

2. Methodik

2.1 Studien Design

Nach Billigung durch die Ethikkommission der Landesärztekammer Brandenburg wurden 25 Patienten der NYHA Klasse I-IV mit koronarer Herzerkrankung (Zwei- und Drei-Gefäßerkrankung) untersucht, bei denen eine elektive aortokoronare Bypassoperation mit Hilfe der EKZ notwendig war. Alle Patienten hatten nach ausführlicher Aufklärung ihre schriftliche Zusage zu der genannten Studie erteilt. Keiner der Patienten hatte präoperativ klinische Zeichen einer Infektion oder einer immunologischen Erkrankung und keiner der Patienten erhielt präoperativ Medikamente, die üblicherweise als Immunsuppressiva eingesetzt werden.

Aufgrund der besonderen Bedingungen im Rahmen einer Bypassoperation mit postoperativer Nachbeatmung wegen Mikroatektasen und einer Häufigkeit von supraventrikulären Tachykardien zwischen 10 % und 40 %, bedingt durch Faktoren wie z.B. perikardiale Entzündung, Störungen des autonomen Nervensystems, Betablockerentzug, exzessive Katecholaminausschüttung und kurzfristige Volumenverschiebungen und Druckunterschiede in den Vorhöfen, welche die elektrischen Eigenschaften der Vorhöfe beeinflussen (Andrews et al., Ommen et al.), wurden in dieser Studie nur die folgenden „klassischen“ Symptome als Einschlusskriterien für ein SIRS verwandt.

Körpertemperatur $>38,0\text{ °C}$ oder $<36,0\text{ °C}$

Leukozytenzahl $>12000/\text{mm}^3$ oder $<4000/\text{mm}^3$

Als zusätzliches SIRS-Symptom mussten die Patienten der SIRS-Gruppe einen perioperativen Laktatanstieg auf $> 2,5\text{ mmol/l}$ aufweisen (Normalwert $< 2,0\text{ mmol/l}$; Bestimmung mit dem Blutgasanalysegerät von Chiron Diagnostics, Typ 860).

Diese drei Kriterien zusammen wurden in dieser Studie als „modifizierte SIRS-Parameter“ bezeichnet.

Die Einteilung der Patienten in die SIRS-Gruppe oder Vergleichsgruppe fand jeweils am Morgen des ersten postoperativen Tages um 7.00 Uhr anhand der zwei zuvor genannten SIRS-Symptome und des perioperativen Laktatanstiegs $> 2,5\text{ mmol/l}$ statt.

Tabelle 2: zeigt die demographischen und operativen Daten der SIRS-Patienten und der Patienten mit unauffälligem Verlauf (Vergleichspatienten).

	SIRS-Patienten	Vergleichspatienten	
Anzahl der Patienten	n = 8	n = 17	
	Mittelwerte		p-Wert*
Alter (in Jahren):	63,7	65,2	0.58
Anteil: Männer/Frauen	8 / 0	15 / 2	0.53
Körpergröße (in cm):	169	171,9	0.31
Körpergewicht (in kg):	74,9	80,7	0.19
NYHA-Klasse I-IV:	3,1	2,7	0.21
Linksventrikuläre Ejektionsfraktion (%)	44	54	0.26
PCWP (mmHg):	14,6	12,5	0.33
Totale Bypass-Zeit (in min):	131,5	94,9	0.01
Aortenklemmzeit (in min):	53,4	52,8	0.88
Anzahl der Anastomosen:	3,6	3,4	0.68
Verwendung der LIMA:	8 / 8	16 / 17	0.61
Präoperatives CRP (mg/l)	17,2	19,4	0.13

*(p-Wert angegeben lt. Wilcoxon-Rangsummentest)

2.2 Perioperatives Vorgehen

Das anästhesiologische Vorgehen war bei allen Patienten gleich.

Nach einer Prämedikation mit 0.1-0.15 mg / kg KG Midazolam po (Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen) wurde eine periphere Vene und die Arteria radialis kanüliert.

Die Einleitung der Anästhesie wurde mit 0.5-1.0 µg / kg KG Sufentanyl (Janssen Pharmaceutica, Beerse, Belgien) und 0.2-0.4 mg / kg KG Etomidat-Lipuro (B. Braun Melsungen AG, Melsungen) durchgeführt. Die Muskelrelaxation wurde mit 0.1 mg / kg KG Pancuroniumbromid (Organon S.A., Frankreich) erreicht. Nach der endotrachealen Intubation wurde ein zentraler Venenkatheter über die Vena jugularis interna eingeführt.

