

Aus der Klinik für Anästhesiologie mit Schwerpunkt operative
Intensivmedizin der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Der Einfluss herzchirurgischer Operationen auf die Aktivität
von Alveolarmakrophagen und die Entstehung postoperativer
Pneumonien

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Karin Rest

aus Warendorf

Datum der Promotion: 8.12.2017

Vorbemerkung

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

Chalk K, Meisel C, Spies C, Volk T, Thuenemann K, Linneweber J, Wernecke KD, Sander M. Dysfunction of alveolar macrophages after cardiac surgery and postoperative pneumonia? – An observational study. *Critical Care* 2013; 17 (6): R285.

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	6
2	Abstrakt / Abstract.....	9
2.1	Abstrakt	9
2.2	Abstract	11
3	Einleitung.....	13
3.1	Pulmonale Komplikationen nach herzchirurgischen Operationen	13
3.2	Systemische Immunmodulation durch herzchirurgische Eingriffe	14
3.3	Alveolarmakrophagen	16
3.4	HLA-DR	16
3.5	HLA-DR auf Monozyten	17
3.6	Toll-like-Rezeptoren auf AM.....	19
3.7	Zytokine in der bronchoalveolären Flüssigkeit	22
3.8	Fragestellung	23
4	Material und Methoden	25
4.1	Material	25
4.1.1	Geräte	25
4.1.2	Verbrauchsmaterialien	25
4.1.3	Software.....	26
4.1.4	Antikörper.....	26
4.1.5	Chemikalien und Biochemikalien	27
4.1.6	Puffer und Lösungen.....	27
4.2	Studiendesign	28

4.3	Patientenkollektiv	28
4.3.1	Einschlusskriterien und Ausschlusskriterien	29
4.4	Studienaufbau	30
4.4.1	Standards der Anästhesie und des perioperativen Monitorings	30
4.4.2	Extrakorporale Zirkulation mit HLM	30
4.4.3	Postoperative Überwachung auf der Intensivstation	31
4.4.4	Entnahme der Blutproben	32
4.4.5	Durchführung der BAL	33
4.4.6	Separation der Zellen aus der BAL-Flüssigkeit	33
4.5	Immunologische Diagnostik	34
4.5.1	Durchflusszytometrische Messung.....	34
4.5.2	Differenzierung mononuklearer Zellen	35
4.5.3	Quantitative Bestimmung der HLA-DR-Expression.....	36
4.5.4	Quantitative Bestimmung der TLR2/4-Expression auf AM.....	37
4.6	LPS-Stimulation der Monozyten und AM.....	37
4.6.1	Quantitative Bestimmung der Zytokine	38
4.7	Statistische Verfahren	39
5	Ergebnisse.....	41
5.1	Patientenkollektiv	41
5.2	Zellzahlen nach Differenzialfärbung der Blutproben.....	44
5.3	Expression von HLA-DR auf Monozyten und AM.....	46
5.4	Expression von TLR2/4 auf AM.....	52
5.5	Zytokin-Produktion von Monozyten und AM nach LPS-Stimulation	56
6	Diskussion	58
6.1	HLA-DR-Expression auf AM und Monozyten	58

6.2	TLR2/4 auf AM	61
6.3	Zytokine.....	64
6.4	Limitationen der Studie.....	66
6.5	Schlussfolgerung.....	67
7	Literaturverzeichnis.....	69
8	Abbildungsverzeichnis	82
9	Tabellenverzeichnis	83
10	Eidesstattliche Versicherung.....	84
11	Lebenslauf	86
12	Publikationsliste	88
13	Danksagung.....	89

1 Abkürzungsverzeichnis

ABC	Antibodies bound per cell
APC	Allophycocyanin
AM	Alveolarmakrophage
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BD	Becton Dickinson
BGA	Blutgasanalyse
CABG	Coronary artery bypass grafting
CARS	Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome
CD	Cluster of Differentiation
CDC	Center of Disease Control
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CPB	Kardiopulmonaler Bypass
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKZ	Extrakorporale Zirkulation
FACS	Fluorescence-Activated-Cell-Sorter
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FiO ₂	Inspiratorische Sauerstofffraktion

FSC	Forwardscatter
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor
HLA-DR	Human-Leukozyten-Antigen-DR
HLM	Herz-Lungen-Maschine
IE	Internationale Einheit
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ITS	Intensivstation
KIU	Kilo International Units
LPS	Lipopolysaccharid
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
MAD	Mittlerer arterieller Blutdruck
MHC	Hauptkompatibilitätskomplex
mHLA-DR	Monozytäres Human Leukozyten Antigen-DR
NNR	Nebennierenrinde
PAMPs	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
PepG	Peptidoglykan

PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PIA	Partikel-Immunoassay
PRRs	Mustererkennungsrezeptoren
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrom
SSC	Sidescatter
TGF	Transforming Growth Factor
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor

2 Abstrakt / Abstract

2.1 Abstrakt

Einleitung: Nach einem herzchirurgischen Eingriff mit kardiopulmonalem Bypass (CPB) haben Patienten ein erhöhtes Risiko, eine postoperative Pneumonie zu entwickeln. Unklar sind bislang die pathophysiologischen Ursachen für dieses erhöhte Risiko. Bekannt ist, dass herzchirurgische Operationen mit CPB das systemische Immunsystem stark beeinflussen. Auch eine Veränderung der pulmonalen Immunabwehr, insbesondere der Alveolarmakrophagen (AM), scheint daher als ein Grund für die Entwicklung einer postoperativen Pneumonie möglich. Um diesen Zusammenhang zu untersuchen, haben wir prä- und postoperativ die Oberflächenmoleküle Human-Leukozyten-Antigen-DR (HLA-DR) und Toll-like-Rezeptor 2 und 4 (TLR2/4) auf AM untersucht. Zusätzlich erfolgte eine *in vitro*-Stimulation der AM mit Lipopolysaccharid (LPS) und die anschließende Messung von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen. Die Ergebnisse haben wir mit der Entwicklung einer postoperativen Pneumonie in Beziehung gesetzt.

Methoden: Nach Freigabe durch die zuständige Ethikkommission und der schriftlichen Einwilligung der Patienten erfolgte der Einschluss von 33 Studienpatienten, die für eine elektive Operation eines Koronararterien-Bypasses stationär aufgenommen wurden. Direkt nach Einleitung der Anästhesie und zwei Stunden nach Beendigung des CPB erfolgte bei jedem Studienpatienten eine periphere Blutabnahme und eine bronchoalveoläre Lavage (BAL). Mittels Durchflusszytometrie wurde die Expression von HLA-DR auf Monozyten und AM sowie die Expression von TLR2/4 auf AM bestimmt. Monozyten und AM wurden mit LPS stimuliert und die Konzentration der Zytokine (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 und IL-10) durchflusszytometrisch gemessen. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Wilcoxon-Test und dem Mann-Whitney-U-Test.

Ergebnisse: Eine Gesamtzahl von drei Patienten (9%) entwickelte im Verlauf eine postoperative Pneumonie. Nach der Operation war bezogen auf die gesamte Patientengruppe sowohl die HLA-DR-Expression auf AM (p-Wert = 0,001*) als auch die HLA-DR-Expression auf Monozyten (p-Wert = 0,001*) im Vergleich zu den Ausgangswerten signifikant reduziert. Bei der Gruppe der Patienten mit postoperativer Pneumonie zeigte sich postoperativ im Vergleich zur Gruppe der Patienten ohne Pneumonie eine signifikante Abnahme sowohl der HLA-DR-Expression auf AM (p-Wert = 0,024*) als auch der TLR4-Expression auf AM (p-Wert = 0,041*). Bereits vor der Operation war der Wert der TLR2-Expression auf AM bei Patienten mit postoperativer Pneumonie signifikant niedriger (p-Wert = 0,027*). Postoperativ zeigte sich die Konzentration der Zytokine TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IL-8 nach LPS-Stimulation der Monozyten signifikant reduziert. Nach LPS-Stimulation der AM konnte hingegen postoperativ keine statistisch signifikante Abnahme der Konzentration der Zytokine TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 und IL-10 festgestellt werden.

Schlussfolgerung: In der vorliegenden Arbeit konnte unseres Wissens nach erstmals gezeigt werden, dass herzchirurgische Operationen zu einer frühzeitigen Veränderung der lokalen pulmonalen Immunabwehr führen. Die Ergebnisse stützen die Hypothese, dass diese pulmonalen Veränderungen mit der Entstehung einer postoperativen Pneumonie in Verbindung stehen.

2.2 Abstract

Introduction: Patients undergoing cardiac surgery with cardiopulmonary bypass (CPB) have an increased risk of developing postoperative pneumonia. The pathophysiological causes for this increased risk are still unclear. However it is known that cardiac surgery with CPB strongly influences the systemic immune system. Therefore a change in the pulmonary immune defense, in particular the alveolar macrophages (AMs), could be a reason for the development of postoperative pneumonia. In order to investigate this relationship, we examined the surface molecules of human leukocyte antigen DR (HLA-DR) and toll-like receptor 2 and 4 (TLR2/4) on AMs pre- and postoperatively. In addition, an *in vitro* stimulation of AMs with lipopolysaccharide (LPS) and the subsequent measurement of pro- and anti-inflammatory cytokines were performed. The results have been correlated to the development of postoperative pneumonia.

Methods: After ethical approval and written informed consent, 33 patients undergoing elective coronary artery bypass grafting (CABG) surgery were included in this observational study. Peripheral blood cells and alveolar lavage fluid were collected directly after induction of anesthesia and two hours after separation from CPB. HLA-DR expression on monocytes and on AMs as well as TLR2/4 expression on AMs were assessed by flow cytometry. Monocytes and AMs were *in vitro* stimulated with LPS and the concentration of cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 and IL-10) was determined by flow cytometry. Statistical analysis was performed with the Wilcoxon test and the Mann-Whitney-U test.

Results: A total of three patients (9%) developed postoperative pneumonia. Postoperatively HLA-DR expression on AMs ($p = 0.001^*$) and HLA-DR expression on peripheral blood monocytes ($p = 0.001^*$) was significantly reduced compared to baseline in all patients. After surgery HLA-DR expression on AMs ($p = 0.024^*$) and TLR4 expression on AMs ($p = 0.041^*$) was significantly reduced in patients who developed postoperative pneumonia compared to patients without pneumonia. Already before surgery the baseline of TLR2 expression on AMs was significantly lower ($p =$

0.027*) in patients who developed postoperative pneumonia. After surgery the concentration of cytokines TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-8 was significantly reduced after stimulation of the monocytes with LPS. Postoperatively the concentration of the investigated cytokines TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 and IL-10 was not significantly reduced after stimulation of AMs with LPS.

Conclusions: As far as we know this is the first study that shows an early impairment of lung cellular immune response after cardiac surgery. The findings support the hypothesis that these pulmonary changes are associated with the development of postoperative pneumonia.

3 Einleitung

Herzchirurgische Operationen gehen mit einem erhöhten Risiko für postoperative Pneumonien einher. Obwohl die systemischen Veränderungen des Immunsystems bei Patienten nach einem solchen Eingriff gut beschrieben sind, bleibt das Verständnis der postoperativen pulmonalen Immunmodulation lückenhaft. In diesem Zusammenhang spielen Alveolarmakrophagen (AM) eine entscheidende Rolle, da sie als wichtigste pulmonale Abwehrzellen eine Schlüsselfunktion in der zellulären Immunabwehr einnehmen. In der vorliegenden Arbeit wird die Hypothese untersucht, ob herzchirurgische Operationen die Aktivität von AM beeinflussen und somit die Entstehung postoperativer Pneumonien begünstigen können.

3.1 Pulmonale Komplikationen nach herzchirurgischen Operationen

Die Entwicklung einer postoperativen Pneumonie ist neben kardiologischen Schwierigkeiten die häufigste Komplikation nach einem herzchirurgischen Eingriff [1, 2]. Insbesondere gram-negative Bakterien wie *Klebsiella pneumoniae* gelten als Auslöser dieser Komplikation [3, 4]. Als Folge dieser Erkrankung wurden eine gesteigerte Morbidität und Mortalität sowie ein verlängerter Aufenthalt auf der Intensivstation (ITS) mit einem Anstieg der Behandlungskosten identifiziert [5–8]. So lag etwa in einer europäischen Studie mit über 10.000 Patienten die Liegedauer auf der ITS bei Patienten mit postoperativer Pneumonie im Schnitt bei ca. 23 Tagen. Bei Patienten, die diese Komplikation nicht entwickelten, betrug sie dagegen lediglich 2 Tage [1]. Verschiedene US-amerikanische Studien konnten außerdem zeigen, dass die Sterblichkeit der Patienten mit postoperativer Pneumonie (23,7% bei Kollef et al. bzw. 51% bei Leal-Nova et al.) im Vergleich zu nicht erkrankten Patienten deutlich erhöht war (3,2% bzw. 6,7%) [8, 9].

Die frühzeitige Erkennung einer postoperativen Pneumonie stellt somit eine besondere Herausforderung dar und ist umso wichtiger, da die rechtzeitige Einleitung einer adäquaten antibiotischen Therapie die Prognose entscheidend beeinflusst [10, 11]. Unklar sind bislang noch die genauen pathophysiologischen Ursachen dafür, warum herzchirurgische Patienten besonders gefährdet sind, eine postoperative Pneumonie zu entwickeln. Eine perioperative Immunmodulation des pulmonalen Immunsystems könnte jedoch ein Grund für diese häufige Komplikation sein [6, 7, 12]. Es ist in der Literatur gut beschrieben, dass Operationen am offenen Herzen mit einer systemischen Immunmodulation verbunden sind, welche eine postoperative Immunsuppression zu Folge hat [13–17]. Dies soll im nächsten Abschnitt näher erläutert werden.

3.2 Systemische Immunmodulation durch herzchirurgische Eingriffe

Experimentelle und klinische Studien haben in der Vergangenheit bewiesen, dass operative Eingriffe das Immunsystem erheblich beeinträchtigen. So wird bei herzchirurgischen Operationen mit Herz-Lungen-Maschine (HLM) bereits perioperativ eine systemische proinflammatorische Immunantwort ausgelöst [13, 18–26]. Sie ist gekennzeichnet durch eine gesteigerte systemische Sezernierung proinflammatorischer Zytokine wie Interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-8 und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α). Diese Zytokine sind die Hauptakteure in der proinflammatorischen Phase. Produziert werden die Zytokine zum größten Teil von Makrophagen, aber auch von dendritischen Zellen, T-Zellen und Endothelzellen [18, 27, 28]. Diese proinflammatorische Reaktion kann in ein „Systemic Inflammatory Response Syndrom“ (SIRS) übergehen [29]. Für die Entstehung dieser proinflammatorischen Immunantwort bzw. eines SIRS werden verschiedene Auslöser diskutiert [28, 30, 31]. Als wichtigste Faktoren gelten hierfür der Kontakt des extrakorporal zirkulierenden Blutes mit den nicht physiologischen Materialien der HLM, die durch Ischämie und Perfusion in der Abklemmphase der Aorta entstehenden Schäden an Kardiomyozyten und Lungengewebe, die während der OP direkt in die Blutbahn eindringenden bakteriellen Endotoxine (z.B. Lipopolysaccharid

(LPS)) sowie das durch die Folgen der OP entstehende ausgedehnte Gewebetrauma [20–24, 32].

Als Antwort auf die proinflammatorische Stoffwechsellaage wird im weiteren Verlauf eine antiinflammatorische Gegenreaktion eingeleitet. Diese wird als „Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome“ (CARS) bezeichnet [18, 28, 29, 33]. Insbesondere die kontinuierlich hohe Konzentration des proinflammatorischen Zytokins IL-6 sorgt über die Freisetzung von Prostaglandin E₂, dem potentesten antiinflammatorischen Mediator, für einen Anstieg weiterer antiinflammatorischer Mediatoren wie IL-10. IL-10 wird ebenfalls von Makrophagen, T-Zellen und dendritischen Zellen sezerniert und hemmt als antiinflammatorisches Zytokin die Aktivität von Makrophagen und T-Zellen [13, 34].

Auch der initiale Anstieg der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF- α induziert die Einleitung einer antiinflammatorischen Gegenreaktion. Über das vegetative Nervensystem kommt es zur Freisetzung von Acetylcholin und Katecholaminen. Ferner führt der Anstieg von IL-6 zur Freisetzung von Glukokortikoiden aus der Nebennierenrinde (NNR). Unter dem Einfluss von Acetylcholin, Katecholaminen und Glukokortikoiden sowie einem steigenden IL-10-Level kommt es zu einer Suppression der monozytären TNF- α -Sekretion und zu einer Abnahme der Human-Leukozyten-Antigen-DR-Expression (HLA-DR-Expression) auf Monozyten [27, 35–43]. Auf Grund der niedrigen HLA-DR-Expression können Monozyten die Information über eine akute bakterielle Infektion nicht mehr adäquat an T-Zellen weiterleiten und eine zellulär vermittelte Immunantwort mit spezifischer Antikörpersynthese bleibt aus [44–46]. Dieser Zustand wird von einigen Autoren daher auch als „Immunparalyse“ bezeichnet [47]. In dieser Phase der Immunsuppression steigt das Risiko der Patienten, eine postoperative Infektion zu entwickeln [17, 19, 41, 48].

Die systemische immunsuppressive Phase ist somit insbesondere durch eine Deaktivierung der Monozyten auf Grund einer mangelnden HLA-DR-Expression gekennzeichnet [47]. Es wäre vorstellbar, dass Alveolarmakrophagen ähnlich wie Monozyten postoperativ ebenfalls eine „Immunparalyse“ durchlaufen und so

postoperative Pneumonien begünstigt werden. Dies rückt die Alveolarmakrophagen als zentrale Schaltstelle der zellulären pulmonalen Immunabwehr in den Fokus.

3.3 Alveolarmakrophagen

Die Alveolarmakrophagen sind Teil der pulmonalen organspezifischen Immunabwehr und gehören zum unspezifischen Immunsystem [49, 50]. Zu ihren wichtigsten Eigenschaften zählen die Aktivierung des spezifischen Immunsystems, die Phagozytose von Bakterien und die Synthese löslicher Immunmediatoren wie z.B. Zytokinen [51, 52]. Auf ihrer Oberfläche befinden sich sowohl Rezeptoren, um Antigene gegenüber anderen Zellen zu präsentieren, als auch Rezeptoren, um Toxine wie z.B. LPS gram-negativer Bakterien zu erkennen [53, 54]. Durch Phagozytose aufgenommene Bakterien werden zu bakteriellen Antigenen verarbeitet und diese an der Zelloberfläche mit Hilfe von HLA-DR exprimiert. Über HLA-DR präsentieren AM Antigene gegenüber CD4+ T-Zellen, wodurch die Proliferation und Differenzierung der CD4+ T-Zellen eingeleitet wird. Differenzierte CD4+ T-Zellen induzieren in einem nächsten Schritt die Produktion der spezifischen Antikörpersynthese durch B-Zellen. Die zellvermittelte, spezifische Immunantwort wird somit maßgeblich über die Expression von HLA-DR gesteuert [27, 50].

3.4 HLA-DR

HLA-DR zählt zu den Hauptkompatibilitätskomplex-Molekülen der Klasse II (MHC-II-Molekülen). MHC-II-Moleküle befinden sich nur auf professionellen antigenpräsentierenden Zellen. Dazu gehören Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen und B-Zellen [27]. HLA-DR spielt sowohl in der pulmonalen organspezifischen

Immunabwehr auf AM als auch in der systemischen Immunabwehr auf Monozyten eine entscheidende Rolle in der Koordination einer effektiven Immunantwort. Als Induktoren sind unter anderem Interferon- γ (IFN- γ), IL-1, Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) und LPS bekannt. Sie steigern die Expression von HLA-DR [30, 55, 56]. Transforming Growth Factor- β (TGF- β) und IL-10 wirken dagegen hemmend und mindern somit die Expression von HLA-DR [57, 58]. Die Veränderung der Expression von HLA-DR auf Monozyten, insbesondere ausgelöst durch Operationen und schwere Verletzungen, und die damit verbundene Folgen für den Patienten sind Forschungsgegenstand vieler klinischer Studien und sollen im folgenden Abschnitt näher erläutert werden [30, 44, 59–62].

3.5 HLA-DR auf Monozyten

Kawasaki et al. gehen der Frage nach, wie sich operativer Stress auf das Immunsystem auswirkt und sich die Expression von HLA-DR auf Monozyten verändert. So konnten sie in ihrer Studie zeigen, dass die monozytäre HLA-DR-Expression bereits kurz nach Beginn einer Operation rapide abnahm und erst am siebten postoperativen Tag ein vollständiger Wiederanstieg erreicht wurde. Die Autoren schlussfolgern, dass die Abnahme Ausdruck einer postoperativen Immunsuppression sein könnte [44]. Doch nicht nur operativer Stress kann die HLA-DR-Expression auf Monozyten supprimieren, sondern ebenso Stress, der durch schwere Verletzungen oder etwa eine akute Pankreatitis ausgelöst wird [59, 60, 63].

