

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

DISSERTATION

Einfluss einer Therapie mit GM-CSF auf die Konzentrationen von
IL-17 produzierenden Th17-Zellen und regulatorischen T-Zellen bei
Patienten mit postoperativer Immunsuppression.

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Johannes Kurth

aus Freiberg

Datum der Promotion: 27.02.2015

MEINER FAMILIE

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden bereits in den folgenden Originalarbeiten veröffentlicht:

Kurth J, Lachmann G, Renius M, Wernecke KD, Spies C: Influence of an immunomodulatory treatment on Il-17 producing Th17 cells, regulatory T-cells and the occurrence of infectious diseases in patients with postoperative immunodeficiency: a randomized controlled trial. *Anästh Intensivmed* 53 (Suppl. 5): 512, 2012

Lachmann G, Kurth J, Wernecke KD, Spies C: Relevance of postoperative HLA-DR stimulation on infection parameters, Poster European Students Conference (ESC) Berlin 2012, Posterpreis: Bestes Poster der Kategorie Anästhesie

Lachmann G, Kurth J, Wernecke KD, Spies C: Effect of postoperative stimulation with GM-CSF or Mutagrip on the infection parameters of temperature, WBC, CRP, PCT and IL-6. *Anästh Intensivmed* 53 (Suppl. 5): 531, 2012

Eine vollständige Publikationsliste ist unter 11. Lebenslauf aufgeführt.

Weitere Veröffentlichungen sind geplant nach Erscheinen der Primärpublikation.

Inhalt

1. Zusammenfassung	7
Einleitung	7
Methoden.....	7
Ergebnisse	7
Schlussfolgerung	8
2. Abstract	8
Background	8
Methods.....	8
Results	9
Conclusion.....	9
3. Abkürzungen	10
4. Einleitung	12
4.1 Postoperative Immunreaktion.....	12
4.1.1 Postoperative Monozytenfunktion und HLA-DR Expression.....	13
4.1.2 Postoperative Lymphozytenfunktion	15
4.2 Th17-Zellen	17
4.3 Regulatorische T-Zellen (Treg).....	18
4.4 Granulozyten Monozyten Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF).....	20
5. Fragestellungen	21
6. Methoden.....	22
6.1 Studiendesign.....	22
6.1.1 Patienteneinschluss.....	22
6.1.2 Ausschlusskriterien	24
6.1.3 Randomisierung	24
6.1.4 Behandlungsarme / Prüfmedikamente.....	25
6.2 Klinische Dokumentation	26

6.2.1	Präoperative Visite	26
6.2.2	Operationstag	26
6.2.3	Postoperative Visiten.....	27
6.2.4	Infektionen	27
6.2.5	Patientensicherheit	27
6.3	Laboruntersuchungen	28
6.3.1	Blutentnahme	28
6.3.2	Material	29
6.3.2.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	29
6.3.2.2	Reagenzien.....	30
6.3.2.3	Antikörper	30
6.3.3	Messung der Th17-Zellen	31
6.3.3.1	Isolierung der PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells).....	31
6.3.3.2	Zellzählung	31
6.3.3.3	Kryo-Konservierung	31
6.3.3.4	Stimulation der PBMC.....	32
6.3.3.5	Färbung der Th17-Zellen	32
6.3.4	Messung der regulatorischen T-Zellen.....	33
6.3.5	Durchflusszytometrie	33
6.3.6	Kontrollfärbungen	36
6.3.7	Messung der Konzentrationen von IL-6, IL-10 und TNF α	37
6.3.8	Monozytäre HLA-DR Expression.....	38
6.4	Statistik	39
7.	Ergebnisse	40
7.1	Baseline-Charakteristika.....	40
7.2	Primärer Endpunkt.....	41
7.2.1	Th17-Zellen.....	41

7.2.2	Regulatorische T-Zellen.....	42
7.3	Sekundäre Endpunkte	44
7.3.1	Th17-/Treg- Verhältnis.....	44
7.3.2	Einfluss der Prüfmedikation auf plasmatische Zytokinkonzentrationen.....	46
7.3.2.1	Konzentration von TNF- α	46
7.3.2.2	Konzentration von IL-6.....	48
7.3.2.3	Konzentration von IL-10.....	49
7.3.3	HLA-DR-Expression auf Monozyten	51
7.3.4	Verhalten der T-Zell-Subspezies bei systemischer Inflammation (SIRS)	53
7.3.5	Einfluss der Prüfmedikation auf klinische Endpunkte	53
8.	Diskussion	55
8.1	Ergebnisse.....	55
8.2	Ergebnisse im Literaturvergleich.....	55
8.3	Methoden.....	59
8.4	Limitationen.....	59
8.5	Perspektiven.....	60
9.	Literaturverzeichnis.....	61
10.	Eidesstattliche Versicherung	67
11.	Lebenslauf	68
12.	Danksagung.....	71

1. Zusammenfassung

Einleitung

Die postoperative Komplikationsrate steigt mit patientenbezogenen Eigenschaften und durch extrinsische Faktoren, wie dem Ausmaß und der Dauer der Operation. Gewebsverletzungen führen zu einer komplexen Immunreaktion. Dabei kann zunächst eine pro-inflammatorische Immunantwort beobachtet werden, die anschließend in einer anti-Inflammation mündet. Patienten nach ausgedehnten Eingriffen sind mehrere Wochen hospitalisiert, zum Teil immobil und benötigen oftmals intensivmedizinisches Monitoring. Daraus resultiert ein hohes Risiko für postoperative Komplikationen, das durch eine Immundysfunktion zusätzlich erhöht wird. Ein Zusammenhang zwischen Gewebsdefekten und lymphozytären Funktionsstörungen konnte in Studien gezeigt werden, sowie, dass ein Missverhältnis zwischen T-Helferzellen mit einer erhöhten Infektionsrate einhergeht. Unlängst wurde die klassische Einteilung der Helferzellen um die regulatorischen T-Zellen (Treg) und die Th17-Zellen erweitert. Der Effekt einer Therapie mit GM-CSF auf diese Zellen ist Primärziel dieser Arbeit.

Methoden

Untersucht wurden Patienten im Rahmen einer randomisierten kontrollierten Studie, die sich elektiv einer Pankreas- oder Ösophagusresektion unterzogen. Haupteinschlusskriterium war eine HLA-DR-Expression am ersten postoperativen Tag (POD1) von weniger als 10000 Antigenen pro Monozyt. Am Operationstag (OD) sowie an POD1-5 wurden die Anteile der Th17-Zellen und Treg ermittelt. Die Dokumentation erfolgte in einem Studienbogen (CRF) und zur statistischen Auswertung wurde SPSS© Statistics (IBM©) verwendet.

Ergebnisse

Insgesamt wurden 10 Patienten der Interventionsgruppe und 10 Kontrollpatienten untersucht. Hinsichtlich der Baselineparameter wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt. Am POD1 wurde in beiden Gruppen ein Anstieg der Th17-Zellen beobachtet. Eine Tendenz zu erhöhten Th17- und erniedrigten Treg-Zellen an POD2 bei GM-CSF-Patienten im Vergleich zu Placebo war nicht signifikant und auch an den anderen Tagen konnten hierfür keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen nachgewiesen werden. Das Th17-/Treg-Verhältnis war jedoch am POD2 bei der Interventionsgruppe signifikant erhöht ($p=0,041$), was multivariat allerdings nicht bestätigt werden konnte. Die HLA-DR-Expression stieg nach GM-CSF-Gabe im Vergleich zu Placebo an POD2 ($p<0,01$) und fiel ab POD3 wieder ($p<0,01$). Dieses Ergebnis konnte in der multivariaten Analyse bestätigt werden ($p<0,0001$).

Außerdem konnte eine signifikant erhöhte Konzentration von IL-10 ($p=0,01$) nach GM-CSF-Gabe an POD2 gemessen und multivariat bestätigt werden ($p<0,01$). Ein Einfluss der Prüfmedikation auf das Auftreten postoperativer Infektionen oder den Genesungsprozess der Patienten konnte nicht gezeigt werden.

Schlussfolgerung

Die vorliegende Studie zeigte in der univariaten Analyse einen signifikanten Effekt einer Gabe von GM-CSF auf das Th17-/Treg-Verhältnis. Des Weiteren konnte ein signifikanter Einfluss von GM-CSF auf die HLA-DR-Expression und IL-10-Konzentration gezeigt werden, der multivariat bestätigt werden konnte. Um einen Effekt der immunmodulierenden Therapie auch hinsichtlich klinischer Endpunkte näher zu untersuchen, sind weitere Studien erforderlich.

2. Abstract

Background

Postoperative complications are increasing with age and comorbidities. Other aggravating factors are extending of tissue damages and duration of the procedure. Damaging tissue leads to an intricate immune response starting with pro-inflammatory reactions subsequently shifting to anti-inflammation. Following major surgery patients are being hospitalized for several weeks, partially immobilized and require ICU-monitoring. This may lead to an elevated risk for postoperative complications, which is increased by a dysfunctional immune system. Several studies have shown an association between injuries and dysfunctional lymphocytes and there is evidence that an impaired relation within T-helper-cells might increase infection rates. The effect of GM-CSF treatment on Treg and Th-17 cells, which were discovered as new lineages within T-Helper cells, and their reaction to major surgery is not yet fully known and has been investigated in this study.

Methods

All data were acquired in a randomized controlled trial in patients who underwent elective surgery. Main inclusion criterion was an HLA-DR expression lower than 10000 antigens/monocyte on POD1. Th17 and Treg were measured from OD until POD5. Data were documented subsequently in a CRF and analyzed using SPSS© Statistics (IBM©).

Results

10 patients of the intervention group and 10 controls were examined. There were no significant differences concerning baseline parameters. On POD1, an increase of Th17 was found in both groups. An elevation by trend of Th17 and a decrease by trend of Treg in GM-CSF patients on POD2 compared to placebo were found to be not significant. Also on the following days there were no significant differences concerning Th17 and Treg detected. Although according to univariate analysis, on POD2 the Th17/Treg-ratio was significantly raised in interventions compared to placebo ($p=0.041$), the results couldn't be verified multivariately. A significant rise of HLA-DR could be detected in GM-CSF on POD2 compared to placebo ($p<0.01$) which decreased again on POD3 ($p<0.01$). These results were also verified by multivariate testing ($p<0.0001$). Furthermore, a significantly increased concentration of IL-10 in interventions ($p=0.01$) on POD2 was also found in multivariate analyses ($p<0.01$). However, an influence of immunomodulatory treatment on complications upon infections or patient's recovery could not be shown.

Conclusion

Administration of GM-CSF showed a univariate significant impact on the Th17/Treg-ratio. Additionally, significant changes were found in the intervention group concerning the HLA-DR expression and the IL-10 levels, which was multivariately confirmed. To obtain conclusive results on the effect of an immunomodulatory treatment to clinical outcome parameters, further studies are required.

3. Abkürzungen

Abb	Abbildung
Al	Alia (andere)
ALAT	Alanin-Aminotransferase
AMG	Arzneimittelgesetz
ART	Addiction Research Team
ASA	American Society of Anesthesiologists
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
BD	Becton Dickinson
BGA	Blutgasanalyse
BIS	Bispektralindex®
BMI	Body Mass Index
CD	Cluster of Differentiation
CDC	Centers For Disease Control And Prevention
CI	Cardiac index
CO	Cardiac output
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
CRF	Case Report Form
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EudraCT	European Union Drug Regulating Authorities Clinical Trials
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluoresceinisothiocyant
FSC	Forward Scatter, Vorwärtsstreulicht
GM-CSF	Granulozyten Monozyten Kolonie-stimulierender Faktor
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA-DR	Human leukocyte antigen (DR bezeichnet den Genort des Moleküls)
HTN	Hypertonie
ICH	Immunhistochemie
i.v.	Intravenös
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Media

Abkürzungen

ITS	Intensivtherapiestation
KHK	Koronare Herzkrankheit
MAD	Mittlerer arterieller Druck
MANOVA	Multivariate analysis of variance
MANCOVA	Multivariate analysis of covariance
m. S.	Mit Schwerpunkt
NaCl	Natriumchlorid
NAS	Numerische Analogskala
PADS-R	Physical Activity and Disability Survey - Revised
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate Buffered Saline
PMA	Phorbol Myristate Acetate
POD	Postoperative day (postoperativer Tag)
Prof	Professor
RPM	Revolutions Per Minute
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute (Zellkulturmedium)
s.c.	Subkutan
SAE	Serious adverse event
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome
SpO ₂	Partielle Sauerstoffsättigung
Spp	Species pluralis
SSC	Side Scatter, Seitwärtsstreulicht
SUSAR	Serious unexpected suspected adverse reaction
Tab	Tabelle
TH	T-Helferzelle
Treg	Regulatorische T-Zelle
TISS 28	Therapeutic Intervention Scoring System 28
ZVD	Zentraler Venendruck
APC	Antigen presenting cells

4. Einleitung

4.1 Postoperative Immunreaktion

Das Risiko nach einem operativen Eingriff zu versterben ist in Europa höher als bisher erwartet, wie eine aktuelle multizentrische Studie zeigte. In 28 Ländern wurden insgesamt 46539 Patienten untersucht und eine Mortalität in den ersten sieben Tagen nach einer nicht kardiochirurgischen Operation von 4% ermittelt (1). Patienten, die sich umfangreichen operativen Eingriffen unterziehen, haben vor allem in der frühen postoperativen Phase ein großes Risiko für das Auftreten einer Infektion (2). Sepsis, schwere Sepsis und septischer Schock zählen zu den Komplikationen, die nach ausgedehnten Operationen am Häufigsten zum Tod führen (3). Das Risiko, nach elektiven Eingriffen eine Sepsis zu erleiden, steigt mit dem Lebensalter, bei zunehmendem Auftreten von Begleiterkrankungen, sowie bei Patienten männlichen Geschlechts (4),(5),(6),(7). Wichtige extrinsische Faktoren, die zu einer erhöhten postoperativen Komplikationsrate führen, sind das Ausmaß der chirurgischen Verletzung (8) und die Dauer der Operation (3),(7). Zahlreiche Untersuchungen konnten sowohl *in-vitro*, als auch *in-vivo* zeigen, dass Blutverlust sowie große Gewebsdefekte durch Operationen, Verletzungen oder Verbrennungen zu einer komplexen Reaktion des Immunsystems führen. Hierbei kommt es zunächst zu einer starken Entzündungsreaktion (pro-inflammatorische Immunantwort). Klinisch manifestiert sich diese häufig als systemische inflammatorische Entzündungsreaktion (SIRS). Im weiteren Verlauf lässt sich häufig eine paradoxe Reaktion beobachten bei der die akute Entzündungsreaktion gehemmt wird (anti-inflammatorische Immunantwort). In einigen Fällen wurde in diesem Stadium eine fast vollständige Unterdrückung der zellulären Immunantwort beschrieben (Immunparalyse) (9),(10),(11).

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Untersuchungen wurden an Patienten durchgeführt, die sich einer elektiven Pankreas- oder Ösophagusresektion unterzogen haben. Die Pankreaskopfresektion als abdominalchirurgischer Eingriff und die Ösophagusresektion als Thorako-abdomineller Eingriff sind mit langen Operationszeiten, einem erheblichen Gewebsdefekt und oftmals großem Blutverlust verbunden. Die Ösophagusresektion gehört laut einer Untersuchung an der Mayo-Clinic in Rochester, USA zu den Operationen mit der höchsten perioperativen Mortalität (12).

4.1.1 Postoperative Monozytenfunktion und HLA-DR Expression

Monozyten und die sich daraus differenzierenden gewebständigen Makrophagen sind Leukozyten myeloischen Ursprungs (siehe Abb.1).

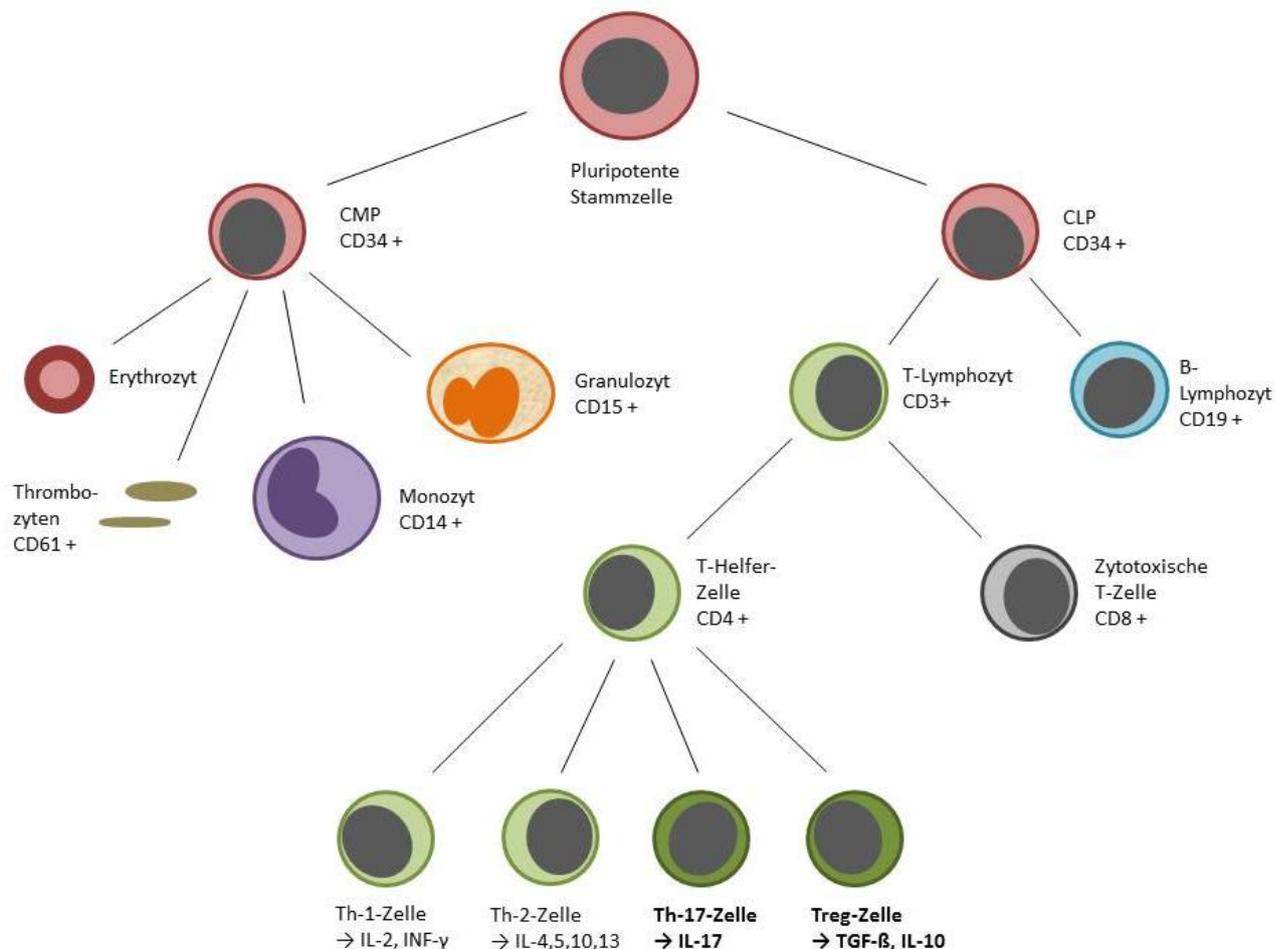


Abbildung 1: Entwicklung von Blutzellen aus einer pluripotenten Stammzelle mit Angabe der spezifischen Oberflächenantigene und Syntheseprodukte.

Sie spielen eine zentrale Rolle bei der Abwehr potentieller Pathogene und stellen eine wichtige Schaltstelle zwischen der angeborenen und der erworbenen Immunität dar, indem sie körperfremdes Material zunächst erkennen und phagozytieren. Die anschließende Präsentation von Fragmenten dieser Antigene auf deren Zelloberfläche bildet die Grundlage für die antigenspezifische T-Zellantwort. Monozyten produzieren darüber hinaus sowohl pro- als auch anti-inflammatorisch wirksame Zytokine. Sie sind dabei direkt durch Antigene und indirekt durch Immunglobuline und Komplement aktivierbar (13). Eine prospektive Studie an 120 Patienten konnte zeigen, dass die Endotoxin-stimulierte monozytäre Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine Interleukin(IL)-1 β , IL-12p40 und Tumornekrosefaktor (TNF) im

postoperativen Verlauf stark abnimmt. Diese Reaktion korrelierte mit einem vermehrten Auftreten von Sepsis. Ein Anstieg von IL-1 β und IL-12p40 im weiteren Verlauf konnte dagegen bei denjenigen Patienten beobachtet werden, die die Sepsis überlebten (14). Ein Abfall der IL-12 Produktion wurde darüber hinaus sowohl im Tiermodell als auch bei Patienten *in vivo* in weiteren Untersuchungen beschrieben (15),(16). Eine gesteigerte IL-1 β Sekretion hingegen, verbunden mit einer gesteigerten Produktion des anti-inflammatorisch wirksamen IL-10 durch Endotoxin-stimulierte Monozyten konnte bereits zuvor in einer Studie an 69 Patienten gezeigt werden (17). Als ausschlaggebend für die unterschiedlichen Beobachtungen der IL-1 β Reaktion werden Unterschiede bei der Schwere der vorangegangenen Operation verantwortlich gemacht (10).

HLA-DR Moleküle sind Rezeptoren auf Zelloberflächen, deren primäre Funktion die Präsentation körperfremder Peptide ist. Die verminderte Expression von HLA-DR Molekülen auf der Zelloberfläche von Monozyten ist bereits in vielen Veröffentlichungen als verlässlicher Marker für die postoperative Immundysfunktion beschrieben worden (18),(19),(20). So konnte weiterhin gezeigt werden, dass die HLA-DR Expression auch mit dem Auftreten postoperativer Komplikationen wie Sepsis und mit dem Outcome der Patienten korreliert (21),(22),(10),(23). Eine aktuelle Untersuchung an 283 Patienten zeigte auch, dass eine langsamere Erholung der HLA-DR Expression mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung sekundärer Infektionen bei Intensivpatienten einhergeht. Nicht zuletzt diese Beobachtung zeigt, dass die verminderte monozytäre HLA-DR Expression einen potentiellen Ansatzpunkt für eine immunmodulierende Therapie darstellt (24). Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde in der hier beschriebenen Studie die HLA-DR Expression auf Monozyten als Parameter zur Detektion einer postoperativen Immundysfunktion herangezogen.

4.1.2 Postoperative Lymphozytenfunktion

Nach Antigenkontakt, Opsonierung und Präsentation durch Monozyten und andere professionell Antigen-präsentierende Zellen (APC) ist die Aktivierung der Lymphozyten essentiell für eine intakte zelluläre Immunantwort (siehe Abb. 2).

