

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

DISSERTATION

Auswirkungen der intraoperativen thorakalen Periduralanästhesie bei
ausgedehnten abdominalchirurgischen Operationen auf die Stressantwort
und die inflammatorische Kapazität der T-Helferzellen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von

Jan Lenze
aus
Münster

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. D. Keh
 2. Priv.-Doz. Dr. V. von Dossow-Hanfstingl
 3. Prof. Dr. M. Weiss

Datum der Disputation: 21.01.2011

Datum der Promotion: 08.04.2011

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	5
1 Einleitung	7
1.1 Das Immunsystem	7
1.1.1 Grundlagen der Immunologie	7
1.1.2 T-Helferzellen und immunologische Kompetenz	8
1.1.3 Interferon- γ und TH1-Antwort	9
1.1.4 Grundlegende Wirkung und Funktion des Interleukin-10	10
1.2 Stressantwort, Stresshormone Kortisol und Adrenalin und chirurgischer Stress	12
1.2.1 Antiinflammation durch die Stressantwort	12
1.2.1.1 Kortisol	13
1.2.1.2 Adrenalin	13
1.3 Narkose	14
1.3.1 Verminderung der Stressantwort	14
1.4 Stand der Forschung	15
2 Fragestellung	16
3 Methoden	17
3.1 Patienten und Einschlusskriterien	17
3.2 Studienprotokoll und anästhesiologisches Management	17
3.3 Postoperative Schmerztherapie	21
3.4 Zeitpunkte der Blutentnahmen und Verarbeitung der Blutproben	22
3.4.1 Bestimmung von Kortisol und Adrenalin	22
3.4.2 Stimulation mit Concanavalin A	23
3.4.3 Bestimmung der Zytokinkonzentrationen	24
3.4.4 Durchflusszytometrie	27
3.4.4.1 Aufbereitung der Blutproben	28
3.5 Datenverarbeitung und statistische Auswertung	31
4 Ergebnisse	32
4.1 Patienten, intra- und postoperative Daten	32
4.2 Kortisol	36

4.3 Adrenalin	37
4.4 T-Helfer-Lymphozyten	38
4.5 IFN- γ (Plasma)	39
4.6 IL-10 (Plasma)	40
4.7 IFN- γ /IL-10 Ratio (Plasma)	41
4.8 IFN- γ (Concanavalin A)	42
4.9 IL-10 (Concanavalin A)	43
4.10 IFN- γ /IL-10 Ratio (Concanavalin A)	44
5 Diskussion	45
5.1 Reduktion der Stressantwort	45
5.2 Auswirkungen der Kombinationsanästhesie auf die Anzahl und die immunologische Funktion der TH1-Lymphozyten	46
5.2.1 Anzahl der TH1-Zellen	46
5.2.2 Immunologische Funktion der TH1-Zellen	48
5.3 Klinische Auswirkungen der Kombinationsanästhesie in der vorliegenden Studie	49
5.4 Bedeutung der Stressantwort und die Rolle der Kombinationsanästhesie	50
5.5 Schlussbemerkung	53
6 Zusammenfassung	54
7 Literaturverzeichnis	56
8 Danksagung	62
9 Erklärung an Eides statt	63
10 Publikationsliste	64
11 Lebenslauf	65

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACTH	Adrenokortikotropin
APC	Antigen-präsentierende Zellen
BIS	Bispectral Index
CD	Cluster of Differentiation
Concanavalin A	ConA
CRF	Corticotropin-Releasing-Hormons
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEG	Elektroenzephalogramm
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FACScan [®]	Durchflusszytometer
FKS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht
HHA	Hypothalamo-Hypophysäre Achse
HPLC	high pressure liquid chromatography
HRP	Horseradish Peroxidase
IFN- γ	Interferon-gamma
IgA	Immunglobulin A
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
i.v.	intravenös
IL-10	Interleukin-10
IL-12	Interleukin-12
KA	Kombinationsanästhesie-Gruppe
KG	Körpergewicht
LPS	Lipopolysaccharide
NF κ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
MHC	Major Histocompatibility Complex
NNM	Nebennierenmark

NNR	Nebennierenrinde
p	Wahrscheinlichkeit zur Annahme der Nullhypothese
PBS	phosphate buffered saline
PCEA	patientenkontrollierte epidurale Analgesie
PDA	Periduralanästhesie
PDK	Periduralkatheter
PE	Phycoerythrin
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SSC	Zellgranularität
TCR	T-Zell-Rezeptor
TH-Zellen	T-Helfer-Lymphozyten
TH1-Zellen	Spezifischer T-Helferzell-Subtyp
TH2-Zellen	Spezifischer T-Helferzell-Subtyp
TLR-4	Toll Like Rezeptor 4
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
U/Min	Umdrehungen pro Minute

1 Einleitung

In der Folge von größeren Operationen, Polytraumen und Verbrennungen treten vermehrt Infektionen auf. Diese können lokalisiert als Wundinfektionen in Erscheinung treten, oder sich als Maximalvariante einer generalisierten Infektion im Sinne einer Sepsis mit möglicherweise lebensbedrohlichem Ausgang manifestieren. Patienten mit größeren chirurgischen Eingriffen erleiden insgesamt eine Verminderung ihrer Fähigkeit zur immunologischen Abwehr von Mikroorganismen (Volk, 1996, Wolk, 2007).

Am Beginn dieser Entwicklung steht dabei das chirurgische Wundtrauma, das durch eine neuronale Transmission die Stressantwort des menschlichen Organismus erzeugt. Diese Antwort umfasst Hormon- und Immunmodulationen, die in ihrer Summe eine systemische Verminderung der immunologischen Kompetenz zur Folge haben. In diesem Zusammenhang leistet die Anästhesie einen Beitrag als stressunterdrückende Technik (Adams, 1991) und somit indirekt als Modulator der Immunkompetenz chirurgischer Patienten. Gegenstand der vorliegenden Substudie ist es, die immunologischen Auswirkungen zwischen zwei Narkoseverfahren (Allgemeinanästhesie und Gabe eines Opiats versus Allgemeinanästhesie in Kombination mit einer thorakalen Epiduralanalgesie) anhand der Messung definierter immunologischer Parameter und endokrinologischer Veränderungen zu vergleichen und somit die mögliche Rolle der Epiduralanästhesie als immunmodulatorische Anästhesieform zu untersuchen.

1.1 Das Immunsystem

1.1.1 Grundlagen der Immunologie

Die Reaktion des Immunsystems auf eine Infektion, die zu einer antimikrobiellen Aktivierung von Leukozyten führt, wird als Inflammation bezeichnet. Der Vorgang der Inflammation begründet die kompetente mikrobielle Abwehr des Organismus (Munford, 2001). Das Immunsystem kann in zwei Komponenten, das angeborene/unspezifische und das adaptive/spezifische Immunsystem, unterteilt werden. Beide Anteile bilden eine funktionelle Einheit und begründen die adäquate immunologische Kompetenz des Menschen.

