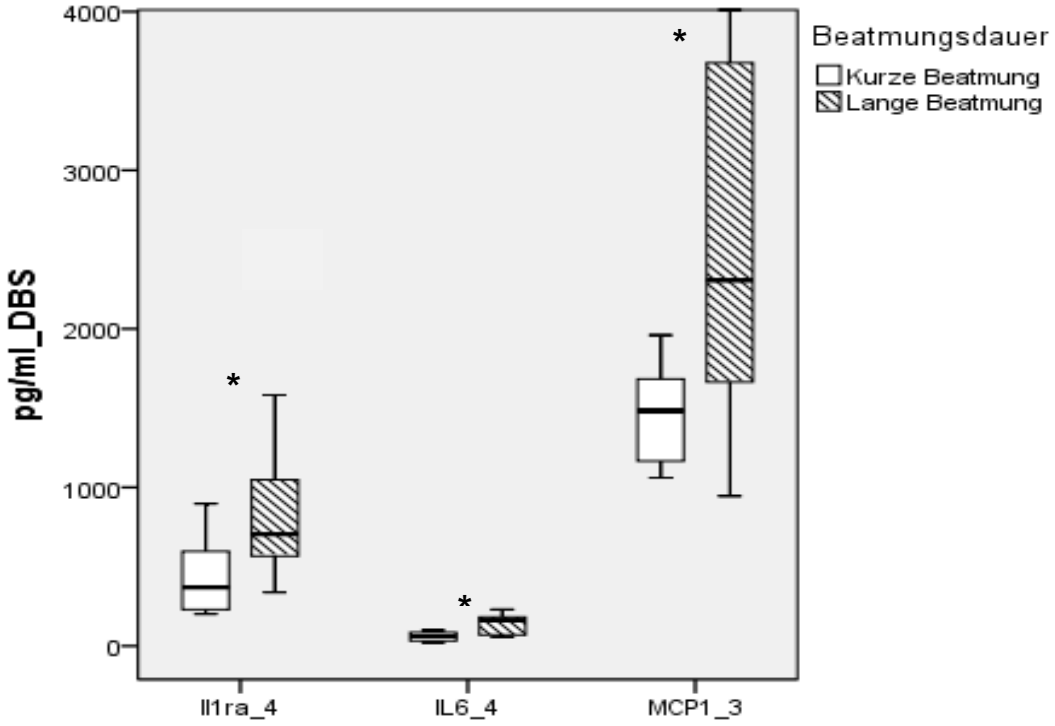
Stärker als Inflammation oder Immunsuppression beeinflusst in unserer Patientengruppe die Flüssigkeitsbilanz unter CPB den postoperativen Verlauf. Die Flüssigkeitsbilanz berechnet sich aus Kardioplegielösung, Primingflüssigkeit, Elektrolytlösungen, Erythrozytenkonzentraten und Diurese.

ILCS: Bei den klinischen Parametern zeigen sich Auswirkungen der Immunsuppression, sichtbar an den negativen Wechselbeziehungen von Monozytenaktivierbarkeit und Beatmungszeit. Die negative Korrelation des Abfalls von TNF-α mit der Beatmungszeit weist daraufhin, dass die starke Suppression von TNF-α den klinischen Verlauf negativ beeinflusst. Auffallend ist, dass zum Zeitpunkt T2 nicht das Serum-TNF-α mit der Beatmungszeit korreliert sondern nur die monozytäre Aktivierbarkeit für TNF-α.
DBS: Signifikante Zusammenhänge mit der Beatmungszeit bestehen für IL-8, MCP-1, IL-6 sowie IL-1Ra. Während IL-6 und IL-8 in T3 ansteigen, fällt MCP-1 ab. Bei den frei löslichen Zytokinen ergeben sich ausschließlich positive Zusammenhänge zwischen Konzentration und klinischem Verlauf. Auch relativ kleine Anstiege beeinflussen hier die Morbidität.

Zusammenfassend können sowohl die monozytäre Aktivierbarkeit für TNF-α als auch die Konzentrationen im Serum als prädiktive Parameter für den klinischen Verlauf fungieren. Eine intraoperative Suppression der Monozytenfunktion für TNF-α ist ebenso wie eine Inflammation assoziiert mit einer höheren Morbidität.

Neben der Flüssigkeitsbilanz und Dauer des CPB ist ein längere Beatmungspflicht mit dem chirurgischen Trauma und der Ischämie nach Aortenklemmung assoziiert (CK-MB, CK-nac, LDH). Außerdem korreliert ein geringeres Körpergewicht der Patienten mit einer längeren mechanischen Beatmung.

Ein Mediansplit nach der Beatmungszeit (Median 16h, Spannweite 4-75h) in kürzer bzw. länger beatmete Kinder verdeutlicht nochmals die unterschiedlichen Zytokinprofile.



Beatmung unter 16h (4-17h), n=10
Beatmung über 16h (20-75 n=10

*Unterschied ist signifikant

Abbildung 12: Unterschiede der Zytokinprofile nach Dauer der mechanischen Ventilation

IL-1Ra in T4, IL-6 in T4, IL-10 in T4 (nicht dargestellt) und MCP-1 in T3 sind bei den länger am CPB operierten Kindern signifikant höher.

3.3.3 Einfluss der intraoperativen Hypothermie

Während sich die Monozyten im Serum präoperativ und unmittelbar postoperativ nicht signifikant unterscheiden, steigt in der 3. Messung bei den hypotherm operierten Kindern die Anzahl der Monozyten signifikant weniger stark an als in der normothermen Gruppe (1,50±0,74/nl versus 2,31±0,94/nl, p=0,046).

ILCS: Eine längere Kühlungsdauer (gemessen ausschließlich in der hypothermen Gruppe) führt zu einer signifikant höheren Sekretionskapazität von IL-10 zum Zeitpunkt T3 (R=0,78, p=0,01, n=10) und von IL-1Ra (R=0,76, p=0,01, n=10).

Gleichzeitig steigt auch im Serum die IL-10 Konzentration mit längerer Kühlungszeit (R=0,528, p=0,04, n=10) und geringerer Minimaltemperatur (R=-0,454, p=0,05, n=10).

Der postoperative Adrenalin- und Corotropbedarf steigt mit der Kühlungszeit (R=0,456, p<0,05). Ebenso korreliert eine hohe Wiedererwärmungsgeschwindigkeit mit einem höheren postoperativen Adrenalinbedarf.

3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

3.4.1 Immunsuppression und -aktivierung

Direkt nach dem kardiochirurgischen Eingriff zeigen die Monozyten für alle Zytokine eine deutliche Einschränkung in ihrer Aktivierbarkeit. In T3 sind die meisten Zytokine wieder schwach induzierbar, TNF-α verbleibt supprimiert, IL-1Ra steigt weit über das Ausgangsniveau an.

Unter CPB verschiebt sich die Immunbalance. Der Anteil der suppressiven Zytokine im Serum steigt von 43% zum Zeitpunkt T1 auf 62% in T3 an, nach LPS-Stimulation erreichen IL-10 und IL-1Ra zum Zeitpunkt T3 12% statt in T1 3%.

Inflammation im Serum und Einschränkung der monozytären Sekretionskapazität laufen früh- und gleichzeitig ab. Die Immunkinetik nach LPS-Stimulation und im Serum ist tendenziell gegenläufig. Sowohl Aktivierung als auch Suppression sind bereits 4 Stunden nach Abgang vom CPB rückläufig.

Unter Hypothermie ist ein Trend zu einer stärkeren Zunahme des immunsuppressiven Anteils zu erkennen.

3.4.2 Effekt der moderaten Hypothermie

Der Gruppenvergleich nach CPB-Temperatur zeigt für kein Zytokin signifikante Unterschiede der Induzierbarkeit; d.h. die Monozytenfunktion wird im Zeitverlauf in beiden Gruppen unabhängig von der Temperatur gleich stark eingeschränkt. Tendenziell ist zwar ein immunsuppressiver Effekt der Hypothermie auf die Mehrzahl der Serumzytokine zu beobachten, dieser Trend erreichte jedoch keine statistische Signifikanz. Als signifikant erwies sich ein geringerer Anstieg der Anzahl der Monozyten in Hypothermie (1,50/nl ±0,74nl versus 2,31/nl ± 0,94/nl, p=0,046).

Um im Rangsummentest bei den bestehenden relativen Unterschieden eine Signifikanz für die Zytokinkonzentrationen zu erhalten, wäre eine Stichprobengröße von n=18 Kindern pro Gruppe nötig. Dies resultiert aus der Betrachtung der kritischen Werte der U-Verteilung unter Annahme konstanter Proportionalität zwischen Rangdifferenz und Rangsumme.