Einem weiteren wichtigen Aspekt gehen Allen et al. in ihrer Studie nach [64]. Sie untersuchten die Expression von HLA-DR auf Monozyten bei Kindern nach herzchirurgischer Operation mit kardiopulmonalem Bypass (CPB) in Hinblick auf das Risiko der Entwicklung einer Sepsis oder eines SIRS. Postoperativ zeigten alle Kinder eine Abnahme der monozytären HLA-DR-Expression, wobei die Kinder mit der prozentual geringsten Expression von HLA-DR ein erhöhtes Risiko für die Entstehung

einer Sepsis oder eines SIRS aufwiesen [64]. Auch bei Patienten mit akuter Pankreatitis erwies sich eine starke Reduktion der monozytären HLA-DR-Expression als ein zuverlässiger Indikator für die Entwicklung einer Sepsis [65]. Lukaszewic et al. schlussfolgern, dass insbesondere ein ausbleibender Wiederanstieg mit dem Risiko einer Infektion assoziiert sein könnte. In ihrer Studie zeigten Patienten, die aufgrund unterschiedlichster Diagnosen auf einer Intensivstation behandelt wurden, initial alle eine verminderte HLA-DR-Expression. Die Autoren konnten nachweisen, dass ein ausbleibender Wiederanstieg der monozytären HLA-DR-Expression mit dem Risiko einer im Verlauf auftretenden sekundären Infektion in Verbindung steht [30]. Zu diesem Ergebnis kommen auch Venet et al. in ihrer Studie an Patienten mit schweren Verbrennungen. Patienten entwickelten im Verlauf häufiger eine Sepsis, wenn sich ab dem vierten bis fünften Tag kein Wiederanstieg der monozytären HLA-DR-Expression zeigte [66].

Die Ergebnisse anderer Studien legen nahe, dass ein Wiederanstieg der monozytären HLA-DR-Expression nicht nur eine Infektion verhindern, sondern auch den Verlauf einer bereits bestehenden Infektion positiv beeinflussen kann. So zeigten bereits an einer Sepsis bzw. einem septischen Schock erkrankte Patienten ein deutlich schlechteres klinisches Ergebnis und eine höhere Letalität, wenn ein Wiederanstieg der monozytären HLA-DR-Expression ausblieb [67, 68]. Ebenso zeigen mehrere Studien, dass es bei Patienten, die an einer akuten Infektion erkrankt waren, insbesondere dann zu einem schweren bzw. letalen Krankheitsverlauf kam, wenn die monozytäre HLA-DR-Expression bei ihnen stark reduziert war [69–71].

Neben der diagnostischen Anwendung zum Immunmonitoring von Hochrisikopatienten bietet das Wissen über die monozytäre HLA-DR-Expression auch einen Ansatzpunkt zur therapeutischen Intervention [28, 72–75]. Meisel et al. verabreichten GM-CSF an Patienten, die an einer Sepsis erkrankt waren und bei denen eine Suppression der monozytären HLA-DR-Expression bekannt war. Unter dieser Therapie zeigte sich ein Wiederanstieg der monozytären HLA-DR-Expression. Die maschinelle Beatmung konnte bei diesen Patienten im Vergleich zur Placebo-Gruppe früher beendet und die Patienten schneller auf eine Normalstation verlegt werden [56]. Zu einem ähnlichen

Ergebnis kommen auch Döcke et al. Sie behandelten ebenfalls an einer Sepsis erkrankte Patienten. Allerdings verwendeten sie zur *in vivo*-Stimulation den Botenstoff IFN- γ . Auch unter dieser Therapie kam es zu einem Wiederanstieg der HLA-DR-Expression auf Monozyten. Die mit IFN- γ behandelten Patienten zeigten ein verbessertes klinisches Ergebnis [45]. Das bessere Wissen über pathophysiologische Vorgänge des Immunsystems stellt somit zusätzlich zu einer möglichen diagnostischen Anwendung auch eine Möglichkeit dar, neue therapeutische Ansätze zu verfolgen und zu installieren.

Auch in Bezug auf die Expression von HLA-DR auf AM liegen erste Studienergebnisse vor. Eine klinische Studie an über 100 Patienten zeigte, dass die Expression von HLA-DR auf AM bei Patienten mit Pneumonie signifikant geringer war als bei Patienten ohne Pneumonie [76]. Diese Ergebnisse werden unterstützt durch eine Studie von Muehlsted et al., die eine Korrelation zwischen der Inzidenz nosokomialer Pneumonien und einer verlängerten Reduktion der HLA-DR-Expression auf AM bei Schwerverletzten nachweisen konnten [77].

3.6 Toll-like-Rezeptoren auf AM

Toll-like-Rezeptoren (TLR) stellen neben HLA-DR-Rezeptoren eine weitere wichtige Gruppe von Oberflächenrezeptoren auf AM dar. Toll-like-Rezeptoren sind essentiell für die Bekämpfung pathogener Keime [78]. Sie werden auch als Mustererkennungsrezeptoren (PRRs) bezeichnet. Sie sind Teil des unspezifischen Immunsystems und kommen vor allem auf der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen vor. TLR spielen eine entscheidende Rolle in der Erkennung pathogen-assoziiertes molekularer Muster (PAMPs). Diese Strukturen sind essentiell für das Überleben von Bakterien und daher vor Veränderungen durch Mutation geschützt. Das bekannteste Beispiel für ein solches Pathogen ist das hochpotente Toxin LPS, das ein Bestandteil der äußeren Membran gram-negativer Bakterien ist [27, 79, 80].

Zwei wichtige Vertreter der TLR-Gruppe sind TLR2 und TLR4. TLR2 bildet die Leitstruktur zur Erkennung gram-positiver Bakterien, z.B. über Peptidoglykan (PepG) [81, 82]. TLR4 erkennt dagegen vor allem gram-negative Bakterien, z.B. über den TLR4-Liganden LPS. Durch Bindung von LPS an TLR4 wird die sofortige Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IL-8 ausgelöst [16, 27, 81, 83, 84]. Zeitlich versetzt erfolgt zusätzlich die Sekretion von antiinflammatorischen Zytokinen wie IL-10 [85]. So konnten Versuche an Knockout-Mäusen ohne TLR4 zeigen, dass die Makrophagen dieser Mäuse nach *in vitro*-Stimulation mit LPS deutlich weniger TNF- α synthetisierten als Mäuse mit TLR4. Dies werten die Autoren als Zeichen einer verringerten Reaktionsfähigkeit gegenüber LPS [86]. Auch Takeuchi et al. führten Untersuchungen an Knockout-Mäusen durch. Hier zeigte sich, dass Makrophagen von Mäusen ohne TLR2 weniger TNF- α produzierten, wenn sie *in vitro* mit Zellwandbestandteilen gram-positiver Bakterien stimuliert wurden. Andererseits zeigten die Mäuse ohne TLR2 eine unveränderte Reaktionsfähigkeit gegenüber LPS [81]. Toll-like-Rezeptoren sind daher essentiell für die frühzeitige Erkennung einer Infektion durch gram-positive oder gram-negative Bakterien [79].

Dass vor allem TLR4 bei der pulmonalen Immunabwehr respiratorischer gram-negativer Bakterien eine elementare Rolle spielt, wird durch mehrere Studien unterstrichen. So infizierten Branger et al. gesunde Mäuse und Knockout-Mäuse (mit mutiertem, funktionslosem TLR4) intranasal mit gram-negativen Bakterien (*Klebsiella pneumoniae*). Die Lungen der Knockout-Mäuse erhielten deutlich mehr Bakterien und das Überleben dieser Mäuse zeigte sich signifikant verkürzt. Die Ergebnisse legen nahe, dass TLR4 zu einer schützenden Immunantwort bei durch *Klebsiella pneumoniae* ausgelösten Atemwegsinfektionen beiträgt [87]. Die entscheidende Bedeutung von TLR4 bei der Vermittlung einer wirksamen Immunantwort in Bezug auf pulmonale Infektionen durch gram-negative Erreger zeigt ferner eine Studie von Wang et al. Das pulmonale Wachstum von intranasal applizierten *Haemophilus influenzae* Bakterien war bei Mäusen ohne TLR4 erhöht und die Konzentration proinflammatorischer Zytokine (IL-1 β , IL-6 und TNF- α) in der bronchoalveolären Flüssigkeit reduziert. Intrapulmonale neutrophile Granulozyten waren bei diesen Mäusen nicht nachweisbar [88].

Auch in Bezug auf den Menschen gibt es erste Forschungsergebnisse bezüglich der Entstehung bakterieller Infektionen im Zusammenhang mit genetischen Mutationen von Toll-like-Rezeptoren. Arbour et al. ließen Probanden LPS inhalieren und konnten anhand der Reaktion der Atemwege zeigen, dass auch beim Menschen Mutationen im TLR4-Gen mit einer unterschiedlichen Reaktionsfähigkeit auf LPS assoziiert sind [89]. Bei Intensivpatienten führten Mutationen im TLR4-Gen signifikant häufiger zu Infektionen mit gram-negativen Erregern als bei Patienten ohne diese Mutationen [90]. Auch Untersuchungen an Patienten im septischen Schock geben Hinweise darauf, dass bei Patienten mit Mutation im TLR4-Gen das Risiko für einen septischen Schock durch gram-negative Bakterien erhöht sein könnte [91]. Menschen mit Mutationen im TLR2-Gen zeigten dagegen ein verringertes Ansprechen gegenüber bakteriellen Peptiden gram-positiver Bakterien wie *Treponema pallidum* und *Borrelia burgdorferi* sowie eine Disposition zur Infektion mit Staphylokokken und Tuberkulose [91–94].

Zusammenfassend zeigen diese Studien die besondere Rolle, die TLR4 und TLR2 in der Entstehung einer bakteriellen Pneumonie spielen. In unserer Studie haben wir daher untersucht, ob operativer Stress die Expression von TLR2/4 auf AM verändert und dadurch die Entstehung einer postoperativen Pneumonie begünstigt wird. Dabei kann an erste Studien angeknüpft werden, die zeigen, dass die Expression von TLR2 und TLR4 auf Monozyten durch operativen Stress beeinflusst wird [82, 95–97]. So untersuchten Krejsek et al. Patienten vor und nach einer herzchirurgischen Operation mit CPB. Direkt postoperativ zeigte sich zunächst eine Abnahme der TLR2- und TLR4-Expression auf Monozyten, welche am ersten postoperativen Tag vollständig rückläufig war [95]. Es ist somit vorstellbar, dass es durch herzchirurgische Eingriffe auch zu einer Veränderung der TLR2- und TLR4-Expression auf AM kommt.

3.7 Zytokine in der bronchoalveolären Flüssigkeit

Wie bereits unter 2.2 erläutert, haben Zytokine einen großen Einfluss auf die Koordination der zellulären Immunantwort während der systemischen Immunmodulation nach operativen Eingriffen. Die systemische Konzentration pro- und antiinflammatorischer Zytokine (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α und IL-10) verändert sich in dieser Situation stark [13, 18, 27, 28, 35, 98].

Es gibt Hinweise darauf, dass operativer Stress auch pulmonal zu ausgeprägten Veränderungen der bronchoalveolären Konzentration pro- und antiinflammatorischer Zytokine führt. So konnten Kotani et al. in ihrer Studie an 80 Patienten zeigen, dass Alveolarmakrophagen nach herzchirurgischem Eingriff mit CPB sowohl mit als auch ohne LPS-Stimulation eine bis zu 3-fach höhere Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-8 und TNF- α aufwiesen als dies vor der Operation der Fall war. Zusätzlich zeigte sich die Produktion der Zytokine durch AM im Vergleich zur systemischen Produktion durch Monozyten nach der Operation deutlich erhöht [99]. Auch Muehlstedt et al. gehen davon aus, dass es nach schwerem Trauma pulmonal zu einer ausgeprägten proinflammatorischen Reaktion kommt. Sie untersuchten Patienten nach schwerem Trauma und konnten zeigen, dass die in der bronchoalveolären Flüssigkeit gemessene Konzentration der Zytokine IL-6, IL-8 und IL-10 nach stationärer Aufnahme deutlich zunahm. IL-6 und IL-8 zeigten außerdem einen signifikant höheren Wert gegenüber den systemisch gemessenen Werten [100].

Weitere Studien lassen den Einfluss einer erhöhten bronchoalveolären Konzentration pro- und antiinflammatorischer Zytokine auf den klinischen Verlauf schwerer Erkrankungen vermuten. So war eine postoperativ erhöhte bronchoalveoläre IL-6-Konzentration in einer Studie an herzchirurgischen Patienten mit einer erhöhten Morbidität assoziiert [101]. Ferner konnte die Entstehung einer nosokomialen Pneumonie in Verbindung gebracht werden mit einer in der bronchoalveolären Flüssigkeit gemessenen erhöhten Konzentration von IL-8 und IL-10 [77].

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass operativer Stress zu einer ausgeprägten pulmonalen Immunmodulation führt und Alveolarmakrophagen als Hauptproduzenten pro- und antiinflammatorischer Zytokine hierbei eine entscheidende Rolle spielen.

3.8 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist es, Veränderungen der pulmonalen Immunabwehr anhand der Funktion der Alveolarmakrophagen vor und nach herzchirurgischer Operation mit Herz-Lungen-Maschine zu untersuchen und sie mit der Entstehung einer postoperativen Pneumonie zu korrelieren. Daraus ergeben sich im Einzelnen folgende Fragestellungen:

Primäre Fragestellung:

- Ist die Expression von HLA-DR auf Alveolarmakrophagen nach herzchirurgischen Operationen mit Herz-Lungen-Maschine vermindert?
- Verändern herzchirurgische Operationen mit Herz-Lungen-Maschine die Expression von TLR2 und TLR4 auf Alveolarmakrophagen?
- Zeigen Alveolarmakrophagen nach herzchirurgischen Operationen mit Herz-Lungen-Maschine eine adäquate Reaktion auf eine *in vitro*-Stimulation mit LPS?

Sekundäre Fragestellung:

- Stehen diese Veränderungen der HLA-DR- und TLR2/4-Expression sowie der Reaktionsfähigkeit von Alveolarmakrophagen gegenüber einer *in vitro*-LPS-Stimulation in einem Zusammenhang mit der Entwicklung einer postoperativen Pneumonie?

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Geräte

Bezeichnung	Hersteller, Firmensitz
Zentrifuge BR 3.11	Jouan, Unterhachingen, Deutschland
Kühlzentrifuge CR 4.22	Jouan, Unterhachingen, Deutschland
Zentrifuge Z 160 M	Hermle, Wehingen, Deutschland
Zentrifuge 5810/5810 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Brutschrank	Heraeus, Hanau, Deutschland
Kühlschrank, Herafreeze	Heraeus, Hanau, Deutschland
Sicherheitsbank, HERAsafe	Heraeus, Hanau, Deutschland
Vortexer, Mixer 5432	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Vakuumpumpe, Laboport	KNF Neuberger, New Jersey, USA
Pipetten, verschiedene Volumina	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Neubauer Zählkammer	LO-Laboroptik, Friedrichsdorf, DE
FACS-Calibur	Becton Dickinson, New Jersey, USA
FACS-Canto	Becton Dickinson, New Jersey, USA

4.1.2 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller, Firmensitz
EDTA Vacutainer-Röhrchen	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Heparin Vacutainer-Röhrchen	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Zellsieb, Falcon Cell Strainer	Becton Dickinson, New Jersey, USA
Röhrchen 50 ml, Falcon Conical Tubes	Becton Dickinson, New Jersey, USA
Röhrchen, Micronic Tubes	Micronic, Lelystad, Niederlande
Röhrchen, Safe-Lock Tubes, 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Röhrchen, Safe-Lock Tubes, 1,5 ml, biopur	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen, 1000 µl u. 100 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen, 1000 µl u. 100 µl, biopur	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

4.1.3 Software

Bezeichnung	Hersteller, Firmensitz
CellQuest	Becton Dickinson, New Jersey, USA
FACS-Comp	Becton Dickinson, New Jersey, USA
QuantiCALC	Becton Dickinson, New Jersey, USA
SPSS 21.0 für Windows	SPSS, Inc., Chicago, USA

4.1.4 Antikörper

Bezeichnung	Hersteller, Firmensitz
CD2 FITC	Becton Dickinson, New Jersey, USA
CD3 PE	Becton Dickinson, New Jersey, USA
CD14 APC	Becton Dickinson, New Jersey, USA
CD16 FITC	Becton Dickinson, New Jersey, USA
CD19 PE	Becton Dickinson, New Jersey, USA
CD45 PerCP	Becton Dickinson, New Jersey, USA
TLR2 FICT	Becton Dickinson, New Jersey, USA
TLR4 PE	Becton Dickinson, New Jersey, USA
IgG2a FICT	Becton Dickinson, New Jersey, USA
IgG2a PE	Becton Dickinson, New Jersey, USA
QuantiBrite Anti-HLA-DR PE	Becton Dickinson, New Jersey, USA
QuantiBrite Anti-Monocyte PerCP-Cy5.5	Becton Dickinson, New Jersey, USA
Cytometric Bead Array	Becton Dickinson, New Jersey, USA
QuantiBrite PE-Kit	Becton Dickinson, New Jersey, USA
CaliBrite Beads-Kit	Becton Dickinson, New Jersey, USA

Antikörper-Mix	Zusammensetzung
Antikörper-Mix Differenzierung Vollblut, Ansatz für 1 ml	150 µl CD2 FITC + 36 µl CD3 PE + 100 µl CD14 APC + 100 µl CD16 FITC + 100 µl CD19 PE + 150 µl CD45 PerCP und 364 µl FACS-Pufferlösung
Antikörper-Mix Differenzierung BAL-Zellsuspension, Ansatz für 25 µl	5 µl CD3 PE + 5 µl CD14 APC + 5 µl CD16 FITC + 10 µl CD45 PerCP

Antikörper-Mix	Zusammensetzung
Antikörper-Mix TLR2 BAL-Zellsuspension, Ansatz für 25 µl	5 µl CD14 APC + 10 µl CD45 PerCP + 5 µl TLR2 FITC + 5 µl IgG2a PE
Antikörper-Mix TLR4 BAL-Zellsuspension, Ansatz für 25 µl	5 µl CD14 APC + 10 µl CD45 PerCP + 5 µl TLR4 PE + 5 µl IgG2a FITC

4.1.5 Chemikalien und Biochemikalien

Bezeichnung	Hersteller, Firmensitz
FACS-Lysing-Solution	Becton Dickinson, New Jersey, USA
LPS	Sigma-Aldrich, Heidelberg, Deutschland
NaCl 0,9% (steril)	B. Braun, Melsungen, Deutschland
PBS	Apotheke Charité, Berlin, Deutschland
RPMI 1640, ohne L-Glutamine	PAA Laboratory, Pasching, Österreich
L-Alanyl-L-Glutamine	Biochrom, Berlin, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (10.000U/ml /10.000 µg/ml)	Biochrom, Berlin, Deutschland
FCS	Biochrom, Berlin, Deutschland

4.1.6 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Lösung zur Zelllyse	FACS-Lysing-Solution im Verhältnis 1:10 mit aqua destillata verdünnt
FACS-Pufferlösung Herstellung 1Liter	20 ml (2%) FCS (30 Minuten auf 56°C erhitzt und hitzeinaktiviert); 1g (0,1%) Natriumacid (NaN ₃); mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) auf 1 Liter auffüllen

RPMI-1640-Komplett-Medium Herstellung 500 ml	440 ml RPMI 1640, ohne L-Glutamine; 50 ml (10%) FCS; 5 ml (1%) Penicillin/Streptomycin; 5 ml (1%) L- Alanyl-L-Glutamine
---	--

Bezeichnung	Zusammensetzung
LPS-Stammlösung für die Ansätze mit Vollblut	LPS wird mit RPMI 1640 Komplett- Medium angesetzt und auf eine Konzentration von 500 pg/ml verdünnt.
LPS-Stammlösung für die Ansätze mit BAL- Zellsuspension	LPS-Stammlösung für Vollblut-Ansätze wird durch die Zugabe von RPMI 1640 Komplett-Medium auf eine Konzentration von 120 ng/ml verdünnt.

4.2 Studiendesign

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine prospektive klinische Pilotstudie. Sie wurde durchgeführt an der Charité-Universitätsmedizin Berlin in Zusammenarbeit mit der Klinik für Anästhesiologie mit Schwerpunkt operative Intensivmedizin, dem Institut für Medizinische Immunologie und der Klinik für kardiovaskuläre Chirurgie.

4.3 Patientenkollektiv

Nach Freigabe durch die zuständige Ethikkommission der Charité-Universitätsmedizin zu Berlin (Ethiknummer: EA1/192/05) erfolgte von Juli 2006 bis Mai 2007 der Einschluss von 33 Studienpatienten. Eine ausführliche mündliche und schriftliche Aufklärung der Patienten über den Ablauf, das Ziel und die Risiken der Studie erfolgte

am Vortag der geplanten Operation im Rahmen der regulären anästhesiologischen Prämedikationsvisite bzw. des Aufklärungsgespräches über die Durchführung der bevorstehenden Allgemeinanästhesie. Die Patienten hatten zu jedem Zeitpunkt die Möglichkeit ihre Einwilligung zu widerrufen. Aufgrund der teils geringen Zellzahl der durch die bronchoalveoläre Lavage (BAL) gewonnenen AM konnten nicht alle Messungen (HLA-DR, TLR2/4 und Zytokine TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-8, IL10) an allen Proben durchgeführt werden, so dass die Größe der Patientengruppe bei den Versuchen variiert.