Die unspezifische Immunabwehr kann Mikroorganismen ohne vorherigen Kontakt anhand der für diese Spezies zum Teil typischen Strukturen erkennen. So können

beispielsweise Lipopolysaccharide (LPS) der Oberfläche gramnegativer Bakterien durch den Toll Like Rezeptor 4 (TLR-4) der Makrophagen und Monozyten sehr schnell erkannt und eine Phagozytose eingeleitet werden. Die Makrophagen und Monozyten, wie auch eine Reihe weiterer immunologischer Zellen, verfügen über die Haupthistokompatibilitätskomplex-II-Proteine (MHC-II) und werden als Antigen präsentierende Zellen (APC) bezeichnet. Die APC können beispielsweise phagozytierte Bakterien-Antigene den spezifisch gegen diese Antigene gerichteten T-Helferzellen präsentieren und in der Folge eine Antwort des spezifischen Immunsystems einleiten (Beutler, 2003).

Die Zellen des spezifischen Immunsystems sind die T- und B-Lymphozyten. Das dominierende Prinzip liegt in der Eigenschaft, eine Vielzahl von möglichen Zielantigenen – seien es Bakterien, Viren, Pilze oder auch Tumorzellen – bereits vor dem Kontakt dieser mit dem Immunsystem durch eine genetische Rekombination hochspezifisch zu definieren (Janeway, 2001). Es gibt also eine große Vielfalt definierter Antigenstrukturen, die sich spezifisch, sowohl in den Antikörpern der aus den B-Zellen hervorgehenden Plasmazellen als auch in den variablen T-Zell-Rezeptorstrukturen manifestieren. Bei einem Antigenkontakt resultiert durch diese Spezifität eine sehr effektive Erregerelimination. Im Vergleich mit dem unspezifischen Immunsystem ist diese Immunreaktion allerdings deutlich langsamer, da das spezifische Immunsystem verschiedene Entwicklungsphasen wie beispielsweise die klonale Expansion bis zum Erreichen der vollen Effektivität durchlaufen muss (Swain 1999, Dong 2001). Davon zu unterscheiden ist ein Zweitkontakt eines definierten Erregerantigens mit dem spezifischen Immunsystem. Durch sogenannte Memory-Funktionen des spezifischen Immunsystems ist ein schnelleres Durchlaufen der verschiedenen Entwicklungsphasen der hochspezifischen Immunantwort gegeben und eine sehr effektive und beschleunigte Erregerelimination möglich.

1.1.2 T-Helferzellen und immunologische Kompetenz

Die T-Helferzellen tragen entscheidend zur Funktionsfähigkeit des adaptiven Immunsystems bei. Eine spezifische Immunreaktion kann erst nach einer entsprechenden Detektion des spezifischen Erreger-Antigens durch das adaptive Immunsystem in der kognitiven Phase erfolgen. Diese Aufgabe wird entscheidend

durch die T-Helferzellen getragen. Deren spezifischer T-Zellrezeptor (TCR) kann einen Fremdpeptid/MHC-II-Komplex beispielsweise eines Makrophagen erkennen (Madden, 1995) und in der Folge eine spezifische Immunantwort einleiten (Lanzavechia, 1990). Trotz dieser den gesamten T-Helferzellen eigenen Funktion werden anhand der nach der Antigenerkennung erfolgenden immunologischen Wirkung zwei Helferzell-Subtypen unterschieden.

So finden sich TH1-Zellen, deren Immunantwort unter anderem in der direkten Vermittlung einer gesteigerten mikrobiellen Phagozytose und Erregerabtötung beispielsweise durch Makrophagen besteht. Darüber hinaus wird die Synthese spezifischer und opsonierender Antikörper und dadurch die Erregerelimination und phagozytäre Aktivität beispielsweise von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten mittelbar entscheidend gefördert. Eine TH1-Antwort ist darüber hinaus wichtig zur Rekrutierung und Aktivierung inflammatorischer Leukozyten in der Folge eines Gewebstraumas (Abbas, 1996, Annunziato, 2009), wie etwa durch die Chirurgie bedingt.

Die TH2-Helferzellen tragen zur Ausbildung einer Immunreaktion bei, die durch eine verstärkte Synthese von IgA, IgE, spezifischer IgG-Subklassen und der Aktivierung von Mastzellen und eosinophilen Granulozyten gekennzeichnet ist (Romagnani, 1995, Annunziato, 2009). Die TH2-Antwort ist in ihrer Funktion noch nicht völlig aufgeklärt. Eine Aufgabe dieser Immunantwort wird in einer Regulierung von akuten und chronischen Entzündungen durch eine Inhibition der TH1-Antwort gesehen. Ansonsten scheint eine gesicherte Funktion in der Abwehr bestimmter Parasiten wie Helminthen zu bestehen (Abbas, 1996, Annunziato, 2009).

1.1.3 Interferon- γ und TH1-Antwort

Interferon- γ (IFN- γ) stellt einen integralen Bestandteil der inflammatorischen TH1-Antwort dar (Seder, 2003). Die TH1-Zellen können große Mengen dieses Interleukins freisetzen (Murphy, 2002). Der Konservierung ausreichender IFN- γ -Plasmaspiegel wird eine wichtige und zentrale Rolle in der Aktivierung einer adäquaten spezifischen Immunfunktion im Rahmen eines chirurgischen Traumas beigemessen. IFN- γ fördert die kognitive Phase und damit die Grundlage der Erregererkennung durch das spezifische Immunsystem, da ebenfalls die MHC-II Expression erhöht wird (Doecke

1997, Schinkel, 2003). Die Erregererkennung und eine in der Folge auftretende Inflammation setzt in diesem Zusammenhang eine interzelluläre Kommunikation zwischen einer APC und einer T-Helferzelle durch die Fremdpeptid/MHC-II-Komplex Erkennung durch den TCR voraus. Zusätzlich sind an dieser Stelle die kostimulatorischen Moleküle zu erwähnen, deren Vorhandensein ebenfalls zu einer erfolgreichen Antigenerkennung notwendig ist (Janeway, 2001).

Die immunkompetenten T-Helferzellen entwickeln sich dabei aus naiven Vorläuferzellen, deren Differenzierung zu einer TH1- oder TH2-Zelle durch die Erkennung des spezifischen Antigens durch den TCR und das vorhandene Umgebungsmilieu bestimmt wird. Als entscheidender Mediator der TH1-Differenzierung ist in diesem Zusammenhang das Interleukin-12 (IL-12) anzusehen (Seder, 1993, Hsieh, 1993), das unter anderem von aktivierten Makrophagen und dendritischen Zellen synthetisiert werden kann. Ebenso stellt IL-12 selbst einen zentralen Stimulus für die IFN- γ Synthese und Freisetzung durch die TH1-Zellen dar. IFN- γ bewirkt ebenfalls eine Differenzierung naiver T-Helferzellen zu immunkompetenten TH1-Zellen durch eine Steigerung der IL-12 Freisetzung durch Makrophagen und durch die vermehrte Expression von IL-12 Rezeptoren der entsprechenden T-Helferzellen (Abbas, 1996). Somit steigert IFN- γ die Produktion des IL-12 und damit auch die eigene Synthese im Rahmen einer TH1-Antwort durch einen positiven Feedbackmechanismus (Schinkel, 2003). Insgesamt fördert IFN- γ die Differenzierung naiver T-Helferzellen zu immunkompetenten TH1-Zellen durch eine direkte Beeinflussung der Expression der TH1-Genprodukte. (Murphy, 2002).