3.4.3 Immunreaktion und Klinik

Veränderungen in der Immunbalance zwischen pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen korrelieren mit erhöhter Beatmungsdauer sowie erhöhtem Adrenalinbedarf. Dies gilt sowohl für die Dysfunktion im Sinne einer übermäßigen Aktivierung (DBS) als auch Inaktivierbarkeit (ILCS). Eine hohe Ausschüttung von IL-1Ra, IL8, MCP1, IL-6, IL-10 und IL-17 im Serum korreliert ebenso signifikant mit einer längeren mechanischen Beatmung wie eine supprimierte Sekretionskapazität der Monozyten für TNF-α.

4 Diskussion

Inflammation und Immunsuppression nach kardiochirurgischem Eingriff gewinnen zunehmend an Bedeutung als unabhängige prädiktive Faktoren für die Entstehung postoperativer Komplikationen wie endotheliale Permeabilitätsstörungen und Organdysfunktion. Zu den auslösenden Faktoren gehören neben Komplementfaktoren die von aktivierten Monozyten sezernierten Zytokine. Das Ziel dieser Arbeit war es, den

Einfluss operativer Parameter wie chirurgisches Trauma, Dauer, Flüssigkeitsbilanz und Temperatur des extrakorporalen Kreislaufs auf Inflammation und Funktionalität der Monozyten sowie die postoperative Beatmungszeit darzustellen. Mithilfe von zwei unterschiedlichen Methoden zur Messung des Immunstatus sollte der Zusammenhang von Inflammation und Immunsuppression im Vollblut von 20 kardiochirurgisch operierten Kindern untersucht werden.

4.1 Immunsuppression

4.1.1 Zytokinsekretion nach LPS-Stimulation

Zeitpunkt T1: Die hohe interindividuelle Variabilität der Zytokinreaktion auf LPS-Stimulation, wie sie in dieser Studie gemessen werden konnte, wurde in der Literatur vielfach beschrieben (Skapenko 2001, Schroder 2004, Mueller 2012). Es ist gleichzeitig davon auszugehen, dass die Kinetik einzelner Zytokine bestimmten Mustern folgt, die intraindividuell relativ stabil sind (Mueller 2012).

Duval et al. zeigen, dass die Stimulierbarkeit von IL-6, IL-8 und IL-1Ra bereits durch die Art des Herzfehlers beeinflusst wird (Duval 1999). Boehm et al. beschreiben den Einfluss genetischer Polymorphismen für TNF-α auf die Stimulierbarkeit nach kardiopulmonarem Bypass (Boehm 2011, vergleichbar Jouan 2012). Van Deventer zeigt, dass durch genetische Polymorphismen die Kapazität der TNF-α-Synthese bis zu 10fach variiert (Van Deventer 2000). Weiterhin ist die Aktivierbarkeit nach LPS-Stimulation vom Lebensalter abhängig (Härtel 2005, Yerkovich 2007). Bei unseren Patienten besteht kein Zusammenhang von Gewicht oder Alter mit der Zytokinsekretionskapazität, was an der relativ homogenen Alterszusammensetzung liegen könnte.

Aktivierende Zytokine: Die Suppression aktivierender Zytokine nach CPB bei Kindern wird verhältnismäßig einheitlich beschrieben. Im Gegensatz zur Immunparalyse bei Sepsis handelt es sich um eine zunächst transiente Suppression, die das Potential hat, sich durch einen „second hit“ zu verstärken (Grundmann 2000, Cornell 2012, Li YP 2013, Angele 2006, Kawasaki 2001, Kirchhoff 2009, Dehoux 2000). Insbesondere TNF-α verbleibt häufig supprimiert und wird als Indikator für die Suppression gesehen. Grundmann beschreibt bei Immunsuppression nach CPB eine fehlende Aktivierbarkeit

für IL-1ß, IL-6, IL-8, aber einen Anstieg von IL-10. Ähnlich finden Hensler et al. nach LPS-Stimulation eine Zunahme der Sekretion von IL-10 bei Herabregulation von IL-1, IL-6, IL-8 (Hensler 1997). Li beobachtet ebenfalls eine Suppression der Induzierbarkeit inflammatorischer Zytokine TNF-α, IL-1ß, IL-6 und IL-8 bei stark erhöhter IL-10 Synthese nach LPS (Li YP 2013).

Supprimierende Zytokine: In unserer Studie zeigt sich die Sekretionskapazität der Monozyten für IL-10 unter CPB relativ stabil (Abfall auf 60%, geringe Erholung); die Stärke der Suppression korreliert nicht mit der CPB-Dauer. Die Funktion von IL-10 im Serum für die Immunsuppression wird in der Literatur uneinheitlich beurteilt. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit (keine Korrelation zwischen IL-10 im Serum und ILCS-Zytokinkonzentrationen) beobachtet Döcke eine limitierte Rolle von IL-10 im Serum für die Immunsuppression (Döcke 2005). Auch Volk sieht das systemische IL-10 nicht verantwortlich für die funktionelle Depression der Monozyten (Volk T 2003). Meisel et al. detektieren in der Suppressionsphase nach Schlaganfall kein IL-10, sie vermuten die Ursache der Suppression in einer Ausschüttung von Acetylcholin (Meisel 2008). Dagegen halten Kawasaki 2001 und Tarnok 2000 einen sofortigen Anstieg von IL-10 bei gleichzeitiger Suppression von TNF-α für eine der Hauptursachen der Immunparalyse. Cornell findet ein über zweifach erhöhtes IL-10 bei Patienten mit Immunparalyse (Cornell: Mean=14,3pg/ml versus 6,0pg/ml; p=0,01, diese Arbeit: Median=7,12pg/ml versus 3,93pg/ml, p=0,03pg/ml) im Vergleich zur immunkompetenten Gruppe (Cornell 2012). Auch Allen misst eine IL-10 Erhöhung im Serum bei gleichzeitiger Reduktion der Monozytenkapazität (Allen 2002). Cornell weist darauf hin, dass der HLA-DR Rezeptor Status kein vollständiges Korrelat der Immundepression darstellt, vielmehr korreliere Inflammation mit einer signifikanten Suppression verschiedener Gene der angeborenen und adaptierten Immunität, was schließlich zur Immunparalyse führe (Cornell 2012).

IL-1Ra zeigt in unserer Studie nach kurzer transienter Suppression unter CPB bereits 4 Stunden nach Abgehen von der CPB einen dreifachen Anstieg (Median 452pg/ml in T1, 1336pg/ml in T3).

Nur vereinzelte Studien untersuchen die Rolle von IL-1Ra für die Pathogenese der Immunsuppression nach CPB. Cornell findet keinen Unterschied für die Sekretion von IL-1Ra nach LPS in der immunkompetenten, bzw. -supprimierten Gruppe. McBride zeigt

signifikant erhöhtes IL-1Ra nach CPB im Serum, untersucht aber nicht die LPS-Stimulation im Vollblut (McBride 1995). Tanzi et al. messen IL-1Ra im Serum nach Schlaganfall und zeigen, dass IL-1Ra eng mit dem Infektionsrisiko korreliert (Tanzi 2011). Während Studien mit therapeutischem IL-1Ra mittelfristig eine Erhöhung des Infektionsrisikos zeigen, ist die kurzfristige Rolle von IL-1Ra nicht geklärt (Tanzi 2011, Salliot 2009). Im Gegensatz zu IL-10 sind für IL-1Ra weniger autoregulative Effekte nachgewiesen, seine Funktion scheint zuvorderst in der Blockade von IL-1-Rezeptoren zu bestehen (Dinarello 2000). Auch Lennard beschreibt für IL-1Ra keine agonistische, bzw. direkt autoregulative Funktion (Lennard 1995).

4.1.2 Kinetik der Immunreaktion

Die in unserer Studie aufgezeigte Funktionseinschränkung der Monozyten findet sehr früh innerhalb des kardiochirurgischen Eingriffs mit CPB statt. Allerdings ist auch eine frühzeitige Tendenz zur Reversion zu erkennen. Die Stimulierbarkeit der Monozyten ist für die aktivierenden Zytokine außer für MCP-1 fast vollständig aufgehoben. Übereinstimmend mit den Ergebnissen dieser Arbeit findet Döcke eine Aufhebung der Suppression 60 min. nach CPB mit Ausnahme von TNF-α, das supprimiert bleibt (Döcke 2005). Auch Dehoux 2001 beobachtet ab 60 Minuten nach CPB-Beginn eine Reduktion, 120 Minuten später das Minimum der Monozytenkapazität. Nur TNF-α verblieb ähnlich der Messungen im Rahmen dieser Studie supprimiert (Dehoux 2001).