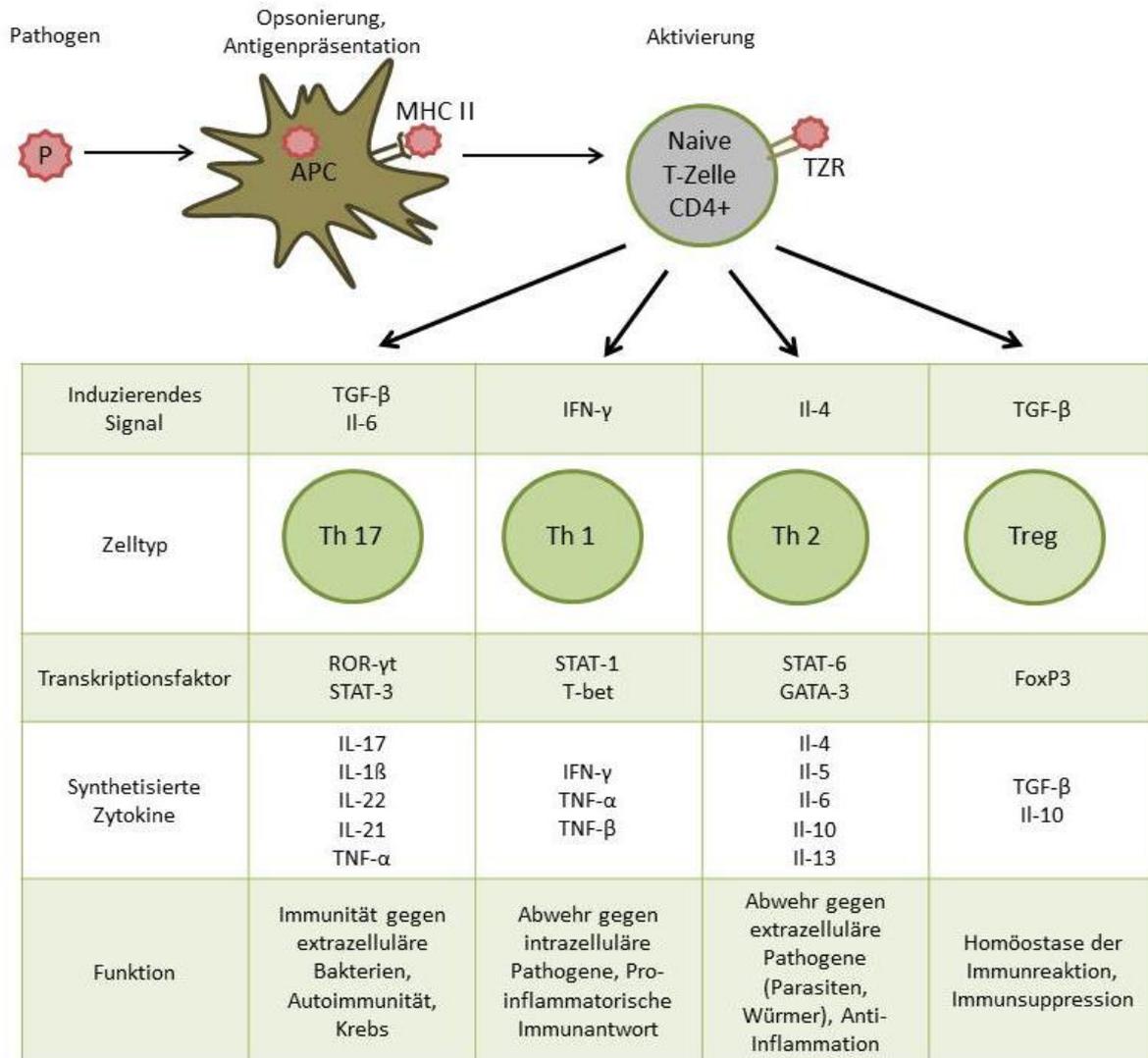


Abbildung 2: Physiologische Reaktion nach Antigenkontakt: Differenzierungsweg und Charakteristika der hier relevanten bekannten T-Helferzell-Subpopulationen (grün, Tabelle) aus einer aktivierten naiven T-Zelle (grau) nach Opsonierung und Präsentation eines Antigens (rot) durch eine aktivierte professionell Antigen präsentierende Zelle (APC, Oliv), Darstellung modifiziert nach Tato et al. (25)

Unlängst zeigten Walz und Kollegen im Tiermodell nach Operationen und Verletzungen mit großen Blutungen eine gestörte Interaktion zwischen T-Lymphozyten und Monozyten und vermuteten an dieser Stelle eine Ursache für Immundysfunktionen nach Verletzungen (26). Schon zuvor deuteten laborexperimentelle und klinische Untersuchungen darauf hin, dass nach Verletzungen, Operationen und Verbrennungen die Lymphozytenantwort nach Aktivierung

durch Mitogene, wie Concanavalin A, beeinträchtigt ist. Dabei steigt der Grad der lymphozytären Funktionsstörung mit zunehmender Komplexität der chirurgischen Eingriffe (10),(27),(28),(29). Die Lymphozyten-Aktivierung in der frühen postoperativen Phase nach großen Eingriffen führt zunächst zu einer vermehrten Proliferation und Funktionssteigerung CD4-positiver T-Helferzellen, während CD8-positive zytotoxische T-Zellen eine verminderte Aktivität zeigen (30). Im weiteren Verlauf zeigt sich allerdings eine Funktionsstörung, sowohl bei den CD4-positiven-, als auch bei den CD8-positiven T-Zellen, was mit einer gesteigerten Infektionsrate assoziiert wird (31),(32),(33). Innerhalb der CD4-positiven Helferzellen ist ein ausgewogenes Verhältnis der potentiell pro-inflammatorischen Zytokine der Th1-Zellen und der anti-inflammatorischen Zytokine der Th2-Zellen wichtig für eine suffiziente Immunantwort. Sowohl im Mausmodell als auch bei Patienten konnte gezeigt werden, dass nach Traumata, Verbrennungen und Blutungen die Produktion entzündlicher Zytokine (IL-2, IFN- γ) von Th1-Zellen supprimiert ist. Eine verminderte Produktion dieser pro-inflammatorischen Zytokine konnte auch für Splenozyten nachgewiesen werden. Dieser Zustand trat frühestens zwei Stunden postoperativ auf und konnte bis zu fünf Tage im postoperativen Verlauf beobachtet werden (29),(34). Anti-inflammatorisch wirksame Zytokine von Th2-Zellen (IL-4, IL-10) werden hingegen vermehrt sezerniert (35),(36),(37). Diese Verlagerung des Th1/Th2 Verhältnisses zugunsten der Th2-Antwort kann eine Immunsuppression zufolge haben. Ishikawa et al. konnten nach abdominalchirurgischen Eingriffen ein signifikant erniedrigtes Th1-/Th2-Verhältnis am zweiten postoperativen Tag im Vergleich zur präoperativen Messung nachweisen. Weiterhin konnten sie einen signifikant niedrigeren Wiederanstieg des Th1-/Th2-Verhältnisses bei Patienten mit postoperativen Komplikationen (Abszesse, Anastomoseninsuffizienzen, Pneumonien) im Vergleich zu Patienten mit komplikationslosem Verlauf zeigen (38). Der Zusammenhang, dass ein Th1-/Th2-Missverhältnis zu einem vermehrten Auftreten von postoperativen Infektionen führt, konnte auch in weiteren Studien belegt werden (36),(39),(40),(41). Darüber hinaus deuten einige Untersuchungen darauf hin, dass auch die Funktion der B-Lymphozyten nach Verletzungen eingeschränkt ist. Es konnte in Mausmodellen gezeigt werden, dass die Produktion von Immunglobulinen nach traumatischen Ereignissen stark eingeschränkt ist. Dieser Mechanismus kann ebenfalls zu einer postoperativen Immundysfunktion beitragen (42),(43).

4.2 Th17-Zellen

Naive CD4-positive Lymphozyten differenzieren sich nach deren Aktivierung in verschiedene T-Helferzell-Subpopulationen. Dabei ist jede Subpopulation durch charakteristische Oberflächenmoleküle, Zytokinprofile und biologische Funktionen gekennzeichnet (Abb. 1,2).

Im Jahre 2000 beschrieben Carmen Infante-Duarte und Kollegen erstmals sowohl bei Mäusen als auch beim Menschen T-Helferzellen, die ein Zytokin produzierten, welches weder den Th1- noch den Th2-Zellen zugeordnet werden konnte. Die Arbeitsgruppe stimulierte murine und humane Zellen mit IL-12 oder Lysaten von *Borrelia burgdorferi*. Mittels Durchflusszytometrie wurde vor allem bei den mit Borrelien stimulierten Zellen eine vermehrte Expression des Zytokins IL-17, sowie von GM-CSF und TNF- α beschrieben. Aufgrund der Ko-Expression dieser pro-inflammatorischen Zytokine vermuteten die Autoren, eine wichtige Schaltstelle zur infektionsvermittelten Immundysfunktion identifiziert zu haben (44). Oppmann et al. beschrieben im selben Jahr erstmals ein weiteres Zytokin, IL-23, das von aktivierten professionell Antigen-präsentierenden Zellen (APC) gebildet wird (45). Sie zeigten, dass IL-23 für die Bildung der gleichen bis dahin unbekanntes IL-17 produzierenden T-Zell Population benötigt wird. Nach dem für den Zelltyp spezifischen IL-17 erfolgte schließlich auch die Namensgebung in Th17-Zellen, die seither die klassische Einteilung der T-Helferzellen in Th1- und Th2-Zellen ergänzen (46). Th17-Zellen unterscheiden sich jedoch nicht nur durch die unterschiedlichen Zytokinprofile von den Th1- und Th2-Zellen, sondern auch durch unterschiedliche Signalmoleküle, die zur Differenzierung von naiven CD4-positiven Zellen zur jeweiligen Effektorzelle führen. Während die Bildung von Th1-Zellen unter dem Einfluss von IFN- γ erfolgt und die Entwicklung von Th2-Zellen durch IL-4 angeregt wird, zeigt sich keine vermehrte Differenzierung von Th17-Zellen unter Anwesenheit dieser Zytokine. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass IL-23, TGF- β und IL-6 die Bildung von Th17- nicht aber von Th1- und Th2-Zellen stimulieren. Auch findet die Entwicklung der Th17-Zellen unabhängig von den Transkriptionsfaktoren der Th1- und Th2-Zellen statt (47). Als entscheidender Transkriptionsfaktor für die Entwicklung von Th17-Zellen konnte in diesem Zusammenhang ROR- γ t (retinoic acid-related orphan Rezeptor) identifiziert werden (48).

Zusätzlich zu IL-17 produzieren Th17-Zellen weitere Zytokine mit pro-inflammatorischer Wirkung, wie IL-17F, IL-21, IL-22 und IL-6. Mit Hilfe dieser Zytokine unterstützen Th17-Zellen die Rekrutierung und Funktion neutrophiler Granulozyten, zytotoxischer T-Zellen und B-Lymphozyten. Die Bildung weiterer pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine sowie die Bildung von Prostaglandinen und Stickstoffmonoxid werden ebenfalls durch Th17-Zellen induziert. Weiterhin wird die Bildung von Akut-Phase-Proteinen in der Leber und von β -

Defensinen in Epithelzellen stimuliert (49). Die oben genannten Reaktionen lassen auf eine wichtige Rolle der Th17-Zellen bei der Abwehrreaktion von Krankheitserregern schließen (siehe Abb. 2). Allerdings ist noch nicht vollständig geklärt, welche Krankheitserreger vorrangig von Th17-Zellen bekämpft werden, denn eine Stimulation der Th17-Antwort konnte für eine heterogene Gruppe von Pathogenen nachgewiesen werden. Zuletzt wiesen Miller und Kollegen auf eine große Bedeutung der Th17-Zellen und von IL-17 bei der Abwehr kutaner Staphylokokkus-aureus-Infektionen hin (50). Insbesondere bei Patienten mit einer genetischen Störung der Th17-Antwort wurden vermehrt Staphylokokken-Infektionen von Schleimhäuten und der Lunge festgestellt.(51) Aber auch für gram-negative Bakterien, wie *Citrobacter rodentium* (52), *Klebsiella pneumoniae* (53), *Bacteroides* spp. (54) und *Borrelia* spp. (44), sowie für *Mycobacterium tuberculosis* (55) und Pilze, wie *Candida albicans* (56), konnte in Studien eine Th17-stimulierende Wirkung gezeigt werden.

Th17-Zellen scheinen jedoch auch eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie von Autoimmunkrankheiten zu spielen (57). So konnten erhöhte Th17 Konzentrationen bei Patienten mit rheumatoider Arthritis (58), multipler Sklerose (59), Psoriasis (60) und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (61) gemessen werden. In Mausmodellen konnten außerdem protektive Effekte niedriger Th17-Konzentration für die Entwicklung von experimenteller Autoimmun-Enzephalomyelitis und kollagen-induzierter Arthritis festgestellt werden (62). Es wird vermutet, dass vor allem die Dysregulation des Zusammenspiels von Th17-Zellen und Th1-Zellen auslösend für Gewebsreaktionen im Rahmen von autoentzündlichen Prozessen sein kann (49).

4.3 Regulatorische T-Zellen (Treg)

Die Treg-Zellen bilden eine T-Zelllinie, die ebenfalls die Familie der T-Helfer-Zellen ergänzt und eine wichtige Schaltstelle im Regelkreis der Immunantwort darstellt. Mittlerweile sind mehrere Subtypen entdeckt worden. Hier soll der Fokus auf den natürlichen Treg-Zellen liegen, die im Knochenmark aus Vorläufern gebildet werden und im Thymus reifen. Regulatorische T-Zellen exprimieren CD25 auf ihrer Zelloberfläche, während keine oder kaum CD127-Moleküle nachweisbar sind. Die Kombination dieser beiden Eigenschaften ist für diesen Zelltyp spezifisch und damit zur durchflusszytometrischen Quantifizierung geeignet (63),(64). Eine weitere Möglichkeit zur Identifizierung dieser Zellen ist die Bestimmung des spezifischen Transkriptionsfaktors FoxP3 (65). Treg-Zellen spielen einerseits eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung der Toleranz gegen körpereigene Antigene und kontrollieren andererseits die Immunantwort gegen körperfremde Antigene (66). So führt ihre Abwesenheit zu einer Vielzahl

von Erkrankungen. In diesem Zusammenhang konnte der genetisch bedingte Defekt von FoxP3 mit dem seltenen IPEX-Syndrom (immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome) beim Menschen in Verbindung gebracht werden (67). Außerdem haben regulatorische T-Zellen einen wichtigen Einfluss auf die Abwehr von Infektionserkrankungen sowohl viralen als auch bakteriellen und parasitären Ursprungs. Hierbei scheinen sie das Zusammenspiel von pro- und anti-inflammatorischer Antwort zu steuern. Im Initialstadium von Infektionen, bei der Rekrutierung immunkompetenter Zellen und bei der Bildung von Gedächtniszellen sind vor allem pro-inflammatorische Wirkungen beschrieben, während im Stadium der aktiven Abwehr die anti-inflammatorische Wirkung vor einer überschießenden Reaktion mit Gewebsdefekten schützt. Somit kann eine Dysfunktion einerseits in Hyperinflammation als auch in Immunsuppression mit Exazerbation der Infektion resultieren (68),(69),(70). In diesem Zusammenhang wird auch eine Rolle bei der Entstehung von Allergien und asthmatischen Erkrankungen diskutiert (71),(72). Aber auch bei Sepsis und septischem Schock konnte ein Anstieg der Treg beobachtet werden (73),(74). Monneret et al. zeigten einen signifikant höheren Anteil der Treg bei Patienten, die nach einem septischen Schock nicht überlebten (23). Wichtig für die Abwehr extrazellulärer Pathogene ist insbesondere auch das Verhältnis von Th17-Zellen zu Treg-Zellen, da ein Missverhältnis zugunsten der Th17-Zellen in Pro-Inflammation und zugunsten der Treg-Zellen in Anti-Inflammation resultiert. Bettelli et al. publizierten hierbei erstmals in *Nature* einen interessanten Zusammenhang, demzufolge es für beide Spezies eine reziproke Reaktion auf induzierende Signale gibt. Während unter dem Einfluss des Akut-Phase Proteins IL-6 die Differenzierung naiver T-Zellen zu regulatorischen T-Zellen gestoppt wird, induziert dieses Zytokin die Bildung von Th17-Zellen. Im Gegensatz dazu ist für die Ausdifferenzierung beider Zelltypen TGF- β notwendig (siehe Abb.2) (75). Darüber hinaus konnte ein stimulierender Effekt von TNF- α auf natürliche Treg-Zellen nachgewiesen werden (76).

Weitere Erkrankungen, die auf dem Boden einer Funktionsstörung der regulatorischen T-Zellen entstehen können, sind chronisch entzündliche Darmerkrankungen, Allergien, Asthma, multiple Sklerose und Diabetes mellitus Typ 1 (77),(78),(79),(80),(81),(82),(83).

4.4 Granulozyten Monozyten Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF)

Humanes GM-CSF kommt im menschlichen Organismus als monomeres Eiweißmolekül vor, welches in der aktiven Form aus 127 Aminosäuren besteht. Das Molekulargewicht differiert je nach Grad der Glykolysierung zwischen 14 kDa und 35 kDa. GM-CSF besitzt zwei Glykolysierungsstellen, wobei die vollständig glykolysierte Form *in vivo* eine höhere biologische Aktivität aufweist. Sezerniert wird dieses Protein von Makrophagen und T-Lymphozyten, sowie von anderen Zelltypen wie Endothelzellen und Fibroblasten nach Aktivierung durch TNF- α , TNF- β , IFN- γ , IL-1 und IL-2. GM-CSF Rezeptoren finden sich auf der Oberfläche von myeloischen Stammzellen und Endothelzellen. Eine Expression auf lymphatischen Zellen konnte bislang nicht nachgewiesen werden (84),(85). GM-CSF stimuliert beim Menschen die Differenzierung, das Wachstum und das Überleben hämatopoetischer Stammzellen und induziert damit die Bildung von Monozyten/Makrophagen, Granulozyten und dendritischen Zellen. Außerdem hat GM-CSF einen aktivierenden Effekt auf Megakaryozyten und Vorläuferzellen der Erythropoese. Bei Primaten konnte zudem ein stimulierender Effekt auf Lymphozyten festgestellt werden. Des Weiteren verstärkt es die Aktivität reifer neutrophiler Granulozyten, Makrophagen und dendritischer Zellen im Rahmen entzündlicher Geschehen. Dabei stimuliert es in erster Linie chemotaktische Prozesse und die Phagozytose körperfremden Materials. Es konnten darüber hinaus synergistische Effekte mit IL-1 und IL-3 beobachtet werden, sowie eine vermehrte Freisetzung von Leukotrien C4 und Histamin aus basophilen Granulozyten (86),(87). Im Mausmodell erhobene Daten deuten außerdem daraufhin, dass ein intaktes Zusammenspiel von GM-CSF mit IFN- γ essentiell für die Abwehr von Infektionen, Entzündungsgeschehen und Krebserkrankungen ist (88). Ebenfalls im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass GM-CSF nach Gewebsdefekten über die Aktivierung Antigen-präsentierender Zellen Einfluss auf die Homöostase der T-Helferzellen nimmt, wobei die Anwesenheit von GM-CSF bei Kontakt von Makrophagen mit apoptotischen oder nekrotischen Zellen zu einem Anstieg der regulatorischen T-Zellen, der Th17-Zellen und der Th1-Zellen führt (89).

5. Fragestellungen

Das primäre Endziel dieser Untersuchung ist die Frage, ob bei immunsupprimierten Patienten eine Therapie mit GM-CSF im Vergleich zu Placebo einen Einfluss auf den Anteil der IL-17 produzierenden Th17-Zellen und der regulatorischen T-Zellen an den CD4-positiven Zellen hat.

Zu den sekundären Endzielen zählt die Frage, ob die Gabe von GM-CSF versus Placebo einen Einfluss auf das Verhältnis von Th17-Zellen zu regulatorischen T-Zellen hat und ob es Unterschiede innerhalb der Plasmakonzentrationen der Zytokine IL-6, IL-10 und TNF- α zwischen den Gruppen gibt. Weitere Sekundärziele waren die Fragen, ob es Unterschiede bei den klinischen Endpunkten zwischen den Gruppen gibt, wie sich die untersuchten T-Zell-Subpopulationen bei Patienten mit systemisch inflammatorischer Immunreaktion (SIRS) verhalten und wie sich der Verlauf der HLA-DR-Expression auf Monozyten als Einschlusskriterium für die Studie darstellt.

6. Methoden

Alle hier publizierten Daten wurden im Rahmen der Studie „Einfluss einer postoperativen Vakzination oder Gabe von GM-CSF bei immunsupprimierten Patienten nach Pankreas- oder Ösophagusresektion auf den Verlauf einer Immunsuppression und die postoperative Infektionsrate.“ (Kurztitel: ART VI, EudraCT-Nummer.: 2007-003111-31) an der Klinik für Anästhesiologie mit Schwerpunkt operative Intensivmedizin der Charité - Universitätsmedizin Berlin erhoben. Hauptsponsor der Studie ist die Charité - Universitätsmedizin Berlin, vertreten durch Hauptprüferin und medizinische Expertin der klinischen Studie Prof. Dr. med. Claudia Spies. Die klinische Prüfung erfolgte nach positivem Ethikvotum im Zeitraum vom 26.10.2008 bis zum 16.04.2011 (first patient first visit – last patient last visit).

6.1 Studiendesign

Die ART VI Studie war eine monozentrische Pilotstudie, die nach den Vorgaben des Arzneimittelgesetzes, randomisiert, kontrolliert, doppelblind, prospektiv im Double-Dummy-Design durchgeführt wurde.

6.1.1 Patienteneinschluss

Das Patientenkollektiv setzte sich aus Frauen und Männern ab einem Lebensalter von mindestens 18 Jahren zusammen, die sich zu einer elektiven Pankreas- oder Ösophagusresektion vorstellten. Die Patienten mussten bereits präoperativ durch den Prüfarzt über die Studieninhalte aufgeklärt werden und eine schriftliche Einwilligungserklärung nach AMG §40 (1) 3b unterzeichnen. Haupteinschlusskriterium war die HLA-DR Expression auf Monozyten von maximal 10000 Antigenen pro Monozyt am POD1. Sowohl Ein- als auch Ausschlusskriterien wurden im Prüfplan der ART VI Studie definiert. In einem Zeitraum vom 01.10.2008 bis zum 31.03.2011 wurden insgesamt 319 Patienten für die Teilnahme an der ART-VI Studie evaluiert. 256 Patienten wurden nicht eingeschlossen, da sie entweder Ausschlusskriterien aufwiesen, nicht in die Studienteilnahme einwilligten, am ersten POD1 eine HLA-DR-Expression von >10000 Antigenen pro Monozyt aufwiesen oder aus sonstigen Gründen von der klinischen Prüfung ausgeschlossen wurden. Insgesamt wurden schließlich 63 Patienten in die ART-VI Studie eingeschlossen.