4.3.1 Einschlusskriterien und Ausschlusskriterien

Für die Aufnahme der Patienten in unsere Studie mussten folgende Einschlusskriterien erfüllt sein: Vorlage der schriftlichen Einwilligung, Alter des Patienten über 18 Jahre und stationäre Aufnahme zur elektiven Koronararterien-Bypass-Operation („coronary artery bypass grafting“, CABG).

Nicht in die Studie aufgenommen werden konnten Patienten, auf welche eins oder mehrere der folgenden Ausschlusskriterien zutraf: Fehlende Vorlage einer schriftlichen Einwilligung, Alter des Patienten jünger als 18 Jahre, aktuell bestehende Schwangerschaft, vorbestehende Lungenerkrankung mit ambulantem Sauerstoffbedarf, Leberinsuffizienz (Child-Pugh-Kriterien, Stadium > B), HIV-Infektion, Therapie mit Corticosteroiden, Zustand nach Organtransplantation sowie präoperative Zeichen einer Infektion nach den Kriterien des Center of Disease Control (CDC).

4.4 Studienaufbau

4.4.1 Standards der Anästhesie und des perioperativen Monitorings

Etwa eine Stunde vor Einleitung der Narkose wurde den Patienten Midazolam als Prämedikation verabreicht. Alle Studienpatienten erhielten für die Operation entsprechend der Standards der Klinik für Anästhesie und operative Intensivmedizin der Charité Campus Mitte das gleiche anästhesiologische Verfahren bzw. die gleichen anästhesiologischen Medikamente [102]. Die Einleitung der Narkose erfolgte zunächst mit Etomidat, Fentanyl und Cis-Atracurium. Im weiteren Verlauf wurde die Allgemeinanästhesie durch die kontinuierliche Gabe von Sevofluran und Fentanyl fortgeführt. Vor Anschluss der HLM wurden Midazolam und Cis-Atracurium wiederholt verabreicht.

Die maschinelle Beatmung erfolgte im druckkontrollierten Beatmungsmodus. Es wurde eine Normoventilation mit einem endexpiratorisch gemessenen CO₂-Partialdruck von 35-40 mmHg als Zielwert angestrebt. Zusätzlich erfolgte eine regelmäßige Kontrolle der arteriellen Blutgase. Das erweiterte perioperative Monitoring der Patienten bestand aus folgenden invasiven und nicht-invasiven Geräten bzw. Methoden: Arteria radialis-Katheter, Arteria femoralis-Katheter, zentraler Venenkatheter, Pulmonalarterienkatheter, naso- oder orogastrale Sonde, transurethraler Blasenkateter, 5-Kanal-EKG, Pulsoxymetrie.

4.4.2 Extrakorporale Zirkulation mit HLM

Eine ausreichende Antikoagulation der Patienten zur extrakorporalen Zirkulation (EKZ) wurde durch die Gabe von Heparin erreicht und über die Messung der Activated Clotting Time kontrolliert. Zur Entwöhnung der EKZ wurden Dopamin und Nitro eingesetzt. Das standardisierte Priming der HLM bestand aus: 500 ml kristalloider

Lösung, 500 ml 10%iger Hydroxyethylstärke-Lösung, Aprotinin (50.000 kIU/kg), Heparin (8000 I.E.), 20 ml 20%iger Mannitol-Lösung und Methylprednisolon (1 g). Die Perfusion und Oxygenierung des Organismus erfolgten nach Anschluss an die HLM durch non-pulsatilen Blutfluss mittels einer Zentrifugalpumpe und durch die Verwendung eines Kapillarmembranoxygenators. Als Richtwert wurde ein mittlerer arterieller Blutdruck (MAD) von 60 mmHg angestrebt. Bei einem MAD unter 60 mmHg erfolgte bolusweise die Gabe von Noradrenalin. Die Körpertemperatur, gemessen über den Blasenkatheter, wurde während der Zeit der EKZ zwischen 35,5 und 36°C gehalten. Intermittierend wurde zur myokardialen Protektion warme Blutkardioplegie in die nach distal abgeklemmte Aorta ascendens infundiert [103, 104].

4.4.3 Postoperative Überwachung auf der Intensivstation

Postoperativ erfolgte eine standardisierte intensivmedizinische Überwachung der Patienten für mindestens 24 Stunden. Nach Beendigung der Operation und Verlegung auf die Intensivstation wurde die Sedierung mit Propofol aufrechterhalten und die maschinelle Beatmung fortgeführt, bis sich die Vitalparameter stabilisierten und evtl. Blutungskomplikationen behandelt wurden. Die medikamentöse Unterstützung des Herz-Kreislauf-Systems erfolgte mit Dopamin und Nitro. Zur Thromboseprohylaxe erhielten die Patienten Acetylsalicylsäure und Heparin. Nach einer postoperativen Beobachtungszeit wurde die Sedierung ausgestellt und die Patienten frühestmöglich extubiert. Sobald die Patienten nach Extubation in einem klinisch stabilen Zustand waren, erfolgte am kommenden Tag die Verlegung auf die Überwachungsstation. Alle Patienten erhielten vor und nach dem chirurgischen Eingriff eine antibiotische Prophylaxe mit Cefuroxim.

Während des Aufenthaltes auf der Intensivstation wurden die Patienten regelmäßig in Hinblick auf die Entwicklung einer postoperativen Pneumonie untersucht. Hierfür wurden klinische und laborklinische Infektionsparameter erhoben sowie Röntgenbilder

des Thorax angefertigt. Ob bei einem Patienten eine postoperative Pneumonie vorlag, wurde mit Hilfe der Kriterien des CDC ermittelt. Die Voraussetzungen für die Bestätigung einer klinischen Pneumonie sind im Folgenden aufgeführt.

Klinisch definierte Pneumonie: Mindestens eines der folgenden Zeichen lässt sich wiederholt bei Röntgenuntersuchungen des Thorax nachweisen:

- Neues oder progressives und persistierendes Infiltrat
- Verdichtung
- Kavernenbildung

und mindestens eines der folgenden Zeichen:

- Leukozytose ($\geq 12.000 /\text{mm}^3$) oder Leukopenie ($< 4000 /\text{mm}^3$)
- Fieber $> 38 \text{ }^\circ\text{C}$ ohne andere Ursache
- Verwirrtheit ohne andere Ursache bei Pat. ≥ 70 Jahre

und mindestens zwei der folgenden Zeichen:

- Neues Auftreten von eitrigem Sputum/Trachealsekret oder Veränderung des Sputums/Trachealsekrets (Farbe, Konsistenz, Geruch) oder vermehrte respiratorische Sekretion oder vermehrtes Absaugen.
- Neuer oder zunehmender Husten oder Dyspnoe oder Tachypnoe.
- Rasselgeräusche oder bronchiales Atemgeräusch.
- Verschlechterung des Gasaustausches (z.B. erhöhter Sauerstoffbedarf, neue Beatmungsnotwendigkeit).

4.4.4 Entnahme der Blutproben

Die Gewinnung der Blutproben erfolgte über den arteriellen Zugang in der linken Arteria radialis. Die Abnahme wurde zu zwei verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt. Die

erste Blutentnahme erfolgte unmittelbar nach Narkoseeinleitung und vor der ersten BAL. Es wurde jeweils ein Ethylendiamintetraessigsäure-Röhrchen (EDTA-Röhrchen) und ein Heparin-Röhrchen abgenommen. Die zweite Entnahme erfolgte zwei Stunden nach Beendigung des CPB.

4.4.5 Durchführung der BAL

Die Durchführung der BAL zur Gewinnung der AM wurde zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten vorgenommen. Die präoperative BAL erfolgte kurz nach Einleitung der Narkose. Die Patienten waren zu diesem Zeitpunkt bereits sediert, muskelrelaxiert und intubiert. Die postoperative BAL erfolgte zwei Stunden nach Beendigung des CPB. Während der BAL wurden die Patienten mit einer inspiratorischen Sauerstofffraktion (FiO_2) von 1.0 beatmet. Zur Sicherheit der Patienten wurde vor und nach jeder BAL eine arterielle Blutgasanalyse (BGA) durchgeführt. Während der ersten BAL wurde der Mittellappen des rechten Lungenflügels aufgesucht und mit einer Menge von ca. 100 ml einer isotonen Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) lavagiert. Während der zweiten BAL erfolgte die Spülung der Lingula des linken Lungenflügels mit erneut 100 ml NaCl 0,9%. Die Patienten waren zu diesem Zeitpunkt weiterhin sediert, muskelrelaxiert und intubiert.

4.4.6 Separation der Zellen aus der BAL-Flüssigkeit

Sofort nach Gewinnung der BAL-Flüssigkeit erfolgte die Weiterverarbeitung der Probe unter einer mikrobiologischen Sicherheitsbank im Labor. Die zum Teil mit zähem Sputum vermengte Flüssigkeit wurde zunächst über eine sterile Gaze grob gefiltert. Zur Entfernung von Zelldebris aus der Probe erfolgte im nächsten Schritt eine feinere Filtration über ein Zellsieb mit einer Porengröße von 100 μm . Die hierdurch gewonnene

Flüssigkeit wurde für 7 Minuten bei 60 g zentrifugiert, wobei auf die Bremse verzichtet wurde. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und das sich am Rand bzw. am Boden befindliche Zellpellet in RPMI-Komplett-Medium aufgenommen bzw. resuspendiert. Die Auszählung der Zellen erfolgte mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer. Anschließend wurde durch die weitere Zugabe von RPMI-Komplett-Medium eine Konzentration der Lösung von 5×10^6 Zellen pro ml erstellt.

4.5 Immunologische Diagnostik

4.5.1 Durchflusszytometrische Messung

Das Durchflusszytometer („Fluorescence-Activated-Cell-Sorter“, FACS) ermöglicht die Unterscheidung von Zellen in Hinblick auf ihre Größe, Oberflächenbeschaffenheit und intrazellulären Eigenschaften. Das Prinzip des Durchflusszytometers beruht auf der Ausstrahlung monochromatischen Lichts durch einen Laser. Das Auftreffen der Laserstrahlen auf eine Zelle erzeugt gestreute und reflektierte Strahlung und eine Autofluoreszenz, welche für die jeweilige Zelle spezifisch sind. Diese Strahlung wird gemessen und lässt Aussagen über die Eigenschaften der einzelnen Zelle zu. Das nach vorne abgelenkte Vorwärtsstreulicht „Forwardscatter“ (FSC) stellt ein Maß für die Zellgröße dar. Über das in einem 90°-Winkel abgestrahlte Seitwärtsstreulicht „Sidescatter“ (SSC) lässt sich die Zellgranularität bestimmen [105].

Die durchflusszytometrische Messung der Zellen setzt eine Markierung der Zellen mit Antikörpern voraus. Bei der extrazellulären direkten Markierung der Zellen werden Oberflächenrezeptoren mit spezifischen Antikörpern markiert. Diese Antikörper sind mit Fluorochromen verschiedener Absorptions- und Emissionsspektren gekoppelt. Durch die Bestrahlung mit monochromatischem Licht kommt es zu einer Anregung der Fluorochrome, die als Folge Licht einer bestimmten Wellenlänge emittieren. Das Emissionsspektrum der verwendeten Fluorochrome reicht von ca. 500-700 nm. Die

Intensität des gemessenen Emissionslichtes ist proportional zur Zahl der gebundenen Antikörper und lässt somit Rückschlüsse auf die Dichte der Expression der verschiedenen Oberflächenrezeptoren zu.

Überlappungen im Emissionsspektrum der Fluorochrome führen zu Fluoreszenzüberstrahlungen und somit zu Ungenauigkeiten in der Messung. Daher ist es wichtig, dass die spektrale Überstrahlung vor Beginn einer Messung durch Kompensation korrigiert wird, so dass eine Zellpopulation gleichzeitig auf mehrere Parameter untersucht werden kann. Dadurch ist eine Differenzierung von Zellpopulationen anhand ihrer Oberflächenantigene möglich. So konnten AM und Monozyten differenziert und die HLA-DR- und TLR2/4-Expression bestimmt werden.

Die in unserer Studie zur Messung der HLA-DR- und TLR2/4-Expression und zur Quantifizierung der Zytokine verwendeten Fluorochrome waren: Fluorescein-Isothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Peridinin Chlorophyll Protein (PerCP) und Allophycocyanin (APC).

4.5.2 Differenzierung mononuklearer Zellen

Zur flowzytometrischen Differenzierung und Zählung der mononuklearen Zellen war eine direkte Mehrfach-Markierung von Antigenen an der Zelloberfläche notwendig. Als Vorbereitung auf die flowzytometrische Messung erfolgte daher zunächst die Färbung der Zellen mit verschiedenen spezifischen Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern. Die verwendeten Antikörper zur Differenzierung der Zellen der Vollblutprobe waren: CD2-FITC, CD3-PE, CD14-APC, CD16-FITC, CD19-PE und CD45-PerCP. Antikörper zur Differenzierung der BAL-Zellsuspension waren: CD3-PE, CD14-APC, CD16-FITC und CD45-PerCP. Es wurden jeweils 50 µl EDTA-Vollblut bzw. 50 µl BAL-Zellsuspension mit 20 µl bzw. 25 µl der jeweiligen spezifischen Antikörperlösung gemischt und bei 4°C in Dunkelheit für 30 Minuten inkubiert. Zur Entfernung der Erythrozyten wurden die Vollblutproben mit 500 µl einer verdünnten FACS-Lysing-Solution versetzt und bei

Raumtemperatur 15 Minuten erneut inkubiert und danach bei 200 g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf ein Restvolumen von 100 µl mit einer Vakuumpumpe abgesaugt und die Probe erneut gut gemischt. Um überschüssige Antikörper zu entfernen, wurden alle Proben mit jeweils 1 ml FACS-Pufferlösung gewaschen, bei 200 g für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand erneut bis auf 100 µl abgesaugt. Die Lagerung der Proben aus BAL-Zellsuspension erfolgte bis zu Beginn der Messung auf Eis und die der Vollblutproben bei 4°C. Gemessen wurden die Proben mit einem FACS-Calibur Durchflusszytometer und der dazugehörigen Software CELLQuest.

4.5.3 Quantitative Bestimmung der HLA-DR-Expression

Für die Bestimmung der HLA-DR-Rezeptoren pro Monozyt bzw. AM wurde BD QuantiBrite Anti-HLA-DR/Anti-Monocyte verwendet. Diese Fertiglösung enthält Anti-HLA-DR-PE-Antikörper, die spezifisch an HLA-DR binden und so die Gruppe der antigenpräsentierenden Zellen markieren. Zusätzlich enthält die Lösung Anti-Monocyte PerCP-Cy-5.5-Antikörper, welche spezifisch an CD14 binden und den Hauptteil der Monozytenpopulation erkennen. Aufgrund der zusätzlichen Erkennung von CD64 durch den an die Anti-Monozyten-Antikörper gekoppelten Farbstoff Cyanin können sowohl CD14 hell positive als auch CD14 schwach positive Monozyten sicher erkannt werden [106]. Für die Bestimmung der HLA-DR-Expression auf Monozyten wurde 50 µl EDTA-Vollblut mit 20 µl QuantiBrite Anti-HLA-DR/Anti-Monocyte versetzt und bei Raumtemperatur für 30 Minuten in Dunkelheit inkubiert. Ebenso wurden 50 µl BAL-Zellsuspension mit 2,5 µl QuantiBrite Anti-HLA-DR/Anti-Monocyte inkubiert. Die Lyse der Erythrozyten erfolgte wie bereits weiter oben beschrieben, wobei die Vollblutproben in dieser Methode bei 4°C inkubiert wurden. Ebenso wurden alle Proben mit 1 ml FACS-Pufferlösung gewaschen, nach dem bereits beschriebenen Verfahren zur Analyse vorbereitet und bis zu Beginn der Messung auf Eis bzw. bei 4°C gelagert.

Zur Vorbereitung auf die Messung erfolgte die aktuelle Kalibrierung und Einstellung des FACS-Calibur-Durchflusszytometers mit dem CaliBRITE-Beads-Kit und der Software FACSComp [107]. Zusätzlich erfolgte vor der Messung von HLA-DR eine Phycoerythrin-Fluoreszenz-Quantifizierung mit dem QuantiBrite-PE-Kit, um eine durchflusszytometrische Bestimmung von PE-gekoppelten Antikörpern pro Zelle „Antibodies bound per cell“ (ABC) zu ermöglichen [106].

Die auf Raumtemperatur aufgetauten Proben wurden am FACS-Calibur-Durchflusszytometer mit dem Programm CellQuest gemessen und mit dem Programm QuantiCALC ausgewertet. Die Ergebnisse wurden als durchschnittliche Anzahl gebundener Antikörper pro Zelle angegeben.

4.5.4 Quantitative Bestimmung der TLR2/4-Expression auf AM

Zur Analyse der TLR2-Expression wurde eine Antikörpermischung aus CD45-PerCP, CD14-APC, TLR2-FITC und IgG2a-PE verwendet. Für die Messung der TLR4-Expression bestand die Antikörpermischung aus CD45-PerCP, CD14-APC, TLR4-PE und IgG2a-FITC. 25 µl des jeweiligen Antikörpergemischs wurden mit 50 µl BAL-Zellsuspension versetzt und bei 4°C inkubiert. Der weitere Versuchsablauf entspricht der unter 4.4.2 und 4.4.3 bereits beschriebenen Methode. Die markierten Zellen wurden bis zum Beginn der Messung auf Eis gelagert. Die Messung erfolgte ebenfalls mit dem FACS-Calibur-Durchflusszytometer und der Software CELLQuest.

4.6 LPS-Stimulation der Monozyten und AM

Grundlage dieser Methode ist die Bestimmung der Zellaktivität durch die *in vitro*-Stimulation von Zellen mit LPS, einem bakteriellen Endotoxin, und der damit

verbundenen zellulären Produktion pro- und antiinflammatorischer Zytokinen. Wie auch in den vorangegangenen Versuchen fanden alle Arbeitsschritte unter einer mikrobiologischen Sicherheitsbank statt. Um eine vorzeitige Stimulation der Zelle zu vermeiden, kamen ausschließlich Endotoxin-freie Pipettenspitzen und Gefäße zum Einsatz.

Zunächst wurden 50 µl Heparin-Vollblut mit 500 µl einer LPS-haltigen Lösung mit der Konzentration von 0,5 pg LPS / ml angesetzt. Die Stimulation der AM erfolgte mit 100 µl BAL-Zellsuspensionen und 400 µl einer stärker verdünnten LPS-Lösung (120 ng LPS / ml). Die Versuchsansätze mit Vollblut und BAL-Zellsuspension wurden jeweils für 4 und 24 Stunden in einem Brutschrank bei einer Temperatur von 37°C inkubiert. Danach wurden die Proben bei 300 g für 5 Minuten zentrifugiert und der so entstandene Überstand anschließend aliquotiert und bei -80° Grad gelagert. Die Analyse der Proben erfolgte zu einem späteren Zeitpunkt am FACS-Canto-Durchflusszytometer.

4.6.1 Quantitative Bestimmung der Zytokine

Die Zytokine wurden mit Hilfe des BD Cytometric Bead Array, einem Partikel-Immunoassay (PIA) bzw. Multiplex-Immunoassay, markiert und mit dem FACS-Canto-Durchflusszytometer gemessen. Das Prinzip des PIA entspricht einem quantitativen Sandwich-Immunoassay. Die sogenannten „beats“, die im PIA verwendet werden, dienen als feste Phase, an die antigenspezifische Antikörper gekoppelt sind. Ein zweiter, nicht gebundener antigenspezifischer Antikörper (Detektionsantikörper) ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff gebunden. Voraussetzung für die Durchführung ist die Bindung der antigenspezifischen Antikörper an unterschiedliche Epitope des zu bestimmenden Zytokins. Aufgrund ihrer homogenen Größe und Struktur lassen sich die „beats“ im FSC-SSC-Plot als Population erkennen. Über die Stärke des gemessenen Fluoreszenzsignals, das sich in seiner Intensität proportional zur Menge der

gebundenen Fluorochrom-gekoppelten Antikörper darstellt, lässt sich die Konzentration des zu bestimmenden Zytokins (TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-8 und IL10) berechnen.

Erweitert wird der PIA mit dem so genannten Multiplex-Immunoassay, wie er auch in unserer Studie Anwendung fand. Mit diesem Verfahren lassen sich verschiedene Antigene, in unserem Fall verschiedene Zytokine, gleichzeitig messen. Dazu werden Populationen von „beats“ verwendet, die sich in bestimmten Eigenschaften voneinander unterscheiden. Diese Eigenschaften müssen mit dem Durchflusszytometer erfasst werden können. Zu diesen zählen neben der Größe vor allem die spezifische Eigenfluoreszenz der jeweiligen „beat-Population“ [105]. Die Quantifizierung der Ergebnisse erfolgte in pg/ Million Zellen. Als untere Nachweisgrenze für das jeweilige Zytokin wurde festgelegt: 7,2 pg/ ml für IL-1 β , 2,5 pg/ ml für IL-6, 3,6 pg/ ml für IL-8, 2,8 pg/ ml für IL-10 und 2,8 pg/ ml für TNF- α . Messergebnisse, die unterhalb der jeweiligen Nachweisgrenze lagen, wurden für die statistische Auswertung als Null gewertet.