4.2 Immunbalance

4.2.1 Gegenüberstellung von ILCS und DBS

Seit Bone Ende der 1990er Jahre den Begriff des CARS als kompensatorische Immunantwort auf eine Inflammationsreaktion prägte (Bone 1996a), folgten Publikationen, welche eine Immunsuppression als Gegenregulation der übermäßigen Aktivierung pro-inflammatorischer Zytokine darlegten (Keel 2005, Shubin 2011). In dem sequenziellen Modell der Immunreaktion laufen Aktivierung und Inaktivierung nacheinander ab. Auf eine pro-inflammatorische Entzündungsreaktion reagieren Monozyten im Sinne einer Herabregulation der HLA-DR Antikörper bzw. mit einer Immundepression (Moore 1996, Bone 1996b). Auch nach kardiochirurgischem Eingriff wird in verschiedenen Publikationen eine sequentielle Immunantwort beschrieben. Sie

basiert auf einer Überaktivierung der Immunreaktion nach CPB und nachfolgend, meist durch IL-10 induziert, einer Suppression der Monozytenfunktion (Bone 1996b, Strohmeyer 2003). Kirchhoff misst eine Immunsuppression frühestens 12 Stunden nach kardiochirurgischem Trauma (Kirchhoff 2009), Strohmeyer ca. 20 Stunden postoperativ (Strohmeyer 2003).

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen eine zeitliche Überschneidung von Aktivierung und Suppression, die beide bereits während der Korrekturoperation induziert werden und zeitlich parallel verlaufen. Bis zum Minimum der in vitro gemessenen Monozytenkapazität zum Zeitpunkt T2 sind 138,45min±63,45min nach Anästhesieeinleitung vergangen (siehe Abbildung 13).

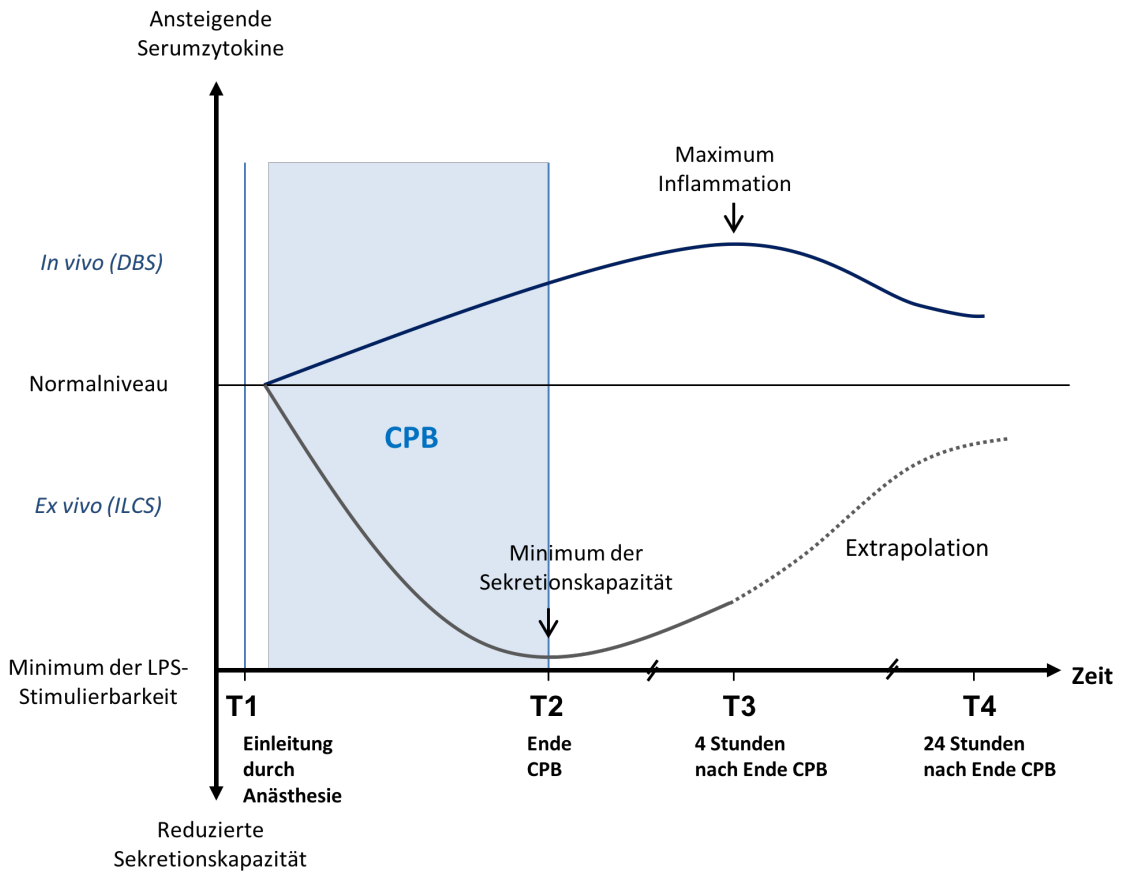


Abbildung 13: Inflammation und Suppression unter CPB

Diese Ergebnisse decken sich mit Analysen der Genexpression anti- und pro-inflammatorischer Zytokine nach Endotoxinstimulation, die nahe legen, dass jegliche Inflammation mit einer parallelen Anti-Inflammation einhergehen könnte (Xiao W 2011). Auch Osuchowski et al. widerlegen die Theorie der SIRS-CARS Sequenz als Modell der

frühen Sepsis. Durch Versuche mit endotoxinstimulierten Mäusen konnten sie zeigen, dass anti- (IL-10, IL-1Ra) und pro-inflammatorische (MCP-1, TNF-α, IL-6, IL-1ß) Mediatoren gleichzeitig induziert werden können (Osuchowski 2006).

Der bei unseren Patienten zu beobachtende parallele Verlauf von Zytokinaktivierung und Monozytensuppression legt die Vermutung nahe, dass nach CPB eine lokale Chemotaxis von Monozyten und Induktion der Sekretion stattfinden, sowie gleichzeitig die Kapazität der flottierenden Monozyten durch systemische Mediatoren eingeschränkt wird.

Auch Cavaillon et al. vermuten, dass ein SIRS durch Endothelzellen des entzündeten Gewebes verursacht wird, die peripher zirkulierenden Monozyten aber durch systemisch suppressiv wirksame Mediatoren wie Cortisol, TGF-ß und PGE_2 in einen Zustand der Inaktivierbarkeit gelangen (Cavaillon 2001, ähnlich Kirchhoff 2009).

Einen zeitgleich verlaufenden Anstieg der zirkulierenden Zytokine und Abfall der Sekretionskapazität der Monozyten nach pädiatrischer Herzoperation beschreiben auch Duval et al. (Duval 1999). Gentile verweist auf Studien, in denen Inflammation und Suppression gleichzeitig stattfinden; entsprechend dürfe SIRS nach Trauma nicht als ein kurzlebiges transientes Konzept verstanden werden, da SIRS in Parallelität mit CARS ein hohes Risiko für ein sogenanntes „Persistent inflammation immunosuppression catabolism syndrome“ (PICS) darstelle (Gentile 2012).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass sich Untersuchungen, die sich gleichzeitig mit Immunsuppression und –inflammation beschäftigen, zu unterschiedlichen Ergebnissen hinsichtlich Interaktion und zeitlichem Verlauf kommen. Mit dem zunehmenden Verständnis der Immunsuppression wird ein Überdenken der immunsuppressiven Therapien in der Inflammation/Sepsis gefordert (Leentjens 2013).

4.2.2 Effekt von Hypothermie und Normothermie auf die Immunbalance

Für die Berechnung der Immunbalance wurden Zytokine in pro-inflammatorisch versus anti-inflammatorisch eingeteilt. Dies ist eine starke Vereinfachung. Zum einen vernachlässigt dieser Ansatz die bipolaren Wirkungen vieler Zytokine. Es kann vermutet werden, dass die Mehrzahl der Interleukine auch immunregulatorische Funktionen hat. Sowohl für IL-6, IL-8, MCP-1 und TNF-α als auch für IL-10 werden autoregulatorische

Eigenschaften berichtet (siehe Tabelle 1). Für die Berechnung der Balancen wurden die durch EDI Reutlingen analysierten gewichtsbasierten Konzentrationen (pg/ml) mit den in Tabelle 1 angegebenen Molekulargewichten der Proteindatenbank Uniprot in Molekularkonzentrationen, also Anzahl Moleküle pro ml Vollblut umgerechnet. Ideal wären Immunbalancen auf Basis von Aktivitätseinheiten wie International Units (IU) gewesen. Im Gegensatz zu IUs für Enzyme scheint es für endogene Zytokine lediglich vergleichbare Angaben für rekombinante humane Zytokine zu geben. Die rekombinant synthetisierten Zytokine weichen allerdings in Proteingröße, Aktivität und Halbwertszeit von den endogenen Zytokinen ab. Zudem variiert die immunmodulatorische Aktivität eines endogenen Zytokins wiederum stark in Abhängigkeit seines immunologischen Umfelds.

McBride beobachtet ähnliche transiente Verschiebungen der Immunbalance im Serum nach CPB (McBride 1995). Er vermutet, dass die anti-inflammatorische Antwort des Immunsystems durch das Endothel und weniger durch zirkulierende Monozyten ausgelöst wird, untersucht aber nicht temperaturdifferenziert.