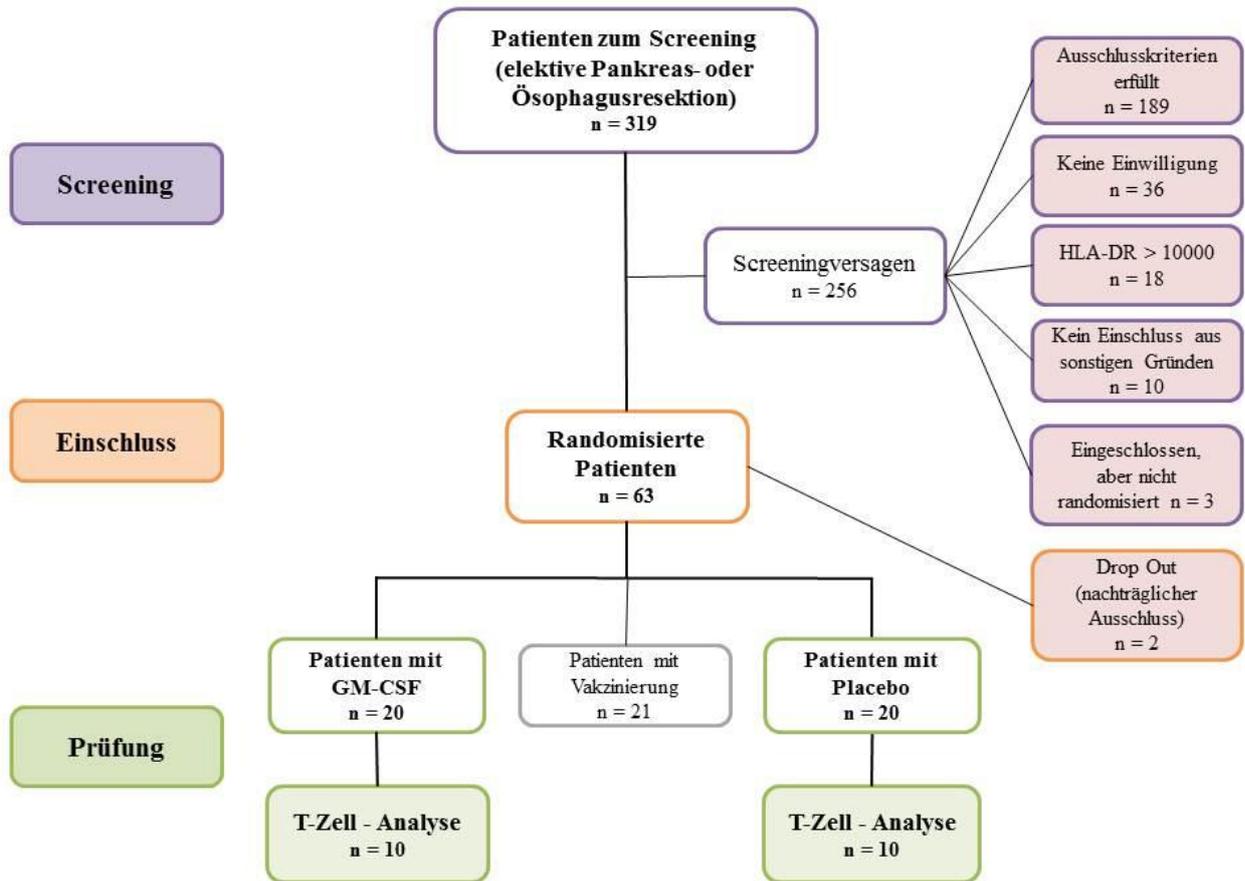


Abbildung 3: Einschlussbaum der ART VI Studie, angelehnt an die Empfehlungen der CONSORT-Group 2010 (90)

Von diesen Patienten beendeten zwei als Drop out die Studienteilnahme vorzeitig, da bei einem Patienten versehentlich das Notfallkuvert geöffnet wurde (vorzeitige Entblindung) und ein anderer Patient am ersten Tag nach der Operation verstarb, wobei ein Zusammenhang zur Prüfmedikation ausgeschlossen wurde. Bei 20 von den 63 eingeschlossenen Patienten wurden die für die vorliegende Arbeit relevanten Daten erhoben (s. Abb.3). Diese teilten sich wie folgt in die Behandlungsarme auf (Tab.1).

Tabelle 1: Studienpopulation

Randomisierungsgruppe	Prüfmedikament	Anzahl der Patienten
Interventionsgruppe	GM-CSF	10
Kontrollgruppe	Placebo	10

6.1.2 Ausschlusskriterien

Von der Studie ausgeschlossen waren Patienten, die bereits an einer anderen Arzneimittelstudie teilnahmen. Gleiches galt für Mitarbeiter der Charité oder nach AMG § 40 (1) 4 für Patienten, die zum Einschlusszeitpunkt auf gerichtliche oder behördliche Anordnung in einer Anstalt untergebracht waren. Die schriftliche Einwilligungserklärung zur Studienteilnahme musste zeitgerecht vorliegen und die Probanden mussten sich zur Speicherung und Weitergabe pseudonymisierter Krankheitsdaten bereit erklären.

Schwangere Frauen, beziehungsweise Frauen mit positivem β -HCG Test im Urin bei der Screening Untersuchung wurden von der Teilnahme ausgeschlossen. Ebenso wie Frauen im gebärfähigen Alter, die keine hocheffektive Kontrazeption mit einem Pearl Index < 1 durchführten und Frauen, die sich in der Stillzeit befanden. Erkrankungen, die zum Ausschluss führten sind Leukämie, andere angeborene oder erworbene Bluterkrankungen, Hepatitis B-, C-, oder HIV-Infektionen, andere Infektionen, wenn diese während der letzten sieben Tage präoperativ aufgetreten waren, Autoimmunerkrankungen, instabile Angina pectoris, nicht therapierte Herzrhythmusstörungen, symptomatische angeborene Herzfehler, Thrombosen oder thrombembolische Ereignisse in der klinischen Vorgeschichte. Folgende präoperativ erhobenen Laborparameter galten im angegebenen Grenzbereich ebenfalls als Ausschlusskriterium:

- Thrombozyten $\leq 100.000/\mu\text{l}$
- Neutrophile $\leq 1.500/\mu\text{l}$
- Hämoglobin $\leq 8\text{g/dl}$
- Bilirubin $> 2\text{g/dl}$
- Kreatinin $> 1,5\text{g/dl}$
- ASAT/ALAT $> 90\text{U/l}$.

Die Patienten mussten außerdem ein Körpergewicht von mehr als 50 Kilogramm vorweisen und durften bis zu vier Wochen vor Einschluss keine immunsuppressiven Medikamente eingenommen haben. Bekannte Allergien oder Überempfindlichkeiten auf einen der arzneilich wirksamen oder sonstigen Bestandteile der genannten Prüfpräparate führten ebenfalls zum Ausschluss von der Studienteilnahme.

6.1.3 Randomisierung

Die Patienten wurden den vorgesehenen Behandlungsarmen randomisiert zugeordnet. Bei Aufnahme wurde jedem Patienten durch die Klinikapotheke der Charité Universitätsmedizin Berlin eine laufende Patienten-Nummer (Randomisierungsnummer) zugewiesen. Dabei wurde außerdem eine Stratifizierung in Bezug auf Alter und Art der Operation vorgenommen. Die

Zuordnung zu einer der drei Behandlungsarmen erfolgte ebenfalls durch die Apotheke. Die Randomisierungsliste war bis zum Abschluss der klinischen Prüfung weder dem behandelnden Arzt noch dem Patienten zugänglich (doppelte Verblindung). Auch die Etikettierung und Verblindung der Studienmedikation wurde durch die Apotheke vorgenommen. Der Verpackung der Studienmedikation und der Galenik der Medikamente waren keine Informationen über die Art des enthaltenen Wirkstoffs zu entnehmen (Double-Dummy-Technik).

Der Prüfarzt erhielt pro Patient ein verschlossenes Notfallkuvert, um bei dem Verdacht auf schwerwiegende Nebenwirkungen (SAE, SUSAR) das applizierte Medikament zuordnen zu können.

6.1.4 Behandlungsarme / Prüfmedikamente

Als Prüfmedikamente kamen rekombinant aus Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*) hergestelltes humanes GM-CSF (rhuGM-CSF, Sargramostim, Leukine®, Bayer Health Care™) und der saisonale Grippeimpfstoff (Mutagrip®, Sanofi Pasteur MSD GmbH) zum Einsatz. Als Placebo wurde isotonische Kochsalzlösung der Firma B. Braun Melsungen AG (154 mmol/l NaCl, Wasser für Injektionszwecke) verwendet. Die Studienpopulation wurde in drei Behandlungsarme aufgeteilt (siehe Abb. 4). Die Patienten eines Behandlungsarmes erhielten einmal täglich 0,5 ml Mutagrip® subkutan (s.c.) sowie 24 ml Placebo (Isotone Kochsalzlösung / NaCl 0,9 %, Braun™) kontinuierlich über 24 h (1 ml/h) intravenös (i.v.). Die Patienten eines weiteren Behandlungsarmes erhielten 250 µg/m² Sargramostim i.v. in 24 ml kontinuierlich über 24 h und 0,5 ml Placebo s.c.. Die Kontrollgruppe erhielt über beide Applikationsformen Placebo (Isotone Kochsalzlösung / NaCl 0,9 %, Braun™). Jeder eingeschlossene Patient erhielt am ersten postoperativen Tag die Prüfmedikation. Am zweiten und dritten postoperativen Tag wurde ebenfalls Prüfmedikation verabreicht, sofern auch an diesen Tagen eine HLA-DR Konzentration von weniger als 10000 Molekülen pro Monozyt nachgewiesen wurde. Für die vorliegende Arbeit wurden lediglich die Patienten aus dem GM-CSF-Behandlungsarm und aus der Kontrollgruppe berücksichtigt.

6.2 Klinische Dokumentation

Während des gesamten Zeitraumes der Studienteilnahme erfolgte die stationäre Behandlung der Patienten auf chirurgischen Normalstationen oder operativen Intensivüberwachungsstationen am Campus Virchow-Klinikum der Charité - Universitätsmedizin Berlin. Die operative und stationäre Versorgung der Patienten orientierte sich dabei an den Standards der chirurgischen und anästhesiologischen Kliniken oben genannter Einrichtung. Die im Rahmen der ART VI Studie durchgeführten Untersuchungen wurden zusätzlich durchgeführt. Die dabei erhobenen Daten wurden prospektiv und pseudonymisiert in einem patienteneigenen Prüfbogen (CRF) dokumentiert.

6.2.1 Präoperative Visite

In Frage kommende Studienpatienten wurden in der Prämedikationsambulanz der Klinik für Anästhesiologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin rekrutiert. Falls ein prinzipielles Interesse zur Studienteilnahme bestand, wurde der Patient durch Studienpersonal über Studienziel, Studienablauf sowie über Risiken und Nebenwirkungen der Prüfpräparate aufgeklärt. Jeder Patient erhielt ein schriftliches Einwilligungensformular, das nach entsprechender Bedenkzeit bis zum Tag der Operation selbstständig ausgefüllt werden musste. Außerdem erfolgte neben einer ausführlichen Anamnese eine körperliche Untersuchung mit Fokus auf dem Vorliegen von Ausschlusskriterien zur Studienteilnahme.

6.2.2 Operationstag

Am Operationstermin erhielt jeder Patient eine Blutentnahme zur Bestimmung verschiedener immunologischer Parameter (siehe Kapitel 4.3 Laboruntersuchungen) zusätzlich zur klinischen Routinediagnostik. Die Narkosevorbereitung, -einleitung, -ausleitung, das intraoperative Management und die eventuelle Nachsorge im Aufwachraum erfolgte nach den Standards der Klinik für Anästhesiologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin. Während der gesamten Dauer des Eingriffs wurden unerwünschte Ereignisse und folgende Parameter durch das Studienpersonal dokumentiert:

- Arterieller Blutdruck (systolisch, diastolisch, MAD), Herzfrequenz
- Zentralvenöser Druck (ZVD), Erweitertes hämodynamisches Monitoring (CO, CI)
- Bispektralindex® (BIS)
- SpO₂, Beatmungsparameter, Arterielle und zentralvenöse Blutgasanalysen (BGA)
- Körpertemperatur
- Blutverlust (Gewicht von Bauchtüchern + abgesaugtes Volumen – Spülvolumen)

6.2.3 Postoperative Visiten

Die erste postoperative Visite fand am ersten Tag nach der Operation statt. Danach wurde jeder Patient täglich bis zum POD9 durch das Studienpersonal visitiert. Bei jeder Visite wurden die Vitalparameter gemessen und eine körperliche Untersuchung durchgeführt. In den ersten fünf postoperativen Tagen erhielten die Patienten wie auch am Operationstag eine zusätzliche Blutentnahme (siehe Kapitel 4.3 Laboruntersuchungen). Die Abschlussuntersuchung wurde am POD9 durchgeführt.

Am POD1 und gegebenenfalls am POD2 und -3 erfolgte die Applikation des jeweiligen Prüfpräparats. Alle erhobenen Daten wurden während der Visite im CRF dokumentiert. Abb. 4 zeigt schematisch den chronologischen Ablauf der Studie.

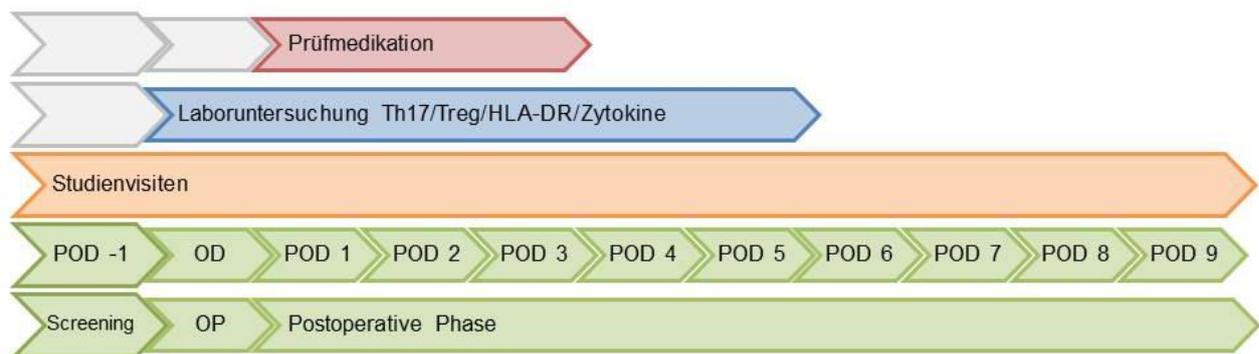


Abbildung 4: Fließschema der ART VI-Studie

6.2.4 Infektionen

Ein besonderer Fokus der klinischen Untersuchung durch das Studienpersonal lag auf der Detektion von postoperativen Infektionen und postoperativem SIRS. Direkt im Anschluss an die täglichen Visiten wurden die erhobenen Daten sowie Befunde der klinischen Routine, wie Labordiagnostik und radiologische Untersuchungen, ausgewertet, um Infektionen zu diagnostizieren. Dabei wurden die Kriterien des *Center for Disease Control* (CDC) zur Erkennung nosokomialer Infektionen in der für Deutschland herausgegebenen Fassung des Nationalen Referenzzentrums für die Surveillance von nosokomialen Infektionen und dem Robert Koch Institut herangezogen.

6.2.5 Patientensicherheit

Unerwünschte Ereignisse (AE, SAE) wurden während der Studienvisiten erfasst, dokumentiert und auf einen Zusammenhang zur Prüfmedikation geprüft. SAE wurden innerhalb von 24 h der Vertreterin des Hauptsponsors gemeldet.

Bestand der Verdacht auf das Vorliegen eines SUSAR, so wurde dies zusätzlich dem Paul-Ehrlich-Institut und der zuständigen Ethikkommission gemeldet. Ein vorzeitiger Abbruch der Studie für einzelne Patienten war jederzeit aus folgenden Gründen möglich:

- Widerruf der Einwilligung
- Jede andere Situation, bei der nach Ansicht des Prüfarztes eine weitere Teilnahme an der klinischen Prüfung nicht im besten Interesse des Patienten gestanden hätte
- Nachträgliches Auftreten eines Ausschlusskriteriums
- Signifikante Protokollverletzungen
- Schwere Krankheitserscheinungen insofern nicht eine andere Ursache als die Prüfmedikation erkannt wurde und die Entblindung des verabreichten Studienmedikamentes notwendig war, eine ab diesem Zeitpunkt vorgesehene Gabe von Studienmedikamenten für den Patienten von Nachteil gewesen wäre oder der Patient auf andere Art und Weise bezüglich der Krankheitserscheinungen und ihrer Behandlung von einem Studienabbruch profitiert hätte.

Folgende Umstände waren im Prüfplan als Begründung für einen vorzeitigen Abbruch der gesamten Studie vorgesehen:

- Medizinische oder ethische Gründe, die die Fortsetzung der Studie gefährden
- Entscheidung der Studienleitung bei unvermeidbaren Risiken und Toxizität
- Deutliche Häufung von schweren Krankheitserscheinungen, die einen Studienabbruch bei den Patienten notwendig machen
- Unzureichende Rekrutierungsrate
- Neue wissenschaftliche Erkenntnisse während der Laufzeit der klinischen Prüfung, die die Sicherheit der Studienteilnehmer als gefährdet erscheinen lassen.

6.3 Laboruntersuchungen

6.3.1 Blutentnahme

Die zusätzlich zur klinischen Routinediagnostik benötigten Blutproben wurden durch Studienpersonal der ART VI Studie aus peripher- oder zentralvenösem Blut gewonnen. Die erste Blutentnahme fand jeweils am OD, die letzte am POD5 statt. Um einer Beeinflussung der Ergebnisse durch Einflüsse der zirkadianen Rhythmik zu entgehen, erfolgten alle Blutentnahmen in einem Zeitraum zwischen 06:00 Uhr und 06:30 Uhr morgens. Die Laboruntersuchungen zur Bestimmung der Th17-Zellen und der regulatorischen T-Zellen erfolgte durch das Studienpersonal stets unmittelbar im Anschluss an die Blutentnahme.

6.3.2 Material

6.3.2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Geräte / Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Eppendorf epT.I.P.S., verschiedene Größen	Sarstedt AG & Co., Nürnbergrecht
Einmal-Untersuchungshandschuhe, Latex	Charité Berlin, Made in Malaysia
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Brutschrank, CO ₂ -Incubator	SANYO, Japan
Lichtmikroskop, Type 090/131001	Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar
Neubauer-Zählkammer	Schott, Jena
Pipettierhilfe	IBS Integra, Schweiz
Research Pipetten, verschiedene Größen	Eppendorf, Hamburg
Mischer (Vortex Genie 2)	Scientific Industries, Darmstadt
Multipipette plus	Eppendorf, Hamburg
Pasteur Pipetten	Brand GmbH & Co, Wertheim
Pipetten, steril	Sarstedt AG&Co., Nürnbergrecht
FACSCanto II flow cytometer	BD Biosciences Deutschland, Heidelberg
Centrifuge 5415 R, mit Kühlfunktion	Eppendorf, Hamburg
Centrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg
Centrifuge 5804	Eppendorf, Hamburg
Herasafe Sterilbank	Heraeus Instruments, Deutschland
FALCON Multiwell, 24 well	BD Labware, USA
FALCON 5ml Polystyrene Round Bottom Tube	BD Biosciences Discovery Labware, USA
FALCON Serological Pipet, sterile 10 ml	BD Biosciences Discovery Labware, USA
FALCON Röhrchen mit Schraubverschluss steril, 15 ml und 50 ml	BD Biosciences Discovery Labware, USA
Flächendesinfektionsmittel Descosept	Dr. Schumacher GmbH, Melsungen
1°C Freezing Container	NALGENE, USA

6.3.2.2 Reagenzien

Geräte / Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Phosphate Buffered Saline (PBS), Dulbecco's, without Ca&Mg	PAA Laboratories GmbH Pasching, Österreich
Phorbol Myristate Acetate (PMA)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Iscove's Modified Dulbecco's Media (IMDM)	Gibco invitrogen, Karlsruhe
Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) , [+] L-Glutamine	Gibco invitrogen, Karlsruhe
Fetal Calf Serum (FCS)	Biochrom AG, Berlin
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
BioColl isotonic separating solution, Density 1,077g/ml	Biochrom AG, Berlin
Aqua dest	Braun, Melsungen
Perm/Wash Lösung	BD Biosciences Deutschland, Heidelberg
Ionomycin	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol unvergällt	Merck, Darmstadt
FACS Puffer	BD Biosciences Deutschland, Heidelberg
FACS Clean	BD Biosciences Deutschland, Heidelberg
FACS shutdown solution	BD Biosciences Deutschland, Heidelberg
FACS Flow	BD Biosciences Deutschland, Heidelberg
FACS Lysing solution	BD Biosciences Deutschland, Heidelberg
Cytofix/Cytoperm™ Plus Fixation	BD Biosciences Deutschland, Heidelberg
Permeabilization Kit with GolgiStop™	BD Biosciences Deutschland, Heidelberg

6.3.2.3 Antikörper

Antikörper	Hersteller
Pacific Blue mouse anti human CD3	BD Biosciences Deutschland, Heidelberg
APC mouse anti human CD8	BD Biosciences Deutschland, Heidelberg
PE mouse anti human IL-17A	BD Biosciences Deutschland, Heidelberg
FITC mouse anti human IFN gamma	BD Biosciences Deutschland, Heidelberg
PE isotyp mouse IgG1	BD Biosciences Deutschland, Heidelberg
FITC isotyp mouse IgG1	BD Biosciences Deutschland, Heidelberg

6.3.3 Messung der Th17-Zellen

Zur Quantifizierung der Th17-Zellen wurden 18 ml Citrat-Vollblut verwendet. Die Bestimmung der Th17-Zellen erfolgte im Forschungslabor am Campus Virchow-Klinikum der Klinik für Anästhesiologie m. S. operative Intensivmedizin der Charité - Universitätsmedizin Berlin.

6.3.3.1 Isolierung der PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells)

Durch Zugabe von isotoner Natriumcitratlösung (3,8 %) wurde das Blut gerinnungsgehemmt. Aus Citrat-Vollblut wurden im ersten Schritt periphere mononukleäre Zellen (PBMC) isoliert. PBMCs beinhalten vor allem B- und T-Lymphozyten, Monozyten, natürliche Killerzellen (NK-Zellen), und Thrombozyten. Sie können mittels Dichtegradientenzentrifugation unter Zugabe von Biocoll (Ficoll), einem Zellseparationsmedium, von den übrigen zellulären Bestandteilen getrennt werden. Das synthetische Polysaccharid Biocoll ist ein neutrales, stark verzweigtes Polymer aus Saccharose-Monomeren. Die Biocoll Trennlösung hat mit 1,077 g/ml eine größere Dichte als Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten. Die Dichte ist jedoch geringer als die von Erythrozyten, Granulozyten und toten Zellen, die bei der Zentrifugation am Gefäßboden sedimentieren. Zur Gewinnung der PBMCs wurde das Citrat-Vollblut 1:1 mit phosphate buffered saline (PBS) in einem 50 ml Falcon-Röhrchen verdünnt. Anschließend wurden in drei Röhrchen je 3 ml Biocoll vorgelegt, mit 9 ml des verdünnten Blutes vorsichtig überschichtet und für 20 min in der Heraeus Multifuge (Model 3L-R, Thermo Electron) bei 800 g und Raumtemperatur (RT), Bremse 1 zentrifugiert. Monozyten und Lymphozyten sammeln sich aufgrund ihres geringen Gewichts in der Interphase zwischen Medium und Plasma, welche mit einer Pasteurpipette abgenommen und in ein neues 50 ml Falcon-Röhrchen überführt wurde. Die PBMCs wurden anschließend zweimal mit PBS gewaschen und in 1 ml PBS resuspendiert.

6.3.3.2 Zellzählung

10 µl der PBMC Zellsuspension wurden mit 190µl Essigsäure (3%) verdünnt und gründlich gemischt. Danach erfolgte das Auszählen der Zellen mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer unter dem Lichtmikroskop. Es wurden vier Quadranten der Zählkammer ausgezählt, deren Mittelwert gebildet und dieser mit dem Verdünnungsfaktor 20 sowie dem Dimensionsfaktor 1000 multipliziert, um die Anzahl der Zellen pro ml Zellsuspension zu berechnen.