1.1.4 Grundlegende Wirkung und Funktion des Interleukin-10

Interleukin-10 (IL-10) zeichnet sich durch eine antientzündliche Wirkung aus, dessen physiologische Funktion in der Limitierung einer Inflammation und damit der Verhütung einer Schädigung des eigenen Organismus zu sehen ist (Mege, 2006, Murray, 2006). Durch die Ergebnisse tierexperimenteller Studien kann IL-10 als ein Feedbackregulator der TH1-Zellen angesehen werden (O`Garra, 2007).

Die Synthese des IL-10 erfolgt unter anderem durch Makrophagen und Monozyten. In den APC vermindert dieser Mediator die Expression des MHC-II und kostimulatorischer

Moleküle (Moore, 2001). Als weitere Quelle der IL-10 Synthese sind ebenfalls sowohl humane TH1- als auch TH2-Helferzellen bekannt (Del Prete, 1993, O`Garra, 2007).

IL-10 unterbindet in den T-Helferzellen die IFN- γ Synthese und die Etablierung einer inflammatorischen TH1-Antwort (Asadullah, 2003). Durch diesen Mechanismus entsteht eine Reduktion der TH1 abhängigen spezifischen Antigenerkennung, da Anzahl und Aktivität der immunkompetenten TH1-Zellen vermindert werden. Darüber hinaus zieht die IL-10 abhängige IFN- γ Verminderung eine Reduzierung der MHC-II Expression der Monozyten (Volk, 1996) und damit indirekt eine weitere Verringerung der Antigenerkennung durch die TH1-Zellen nach sich. Die im Rahmen operativer Eingriffe erhöhten IL-10-Plasmaspiegel werden so mit der Entstehung einer Immunsuppression des chirurgischen Patienten in Verbindung gebracht (Volk, 2003).

Im Zusammenhang mit der antientzündlichen IL-10 Wirkung wird häufig die TH2-Antwort gesehen. Ein Teil der wissenschaftlichen Autoren ordnet das IL-10 als ein Charakteristikum der TH2-Antwort ein und schreibt dieser Antwort einen antiinflammatorischen Charakter zu. Diese Sicht ist Gegenstand einer wissenschaftlichen Kontroverse. Die Vorstellung IL-10 sei ein integraler Teil der TH2-Antwort, wird in einem wissenschaftlichen Artikel von Murray als "verbreitetes Missverständnis" bezeichnet (Murray, 2006). Sowohl TH2- als auch TH1-Zellen können IL-10 freisetzen, das sich negativ auf die eigene Aktivität dieser Zellen auswirkt (O`Garra, 2007). Die TH1- und TH2-Zellen inhibieren sich gegenseitig und in der Folge kommt es zur Einstellung eines physiologischen Gleichgewichtes, der sogenannten TH1/TH2-Balance. Die TH1-Antwort begrenzt die TH2-Antwort durch die Synthese des IFN- γ . Wird die IFN- γ Synthese durch eine erhöhte IL-10-Konzentration reduziert, kommt es in der Folge zu einer Verschiebung der relativen TH1/TH2-Balance zugunsten der TH2-Antwort (Asadullah, 2003). Das IL-10 reduziert aber auch die absolute Aktivität der TH2-Antwort (O`Garra, 2007, Asadullah, 2003). Zusammenfassend ist diese relative Verschiebung der TH1/TH2-Balance etwa durch chirurgische Eingriffe möglicherweise als Symptom einer verminderten absoluten immunologischen Kapazität anzusehen, deren Ursache in höheren IL-10-Spiegeln zu suchen und nicht in einer verstärkten TH2-Antwort zu sehen ist.

1.2 Stressantwort, Stresshormone Kortisol und Adrenalin und chirurgischer Stress

Der Begriff Stressantwort definiert die endokrinologischen und metabolischen Veränderungen beispielsweise in der Folge eines chirurgischen Traumas, wie etwa durch die Hormone Kortisol und Adrenalin repräsentiert (Desbrough, 2000). So kann durch ein chirurgisches Trauma unter anderem regelmäßig ein Anstieg des Corticotropin-Releasing-Hormons (CRF) und der Adrenokortikotropin (ACTH) Inkretion mit konsekutiver Erhöhung des Glukokortikoid-Plasmaspiegels im Rahmen einer verstärkten Tätigkeit der Hypothalamo-Hypophysären-Achse (HHA) gemessen werden (Buckingham, 1985). Das sympathische Nervensystem nimmt mittels eines Netzes afferenter und efferenter Bahnen und des Neurotransmitters Adrenalin ebenfalls einen deutlichen Anteil an der Stressreaktion ein. Das Nebennierenmark (NNM) synthetisiert dabei Adrenalin in Abhängigkeit von der sympathischen Stressreaktion. Die Aktivierung des sympathoadrenergen Systems (SAS) und der HHA ist unter anderem auf die Transmission afferenter Neurone aus dem Wundgebiet zurückzuführen (Adams, 1991).

Der Anstieg der Kortisol- und Adrenalin-Plasmaspiegel korreliert dabei gleichsinnig mit der Stärke des durch den chirurgischen Eingriff verursachten Stresses. Somit ist anhand der perioperativen Kortisol- und Adrenalin-Plasmaspiegel der Grad der chirurgischen Stressantwort und die Stärke des zugrunde liegenden chirurgischen Stresses bestimmbar (Chernow, 1987, Schuetz, 2006). Die Stressantwort ist wiederum als Teil der chirurgischen Stressreaktion zu betrachten.

Der Begriff chirurgische Stressreaktion bezeichnet dabei die Gesamtheit der durch das Wundtrauma verursachten Modulationen, die eine Vielzahl von endokrinologischen, hämatologischen und immunologischen Veränderungen umfassen (Desbrough, 2000). So entsteht neben den bereits beschriebenen hormonellen Veränderungen beispielsweise innerhalb der Wunde eine Inflammation, deren Faktoren wie etwa der inflammatorische Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) sich sowohl im lokalen Bereich der Wunde als auch in der systemischen Zirkulation nachweisen lassen (Baker, 2006).

1.2.1 Antiinflammation durch die Stressantwort

Die adaptive Stressantwort des menschlichen Organismus ist unter immunologischen Aspekten insgesamt als antiinflammatorisch zu werten (Chrousos, 1998). Die Antiinflammation bezeichnet eine immunologische Reaktion, die die Produktion und

Funktion inflammatorischer Mediatoren, wie etwa des IFN- γ und eine leukozytäre antimikrobielle Aktivität wie der T-Helferzellen vermindert. Als antiinflammatorisch sind in diesem Sinne die in der Folge der chirurgischen Stressantwort vermehrt gebildeten Hormone Kortisol, Adrenalin und das bereits in seiner immunologischen Wirkung beschriebene Interleukin-10 zu bezeichnen (Munford, 2001).