4.7 Statistische Verfahren

Aufgrund der begrenzten Fallzahl und der asymmetrisch verteilten Beobachtungen werden in der vorliegenden Studie nichtparametrische statistische Methoden verwendet. Die Ergebnisse werden als Median und IQR für kontinuierliche Variablen angegeben und als prozentuale Häufigkeit für kategoriale Daten. Dabei wurde ein Konfidenzniveau von 95% gewählt. Die Berechnung der Daten für paarweise Vergleiche erfolgte mit dem nichtparametrischen Wilcoxon-Test und für unabhängige Patientengruppen mit dem nichtparametrischen Mann-Whitney-U-Test. Um die relativen Veränderungen (%) zwischen den Gruppen zu berechnen, wurden die Medianwerte verwendet und ein p-Wert < 0,05 als statistisch signifikant gewertet. Aufgrund der geringen Anzahl der Patienten in Gruppe 2 konnte keine statistische Auswertung durchgeführt werden. Stattdessen erfolgte eine deskriptive Auswertung der Absolutwerte als Median. Die statistische Auswertung wurde durchgeführt mit dem

Software Package for Social Sciences, SPSS for Windows 21.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

5 Ergebnisse

5.1 Patientenkollektiv

Insgesamt wurden Blutproben und BAL-Flüssigkeit von 33 Patienten gewonnen. Retrospektiv erfolgte die Einteilung des Patientenkollektivs in zwei Studiengruppen: Gruppe 1 (n=30): Patienten ohne postoperative Pneumonie; Gruppe 2 (n=3): Patienten mit Pneumonie im postoperativen Verlauf.

Tabelle 1

Patientencharakteristika

	Gruppe 1 (n = 30)		Gruppe 2 (n = 3)		p
	Median	IQR / Prozent	Median	IQR / Prozent	
Alter, Jahre	67	59, 72	79	78, 84	0,006*
Geschlecht, m / w	22 / 8	73% / 27%	2 / 1	66% / 33%	0,88
Größe, cm	171	164, 179	166	159, 170	0,26
Gewicht, kg	84	71, 94	68	62, 81	0,1
BMI, kg/m ²	27,5	25,5, 29,7	26,9	22,5, 28,03	0,45
Raucher	3	10%	0	0%	0,49
LVEF, %	55	50, 60	55	50, 66	0,75
Arterieller Hypertonus	28	93%	3	100%	0,88
COPD	2	7%	0	0%	0,88
Renale Insuffizienz	2	7%	1	33%	0,49
Diabetes mellitus	6	20%	1	33%	0,75

Die Zahlen sind als Median und IQR oder als absoluter Zahlenwert und Prozentzahl dargestellt.

* = statistisch signifikant (p-Wert < 0,05). Es wurde der Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben angewandt. Retrospektiv wurden die Patienten in zwei Gruppen geteilt. Gruppe 1 ohne postoperative Pneumonie und Gruppe 2 mit postoperativer Pneumonie. M / w, männlich/weiblich; BMI, Body-Mass-Index, Formel zur Berechnung: Körpergewicht in Kilogramm geteilt durch Körpergröße in Metern zum Quadrat; LVEF, Linksventrikuläre Ejektionsfraktion; COPD, Chronisch obstruktive Lungenerkrankung.

In Gruppe 2 waren alle Patienten Nichtraucher und bei keinem dieser Patienten lag eine chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) vor. Jedoch war bei allen Patienten der Gruppe 2 ein arterieller Hypertonus als Vorerkrankung bekannt. Ein Patient der Gruppe 2 litt zusätzlich an einer renalen Insuffizienz und an einem Diabetes mellitus.

Ein arterieller Hypertonus bestand bei 31 der insgesamt 33 Patienten und war damit die häufigste bereits bestehende Vorerkrankung neben COPD (2 Patienten), renaler Insuffizienz (3 Patienten) und Diabetes mellitus (7 Patienten). Die Verteilung der Vorerkrankungen war zwischen den beiden Gruppen nicht statistisch signifikant. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den beiden Studiengruppen bestanden für die Parameter: Alter, Dauer der Operation, Dauer des HLM-Einsatzes, Dauer der Beatmung, intraoperative Gabe von Blutprodukten, Dauer des ITS-Aufenthaltes und Mortalität. Die Patienten aus Gruppe 2 waren im Vergleich signifikant älter und die Dauer der Operation, des HLM-Einsatzes und der Beatmung signifikant länger, ebenso der ITS-Aufenthalt. Ferner war die Mortalität höher. Des Weiteren erhielten alle Patienten der Gruppe 2 intraoperativ Bluttransfusionen (100 Prozent), in Gruppe 1 hingegen nur 7 Patienten (23 Prozent).

Sieben Patienten des gesamten Patientenkollektivs entwickelten im Verlauf eine postoperative Infektion: vier Fälle von Wundinfektion und drei Fälle von postoperativer Pneumonie. Die Inzidenz der postoperativen Pneumonie lag bei den 33

Tabelle 2

Intraoperative Werte					
	Gruppe 1 (n = 30)		Gruppe 2 (n = 3)		p
	Median	IQR / Prozent	Median	IQR / Prozent	
Dauer der Anästhesie, Minuten	270	234, 318	360	330, 360	0,019*
Dauer der Operation, Minuten	213	173, 244	275	275, 320	0,025*
Dauer des HLM-Einsatzes, Minuten	73	54, 99	125	101, 142	0,030*
Aortaklemmzeit, Minuten	41	32, 61	58	40, 97	0,235
Dauer der Beatmung, Stunden	13	11, 15	24	22, 25	0,015*
Intraoperative Bluttransfusion	7	23%	3	100%	0,025*

Die Zahlen sind als Median und IQR oder als absoluter Zahlenwert und Prozentzahl dargestellt. * = statistisch signifikant (p-Wert < 0,05). Es wurde der Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben angewandt. N/j, nein/ja; HLM, Herz-Lungen-Maschine.

Studienpatienten somit bei 9%. Zwei der Patienten mit postoperativer Pneumonie entwickelten im Verlauf eine schwere Sepsis mit septischem Schock und verstarben auf der ITS. Der Beginn der postoperativen Pneumonie lag im Median am fünften postoperativen Tag (Werte siehe Tabelle 1-3).

Tabelle 3

Postoperative Werte					
	Gruppe 1 (n = 30)		Gruppe 2 (n = 3)		p
	Median	IQR / Prozent	Median	IQR / Prozent	
Postoperative Wundinfektion	4	13%	0	0%	0,75
Beginn Pneumonie, postoperativer Tag	n/a	n/a	5	4, 5	n/a
Sepsis	0	0%	2	67%	0,06
ITS-Aufenthalt, Tage	1	1, 1	32	12, 47	0,00*

Die Zahlen sind als Median und IQR oder als absoluter Zahlenwert und Prozentzahl dargestellt. * = statistisch signifikant (p-Wert < 0,05). Es wurde der Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Variablen angewandt. ITS, Intensivstation; n/a, nicht anwendbar.

5.2 Zellzahlen nach Differenzialfärbung der Blutproben

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Auswertung der Blutproben von 33 Patienten dargestellt. Die Zahl der Leukozyten lag präoperativ bei allen Patienten im Normbereich: 7,3 / μ l (6,2 / μ l – 8,8 / μ l). Kurz nach der Operation stiegen die Leukozyten erwartungsgemäß statistisch signifikant an: 10,3 / μ l (9,2 / μ l – 13,8 / μ l) (p-Wert = 0,001*). Dieser Trend setzte sich auch am ersten postoperativen Tag weiter fort (bezogen auf die präoperativen Zellzahlen): 12,8 / μ l (11,5 / μ l - 14,2 / μ l) (p-Wert = 0,001*). Im Detail betrachtet zeigten auch die prozentualen Anteile der Monozyten, Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten signifikante Veränderungen. Der Anteil der Monozyten und Lymphozyten zeigte sich postoperativ bei allen Patienten signifikant vermindert. Dagegen war der Anteil neutrophiler Granulozyten signifikant erhöht. Die Monozyten waren in Gruppe 2 ebenfalls stark abgefallen, die Anteile der Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten zeigten nach der Operation im Vergleich zu den Ausgangswerten dagegen kaum Veränderungen (p-Wert = nicht anwendbar (n/a)) (Werte siehe Tabelle 4).

Tabelle 4
Zelldifferenzierung der Blutproben, Teilmengen in %

Zeitpunkt	präoperativ		postoperativ		p
	Median	IQR	Median	IQR	
Monozyten (n = 33)	8,0	6,7, 9,9	4,0	2,6, 5,7	0,001*
Gruppe 1 (n = 30)	7,9	6,7, 10,2	4,4	2,8, 6,0	0,001*
Gruppe 2 (n = 3)	9,3	7,1, 9,6	2,3	2,2, 4,0	n/a
Lymphozyten (n = 33)	21,4	17,1, 30,3	7,4	5,8, 11,9	0,001*
Gruppe 1 (n = 30)	21,6	17,5, 29,7	7,5	5,7, 11,7	0,001*
Gruppe 2 (n = 3)	6,4	5,8, 34,4	6,9	6,2, 10,2	n/a
Neutrophile Granulozyten (n = 33)	66,7	57,7, 74,3	87,4	81,4, 91,2	0,001*
Gruppe 1 (n = 30)	66,6	57,8, 74,0	87,2	80,4, 91,3	0,001*
Gruppe 2 (n = 3)	82,4	56,6, 83,5	88,9	87,4, 91,3	n/a

Die Blutproben der gesamten Patientengruppe (n = 33) zeigten postoperativ eine signifikante Abnahme der Monozyten und Lymphozyten, dagegen waren die neutrophilen Granulozyten signifikant angestiegen. Die Zahlen sind als Median und IQR dargestellt. * = statistisch signifikant (p-Wert < 0,05). Es wurde der Wilcoxon-Test für verbundene Variablen angewandt, um signifikante Unterschiede zu berechnen. N/a, nicht anwendbar.

Die Differenzierung der durch BAL gewonnenen Zellen zeigte vor und nach der Operation für die gesamte Patientengruppe (n = 33) einen ähnlichen prozentualen Anteil für Monozyten, Lymphozyten und neutrophile Granulozyten. Postoperativ waren jedoch signifikant weniger Alveolarmakrophagen nachweisbar (p-Wert = 0,018*).

In Gruppe 1 war postoperativ ein deutlicher Trend bezüglich der Abnahme des prozentualen Anteils der AM festzustellen (p-Wert = 0,06). Auch in der Gruppe der Patienten mit postoperativer Pneumonie (Gruppe 2) zeigte sich eine starke Reduktion der AM und eine deutliche Zunahme der neutrophilen Granulozyten (p-Wert = n/a; Werte siehe Tabelle 5).

Tabelle 5

Zelldifferenzierung der BAL-Proben, Teilmengen in %

Zeitpunkt	präoperativ		postoperativ		p
	Median	IQR	Median	IQR	
Alveolarmakrophagen (n = 33)	63,5	38,8, 76,5	52,2	21,5, 69,6	0,018*
Gruppe 1 (n = 30)	63,2	35,2, 73,0	53,4	22,0, 70,2	0,06
Gruppe 2 (n = 3)	77,1	56,7, 85,7	27,9	7,5, 57,4	n/a
Monozyten (n = 33)	3,4	2,3, 4,6	3,1	1,8, 4,7	0,83
Gruppe 1 (n = 30)	3,3	2,3, 4,2	3,2	2,0, 4,7	0,758
Gruppe 2 (n = 3)	4,3	2,4, 11,9	1,8	1,7, 7,5	n/a
Lymphozyten (n = 33)	11,4	7,4, 14,5	9,2	4,6, 17,1	0,99
Gruppe 1 (n = 30)	11,5	7,7, 15,7	9,9	5,7, 19,2	0,673
Gruppe 2 (n = 3)	13,1	4,7, 14,2	4,3	3,4, 11,4	n/a
Neutrophile Granulozyten (n = 33)	10,6	3,1, 28,8	15,1	2,1, 46,7	0,088
Gruppe 1 (n = 30)	11,3	3,1, 35,5	14,3	1,8, 41,0	0,254
Gruppe 2 (n = 3)	4,8	3,1, 11,7	45,2	15,1, 82,7	n/a

Der Prozentsatz der Alveolarmakrophagen war für die gesamte Patientengruppe (n=33) postoperativ signifikant verringert. Die Zahlen sind als Median und IQR dargestellt. * = statistisch signifikant (p-Wert < 0,05). Es wurde der Wilcoxon-Test für verbundene Variablen angewandt, um signifikante Unterschiede zu berechnen. N/a, nicht anwendbar.

5.3 Expression von HLA-DR auf Monozyten und AM

Die Expression von HLA-DR auf Monozyten zeigte sich nach der Operation in der gesamten Gruppe (n = 31) statistisch signifikant vermindert (p-Wert = 0,001*). Bei Patienten ohne postoperative Pneumonie (Gruppe 1) (n = 28) sank die Expression von mHLA-DR (monozytäres HLA-DR) ebenfalls signifikant (p-Wert = 0,001*), und auch bei Patienten mit postoperativer Pneumonie (Gruppe 2) (n = 3) waren die Absolutwerte der mHLA-DR-Expression postoperativ deutlich vermindert (p-Wert = n/a). Im Vergleich der beiden Gruppen war kein statistisch signifikanter Unterschied der präoperativen mHLA-DR-Expression (p-Wert = 0,97) oder der postoperativen mHLA-DR-Expression (p-Wert = 0,12) nachweisbar (Werte siehe Tabelle 6).

Tabelle 6

HLA-DR-Expression (Antikörper / Monozyt) auf Monozyten

Zeitpunkt	präoperativ		postoperativ		p
	Median	IQR	Median	IQR	
Gesamt (n = 31)	26.587	20.410, 31.478	13.996	11.724, 17.706	0,001*
Gruppe 1 (n = 28)	26.266	20.646, 31.415	15.258	12.365, 18.580	0,001*
Gruppe 2 (n = 3)	27.882	12.325, 34.088	10.292	10.288, 13.389	n/a

Die HLA-DR-Expression auf Monozyten zeigte sich postoperativ für die gesamte Patientengruppe (n = 31) signifikant reduziert. Die Zahlen sind als Median und IQR dargestellt. * = statistisch signifikant (p-Wert < 0,05). Es wurde der Wilcoxon-Test für verbundene Variablen angewandt, um signifikante Unterschiede zu berechnen. N/a, nicht anwendbar; HLA-DR, Human-Leukozyten-Antigen-DR.

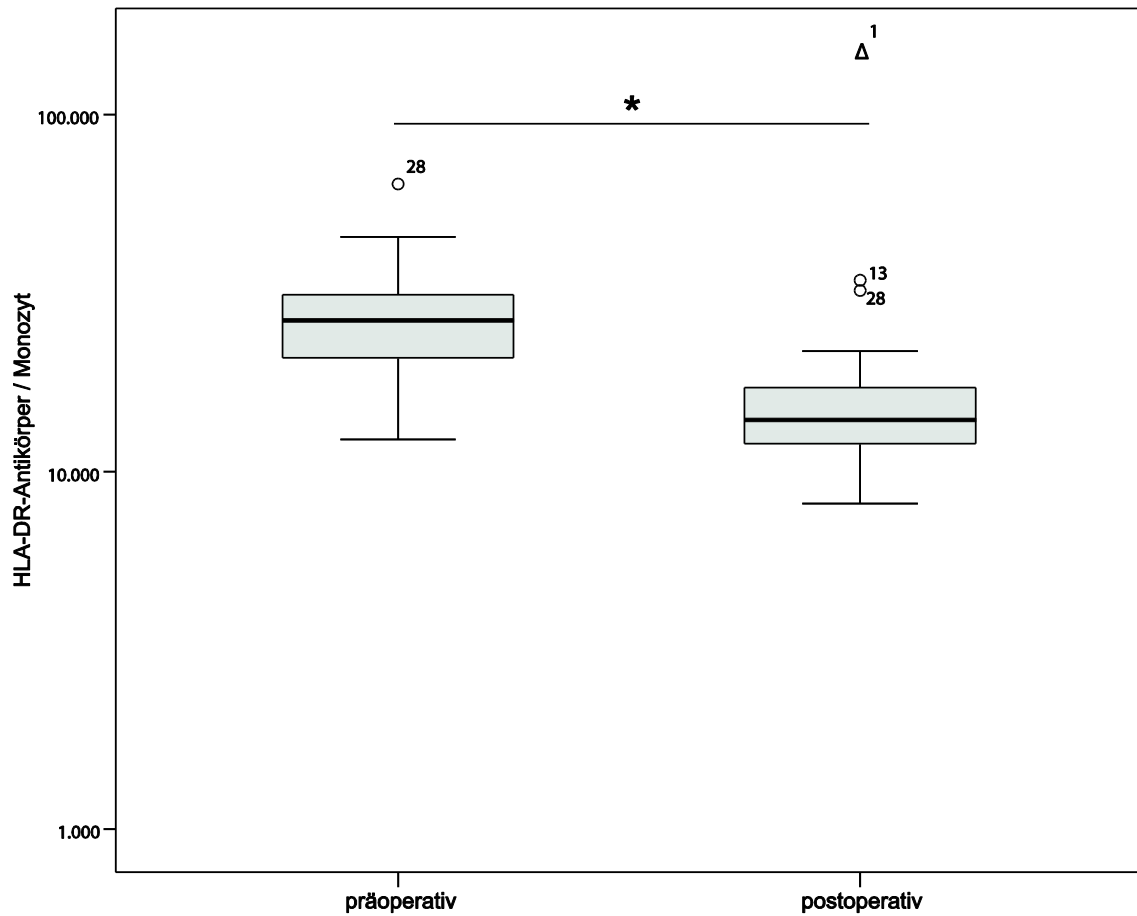


Abbildung 1: Expression von HLA-DR auf Monozyten, gesamte Patientengruppe

Dargestellt sind die Zahlen für das gesamte Patientenkollektiv (n = 31). Die Werte der HLA-DR-Expression auf Monozyten zeigen nach der Operation im Vergleich zu den Ausgangswerten eine signifikante Abnahme (p-Wert = 0,001*). Ausreißer werden durch kleine Kreise, extreme Werte durch ein Dreieck dargestellt. Die Boxplot-Diagramme repräsentieren jeweils Median und IQR. Es wurde der Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben angewandt; *p-Wert < 0,05.

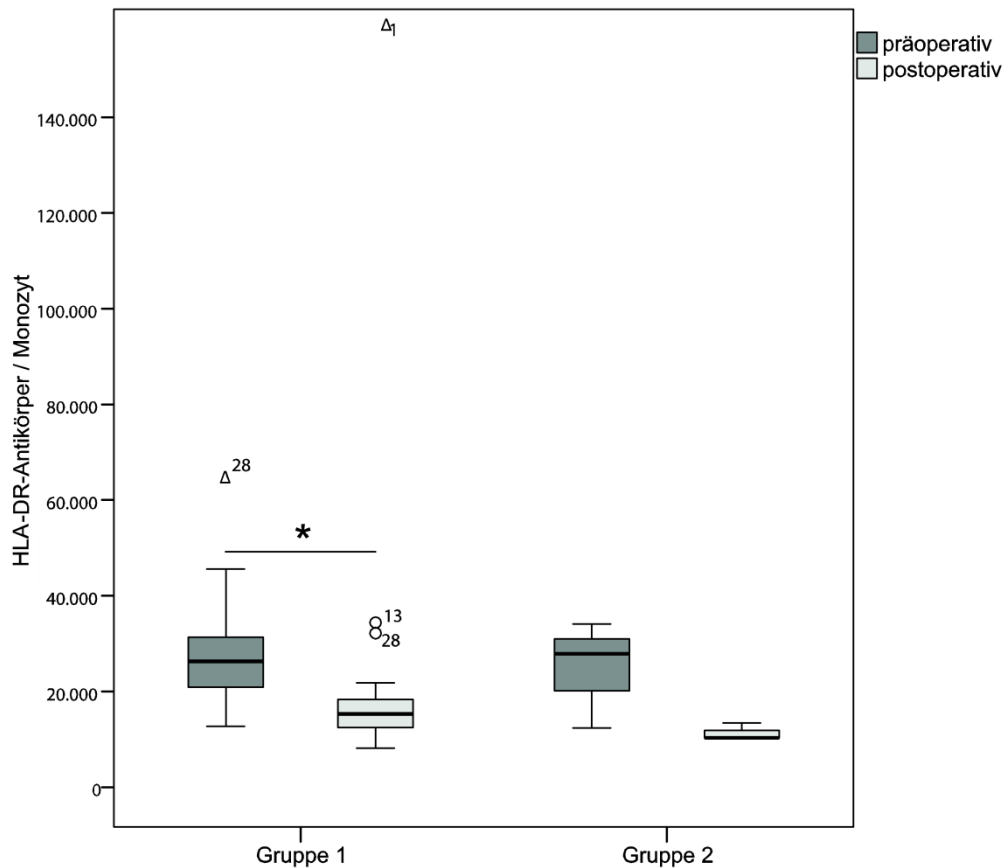


Abbildung 2: Expression von HLA-DR auf Monozyten, Gruppe 1 und Gruppe 2

In Gruppe 1 sank die Expression von monozytärem HLA-DR signifikant (p -Wert = 0,001*). Im Vergleich beider Gruppen zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied der prä- und postoperativen Werte. Die Boxplot-Diagramme repräsentieren Median und IQR. Ausreißer werden durch kleine Kreise, extreme Werte durch ein Dreieck dargestellt. Es wurde der Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben angewandt und der Mann-Whitney-U-Test für unverbundene Stichproben; * p -Wert < 0,05.