6.3.3.3 Kryo-Konservierung

Das Einfrieren der PBMCs als Rückstellprobe erfolgte in Aliquotes zu je 5×10^6 Zellen/ml. Dazu wurden die gewaschenen PBMCs für 5 min bei 300 g und 4 °C in der vorgekühlten Tischzentrifuge (Model 5417 R, Eppendorf) zentrifugiert und das Zellsediment in 0,5 ml Iscove's

Modified Dulbecco's Media (IMDM) resuspendiert. Nachfolgend wurden 0,5 ml gekühltes Einfriermedium, bestehend aus einer 1:4-Verdünnung von Dimethylsulfoxid (DMSO) mit fötalem Kälberserum (FKS), vorsichtig hinzu gegeben, um die zellschädigende Bildung intrazellulärer Eiskristalle beim Einfriervorgang zu verhindern. Die Zellsuspension wurde in auf Eis gelagerte Kryoröhrchen überführt und zunächst in Einfrierbehälter mit Isopropanol bei -80°C eingefroren. Nach drei Tagen wurden die Proben in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt.

6.3.3.4 Stimulation der PBMC

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in IMDM mit einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml in einer 24-Well Zellkulturplatte bei 37°C und 5 % CO_2 für 2 h. Hiernach wurden die Zellen mit 25 ng/ml Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) und 500 ng/ml Ionomycin stimuliert. PMA simuliert hierbei eine T-Zellrezeptor- (TCR) Stimulation durch Aktivierung des Signaltransduktionsweges des TCR und Ionomycin führt zur Aktivierung der Proteinkinase C und der intrazellulären Calciumfreisetzung. Dadurch werden die T-Zellen aktiviert und zur Zytokinproduktion angeregt. Dabei handelt es sich um eine rezeptorunabhängige Stimulation. Um zu verhindern, dass es zur Sekretion von Zytokinen über die Zellmembran kommt und um eine Anreicherung aller Zytokine in der Zelle zu erreichen, wurde den Zellen Golgi-Stop (Monensin) zugesetzt und für weitere 2 h inkubiert.

6.3.3.5 Färbung der Th17-Zellen

Es wurden 1×10^6 der PBMCs in 100 μL FACS Puffer resuspendiert und für die Oberflächenfärbung mit 3 μL des Antikörpers CD3 Pacific Blue und 5 μL CD8 APC für 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Dies wurde durch die Zugabe von 0,5 ml FACS-Fix/Perm Solution und einer Inkubation von 10 min im Dunkeln erreicht. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 200 g wurden die sedimentierten Zellen mit 1 ml FACSTM-Perm/Wash Lösung resuspendiert und für 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Hierauf folgte eine weitere Zentrifugation und ein weiterer Waschschrift mit 100 μL FACSTM-Perm/Wash Lösung. Danach wurden den Zellen zur intrazellulären Färbung von IL-17 20 μL IL-17 PE und 1 μL IFN- γ FITC zugegeben und nach sorgfältigem Mischen für 30 min im Dunkeln bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit FACSTM-Perm/Wash gewaschen, in 200 μL FACS-Puffer resuspendiert und im Durchflusszytometer gemessen.

6.3.4 Messung der regulatorischen T-Zellen

Die Bestimmung der regulatorischen T-Zellen erfolgte aus EDTA-Vollblut, wobei hier keine Stimulation oder Permeabilisierung der Zellen nötig war, da nur Oberflächenantigene gefärbt wurden. Zu 50 µl Vollblut wurden 15,5 µl eines Antikörpergemisches, bestehend aus 10 µl CD4 PerCP, 2,5 µl CD25 APC, 1,25 µl CD127 PE und 1,5 µl CD3 Pacific Blue, hinzugefügt. Nach sorgfältigem Mischen erfolgte eine 20 minütige Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln. Hiernach erfolgte eine Zugabe von 1 ml BDTM Lyse-Lösung und eine weitere 10 minütige Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln. Anschließend wurde für 5 min bei 200 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, 1 ml FACSTM Puffer hinzugegeben und erneut für 5 min bei 200 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde einmal wiederholt, die Zellen in 100 µl FACS Puffer resuspendiert und im Durchflusszytometer analysiert.

6.3.5 Durchflusszytometrie

Die durchflusszytometrischen Analysen der Th17-Zellen und der regulatorischen T-Zellen erfolgten am FACSTMCanto II Durchflusszytometer unter Verwendung der Software BD-FACSTMDiva (Version 6.1.1) der Firma BD Biosciences. Die Abkürzung FACS steht für Fluorescence Activated Cell Sorting. Demnach passieren bei der FACS-Messung native oder gefärbte Zellen in einem hydrodynamisch fokussierten Flüssigkeitsstrom zwei Laser, einen Argon- (488nm) und einen Diodenlaser (635nm). Der Lichtstrahl wird durch die Zellen in der Zellsuspension gestreut, was mittels Detektoren nachgewiesen wird. Mit Hilfe des Vorwärtsstreulichts (forward scatter, FSC) kann man dabei Informationen über die Größe der Zelle und mit dem Seitwärtsstreulicht (side scatter, SSC) Informationen über die Granularität der Zelle gewinnen. (Abb. 5)

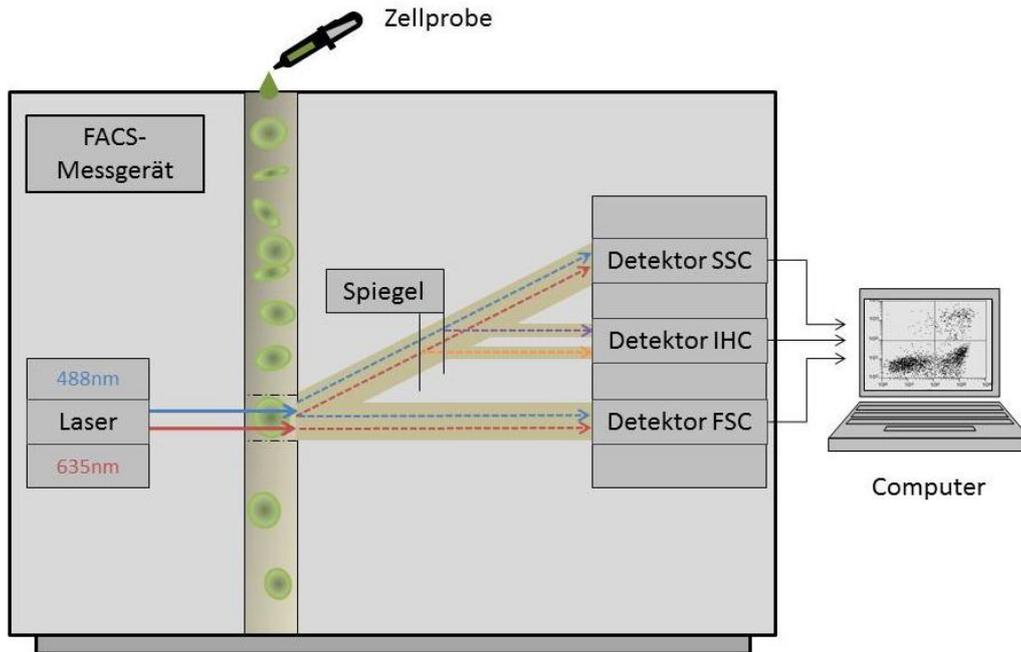


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Analyse einer Zellsuspension am Durchflusszytometer. Im FSC wird dabei die Zellgröße und im SSC die Granularität erfasst. Spezielle Detektoren messen zusätzlich die Emission der durch Laser in unterschiedlichen Wellenlängen angeregten Farbsignale (IHC)

Weiterhin können Fluorochrom-gekoppelte Antikörper verwendet werden, die meist gegen bestimmte Oberflächenproteine gerichtet sind. Potentielle Zielstrukturen für extrazelluläre Färbungen sind Oberflächenmoleküle (CD= Cluster of differentiation) und bei intrazellulärer Färbung die produzierten Zytokine (Abb. 1).

T-Helferzellen exprimieren auf ihrer Oberfläche CD4 und werden in diesem Zusammenhang auch als CD4+ Zellen bezeichnet. Im Gegensatz zu den CD8+ zytotoxischen T-Zellen exprimieren sie keine CD8 Moleküle. CD4 ist der Ligand von MHC-II (HLA-DR) und CD8 Ligand von MHC-I Molekülen. Da es durch die oben beschriebene Stimulation der Th17-Zellen zu einer Degradierung der CD-4 Moleküle kommen kann, erfolgte der Nachweis von T-Helferzellen über CD8-Moleküle. Um die Th-17-Zellen zu quantifizieren, wurde demnach mit Hilfe der Oberflächenfärbung zunächst der Anteil der CD3 positiven und CD8 negativen (entspricht dem Anteil der CD4 positiven Zellen) T-Helferzellen unter den Lymphozyten berechnet. Anschließend wurde der Anteil IL-17 produzierender Zellen in dieser T-Helfer Zell-Population ermittelt, welcher der Konzentration der Th-17 Zellen entspricht (siehe Abb. 6).

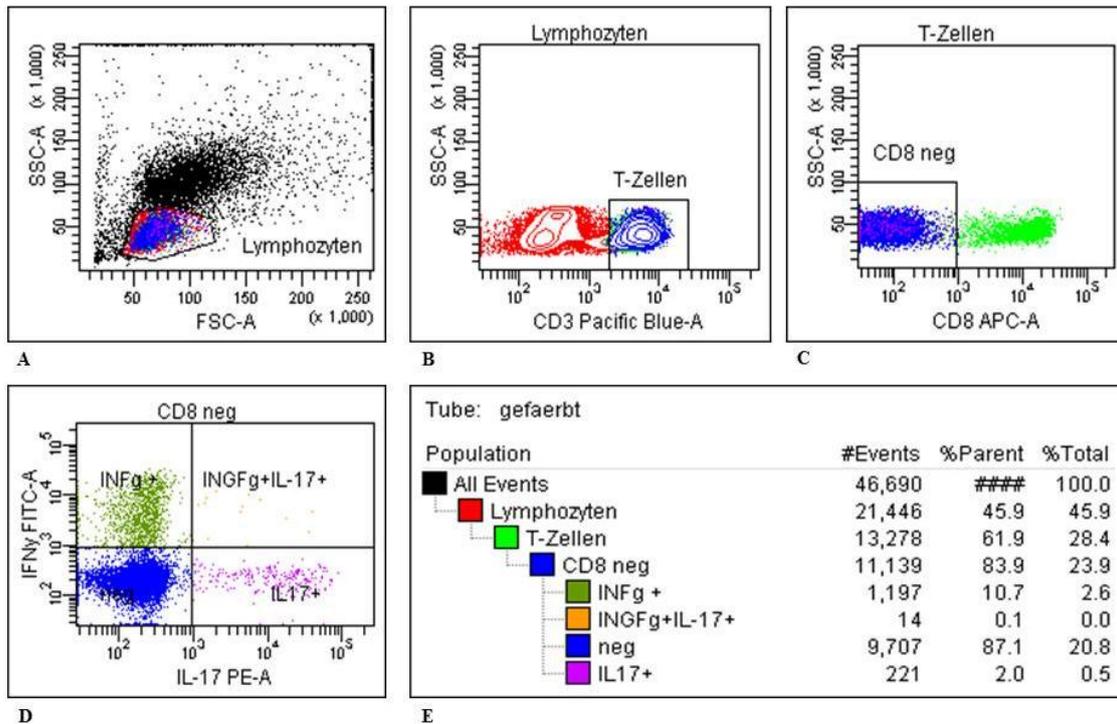


Abbildung 6: Beispiel einer FACS-Messung der Th17-Zellen eines Studienpatienten: in A sind die durch Größe und Granularität ermittelten Lymphozyten markiert, B zeigt die CD3 positiven T-Zellen, in C sind die CD8 negativen T-Helferzellen markiert, D repräsentiert im rechten unteren Bereich die IL-17 positiven Th17-Zellen, E zeigt die Aufschlüsselung der Farbkodierung und den Anteil der einzelnen Zellpopulationen dieser Messung; die Achsen sind mit ssc, fsc und/oder den entsprechenden markierten Antikörpern beschriftet.

Zur Quantifizierung der regulatorischen T-Zellen wurden zunächst die Oberflächenmoleküle CD3 und CD4 angefärbt, um den Anteil der T-Helferzellen zu bestimmen. Um die Tregs zu bestimmen, wurde anschließend von dieser Population der Anteil an Zellen berechnet, bei dem viel CD25 Antigene und wenig CD127 Antigene angefärbt werden konnten. (Abb.7)

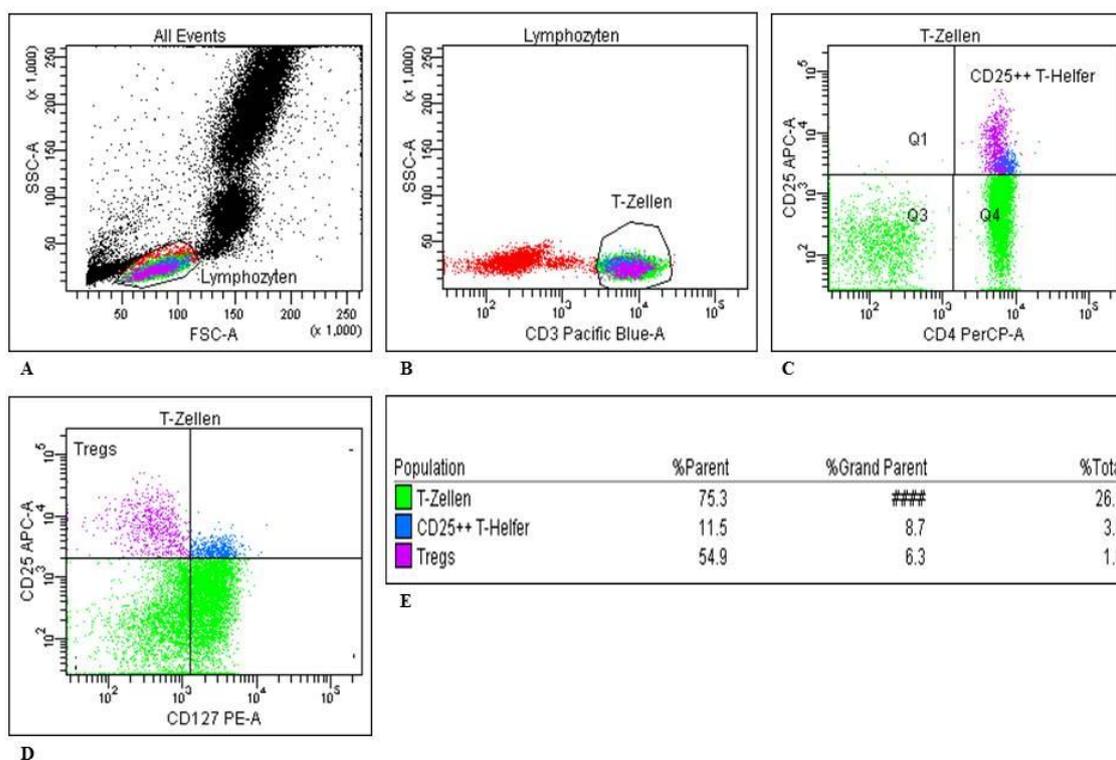


Abbildung 7: Beispiel einer FACS-Messung der Treg eines Studienpatienten: in A sind die durch Größe und Granularität ermittelten Lymphozyten markiert, B zeigt die CD3 positiven T-Zellen, in C sind die CD4 positiven T-Helferzellen markiert, C zeigt den Anteil der CD-25 stark positiven T-Helferzellen, D repräsentiert im linken oberen Bereich die Treg, E zeigt die Aufschlüsselung der Farbkodierung und die Konzentrationen der einzelnen Zellpopulationen dieser Messung; die Achsen sind mit ssc, fsc und/oder den entsprechenden markierten Antikörpern beschriftet.

6.3.6 Kontrollfärbungen

Um sicherzustellen, dass die verwendeten Antikörper nicht unspezifisch binden, wurden regelmäßig Isotopenkontrollen mitgeführt. Die eingesetzten FITC-, PE-konjugierten Isotypen-Kontrollen (IG61 PE und IG61 FITC) wurden in der gleichen Konzentration verwendet und entsprechen demselben Immunglobulin-Isotyp wie der spezifische Antikörper, binden aber nicht spezifisch an humane Antigene. Des Weiteren wurde parallel eine Kontrollmessung durchgeführt, bei der nicht intrazellulär gefärbt wurde. Damit wurde ausgeschlossen, dass durch Eigenfluoreszenz der Zellen falsch positive Ergebnissen gemessen werden. (siehe Abb. 8)

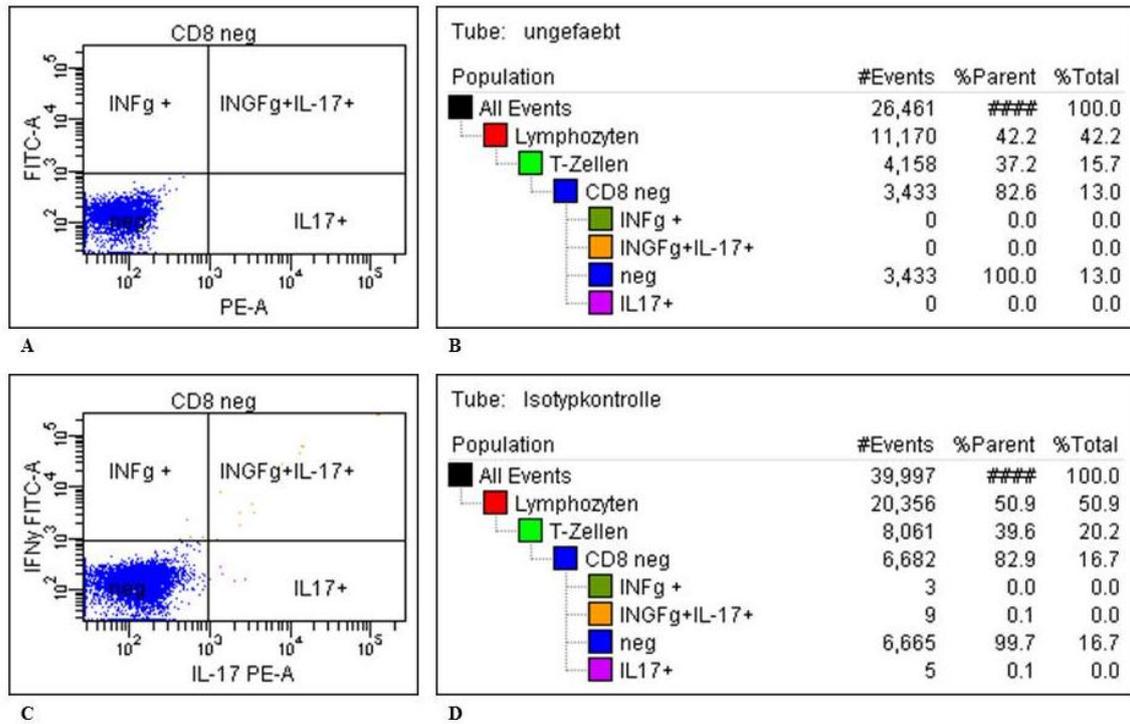


Abbildung 8: Kontrollen: Kontrollmessungen des gleichen Patientenbeispiels wie Abb.7: A und B zeigen eine Messung ohne intrazelluläre Färbung, C und D zeigen die Isotypenkontrolle

6.3.7 Messung der Konzentrationen von IL-6, IL-10 und TNF α

Die Messung der Konzentrationen von IL-6, IL-10 und TNF α wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Immunologie, Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Mitte durch MTA durchgeführt und wird an dieser Stelle nur überblickend erläutert. Für die Bestimmung der Zytokinkonzentrationen wurden den Blutproben Heparin (IL-10, TNF α) oder EDTA (IL-6) zur Antikoagulation hinzugefügt. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (2000 g, RT, 10 min) und bis zur Messung bei -86°C aufbewahrt. Für die quantitative Bestimmung der Zytokinkonzentrationen wurde der semi-automatische Chemilumineszenz-Immunoassay Immulite® der Firma Siemens Medical Solutions, Bad Nauheim, Deutschland verwendet. Die Quantifizierung folgte dabei dem Prinzip der Sandwich-Elisa-Methode mit einem Festphasen- Chemiluminiszenz- Assay. Das Blut wurde zunächst in Röhrchen überführt, die beschichtete Polyester-Kugeln Kugeln enthielten. Diese mit monoklonalen Antikörpern beschichteten Kugeln dienten als feste Phase und banden die Epitope der zu bestimmenden Zytokine. Anschließend wurde ein Gemisch aus polyklonalen enzymbehafteten Antikörpern zugegeben. Nach einer zehnmütigen Inkubation erfolgte ein Waschschrift und der nicht gebundene Überstand wurde verworfen.

Zur Messung wurde ein starkes Chemilumineszenzsubstrat zugegeben, dessen Lichtemission direkt proportional zur Konzentration der zu bestimmenden Zytokine ist. Die untere Nachweisgrenze beträgt für TNF α und IL-6 2 pg/ml und für IL-10 5 pg/ml. Der Variationskoeffizient des Immulite®-Assays beträgt weniger als 5 %.

6.3.8 Monozytäre HLA-DR Expression

Die Messung der HLA-DR Expression auf Monozyten wurde ebenfalls in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Immunologie, Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Mitte durchgeführt. Zur Analyse wurde EDTA-Vollblut verwendet. Die Messungen erfolgten stets unmittelbar nach Erhalt der Proben im Anschluss an die Blutentnahme. Zu 50 μ l EDTA-Vollblut wurden in einem Eppendorfgefäß 20 μ l Antikörpermischung (BD Biosciences, San Jose, USA) gegeben. Dieses Antikörpermischung enthielt Anti-CD14 Antikörper, konjugiert mit Peridin-Chlorophyll (PerCP-Cy 5.5) und monoklonalen Anti-HLA-DR Antikörper, konjugiert mit Phycoerythrin. Nach sorgfältigem Mischen erfolgte die Inkubation für 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur. Anschließend wurde erneut gemischt und 500 μ l FACS™ Lyse Lösung hinzugegeben. Die Zellen wurden für weitere 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert und bei 250 g, Bremse 1 für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf ein Restvolumen von 100 μ l abgenommen, zu den Zellen wurde 1 ml gekühlter (4°C) FACS Puffer hinzugegeben, mit 250 g, Bremse 1 für 5 min zentrifugiert und der Überstand erneut bis auf ein Restvolumen von 100 μ l abgenommen.

Die durchflusszytometrische Messung erfolgte dann an einem BD FACS Calibur Flow Cytometer™ der Firma BD Biosciences. Die Monozyten wurden in ihrer Eigenschaft als CD-14 exprimierende Leukozyten mit Hilfe der markierten Anti-CD-14 Antikörper quantifiziert. Die Markierung der HLA-DR Antigene erfolgte mit Anti-HLA-DR Antikörpern, die in einem Verhältnis von 1:1 mit Phycoerythrin Molekülen konjugiert waren. Für die Quantifizierung der HLA-DR-Antikörper und damit der HLA-DR Moleküle pro Monozyt wurden zunächst Eichkurven erzeugt. Dazu wurden Partikel (Quantibrite™ PE Beads, BD Biosciences, San Jose, USA), die mit definierten Mengen von Phycoerythrin konjugiert sind, mit den identischen Geräteeinstellungen wie für die Analyse der Zellen gemessen. Die Berechnung der Antigene pro Monozyt erfolgte mit Hilfe der CellQuest™ Software (BD Biosciences).