1.2.1.1 Kortisol

Die stark antiinflammatorische Wirkung des Kortisols wird über intrazelluläre Rezeptoren vermittelt. Nach Bildung des Kortikosteroidrezeptorkomplexes transloziert dieser in den Zellkern und verändert die Genexpression. Das durch die Stressantwort vermehrt synthetisierte Kortisol bewirkt durch eine Hemmung des Transkriptionsfaktors NF κ B eine Synthesehemmung inflammatorischer Zytokine, wie Interferon- γ (Agarwal, 2001, Elenkov, 2004). In Folge dessen werden alle T-Helferzellen in ihrer Funktion inhibiert und an der Proliferation gehindert (Almawi, 1991, Almawi, 2002). Darüber hinaus fördert Kortisol die Produktion von Interleukin-10 (Volk, 2001). Insgesamt kann das Steroidhormon Kortisol eine Blockierung der Immunantwort auf der Ebene der Induktionsphase durch eine Inhibition des T-Zellsignalprozesses beispielsweise durch die Unterbindung der Antigenpräsentation (Yoshimura, 2001), einer Abnahme der TH1-Zell Aktivität und der Suppression der inflammatorisch wirkenden Zytokine bewirken. Aus der Transplantationsmedizin ist weiterhin bekannt, dass Kortisol sowohl die klonale Expansion, als auch eine Inhibition der Effektorphase des spezifischen Immunsystems bewirkt.

1.2.1.2 Adrenalin

Das im Rahmen operativer Eingriffe im Plasma erhöhte Adrenalin entfaltet seine Wirkung durch die Bindung an Alpha- und Betarezeptoren. T-Lymphozyten besitzen an ihren Zelloberflächen β 2-Rezeptoren (Nance, 2007). Durch Adrenalin wird die Proliferation der T-Helferzell vermindert (Dieing, 2003) und die Freisetzung inflammatorischer zugunsten antiinflammatorischer Zytokine verschoben. In diesem Zusammenhang führt Adrenalin ebenfalls zu einer erhöhten Synthese des antiinflammatorischen IL-10 (Elenkov, 2000). Zusammenfassend bewirkt Adrenalin unter anderem eine Verringerung der spezifischen immunologischen Kompetenz mit

einer Verminderung der TH1-Antwort und einer Verschiebung der TH1-/TH2-Balance zugunsten der TH2-Antwort (Elenkov, 2002).

1.3 Narkose

Unter dem Begriff Allgemeinanästhesie wird eine Ausschaltung des Bewusstseins durch Hypnotika, eine Muskelrelaxation und eine Analgesie verstanden. Die Begriffe Narkose und Allgemeinanästhesie (Adams, 2001) und ebenfalls Epidural- und Periduralanästhesie (PDA) können synonym verwendet werden.

Die Kombination einer Allgemeinanästhesie mit einer PDA zur Sicherstellung einer Analgesie kann als Kombinationsanästhesie bezeichnet werden (Adams, 1991, Adams, 2001). Unter dem Begriff Kombinationsanästhesie wird im Folgenden die Verwendung einer Allgemeinanästhesie verstanden, deren analgetische Komponente hauptsächlich auf der intraoperativen Verwendung einer (thorakalen) PDA beruht.

1.3.1 Verminderung der Stressantwort

Die PDA im Rahmen einer Kombinationsanästhesie zählt zu den potentesten anästhesiologischen Techniken zur Verringerung der Stressantwort. Eine Ursache hierfür ist in der sehr effizienten afferenten neuronalen Blockade aus dem chirurgischen Wundgebiet zu sehen, die eine verbesserte Stressabschirmung bedingt. In diesem Zusammenhang sind Verminderungen der Kortisol- und Adrenalin-Plasmaspiegel möglich. Die thorakale PDA führt aber auch zu einer efferenten neuronalen Blockade des Nebennierenmarks mit einer nachfolgenden Verminderung der Adrenalin-Plasmaspiegel (Adams, 1991).

Zusammenfassend kann die Kombination einer Allgemeinanästhesie und einer PDA eine deutliche Verringerung der antiinflammatorischen Stresshormone Kortisol und Adrenalin bewirken und in der Folge eventuell eine Verbesserung der immunologischen Kompetenz nach sich ziehen.

1.4 Stand der Forschung

Die intraoperative PDA verfügt anhand eines Teiles der aktuellen wissenschaftlichen Literatur über das Potential einer intraoperativen Stressverminderung. In Folge dessen bestehen Hinweise auf eine verbesserte Konservierung der immunologischen Kompetenz des chirurgischen Patienten mit einer Verringerung postoperativer Infektionen. In diesem Zusammenhang gelang es einer Arbeitsgruppe unter Verwendung der intraoperativen PDA bei Patientinnen, die sich einer Hysterektomie unterzogen, sowohl eine Reduzierung der endokrinen Stressantwort hinsichtlich der Kortisol und Adrenalin Ausschüttung als auch eine Abschwächung der antiinflammatorischen Veränderungen hinsichtlich der im Blut zirkulierenden Anzahl der gesamten Leukozyten nachzuweisen (Rem, 1980). Bei Patienten, die eine kardiochirurgische Bypass-Operation erhielten, zeigte sich ebenfalls eine Abschwächung der hormonellen Stressantwort mit niedrigeren Adrenalin- und Kortisol-Plasmaspiegeln. Darüber hinaus wurde eine signifikante Reduktion der antiinflammatorischen IL-10-Plasmakonzentration beobachtet (Volk, 2003). Bei Patienten allerdings, die sich einer Gastrektomie unterziehen mussten, konnte keine im Vergleich signifikante Reduktion der Stresshormone Kortisol und Adrenalin festgestellt werden. Ebenso konnte der Anstieg der IL-10-Plasmaspiegel durch die entsprechende Kombinationsanästhesie nicht vermindert werden (Kawasaki, 2007). Hinsichtlich der widersprüchlichen Ergebnisse der aktuellen wissenschaftlichen Literatur besteht weiterhin Unklarheit über das Potential der intraoperativen PDA, die durch chirurgische Eingriffe bedingte Erhöhung der antiinflammatorischen Stresshormone Kortisol und Adrenalin abzuschwächen. Vor dem genannten wissenschaftlichen Hintergrund erscheint die Verminderung des Anstiegs des antiinflammatorischen IL-10 durch die intraoperative PDA ebenfalls uneinheitlich.

Darüber hinaus fehlen Studien, die die Auswirkungen der intraoperativen PDA auf das spezifische Immunsystem insbesondere die Konservierung des für die TH1-Antwort essentiellen inflammatorischen IFN- γ intra- und postoperativ im Plasma untersuchen. In diesem Zusammenhang fehlen ebenfalls wissenschaftliche Arbeiten, die die Bewahrung der Kapazität der Lymphozyten zur IFN- γ Freisetzung durch gezielte lymphozytäre Concanavalin A (ConA) Stimulation erforschen.

2 Fragestellung

Im Rahmen der vorliegenden Studie soll der Versuch unternommen werden, das Potential der Kombination einer Allgemeinanästhesie und der thorakalen PDA als stressunterdrückende und damit möglicherweise zur Bewahrung der immunologischen Kompetenz des spezifischen Immunsystems beitragenden Anästhesieform anhand großer abdominalchirurgischer Operationen zu untersuchen.