In Bezug auf alle Patienten (n = 31) war die Expression von HLA-DR auf AM postoperativ ebenfalls signifikant verringert (p-Wert = 0,001*). Sowohl Gruppe 1 als auch Gruppe 2 zeigten eine starke Abnahme der HLA-DR-Expression auf AM. In Gruppe 1 waren die postoperativen Werte für HLA-DR auf AM statistisch signifikant verringert (p-Wert = 0,002*) und auch in Gruppe 2 zeigte sich eine starke Reduktion der postoperativen HLA-DR-Expression (p-Wert = n/a). Trotz der kleinen Patientenzahl in Gruppe 2 ließ sich ein Trend deutlich erkennen. Im Vergleich der beiden Gruppen zeigte sich die Expression von HLA-DR auf AM in Gruppe 2 präoperativ verringert (p-Wert = 0,20) und auch die postoperativ gemessenen Werte für HLA-DR waren in Gruppe 2 statistisch signifikant niedriger (p-Wert = 0,024*; Werte siehe Tabelle 7).

Tabelle 7

HLA-DR-Expression (Antikörper / AM) auf Alveolarmakrophagen					
Zeitpunkt	präoperativ		postoperativ		p
	Median	IQR	Median	IQR	
Gesamt (n = 31)	985.234	698.683, 1.293.531	712.564	320.726, 941.120	0,001*
Gruppe 1 (n = 28)	1.009.337	739.280, 1.294.545	736.306	430.604, 943.491	0,002*
Gruppe 2 (n = 3)	652.262	505.628, 985.234	106.139	42.434, 417.111	n/a

Die HLA-DR-Expression auf Alveolarmakrophagen zeigte sich postoperativ signifikant reduziert. In Gruppe 2 waren die postoperativen Werte stark vermindert. Die Zahlen sind als Median und IQR dargestellt. * = statistisch signifikant (p-Wert < 0,05). Es wurde der Wilcoxon-Test für verbundene Variablen angewandt, um signifikante Unterschiede zu berechnen. N/a, nicht verfügbar; HLA-DR, Human-Leukozyten-Antigen-DR; AM, Alveolarmakrophagen.

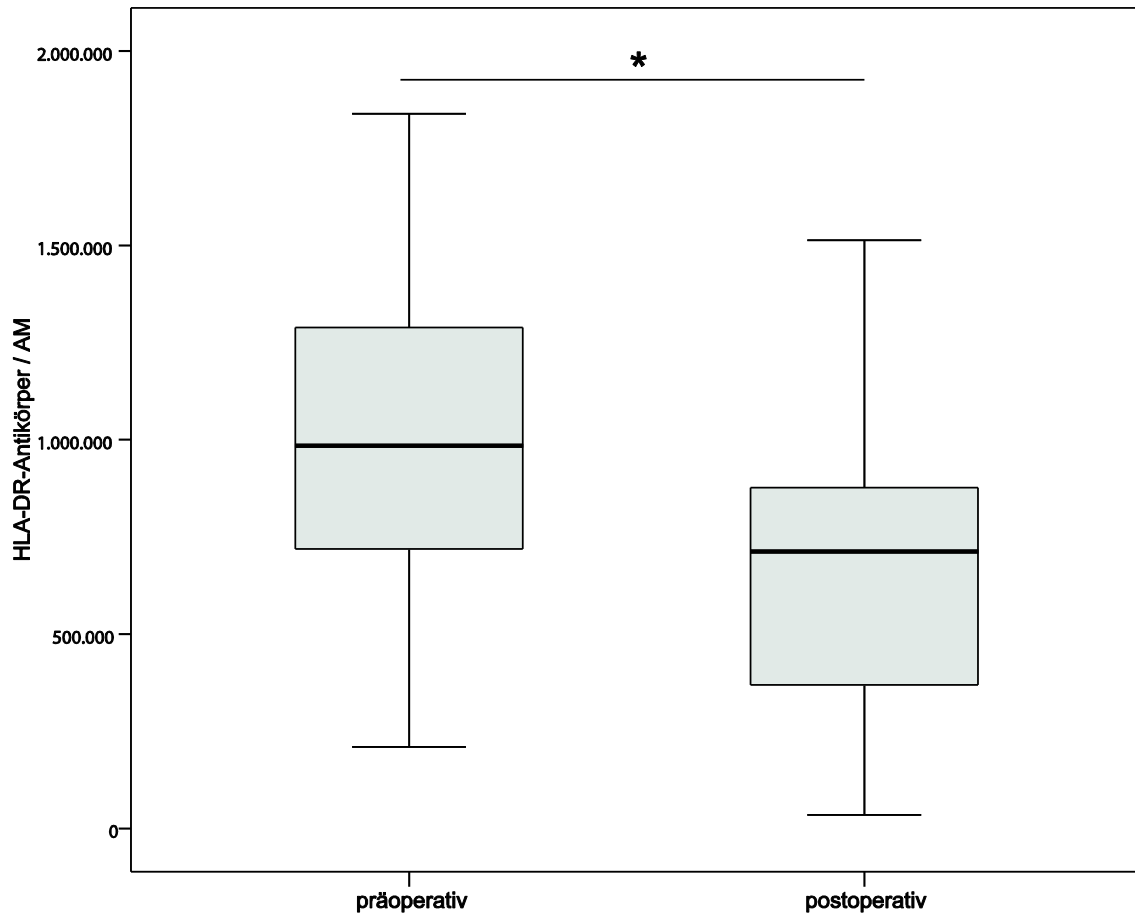


Abbildung 3: Expression von HLA-DR auf Alveolarmakrophagen, gesamte Patientengruppe

Dargestellt sind die Zahlen der HLA-DR-Antikörper pro AM der prä- und postoperativen Werte für die gesamte Patientengruppe (n = 31). Die Abnahme ist statistisch signifikant (p-Wert = 0,001*). Die Boxplot-Diagramme repräsentieren jeweils Median und IQR. Es wurde der Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben angewandt; *p-Wert < 0,05.

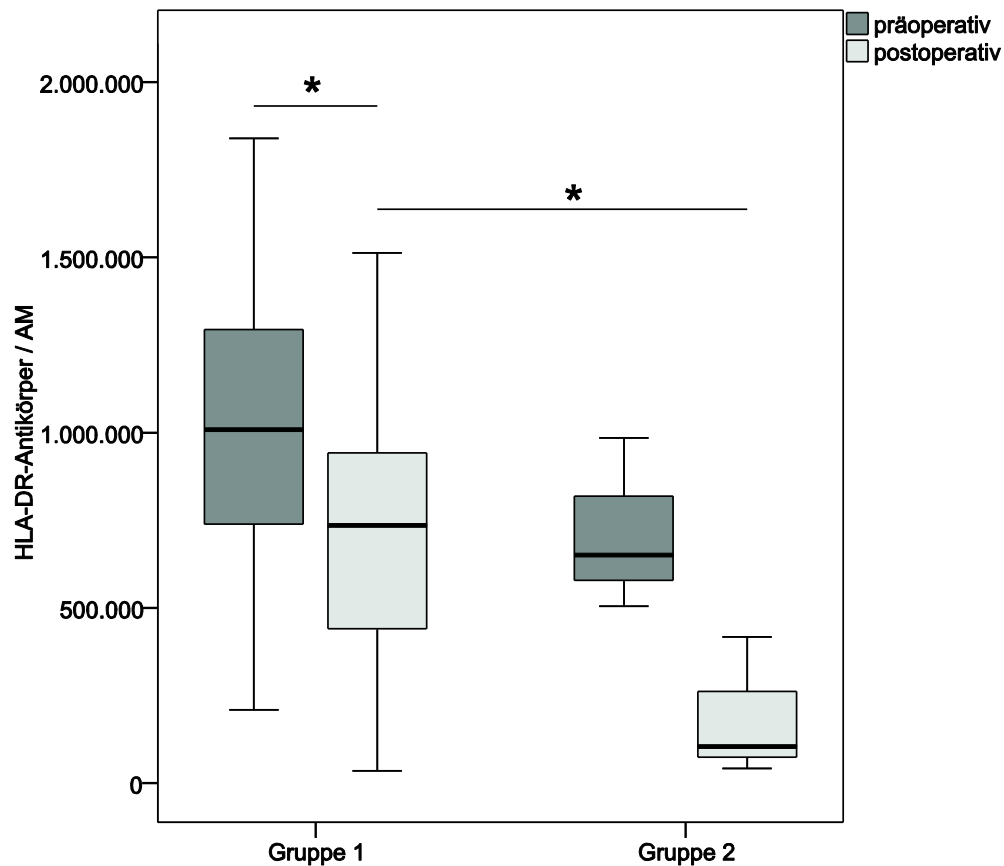


Abbildung 4: Expression von HLA-DR auf Alveolarmakrophagen, Gruppe 1 und Gruppe 2

Die postoperativ gemessenen Werte für die Expression von HLA-DR zeigten sich in Gruppe 1 signifikant verringert (p -Wert=0,002*). Im Vergleich der beiden Gruppen waren die postoperativen Werte in Gruppe 2 statistisch signifikant niedriger (p -Wert = 0,024*). Die Boxplot-Diagramme repräsentieren Median und IQR. Es wurde der Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben angewandt und der Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben; * p -Wert < 0,05

5.4 Expression von TLR2/4 auf AM

Die Messung der TLR2-Expression auf AM zeigte für die gesamte Patientengruppe (n = 32) keinen signifikanten Unterschied im Vergleich der Werte vor und nach der Operation (p-Wert = 0,31). Auch im Einzelnen betrachtet ergaben sich keine signifikanten Veränderungen der prä- und postoperativen Werte in Gruppe 1 (p-Wert = 0,32) und Gruppe 2 (p-Wert = n/a) (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8
TLR2- Expression (Antikörper / AM)
auf Alveolarmakrophagen

Zeitpunkte	präoperativ		postoperativ		p
	Median	IQR	Median	IQR	
Gesamt (n = 32)	55,2	46,0, 81,9	52,1	41,2, 72,0	0,31
Gruppe 1 (n = 29)	59,3	51,0, 84,5	52,2	41,4, 76,1	0,32
Gruppe 2 (n = 3)	42,9	34,6, 43,0	30,0	22,1, 58,1	n/a

Die Werte der TLR2-Expression zeigten von prä- zu postoperativ keinen signifikanten Unterschied. Die Zahlen sind als Median und IQR dargestellt. * = statistisch signifikant (p-Wert < 0,05). Es wurde der Wilcoxon-Test für verbundene Variablen angewandt, um signifikante Unterschiede zu berechnen. N/a, nicht verfügbar; TLR, Toll-like-Rezeptor; AM, Alveolarmakrophagen.

Das Ergebnis der prä- und postoperativen Messung von TLR4 zeigte ebenfalls keine statistisch relevante Differenz im Vergleich der prä- und postoperativen Werte in Bezug auf die gesamte Patientenpopulation ($n = 32$) (p -Wert = 0,77). In Gruppe 2 waren die TLR4-Werte nach der Operation deutlich verringert (p -Wert = n/a). In Gruppe 1 hingegen blieben die Werte vor und nach der Operation unverändert ohne statistische Relevanz (p -Wert = 0,15) (Werte siehe Tabelle 9).

Tabelle 9**TLR4-Expression (Antikörper / AM) auf Alveolarmakrophagen**

Zeitpunkte	präoperativ		postoperativ		p
	Median	IQR	Median	IQR	
Gesamt ($n = 32$)	63,6	48,4, 94,1	57,0	41,7, 87,4	0,77
Gruppe 1 ($n = 29$)	64,6	48,9, 97,9	58,2	43,7, 89,8	0,15
Gruppe 2 ($n = 3$)	62,7	36,4, 75,2	33,8	33,8, 36,1	n/a

In Gruppe 2 zeigten sich die postoperativen Werte für die Expression von TLR4 im Trend stark reduziert. Die Zahlen sind als Median und IQR dargestellt. * = statistisch signifikant (p -Wert < 0,05). Es wurde der Wilcoxon-Test für verbundene Variablen angewandt, um signifikante Unterschiede zu berechnen. N/a, nicht verfügbar; TLR, Toll-like-Rezeptor; AM, Alveolarmakrophagen.

Im Vergleich der beiden Gruppen zeigte sich ein bereits vor der Operation bestehender statistisch signifikant niedrigerer Ausgangswert der TLR2-Expression in Gruppe 2 (p -Wert = 0,027*). Für die Expression von TLR4 konnten wir diese bereits präoperativ bestehende signifikante Differenz der Ausgangswerte jedoch nicht nachweisen. Postoperativ zeigte sich die Expression von TLR4 in Gruppe 2 jedoch signifikant reduziert (p -Wert = 0,041*) und auch die Werte für die postoperative Expression von TLR2 zeigten einen abnehmenden Trend (p -Wert = 0,21).

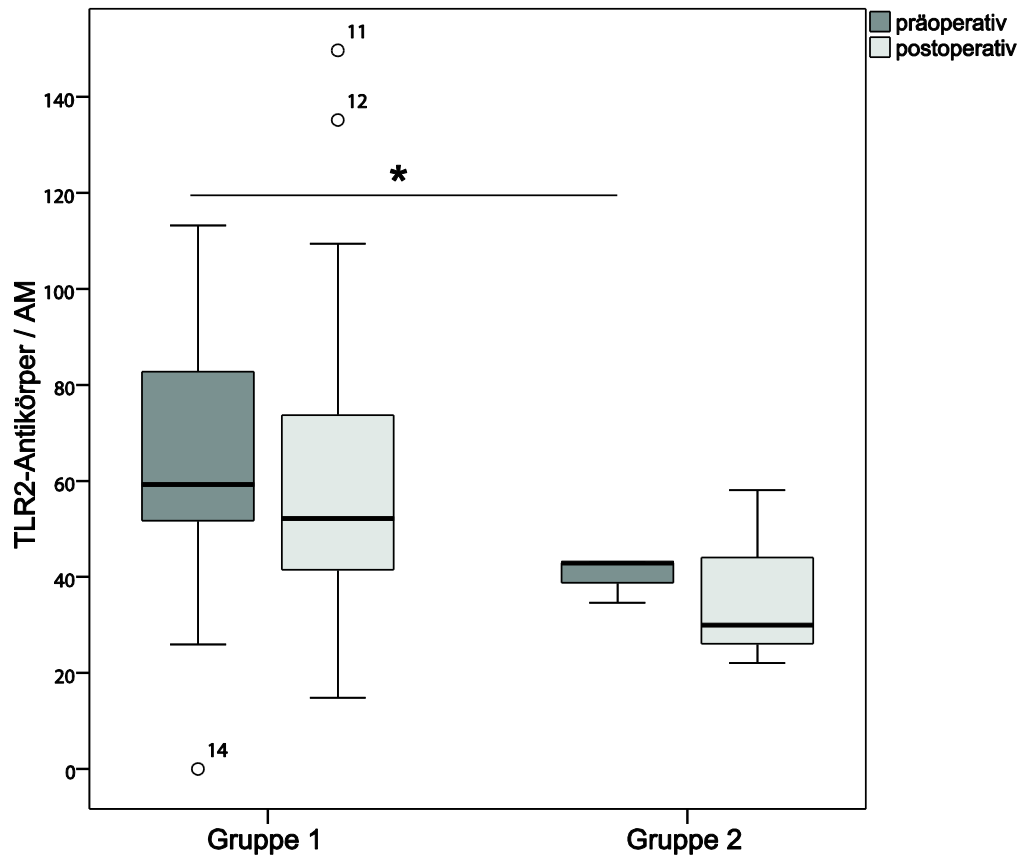


Abbildung 5: Expression von Toll-like-Rezeptor 2 auf Alveolarmakrophagen

Im Vergleich der beiden Gruppen war die Expression von TLR2 auf AM in Gruppe 2 bereits präoperativ signifikant verringert (p -Wert = 0,027*). Die Boxplot-Diagramme repräsentieren Median und IQR. Ausreißer werden durch kleine Kreise dargestellt. Es wurde der Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben angewandt und der Mann-Whitney-U-Test für unverbundene Stichproben; * p -Wert < 0,05.

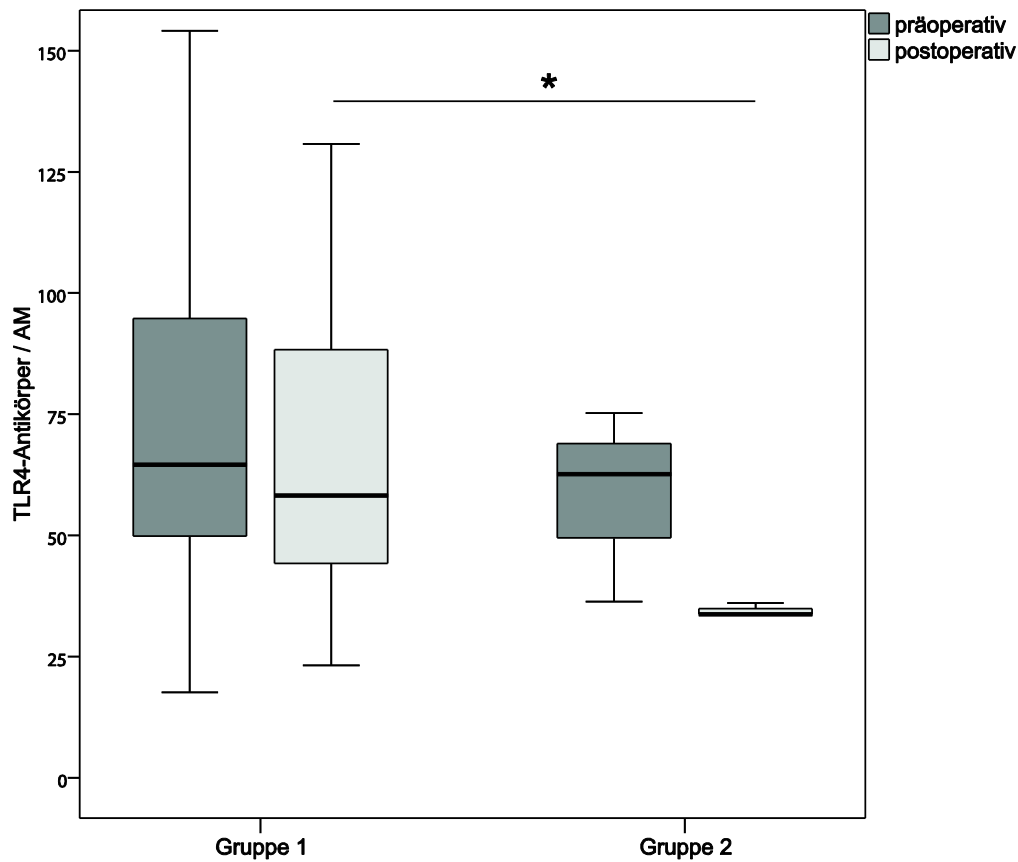


Abbildung 6: Expression von Toll-like-Rezeptor 4 auf Alveolarmakrophagen

Die präoperativen Werte der TLR4-Expression zeigten keinen Unterschied im Vergleich der beiden Gruppen zueinander (p -Wert = 0,45). Hingegen zeigte sich die postoperative TLR4-Expression in Gruppe 2 statistisch signifikant vermindert (p -Wert = 0,041*). Die Boxplot-Diagramme repräsentieren Median und IQR. Es wurde der Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben angewandt und der Mann-Whitney-U-Test für unverbundene Stichproben; * p -Wert < 0,05.

5.5 Zytokin-Produktion von Monozyten und AM nach LPS-Stimulation

Monozyten und AM wurden einmal für 4 Stunden und einmal für 24 Stunden mit LPS stimuliert. Aufgrund der unterschiedlichen biologischen Aktivität der Zellen sind die Konzentrationen der Zytokine zu den Spitzenzeiten der jeweiligen Zytokin-Produktion gemessen worden. Für TNF- α sind daher die Ergebnisse nach 4 Stunden Inkubationszeit angegeben, für IL-6, IL1 β , IL-8 und IL-10 hingegen nach 24 Stunden. Die Ergebnisse sind in der Einheit [pg / Mio. Zellen] angegeben.

Postoperativ zeigten die Monozyten eine abnehmende Empfindlichkeit gegenüber LPS. Nach der Operation waren die Werte der gesamten Patientengruppe (n = 26) für alle Zytokine vermindert, wobei die Werte für TNF- α , IL-6, IL-1 β und IL-8 statistisch signifikant reduziert waren. In der Gruppe der Patienten mit postoperativer Pneumonie (n = 3) zeigte sich postoperativ ebenfalls eine Abnahme der Zytokinsekretion von TNF- α , IL-6, IL-1 β und IL-8, aber nur die Sekretion von IL-1 β war im Vergleich zur Gruppe 1 signifikant reduziert (p-Wert = 0,032*). Die Konzentration von IL-10 war in Gruppe 2 hingegen postoperativ angestiegen (p-Wert = n/a) (Werte siehe Tabelle 10).