6.4 Statistik

Zunächst erfolgte die deskriptive Statistik aller primären und sekundären Zielgrößen. Dabei wurde ebenfalls die Verteilung der Daten auf Normalität hin untersucht. Zur Darstellung aller hier angegebenen kategorialen und nicht normalverteilten Variablen wurden die Medianwerte und die Interquartilsdifferenzen (25., 50. und 75. Perzentile) verwendet. Werte mit mehr als drei Dezimalstellen wurden nach IEEE-754-Standard mathematisch gerundet. Die Auswertung von Häufigkeiten erfolgte aufgrund der geringen Stichprobenumfänge und der unbalancierten Verteilung mittels exaktem Chi-Quadrat-Test oder bei dichotomen Merkmalen mittels exaktem Test nach Fisher. Für die Berechnung der Unterschiede zwischen den Gruppen wurde als nicht-parametrischer Test für unabhängige Stichproben der U-Test nach Mann und Whitney herangezogen. Für klinische Daten, die in einem Zeitverlauf gemessen wurden erfolgte außerdem eine multivariate, zweifaktorielle, nichtparametrische Analyse (MANOVA) für wiederholte Messungen mit der Intervention als unabhängigem Faktor und dem Zeitverlauf als abhängigem Faktor. Dabei wurde getestet, ob es Unterschiede zwischen den Gruppen (über die Zeit), systematische Änderungen in der Zeit (über die Gruppen), Wechselwirkungen zwischen Gruppe und Zeit oder systematische Änderungen in der Zeit für jede Gruppe einzeln gibt. Anschließend erfolgte eine multivariate, zweifaktorielle, nichtparametrische Kovarianzanalyse (MANCOVA) für wiederholte Messungen mit dem jeweiligen Baseline-Wert als Kovariate. Statistische Signifikanz wurde für p-Werte kleiner 0,05 angenommen. Alle hier aufgeführten Ergebnisse sind als Ergebnisse einer explorativen Auswertung zu sehen und wurden nicht durch multiples Testen korrigiert. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software IBM© SPSS© Statistics, Version 19, © Copyright 1989, 2010 SPSS Inc., IBM Company und SAS, Version 9.1, Copyright by SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA.

Für die vorliegende Arbeit wurde des Weiteren eine retrospektive Poweranalyse für die primäre Fragestellung durchgeführt. Die Poweranalyse erfolgte mit Hilfe der Software nQuery Advisor® Release 7.0 der Firma Stat. Solutions Ltd. & South Bank, Crosse's Green, Cork, Ireland. Für die ART-VI-Studie wurde im Vorfeld keine Poweranalyse durchgeführt, da diese als Pilotstudie geplant wurde.

7. Ergebnisse

7.1 Baseline-Charakteristika

Hinsichtlich der Baseline-Parameter wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen festgestellt (Tab. 2). Die Probanden der Studie waren demnach in beiden Gruppen vorwiegend männlich, zwischen 55 und 70 Jahren alt und erhielten zu etwa gleichen Teilen eine Operation an der Speiseröhre oder der Bauchspeicheldrüse.

Tabelle 2: Baseline-Charakteristika: dargestellt sind Medianwerte (25. und 75. Perzentilen) und absolute Häufigkeiten, die Signifikanzniveaus wurden Mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests, des exakten Chi-Quadrat-Tests und des exakten Tests nach Fisher berechnet

Parameter	Interventionsgruppe (n=10)	Kontrollgruppe (n=10)	Signifikanzniveau
Alter [Jahre]	64,0 (54,3-68,5)	61,5 (55,0-69,3)	p=0,791
Geschlecht (weiblich/männlich)	1/9	3/7	p=0,582
Operation (Ösophagus/Pankreas)	4/6	6/4	p=0,656
Operationsdauer [min]	390 (322-449)	360 (304-421)	p=0,733
Intraoperativer Blutverlust [ml]	650 (575-875)	600 (313-950)	p=0,688
BMI [kg/m ²]	25,8 (23,3-28,0)	25,5 (24,2- 27,5)	p=0,880
Gewichtsklassifikation DGE (Normal/Übergewicht/Adipositas)	4/6/0	3/6/1	p=1,000
ASA-Score (1/2/3/4)	0/5/5/0	0/7/3/0	p=0,650
Rauchverhalten (Raucher/Nichtraucher/Nieraucher)	3/6/1	3/4/3	p=0,632
KHK	3	2	p=1,000
Arterielle HTN	6	6	p=1,000
Diabetes mellitus	2	1	p=1,000
COPD	1	1	p=1,000

7.2 Primärer Endpunkt

7.2.1 Th17-Zellen

Die gemessenen Unterschiede bei der Th17-Konzentration zwischen der Interventions- und Kontrollgruppe ergaben in der univariaten Analyse zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede. Allerdings konnten am POD2, nach GM-CSF Gabe in Tendenz erhöhte Th17-Werte im Vergleich zu Placebo gemessen werden ($p=0,05$). In beiden Gruppen konnte ein Anstieg der Th17-Zellen nach der Operation beobachtet werden. In der Kontrollgruppe war dieser zum POD2 wieder rückläufig. Während hier die Th17-Zellkonzentration der Kontrollgruppe im Median unter den präoperativen Wert sank, schien die der Interventionsgruppe weiter anzusteigen (Abb. 9).

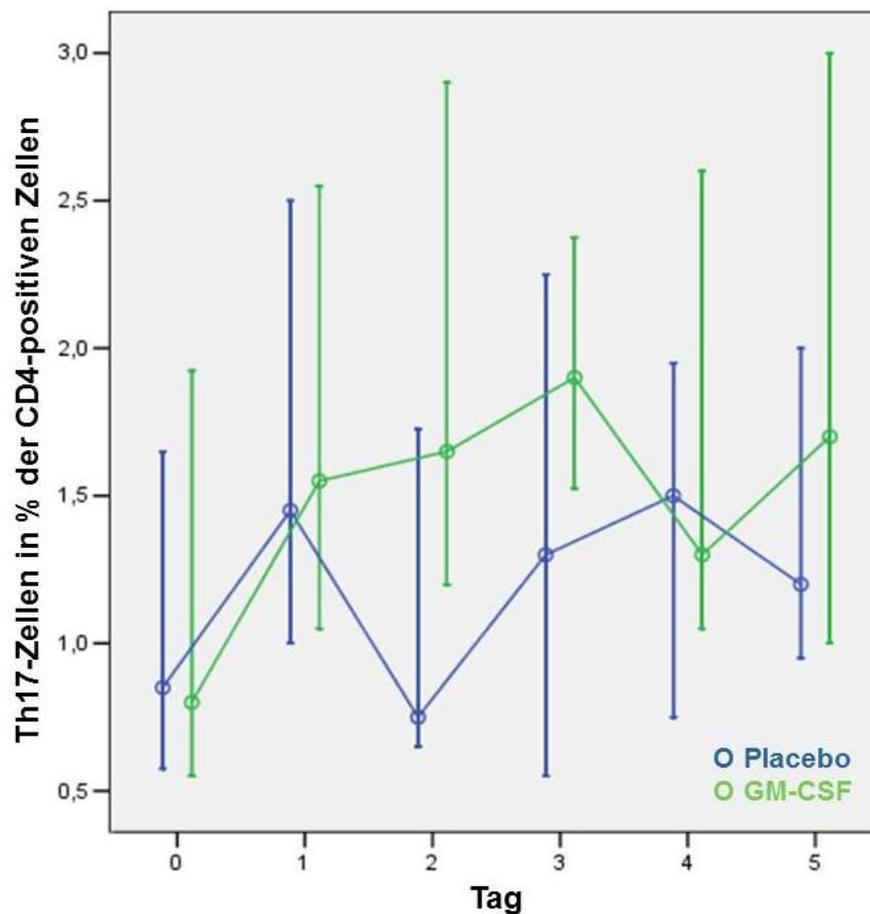


Abbildung 9: Anteil der Th17-Zellen Tag 0 (Operationstag) – Tag 5 (5. Postoperativer Tag, 4. Tag nach Intervention), dargestellt als Mediane (o) und 25. Bzw. 75. Perzentilen (-)

Die jeweiligen Ergebnisse der deskriptiven Statistik und der univariat ermittelten Signifikanzniveaus sind für die einzelnen Tage in Tab. 3 dargestellt.

Tabelle 3: Deskriptive Auswertung der Th17-Zellkonzentrationen in % der CD4-positiven Zellen zu den jeweiligen Messzeitpunkten mit Signifikanzniveaus (Mann-Whitney-U-Test) der Th17-Zellkonzentrationsunterschiede zwischen den Gruppen

Zeitpunkt	Th17 [%CD4-Zellen]	Interventionsgruppe n = 10	Kontrollgruppe n = 10	p-Wert
OD	Median (25.-75. Perzentile)	0.800 (0.550-1.925)	0.850 (0.575-1.650)	0,970
POD 1	Median (25.-75. Perzentile)	1.550 (1.050-2.550)	1.450 (1.000-2.500)	0,970
POD 2	Median (25.-75. Perzentile)	1.650 (1.200-2.900)	0.750 (0.650-1.725)	0,050
POD 3	Median (25.-75. Perzentile)	1.900 (1.525-2.375)	1.300 (0.550-2.250)	0,227
POD 4	Median (25.-75. Perzentile)	1.300 (1.050-2.600)	1.500 (0.750-1.950)	0,479
POD 5	Median (25.-75. Perzentile)	1.700 (1.000-3.000)	1.200 (0.950-2.000)	0,289

In der multivariaten nichtparametrischen Varianzanalyse (MANOVA) und in der Baseline-korrigierten Kovarianzanalyse (MANCOVA) für wiederholte Messungen konnten im gesamten Zeitverlauf (OD - POD 5) ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden ($p=0,226$). Allerdings konnte ein systematischer Einfluss des Zeitpunktes auf die Th17 Zellen gezeigt werden ($p=0,03$), da vom OD bis zum POD1 die Werte stark anstiegen. Die Ergebnisse der multivariaten Analysen für die Th17-Zellen sind in Tab. 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Ergebnisse der multivariaten nichtparametrischen (Ko-)Varianzanalyse (MANOVA/MANCOVA) mit dem Zeitunkt und der Randomisierungsgruppe als Faktoren und der Th17-Zellen als Variable. Kovariate ist der Baselinewert (OD)

Faktor	p-Wert (MANOVA)	p-Wert (MANCOVA)
Randomisierungsgruppe	0,226	0,375
Zeitpunkt	0,027	0,894
Gruppe*Zeitpunkt	0,259	0,444

Die Power, um univariat Unterschiede bei der Konzentration von Th17-Zellen am zweiten postoperativen Tag detektieren zu können, beträgt für den Vergleich der Gruppen GM-CSF versus Placebo 12%.

7.2.2 Regulatorische T-Zellen

Im Gegensatz zur Messung der Th17-Zellen kam es bei der Bestimmung der Treg-Zellen in beiden Gruppen zu keiner relevanten Änderung der Werte am POD1. An den PODs 2-4, also insbesondere ab dem ersten Tag der Prüfmedikamentengabe schienen die Patienten der Interventionsgruppe eine niedrigere Konzentration an regulatorischen T-Zellen als die der Kontrollgruppe aufzuweisen, während sich die Medianwerte am POD5 wieder einander

annäherten. Allerdings waren die Unterschiede in den Konzentrationen der regulatorischen T-Zellen in der univariaten Analyse zu keinem Zeitpunkt der Messung signifikant. (Tab.5, Abb.10) Auch in der multivariaten Varianzanalyse für wiederholte Messungen wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Allerdings konnte hier ein signifikanter systematischer Zeiteinfluss über die Gruppen gemessen werden ($p < 0,001$). Insbesondere bei der Placebogruppe zeigte der zeitliche Verlauf eine systematische Änderung des Anteils der Treg-Zellen ($p = 0,03$), indem vom POD1 die Zellen zum POD2 stark anstiegen. In der Baseline-korrigierten Kovarianzanalyse für wiederholte Messungen konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ($p = 0,036$) festgestellt werden (Tab. 6), was den Einfluss der Baseline-Messung auf die Folgemessungen widerspiegelt.

Tabelle 5: Deskriptive Auswertung der Treg-Konzentrationen in % der CD4-positiven Zellen zu den jeweiligen Messzeitpunkten mit Signifikanzniveaus (Mann-Whitney-U-Test) der T-Reg-Zellkonzentrationsunterschiede zwischen den Gruppen

Zeitpunkt	Treg [%CD4-Zellen]	Interventionsgruppe n = 10	Kontrollgruppe n = 10	p-Wert
OD	Median (25.-75. Perzentile)	5.300 (3.050-7.025)	5.550 (4.800-6.050)	0,940
POD 1	Median (25.-75. Perzentile)	5.600 (3.225-7.625)	5.700 (4.950-8.350)	0,579
POD 2	Median (25.-75. Perzentile)	6.050 (4.525-7.750)	7.850 (5.050-8.600)	0,273
POD 3	Median (25.-75. Perzentile)	5.650 (4.725-7.225)	8.050 (5.975-8.925)	0,140
POD 4	Median (25.-75. Perzentile)	5.200 (4.450-7.350)	7.200 (5.625-9.050)	0,130
POD 5	Median (25.-75. Perzentile)	5.650 (4.575-8.000)	6.100 (5.800-10.050)	0,287

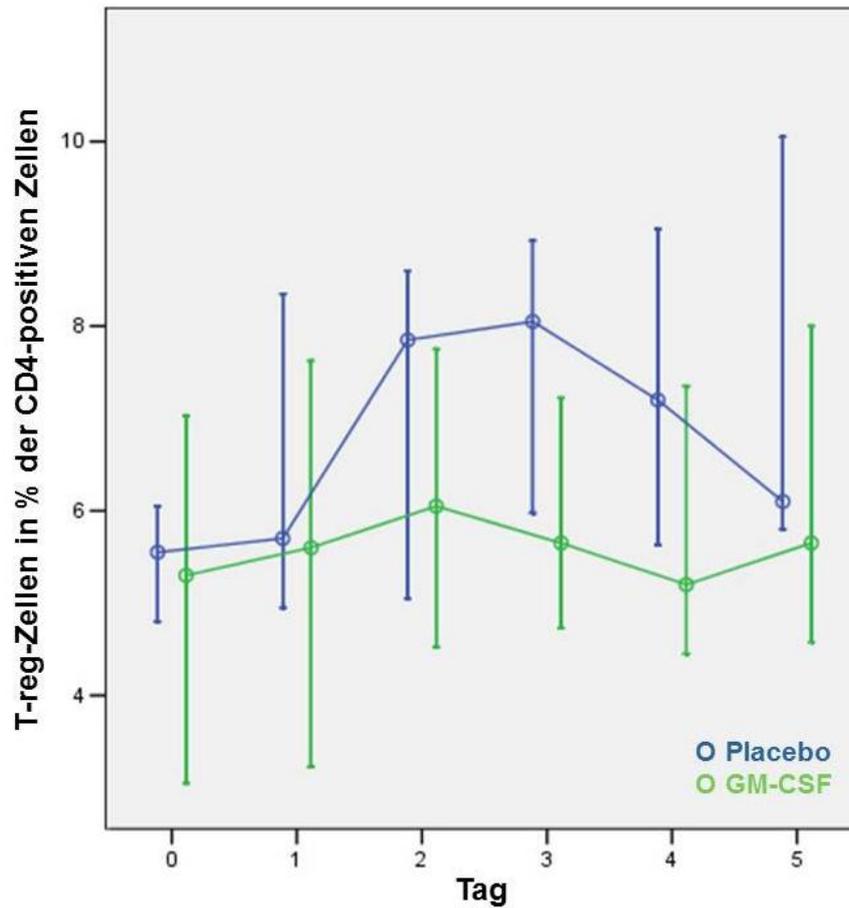


Abbildung 10: Konzentration Treg-Zellen Tag 0 (Operationstag) – Tag 5 (5. Postoperativer Tag, 4. Tag nach Intervention), dargestellt als Mediane (o) und 25. Bzw. 75. Perzentilen (-)

Tabelle 6: Ergebnisse der multivariaten nichtparametrischen (Ko-)Varianzanalyse (MANOVA/MANCOVA) mit dem Zeitpunkt und der Randomisierungsgruppe als Faktoren und der Treg-Zellen als Variable. Kovariate ist der Baselinewert (OD)

Faktor	p-Wert (MANOVA)	p-Wert (MANCOVA)
Randomisierungsgruppe	0,317	0,036
Zeitpunkt	0,0004	0,203
Gruppe*Zeitpunkt	0,130	0,446

7.3 Sekundäre Endpunkte

7.3.1 Th17-/Treg- Verhältnis

Für die im Folgenden aufgeführten Ergebnisse wurde der Quotient aus Th17-Zellen und regulatorischen T-Zellen gebildet. Dabei sprechen höhere Werte für ein Überwiegen der pro-inflammatorischen Immunantwort während niedrigere Werte eine anti-inflammatorisch geprägte Immunlage repräsentieren. An allen postoperativen Tagen wiesen die Mediane der

Interventionsgruppe höhere Werte auf (Abb. 11). Wie aus der folgenden Tabelle (Tab. 7) zu entnehmen, ist der gemessene Unterschied des Th17-/Treg-Verhältnisses zwischen den Gruppen am POD2, beziehungsweise am ersten Tag nach der Intervention signifikant ($p=0,041$).

Tabelle 7: Deskriptive Auswertung des Th17-/Treg-Verhältnisses in % der CD4-postiven Zellen zu den jeweiligen Messzeitpunkten mit Signifikanzniveaus (Mann-Whitney-U-Test) der Unterschiede des Th17-/Treg-Verhältnis zwischen den Gruppen

Zeitpunkt	Th17/Treg-ratio [%CD4-Zellen]	Interventionsgruppe n = 10	Kontrollgruppe n = 10	p-Wert
OD	Median (25.-75. Perzentile)	0.235 (0.110-0.313)	0.143 (0.099-0.327)	0,597
POD 1	Median (25.-75. Perzentile)	0.396 (0.127-0.581)	0.259 (0.149-0.330)	0,496
POD 2	Median (25.-75. Perzentile)	0.327 (0.149-0.442)	0.115 (0.088-0.204)	0,041
POD 3	Median (25.-75. Perzentile)	0.310 (0.204-0.376)	0.161 (0.058-0.271)	0,067
POD 4	Median (25.-75. Perzentile)	0.250 (0.151-0.512)	0.182 (0.068-0.282)	0,402
POD 5	Median (25.-75. Perzentile)	0.378 (0.121-0.597)	0.150 (0.123-0.336)	0,402

In der multivariaten Varianzanalyse und der baselinekorrigierten Kovarianzanalyse für wiederholte Messungen war der Unterschied zwischen den Gruppen allerdings nicht signifikant ($p=0,165$, $p=0,310$). Hierbei konnte lediglich ein systematischer Zeiteinfluss festgestellt werden ($p=0,03$). Die Power für den Nachweis eines univariat ermittelten Unterschiedes des Th17-/Treg-Verhältnisses betrug am POD2 für den Vergleich beider Gruppen 3%.

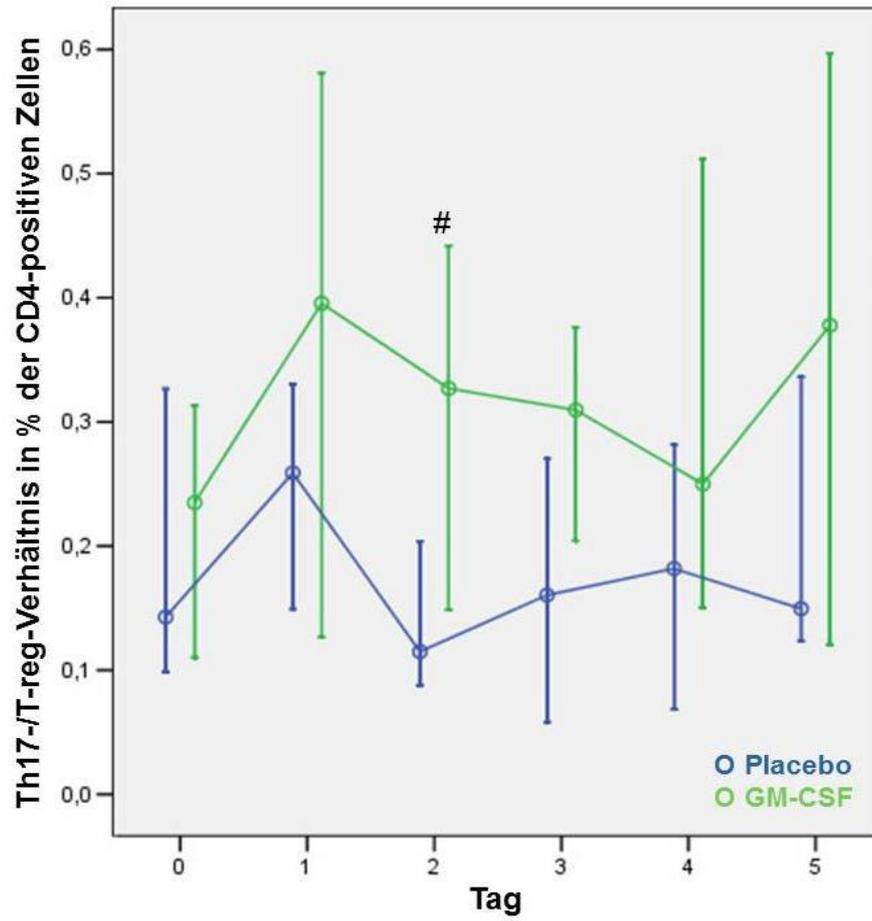


Abbildung 11: Th17-/Treg-Verhältnis Tag 0 (Operationstag) – Tag 5 (5. Postoperativer Tag, 4. Tag nach Intervention), dargestellt als Mediane (o) und 25. bzw. 75. Perzentilen (-), $p < 0,05$ (#) in der univariaten Analyse (Mann-Whitney-U)

7.3.2 Einfluss der Prüfmedikation auf plasmatische Zytokinkonzentrationen

7.3.2.1 Konzentration von $\text{TNF-}\alpha$

Das pro-inflammatorische Zytokin $\text{TNF-}\alpha$ wird von Th17-Zellen, Makrophagen und Th1-Zellen gebildet. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Konzentration von $\text{TNF-}\alpha$ zwischen den Gruppen festgestellt werden. Auch in den multivariaten Analysen (MANOVA und MANCOVA) wurden keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen. Allerdings schien die Konzentration von $\text{TNF}\alpha$ nach Gabe von GM-CSF am POD2 anzusteigen, während sie bei der Kontrollgruppe weiter abfiel (Tab. 8, Abb. 12).