4.3 Zusammenhang der Zytokinreaktion mit klinischen Parametern

4.3.1 Operative Faktoren

Erwartungsgemäß kann bei den in vivo Zytokinen eine enge Korrelation von IL-6 (p=0,001) und IL-8 (p=0,02) mit der CPB-Dauer gezeigt werden. Dieses Ergebnis unserer Studie ist bereits in zahlreichen klinischen Studien mit Serumzytokinen beschrieben worden (Mahle 2014, Strohmeyer 2003, Dehoux 2000, Grundmann 2000, Pasnik 2007, Hammer 2004). Aber auch IL-1Ra (p=0,001), IL-10 (p=0,002), und IFN-γ (p=0,007) steigen signifikant mit der Dauer des extrakorporalen Kreislaufs.

Ähnlich enge Zusammenhänge von CPB-Dauer und Zytokinkonzentration können im Rahmen dieser Arbeit für die mit ILCS gemessenen Zytokine nicht bestätigt werden. Kinder, die lange am CPB operiert wurden, zeigen in der vorliegenden Untersuchung signifikant erhöhte IL-1Ra Konzentrationen nach LPS (Mediane kurz 1049pg/ml, bzw. lang 1646pg/ml) und supprimierte TNF-α-Serumwerte (p=0,10). Unsere Ergebnisse bestätigen eine Publikation von de Jong et al., die eine Herabregulation von TNF-α durch eine Blockade der STAT3-Signaltransduktion erklären (de Jong 2012). Die

Synthesekapazität für die aktivierenden Zytokine IL-6 und IL-8 korrelieren nicht mit der CPB-Dauer.

4.3.2 Dauer der mechanischen Ventilation

Den entscheidenden Einflussfaktor für die Dauer der mechanischen Ventilation stellt bei unseren Patienten die während der Operation erhaltene Flüssigkeit dar. Diese Arbeit konnte den engen Zusammenhang der Zytokinkonzentrationen im Serum mit einer Veränderung der alveolären Permeabilität nachweisen: Nach einem Mediansplit der Beatmungszeiten ist zu erkennen, dass die kürzer beatmeten Kinder intraoperativ signifikant weniger Flüssigkeit erhalten hatten als die länger beatmeten Kinder (103ml±74ml bzw. 187ml±93ml, p=0,045). Der Anteil der intraoperativ verabreichten Flüssigkeit am Körpergewicht war umso größer, je geringer das Körpergewicht der Patienten, korrelierte aber nicht mit dem Alter (p=0,28). Die Dauer der extrakorporalen Zirkulation wiederum korrelierte nicht mit der Flüssigkeitsbilanz (R=0,298, p=0,403), die Bilanz stellt damit einen unabhängigen Faktor für die Beatmungsnotwendigkeit dar.

Nach Schure überwiegen die Nachteile der Haemodilution aufgrund induzierter Anämie, verminderter Oxygenierungskapazität sowie Reduktion der Plasmaproteine und Gerinnungsfaktoren. Dies wiederum begünstige Ödeme, Koagulopathien, sowie eine Komplementaktivierung (Schure 2010). Auch Toraman beobachtet einen Effekt der intraoperativen Flüssigkeitsgabe unter CPB auf die IPS-Aufenthaltszeit (Toraman 2004).

Die Ergebnisse dieser Studie lassen vermuten, dass zytokinvermittelte Pathomechanismen der endothelialen Dysfunktion eine übergeordnete Rolle für die postoperative Beatmungszeit spielen.

Folgende Graphik zeigt in der vorliegenden Arbeit untersuchte Zusammenhänge (dunkle Linien), die zu einer Dysfunktion des alveolären Endothels führen können. Davon abzugrenzen sind viele weitere mögliche Ursachen von Endotheldysfunktion und Immunsuppression, die nicht Gegenstand unserer Untersuchung waren (helle Linien).

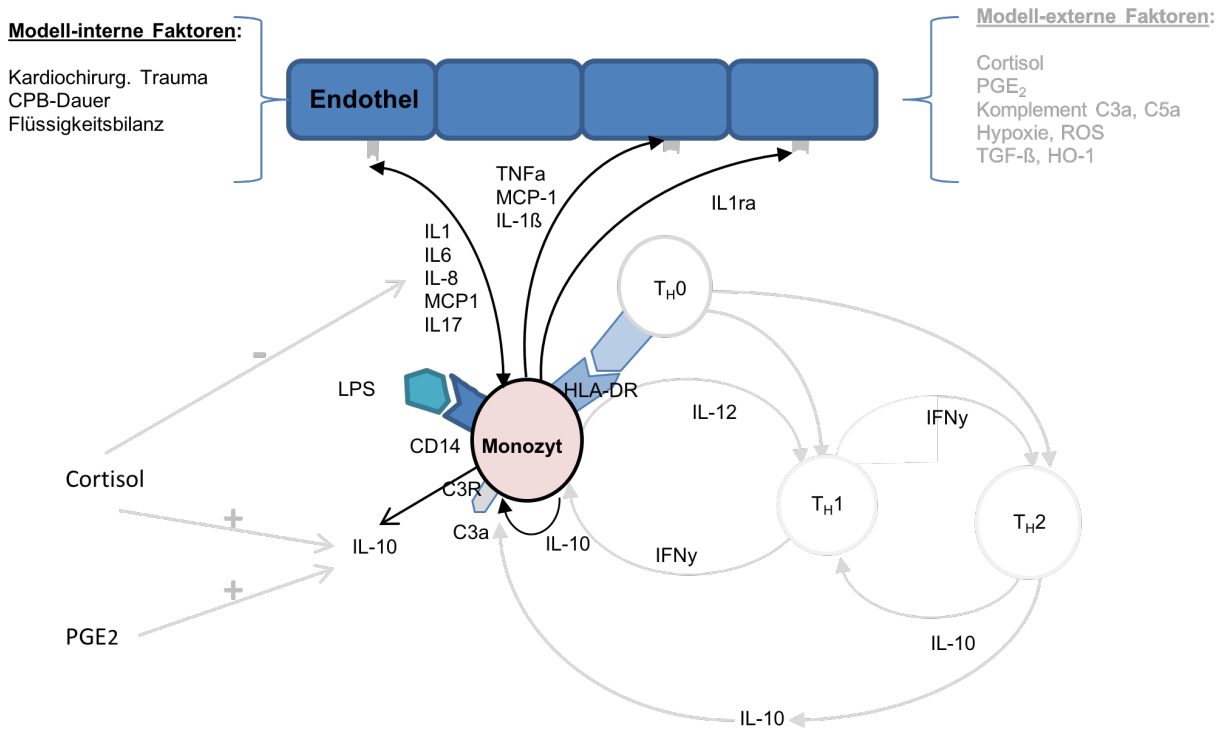


Abbildung 14: Interaktion von Monozyten, Inflammation und Endothel

In der vorliegenden Arbeit konnte für die länger als 16h beatmeten Kinder eine starke Erhöhung der Serumzytokine für IL-1Ra (p=0,016), IL-6 (p=0,008), IL-10 (p=0,032) und MCP-1 (p=0,023) gezeigt werden sowie eine Suppression von TNF-α nach LPS-Stimulation. Für TNF-α nach LPS-Stimulation misst die Korrelationsanalyse einen direkten Zusammenhang einer stärkeren Suppression der Synthesekapazität zum Zeitpunkt T2 mit einer längeren Beatmungsdauer (R=-0,619, p=0,01).

Auch Kirchhoff findet nach Trauma eine reduzierte Synthesekapazität für IL-6, IL-8 und TNF-α, wobei TNF-α negativ mit einem erhöhten Risiko für ein MODS korreliert (Kirchhoff 2009). Eine reduzierte Sekretionskapazität für TNF-α als Prädikator für das Multiorganversagen bestätigen u.a. Studien von Ploder und von Majetschak (Ploder 2006, Majetschak 1999). Chaudhry kommt zu dem Schluss, dass bei Sepsis-Patienten ein Abfall von IL-6 mit einer besseren Prognose, eine starke Überproduktion von IL-10 mit Komplikationen und einer höheren Morbidität assoziiert ist (Chaudhry 2013).

4.3.3 Einfluss der intraoperativen Hypothermie

Intraoperative Hypothermie gilt seit Jahren als Standard bei kardiochirurgischen Eingriffen mit CPB. Im Mann-Whitney-U-Test konnten keine signifikanten Unterschiede in der Gruppe 32°C versus 36°C hinsichtlich der monozytären Sekretionskapazität

festgestellt werden. In der sensitiveren Korrelationsanalyse nach Spearman zeigen sich signifikante Auswirkungen der Temperatur, Wiedererwärmungszeit und -geschwindigkeit auf die Zytokinsekretion, die allerdings aufgrund der kleinen Stichprobe von 10 Kindern und der hohen Variabilität der Daten vorsichtig zu beurteilen sind. In der Hypothermie-Gruppe steigt die Anzahl der Monozyten nach kardiochirurgischem Eingriff signifikant weniger stark an als in der Normothermiegruppe.