Folgende Fragen sollen beantwortet werden:

1. Ist durch die Kombinationsanästhesie eine Reduzierung der antiinflammatorischen Stressantwort repräsentiert durch eine Verminderung der Stresshormone Kortisol und Adrenalin erreichbar?
2. Kann die Kombinationsanästhesie zu einer verbesserten Konservierung der Anzahl der TH1-Zellen im peripheren Blut beitragen? Führt die Kombinationsanästhesie ebenfalls zu einer relativen Verbesserung der immunologischen Kapazität der TH1-Zellen und damit letztendlich zu einer relativen Verbesserung des spezifischen Immunsystems? Hierzu sollen die Veränderungen des inflammatorischen IFN- γ in vivo und nach Concanavalin A (ConA) Stimulation untersucht und mit dem antiinflammatorischen IL-10 in vivo und nach ConA Stimulation verglichen und durch entsprechende IFN- γ /IL-10 Ratios in Verhältnis gesetzt werden.
3. Ergeben sich klinische Vorteile durch die Verwendung der Kombinationsanästhesie? In diesem Zusammenhang sollen die Studiengruppen anhand der Tage des Klinikaufenthaltes, der Wiederaufnahmen auf die Intensivstation, der Anzahl der Überlebenden und der Anzahl der postoperativen Infektionen verglichen werden.

Ergänzend soll folgende Frage diskutiert werden:

Wie können die durch die Kombinationsanästhesie bedingten immunologischen Veränderungen in das Stressmodell eingeordnet werden?

3 Methoden

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine einfach blinde, randomisierte, prospektive Studie. Diese wurde in der Charité, Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow Klinikum in der Zeit von November 2002 bis Juli 2003 an Patienten durchgeführt, die sich geplanten großen abdominalchirurgischen Operationen unterzogen. Eine Aufklärung der Patienten erfolgte in mündlicher und schriftlicher Form. Eine Genehmigung durch die Ethikkommission der Charité, Universitätsmedizin Berlin, erging am 19.09.2002 (Antragsnummer 139/2002).

3.1 Patienten und Einschlusskriterien

Ein Einschluss der betreffenden Patienten (American Society of Anesthesiologists I-II) erfolgte einen Tag vor der Durchführung der Operation. Bei diesen Eingriffen bestand von vornherein eine Indikation zur Etablierung eines Periduralkatheters (PDK) zur postoperativen Analgesie. Um einen Studieneinschluss durchführen zu können, durften keine der im Folgenden genannten Kriterien vorliegen:

1. Kontraindikation für die PDK Anlage
2. präoperativ wirksame immunsuppressive oder kardiovaskuläre Therapie
3. renale oder kardiale Funktionseinschränkung
4. Alter von unter 18 Jahren

3.2 Studienprotokoll und anästhesiologisches Management

Eine Stunde vor dem operativen Eingriff wurde jedem der Patienten eine Dosis von 7,5 mg Midazolam (Dormicum®, Hoffman-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) als orale Prämedikation verabreicht. Es wurde eine Blockrandomisierung und Zuteilung der Patienten, entweder zur Kombinationsanästhesie-Gruppe oder zur Kontrollgruppe durchgeführt. Zunächst erfolgte im Einleitungsraum ein Anschluss der Patienten an einen Überwachungsmonitor (Agilent, Böblingen, Deutschland), der eine Messung von Blutdruck, EKG und Sauerstoffsättigung ermöglichte. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte auch die Etablierung eines peripheren venösen Zugangs. Zum Ausgleich eines möglicherweise präexistenten Flüssigkeitsdefizits wurde eine Vollelektrolytlösung

(E153, Berlin-Chemie AG, Berlin, Deutschland) von ca. 10 ml/kg KG über eine Zeitraum von 15 min verabreicht und im Anschluss mit 10 ml·kg⁻¹·h⁻¹ weitergeführt.

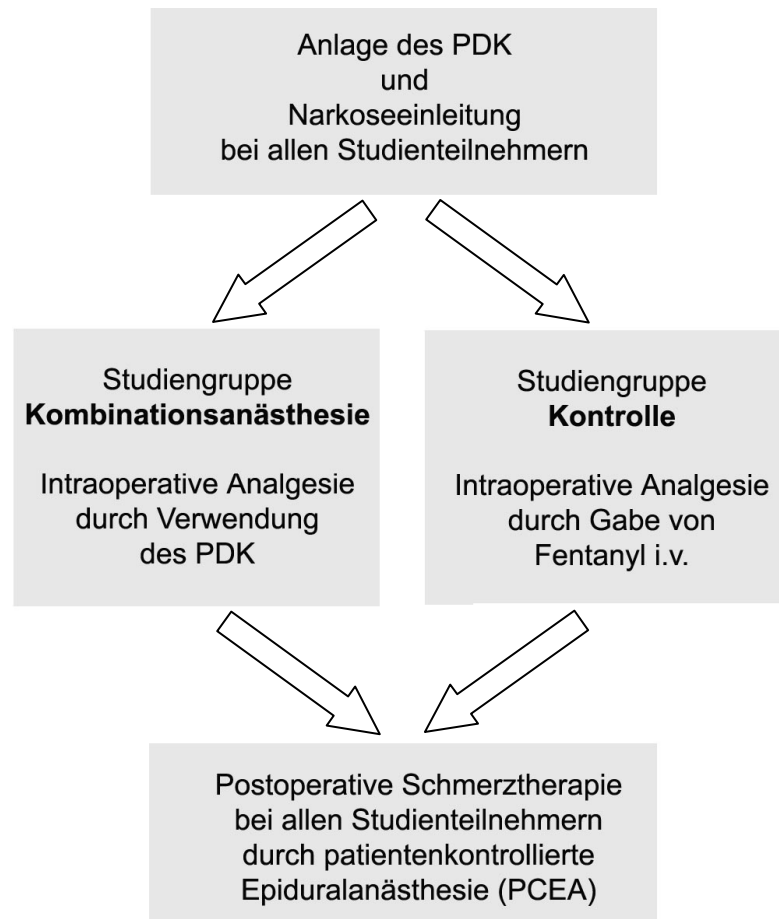


Abbildung 1: Übersicht des anesthesiologischen Managements der Studiengruppen Kombinationsanästhesie und Kontrolle

Die anschließende Anlage des PDK fand am nach vorne gebeugten, sitzenden Patient in einer von der Operation abhängigen thorakalen Lokalisation statt (Siehe auch Tabelle 1). Der Patient erhielt nach einer Hautdesinfektion im Punktionsbereich eine Lokalanästhesie mit 3-5 ml 1% Lidocain. Danach wurde eine sterile 16G Tuohy-Nadel, die mit einer NaCl 0,9% Spritze verbunden worden war, zwischen den Processus spinosi zweier Wirbel in Richtung des Periduralraumes vorgeführt. Der auf die Spritze ausgeübte Stempeldruck zeigte dabei nach Durchdringung des Ligamentum flavum und der dadurch bedingten Lokalisation im Periduralraum einen deutlichen Widerstandsverlust. Diese Abnahme des Widerstandes zeigte somit die richtige

Lokalisation der Tuohy-Nadel an und ist für diese Methode namensgebend („Loss of resistance“).