Ergebnisse

Tabelle 8: Deskriptive Auswertung der TNF α -Konzentrationen zu den jeweiligen Mess-Zeitpunkten mit Signifikanzniveaus (Mann-Whitney-U-Test) der Unterschiede der Messwerte zwischen den Gruppen

Zeitpunkt	TNF- α [pg/ml]	Interventionsgruppe n = 10	Kontrollgruppe n = 10	p-Wert
OD	Median (25.-75. Perzentile)	11.60 (9.750-16.80)	12.70 (10.25-15.20)	1.000
POD 1	Median (25.-75. Perzentile)	9.60 (6.10-11.10)	10.40 (6.55-16.50)	0.354
POD 2	Median (25.-75. Perzentile)	12.80 (10.05-23.65)	9.20 (8.10-12.80)	0.112
POD 3	Median (25.-75. Perzentile)	10.05 (9.125-14.55)	11.40 (9.99-14.00)	0.407
POD 4	Median (25.-75. Perzentile)	12.75 (9.20-21.325)	9.20 (7.75-12.90)	0.205
POD 5	Median (25.-75. Perzentile)	10.90 (8.625-13.325)	13.35 (10.45-17.40)	0.248

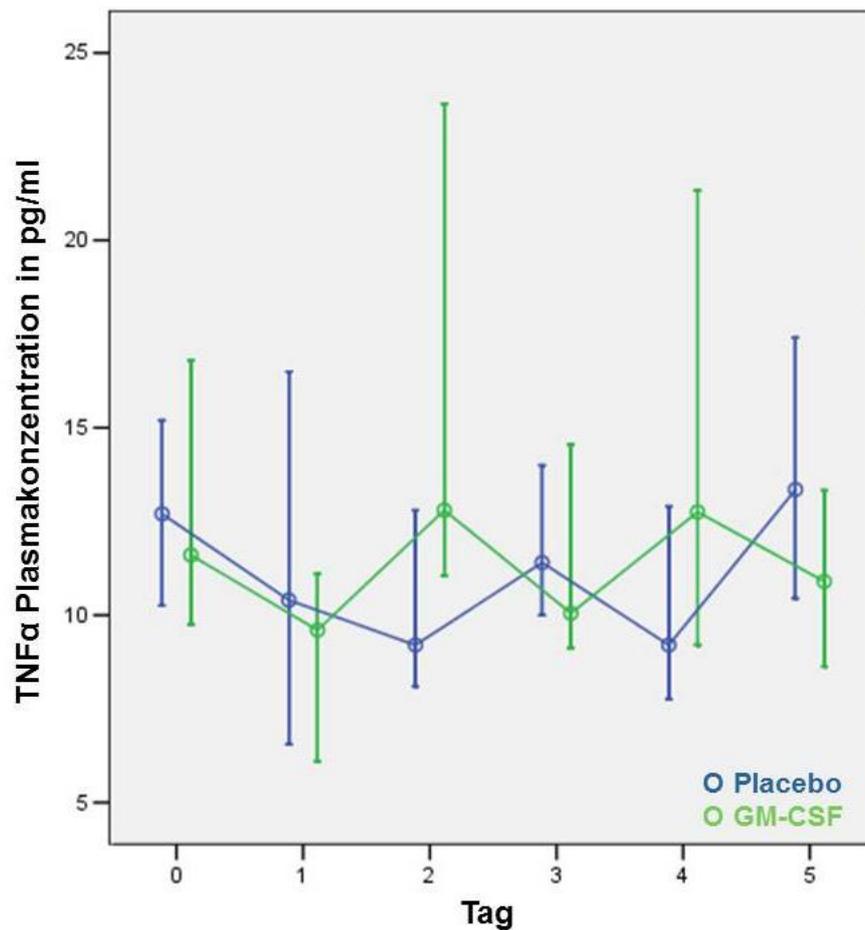


Abbildung 12: TNF α Konzentration im Plasma Tag 0 (Operationstag) – Tag 5 (5. Postoperativer Tag, 4. Tag nach Intervention), dargestellt als Mediane (o) und 25. Bzw. 75. Perzentilen (-)

7.3.2.2 Konzentration von IL-6

IL-6 ist ein Zytokin, welches unter anderem von Makrophagen und Th2-Zellen gebildet wird und sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Wirkungen aufweist. IL-6 ist eines der Induktionssignale, das die Bildung von Th17-Zellen stimuliert. Auch bei der IL-6- Konzentration konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen gezeigt werden. In beiden Gruppen deutete sich allerdings ein Anstieg direkt postoperativ an. Während nach GM-CSF-Gabe der Anstieg weiter anzuhalten schien, nahm die Konzentration bei der Placebogruppe im Median am POD2 wieder ab (Tab. 9, Abb. 13).

Tabelle 9: Deskriptive Auswertung der IL-6-Konzentrationen zu den jeweiligen Mess-Zeitpunkten mit Signifikanzniveaus (Mann-Whitney-U-Test) der Unterschiede der Messwerte zwischen den Gruppen

Zeitpunkt	IL-6 [pg/ml]	Interventionsgruppe n = 10	Kontrollgruppe n = 10	p-Wert
OD	Median (25.-75. Perzentile)	4.30 (2.25-11.125)	2.70 (2.00-5.90)	0.320
POD 1	Median (25.-75. Perzentile)	65.90 (51.55-139.00)	64.70 (43.45-97.95)	0.724
POD 2	Median (25.-75. Perzentile)	72.90 (52.00-119.00)	39.70 (17.60-97.10)	0.101
POD 3	Median (25.-75. Perzentile)	39.700 (29.025- 50.425)	52.000 (20.800- 53.500)	0.379
POD 4	Median (25.-75. Perzentile)	33.700 (20.325- 81.425)	36.100 (24.950- 114.450)	0.514
POD 5	Median (25.-75. Perzentile)	25.600 (14.375- 49.825)	36.100 (19.350- 71.800)	0.424

Die multivariate Analyse zeigte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, allerdings konnte ein systematischer Zeiteinfluss über die Gruppen ($p < 0,001$) und ein systematischer Zeiteinfluss auf die IL-6 Konzentration der Kontrollgruppe ($p < 0,001$) und der Interventionsgruppe ($p < 0,001$) gezeigt werden. Der systematische Zeiteinfluss wurde in der Kovarianzanalyse ebenfalls bestätigt ($p = 0,015$).

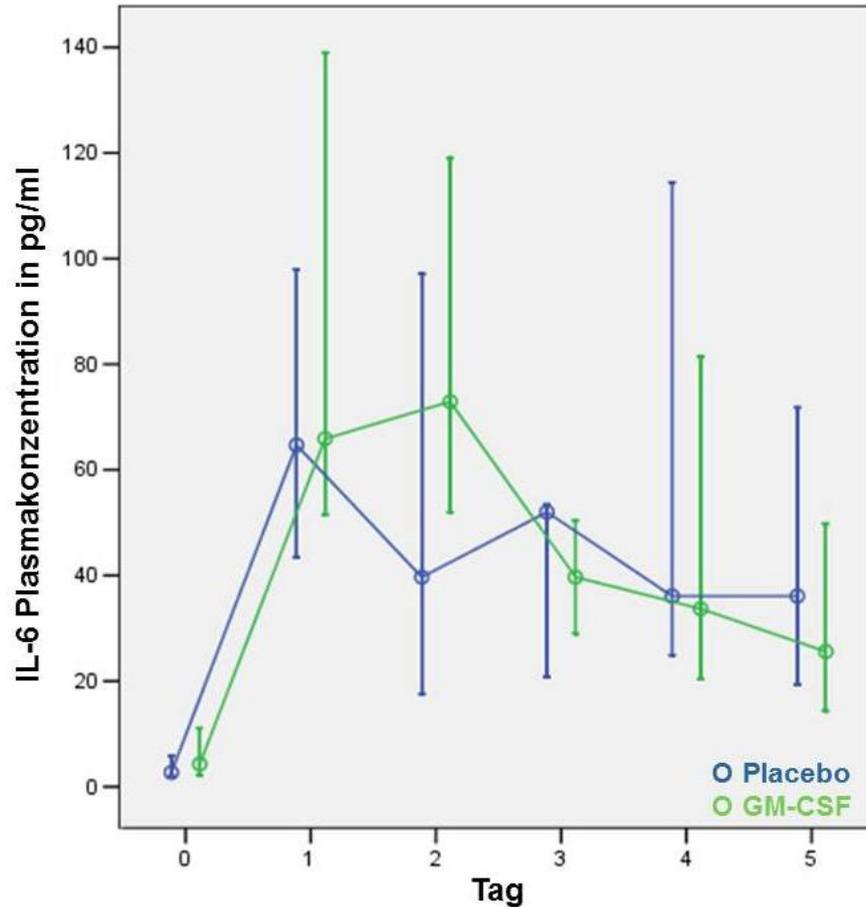


Abbildung 13: IL-6 Konzentration im Plasma Tag 0 (Operationstag) – Tag 5 (5. Postoperativer Tag, 4. Tag nach Intervention), dargestellt als Mediane (o) und 25. Bzw. 75. Perzentilen (-)

7.3.2.3 Konzentration von IL-10

Interleukin 10 ist eines der potentesten anti-inflammatorischen Zytokine und wird von Monozyten, Th2- und Treg-Zellen gebildet. Der Normbereich für die IL-10 Konzentration im Plasma liegt bei <5 pg/ml. Die Laborspezifische Nachweisgrenze liegt ebenfalls bei 5 pg/ml. In der Kontrollgruppe blieb die Konzentration von IL-10 im Plasma im Median an allen Tagen unterhalb der Nachweisgrenze und damit im Normbereich, während nach GM-CSF-Gabe am POD2 im Median Werte über der Nachweisgrenze (6.1 pg) gemessen wurden. Dieser Unterschied stellte sich in der univariaten Analyse als statistisch signifikant dar ($p=0,01$). Im weiteren Verlauf fiel die Konzentration im Median auch bei der GM-CSF-Gruppe wieder auf Normwerte ab und an allen anderen Tagen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen gemessen werden (Abb. 14, Tab. 10). Auffallend war eine hohe Streubreite der IL-10 Konzentrationen, insbesondere bei der Interventionsgruppe am POD2. Im Zusammenhang mit dem Problem der Nachweisgrenze, der hohen Streuung der Beobachtungswerte und den

geringen Fallzahlen sind diese Ergebnisse nur mit der gebotenen Zurückhaltung zu betrachten und die in der Folge ausgeführten statistischen Test besitzen eine sehr beschränkte Aussagekraft. In der multivariaten Kovarianzanalyse konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bestätigt werden ($p < 0,01$) während die Varianzanalyse keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen feststellen konnte. Allerdings konnte für die Interventionsgruppe ein systematischer Einfluss des Zeitpunktes auf die IL-10 Konzentration über die Gruppen gezeigt werden ($p = 0,03$).

Tabelle 10: Deskriptive Auswertung der IL-10-Konzentrationen zu den jeweiligen Mess-Zeitpunkten mit Signifikanzniveaus (Mann-Whitney-U-Test) der Unterschiede der Messwerte zwischen den Gruppen, 5.0 pg/ml repräsentiert die untere Nachweisgrenze

Zeitpunkt	IL-10 [pg/ml]	Interventionsgruppe n = 10	Kontrollgruppe n = 10	p-Wert
OD	Median (25.-75. Perzentile)	≤ 5 ($\leq 5 - \leq 5$)	≤ 5 ($\leq 5 - \leq 5$)	0.317
POD 1	Median (25.-75. Perzentile)	≤ 5 ($\leq 5 - 7.650$)	≤ 5 ($\leq 5 - 6.000$)	0.960
POD 2	Median (25.-75. Perzentile)	6.000 ($\leq 5 - 15.300$)	≤ 5 ($\leq 5 - \leq 5$)	0.011
POD 3	Median (25.-75. Perzentile)	≤ 5 ($\leq 5 - \leq 5$)	≤ 5 ($\leq 5 - \leq 5$)	0.403
POD 4	Median (25.-75. Perzentile)	≤ 5 ($\leq 5 - 7.075$)	≤ 5 ($\leq 5 - 6.350$)	0.712
POD 5	Median (25.-75. Perzentile)	≤ 5 ($\leq 5 - 5.350$)	≤ 5 ($\leq 5 - \leq 5$)	0.261

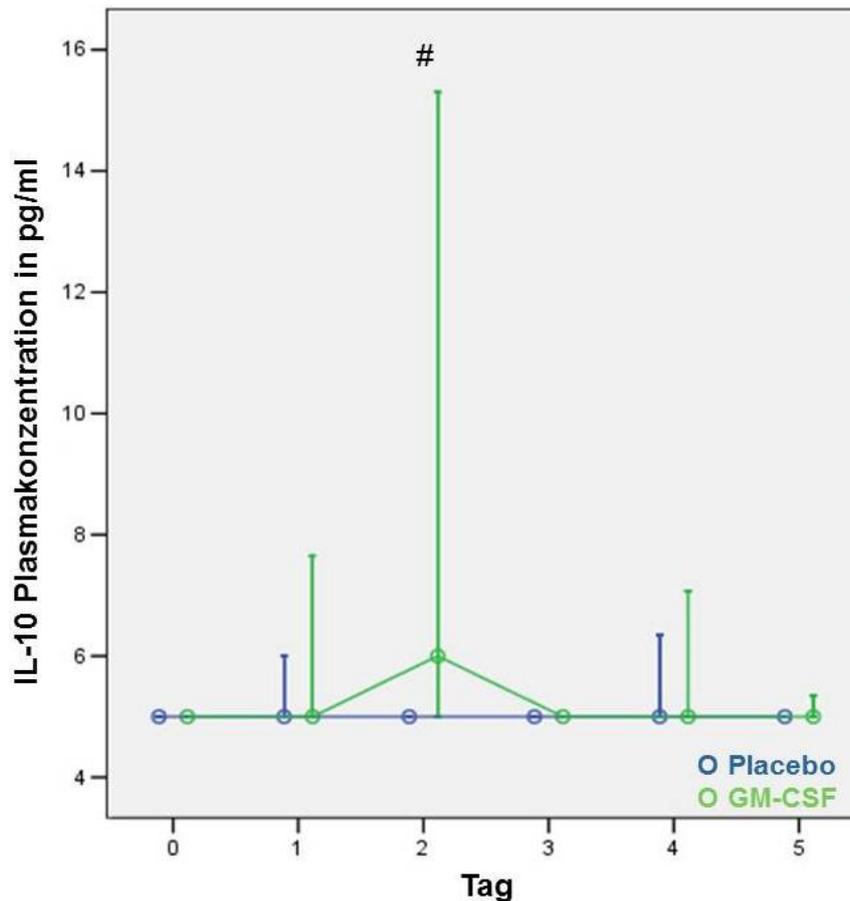


Abbildung 14: IL-10 Konzentration im Plasma Tag 0 (Operationstag) – Tag 5 (5. Postoperativer Tag, 4. Tag nach Intervention), dargestellt als Mediane (o) und 25. Bzw. 75. Perzentilen (-), $p < 0,05$ (#) in der univariaten Analyse (Mann-Whitney-U)

7.3.3 HLA-DR-Expression auf Monozyten

Einschlusskriterium für die Studie war die Expression von HLA-DR-Antigenen auf Monozyten am ersten postoperativen Tag. In beiden Gruppen liegen daher an diesem Tag die Werte unter 10000 Antigenen pro Monozyt. Am POD2, also am ersten Tag postinterventionell war bei der GM-CSF Gruppe ein steiler Anstieg zu beobachten, ab dem POD3 näherten sich dann die Werte wieder dem Wert am POD1 an. Bei der Kontrollgruppe fielen die Werte zunächst ebenfalls, stiegen aber erst ab dem POD4 wieder leicht an. Am POD1 gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. Die Unterschiede zwischen beiden Gruppen waren jedoch an den PODs 2 und 3 hochsignifikant ($p=0,000$; $p=0,003$) und eine Tendenz zu einem Unterschied zwischen den Gruppen war auch am POD4 erkennbar ($p=0,049$) (Tab.11, Abb.15).

Ergebnisse

Tabelle 11: Deskriptive Auswertung der monozytären HLA-DR-Expression in Antigenen pro Monozyt zu den jeweiligen Messzeitpunkten mit Signifikanzniveaus (Mann-Whitney-U-Test) der Unterschiede der HLA-DR Expression zwischen den Gruppen

Zeitpunkt	HLA-DR [AG/M]	Interventionsgruppe n = 10	Kontrollgruppe n = 10	p-Wert
OD	Median (25.-75. Perzentile)	27685.500 (18163.250-35231.000)	32371.500 (21620.250-44050.750)	0,364
POD 1	Median (25.-75. Perzentile)	6574.000 (4905.500-9658.250)	6914.635 (6022.500-9001.750)	0,880
POD 2	Median (25.-75. Perzentile)	60189.000 (41113.500-68920.250)	6634.000 (5430.250-7919.250)	<0,0001
POD 3	Median (25.-75. Perzentile)	22332.000 (14740.750-35929.000)	7064.000 (6231.500-8521.500)	0,003
POD 4	Median (25.-75. Perzentile)	13308.000 (8125.500-20560.000)	7926.000 (5888.250-10240.750)	0,049
POD 5	Median (25.-75. Perzentile)	10013.500 (9006.000-19132.000)	11091.000 (6152.000-13357.000)	0,514

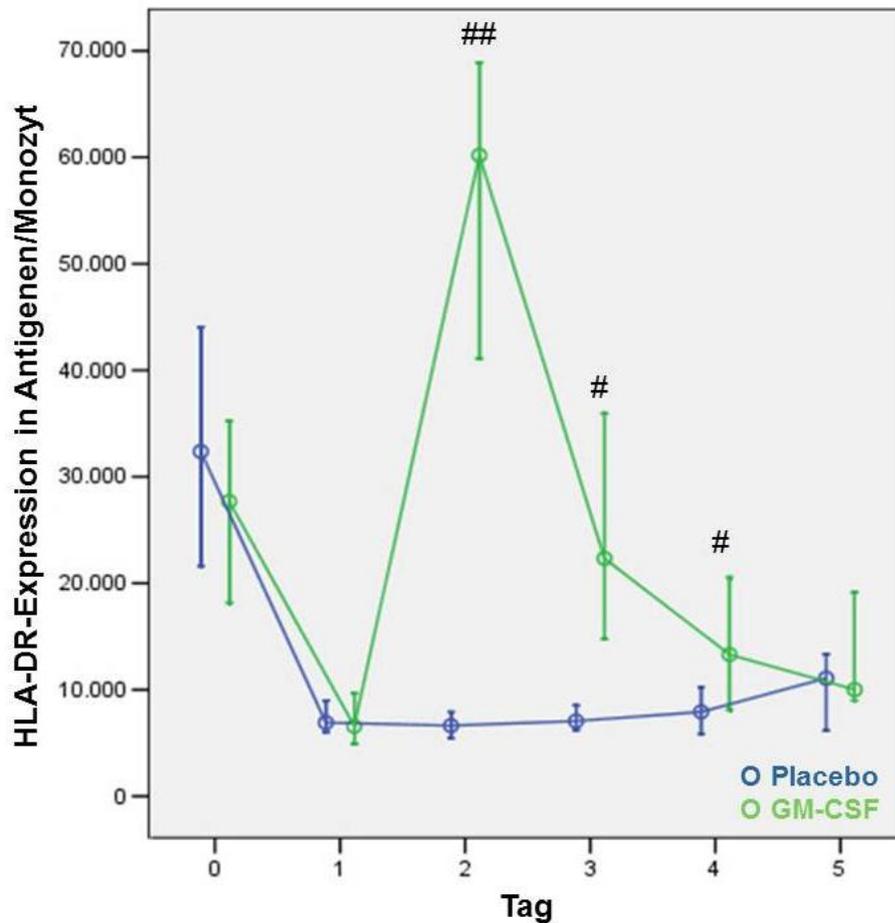


Abbildung 15: HLA-DR Expression in Antigenen/Monozyt an den Tagen 0 (Operationstag) – Tag 5 (5. Postoperativer Tag, 4. Tag nach Intervention), dargestellt als Mediane (o) und 25. Bzw. 75. Perzentilen (-), p<0,05 (#), p<0,01 (##) in der univariaten Analyse (Mann-Whitney-U)

Sowohl in der multivariaten Varianzanalyse als auch in der Kovarianzanalyse konnte ein signifikanter Unterschied in der HLA-DR Expression zwischen den Gruppen bestätigt werden ($p < 0,0001$, $p < 0,0001$). Außerdem zeigte sich in beiden multivariaten Verfahren ein systematischer Zeiteinfluss über die Gruppen ($p < 0,0001$, $p < 0,0001$) und signifikante Wechselwirkungen zwischen Gruppe und Zeitpunkt ($p < 0,0001$, $p < 0,0001$).

7.3.4 Verhalten der T-Zell-Subspezies bei systemischer Inflammation (SIRS)

Unabhängig von der Prüfmedikation wurde das Verhalten von Th17-Zellen und Treg und des Th17-/Treg-Verhältnisses bei Patienten mit systemic inflammatory response syndrome (SIRS) untersucht. Hierfür erfolgte eine erneute Gruppeneinteilung in Patienten, die während des Beobachtungszeitraumes ein SIRS entwickelten und Patienten ohne SIRS. Beide Gruppen sind bei der geringen Gesamtfallzahl sehr klein (n [SIRS/kein SIRS] = 3/2), so dass die Auswertung rein deskriptiv erfolgte. Allerdings ist hierbei ein Trend erkennbar, demnach Patienten mit SIRS an allen Messzeitpunkten eine höhere Konzentration an Treg aufzuweisen schienen. Insbesondere am POD1 schienen die Patienten, die ein SIRS entwickelten, höhere Treg-Werte im Vergleich zu Patienten ohne SIRS aufzuweisen. Ein Einfluss der Prüfmedikation als Confounder auf dieses Ergebnis ist ausgeschlossen, da die erste Gabe erst nach der Probenentnahme am POD1 erfolgte. An den anderen Tagen wurden keine Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt. Es wurden auch keine Unterschiede hinsichtlich der Konzentration der Th17-Zellen, sowie des Th17-/Treg-Verhältnis bei dieser Gruppeneinteilung festgestellt.

7.3.5 Einfluss der Prüfmedikation auf klinische Endpunkte

Hinsichtlich der klinischen Endpunkte wiesen die Patienten der beiden Behandlungsgruppen keine signifikanten Unterschiede auf (Tab.12). Auf eine statistische Auswertung des Auftretens postoperativer Infektionen und postoperativer systemischer Immunantwort (SIRS) wurde verzichtet, da die Anzahl der Ereignisse bei niedriger Fallzahl sehr gering ausfiel (Infektion/SIRS Interventionsgruppe $n=5/3$, Kontrollgruppe $n=6/2$). Im Beobachtungszeitraum ist ein Patient der Interventionsgruppe verstorben, wobei ein kausaler Zusammenhang zur Prüfmedikation ausgeschlossen wurde.