Die weitere Narkose wurde mit Sufentanyl 1.0-1.5 µg / kg KG / h und Propofol 2.0-3.5 mg / kg KG / h (Fresenius-Kabi, Bad Homburg) aufrechterhalten. Die Herzlungenmaschine (Stöckert Typ S III, München) wurde mit 500 ml HAES 10% 200/0,5 (Fresenius-Kabi, Bad Homburg) und 1000 ml Ringerlaktat (Fresenius-Kabi, Bad Homburg) als Primevolumen vorgefüllt. Zusätzlich wurden dem Primevolumen der Herzlungenmaschine 3 mio KIE des Kallikrein-Inhibitors Aprotinin (Trasylol, Bayer, Leverkusen) zugesetzt wegen der bekannten Effekte auf die Fibrinolyse und der unspezifischen antiinflammatorischen Wirkung. Zur Oxigenierung wurde ein Membranoxigenator (Modul 7500 DIDECO, Italien) verwendet.

Der chirurgische Zugang erfolgte durch eine mediane Sternotomie. Heparin (Liquemin N, Hoffmann-La Roche AG) wurde in einer Dosis von 400 I.E. / kg KG zugeführt, um eine ACT (activated clotting time) > 450 sec vor Aufnahme der EKZ zu erzielen. Der linke Ventrikel wurde über einen Vent an der Aortenwurzel entlastet und mittels Blutkardioplegie und hyperkaliämischer Lösung (Calafiore) der Herzstillstand induziert. Der Fluss an der Herzlungenmaschine wurde bei 2.5-3.0 l / min pro qm Körperoberfläche gehalten, der mittlere arterielle Blutdruck zwischen 50 und 80 mm Hg und die Körpertemperatur bei 37.0 °C. Zur Reduktion des Ischämie/Reperfusionsoödems wurden 1g Magnesium, 125 ml Mannitol 20 % und 250 mg Urbason vor Aufnahme der EKZ und 1 g Magnesium und 125 ml Mannitol 20 % nach Eröffnung der Aorta über den zentralen Venenkatheter injiziert. Nach der Dekanülierung wurde Protaminhydrochlorid (Protamin ICN 1000 I.E./ml, ICN Pharmaceuticals Germany, Frankfurt/M) in einer Dosierung von 1 ml pro 1000 I.E. Heparin gegeben, um die Heparinwirkung zu neutralisieren. Als Volumenersatztherapie wurden ca. 1000 ml Ringerlaktat (Fresenius-Kabi) und Gelafundin 4% (B. Braun, Melsungen AG) nach klinischen Kriterien bzw. bis zu einem zentralvenösen Venendruck von 15 mmHg appliziert.

2.3 Messzeitpunkte

Die venöse Blutabnahme zur Bestimmung des Cytokin IL6, der Complementfaktoren, der Monozytenaktivierung, der C1-INH-Aktivität und des Cortisolspiegels sowie aller anderer Parameter fand präoperativ um 7.30 Uhr kurz vor Narkoseeinleitung und 24 Stunden später am 1. postoperativen Tag ebenfalls um 7.30 Uhr aus einer peripheren Venenkanüle oder dem zentralen Venenkatheter statt.

2.4 Messmethoden

Die Gerinnungswerte (Quickwert und PTT) wurden mit dem Gerät Diagnostica STA-R (Stago, Frankreich) bestimmt.

Das Blutbild wurde mit dem Gerät Coulter LH 750 Hematology Analyzer (Beckman Coulter, Krefeld) bestimmt.

Creatinkinase (CK), LDH, Creatinin, Harnstoff, Fibrinogen, ASAT und CRP wurden mit dem Gerät Vitros 750 XRC Chemistry System (Johnson & Johnson, USA) bestimmt.

Das Cortisol wurde mit dem Gerät Elecsys 2010 (Roche Diagnostics GmbH) bestimmt.

Das Cytokin IL6 wurde im EDTA-Blut (Plasma) bestimmt, die Blutprobe innerhalb von 15 min nach Entnahme bei 1000 g zentrifugiert und das Plasma vor der Bestimmung auf – 80 °C eingefroren. Zur Bestimmung wurde der enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit IMMULITE der Firma DPC Biermann GmbH, Bad Nauheim verwendet.

Die Complementfaktoren C4d, Bb und SC5b-9 (löslicher Membranangriffskomplex) wurden im EDTA-Blut (Plasma) bestimmt, die Blutprobe innerhalb von 15 min nach Entnahme bei 1000 g zentrifugiert und das Plasma vor Bestimmung auf – 80 °C eingefroren.