Tabelle 1: Punktionshöhe des PDK in Abhängigkeit vom Operationsgebiet

Operation	Punktionshöhe	Zu anästhesierendes Areal
Gastrektomie	Th 8–Th 10	Th 6–Th 12
Whipple-Operation	Th 8–Th 10	Th 6–Th 12
Resektion des Dünndarms, Hemikolektomie	Th 10–Th 12	Th 8–L 2
Rektumresektion	Th 10–L1	Th 11–L 2

PDK: Periduralkatheter, Th: Höhe des Einstichs orientiert an den thorakalen Wirbelkörpern, L: Höhe des Einstichs orientiert an den lumbalen Wirbelkörpern

Nachdem der Periduralkatheter durch die Punktionsnadel in den Periduralraum eingebracht worden war, konnte die Nadel entfernt werden. Zur Überprüfung der richtigen Lokalisation des Katheters wurde anschließend aspiriert und im Weiteren eine Testdosis von 3 ml Bupivacain 0,5% (Bupivacain RPR®, DeltaSelect GmbH, Dreieich, Deutschland) verabreicht. Auf diese Weise konnte eine mögliche Fehlpunktion eines Gefäßes oder des Liquorraumes ausgeschlossen werden. Im Weiteren erfolgte der Anschluss der im Wachzustand befindlichen Patienten an das Neuromonitoring. Dieser Bispectral Index (BIS) ist eine seit 1996 in den USA zugelassene Technik zur Überwachung der Narkosetiefe (Johansen, 2000). Durch Stirnelektroden wird ein EEG erzeugt, das durch eine spezielle Bearbeitung in Zahlen zwischen 0 bis 100 umgewandelt wird. Dabei spiegelt eine BIS-Zahl von 0 ein isoelektrisches EEG, eine BIS-Zahl von 100 höchste Aufmerksamkeit und Wachheit wieder. In dieser Studie wurde dabei ein BIS von 40 bis 50 innerhalb der Narkose angestrebt, da in diesem Bereich eine angemessene Narkosetiefe unter Isofluran als gesichert gelten kann (Glass, 1997).

Eine Narkoseeinleitung schloss sich im Folgenden mit 1,5 µg/kg KG Fentanyl (Fentanyl Janssen®, Janssen-Cilag, Neuss, Deutschland), 3-5 mg/kg KG Thiopental (Trapanal®, Byk Gulden, Konstanz, Deutschland), und 0,1-0,2 mg/kg KG Cis-Atracurium (Nimbex®,

GlaxoSmithKline, München, Deutschland) an. Über einen Tubus erfolgte die Beatmung der Patienten. Durch die Verabreichung von Isofluran (Isofluran Curamed®, CuraMED Pharma, Karlsruhe, Deutschland) mit einer endexpiratorische Konzentration von 0,8-1 Volumen % wurde die Basisnarkose mit einem BIS von 40-50 aufrecht erhalten. Des Weiteren erfolgte die Etablierung eines Zentralen Venenkatheters, einer Magensonde und eines Harnblasenkatheters. Eine im Verlauf erforderliche Relaxation wurde bei allen Patienten bedarfsadaptiert mit Cis-Atracurium realisiert.

In der Kombinationsanästhesie-Gruppe erfolgte ca. 30 min vor Hautschnitt das Anspritzen des PDK mit 6-8 ml einer Standardlösung (siehe auch Tabelle 2).

Tabelle 2: Studienprotokoll – Zusammenfassung des analgetischen Managements

	Kombinationsanästhesie-Gruppe	Kontrollgruppe
30 Minuten vor Hautschnitt	Der PDK wird mit 6-8 ml Standardlösung bestehend aus 0,2% Naropin + 1 µg/ml Sufentanil angespritzt	kein Anspritzen des PDK
wenige Minuten vor Hautschnitt	Über PDK kontinuierliche Infusion der Standardlösung mit einer Basalrate von 6 ml/h	Fentanyl i.v. 2-3 µg/kg
intraoperativ	Wenn keine ausreichende Analgesie erreicht werden konnte, erfolgte zusätzlich zur Basalrate ein erneuter Bolus von 6 ml Standardlösung. Bei weiterhin defizienter Analgesie über den PDK erfolgt ein Umstellung auf Fentanyl i.v. und ein Studienausschluss	Fentanyl i.v. bei Bedarf
Bei Verschluss des Peritoneums	Die Infusionsrate der Periduralanästhesie mit der Basalrate von 6 ml/h wird fortgesetzt	Der PDK wird mit 6-8 ml Standardlösung mit 0,2% Naropin u. 1 µg/ml Sufentanil angespritzt und die Gabe einer Basalrate von 6 ml/h fortgesetzt

PDK: Periduralkatheter

Diese bestand aus dem 0,2 % Lokalanästhetikum Ropivacain (Naropin®, Astra Zeneca, Wedel, Deutschland) und 1 µg/ml Sufentanil (Sufenta mite®, Janssen-Cilag, Neuss, Deutschland). Bei Durchführung des Hautschnittes erfolgte dann eine kontinuierliche Infusion dieser Standardlösung mit einer Infusionsrate von 5-6 ml/h für die Dauer der Operation. Bei Anzeichen einer klinischen Unzulänglichkeit der Analgesie, erhielten die Patienten einen zusätzlichen Bolus von 6 ml der Standardlösung. Wenn danach immer noch klinische Zweifel an der Effektivität der Analgesie bestanden, wurde der entsprechende Patient aus der Studie ausgeschlossen und die weitere Analgesie mit Fentanyl i.v. fortgeführt. In der Kontrollgruppe wurde die Analgesie 20 Minuten vor dem Hautschnitt durch die i.v. Gabe von 2-3 µg/kg KG Fentanyl bzw. Nachinjektionen dieses Opiats bei Bedarf gewährleistet. Intraoperativ wurde damit der PDK bei dieser Patientengruppe nicht genutzt. Erst zum Zeitpunkt des Peritonealverschlusses erfolgte das Anspritzen des PDK mit 6 ml der bekannten Standardlösung (siehe Tabelle 2).

3.3 Postoperative Schmerztherapie

Beide Studiengruppen erhielten postoperativ eine patientenkontrollierte epidurale Analgesie (PCEA), die eine bedarfsgerechte analgetische Versorgung der Patienten garantierte. Die PCEA wurde mit dem Beginn der postoperativen Schmerztherapie auf eine Basalrate von 6 ml/h der bekannten Standardlösung eingestellt. Ein patientenkontrollierter Bolus von 4 ml konnte maximal dreimal pro Stunde bei subjektivem Schmerzempfinden abgefragt werden. Ein Anästhesist kümmerte sich während des gesamten postoperativen Studienzeitraums um die Patienten und überwachte die Ordnungsmäßigkeit der Schmerztherapie, hinsichtlich der Wirksamkeit und des Auftretens von Nebenwirkungen. Im Falle einer Katheterfehlage wurde dieser entfernt und der Patient zu diesem Zeitpunkt aus der Studie ausgeschlossen.