Der Effekt der Hypothermie wird in der Literatur sehr uneinheitlich beurteilt. Die Ergebnisse einer großen multizentrischen Studie zu therapeutischer Hypothermie nach Herzstillstand stellen als sicher angenommene Vorteile der Hypothermie in Frage. Es konnten keine positiven Auswirkungen der Hypothermie auf Morbidität und Mortalität festgestellt werden (Nielsen 2013).

Die aktuellen Ergebnisse, eine leichte Erhöhung von IL1ra, IL-1ß und IL-10 in Hypothermie, sind einzuordnen in eine Serie klinischer Studien, die in Tabelle 4 zusammengefasst sind. Es gibt nur wenige pädiatrische Studien zum Effekt der moderaten Hypothermie auf die Inflammation, weshalb fünf weitere Studien mit erwachsenen Patienten eingeschlossen wurden. Es konnten keine Publikationen gefunden werden, in denen die Auswirkung der intraoperativen Hypothermie auf die Zytokinsekretionskapazität der Monozyten nach LPS-Stimulation erforscht wurde.

Tabelle 4: Studien zu Hypothermie und Inflammation nach kardiochirurgischem Eingriff

Autor	Jahr	n	Patienten	°C	Zytokine	Effekt der Hypothermie
Jenkins DD	2012	50	Neonaten mit HIE	33	MCP-1, IL-6, IL-8, IL-10	MCP-1, IL-6, IL-8, IL-10 induziert
Stocker CF	2011	16	<12kg, mit CHDs	24,34	IL-6, IL-10, TNF-α	Kein Effekt
Rasmussen LS	2011	20	5-7Monate, VSD, ASD	25,36	NSE, S100 protein	Kein Effekt auf Inflammation, gleiche Extubationszeit
Eggum R	2008	30	<10kg, CPB	25,32	IL-8, IL-10	IL-10 supprimiert, Il-8 induziert, insgesamt "kein Effekt"
Caputo M	2005	59	3-7Jahre, CPB	38,35	IL-6, IL-8, IL-10, C3a,	Kein Effekt auf Inflammation
Tassani P	2002	23	<10kg, CPB	18,24	IL-6, IL-8	Weniger SIRS, weniger Ödem

Autor	Jahr	n	Patienten	°C	Zytokine	Effekt der Hypothermie
Hovels-Gurich HH	2002	63	Neonaten	15,37	IL-6, IL-8	Erhöhtes IL-6, 8 in tiefer HT
Seghaye MC	1996	24	Neonaten, CPB	15,37	TNF-α,	Erhöhtes TNF-α
Birdi I	1999	45	Erwachsene, CPB	28,32, 37	IL-8, IgG	Leichte Induktion von IL-8
Honore PM	2001	60	Erwachsene, CPB		IL6, IL10, TNFa	Kein Effekt
Gaudino M	2002	113	Erwachsene, CPB	26, 37	Leukozyten, CRP	Kein Effekt
Speziale G	2000	20	Erwachsene, CPB		IL1ß, Leukozyten	Induktion von IL-1ß und Thrombozyten-aktivierung
Rasmussen BS	2007	30	Erwachsene, CPB, CABG	36,32	IL-6, IL-8, IL-10	Kein Effekt

4.4 Limitationen der Studie

Die geringe Patientenzahl von 20 Kindern und die hohe interindividuelle Variabilität der Zytokinausschüttung birgt das Risiko, möglicherweise in der Grundgesamtheit signifikante Ergebnisse auszuschließen. Der tendenziell suppressive Effekt der Hypothermie auf die Sekretion der Serumzytokine wäre erst ab einer Stichprobengröße von 36 Kindern als signifikant einzuschätzen.

Zusätzliche spätere Messungen der Monozytenfunktion nach der ILCS-Methode wären nützlich gewesen: die Reversibilität der Suppression vieler Interleukine ist tendenziell erkennbar, aber nicht statistisch signifikant, es könnten theoretisch auch „second hits“ in den Tagen nach IPS-Aufenthalt verpasst worden sein. Allerdings bestätigen sowohl der klinische Verlauf als auch die T4-Messungen in vivo, dass Immunaktivierung und Suppression mit hoher Wahrscheinlichkeit rückläufig war.

Das LPS-Modell zur Charakterisierung der Immunkompetenz stellt ein etabliertes Modell der Immunsuppression dar, unterliegt aber mehreren Limitationen: Die abgebildete Immunreaktion ist LPS-spezifisch, sie ist ausschließlich auf die Stimulierbarkeit von Monozyten fokussiert, und sie ist nicht normiert (Menge LPS, Dauer Stimulierung, Typ LPS). Zu LPS als Stimulanz ist zu sagen, dass sich die Durchlässigkeit der Darmwand für gramnegatives Endotoxin unter CPB erhöht und

endogenes LPS ein ernstzunehmender Risikofaktor für kardiochirurgische Patienten darstellt (Klein DJ 2010, Booker 1996).

Die Validität der Monozytenfunktionalität als Korrelat für die Immunkompetenz konnte durch die Übereinstimmung von HLA-DR Expression bzw. ex vivo Zytokinsekretion und Klinik in zahlreichen Publikationen bestätigt werden (Kawasaki 2001, Heagy 2003). Die mangelnde Normierung schränkt allerdings die Vergleichbarkeit der Daten mit externen Publikationen ein.

5 Schlussfolgerungen

Unter kardiochirurgischem Eingriff mit CPB erfolgt bereits ab Beginn des Eingriffs mit CPB eine Aktivierung der Serumzytokine bei gleichzeitiger Einschränkung der Sekretionskapazität der Monozyten („Immundepression“). Diese frühe Parallelität von Inflammation und Suppression unterstützt die Hypothese, dass jegliche Inflammation mit einer Reduktion der Sekretionskapazität einhergehen könnte. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen aber auch, wie schwierig die Auswahl einer adäquaten immunmodulatorischen Therapie ist. Der Fokus auf häufig standardmäßig angewandte immunsuppressive Therapien mit Glukokortikoiden vor oder während der Korrekturoperation sollte kritisch überprüft werden.

In der Erholungsphase nach CPB wird IL-1Ra überproportional induziert. Vergleichbare Einflüsse auf die Reaktivierungsphase sind in anderen Studien bisher hauptsächlich für IL-10, kaum aber für IL-1Ra beschrieben worden. Sollten weitere Untersuchungen eine dominante Rolle von IL-1Ra für die Regulation der Inflammation bestätigen, könnte dies neue Möglichkeiten für einen therapeutischen Einsatz von rekombinantem IL-1Ra bei überschießender Inflammation eröffnen.

Im Serum spiegelt sich die Immunsuppression durch erhöhtes IL-10 und supprimiertes TNF-α wider. Diese Arbeit bestätigt, dass auch die weniger aufwendig zu messenden Serumzytokine auf eine parallel stattfindende Inflammation und Immunsuppression hinweisen.

Die Flüssigkeitszufuhr unter CPB stellt in unserer Patientengruppe einen erheblichen Einflussfaktor für die postoperative Beatmungsdauer dar. Die länger beatmungspflichtigen Kinder hatten intraoperativ mehr Flüssigkeit relativ zum

Körpergewicht erhalten (p=0,045), waren länger mit CPB operiert worden (p=0,028), und wiesen höhere Serumkonzentrationen von IL-1Ra (p=0,016), IL-6 (p=0,008), IL-10 (P=0,032) und MCP-1 (p=0,049) auf. Dieser Zusammenhang weist darauf hin, dass Säuglinge bereits nach relativ unkomplizierten und kurzen Eingriffen mit CPB gefährdet sind, eine Permeabilitätszunahme des Endothels zu erleiden, die sich zuerst als alveoläres Ödem manifestiert. Es wird daher empfohlen, nicht obligate Bestandteile der intraoperativen Flüssigkeitsmenge kritisch zu prüfen und ggf. restriktiver einzusetzen.