Tabelle 10

Zytokine nach LPS-Stimulation von Monozyten (pg / Mio. Zellen)

Zeitpunkte	präoperativ		postoperativ		p
	Median	IQR	Median	IQR	
TNF-α (n = 26)	1144,7	656,5, 1577,1	186,9	123,1, 322,9	0,000*
Gruppe 1 (n = 23)	1188,6	706,2, 1566,5	195,8	127,3, 291,5	0,000*
Gruppe 2 (n = 3)	413,6	13,1, 1681,3	112,9	64,4, 417	n/a
IL-6 (n = 26)	7808,6	4303,2, 9981,9	655,2	223,2, 2027,2	0,001*
Gruppe 1 (n = 23)	7856,5	5660,5, 9949,8	751,5	331,0, 3008,6	0,003*
Gruppe 2 (n = 3)	5532,1	1549,2, 12514,7	177,2	7,9, 402,9	n/a
IL-1β (n = 26)	1107,3	505,9, 1570,1	43,6	17,2, 213,4	0,000*
Gruppe 1 (n = 23)	1124,3	559,8, 1511,7	49,2	25,2, 396,7	0,000*
Gruppe 2 (n = 3)	1210,8	111,6, 3280,3	13,3	7, 17,1	n/a
IL-8 (n = 26)	7860,2	6348,5, 13702,3	1638,3	795,5, 7533,6	0,002*
Gruppe 1 (n = 23)	8060,0	6376,9, 10990,4	1692,0	810,0, 8002,7	0,007*
Gruppe 2 (n = 3)	21820,1	6263,1, 51537,0	883,8	752,1, 1066,4	n/a
IL-10 (n = 26)	54,6	25,7, 102,2	29,4	21,5, 70,9	0,058
Gruppe 1 (n = 23)	57,1	39,1, 120,0	28,5	22,4, 57,9	0,014*
Gruppe 2 (n = 3)	23,8	0,0, 85,7	106,1	0,0, 132,5	n/a

Für TNF- α sind die Ergebnisse nach 4 Stunden Inkubationszeit angegeben, für IL-6, IL1 β , IL-8 und IL-10 nach 24 Stunden. Die Zahlen sind als Median und IQR dargestellt. * = statistisch signifikant (p-Wert < 0,05). Es wurde der Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben angewandt, um signifikante Unterschiede zu berechnen. N/a, nicht anwendbar; LPS, Lipopolysaccharid.

Bei den gemessenen Zytokinen (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 und IL-10) zeigte sich nach *in vitro*-LPS-Stimulation der AM in Bezug auf die gesamte Patientengruppe (n=27) kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den prä- und postoperativ gemessenen Konzentrationen. Auch das Ergebnis der Messung der Zytokin-Konzentrationen (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 und IL-10) für die Patienten ohne Pneumonie (n=24) blieb ohne statistische Relevanz. Im Vergleich der prä- und postoperativen Ergebnisse von Gruppe 1 und Gruppe 2 zeigte sich für keines der gemessenen Zytokine (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 und IL-10) ein statistisch relevanter Unterschied (Werte siehe Tabelle 11).

Tabelle 11

Zytokine nach LPS Stimulation von Alveolarmakrophagen (pg / Mio. Zellen)

Zeitpunkte	präoperativ		postoperativ		p
	Median	IQR	Median	IQR	
TNF-α (n = 27)	146,1	29,0, 507,6	257,4	116,3, 887,2	0,130
Gruppe 1 (n =24)	209,0	29,1, 571,2	230,0	118,0, 876,4	0,241
Gruppe 2 (n = 3)	32,0	10,8, 90,4	366,4	17,8, 923,9	n/a
IL-6 (n = 27)	232,4	2,8, 4073,5	521,4	143,1, 3015,7	0,737
Gruppe 1 (n = 24)	310,6	0,7, 4858,8	391	101,0, 3689,8	1,00
Gruppe 2 (n = 3)	27,7	20,0, 256,6	917,0	143,1, 3015,7	n/a
IL-1β (n = 27)	7,2	0,7, 125,5	17,7	6,0, 67,3	0,810
Gruppe 1 (n = 24)	8,7	0,2, 125,6	17,6	5,7, 81,9	0,841
Gruppe 2 (n = 3)	1,5	0,7, 6,8	17,7	12,2, 50,7	n/a
IL-8 (n = 27)	3146,9	32,7, 12147,5	4476,0	1650,4, 15190,8	0,212
Gruppe 1 (n = 24)	3212,1	8,2, 15207,9	3949,1	1288,3, 13894,2	0,440
Gruppe 2 (n = 3)	903	112,0, 3883,9	22077,8	2555,7, 39118,7	n/a
IL-10 (n = 27)	3,2	0,0, 28,6	5,9	2,5, 30,4	0,668
Gruppe 1 (n = 24)	4,2	0,0, 31,0	5,7	2,6, 29,5	0,986
Gruppe 2 (n = 3)	0,3	0,0, 1,1	9,2	0,0, 111,1	n/a

Für TNF- α sind die Ergebnisse nach 4 Stunden Inkubationszeit angegeben, für IL-6, IL-1 β , IL-8 und IL-10 nach 24 Stunden. Die Zahlen sind als Median und IQR dargestellt. * = statistisch signifikant (p-Wert < 0,05). Es wurde der Wilcoxon-Test für verbundene Variablen angewandt, um signifikante Unterschiede zu berechnen. N/a, nicht anwendbar; LPS, Lipopolysaccharid; AM, Alveolarmakrophagen.

6 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass herzchirurgische Operationen mit HLM zu einer frühzeitigen Veränderung der organspezifischen pulmonalen Immunabwehr führen. Dies zeigte sich in der postoperativen, statistisch signifikanten Abnahme der Expression von HLA-DR auf Alveolarmakrophagen. Auch die Expression von HLA-DR auf Monozyten war postoperativ signifikant vermindert, was im Einklang mit der in der Literatur bereits gut beschriebenen systemischen Immunmodulation nach großen operativen Eingriffen steht [14, 15, 17]. Zusätzlich geben die vorliegenden Ergebnisse einen Hinweis darauf, dass die frühzeitigen Veränderungen der pulmonalen Immunabwehr die Entstehung einer postoperativen Pneumonie begünstigen können.

6.1 HLA-DR-Expression auf AM und Monozyten

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass es bei großen operativen Eingriffen neben der Abnahme der monozytären HLA-DR-Expression auch zu einer organspezifischen pulmonalen Abnahme von HLA-DR auf Alveolarmakrophagen kommt und diese mit der Entstehung einer postoperativen Pneumonie assoziiert ist. Unsere Ergebnisse werden durch weitere Studien unterstützt. So stellten Muehlstedt et al. eine Studie vor, in der sie die Veränderungen der systemischen und der pulmonalen Immunantwort bei Patienten nach Multitrauma untersuchten. BAL-Flüssigkeit wurde 12, 36 und 60 Stunden nach stationärer Aufnahme gewonnen. Es konnte gezeigt werden, dass bereits 12 Stunden nach Trauma sowohl die monozytäre HLA-DR-Expression als auch die Expression von HLA-DR auf AM statistisch signifikant gegenüber der Kontrollgruppe abgenommen hatte. Zusätzlich untersuchten die Autoren einen möglichen Zusammenhang mit der Entwicklung einer nosokomialen Pneumonie. 6 der

16 Patienten (38%) entwickelten eine nosokomiale Pneumonie, wobei die Diagnose im Durchschnitt etwa zwischen dem vierten und fünften Tag nach Trauma gestellt wurde. Die Expression von HLA-DR auf AM zeigte sich in der Gruppe der Patienten mit nosokomialer Pneumonie auch nach 60 Stunden weiterhin signifikant vermindert. Bemerkenswert ist, dass in der Gruppe der Patienten ohne nosokomiale Pneumonie die HLA-DR-Expression auf AM 60 Stunden nach Trauma vollständig wiederhergestellt war und keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe mehr aufwies. Die HLA-DR-Expression auf Monozyten zeigte sich dagegen 60 Stunden nach Trauma bei allen Patienten wieder komplett regeneriert [77].

Wie die Studie von Muehlstedt et al. so geben auch unsere Ergebnisse einen Hinweis darauf, dass eine verminderte HLA-DR-Expression auf AM ein Risikofaktor für die Entwicklung einer postoperativen Pneumonie darstellen könnte. Wir konnten in unserer Studie ebenfalls zeigen, dass bereits zwei Stunden nach Beendigung des CPB ein signifikanter Unterschied der HLA-DR-Expression auf AM zwischen der Gruppe der Patienten mit postoperativer Pneumonie und der Gruppe ohne postoperative Pneumonie bestand. Leider war es uns nicht möglich, unsere Untersuchungen zu einem späteren Zeitpunkt erneut durchzuführen, da wir aus ethischen Gründen die maschinelle Beatmung nicht länger als nötig durchführen konnten. Es ist vorstellbar, dass die Suppression der HLA-DR-Expression auf AM bei den Patienten, die im Verlauf an einer postoperativen Pneumonie erkrankten, ebenfalls für mehrere Tage anhielt. Dafür spricht auch der klinische Beginn der postoperativen Pneumonie nach drei bis fünf Tagen.

Auch Bühling et al. kommen in ihrer Studie zu dem Ergebnis, dass eine verminderte HLA-DR-Expression auf AM mit der Entstehung einer Pneumonie in Verbindung steht [76]. Sie untersuchten unter anderem die HLA-DR-Expression auf AM von 42 Patienten mit klinischem oder radiologischem Hinweis auf eine Pneumonie und verglichen sie mit der HLA-DR-Expression einer pulmonal gesunden Kontrollgruppe. BAL-Flüssigkeit wurde 12 Stunden nach den ersten Anzeichen einer Pneumonie gewonnen. Die Expression von HLA-DR war in der Gruppe der an Pneumonie erkrankten Patienten signifikant gegenüber der Kontrollgruppe verringert. Die Ergebnisse deuten darauf hin,

dass Alveolarmakrophagen während einer Pneumonie in ihrer Funktion stark eingeschränkt sind.

Einen anderen Ansatz verfolgen Nakos et al. [108]. Sie stellen die These auf, dass ein besseres Verständnis der pulmonalen pathophysiologischen Vorgänge nicht nur einen Ansatz hinsichtlich der Prävention bieten könnte, sondern auch hinsichtlich der medikamentösen Therapie der nosokomialen Pneumonie. So beschäftigen sich die Autoren in ihrer Studie mit der Frage, ob sich durch die Gabe von INF- γ die Expression von HLA-DR auf AM bei Patienten nach schwerem Trauma beeinflussen lässt. Von 52 Trauma-Patienten wurde BAL-Flüssigkeit am zweiten oder dritten Tag nach Aufnahme auf die Intensivstation gewonnen. Eine signifikante Anzahl der Patienten (40%) zeigte eine pulmonale Immunparalyse, was einer Abnahme der HLA-DR-Expression unter 30% pro AM entsprach. Diese Patienten wurden in zwei Gruppen unterteilt. Es konnte gezeigt werden, dass es unter der Behandlung mit INF- γ zu einem signifikanten Wiederanstieg der HLA-DR-Expression kam. In der Placebo-Gruppe blieb dieser Wiederanstieg aus. 26% der Patienten mit pulmonaler Immunparalyse entwickelten eine nosokomiale Pneumonie, wobei in der Gruppe, welche mit IFN- γ behandelt wurde, signifikant weniger Fälle auftraten. Eine niedrige Expression von HLA-DR pro AM konnte auch hier als ein möglicher Risikofaktor für eine nosokomiale Pneumonie identifiziert werden [108].

In Bezug auf die Monozyten zeigte sich die HLA-DR-Expression in unserer Studie postoperativ signifikant vermindert. Dies steht im Einklang mit der in der Literatur bereits gut beschriebenen systemischen Immunmodulation nach großen operativen Eingriffen [14, 15, 17]. Zusätzlich gibt es Hinweise darauf, dass ein Zusammenhang zwischen der Abnahme der monozytären HLA-DR-Expression und der Entstehung von Infektionen besteht [64, 65, 109]. So konnte zum Beispiel die Arbeitsgruppe von Strohmeyer et al. in ihrer Studie an herzchirurgischen Patienten mit CPB nachweisen, dass die postoperative Abnahme der monozytären HLA-DR-Expression neben dem Serumlevel von IL-10 der beste Parameter war, um Patienten mit einem Risiko für eine postoperative Infektion von denen ohne Risiko zu unterscheiden. Ein erhöhtes Risiko für eine postoperative Infektion konnte bereits am ersten postoperativen Tag

diagnostiziert werden. Um Risikopatienten frühestmöglich zu erkennen, schlagen die Autoren daher vor, die Messung der monozytären HLA-DR-Expression als standardisiertes Immunmonitoring am ersten postoperativen Tag einzuführen [28]. Dies scheint umso wichtiger, da das Ausmaß einer entstehenden Immunsuppression anhand von klinischen Parametern schwer zu beurteilen ist und eine Depression des Immunsystems insbesondere bei älteren Menschen klinisch unauffällig und unspezifisch ablaufen kann [61, 110]. In unserer Studie konnten wir zwei Stunden nach Ende des CPB ebenfalls eine signifikante Abnahme der monozytären HLA-DR-Expression nachweisen. Eine Assoziation dieses Ergebnisses mit der Entwicklung einer postoperativen Pneumonie konnten wir zu diesem frühen Zeitpunkt der Messung allerdings nicht zeigen. Dies kann auf die kleine Fallzahl der vorliegenden Studie zurückgeführt werden.

6.2 TLR2/4 auf AM

Zusätzlich untersuchten wir in unserer Studie die postoperativen Auswirkungen auf die Expression von TLR2 und TLR4 auf AM und stellten die Ergebnisse in Bezug zur Entwicklung einer postoperativen Pneumonie. In unserer Arbeit zeigte die Expression von TLR2 und TLR4 für die gesamte Patientengruppe postoperativ keine statistisch signifikante Abnahme. Unserem Wissen nach gibt es bislang keine Studien zu der Fragestellung, wie sich operativer Stress auf die Expression von TLR2 und TLR4 auf AM auswirkt. Wie operative Ereignisse die Expression von TLR2 und TLR4 auf Monozyten verändern, wurde hingegen bereits in mehreren Studien untersucht.

So konnte in einer Studie an 89 Patienten, die sich einer CABG-Operation unterziehen mussten, gezeigt werden, dass die Expression von TLR2 und TLR4 auf Monozyten bereits nach Beendigung des CPB signifikant vermindert war. Am ersten postoperativen Tag waren die Werte sowohl für die TLR2- als auch für die TLR4-Expression wieder auf das Ausgangsniveau der präoperativ gemessenen Werte angestiegen. Im Verlauf

stiegen die Werte weiter an, mit einem Maximum am dritten postoperativen Tag [95]. Die Studie von Dybdahl et al. unterstützt dieses Ergebnis. Direkt postoperativ konnte zwar nur für die TLR4-Expression eine signifikante Abnahme nachgewiesen werden, aber eine erneute Messung nach weiteren fünf Stunden zeigte bereits einen signifikanten Anstieg bzw. Wiederanstieg der monozytären TLR2- und TLR4-Expression [96]. Hadley et al. konnten in ihrer Studie an sechs Patienten keine signifikante Abnahme der monozytären TLR2/4-Expression nach Ende des CPB nachweisen. Doch auch hier zeigte sich bei einer erneuten Messung nach 20 Stunden ein signifikanter Anstieg der Werte für die TLR2-Expression (um 121%) und die TLR4-Expression (um 132%) [82]. Ob postoperativer Stress zu einer frühzeitigen, ggf. nur kurzfristig bestehenden signifikanten Abnahme der TLR2/4-Expression auf Monozyten führt, kann aufgrund der Studienlage nicht eindeutig geklärt werden. Sicher scheint jedoch, dass es im postoperativen Verlauf zu einem Anstieg (bzw. Wiederanstieg) der TLR2/4-Expression auf Monozyten kommt [82, 95, 96].

In unserer Studie konnten wir zwei Stunden nach Ende des CPB keine Abnahme der TLR2/4-Expression auf AM nachweisen. Ob es im weiteren postoperativen Verlauf auch zu einem Anstieg der TLR2/4-Expression auf AM gekommen ist, können wir nicht sagen, da ethische Gründe eine Verlängerung der maschinellen Beatmung nicht zuließen. Die Durchführung einer weiteren Bronchoskopie zu einem späteren Zeitpunkt war daher nicht möglich.

Während in der vorliegenden Arbeit für die Expression von TLR2/4 in Bezug auf die gesamte Patientengruppe postoperativ keine statistisch signifikante Abnahme nachgewiesen werden konnte, ist es bemerkenswert, dass im Vergleich der Gruppen mit und ohne postoperative Pneumonie sich die TLR4-Expression in der Gruppe der Patienten mit postoperativer Pneumonie postoperativ signifikant reduziert zeigte und auch die Expression von TLR2 postoperativ tendenziell vermindert war.

Es ist vorstellbar, dass diese postoperative Abnahme der TLR4-Expression die Entstehung einer postoperativen Pneumonie begünstigt haben könnte. So konnten Versuche an Knockout-Mäusen ohne TLR4 zeigen, dass es bei diesen Mäusen zu

einem beschleunigten Wachstum und zu einer schnelleren Ausbreitung von pathogenen Bakterien kommt als bei Mäusen mit TLR4. Ferner zeigen auch Untersuchungen, dass Menschen, bei denen aufgrund einer Genmutation ein Funktionsverlust von TLR4 vorliegt, ein erhöhtes Risiko aufweisen, postoperativ an einer schwerwiegenden bakteriellen Infektion (Pneumonie, Sepsis) zu erkranken [111, 112].

Auch die postoperativ verminderte TLR2-Expression in der Gruppe der Patienten mit Pneumonie könnte mit der Entwicklung einer postoperativen Pneumonie assoziiert sein. So gibt es in der Literatur Hinweise, dass eine Abnahme der monozytären TLR2-Expression Einfluss auf die Entstehung postoperativer Infektionen haben könnte. So konnte eine Studie aus den Niederlanden zeigen, dass eine Abnahme der TLR2-Expression auf Monozyten bei Patienten nach CABG-Operation mit der Entwicklung postoperativer Komplikationen wie SIRS und Pneumonie assoziiert war. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen konnten die Autoren in ihrer Studie eine Assoziation zwischen der Abnahme der TLR4-Expression und der Häufigkeit einer postoperativen Pneumonie jedoch nicht nachweisen [113].

Ferner ist es bemerkenswert, dass in unserer Studie der Ausgangswert der TLR2-Expression auf AM in der Gruppe der Patienten mit postoperativer Pneumonie im Vergleich zu den Ausgangswerten der Gruppe der Patienten ohne Pneumonie bereits vor Beginn der Operation signifikant niedriger war. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte eine bereits vor der Operation bestehende bakterielle Besiedlung der Atemwege dieser Patienten sein. Zwar sind in der Literatur keine Aussagen über die Prävalenz bakterieller Besiedlung der Atemwege gesunder Patienten zu finden. Doch Untersuchungen an COPD-Patienten zeigen, dass eine niedrige TLR2-Expression in Zusammenhang mit einer dauerhaften bakteriellen Besiedlung der Atemwege stehen könnte [114]. Wenngleich in der Gruppe der Patienten mit Pneumonie kein Patient an COPD erkrankt war, könnte dies dennoch als Hinweis dafür gesehen werden, dass die bereits präoperativ nachgewiesene niedrigere TLR2-Expression eine pulmonale bakterielle Besiedlung dieser Patienten forciert hat. Mehrere Faktoren, wie der Kontakt zur HLM, der operative Stress und die maschinelle Beatmung, begünstigen das Wachstum einer bakteriellen Besiedlung und könnten so die Entwicklung einer

postoperativen Pneumonie ausgelöst haben. Leider können wir unsere Hypothese nicht durch den kulturellen Nachweis von Bakterien bestätigen, da keine mikrobiologischen Untersuchungen durchgeführt worden sind. Für zukünftige Untersuchungen wäre es interessant, diese Frage zu klären.

6.3 Zytokine

Postoperativ zeigten sich die Werte aller nach LPS-Stimulation der Monozyten gemessenen Zytokine (TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-8 und IL10) vermindert (für die gesamte Patientengruppe). Eine statistisch signifikante Abnahme konnten wir für die proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-6, IL-1 β und IL-8 nachweisen. Unsere Ergebnisse lassen daher auf eine postoperativ reduzierte Sensibilität der Monozyten gegenüber LPS im Sinne einer zellulären Immunsuppression schließen.