Ergebnisse

Tabelle 12: Outcome-Charakteristika: dargestellt sind Medianwerte (25. und 75. Perzentilen) und absolute Häufigkeiten, die Signifikanzniveaus wurden Mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests, des exakten Chi-Quadrat-Tests und des exakten Tests nach Fisher berechnet

Parameter	Interventionsgruppe (n=10)	Kontrollgruppe (n=10)	Signifikanzniveau
Liegedauer ITS [d]	4,0 (0,8-10,4)	3,2 (2,4-4,9)	0,880
Liegedauer gesamt [d]	16,9 (11,8-30,0)	14,4 (11,5-20,6)	0,364

8. Diskussion

8.1 Ergebnisse

Das wichtigste Ergebnis dieser Arbeit ist das signifikant erhöhte Verhältnis von Th17-Zellen zu regulatorischen Zellen am POD2 bei der Interventionsgruppe im Vergleich zu Placebo ($p=0,041$). Dies spricht für ein höheres pro-inflammatorisches Potential am ersten Tag nach der Gabe des Prüfpräparats bei Patienten, die GM-CSF erhielten als bei den Patienten der Placebogruppe. In der multivariaten Varianzanalyse und der baselinekorrigierten Kovarianzanalyse konnte der signifikante Unterschied zwischen den Gruppen allerdings nicht bestätigt werden ($p=0,165$, $p=0,310$). Der Anteil der Th17-Zellen der Interventionsgruppe zeigte am POD2 gegenüber der Kontrollgruppe in Tendenz erhöhte Werte, allerdings war dieses Ergebnis nicht signifikant ($p=0,05$). Die regulatorischen T-Zellen waren dagegen besonders an den postoperativen Tagen 2-4 erniedrigt, allerdings in der univariaten Analyse ebenfalls nicht signifikant. In der Baseline-korrigierten Kovarianz Analyse zeigte sich ein univariat signifikanter Unterschied bei den Treg-Zellen zwischen den Gruppen ($p=0,04$). Hinsichtlich der Zytokine konnte eine signifikant erhöhte IL-10 Konzentration nach GM-CSF Gabe in Vergleich zu Placebo gemessen werden ($p=0,01$). Dieses Ergebnis bestätigte sich in der Baseline-korrigierten Kovarianz Analyse ($p<0,01$), steht aber im Kontrast zu der als tendenziell erniedrigt gemessenen Treg Konzentration bei Patienten der Interventionsgruppe. An den anderen Tagen liegen die Ergebnisse beider Gruppen im Median mit Werten kleiner 5pg/ml im Normbereich, allerdings auch unterhalb der laboreigenen Nachweisgrenze (ebenfalls 5pg/ml). Weiterhin führte die Gabe von GM-CSF zu einer signifikant erhöhten HLA-DR-Expression auf Monozyten an den Tagen POD2 und POD3 (an beiden Tagen $p<0,01$). In der multivariaten Varianzanalyse sowie der Kovarianzanalyse konnte dies bestätigt werden ($p<0,0001$; $p<0,0001$). Ein signifikanter Einfluss der Prüfmedikation auf klinische Endpunkte und das Outcome konnte nicht gezeigt werden. Vergleicht man allerdings die T-Zell-Subpopulationen unabhängig von der Prüfmedikation bei Patienten mit und ohne SIRS, deuten die Ergebnisse darauf hin, dass Patienten, die im Beobachtungszeitraum ein SIRS entwickelten am POD1 einen erhöhten Anteil regulatorischer T-Zellen aufweisen.

8.2 Ergebnisse im Literaturvergleich

Arbeiten, die nach einer GM-CSF-Gabe im postoperativen Verlauf die Konzentrationen der Th17-oder Treg-Zellen untersucht haben, liegen nicht zum Vergleich vor. Ein Einfluss von GM-CSF auf die Balance von T-Helferzellen konnte jedoch von Jinushi et al. im Mausmodell gezeigt werden. Hier wurden Makrophagen und T-Zellen einem Stress ausgesetzt, der einem

Gewebsdefekt entspricht. Unter Anwesenheit von GM-CSF konnte nach Kontakt mit nekrotischem Zellmaterial oder apoptotischen Zellen ein Anstieg sowohl der Treg- als auch der Th17-Zellen beobachtet werden (89). Hierbei steht der Anstieg der regulatorischen T-Zellen im Kontrast zu den Beobachtungen die in dieser Arbeit gemacht wurden, während ein Anstieg der Th17-Zellen in der vorliegenden Studie ebenfalls beobachtet werden konnte. Allerdings ist ein direkter Vergleich der Untersuchung mit den hier beschriebenen Ergebnissen nicht möglich, da die Untersuchung von Jinushi et al. auf ein ex-vivo Mausmodell basiert.

Weitere Studien untersuchten Th17-/Treg- assoziierte Zytokine im postoperativen Verlauf ohne die Stimulation mit GM-CSF. Mokart et al. untersuchten die Konzentrationen von IL-6, IL-10 und TNF- α prospektiv bei Patienten nach chirurgischen Eingriffen mit und ohne Komplikationen (2). Sie führten die Messungen ebenfalls täglich vom Operationstag bis zum POD5 durch. Bei der TNF- α Messung zeigte sich bei Mokart et al. am POD2 ein Anstieg bei Patienten ohne Komplikationen und ab POD3 ein starker Anstieg von TNF- α bei Patienten mit Sepsis und bei denen mit septischem Schock. Bei Patienten ohne Komplikationen wurden zum POD5 die Ausgangswerte wieder erreicht. In der vorliegenden Arbeit konnte bei Patienten der Interventionsgruppe ebenfalls ein Anstieg am POD2 beobachtet werden, in der Kontrollgruppe war ein Anstieg an den Tagen POD3 und POD5 messbar. Weiterhin konnte bei Mokart et al. ein postoperativer Anstieg von IL-6 nachgewiesen werden, der bei Patienten mit septischem Schock am stärksten ausgeprägt war und der mit den hier veröffentlichten Werten von IL-6 in beiden Gruppen und mit dem Th17-Anstieg am POD1 vereinbar ist. Ab dem ersten postoperativen Tag fielen die Werte bei Mokart et al. wieder ab und erreichten bei Patienten ohne Komplikationen am POD5 wieder den Ausgangswert. In der Kontrollgruppe war dieser Abfall ebenfalls zu sehen, während in der Interventionsgruppe die Werte bis zum POD2 weiter anstiegen. Die Konzentration von IL-10 stieg bei Mokart et al. bei allen Patienten bereits zum ersten postoperativen Tag an und fiel bei Patienten mit Sepsis und bei Patienten ohne Komplikationen an den Folgetagen wieder ab. Bei Patienten mit septischem Schock stieg IL-10 ab dem POD2 wieder stark an. Hier war der IL-10 Anstieg nur bei Patienten mit GM-CSF und erst am zweiten postoperativen Tag messbar (Abb. 16).

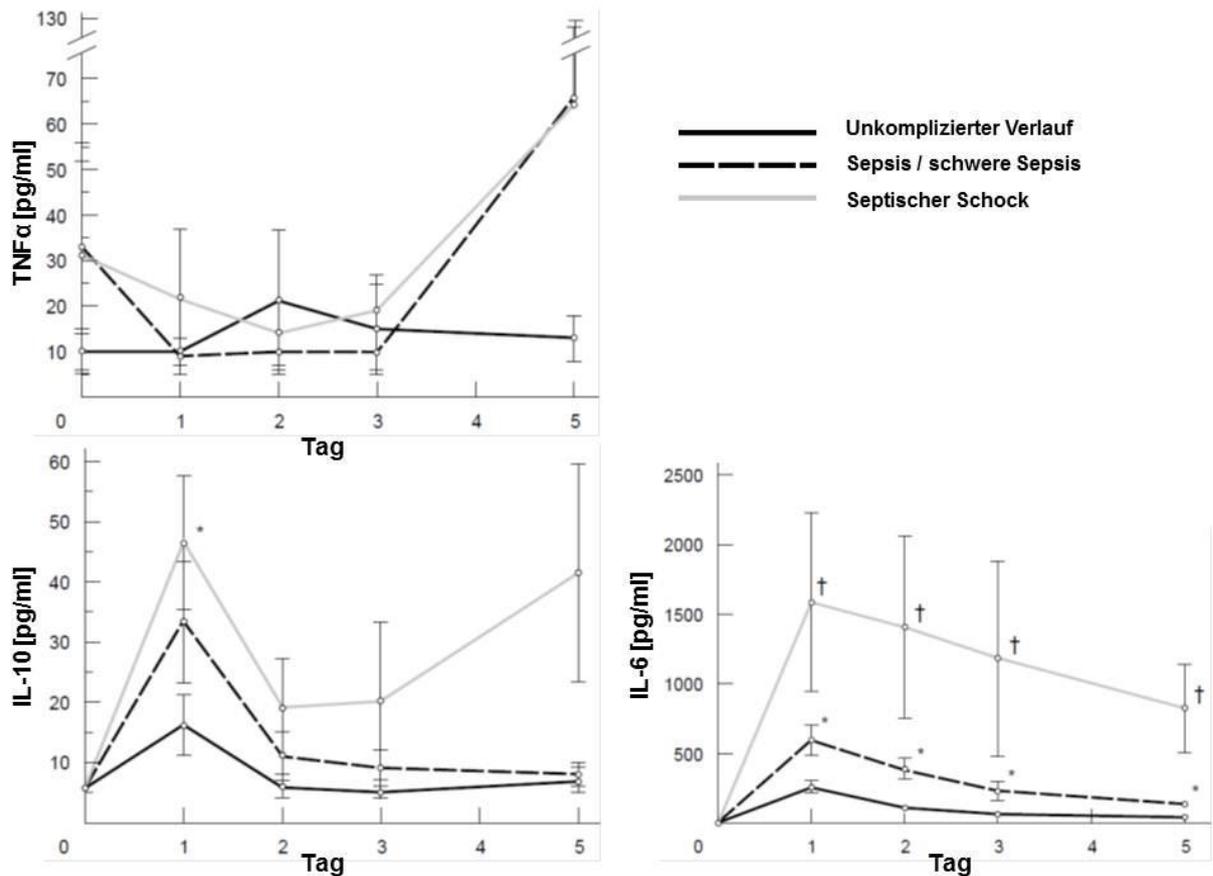


Abbildung 16: Zytokinkonzentrationen postoperativ für TNF α , IL-6, IL-10, dargestellt als Mediane (*= $p < 0,01$, t= $p < 0,003$, berechnet mit Mann-Whitney-U-Test) für Patienten mit und ohne Komplikationen, Grafik entnommen aus (2)

In einer Veröffentlichung von Angele et al. wurden aus mehreren Arbeiten gewonnene Daten von Zytokinkonzentrationen in den ersten 24 h nach Trauma oder Blutung in einer Graphik zusammengefasst (10). Beispielhaft ist dort der Verlauf der Konzentrationen von TNF α und IL-6, sowie von IL-10 und TGF β dargestellt. Da eine Skalierung der x-Achse fehlt, gehen aus dieser Graphik allerdings keine genauen Konzentrationen hervor. Gut zu erkennen ist hier jedoch der biphasische Verlauf der Immunreaktion nach einem Gewebsdefekt. Nach einer proinflammatorischen Reaktion (gekennzeichnet durch die Zytokine TNF α und IL-6) kommt es hierbei zu einer anti-inflammatorisch geprägten Antwort (IL-10 und TGF β). (Abb.17)

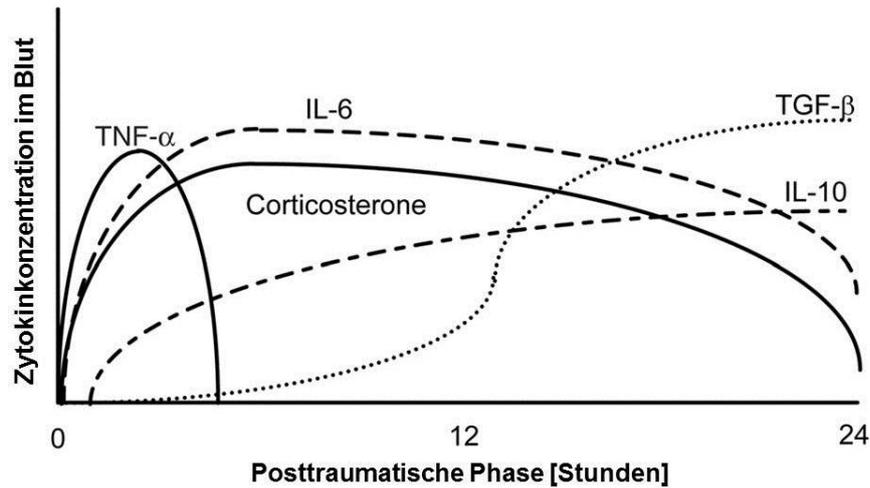


Abbildung 17: Zytokinkonzentrationen während der ersten 24 Stunden nach Trauma und hämorrhagischem Schock. Die Konzentrationen von TNF- α , IL-6, und TGF- β wurden mit einem spezifischen Bioassay bestimmt. IL-10 wurde mittels ELISA und corticosterone mit Hilfe eines Radioimmunoassays bestimmt. Die Grafik wurde aus der Originalarbeit von Angele et al. übernommen und enthielt keine Einheiten und Beschriftung auf der x-Achse. (10)

In beiden Gruppen konnte auch in den vorliegenden Ergebnissen ein Anstieg von IL-6 innerhalb der ersten 24 h gezeigt werden. Während bei Angele et al. keine weiteren Messungen folgten, fielen hier die Werte in der Placebogruppe zum POD3 wieder ab. GM-CSF schien diesen Abfall der IL-6 Konzentrationen zu verhindern, allerdings waren die Unterschiede am POD3 nicht signifikant. Die Ergebnisse der IL-10 Konzentrationen lassen keinen Vergleich zu, da bei der Messung am POD1 die Werte in beiden Gruppen fast vollständig unter der Nachweisgrenze lagen. Der Anstieg von TNF α wurde bei Angele et al. in den ersten Stunden gemessen, hier erfolgte die erste Messung am Folgetag der Operation, zeigte da aber einen Abfall unter präoperative Werte. Diese schienen nach GM-CSF Gabe zum POD2 wieder anzusteigen. Diese Beobachtungen sind auch mit den gemessenen Konzentrationen der Th17-Zellen vereinbar, deren Bildung durch IL-6 angeregt wird und die ihrerseits TNF- α ausschütten. Diese zeigten einen Anstieg von der präoperativen Messung zum ersten postoperativen Tag (vor der Prüfmedikationsgabe), danach zeigte sich am zweiten postoperativen Tag in der Placebogruppe ein Abfall unter den Ausgangswert. Die Treg, die sich unter dem Einfluss von TGF- β differenzieren und selbst IL-10 ausschütten, zeigten vom Operationstag zum ersten postoperativen Tag keine Änderung, stiegen dann aber am POD2 vor allem in der Placebogruppe stark an. Daraus lässt sich in den ersten zwei Tagen ein Übergang von Pro-Inflammation zu Anti-Inflammation ableiten, der auch im berechneten Th17-Treg-Verhältnis deutlich wird. Bei der Placebogruppe scheint dabei die anti-inflammatorische Immunlage insbesondere am POD2 stärker ausgeprägt zu sein. Allerdings stammen die Daten, die für die Publikation von Angele et al. zugrunde liegen aus unterschiedlichen Studien, wurden zum Teil tierexperimentell erhoben

und sind damit nicht direkt vergleichbar. Unabhängig von der Prüfmedikation konnte in der vorliegenden Arbeit ein tendenziell höherer Anteil der Treg bei Patienten mit SIRS im Vergleich zu Patienten ohne SIRS beobachtet werden. Allerdings erfolgte die Auswertung aufgrund der geringen Fallzahl rein deskriptiv. In einer Veröffentlichung von Leng et al. wurden die Konzentrationen der Treg bei Patienten mit septischem Schock, mit SIRS und bei gesunden Probanden erhoben. Hier konnten erhöhte Konzentrationen von Treg bei Patienten mit Sepsis im Vergleich zu Patienten ohne systemische Inflammation gemessen werden. Ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und Patienten mit SIRS konnte nicht festgestellt werden (74). Hein et al. konnten bei Patienten mit septischem Schock ebenfalls einen signifikanten Anstieg des Anteils von Treg an den CD4-positiven Zellen im Vergleich zu gesunden Probanden zeigen, Patienten mit SIRS ohne Infektionsnachweis wurden hier allerdings nicht untersucht (73).

8.3 Methoden

Um störende Einflüsse auf die Ergebnisse zu vermeiden, wurde für die Untersuchung ein randomisiertes, Placebo-kontrolliertes doppelt verblindetes Double-Dummy-Design gewählt. Des Weiteren waren feste Ein- und Ausschlusskriterien festgelegt und es erfolgte ein lückenloses Screening der Patienten um Selektionsbias zu vermeiden. Alle Patienten wurden nach den gleichen Vorgaben intraoperativ und postoperativ behandelt. Dabei kamen insbesondere gleiche Narkoseverfahren zur Anwendung, die Vitalparameter wurden in engen Grenzen stabil gehalten und es wurde auf eine optimale analgetische Therapie intra- und postoperativ geachtet. Die Diagnose von Infektionen erfolgte wie oben beschrieben nach einheitlichen objektiven Kriterien. Die Blutentnahmen erfolgten jeweils zur gleichen Uhrzeit um einen Einfluss durch die zirkadiane Rhythmik als Fehlerquelle zu vermeiden. Das Verfahren zur Bestimmung der Th17-Zellen, der Treg war im Labor bereits etabliert und erfolgte nach Schulung des Studienpersonals bei allen Patienten mit den gleichen oben genannten Materialien exakt nach dem oben beschriebenen Protokoll.

8.4 Limitationen

Bei den Baselineparametern konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden. Allerdings können die Daten nicht ohne weiteres auf die Normalbevölkerung übertragen werden, da insgesamt mehr Männer als Frauen und ausschließlich ältere Patienten zwischen 55 und 70 Jahren untersucht wurden. Außerdem wiesen alle untersuchten Patienten eine maligne Erkrankung als Grunderkrankung und Anlass zur Operation auf. Die größte Limitation ist allerdings die geringe Fallzahl der Untersuchung und die damit niedrige Power bei

den durchgeführten statistischen Tests. So konnte für die univariate Analyse der Konzentration von Th17-Zellen zwischen den Gruppen am POD2 eine Power von 12% und für die Analyse des Th17-/Treg-Verhältnisses eine Power von nur 3% ermittelt werden. Durch kleine Fallzahlen können gemessene Effekte als nicht signifikant erscheinen und damit unentdeckt bleiben bzw. wird deren statistischer Nachweis erschwert. Ein besonders großes Problem stellt die geringe Fallzahl bei der Auswertung klinischer Parameter wie Sepsis oder SIRS dar, die nur bei einem Teil der untersuchten Patienten auftraten. Die vorliegenden Ergebnisse sind daher als rein deskriptiv zu werten und dienen in erster Linie zur Generierung von Hypothesen und somit der Planung weiterer Nachfolgestudien. Eine weitere Fehlerquelle stellt die Messung der Th17-Zellen dar, die auf eine intrazelluläre Färbung nach Zellstimulation mit PMA/Ionomycin basiert, wobei auch zwei manuelle Zellzählungen nötig sind. Hier könnte auch die Ursache für die großen Schwankungen bei den Messergebnissen liegen, die besonders bei der kleinen Fallzahl den Nachweis von Unterschieden zwischen den Patientengruppen erschweren. Auch bei den Messergebnissen der Zytokinkonzentrationen, insbesondere IL-10 fällt eine große Varianz in den Messwerten auf, wodurch bei kleinen Fallzahlen ein Nachweis von Effekten erschwert wird. Weiterhin liegen für die Konzentration von IL-10 die Normwerte unterhalb der laborspezifischen Nachweisgrenze, so dass hier lediglich für Interventionspatienten am POD2 Werte von über 5pg/ml messbar waren. Die Tregs können durchflusszytometrisch über den intrazellulären Nachweis von FoxP3 quantifiziert werden. Um einer weiteren störanfälligen intrazellulären Färbung zu entgehen, wurde für die vorliegende Studie der Nachweis von CD127 auf der Zelloberfläche zur Bestimmung genutzt. In mehreren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass diese Methode ebenfalls zur Bestimmung von Treg geeignet ist (63),(64).

8.5 Perspektiven

Th17-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Abwehr extrazellulärer Pathogene und die Tregs sind wichtig für die Balance von Pro- und Anti-Inflammation. GM-CSF hat einen Einfluss auf beide Zellpopulationen. Die hier veröffentlichten Ergebnisse zeigen einen Anstieg der Th17-/Treg-Ratio einen Tag nach GM-CSF-Gabe im Vergleich zu Placebo. Vorstellbar ist, dass dieser Effekt einen positiven Einfluss auf eine postoperative Immundysfunktion und das Auftreten von nosokomialen Infektionen im postoperativen Verlauf hat. Ein signifikanter Einfluss auf das Outcome der Patienten und klinische Endpunkte wie postoperative Infektionen, Krankenhausverweildauer und Mortalität konnte allerdings nicht gezeigt werden. Um diesen Zusammenhang abschließend zu untersuchen, wäre eine Studie an einem deutlich größeren Patientenkollektiv nötig.

9. Literaturverzeichnis

1. Pearse RM, Moreno RP, Bauer P, Pelosi P, Metnitz P, Spies C, et al. Mortality after surgery in Europe: a 7 day cohort study. *Lancet*. 2012;380(9847):1059-65. Epub 2012/09/25.
2. Mokart D, Capo C, Blache JL, Delpero JR, Houvenaeghel G, Martin C, et al. Early postoperative compensatory anti-inflammatory response syndrome is associated with septic complications after major surgical trauma in patients with cancer. *The British journal of surgery*. 2002;89(11):1450-6. Epub 2002/10/23.
3. Hampshire PA, Guha A, Strong A, Parsons D, Rowan P. An evaluation of the Charlson co-morbidity score for predicting sepsis after elective major surgery. *Indian journal of critical care medicine : peer-reviewed, official publication of Indian Society of Critical Care Medicine*. 2011;15(1):30-6. Epub 2011/06/03.
4. Mokart D, Leone M, Sannini A, Brun JP, Tison A, Delpero JR, et al. Predictive perioperative factors for developing severe sepsis after major surgery. *British journal of anaesthesia*. 2005;95(6):776-81. Epub 2005/10/18.
5. Cullen DJ, Apolone G, Greenfield S, Guadagnoli E, Cleary P. ASA Physical Status and age predict morbidity after three surgical procedures. *Annals of surgery*. 1994;220(1):3-9. Epub 1994/07/01.
6. Behrman SW, Zarzaur BL. Intra-abdominal sepsis following pancreatic resection: incidence, risk factors, diagnosis, microbiology, management, and outcome. *The American surgeon*. 2008;74(7):572-8; discussion 8-9. Epub 2008/07/24.
7. Pessaux P, Msika S, Atalla D, Hay JM, Flamant Y. Risk factors for postoperative infectious complications in noncolorectal abdominal surgery: a multivariate analysis based on a prospective multicenter study of 4718 patients. *Arch Surg*. 2003;138(3):314-24. Epub 2003/03/04.
8. Veltkamp SC, Kemmeren JM, van der Graaf Y, Edlinger M, van der Werken C. Prediction of serious complications in patients admitted to a surgical ward. *The British journal of surgery*. 2002;89(1):94-102. Epub 2002/02/20.
9. Ahlers O, Nachtigall I, Lenze J, Goldmann A, Schulte E, Hohne C, et al. Intraoperative thoracic epidural anaesthesia attenuates stress-induced immunosuppression in patients undergoing major abdominal surgery. *British journal of anaesthesia*. 2008;101(6):781-7. Epub 2008/10/17.
10. Angele MK, Faist E. Clinical review: immunodepression in the surgical patient and increased susceptibility to infection. *Crit Care*. 2002;6(4):298-305. Epub 2002/09/13.
11. Munford RS, Pugin J. Normal responses to injury prevent systemic inflammation and can be immunosuppressive. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2001;163(2):316-21. Epub 2001/02/17.
12. Schieman C, Wigle DA, Deschamps C, Nichols Iii FC, Cassivi SD, Shen KR, et al. Patterns of operative mortality following esophagectomy. *Diseases of the esophagus : official journal of the International Society for Diseases of the Esophagus / ISDE*. 2012. Epub 2012/01/17.
13. Haupt W, Riese J, Mehler C, Weber K, Zowe M, Hohenberger W. Monocyte function before and after surgical trauma. *Digestive surgery*. 1998;15(2):102-4. Epub 1998/12/09.
14. Weighardt H, Heidecke CD, Emmanuilidis K, Maier S, Bartels H, Siewert JR, et al. Sepsis after major visceral surgery is associated with sustained and interferon-gamma-resistant defects of monocyte cytokine production. *Surgery*. 2000;127(3):309-15. Epub 2000/03/15.
15. Hensler T, Heidecke CD, Hecker H, Heeg K, Bartels H, Zantl N, et al. Increased susceptibility to postoperative sepsis in patients with impaired monocyte IL-12 production. *J Immunol*. 1998;161(5):2655-9. Epub 1998/09/02.