Als Maß für die Aktivierung des klassischen Wegs der Complementkaskade wurde das C4d-Fragment im Plasma bestimmt, unter Anwendung des Quidel C4d Fragment Enzyme Immunoassay. Die C4d-Fragment-Reagenzien wurden zur Bestimmung auf Raumtemperatur erwärmt (15-30 °C) und anschließend in einer Drei-Schritte Prozedur gemäß den Herstellerangaben bearbeitet (Quidel, Mountain View, CA, USA).

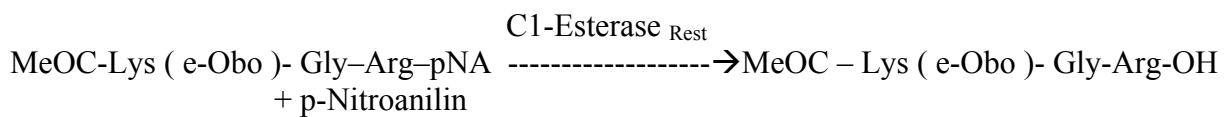
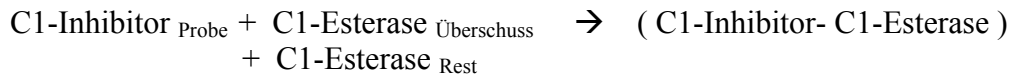
Als Maß für die Aktivierung des alternativen Wegs der Complementkaskade wurde das Bb-Fragment im Plasma mit Hilfe des Quidel Bb-Fragment Enzyme Immunoassay im Plasma bestimmt. Die Bb-Fragment-Reagenzien wurden zur Bestimmung auf Raumtemperatur erwärmt (15-30 °C) und anschließend in einer Drei-Schritte Prozedur gemäß den Herstellerangaben bearbeitet (Quidel, Mountain View, CA, USA).

Als Maß für die gemeinsame Endstrecke der Complementkaskade wurde SC5b-9 (löslicher Membranangriffskomplex) mit Hilfe des Quidel SC5b-9 Enzyme-Immunoassay im Plasma bestimmt. Die SC5b-9-Reagenzien wurden zur Bestimmung auf Raumtemperatur erwärmt (15-30 °C) und anschließend in einer Drei-Schritte Prozedur gemäß den Herstellerangaben bearbeitet (Quidel, Mountain View, CA, USA).

Die funktionelle Aktivität von C1-Inhibitor (C1-INH) wurde im Citratplasma bestimmt, wie von der Firma Dade Behring Marburg GmbH beschrieben.

Blutabnahme mit Sarstedt-Monovetten Typ 9NC (0,3 ml Citratlösung auf 3ml).

C1-Inhibitor der Probe hemmt vorgelegte C1-Esterase. Die Restaktivität der C1-Esterase wird in einem kinetischen Test mit Extinktionszunahme bei 405 nm nach folgendem Reaktionsschema bestimmt.



Auswertung nach der Zweipunkt-Methode:

C1-Esterase, Substrat-Reagenz sowie die Kunststoffküvetten bzw. – röhren auf 37 °C vorwärmen.

	C1-Esterase-Enzymwert (CEW)	Probe	Probenleerwert
Isotonische Kochsalzlösung	20µl	--	1100µl
Plasma-Probe	--	20µl	20µl
C1-Esterase	1000µl	1000µl	--

Mischen und genau 5 min bei 37 °C inkubieren.

Substrat-Reagenz	100µl	100µl	--
------------------	-------	-------	----

Sofort mischen und nach 2 min Zugabe von:

Essigsäure 20 %	500µl	500µl	500µl
-----------------	-------	-------	-------

Sofort mischen und Extinktion innerhalb von 60 min gegen Probenleerwert bestimmen.

Für jede Mess-Serie ist mindestens 1 C1-Esterase-Enzymwert (E_{CEW}) und 1 Referenzwert, der mit einem Bezugsplasma mit Sollwertangabe für C1-Inhibitor als Probe bestimmt wird, erforderlich. Damit wird der laborinterne Faktor F_L berechnet:

$$F_L = \frac{\text{Sollwert (\% der Norm)}_{\text{Bezugsplasma}}}{E_{\text{CEW}} - E_{\text{Bezugsplasma}}}$$

Der C1-Inhibitor-Gehalt der Probe in % der Norm ergibt sich dann nach folgender Formel:

$$\text{C1-Inhibitor}_{\text{Probe}} (\% \text{ der Norm}) = F_L \times (E_{\text{CEW}} - E_{\text{Probe}})$$

Die Messung der Monozytenaktivierung erfolgte mittels FACS (fluorescence activated cell sorter). Untersucht wurde die HLA-DR-Expression auf Monozyten im venösen Heparinblut (Abnahme mit Sarstedt-Monovetten Typ LH 16 IE Heparin/ml Blut auf 7,5 ml) mit dem Quanti Brite Kit (BD Biosciences, San Jose, USA).