6 Literatur

1. Abe R, Hirasawa H, Oda S, et al. Up-regulation of interleukin-10 mRNA expression in peripheral leukocytes predicts poor outcome and diminished human leukocyte antigen-DR expression on monocytes in septic patients. J Surg Res 2008;147:1-8.
2. Allan CK, Newburger JW, McGrath E, et al. The relationship between inflammatory activation and clinical outcome after infant cardiopulmonary bypass. Anesthesia & Analgesia 2010;111:1244-51.
3. Allen ML, Hoschtitzky JA, Peters MJ, et al. Interleukin-10 and its role in clinical immunoparalysis following pediatric cardiac surgery. Crit Care Med 2006;34:2658-65.
4. Allen ML, Peters MJ, Goldman A, et al. Early postoperative monocyte deactivation predicts systemic inflammation and prolonged stay in pediatric cardiac intensive care. Crit Care Med 2002;30:1140-5.
5. Angele MK, Faist E. Clinical review: immunodepression in the surgical patient and increased susceptibility to infection. Crit Care 2002;6:298-305.
6. Birdi I. et al. The effects of cardiopulmonary bypass temperature on inflammatory response following cardiopulmonary bypass. Eur J Cardiothoracic Surg 1999;5:540-545.
7. Bocsi J, Hambsch J, Osmancik P, Schneider P, Valet G, Tarnok A. Preoperative prediction of pediatric patients with effusions and edema following cardiopulmonary bypass surgery by serological and routine laboratory data. Crit Care 2002;6:226-33.
8. Boehm J, Hauner K, Grammer J, et al. Tumor necrosis factor-alpha -863 C/A promoter polymorphism affects the inflammatory response after cardiac surgery. Eur J Cardiothorac Surg 2011;40:e50-4.
9. Bønding Andreasen J, Hvas AM, Ravn HB. Marked changes in platelet count and function following pediatric congenital heart surgery. Paediatr Anaesth. 2014 Apr;24(4):386-92.
10. Bone RC. 1996a. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS and CARS. Crit Care Med 1996;24:1125-1128.
11. Bone RC. 1996b. Toward a theory regarding the pathogenesis of the systemic inflammatory response syndrome: what we do and do not know about cytokine regulation. Crit Care Med 1996;24:163–72.
12. Booker PD, Romer H, Franks R. Gut mucosal perfusion in neonates undergoing cardiopulmonary bypass. Br J Anaesth 1996;77:597-602.
13. Caputo M et al. Randomized comparison between normothermic and hypothermic cardiopulmonary bypass in pediatric open-heart surgery. Ann Thoracic Surg. 2005 Sep;80(3):982-988.
14. Cassatella MA, Meda L, Gasperini S, Calzetti F, Bonora S. Interleukin 10 (IL-10) upregulates IL-1 receptor antagonist production from lipopolysaccharide-stimulated human polymorphonuclear leukocytes by delaying mRNA degradation. J Exp Med 1994;179:1695-9.

15. Cavaillon JM, et al. Immunodepression in sepsis and SIRS assessed by ex vivo cytokine production is not a generalized phenomenon: a review. J Endotoxin Res 2001;7: 85-93.
16. Chaudhry H, et al. Role of Cytokines as a Double-edged Sword in Sepsis. In Vivo, 2013, Nov-Dec;27(6):669-684.
17. Cornell TT, Sun L, Hall MW, et al. Clinical implications and molecular mechanisms of immunoparalysis after cardiopulmonary bypass. J Thorac Cardiovasc Surg 2012;143:1160-6.e1.
18. Cromer WE, Zawieja SD, Tharakan B, Childs EW, Newell MK, Zawieja DC. The effects of inflammatory cytokines on lymphatic endothelial barrier function. Angiogenesis 2014 Apr;17(2):395-406.
19. de Jong PR, Schadenberg AW, van den Broek T, et al. STAT3 regulates monocyte TNF-alpha production in systemic inflammation caused by cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. PLoS One 2012;7:e35070.
20. DeForge L, Remick DG. Kinetics of TNF, IL-6, and IL-8 gene expression in LPS-stimulated human whole blood. Biochem Biophys Res Commun 1991;174:18-24.
21. Dehoux MS, Hernot S, Asehnoune K, et al. Cardiopulmonary bypass decreases cytokine production in lipopolysaccharide-stimulated whole blood cells: roles of interleukin-10 and the extracorporeal circuit. Crit Care Med 2000;28:1721-7.
22. Deshmane, Satish L., et al. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. J Interferon Cytokine Res 2009 Jun;29(6):313-326.
23. Diehl S, Rincon M. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. Mol Immunol 2002;39:531-6.
24. Dinarello CA. The role of the interleukin-1-receptor antagonist in blocking inflammation mediated by interleukin-1. N Engl J Med 2000;343:732-4.
25. Döcke WD, Hoflich C, Davis KA, et al. Monitoring temporary immunodepression by flow cytometric measurement of monocytic HLA-DR expression: a multicenter standardized study. Clin Chem 2005;51:2341-7.
26. Duval EL, Kavelaars A, Veenhuizen L, van Vught AJ, van de Wal HJ, Heijnen CJ. Pro- and anti-inflammatory cytokine patterns during and after cardiac surgery in young children. Eur J Pediatr 1999;158:387-93.
27. Eggum R, Ueland T, Mollnes TE, et al. Effect of perfusion temperature on the inflammatory response during pediatric cardiac surgery. Ann Thorac Surg 2008;85:611-7.
28. Faist E, Storck M, Hultner L, et al. Functional analysis of monocyte activity through synthesis patterns of proinflammatory cytokines and neopterin in patients in surgical intensive care. Surgery 1992;112:562-72.
29. Fedarava, Katsiaryna. Hypothermie versus Normothermie an der Herz-Lungen-Maschine bei Kindern zwischen 5 und 10 kg Körpergewicht: Vergleich der Entzündungsmediatoren und des klinischen Verlaufs. Diss. Berlin, Medizinische Fakultät Charité-Universitätsmedizin Berlin, Dissertation 2011.
30. Fogel-Petrovic M, Long JA, Misso NL, Foster PS, Bhoola KD, Thompson PJ. Physiological concentrations of transforming growth factor beta1 selectively inhibit human dendritic cell function. Int Immunopharmacol 2007;7:1924-33.

31. Foey AD., et al. Regulation of monocyte IL-10 synthesis by endogenous IL-1 and TNF-α: role of the p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases. J Immunol, 1998 Jan 15;160(2):920-928.
32. Frazier WJ, Hall MW. Immunoparalysis and adverse outcomes from critical illness. Pediatr Clin North Am 2008;55:647-68, xi.
33. Gaudino M, et al. Normothermia does not improve postoperative hemostasis nor does it reduce inflammatory activation in patients undergoing primary isolated coronary artery bypass. J Thorac Cardiovasc Surg. 2002, 123;(6):1092-1100.
34. Gearing A JH, et al. Soluble Forms of Vascular Adhesion Molecules, E-Selectin, ICAM-1, and VCAM-1: Pathological Significance. Ann N Y Acad Sci. 1992 Dec 4;667:324-331.
35. Geng Y, Gulbins E, Altman A, Lotz M. Monocyte deactivation by interleukin 10 via inhibition of tyrosine kinase activity and the Ras signaling pathway. Proc Natl Acad Sci U S A 1994;91:8602-6.
36. Gentile LF, Cuenca AG, Efron PA, et al. Persistent inflammation and immunosuppression: a common syndrome and new horizon for surgical intensive care. J Trauma Acute Care Surg 2012;72:1491-501.
37. Giamarellos-Bourboulis EJ. Should we be moving from suppression to stimulation to deal with immunoparalysis in sepsis patients? Immunotherapy 2014;6:113-5.
38. Grundmann U, Rensing H, Adams HA, et al. Endotoxin desensitization of human mononuclear cells after cardiopulmonary bypass: role of humoral factors. Anesthesiology 2000;93:359-69.
39. Haeusler KG, Schmidt WU, Fohring F, et al. Cellular immunodepression preceding infectious complications after acute ischemic stroke in humans. Cerebrovasc Dis 2008;25:50-8.
40. Hammer S, Fuchs AT, Rinker C, Daebritz S, Kozlik-Feldmann R, Netz H. Interleukin-6 and procalcitonin in serum of children undergoing cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. Acta Cardiol 2004;59:624-9.
41. Härtel C, Adam N, Strunk T, Temming P, Müller-Steinhardt M, Schultz C. Cytokine responses correlate differentially with age in infancy and early childhood. Clin Exp Immunol 2005;142:446-53.
42. Harizi H, et al. Pivotal role of PGE2 and IL-10 in the cross-regulation of dendritic cell-derived inflammatory mediators. Cell Mol Immunol, 2006, 3. Jg., Nr. 4, S. 271-277.
43. Heagy W, Nieman K, Hansen C, Cohen M, Danielson D, West MA. Lower levels of whole blood LPS-stimulated cytokine release are associated with poorer clinical outcomes in surgical ICU patients. Surg Infect (Larchmt) 2003;4:171-80.
44. Henrich M, Gruss M, Weigand MA. Sepsis-induced degradation of endothelial glycocalix. ScientificWorldJournal 2010;10:917-23.
45. Hensler T, Hecker H, Heeg K, et al. Distinct mechanisms of immunosuppression as a consequence of major surgery. Infect Immun 1997;65:2283-91.