Zu dieser Schlussfolgerung kommen auch Li et al. Sie untersuchten ebenfalls Patienten nach herzchirurgischen Eingriffen mit CPB und führten eine *in vitro*-LPS-Stimulation mit Monozyten durch. Bereits nach Beendigung des CBP waren die Werte der proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-6, IL-1 β und IL-8 im Vergleich zu den präoperativ gemessenen Werten um bis zu 90% reduziert. Nur die Konzentration des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 zeigte sich zu diesem Zeitpunkt deutlich erhöht. Bereits am ersten postoperativen Tag war der Wert für IL-10 wieder gesunken. Die proinflammatorischen Zytokine erlangten spätestens am siebten postoperativen Tag wieder ihr Ausgangsniveau. Die Autoren folgern, dass diese vorübergehende, aber drastische Immunsuppression die Disposition für postoperative Infekte in dieser Patientengruppe erklären könnte [97]. Weitere Studien kommen zu einem ähnlichen Ergebnis und können zeigen, dass es peri- bzw. postoperativ zu einer kurzfristigen signifikanten Immunparalyse mit einer verminderten proinflammatorischen Zytokin-Ausschüttung nach LPS-Stimulation kommt, welche sich im postoperativen Verlauf innerhalb von einigen Stunden bis Tagen wieder erholt [44, 98, 115, 116].

In unserer Studie kam es bei den Patienten mit Pneumonie postoperativ zu einer erhöhten IL-10-Ausschüttung im Gegensatz zu den Werten für TNF- α , IL-6, IL-1 β und IL-8. Tatsächlich konnten Studien zeigen, dass ein postoperativer Serumanstieg von IL-10 bei Patienten nach Operation mit CPB mit der Entstehung postoperativer Komplikationen korreliert [13, 28]. Außerdem gibt es Hinweise, dass IL-10 als antiinflammatorisches Zytokin mitverantwortlich für die postoperative Abnahme der HLA-DR-Expression auf Monozyten ist [42, 117]. Dies könnte ein weiterer Hinweis darauf sein, dass es in der Gruppe der Patienten mit postoperativer Pneumonie zu einer ausgeprägteren transienten Immunsuppression gekommen ist, welche die Entstehung einer postoperativen Pneumonie begünstigt haben könnte. Eine Assoziation der postoperativen Zunahme von IL-10 und der Entwicklung einer postoperativen Pneumonie konnten wir jedoch nicht nachweisen.

Im Gegensatz zu der postoperativ deutlich eingeschränkten Reaktionsfähigkeit der Monozyten gegenüber LPS zeigten die AM nach *in vitro*-Stimulation mit LPS keine statistisch signifikante Abnahme der postoperativ gemessenen Konzentration der Zytokine TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 und IL-10. Dies könnte für eine zumindest teilweise erhaltene immunologische Aktivität der AM sprechen. Bezüglich der Entstehung einer postoperativen Pneumonie konnten wir keinen Zusammenhang feststellen. Zu einem anderen Ergebnis kommen Kotani et al. Sie konnten in ihrer Studie zeigen, dass AM nach herzchirurgischen Eingriffen durch Stimulation mit LPS eine bis zu 3-fach höhere Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-8 und TNF- α aufwiesen als vor der Operation. Zusätzlich zeigte sich die in der bronchoalveolären Flüssigkeit gemessenen Konzentration der Zytokine gegenüber der im Blut gemessenen Konzentration deutlich erhöht [99]. Auch Muehlstedt et al. konnten zeigen, dass es pulmonal zu einer ausgeprägten proinflammatorischen Reaktion kommt. Die Konzentration der in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit gemessenen Zytokine (IL-6, IL-8 und IL-10) schwerverletzter Patienten war deutlich erhöht und gegenüber den systemisch gemessenen Werten noch gesteigert. Im Vergleich zur Studie von Kotani et al. zeigten sich in der Studie von Muehlstedt et al. die mit LPS stimulierten AM in ihrer Funktion stark eingeschränkt, proinflammatorische Zytokine wie IL-6 und IL-8 zu

sezernieren. Die Synthese von IL-10 war dagegen gesteigert [100]. Sowohl Kotani et al. als auch Muehlstedt et al. kommen auf Grund ihrer Studienergebnisse zu der Schlussfolgerung, dass es nach großen körperlichen Eingriffen (Operationen, Verletzungen) zu einer ausgeprägten pulmonalen proinflammatorischen Immunreaktion kommt, welche die systemische Reaktion noch übersteigt. Muehlstedt et al. interpretieren ihre Ergebnisse zusätzlich als eine zelluläre Immunsuppression der AM, ausgelöst durch eine hohe Konzentration des antiinflammatorischen Zytokins IL-10. In einer weiteren Studie konnten Muehlstedt et al. außerdem zeigen, dass AM von Patienten mit nosokomialer Pneumonie signifikant mehr IL-10 nach LPS-Stimulation produzieren als AM von Patienten ohne nosokomiale Pneumonie [118]. Es scheint somit nicht eindeutig geklärt, ob Operationen und schwere Verletzungen zu einer initialen Sensibilisierung oder Desensibilisierung von AM gegenüber LPS führen. In der vorliegenden Studie konnten wir postoperativ weder eine Zu- noch eine Abnahme der Sensibilität von AM gegenüber LPS nachweisen.

6.4 Limitationen der Studie

Die wesentliche Einschränkung hinsichtlich der Aussagekraft der vorliegenden Studie ist die kleine Gruppe von Patienten, die eine postoperative Pneumonie entwickelten. Da die Studie als Pilotstudie angelegt war, konnten nicht mehr Patienten einbezogen werden. Um die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zu verifizieren, wäre die Durchführung einer großen Interventionsstudie notwendig.

Ferner ist nicht auszuschließen, dass es durch die präoperativ durchgeführte BAL im rechten Lungenflügel zu einer Aktivierung der AM gekommen ist. Es wurde allerdings versucht, etwaige Folgen einer solchen Aktivierung zu minimieren, indem die postoperative BAL im linken Lungenflügel durchgeführt wurde. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass es durch die Verarbeitung der Zellen im Labor und dem Kontakt der Zellen zu künstlichen Oberflächen zu einer Aktivierung der Zellen gekommen ist. Da es sich bei der vorliegenden Arbeit allerdings um eine klinische Studie an Patienten

handelt, bei der alle Proben gleichermaßen im Labor behandelt wurden, kann eine solche Manipulation als Störgröße in unseren Ergebnissen vernachlässigt werden.

Zusätzlich muss beachtet werden, dass eine Vielzahl von Faktoren wie Alter, Dauer der maschinellen Beatmung, die Gabe von Methylprednisolon und die Verwendung von Blutprodukten die peri- und postoperative Immunfunktion beeinflussen [1, 8, 119–121]. Kinlin et al. konnten etwa 13 unabhängige Risikofaktoren für die Entstehung einer postoperativen Pneumonie identifizieren. So konnten als unabhängige Risikofaktoren unter anderem die verlängerte Dauer der maschinellen Beatmung > 24 Stunden (als der schwerwiegendste Risikofaktor), die Gabe von Bluttransfusionen, ein BMI < 18,5 kg/m², eine positive Raucheranamnese und ein Notfallstatus nachgewiesen werden [119]. Weitere Studien an Patienten mit herzchirurgischer Operation konnten ebenfalls die Gabe von Bluttransfusionen als Risikofaktor identifizieren [1, 8, 120]. In diesem Kontext ist zu beachten, dass in der vorliegenden Studie alle drei Patienten der Gruppe mit postoperativer Pneumonie intraoperativ Bluttransfusionen erhielten. Zudem waren die Patienten in dieser Gruppe signifikant älter. Ebenso dauerte die Operation signifikant länger und damit einhergehend auch die Anwendung der HLM und die maschinelle Beatmung. Es ist möglich, dass diese Parameter eine Auswirkung auf das Ausmaß der HLA-DR- und TLR2/4-Expression hatten sowie der Reaktionsfähigkeit der Zellen gegenüber LPS. Leider hat diese Pilotstudie nicht die statistische Aussagekraft Risikofaktoren zu identifizieren oder zu validieren.

6.5 Schlussfolgerung

Unsere Ergebnisse weisen auf eine starke postoperative Immunsuppression der pulmonalen Immunabwehr hin. Dies konnten wir anhand der postoperativen signifikanten Abnahme der HLA-DR-Expression auf AM zeigen. In Bezug auf die Monozyten zeigen unsere Ergebnisse eine postoperative Deaktivierung der Zellen, die sich in einer Abnahme der HLA-DR-Expression und einer verminderten

Reaktionsfähigkeit gegenüber LPS manifestierte. Wir konnten damit nachweisen, dass es nach herzchirurgischen Operationen neben den systemischen Veränderungen der zellulären Immunabwehr auch zu einer pulmonalen organspezifischen Immunmodulation kommt.

Zusätzlich zeigten Patienten, die an einer postoperativen Pneumonie erkrankten, eine signifikant stärkere Abnahme der HLA-DR-Expression auf AM verglichen mit den Patienten, die keine postoperative Pneumonie entwickelten. Patienten mit postoperativer Pneumonie wiesen bereits zwei Stunden nach Ende des CPB eine signifikant stärkere Abnahme der HLA-DR-Expression auf AM auf. Die HLA-DR-Expression auf Monozyten zeigte diesen signifikanten Unterschied zu diesem frühen Zeitpunkt nicht. Hier könnte ein Ansatzpunkt zur frühzeitigen Diagnostik dieser Hochrisikopatienten liegen. Insgesamt unterstützen diese Ergebnisse die Hypothese, dass herzchirurgische Operationen neben der systemischen zellulären Immunmodulation auch zu einer organspezifischen Immunsuppression der Alveolarmakrophagen führen und diese pulmonalen Veränderungen mit der Entstehung einer postoperativen Pneumonie in Verbindung stehen.

7 Literatur

- 1 Hortal J, Munoz P, Cuerpo G, Litvan H, Rosseel P, Bouza E, the European Study Group on Nosocomial Infections, the European Workgroup of Cardiothoracic Intensivists. Ventilator-associated pneumonia in patients undergoing major heart surgery: an incidence study in Europe. *Critical Care* 2009; 13 (3): R80
- 2 Bouza E, Hortal J, Muñoz P, Pérez MJ, Riesgo MJ, Hiesmayr M. Infections following major heart surgery in European intensive care units: there is room for improvement (ESGNI 007 Study). *Journal of Hospital Infection* 2006; 63 (4): 399–405
- 3 Ryan TM, Carthy JFMF, Rady MYMP, Serkey JRN, Gordon SMD, Starr. Early bloodstream infection after cardiopulmonary bypass: Frequency rate, risk factors, and implications. *Critical Care Medicine* 1997; 25 (12): 2009–2014
- 4 Lode H, Erbes R, Geerdes-Fenge H, Raffenberg M, Mauch H. Nosokomiale Pneumonie Epidemiologie, Pathogenese und Diagnostik. *Der Internist* 2000; 41 (11): 1170–1179
- 5 Rebollo MH, Bernal JM, Llorca J, Rabasa JM, Revuelta JM. Nosocomial infections in patients having cardiovascular operations: A multivariate analysis of risk factors. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996; 112 (4): 908–913
- 6 Wynne R, Botti M. Postoperative pulmonary dysfunction in adults after cardiac surgery with cardiopulmonary bypass: clinical significance and implications for practice. *Am J Crit Care* 2004; 13 (5): 384–393
- 7 Ng CSH, Wan S, Yim APC, Arifi AA. Pulmonary dysfunction after cardiac surgery. *Chest* 2002; 121 (4): 1269–1277
- 8 Leal-Noval SRM, Marquez-Vacaro JAM, Garcia-Curiel AMD, Camacho-Larana PP, Rincon-Ferrari MDP, Ordonez-Fernandez AMD, Flores-Cordero JMM, Loscertales-Abril JMD. Nosocomial pneumonia in patients undergoing heart surgery. *Critical Care* 2000; 28 (4): 935–940
- 9 Kollef MH, Sharpless L, Vlasnik J, Pasque C, Murphy D, Fraser VJ. The Impact of Nosocomial Infections on Patient Outcomes Following Cardiac Surgery. *CHEST Journal* 1997; 112 (3): 666–675

- 10 Lorenz J, Bodmann K, Bauer TT, Ewig S, Trautmann M, Vogel F. Nosokomiale Pneumonie: Prävention, Diagnostik und Therapie. *Pneumologie* 2003; 57 (09): 532–545
- 11 Welte T. Die nosokomiale Pneumonie. *Intensivmedizin und Notfallmedizin* 2006; 43 (4): 301–309
- 12 Santini F, Onorati F, Telesca M, Menon T, Mazzi P, Berton G, Faggian G, Mazzucco A. Selective pulmonary pulsatile perfusion with oxygenated blood during cardiopulmonary bypass attenuates lung tissue inflammation but does not affect circulating cytokine levels. *Eur J Cardiothorac Surg* 2012; 42 (6): 942–950
- 13 Menger M, Vollmar B. Surgical trauma: hyperinflammation versus immunosuppression?: *Langenbeck's Archives of Surgery*. *Langenbecks Arch Surg* 2004; 389 (6): 475–484
- 14 Ascione R, Lloyd CT, Underwood MJ, Lotto AA, Pitsis AA, Angelini GD. Inflammatory response after coronary revascularization with or without cardiopulmonary bypass. *The Annals of Thoracic Surgery* 2000; 69 (4): 1198–1204
- 15 Asimakopoulos G, Taylor KM. Effects of cardiopulmonary bypass on leukocyte and endothelial adhesion molecules. *The Annals of Thoracic Surgery* 1998; 66 (6): 2135–2144
- 16 Sander M, Heymann C von, Dossow V von, Spaethe C, Konertz WF, Jain U, Spies CD. Increased interleukin-6 after cardiac surgery predicts infection. *Anesthesia & Analgesia* 2006; 102 (6): 1623–1629
- 17 Volk T, Döpfner UR, Schmutzler M, Rimpau S, Schnitzler H, Konertz W, Hoeflich C, Döcke W, Spies CD, Volk H, Kox WJ. Stress induced IL-10 does not seem to be essential for early monocyte deactivation following cardiac surgery. *Cytokine* 2003; 24 (6): 237–243
- 18 Ni Choileain N, Redmond HP. Cell response to surgery. *Arch Surg* 2006; 141 (11): 1132–1140
- 19 Angele MK, Faist E. Clinical review: Immunodepression in the surgical patient and increased susceptibility to infection. *Critical Care* 2002; 6 (4): 298–305

- 20** Kirklin JK, Westaby S, Blackstone EH, Kirklin JW, Chenoweth DE, Pacifico AD. Complement and the damaging effects of cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1983; 86 (6): 845–857
- 21** Sawa Y, Shimazaki Y, Kadoba K, Masai T, Fukuda H, Ohata T, Taniguchi K, Matsuda H. Attenuation of cardiopulmonary bypass-derived inflammatory reactions reduces myocardial reperfusion injury in cardiac operations. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 1996; 111 (1): 29–35
- 22** Kharazmi A, Andersen LW, Baek L, Valerius NH, Laub M, Rasmussen JP. Endotoxemia and enhanced generation of oxygen radicals by neutrophils from patients undergoing cardiopulmonary bypass. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 1989; 98 (3): 381–385
- 23** Landow L, Andersen LW. Splanchnic ischaemia and its role in multiple organ failure. *Acta Anaesthesiol Scand* 1994; 38 (7): 626–639
- 24** Hall RI, Smith MS, Rocker G. The Systemic Inflammatory Response to Cardiopulmonary Bypass: Pathophysiological, Therapeutic, and Pharmacological Considerations. *Anesthesia & Analgesia* 1997; 85 (4): 766–782
- 25** Butler J, Rocker GM, Westaby S. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass. *The Annals of Thoracic Surgery* 1993; 55 (2): 552–559
- 26** Mahle WT, Matthews E, Kanter KR, Kogon BE, Hamrick SE, Strickland MJ. Inflammatory Response After Neonatal Cardiac Surgery and Its Relationship to Clinical Outcomes. *The Annals of Thoracic Surgery* 2014; 97 (3): 950–956
- 27** Schütt C, Bröker B. *Grundwissen Immunologie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2011
- 28** Strohmeyer J, Blume C, Meisel C, Doecke W, Hummel M, Hoeflich C, Thiele K, Unbehaun A, Hetzer R, Volk H. Standardized immune monitoring for the prediction of infections after cardiopulmonary bypass surgery in risk patients. *Cytometry* 2003; 53 (1): 54–62
- 29** Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference

- Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. CHEST Journal 1992; 101 (6): 1644–1655
- 30** Lukaszewicz A, Grienay M, Resche-Rigon M, Pirracchio R, Faivre V, Boval B, Payen D. Monocytic HLA-DR expression in intensive care patients: Interest for prognosis and secondary infection prediction*. Critical Care Medicine 2009; 37 (10): 2746–2752
- 31** Kono H, Rock KL. How dying cells alert the immune system to danger. Nat Rev Immunol 2008; 8 (4): 279–289
- 32** Butler J, Parker D, Pillai R, Westaby S, Shale DJ, Rocker GM. Effect of cardiopulmonary bypass on systemic release of neutrophil elastase and tumor necrosis factor. J Thorac Cardiovasc Surg 1993; 105 (1): 25–30
- 33** Adib-Conquy M, Cavillon J. Compensatory anti-inflammatory response syndrome. Thrombosis and haemostasis 2009; 101 (1): 36–47
- 34** Faist E. Update on the Mechanisms of Immune Suppression of Injury and Immune Modulation. World Journal of Surgery 1996; 20 (4): 454–459
- 35** Ogawa K, Hirai M, Katsube T, Murayama M, Hamaguchi K, Shimakawa T, Naritake Y, Hosokawa T, Kajiwara T. Suppression of cellular immunity by surgical stress. Surgery 2000; 127 (3): 329–336
- 36** Asadullah K, Woiciechowsky C, Docke WD, Egerer K, Kox WJ, Vogel S, Sterry W, Volk HD. Very low monocytic HLA-DR expression indicates high risk of infection--immunomonitoring for patients after neurosurgery and patients during high dose steroid therapy. Eur J Emerg Med 1995; 2 (4): 184–190
- 37** Woiciechowsky C, Asadullah K, Nestler D, Eberhardt B, Platzer C, Schöning B, Glöckner F, Lanksch WR, Volk H, Döcke W. Sympathetic activation triggers systemic interleukin-10 release in immunodepression induced by brain injury. Nature medicine 1998; 4 (7): 808–813
- 38** Schindler R, Mancilla J, Endres S, Ghorbani R, Clark SC, Dinarello CA. Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. Blood 1990; 75 (1): 40–47

- 39** Ulich TR, Yin S, Guo K, Yi ES, Remick D, Del Castillo J. Intratracheal injection of endotoxin and cytokines. II. Interleukin-6 and transforming growth factor beta inhibit acute inflammation. *The American journal of pathology* 1991; 138 (5): 1097
- 40** Baumann H, Gauldie J. The acute phase response. *Immunology Today* 1994; 15 (2): 74–80
- 41** Volk T, Schmutzler M, Engelhardt L, Docke WD, Volk HD, Konertz W, Kox WJ. Influence of aminosteroid and glucocorticoid treatment on inflammation and immune function during cardiopulmonary bypass. *Critical Care Medicine* 2001; 29 (11): 2137–2142
- 42** Armstrong L, Jordan N, Millar A. Interleukin 10 (IL-10) regulation of tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha) from human alveolar macrophages and peripheral blood monocytes. *Thorax* 1996; 51 (2): 143–149
- 43** Caille V, Chiche J, Nciri N, Berton C, Gibot S, Boval B, Payen D, Mira J, Mebazaa A. Histocompatibility leukocyte antigen-D related expression is specifically altered and predicts mortality in septic shock but not in other causes of shock. *Shock* 2004; 22 (6): 521–526
- 44** 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. *Anesthesia and Analgesia* 2001; 92 (5): 1322–1326
- 45** Döcke W, Randow F, Syrbe U, Krausch D, Asadullah K, Reinke P, Volk H, Kox W. Monocyte deactivation in septic patients: Restoration by IFN- γ treatment. *Nat Med* 1997; 3 (6): 678–681
- 46** West MA, Heagy W. Endotoxin tolerance: a review. *Critical Care Medicine* 2002; 30 (1 Suppl): S64-73
- 47** Volk HD, Reinke P, Docke WD. Clinical aspects: from systemic inflammation to 'immunoparalysis'. *Chem Immunol* 2000; 74: 162–177
- 48** Volk T, Schenk M, Voigt K, Tohtz S, Putzier M, Kox WJ. Postoperative epidural anesthesia preserves lymphocyte, but not monocyte, immune function after major spine surgery. *Anesthesia & Analgesia* 2004; 98 (4): 1086–1092