Quanti Brite: Anti-HLA-DR-Phycoerythrin (PE) / Anti-Monocyte-Per CP-Cy 5.5
(20µl/test) (clone L234) (clone Mphi P9)

Anti-HLA-DR clone L234 ist ein Hybrid aus Maus NS-1/1-Ag4 Myelomzellen mit Milzzellen von BALB/c Mäusen, die mit Blut-Monozyten eines Patienten mit rheumatoider Arthritis immunisiert wurden. Anti-HLA-DR reagiert mit einem nicht polymorphen HLA-DR Epitop ohne Kreuzreaktion mit HLA-DQ oder HLA-DP.

Anti-Monocyte Per CP-Cy 5.5 Reagenz erkennt Monozyten durch zwei Spezifitäten:

Es erkennt CD14, ein humanes Monozyten-Antigen und Mr 55 kDa, welches die Mehrheit einer Monozytenpopulation betrifft. Zusätzlich bindet Anti-Monozyten Per CP-Cy 5.5 an die FcγR1 (CD64) Region, indem es die Bindung von Cyanin an CD64 nutzt.

Dadurch können alle Monozyten in einer Probe identifiziert werden.

Die venösen Vollblutproben (50 µl) wurden innerhalb von 15 min nach Abnahme mit dem Quantibrite-Reagenz (20 µl) für 25-35 min inkubiert und mit FACS Lysing Solution (BD Biosciences) bei Raumtemperatur lysiert und fixiert. Bei jeder der Blutproben wurde die HLA-DR-Expression bestimmt; einmal sofort nativ und zusätzlich nach einer Stimulation mit LPS (ex vivo Stimulationskit MILENIA, Firma DPC Biermann GmbH, Bad Nauheim) und zwar in den Konzentrationen: 50 pg/ml LPS und 500 pg/ml LPS.

Zur Stimulation mit den unterschiedlichen LPS-Konzentrationen wurden 50 µl Vollblut mit 500 µl der LPS-Stimulationslösung über 4 Stunden bei 37 ° C inkubiert. Anschließend wurde die HLA-DR-Expression der stimulierten Probe gemessen. Die Flow-Cytometrie Analyse wurde mit Hilfe eines FACScan (FACS Calibur) mit Cell Quest software (Becton Dickinson, Heidelberg) durchgeführt.

10.000 Leukozyten wurden pro "gating" hinsichtlich ihrer CD14 Expression und "side-scatter" Eigenschaften analysiert. Dabei wurden ca. 1000 Monozyten-events pro "gating" untersucht. Das Resultat wurde angegeben als "mean fluorescence intensity" (MFI) über die gesamte Monozytenpopulation (Wolk et al.). Die tägliche Eichung zur Konstanthaltung der Messintensität hinsichtlich Vorwärtsstreulicht/Seitwärtsstreulicht (Zellzuordnung hinsichtlich Größe und Granularität) und Einstellung der PMT-Spannung für den PE-Kanal wurde mit Kontroll-beads der Firma Becton Dickinson, Heidelberg (CaliBRITE-beads) durchgeführt.

2.5 Statistische Analyse

Die Berechnung der erhobenen Daten wurde mit der Software R 1.7.1 durchgeführt, R Development Core Team (2003).

<http://www.r-project.org>

Es wurde ein Wilcoxon-Rangsummentest angewendet.

Ein p-Wert < 0.05 wurde als signifikant gewertet.

Die Grafiken sind Box-Whisker-Plots.

Das untere Ende der Box entspricht der 1. Quartile, das obere Ende der Box entspricht der 3. Quartile. Die Box wird durch den Median geteilt.

Die Whiskers spannen sich über die Enden der Box hinaus und zwar bis zu den äußersten Werten, welche nicht mehr als das 1,5 fache der Boxlänge entfernt von der Box sind.

Die Ausreißer sind in den Grafiken als Rhomben markiert.

Die Berechnung der Daten für Pearson's Chi-squared Test und Fisher's Exact Test wurden mit der Software R 1.8 durchgeführt, R Development Core Team (2003).

<http://www.r-project.org>