46. Honore, P. M., et al. Effects of normothermia versus hypothermia on extravascular lung water and serum cytokines during cardiopulmonary bypass: a randomized, controlled trial. Crit Care Med. 2001 Oct;(10):1903-1909.
47. Hovels-Gurich HH, Schumacher K, Vazquez-Jimenez JF, et al. Cytokine balance in infants undergoing cardiac operation. Ann Thorac Surg 2002;73:601-8; discussion 8-9.
48. Jargon, D. (2005). Änderungen der intestinalen Permeabilität mit systemischer Zytokinaktivierung nach grossen Operationen bei der Entstehung des Multiorganversagens (Doctoral dissertation, Universitätsbibliothek Freiburg).
49. Jenkins DD, Rollins LG, Perkel JK, et al. Serum cytokines in a clinical trial of hypothermia for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. J Cereb Blood Flow Metab 2012;32:1888-96.
50. Jouan J, Golmard L, Benhamouda N, et al. Gene polymorphisms and cytokine plasma levels as predictive factors of complications after cardiopulmonary bypass. J Thorac Cardiovasc Surg 2012;144:467-73, 73.e1-2.
51. Kawasaki T, Ogata M, Kawasaki C, Tomihisa T, Okamoto K, Shigematsu A. Surgical stress induces endotoxin hyporesponsiveness and an early decrease of monocyte mCD14 and HLA-DR expression during surgery. Anesth Analg 2001;92:1322-6.
52. Keel M, Trentz O. Pathophysiology of Polytrauma. Injury 2005 36: 691-709
53. Kim OY, Monsel A, Bertrand M, Coriat P, Cavaillon JM, Adib-Conquy M. Differential down-regulation of HLA-DR on monocyte subpopulations during systemic inflammation. Crit Care 2010;14:R61.
54. Kimura, F., Shimizu, H., Yoshidome, H., Ohtsuka, M., & Miyazaki, M. Immunosuppression following surgical and traumatic injury. Surgery today 2010,40(9), 793-808.
55. Kirchhoff C, Biberthaler P, Mutschler WE, Faist E, Jochum M, Zedler S. Early down-regulation of the pro-inflammatory potential of monocytes is correlated to organ dysfunction in patients after severe multiple injury: a cohort study. Crit Care 2009;13:R88.
56. Klava A, Windsor AC, Farmery SM, et al. Interleukin-10. A role in the development of postoperative immunosuppression. Arch Surg 1997;132:425-9.
57. Klein DJ, Briet F, Nisenbaum R, Romaschin AD, Mazer CD. Endotoxemia related to cardiopulmonary bypass is associated with increased risk of infection after cardiac surgery: a prospective observational study. Crit Care 2011;15:R69.
58. Kunkel, S. L., et al. Prostaglandin E2 regulates macrophage-derived tumor necrosis factor gene expression. Journal of Biological Chemistry 263.11 (1988): 5380-5384.
59. Labor Berlin. http://www.laborberlin.com/leistungsverzeichnis.html accessed online 13.4.2014
60. Leentjens J, Kox M, van der Hoeven JG, Netea MG, Pickkers P. Immunotherapy for the adjunctive treatment of sepsis: from immunosuppression to immunostimulation. Time for a paradigm change? Am J Respir Crit Care Med 2013;187:1287-93.
61. Lennard AC. Interleukin-1 receptor antagonist. Crit Rev Immunol 1995;15(1):77-105.

62. Li J, Lee DSW, Madrenas J. Evolving bacterial envelopes and plasticity of TLR2-dependent responses: basic research and translational opportunities. Front Immunol 2013 Oct 28;4:347.
63. Li YP, Huang J, Huang SG, et al. The compromised inflammatory response to bacterial components after pediatric cardiac surgery is associated with cardiopulmonary bypass-suppressed Toll-like receptor signal transduction pathways. J Crit Care. 2014 Apr;29(2):312.e7-13.
64. Lindberg HL, Hoel TN. The Systemic Inflammatory Response Syndrome Following Cardiopulmonary Bypass in Children. Inflammatory Response in Cardiovascular Surgery: Springer; 2013:245-53. ISBN: 978-1-4471-4428-1.
65. Madden KS, Sanders VM, Felten DL. Catecholamine influences and sympathetic neural modulation of immune responsiveness. Ann Rev Pharmacol Toxicol 1995;35:417-48.
66. Mahle WT, Matthews E, Kanter KR, Kogon BE, Hamrick SE, Strickland MJ. Inflammatory Response After Neonatal Cardiac Surgery and Its Relationship to Clinical Outcomes. Ann Thorac Surg 2014 Mar;97(3):950-6.
67. Majetschak M, Flach R, Kreuzfelder E, et al. The extent of traumatic damage determines a graded depression of the endotoxin responsiveness of peripheral blood mononuclear cells from patients with blunt injuries. Crit Care Med 1999;27:313-8.
68. McBride, W. T., et al. Cytokine balance and immunosuppressive changes at cardiac surgery: contrasting response between patients and isolated CPB circuits. Br J Anaesth 1995 Dec;75(6):724-733.
69. Meisel C, Hoflich C, Volk HD. Immune monitoring in SIRS and sepsis based on the PIRO model. Dtsch Med Wochenschr 2008;133:2332-6.
70. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. J Immunol 2000;164:6166-73.
71. Monneret G, Lepape A, Voirin N, et al. Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. Intensive Care Med 2006;32(8):1175–83.
72. Moore FA, Sauaia A, Moore EE, Haenel JB, Burch JM, Lezotte DC. Postinjury multiple organ failure: a bimodal phenomenon. J Trauma 1996;40:501-10; discussion 10-2.
73. Mueller SC, Marz R, Schmolz M, Drewelow B. Intraindividual long term stability and response corridors of cytokines in healthy volunteers detected by a standardized whole-blood culture system for bed-side application. BMC Med Res Methodol 2012;12:112.
74. Murphy GS, Hessel EA, Groom RC. Optimal perfusion during cardiopulmonary bypass: an evidence-based approach. Anesth Analg 2009 May;108(5):1394-417.
75. Nielsen N, Wetterslev J, Cronberg T, et al. Targeted temperature management at 33 degrees C versus 36 degrees C after cardiac arrest. N Engl J Med 2013;369:2197-206.
76. Osterud B, Bjorklid E. The tissue factor pathway in disseminated intravascular coagulation. Semin Thromb Hemost 2001;27:605-17.

77. Osuchowski MF, Welch K, Siddiqui J, Remick DG. Circulating cytokine/inhibitor profiles reshape the understanding of the SIRS/CARS continuum in sepsis and predict mortality. J Immunol 2006;177(3):1967–74.
78. Pasnik J, Moll J, Cywinska-Bernas A, Moll J, Sysa A, Zeman K. Proteolytic and cytokine balance abnormalities in children with congenital heart disease undergoing cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. Kardiol Pol 2007;65:1208-14; discussion 15.
79. Patel M, Stefanidou M, Long CB, et al. Dynamics of cell-mediated immune responses to cytomegalovirus in pediatric transplantation recipients. Pediatr Transplant 2012;16:18-28.
80. Perrier S, Darakhshan F, Hajduch E. IL-1 receptor antagonist in metabolic diseases: Dr Jekyll or Mr Hyde? FEBS Letters 2006;580:6289-94.
81. Peters DM, Vadász I, Wujak U, et al. TGF-β directs trafficking of the epithelial sodium channel ENaC which has implications for ion and fluid transport in acute lung injury. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Jan 21;111(3):E374-83.
82. Platzer C, Döcke WD, Volk HD, Prösch S. Catecholamines trigger IL-10 release in acute systemic stress reaction by direct stimulation of its promoter/enhancer activity in monocytic cells. J Neuroimmunol. 2000 Jun 1;105(1):31-8.
83. Ploder M, et al. LPS-induced TNF-a production and not monocyte human leukocyte antigen-DR expression is correlated with survival in septic trauma patients. Shock 2006 Feb;25(2):129-34.
84. Poloso NJ, Urquhart P, Nicolaou A, Wang J, Woodward DF. PGE2 differentially regulates monocyte-derived dendritic cell cytokine responses depending on receptor usage (EP2/EP4). Mol Immunol 2013;54:284-95.
85. Ranucci M, Carlucci C, Isgro G, et al. Hypothermic cardiopulmonary bypass as a determinant of late thrombocytopenia following cardiac operations in pediatric patients. Acta Anaesthesiol Scand 2009;53:1060-7.
86. Rasmussen BS, Sollid J, Knudsen L, Christensen T, Toft E, Tonnesen E. The release of systemic inflammatory mediators is independent of cardiopulmonary bypass temperature. J Cardiothorac Vasc Anesth 2007;21:191-6.
87. Rasmussen LS, et al. Normothermic versus hypothermic cardiopulmonary bypass during repair of congenital heart disease. J Cardiothorac Vasc Anesth 2001, 15. Jg., Nr. 5, S. 563-566.
88. Roussel L, et al. IL-17 promotes p38 MAPK-dependent endothelial activation enhancing neutrophil recruitment to sites of inflammation. J Immunol. 2010 Apr 15;184(8):4531-7.
89. Salliot C, Dougados M, Gossec L. Risk of serious infections during rituximab, abatacept and anakinra treatments for rheumatoid arthritis: meta-analyses of randomised placebo-controlled trials. Ann Rheum Dis 2009;68:25-32.
90. Schoenbein C, Dööcke WD, Wolk K, et al. Long-term interleukin-10 presence induces the development of a novel, monocyte-derived cell type. Clin Exp Immunol 2008;151:306-16.
91. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. J Leukoc Biol 2004;75:163-89.