- 49** Nicod LP. Lung defences: An overview. *European Respiratory Review* 2005; 14 (95): 45–50
- 50** Lambrecht BN. Alveolar macrophage in the driver's seat. *Immunity* 2006; 24 (4): 366–368
- 51** Nicod LP. Pulmonary defence mechanisms. *Respiration* 1999; 66 (1): 2–11
- 52** Lohmann-Matthes ML, Steinmuller C, Franke-Ullmann G. Pulmonary macrophages. *Eur Respir J* 1994; 7 (9): 1678–1689
- 53** Gordon SB, Read RC. Macrophage defences against respiratory tract infections. *British Medical Bulletin* 2002; 61 (1): 45–61
- 54** Medzhitov R, Janeway C, JR. Innate immune recognition: Mechanisms and pathways. *Immunol Rev* 2000; 173 (1): 89–97
- 55** Ting JP, Trowsdale J. Genetic Control of MHC Class II Expression. *Cell* 2002; 109 (2, Supplement 1): S21-S33
- 56** Meisel C, Schefold JC, Pschowski R, Baumann T, Hetzger K, Gregor J, Weber-Carstens S, Hasper D, Keh D, Zuckermann H, Reinke P, Volk H. Granulocyte–Macrophage Colony-stimulating Factor to Reverse Sepsis-associated Immunosuppression. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2009; 180 (7): 640–648
- 57** Fumeaux T, Pugin J. Role of Interleukin-10 in the Intracellular Sequestration of Human Leukocyte Antigen-DR in Monocytes during Septic Shock. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2002; 166 (11): 1475–1482
- 58** Fernández EM, O'Toole PJ, Morrison IEG, Cherry RJ, Fernández N. Interaction of HLA-DR with actin microfilaments. *Human Immunology* 2003; 64 (3): 327–337
- 59** Richter A, Nebe T, Wendl K, Schuster K, Klaebisch G, Quintel M, Lorenz D, Post S, Trede M. HLA-DR expression in acute pancreatitis. *Eur J Surg* 1999; 165 (10): 947–951
- 60** Flohé S, Lendemans S, Schade F, Kreuzfelder E, Waydhas C. Influence of surgical intervention in the immune response of severely injured patients. *Intensive Care Medicine* 2004; 30 (1): 96–102
- 61** Metlay JP, Schulz R, Li YH, Singer DE, Marrie TJ, Coley CM, Hough LJ, Obrosky DS, Kapoor WN, Fine MJ. Influence of age on symptoms at presentation in patients

- with community-acquired pneumonia. *Archives of Internal Medicine* 1997; 157 (13): 1453–1459
- 62** Cheadle WG, Turina M. Infection and organ failure in the surgical patient: a tribute to seminal contributions by Hiram C. Polk, Jr, M.D. *Am J Surg* 2005; 190 (2): 173–177
- 63** Vester H, Dargatz P, Huber-Wagner S, Biberthaler P, van Griensven M. HLA-DR expression on monocytes is decreased in polytraumatized patients. *Eur J Med Res* 2015; 20: 84
- 64** Allen ML, Peters MJ, Goldman A, Elliott M, James I, Callard R, Klein NJ. Early postoperative monocyte deactivation predicts systemic inflammation and prolonged stay in pediatric cardiac intensive care*. *Critical Care Medicine* 2002; 30 (5): 1140–1145
- 65** Satoh A, Miura T, Satoh K, Masamune A, Yamagiwa T, Sakai Y, Shibuya K, Takeda K, Kaku M, Shimosegawa T. Human Leukocyte Antigen-DR Expression on Peripheral Monocytes as a Predictive Marker of Sepsis During Acute Pancreatitis. *Pancreas* 2002; 25 (3): 245–250
- 66** Venet F, Tissot S, Debard A, Faudot C, Crampé C, Pachot A, Ayala A, Monneret G. Decreased monocyte human leukocyte antigen-DR expression after severe burn injury: Correlation with severity and secondary septic shock. *Critical Care Medicine* 2007; 35 (8): 1910–1917
- 67** Monneret G, Lepape A, Voirin N, Bohé J, Venet F, Debard A, Thizy H, Bienvenu J, Gueyffier F, Vanhems P. Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive Care Medicine* 2006; 32 (8): 1175–1183
- 68** Le Tulzo Y, Pangault C, Amiot L, Guilloux V, Tribut O, Arvieux C, Camus C, Fauchet R, Thomas R, Drénou B. Monocyte Human Leukocyte Antigen–DR Transcriptional Downregulation by Cortisol during Septic Shock. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2004; 169 (10): 1144–1151
- 69** Pradhan R, Jain P, Paria A, Saha A, Sahoo J, Sen A, Mukherjee S, Som T, Hazra A, Warner N, Singh AK, Chatterjee M. Ratio of neutrophilic CD64 and monocytic

- HLA-DR: A novel parameter in diagnosis and prognostication of neonatal sepsis. *Cytometry* 2016; 90 (3): 295–302
- 70** Zhuang Y, Li W, Wang H, Peng H, Chen Y, Zhang X, Chen Y, Gao C. Predicting the Outcomes of Subjects With Severe Community-Acquired Pneumonia Using Monocyte Human Leukocyte Antigen-DR. *Respir Care* 2015; 60 (11): 1635–1642
- 71** Aho IM, Jans J, Haroutiounian L, Simonetti ER, van der Gaast-de Jongh C, Diavatopoulos DA, Jonge MI de, Groot R de, Ferwerda G. Reduced Expression of HLA-DR on Monocytes During Severe Respiratory Syncytial Virus Infections. *Pediatr Infect Dis J* 2016; 35 (3): e89-96
- 72** Döcke W, Höflich C, Davis KA, Röttgers K, Meisel C, Kiefer P, Weber SU, Hedwig-Geissing M, Kreuzfelder E, Tschentscher P, Nebe T, Engel A, Monneret G, Spittler A, Schmolke K, Reinke P, Volk H, Kunz D. Monitoring Temporary Immunodepression by Flow Cytometric Measurement of Monocytic HLA-DR Expression: A Multicenter Standardized Study. *Clinical Chemistry* 2005; 51 (12): 2341–2347
- 73** Schneider C, Aulock S von, Zedler S, Schinkel C, Hartung T, Faist E. Perioperative Recombinant Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor (Filgrastim) Treatment Prevents Immunoinflammatory Dysfunction Associated With Major Surgery. *Annals of Surgery* 2004; 239 (1): 75–81
- 74** Polk HC, JR, Cheadle WG, Livingston DH, Rodriguez JL, Starko KM, Izu AE, Jaffe HS, Sonnenfeld G. A randomized prospective clinical trial to determine the efficacy of interferon-gamma in severely injured patients. *Am J Surg* 1992; 163 (2): 191–196
- 75** Malakooti M, Kelleher M, Wald E. Immune Dysregulation in Sepsis. *Clinical Pediatric Emergency Medicine* 2014; 15 (2): 163–168
- 76** Buhling F, Ittenson A, Kaiser D, Tholert G, Hoffmann B, Reinhold D, Ansorge S, Welte T. MRP8/MRP14, CD11b and HLA-DR expression of alveolar macrophages in pneumonia. *Immunol Lett* 2000; 71 (3): 185–190
- 77** Muehlstedt SG, Lyte M, Rodriguez JL. Increased IL-10 Production and HLA-DR Suppression in the Lungs of Injured Patients Precede the Development of Nosocomial Pneumonia. *Shock* 2002; 17 (6): 443–450

- 78** Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004; 4 (7): 499–511
- 79** Kaisho T, Akira S. Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117 (5): 979–987
- 80** Schnare M, Rollinghoff M, Qureshi S. Toll-like receptors: sentinels of host defence against bacterial infection. *Int Arch Allergy Immunol* 2006; 139 (1): 75–85
- 81** Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Differential Roles of TLR2 and TLR4 in Recognition of Gram-Negative and Gram-Positive Bacterial Cell Wall Components. *Immunity* 1999; 11 (4): 443–451
- 82** Hadley JS, Wang JE, Michaels LC, Dempsey CM, Foster SJ, Thiemermann C, Hinds CJ. Alterations in Inflammatory Capacity and Tlr Expression on Monocytes and Neutrophils After Cardiopulmonary Bypass. *Shock* 2007; 27 (5): 466–473
- 83** Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2001; 2 (8): 675–680
- 84** Imler J, Hoffmann JA. Toll receptors in innate immunity. *Trends in Cell Biology* 2001; 11 (7): 304–311
- 85** Monick MM, Hunninghake GW. Activation of second messenger pathways in alveolar macrophages by endotoxin. *European Respiratory Journal* 2002; 20 (1): 210–222
- 86** Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S. Cutting Edge: Toll-Like Receptor 4 (TLR4)-Deficient Mice Are Hyporesponsive to Lipopolysaccharide: Evidence for TLR4 as the Lps Gene Product. *The Journal of Immunology* 1999; 162 (7): 3749–3752
- 87** Branger J, Knapp S, Weijer S, Leemans JC, Pater JM, Speelman P, Florquin S, van der Poll T. Role of Toll-Like Receptor 4 in Gram-Positive and Gram-Negative Pneumonia in Mice. *Infection and Immunity* 2004; 72 (2): 788–794
- 88** Wang X, Moser C, Louboutin J, Lysenko ES, Weiner DJ, Weiser JN, Wilson JM. Toll-Like Receptor 4 Mediates Innate Immune Responses to *Haemophilus influenzae* Infection in Mouse Lung. *The Journal of Immunology* 2002; 168 (2): 810–815

- 89** Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, Frees K, Watt JL, Schwartz DA. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet* 2000; 25 (2): 187–191
- 90** Agnese DM, Calvano JE, Hahm SJ, Coyle SM, Corbett SA, Calvano SE, Lowry SF. Human Toll-Like Receptor 4 Mutations but Not CD14 Polymorphisms Are Associated with an Increased Risk of Gram-Negative Infections. *Journal of Infectious Diseases* 2002; 186 (10): 1522–1525
- 91** Lorenz E, Mira J, Frees KL, Schwartz DA. Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock. *Archives of Internal Medicine* 2002; 162 (9): 1028–1032
- 92** Cook DN, Pisetsky DS, Schwartz DA. Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nat Immunol* 2004; 5 (10): 975–979
- 93** Ogus AC, Yoldas B, Ozdemir T, Uguz A, Olcen S, Keser I, Coskun M, Cilli A, Yegin O. The Arg753Gln polymorphism of the human Toll-like receptor 2 gene in tuberculosis disease. *European Respiratory Journal* 2004; 23 (2): 219–223
- 94** Lorenz E, Mira JP, Cornish KL, Arbour NC, Schwartz DA. A Novel Polymorphism in the Toll-Like Receptor 2 Gene and Its Potential Association with Staphylococcal Infection. *Infection and Immunity* 2000; 68 (11): 6398–6401
- 95** Krejsek J, Kolackova M, Mand'ak J, Kunes P, Holubcova Z, Holmannova D, AbuAttieh M, Andrys C. TLR2 and TLR4 expression on blood monocytes and granulocytes of cardiac surgical patients is not affected by the use of cardiopulmonary bypass. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 2013; 56 (2): 57–66
- 96** Dybdahl B, Wahba A, Lien E, Flo TH, Waage A, Qureshi N, Sellevold OFM, Espevik T, Sundan A. Inflammatory response after open heart surgery: release of heat-shock protein 70 and signaling through toll-like receptor-4. *Circulation* 2002; 105 (6): 685–690
- 97** Li Y, Huang J, Huang S, Xu Y, Xu Y, Liao J, Feng X, Zhang X, Wang JH, Wang J. 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; 29 (2): 312.e7-13

- 98** Cabie A, Fitting C, Farkas JC, Laurian C, Cormier JM, Carlet J, Cavaillon JM. Influence of surgery on in-vitro cytokine production by human monocytes. *Cytokine* 1992; 4 (6): 576–580
- 99** Kotani N, Hashimoto H, Sessler DI, Muraoka M, Wang JS, O'Connor MF, Matsuki A. Cardiopulmonary bypass produces greater pulmonary than systemic proinflammatory cytokines. *Anesthesia and Analgesia* 2000; 90 (5): 1039–1045
- 100** Muehlstedt SG, Richardson CJ, Lyte M, Rodriguez JL. Systemic and pulmonary effector cell function after injury. *Critical Care Medicine* 2002; 30 (6): 1322–1326
- 101** Hauser GJ, Ben-Ari J, Colvin MP, Dalton HJ, Hertzog JH, Bearb M, Hopkins RA, Walker SM. Interleukin-6 levels in serum and lung lavage fluid of children undergoing open heart surgery correlate with postoperative morbidity. *Intensive Care Medicine* 1998; 24 (5): 481–486
- 102** Kox W, Spies CD. Check-up Anästhesiologie: Standards Anästhesie - Intensivmedizin - Schmerztherapie - Notfallmedizin. 2 Aufl. Berlin: Springer; 2005
- 103** Heinemann A. Einfluss der Hämodilution während normothermer extrakorporaler Zirkulation bei aortokoronaren Bypassoperationen auf Leberperfusion und Leberfunktion [Dissertation]. Berlin, 2007
- 104** Weymann L. Einfluss der Hämodilution unter normothermer extrakorporaler Zirkulation während aortokoronaler Bypassoperation auf die Darmpermeabilität und die Zytokinfreisetzung [Dissertation]. Berlin, 2008
- 105** Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D. Der Experimentator: Immunologie. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum; 2004
- 106** Becton Dickinson Immunocytometry Systems. QuantiBRITE™ PE*: Phycoerythrin Fluorescence Quantitation Kit. Im Internet: www.lerner.ccf.org/services/flow/documents/QuantiBritePE.pdf; Stand: 02.05.2017
- 107** BD Biosciences. BD Calibrite™ Beads. Im Internet: www.bdbiosciences.com/ds/is/tds/23-3172.pdf; Stand: 02.05.2017
- 108** Nakos G, Malamou-Mitsi VD, Lachana A, Karassavoglou A, Kitsioulis E, Agnandi N, Lekka ME. Immunoparalysis in patients with severe trauma and the effect of inhaled interferon-gamma. *Critical Care Medicine* 2002; 30 (7): 1488–1494

- 109** Cheadle WG, Hershman MJ, Wellhausen SR, Polk HC, JR. HLA-DR antigen expression on peripheral blood monocytes correlates with surgical infection. *Am J Surg* 1991; 161 (6): 639–645
- 110** Lukaszewicz A, Faivre V, Payen D. Is monocyte HLA-DR expression monitoring a useful tool to predict the risk of secondary infection? *Minerva Anesthesiol* 2010; 76 (9): 737–743
- 111** Kumpf O, Giamarellos-Bourboulis EJ, Koch A, Hamann L, Mouktaroudi M, Oh D, Latz E, Lorenz E, Schwartz DA, Ferwerda B, Routsis C, Skalioti C, Kullberg B, van der Meer, Jos W M, Schlag PM, Netea MG, Zacharowski K, Schumann RR. Influence of genetic variations in TLR4 and TIRAP/Mal on the course of sepsis and pneumonia and cytokine release: an observational study in three cohorts. *Crit Care* 2010; 14 (3): R103
- 112** Wieland CW, van Lieshout MHP, Hoogendijk AJ, van der Poll T. Host defence during *Klebsiella pneumoniae* relies on haematopoietic-expressed Toll-like receptors 4 and 2. *European Respiratory Journal* 2011; 37 (4): 848–857
- 113** Flier S, Concepcion AN, Versteeg D, Kappen TH, Hoefler IE, Lange DW de, Pasterkamp G, Buhre WF. Monocyte hyporesponsiveness and Toll-like receptor expression profiles in coronary artery bypass grafting and its clinical implications for postoperative inflammatory response and pneumonia: An observational cohort study. *Eur J Anaesthesiol* 2015; 32 (3): 177–188
- 114** Droemann D, Goldmann T, Tiedje T, Zabel P, Dalhoff K, Schaaf B. Toll-like receptor 2 expression is decreased on alveolar macrophages in cigarette smokers and COPD patients. *Respir Res* 2005; 6 (1): 68–76
- 115** Ikushima H, Nishida T, Takeda K, Ito T, Yasuda T, Yano M, Akira S, Matsuda H. Expression of Toll-like receptors 2 and 4 is downregulated after operation. *Surgery* 2004; 135 (4): 376–385
- 116** Justus G. Zytokinsekretion unter kardiochirurgischem Eingriff im Säuglingsalter: Einfluss des Immunstatus auf den postoperativen Verlauf [Dissertation]. Berlin: Medizinische Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin, 2016

- 117** Klava A, Windsor AC, Farmery SM, Woodhouse LF, Reynolds JV, Ramsden CW, Boylston AW, Guillou PJ. Interleukin-10. A role in the development of postoperative immunosuppression. *Arch Surg* 1997; 132 (4): 425–429
- 118** Muehlstedt SG, Richardson CJ, West MA, Lyte M, Rodriguez JL. Cytokines and the pathogenesis of nosocomial pneumonia. *Surgery* 2001; 130 (4): 602–609
- 119** Kinlin LM, Kirchner C, Zhang H, Daley J, Fisman DN. Derivation and Validation of a Clinical Prediction Rule for Nosocomial Pneumonia after Coronary Artery Bypass Graft Surgery. *Clinical Infectious Diseases* 2010; 50 (4): 493–501
- 120** Vamvakas EC. Pneumonia as a complication of blood product transfusion in the critically ill: transfusion-related immunomodulation (TRIM). *Critical Care Medicine* 2006; 34 (5 Suppl): S151-9
- 121** Landers DF, Hill GE, Wong KC, Fox IJ. Blood transfusion-induced immunomodulation. *Anesthesia and Analgesia* 1996; 82 (1): 187–204

8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Expression von HLA-DR auf Monozyten, gesamte Patientengruppe47
Abb. 2: Expression von HLA-DR auf Monozyten, Gruppe 1 und Gruppe 248
Abb. 3: Expression von HLA-DR auf AM, gesamte Patientengruppe50
Abb. 4: Expression von HLA-DR auf AM, Gruppe 1 und Gruppe 251
Abb. 5: Expression von Toll-like-Rezeptor 2 auf AM54
Abb. 6: Expression von Toll-like-Rezeptor 4 auf AM55

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Patientencharakteristika.....	41
Tabelle 2: Intraoperative Werte	42
Tabelle 3: Postoperative Werte	43
Tabelle 4: Zelldifferenzierung der Blutproben.....	44
Tabelle 5: Zelldifferenzierung der BAL-Proben.....	45
Tabelle 6: HLA-DR-Expression (Antikörper / Monozyt) auf Monozyten.....	46
Tabelle 7: HLA-DR-Expression (Antikörper / AM) auf Alveolarmakrophagen.....	49
Tabelle 8: TLR2-Expression (Antikörper / AM) auf Alveolarmakrophagen	52
Tabelle 9: TLR4-Expression (Antikörper / AM) auf Alveolarmakrophagen	53
Tabelle 10: Zytokine nach LPS-Stimulation von Monozyten.....	56
Tabelle 11: Zytokine nach LPS-Stimulation von Alveolarmakrophagen	57

10 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Karin Rest, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema ‚Der Einfluss herzchirurgischer Operationen auf die Aktivität von Alveolarmakrophagen und die Entstehung postoperativer Pneumonien‘ 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 (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) 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

Anteilserklärung an erfolgter Publikation

Karin Rest, geb. Thünemann, hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Chalk K, Meisel C, Spies C, Volk T, Thuenemann K, Linneweber J, Wernecke KD, Sander M. Dysfunction of alveolar macrophages after cardiac surgery and postoperative pneumonia? – An observational study. Critical Care 2013; 17 (6): R285.

Beitrag im Einzelnen: Mitwirkung an der Primärdatenerhebung; Entnahme der Blutproben; Durchführung der Proben-Analyse im Labor (Vorbereitung der Proben und Färbung der Zellen für die durchflusszytometrische Messung; Messung und Auswertung der Proben am Durchflusszytometer); Auswertung der Daten.

Datum

Unterschrift

11 Lebenslauf

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

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

12 Publikationsliste

Chalk K, Meisel C, Spies C, Volk T, Thuenemann K, Linneweber J, Wernecke KD, Sander M. Dysfunction of alveolar macrophages after cardiac surgery and postoperative pneumonia? – An observational study. *Critical Care* 2013; 17 (6): R285.

13 Danksagung

Zum Gelingen dieser Arbeit haben viele Personen beigetragen, bei denen ich mich an dieser Stelle bedanken möchte. Für die Überlassung des Dissertationsthemas und für die hervorragende Betreuung der vorliegenden Arbeit danke ich Prof. Dr. med. Michael Sander, Direktor der Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin des Universitätsklinikums Gießen, und Prof. Dr. med. Claudia Spies, Direktorin der Klinik für Anästhesiologie mit Schwerpunkt operative Intensivmedizin der Charité - Universitätsmedizin Berlin. Für die herausragende Betreuung möchte ich mich insbesondere bedanken bei Dr. med. Katharina Chalk, Fachärztin an der Klinik für Anästhesiologie mit Schwerpunkt operative Intensivmedizin der Charité - Universitätsmedizin Berlin, die mit ihren zahlreichen wertvollen Anregungen wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Besonderer Dank gebührt des Weiteren Dr. med. Christian Meisel, Leitung Autoimmundiagnostik, Labor Berlin, und Prof. Dr. Klaus-Dieter Wernecke, Geschäftsführer der Sostana GmbH. Weiterhin bedanke ich mich bei dem ärztlich und pflegerisch tätigen Personal der Klinik für Anästhesiologie mit Schwerpunkt operative Intensivmedizin am Campus Charité Mitte, das die Durchführung der Studie freundlich unterstützte. Ebenso bedanke ich mich bei dem Personal der Klinik für Kardiovaskuläre Chirurgie. Nicht zuletzt möchte ich den Patienten danken, die uns die Durchführung der Studie erst ermöglicht haben.

Diese Doktorarbeit möchte ich Daniela Bayer widmen, die viel zu früh verstorben ist. Sie unterstütze uns als Medizinisch-technische Assistentin maßgeblich bei der Durchführung der Studie.