3.4. Zeitpunkte der Blutentnahmen und Verarbeitung der Blutproben

Pro Patient ergaben sich insgesamt 5 Blutentnahmen von jeweils 15 ml. Die Zeitpunkte im Studienverlauf können der Tabelle 3 entnommen werden.

Tabelle 3: Chronologische Reihenfolge der Blutentnahmen

OP-Tag	1. Blutentnahme - <u>Baseline</u> vor Anlage des PDK 2. Blutabnahme - <u>40 Minuten</u> nach Hautschnitt zur Bestimmung von Kortisol und Adrenalin 3. Blutabnahme - <u>120 Minuten</u> nach Hautschnitt
1. post OP-Tag	4. Blutabnahme - <u>Tag 1</u>
4. post OP-Tag	5. Blutentnahme - <u>Tag 4</u> zur Verlaufskontrolle

Das von beiden Patientengruppen gewonnene Blut wurde nach der Abnahme unverzüglich weiterverarbeitet. Zur Plasmagewinnung wurden 7 ml Heparin-Blut bei einer Temperatur von 4°C mit 2000 U/min für 10 min zentrifugiert (Megafuge® 1.0 R., Heraeus Instruments, Berlin). Der Überstand wurde abpipettiert und in 300 µl Portionen in Eppendorf-Röhrchen bei -20°C zur Feststellung der Kortisolwerte und bei -80°C bis zur Bestimmung von Adrenalin sowie der Plasmazytokine eingefroren. Zwei ml des in den EDTA-Röhrchen enthaltenen Blutes wurden innerhalb der nächsten 15 min nach Entnahme zur Bestimmung der Leukozytenzahl pro nl (Cell-Dyn 1600®, Abbott Diagnostics, Abbott Park, USA) herangezogen und im Anschluss der durchflusszytometrischen Analyse zugeführt (Durchflusszytometrie siehe Kapitel 3.4.4).

3.4.1 Bestimmung von Kortisol und Adrenalin

Die vorliegende Substudie wurde im Rahmen einer Untersuchung zur intraoperativen Kombination Epidural-Allgemeinanästhesie (IKEA) unter der Studienleitung von Dr. Georg Fritz realisiert. Die Untersuchungsschwerpunkte der Hauptstudie stellten dabei die Auswirkungen einer Stressverminderung durch die Verwendung der intraoperativen thorakalen Epiduralanalgesie auf die Hämodynamik und die perioperative Analgesie

dar. Die in der Hauptstudie ermittelten Daten zur intraoperativen Veränderungen der Adrenalin- und Kortisol-Plasmakonzentrationen wurden nicht durch unsere Arbeitsgruppe ermittelt, sondern im Labor der AG experimentelle Anästhesie des Campus Virchow Klinikums der Charité gemessen und unserer Arbeitsgruppe hinsichtlich der Exploration möglicher Modifikationen des Immunsystems zur Verfügung gestellt. Die entsprechenden Daten wurden ebenfalls in der von Anton Goldmann veröffentlichten Dissertation unter dem Titel „Kombinationsanästhesie vermindert die Stressantwort auf chirurgischen Reiz – Untersuchung von hämodynamischen und hormonellen Regulationsvorgängen im Vergleich zur balancierten Allgemeinanästhesie“ verwendet.

Die Messung der Kortisol-Plasmakonzentration erfolgte mit Hilfe eines kompetitiven Festphasen-Radioimmunoassays (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, USA). Nach Herstellerangaben befindet sich die Nachweisgrenze bei 5,52 nmol/l.

Die Konzentrationsbestimmung von Adrenalin im Plasma erfolgte unter Anwendung der Einisotopenmethode. Hierbei wird Adrenalin in die O-methylierten Derivate umgewandelt, anschließend extrahiert und unter Verwendung der Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (HPLC= high pressure liquid chromatography) bestimmt (Chromsystems, München, Deutschland).

3.4.2 Stimulation mit Concanavalin A

Das Polysaccharid Concanavalin A wurde zur Stimulation der T-Zellen eingesetzt. Es bindet an spezifische Oberflächenstrukturen der T-Zellen und aktiviert diese (Palacios, 1982). In der Folge werden Zytokine im Verhältnis entsprechend der TH1- oder TH2-Polarisation freigesetzt. Eine Lymphozytenstimulation mit ConA wurde bei jeder Blutentnahme durchgeführt. Dazu wurden 200 µl Vollblut in einem Zeitraum von 15 Minuten nach der Entnahme mit 100 µg/100 µl ConA (ConA, Sigma C 5275, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) und 700 µl RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) für 4 Stunden bei einer Temperatur von 37°C und 5% CO₂ Anteil inkubiert. Nach diesen 4 Stunden wurde eine Zentrifugation durchgeführt und der Überstand bei -80°C zur späteren Bestimmung von Interferon-γ und Interleukin-10 eingefroren.

3.4.3 Bestimmung der Zytokinkonzentrationen

Die Bestimmung der Zytokine aus dem tiefgefrorenen Plasma fand durch einen enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) statt. Dabei wurde die Variante des Sandwich-Typs gewählt. Bei diesem Verfahren wird in einem ersten Schritt das zu ermittelnde Zytokin an mit spezifischen Antikörpern (Capture Antikörper) überzogene Mikrotiterplatte gebunden. Im Folgenden wird nach verschiedenen Reinigungsschritten ein zweiter Antikörper eingebracht, der ebenfalls an dieses spezifische Zytokin bindet. Dieser zweite Antikörper verfügt über ein Enzym, welches in Abhängigkeit von seiner am Ende vorhandenen Konzentration eine Farbreaktion hervorruft.

Eine im Anschluss durchgeführte photometrische Messung ermittelt anhand der von dieser Farbreaktion abhängigen Extinktion, die in direkter Weise mit der Konzentration des spezifischen Zytokins korreliert. Die einzelnen Arbeitsschritte könne der Tabelle 4 entnommen werden.

Tabelle 4: Reihenfolge der einzelnen Arbeitsschritte zur Interleukin Bestimmung

1. Tag	Bereitstellung eines 0,1 mol/l Karbonat Puffers (auch als Coating buffer bezeichnet) mit einem pH von 9,5 (100ml Aqua destilata mit 356 mg Na ₂ HCO ₃ und 840 mg NaHCO ₃)
	Mischung des Capture-Antikörpers des jeweiligen ELISA-Sets mit Coating Buffer im Verhältnis 1:250
	Auftragung auf Mikrotiterplatte (pro Vertiefung je 100 µl) der jeweiligen Capture Antikörper, dann Versiegelung und Inkubation bei 4°C für 12 Stunden
2. Tag	Mischung eines Waschpuffers aus 0,05% TWEEN 20 (Sigma Chemical, St. Louis, USA) und Phosphate Buffered Saline (PBS, PAA Laboratories, Linz, Österreich) und eines zur Verdünnung geeigneten Puffers aus PBS und 10% fetalem Kälber Serum (FKS, PAA Laboratories, Linz, Österreich)
	Dreimaliges Auswaschen der Mikrotiterplatte mit dem Waschpuffer durch das Mikrotiter-Waschgerät 812 SW1, SLT LAB, Straßburg, Frankreich