92. Schure AY. Cardiopulmonary bypass in infants and children: what's new?: cardiac anaesthesia. South Afr J Anaesth Analg: SASA Congress Edition-Refresher Course Index (Vol. 16, No. 1, pp. 25-27). Sabinet Online.

93. Seghaye MC, Grabitz RG, Duchateau J, et al. Inflammatory reaction and capillary leak syndrome related to cardiopulmonary bypass in neonates undergoing cardiac operations. J Thorac Cardiovasc Surg 1996;112:687-97.

94. Siemens Immulite. http://www.healthcare.siemens.de/services/laboratory-diagnostics/referenzwerte. Accessed online 13.4.2014

95. Sievers C. Mechanismen der posttraumatischen Immundepression. Doktorarbeit. Humboldt-Universität zu Berlin, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I; 2010.

96. Skapenko A, Lipsky PE, Kraetsch HG, Kalden JR, Schulze-Koops H. Antigen-independent Th2 cell differentiation by stimulation of CD28: regulation via IL-4 gene expression and mitogen-activated protein kinase activation. J Immunol 2001;166:4283-92.

97. Speziale G, et al. Effect of normothermic versus hypothermic cardiopulmonary bypass on cytokine production and platelet function. J Cardiovasc Surg (Torino). 2000 Dec;41(6):819-27.

98. Spolarics Z, Siddiqi M, Siegel JH, et al. Depressed interleukin-12-producing activity by monocytes correlates with adverse clinical course and a shift toward Th2-type lymphocyte pattern in severely injured male trauma patients. Crit Care Med 2003;31:1722-9.

99. Steensberg A, Fischer CP, Keller C, Moller K, Pedersen BK. IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans. Am J Physiol Endocrinol Metab 2003;285:E433-7.

100. Stocker CF, Shekerdemian LS, Horton SB, et al. The influence of bypass temperature on the systemic inflammatory response and organ injury after pediatric open surgery: a randomized trial. J Thorac Cardiovasc Surg 2011;142:174-80.

101. JC, Blume C, Meisel C. Standardized immune monitoring for the prediction of infections after cardiopulmonary bypass surgery in risk patients. Cytometry B Clin Cytom 2003;53B:54-62.

102. Sundar KM, Sires M. Sepsis induced immunosuppression: Implications for secondary infections and complications. Indian J Crit Care Med 2013;17:162-9.

103. Sugitharini V, Prema A, Berla A. Inflammatory mediators of systemic inflammation in neonatal sepsis. Inflamm Res 2013 Dec;62(12):1025-1034.

104. Tanzi P, Cain K, Kalil A, et al. Post-stroke infection: a role for IL-1ra? Neurocrit Care 2011;14:244-52.

105. Tárnok A, Schneider P. Pediatric cardiac surgery with cardiopulmonary bypass: pathways contributing to transient systemic immune suppression. Shock 2001;16 Suppl 1:24-32.

106. Tassani P, et al. Cardiac surgery with deep hypothermic circulatory arrest produces less systemic inflammatory response than low-flow cardiopulmonary bypass in newborns. J Thorac Cardiocasc Surg. 2002 Apr;123(4): 648-654.

107. Thiele K. Differenzierte immunologische Charakterisierung der postoperativen Immundepression nach kardiochirurgischen Eingriffen. Dissertation Charité-Universitätsmedizin Berlin 2009.
108. Toraman F, Evrenkaya S, Yuce M, et al. Highly positive intraoperative fluid balance during cardiac surgery is associated with adverse outcome. Perfusion 2004;19:85-91.
109. Trappe U, Riess H. Basics in the pathophysiology of sepsis. Hämostaseologie 2005;25:175-82.
110. Tschoeke SK, Ertel W. Immunoparalysis after multiple trauma. Injury 2007;38:1346-57.
111. Uniprot Proteindatenbank: http://www.uniprot.org accessed online 13.4.2014.
112. Van Deventer SJH. Cytokine and cytokine receptor polymorphisms in infectious disease. Intens Care Med 2000;26: S098-S102.
113. Volk HD, Reinke P, Döcke WD. Clinical aspects: from systemic inflammation to 'immunoparalysis'. Chem Immunol 2000;74:162-77.
114. Volk T, et al. Stress induced IL-10 does not seem to be essential for early monocyte deactivation following cardiac surgery. Cytokine 2003, 24(6): 237-243.
115. Wang P, et al. IL-10 inhibits transcription of cytokine genes in human peripheral blood mononuclear cells. J Immunol 1994 Jul15;153(2):811-816.
116. Wolk K, Döcke WD, von Baehr V, Volk H, Sabat R. Comparison of monocyte functions after LPS- or IL-10-induced reorientation: importance in clinical immunoparalysis. Pathobiology 1999;67:253-6.
117. Xiao G, Guo Q, Shu M, et al. Safety profile and outcome of mild therapeutic hypothermia in patients following cardiac arrest: systematic review and meta-analysis. Emerg Med J 2013;30:91-100.
118. Xiao W, Mindrinos MN, Seok J, Cuschieri J, Cuenca AG, Gao H, Hayden DL, Hennessy L, Moore EE, Minei JP, et al. A genomic storm in critically injured humans. J Exp Med 2011;208(13):2581–90.
119. Xing Z, Gauldie J, Cox G, et al. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. J Clin Invest 1998;101:311.
120. Yang G, Hamacher J, Gorshkov B, et al. The Dual Role of TNF in Pulmonary Edema. J Cardiovasc Dis Res 2010;1:29-36.
121. Yerkovich ST, Wikström ME, Suriyaarachchi D, Prescott SL, Upham JW, Holt PG. Postnatal development of monocyte cytokine responses to bacterial lipopolysaccharide. Pediatr Res 2007;62:547-52.
122. Yoo JS, Kim JB, Joo Y, et al. Deep hypothermic circulatory arrest versus non-deep hypothermic beating heart strategy in descending thoracic or thoracoabdominal aortic surgery. Eur J Cardiothorac Surg 2014:ezu053.

7 Erklärung an Eides Statt

„Ich, Georgia Justus, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Zytokinsekretion unter kardiochirurgischem Eingriff im Säuglingsalter: Einfluss des Immunstatus auf den postoperativen Verlauf“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.
Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -*www.**icmje**.org*) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik entsprechen den URM und werden von mir verantwortet.
Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgehen werden und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM und werden von mir verantwortet.
Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum Unterschrift

Publikationen:

Zur Veröffentlichung eingereicht und akzeptiert:

Influence of bypass temperature on clinical outcome and inflammation: A prospective randomized pediatric trial
Schmitt K.R.L. [(1)*], Fedarava K. [(1)], Justus G. [(1)], Delmo-Walther E. [(2)], Hetzer R. [(2)], Berger F. [(1,3)] and Miera O. [(1)]
Heart Lung and Vessels
Persönlicher Anteil: 30%, Datenauswertung, Statistik, Diskussion

In Vorbereitung:

Avoiding Prenatal Programming Effects of Glucocorticoids:
Are there alternative treatments for the induction of antenatal lung maturation?
G. Justus[1*], D. M. Sloboda[2*], J. W. Dudenhausen[1], W. Henrich[1], J. P. Newnham[3], J. R. G. Challis[4,5], A. Plagemann[1] and T. Braun[1]
*first shared authorship

Persönlicher Anteil: 70%: Publikationszusammenstellung für Review, Auswertung der einzelnen Studien, Verfassen des deutschen und englischen Manuskripts

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Priv.-Doz. Dr. med. Katharina Schmitt, Klinik für Angeborene Herzfehler / Kinderkardiologie Deutsches Herzzentrum Berlin, für die Überlassung des Themas und ihre uneingeschränkte Unterstützung des gesamten Projekts. Mein herzlicher Dank gilt ihrer fortwährenden Diskussionsbereitschaft, großen Begeisterungsfähigkeit und steten Übersicht über unser Thema.

Großer Dank gilt Herrn Dr. med. Oliver Miera für seine hervorragende fachliche Unterstützung in allen klinischen Fragen sowie die exakte Überprüfung des Manuskripts.

Danken möchte ich Herrn Dipl.-Math. René Wähner für statistische Beratung.

Für ausführliche Gespräche über die Immunologie der Monozyten danke ich Herrn PD Gerald Grütz, Medizinische Immunologie, Charité, Frau Dr. rer. nat. Ulrike Kuckelkorn, Institut für Biochemie, Charité, sowie Herrn Prof. Andreas Meisel, Klinik für Neurologie, Charité. Herrn Dr. Christian Meisel, Labor Berlin, und Herrn Dr. Manfred Schmolz, EDI Reutlingen, danke ich für die ausführliche Beantwortung von methodischen Fragen zur Messung der Immunsuppression.

9 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.