16. Goebel A, Kavanagh E, Lyons A, Saporoschetz IB, Soberg C, Lederer JA, et al. Injury induces deficient interleukin-12 production, but interleukin-12 therapy after injury restores resistance to infection. *Annals of surgery*. 2000;231(2):253-61. Epub 2000/02/16.
17. Hensler T, Hecker H, Heeg K, Heidecke CD, Bartels H, Barthlen W, et al. Distinct mechanisms of immunosuppression as a consequence of major surgery. *Infection and immunity*. 1997;65(6):2283-91. Epub 1997/06/01.
18. Hershman MJ, Cheadle WG, Wellhausen SR, Davidson PF, Polk HC, Jr. Monocyte HLA-DR antigen expression characterizes clinical outcome in the trauma patient. *The British journal of surgery*. 1990;77(2):204-7. Epub 1990/02/01.
19. Venet F, Tissot S, Debard AL, Faudot C, Crampe C, Pachot A, et al. Decreased monocyte human leukocyte antigen-DR expression after severe burn injury: Correlation with severity and secondary septic shock. *Critical care medicine*. 2007;35(8):1910-7. Epub 2007/06/15.
20. Flohe S, Scholz M. HLA-DR monitoring in the intensive care unit--more than a tool for the scientist in the laboratory? *Critical care medicine*. 2009;37(10):2849-50. Epub 2009/10/30.
21. Schinkel C, Sendtner R, Zimmer S, Faist E. Functional analysis of monocyte subsets in surgical sepsis. *The Journal of trauma*. 1998;44(5):743-8; discussion 8-9. Epub 1998/05/29.
22. Wakefield CH, Carey PD, Foulds S, Monson JR, Guillou PJ. Changes in major histocompatibility complex class II expression in monocytes and T cells of patients developing infection after surgery. *The British journal of surgery*. 1993;80(2):205-9. Epub 1993/02/01.
23. Monneret G, Debard AL, Venet F, Bohe J, Hequet O, Bienvenu J, et al. Marked elevation of human circulating CD4+CD25+ regulatory T cells in sepsis-induced immunoparalysis. *Critical care medicine*. 2003;31(7):2068-71. Epub 2003/07/09.
24. Lukaszewicz AC, Grienay M, Resche-Rigon M, Pirracchio R, Faivre V, Boval B, et al. Monocytic HLA-DR expression in intensive care patients: interest for prognosis and secondary infection prediction. *Critical care medicine*. 2009;37(10):2746-52. Epub 2009/08/27.
25. Tato CM, O'Shea JJ. Immunology: what does it mean to be just 17? *Nature*. 2006;441(7090):166-8. Epub 2006/05/12.
26. Walz CR, Zedler S, Schneider CP, Albertsmeier M, Loehe F, Bruns CJ, et al. The potential role of T-cells and their interaction with antigen-presenting cells in mediating immunosuppression following trauma-hemorrhage. *Innate immunity*. 2009;15(4):233-41. Epub 2009/07/10.
27. Abraham E, Chang YH. The effects of hemorrhage on mitogen-induced lymphocyte proliferation. *Circulatory shock*. 1985;15(2):141-9. Epub 1985/01/01.
28. Riddle PR, Berenbaum MC. Postoperative depression of the lymphocyte response to phytohaemagglutinin. *Lancet*. 1967;1(7493):746-8. Epub 1967/04/08.
29. Stephan RN, Kupper TS, Geha AS, Baue AE, Chaudry IH. Hemorrhage without tissue trauma produces immunosuppression and enhances susceptibility to sepsis. *Arch Surg*. 1987;122(1):62-8. Epub 1987/01/01.
30. Shimaoka M, Hosotsubo K, Sugimoto M, Sakaue G, Taenaka N, Yoshiya I, et al. The influence of surgical stress on T cells: enhancement of early phase lymphocyte activation. *Anesthesia and analgesia*. 1998;87(6):1431-5. Epub 1998/12/08.
31. O'Mahony JB, Wood JJ, Rodrick ML, Mannick JA. Changes in T lymphocyte subsets following injury. Assessment by flow cytometry and relationship to sepsis. *Annals of surgery*. 1985;202(5):580-6. Epub 1985/11/01.
32. Feeney C, Bryzman S, Kong L, Brazil H, Deutsch R, Fritz LC. T-lymphocyte subsets in acute illness. *Critical care medicine*. 1995;23(10):1680-5. Epub 1995/10/01.
33. Hsieh CH, Hsu JT, Hsieh YC, Frink M, Raju R, Hubbard WJ, et al. Suppression of activation and costimulatory signaling in splenic CD4+ T cells after trauma-hemorrhage reduces T-cell function: a mechanism of post-traumatic immune suppression. *The American journal of pathology*. 2009;175(4):1504-14. Epub 2009/09/05.

34. Zellweger R, Ayala A, DeMaso CM, Chaudry IH. Trauma-hemorrhage causes prolonged depression in cellular immunity. *Shock*. 1995;4(2):149-53. Epub 1995/08/01.
35. Angele MK, Knoferl MW, Ayala A, Bland KI, Chaudry IH. Testosterone and estrogen differently effect Th1 and Th2 cytokine release following trauma-haemorrhage. *Cytokine*. 2001;16(1):22-30. Epub 2001/10/24.
36. O'Sullivan ST, Lederer JA, Horgan AF, Chin DH, Mannick JA, Rodrick ML. Major injury leads to predominance of the T helper-2 lymphocyte phenotype and diminished interleukin-12 production associated with decreased resistance to infection. *Annals of surgery*. 1995;222(4):482-90; discussion 90-2. Epub 1995/10/01.
37. Entleutner M, Traeger T, Westerholt A, Holzmann B, Stier A, Pfeffer K, et al. Impact of interleukin-12, oxidative burst, and iNOS on the survival of murine fecal peritonitis. *International journal of colorectal disease*. 2006;21(1):64-70. Epub 2005/03/10.
38. Ishikawa M, Nishioka M, Hanaki N, Miyauchi T, Kashiwagi Y, Ioki H, et al. Perioperative immune responses in cancer patients undergoing digestive surgeries. *World journal of surgical oncology*. 2009;7:7. Epub 2009/01/14.
39. Tatsumi H, Ura H, Ikeda S, Yamaguchi K, Katsuramaki T, Asai Y, et al. Surgical influence on TH1/TH2 balance and monocyte surface antigen expression and its relation to infectious complications. *World journal of surgery*. 2003;27(5):522-8. Epub 2003/04/26.
40. van Sandick JW, Gisbertz SS, ten Berge IJ, Boermeester MA, van der Pouw Kraan TC, Out TA, et al. Immune responses and prediction of major infection in patients undergoing transhiatal or transthoracic esophagectomy for cancer. *Annals of surgery*. 2003;237(1):35-43. Epub 2002/12/24.
41. Matsuda A, Furukawa K, Suzuki H, Kan H, Tsuruta H, Matsumoto S, et al. Does impaired TH1/TH2 balance cause postoperative infectious complications in colorectal cancer surgery? *The Journal of surgical research*. 2007;139(1):15-21. Epub 2007/02/13.
42. Abraham E, Freitas AA. Hemorrhage in mice induces alterations in immunoglobulin-secreting B cells. *Critical care medicine*. 1989;17(10):1015-9. Epub 1989/10/01.
43. Nishimura T, Yamamoto H, deSerres S, Meyer AA. Transforming growth factor-beta impairs postburn immunoglobulin production by limiting B-cell proliferation, but not cellular synthesis. *The Journal of trauma*. 1999;46(5):881-5. Epub 1999/05/25.
44. Infante-Duarte C, Horton HF, Byrne MC, Kamradt T. Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J Immunol*. 2000;165(11):6107-15. Epub 2000/11/22.
45. Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B, et al. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity*. 2000;13(5):715-25. Epub 2000/12/15.
46. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *The Journal of experimental medicine*. 2005;201(2):233-40. Epub 2005/01/20.
47. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature immunology*. 2005;6(11):1123-32. Epub 2005/10/04.
48. Ivanov, II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, et al. The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell*. 2006;126(6):1121-33. Epub 2006/09/23.
49. Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature*. 2008;453(7198):1051-7. Epub 2008/06/20.
50. Miller LS, Cho JS. Immunity against *Staphylococcus aureus* cutaneous infections. *Nature reviews Immunology*. 2011;11(8):505-18. Epub 2011/07/02.

51. Milner JD, Brenchley JM, Laurence A, Freeman AF, Hill BJ, Elias KM, et al. Impaired T(H)17 cell differentiation in subjects with autosomal dominant hyper-IgE syndrome. *Nature*. 2008;452(7188):773-6. Epub 2008/03/14.
52. Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, et al. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature*. 2006;441(7090):231-4. Epub 2006/05/02.
53. Ye P, Rodriguez FH, Kanaly S, Stocking KL, Schurr J, Schwarzenberger P, et al. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *The Journal of experimental medicine*. 2001;194(4):519-27. Epub 2001/08/22.
54. Chung DR, Kasper DL, Panzo RJ, Chitnis T, Grusby MJ, Sayegh MH, et al. CD4+ T cells mediate abscess formation in intra-abdominal sepsis by an IL-17-dependent mechanism. *J Immunol*. 2003;170(4):1958-63. Epub 2003/02/08.
55. Khader SA, Bell GK, Pearl JE, Fountain JJ, Rangel-Moreno J, Cilley GE, et al. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during Mycobacterium tuberculosis challenge. *Nature immunology*. 2007;8(4):369-77. Epub 2007/03/14.
56. Huang W, Na L, Fidel PL, Schwarzenberger P. Requirement of interleukin-17A for systemic anti-Candida albicans host defense in mice. *The Journal of infectious diseases*. 2004;190(3):624-31. Epub 2004/07/10.
57. Maddur MS, Miossec P, Kaveri SV, Bayry J. Th17 cells: biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies. *The American journal of pathology*. 2012;181(1):8-18. Epub 2012/05/30.
58. Chabaud M, Durand JM, Buchs N, Fossiez F, Page G, Frappart L, et al. Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. *Arthritis and rheumatism*. 1999;42(5):963-70. Epub 1999/05/14.
59. Lock C, Hermans G, Pedotti R, Brendolan A, Schadt E, Garren H, et al. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nature medicine*. 2002;8(5):500-8. Epub 2002/05/02.
60. Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, McKenzie BS, Blumenschein WM, Mattson JD, et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nature immunology*. 2007;8(9):950-7. Epub 2007/08/07.
61. Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, Araki Y, et al. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2003;52(1):65-70. Epub 2002/12/13.
62. Awasthi A, Kuchroo VK. Th17 cells: from precursors to players in inflammation and infection. *International immunology*. 2009;21(5):489-98. Epub 2009/03/06.
63. Hardy MY, Vari F, Rossetti T, Hart DN, Prue RL. A flow cytometry based assay for the enumeration of regulatory T cells in whole blood. *Journal of immunological methods*. 2012. Epub 2012/07/25.
64. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *The Journal of experimental medicine*. 2006;203(7):1701-11. Epub 2006/07/05.
65. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature immunology*. 2003;4(4):330-6. Epub 2003/03/04.
66. Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annual review of immunology*. 2004;22:531-62. Epub 2004/03/23.
67. Wildin RS, Smyk-Pearson S, Filipovich AH. Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome. *Journal of medical genetics*. 2002;39(8):537-45. Epub 2002/08/06.

68. Belkaid Y, Rouse BT. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nature immunology*. 2005;6(4):353-60. Epub 2005/03/24.
69. Maizels RM, Smith KA. Regulatory T cells in infection. *Advances in immunology*. 2011;112:73-136. Epub 2011/11/29.
70. Rowe JH, Ertelt JM, Way SS. Foxp3(+) regulatory T cells, immune stimulation and host defence against infection. *Immunology*. 2012;136(1):1-10. Epub 2012/01/04.
71. Ling EM, Smith T, Nguyen XD, Pridgeon C, Dallman M, Arbery J, et al. Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet*. 2004;363(9409):608-15. Epub 2004/02/28.
72. Meiler F, Klunker S, Zimmermann M, Akdis CA, Akdis M. Distinct regulation of IgE, IgG4 and IgA by T regulatory cells and toll-like receptors. *Allergy*. 2008;63(11):1455-63. Epub 2008/10/18.
73. Hein F, Massin F, Cravoisy-Popovic A, Barraud D, Levy B, Bollaert PE, et al. The relationship between CD4+CD25+CD127- regulatory T cells and inflammatory response and outcome during shock states. *Crit Care*. 2010;14(1):R19. Epub 2010/02/17.
74. Leng FY, Liu JL, Liu ZJ, Yin JY, Qu HP. Increased proportion of CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells during the early-stage sepsis in ICU patients. *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi*. 2012. Epub 2012/08/28.
75. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006;441(7090):235-8. Epub 2006/05/02.
76. Housley WJ, Adams CO, Nichols FC, Puddington L, Lingenheld EG, Zhu L, et al. Natural but not inducible regulatory T cells require TNF-alpha signaling for in vivo function. *J Immunol*. 2011;186(12):6779-87. Epub 2011/05/17.
77. Asseman C, Read S, Powrie F. Colitogenic Th1 cells are present in the antigen-experienced T cell pool in normal mice: control by CD4+ regulatory T cells and IL-10. *J Immunol*. 2003;171(2):971-8. Epub 2003/07/09.
78. Uhlig HH, Coombes J, Mottet C, Izcue A, Thompson C, Fanger A, et al. Characterization of Foxp3+CD4+CD25+ and IL-10-secreting CD4+CD25+ T cells during cure of colitis. *J Immunol*. 2006;177(9):5852-60. Epub 2006/10/24.
79. Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*. 2007;450(7169):566-9. Epub 2007/11/23.
80. Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *The Journal of experimental medicine*. 2004;199(7):971-9. Epub 2004/04/07.
81. Haas J, Hug A, Viehöver A, Fritzsching B, Falk CS, Filser A, et al. Reduced suppressive effect of CD4+CD25high regulatory T cells on the T cell immune response against myelin oligodendrocyte glycoprotein in patients with multiple sclerosis. *European journal of immunology*. 2005;35(11):3343-52. Epub 2005/10/06.
82. You S, Belghith M, Cobbold S, Alyanakian MA, Gouarin C, Barriot S, et al. Autoimmune diabetes onset results from qualitative rather than quantitative age-dependent changes in pathogenic T-cells. *Diabetes*. 2005;54(5):1415-22. Epub 2005/04/28.
83. Bach JF, Chatenoud L. Tolerance to islet autoantigens in type 1 diabetes. *Annual review of immunology*. 2001;19:131-61. Epub 2001/03/13.
84. Demetri GD, Griffin JD. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood*. 1991;78(11):2791-808. Epub 1991/12/01.

85. Miyajima A, Mui AL, Ogorochi T, Sakamaki K. Receptors for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-3, and interleukin-5. *Blood*. 1993;82(7):1960-74. Epub 1993/10/01.
86. Metcalf D. The molecular biology and functions of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factors. *Blood*. 1986;67(2):257-67. Epub 1986/02/01.
87. Monroy RL, Davis TA, MacVittie TJ. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: more than a hemopoietin. *Clinical immunology and immunopathology*. 1990;54(3):333-46. Epub 1990/03/01.
88. Enzler T, Gillessen S, Manis JP, Ferguson D, Fleming J, Alt FW, et al. Deficiencies of GM-CSF and interferon gamma link inflammation and cancer. *The Journal of experimental medicine*. 2003;197(9):1213-9. Epub 2003/05/07.
89. Jinushi M, Nakazaki Y, Dougan M, Carrasco DR, Mihm M, Dranoff G. MFG-E8-mediated uptake of apoptotic cells by APCs links the pro- and antiinflammatory activities of GM-CSF. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(7):1902-13. Epub 2007/06/09.
90. Schulz KF, Altman DG, Moher D. CONSORT 2010 statement: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. *BMJ*. 2010;340:c332. Epub 2010/03/25.

10.Eidesstattliche Versicherung

Ich, Johannes Kurth, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Einfluss einer Therapie mit GM-CSF auf die Konzentrationen von IL-17 produzierenden Th17-Zellen und regulatorischen T-Zellen bei Patienten mit postoperativer Immunsuppression.“ 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 etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, 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.

Berlin, den 06.02.2014

Johannes Kurth

11. Lebenslauf

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

Anteilerklärung an erfolgten Publikationen:

Johannes Kurth hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Claudia Spies, Alawi Lütz, Markus Renius, Gunnar Lachmann, Clarissa von Haefen, Klaus-Dieter Wernecke, Marcus Bahra, Alexander Schiemann, Marco Paupers und Christian Meisel: Sargramostim but not vaccination improves HLA-DR response in immune suppressed patients after esophageal or pancreatic resection, Eingereicht 2013 bei Critical Care Medicine
Beitrag im Einzelnen: Mitarbeit bei der Datenerhebung, Erstellung der Datenbank, Auswertung der Daten in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Wernecke und Frau Prof. Dr. Spies.

Preise / Abstracts:

Lachmann G, Kurth J, Wernecke KD, Spies C: Relevance of postoperative HLA-DR stimulation on infection parameters, Poster European Students Conference (ESC) Berlin 2012, Posterpreis: Bestes Poster der Kategorie Anästhesie

Beitrag im Einzelnen: Mitarbeit bei der Datenerhebung, Erstellung der Datenbank & Auswertung, Korrekturen.

Kurth J, Lachmann G, Renius M, Wernecke KD, Spies C: Influence of an immunomodulatory treatment on Il-17 producing Th17 cells, regulatory T-cells and the occurrence of infectious diseases in patients with postoperative immunodeficiency: a randomized controlled trial. Anästh Intensivmed 53 (Suppl. 5): 512, 2012

Beitrag im Einzelnen: Mitarbeit bei der Datenerhebung, Erstellung der Datenbank & Auswertung der Daten. Erstellung der Präsentation, Verfassen des Abstracts, Freier Vortrag

Lachmann G, Kurth J, Wernecke KD, Spies C: Effect of postoperative stimulation with GM-CSF or Mutagrip on the infection parameters of temperature, WBC, CRP, PCT and IL-6. Anästh Intensivmed 53 (Suppl. 5): 531, 2012

Beitrag im Einzelnen: Mitarbeit bei der Datenerhebung, Erstellung der Datenbank & Auswertung, Korrekturen.

Weitere Publikationen unter Mitwirkung von Johannes Kurth ohne Bezug zur Promotion:

Kurth J, DeFeo EM, Cheng LL: Magnetic resonance spectroscopy: a promising tool for the diagnostics of human prostate cancer? Urologic Oncology 2011; 29

Beitrag im Einzelnen: Literaturrecherche, Verfassen der Publikation.

Rosling R, Kurth J, Decelle EA, Wu CL, McDougal WS, Cheng LL: Metabolomic characterization of human prostate cancer with intact tissue MRS, Traditional Poster Session, ISMRM Conference Melbourne, Australia, 5.- 11.5.2012

Beitrag im Einzelnen: Mitarbeit bei der Datenerhebung, Erstellung der Datenbank & Auswertung, Korrekturen.

Dittrich R, Kurth J, Decelle EA, Defeo EM, Taupitz M, Wu S, Wu CL, McDougal WS, Cheng LL: Assessing prostate cancer growth with citrate measured by intact tissue proton magnetic resonance spectroscopy, Prostate Cancer Prostatic Dis. 2012 Jan 31

Beitrag im Einzelnen: Mitarbeit bei der Datenerhebung, Erstellung der Datenbank & Auswertung, Korrekturen.

Weitere Publikationen zum Thema sind nach Erscheinen der Primärpublikation geplant.

Berlin, den 06.02.2014

Johannes Kurth

12.Danksagung

Frau Prof. Dr. Claudia Spies gilt mein herzlicher Dank für die Betreuung meiner Doktorarbeit. Sie war für mich während der Planung und Durchführung dieser klinischen Untersuchung, sowie bei der Datenauswertung jederzeit ansprechbar und stand mir bei Problemen und Fragen kurzfristig mit konstruktiven Vorschlägen zur Seite. Ihr enormes Fachwissen, ihre Gabe zur schnellen und unkomplizierten Lösung von Problemen aller Art und ihr herzlicher Umgang mit den Mitarbeitern der Klinik sind für mich stets ein großes Vorbild.

Des Weiteren möchte ich dem Prüfarzt der Studie, Markus Renius ganz herzlich für seinen persönlichen Einsatz danken, der essentiell für das Gelingen der Studie war. Auch er stand mir jederzeit mit wertvollen Ratschlägen für meine Dissertation zur Seite. Zusätzlich konnte ich von ihm viel für meine klinische Ausbildung lernen und nicht zuletzt sorgte er zu jeder Tages- und Nachtzeit für die nötige Kurzweil während der vielen Stunden auf Station, im Operationsaal und Büro.

Frau Dr. Clarissa von Haefen möchte ich an dieser Stelle meinen Dank aussprechen, da sie mich bei der Laborarbeit, bei der Auswertung der Ergebnisse und beim Schreiben der Dissertation besonders unterstützt hat. Auch Herrn Dr. Christian Meisel möchte ich für seine Unterstützung bei der Laborarbeit danken. Für ihre Unterstützung bei der Dokumentation danke ich Frau Kathrin Scholtz und Herrn Professor Dr. Klaus-Dieter Wernecke danke ich ganz herzlich für die umfassende und geduldige Beratung bei der statistischen Auswertung.

Für eine ebenso konstruktive wie angenehme Zusammenarbeit möchte ich mich auch ganz besonders bei meinen KollegInnen und FreundInnen Fatima Yürek, Carolyn Geipel und Gunnar Lachmann bedanken.

Ferner möchte ich allen Patienten meinen Dank und Respekt aussprechen. Sie waren trotz ihrer oft schweren Grunderkrankung bereit, einen Beitrag für die Wissenschaft zu leisten. Durch ihr entgegengebrachtes Vertrauen und ihre Kooperation haben sie diese Studie ermöglicht.

Ein ganz besonderes Dankeschön gilt meiner Ehefrau Yvonne Kurth. Für ihre Geduld und ihr Verständnis das sie mir während der letzten Jahre entgegengebracht hat kann ich ihr nicht genug danken. Ihre konkreten Ratschläge waren mir stets ebenso wichtig wie ihre moralische Unterstützung. In diesem Sinne möchte ich auch meiner Tochter Frieda einen großen Dank aussprechen, die für mich eine große Motivationsquelle ist. Undenkbar wäre diese Dissertation auch ohne die liebevolle Unterstützung nicht nur während des Studiums und der Promotion durch meine Eltern Andrea Kurth und Marcel Kurth.