Nochmaliges füllen aller Vertiefungen der Mikrotiterplatte mit 200 µl Verdünnungspuffer, Inkubation von einer Stunde bei Raumtemperatur, dreimaliges Auswaschen der Mikrotiterplatte mit dem Waschpuffer durch das Mikrotiter-Waschgerät 812 SW1, SLT LAB, Straßburg, Frankreich

Erstellung einer Standardverdünnungsreihe mit Verdünnungspuffer von 0 pg/ml, 7 pg/ml, 8 pg/ml, 15 pg/ml, 6 pg/ml, 31 pg/ml, 5 pg/ml, 62,5 pg/ml, 125 pg/ml, 250 pg/ml, 500 pg/ml

Einfüllung von 100 µl aufgetautem Plasma in Vertiefung der Mikrotiterplatte und Einrichtung einer Standardreihe

Nach zweistündiger Inkubation fünfmaliges Auswaschen der Mikrotiterplatte mit dem Waschpuffer durch das Mikrotiter-Waschgerät 812 SW1, SLT LAB, Straßburg, Frankreich

Verdünnung auf 1:250 des Detektionsantikörpers und des jeweiligen Detektionsenzym mit Verdünnungspuffer (Siehe auch Tabelle 5 der verwendete Elisasetts und Detektionssysteme)

Auffüllen der Mikrotiterplatten-Vertiefungen mit jeweils 100 µl Detektionsreagenz, dann fünfmaliges Auswaschen der Mikrotiterplatte mit dem Waschpuffer durch das Mikrotiter-Waschgerät 812 SW1, SLT LAB, Straßburg, Frankreich

Erstellung einer Substratlösung aus Tetramethylbenzidine und Wasserstoffperoxid (TMB-Set, Pharmingen, San Diego, USA) und aufbringen von jeweils 100 µl in jeweilige Mikrotiterplatten-Vertiefung

Erneute Inkubation von 30 min, Stopp der Enzymreaktion durch Auftragung von 50 µl einer 1 mmol/l Schwefelsäure in die jeweilige Vertiefung

Photometrische Messung der Extinktion, Berechnung der Zytokinkonzentration (MR5000® Photometer, Dynatech, Billingshurst, England) anhand normierter Standardkurven

Tabelle 5: Übersicht der verwendeten ELISA-Sets und die jeweiligen Detektionsenzyme

	Zytokin-Set	Detektionsenzym
1	OptEIA® Human IL-10	Streptavidin-HRP
2	OptEIA® Human IFN- γ	Avidin-HRP
3	OptEIA® Human IL-12p70 (aktive Form des IL-12)	Streptavidin-HRP

HRP: Horseradish Peroxidase

3.4.4 Durchflusszytometrie

Ein im Durchflusszytometer befindlicher Argon-Ionen-Laser emittiert Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm. Der Lichtstrahl passiert einzelne, sich in einer Trägerflüssigkeit befindliche Lymphozyten. Das nach dieser Passage als Vorwärtsstreulicht („forward scatter“, kurz „FSC“) und Seitwärtsstreulicht („sideward scatter“, kurz „SSC“) von einer Fotodiode messbare Licht, gibt je nach Zusammensetzung der Lichtstreuung Aufschluss über die vorhandene Leukozytenpopulation. Darüber hinaus existiert die Option, fluoreszierende Antikörper (AK) auf diesen Zellen zu detektieren und anhand der spezifischen Fluoreszenzeigenschaften auf den bekannten Antikörper bzw. das entsprechend definierte Epitop zu schließen. Anhand der Kombination der typischen Konstellation aus SSC, FSC kann die Zellpopulation (z.B. Lymphozyten) ermittelt werden (Abbildung 2).

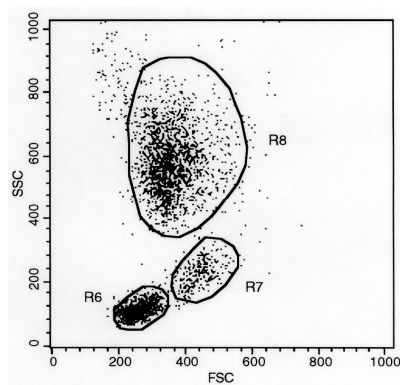


Abbildung 2: Leukozytäre Subpopulationen im FSC (forward scatter)/SSC (sideward scatter) Diagramm; R6: Lymphozyten, R8: Granulozyten, R7: Monozyten; x-Achse: forward scatter, y-Achse: sideward scatter

Die T-Lymphozyten besitzen spezifische Oberflächenmoleküle, die nach dem Cluster of Differentiation (CD) eingeteilt werden. CD3 ist auf allen peripheren T-Zellen zu finden, CD4 auf allen T-Helferzellen. Mit fluoreszierenden AK beispielsweise der Epitope CD3, CD4 kann die Subpopulation der T-Helferzell ermittelt werden. Durch die Bestimmung der gesamten Zellsignale in Anordnungen von Punktwolken kann eine Aussage über die prozentuale Verteilung der einzelnen Zellpopulationen in der Messprobe getroffen werden bzw. eine Umrechnung in 1/nl bei ermittelter Gesamtleukozytenanzahl erfolgen.

3.4.4.1 Aufbereitung der Blutproben

Innerhalb von 30 Minuten nach Blutentnahme erfolgte die Verarbeitung der EDTA-Vollblutproben. Je 100 µl Blut wurden in 3 verschiedene Polystyrol-Röhrchen pipettiert und 20 µl der aufgeführten monoklonalen Antikörperpaare (Becton Dickinson, San Jose, USA) hinzu gegeben (Tabelle 6). Eine gründliche Durchmischung wurde vorgenommen (Vortex Genie 2, Scientific Industries, Bohemia, USA), anschließend erfolgte eine 20 Minuten umfassende Inkubation bei 4°C. Die verwendeten Antikörper erhielten entweder Phycoerythrin (PE, emittierte Wellenlänge: 575 nm) oder Fluorescein-Isothiocyanat (FITC, emittierte Wellenlänge: 530 nm) als fluoreszierende Farbstoffe.

Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten monoklonalen Antikörperpaare

Probe	Antikörperpaar	Immunglobulin (Ig)-Klassen
1	Simultest® CD45/CD14	IgG1-FITC/IgG2a-PE
2	Simultest® CD3/CD4	IgG1-FITC/IgG1-PE

CD: Cluster of Differentiation; FITC: Fluorescein-isothiocyanat; PE: Phycoerythrin

Im Folgenden wurden 1 ml Ammonium-Chlorid-Stock-Lösung nach Robinson (8,02 g NH₄Cl + 0,84g NHCO₃ + 0,37g EDTA-Natrium auf 100 ml destilliertem Wasser [Aqua dest.] (Robinson 1993)) 1:10 verdünnt. Jeweils 2 ml dieser neu entstandenen Lösung wurden jedem Probenröhrchen mit dem Ziel einer Lysierung der Thrombo- und Erythrozyten zugegeben. Daran schloss sich eine gründliche Durchmischung mit dem Vortex Genie 2 und eine 10 Minuten andauernde Inkubation bei Zimmertemperatur unter Lichtausschluss an. Es folgten eine Zentrifugation bei 1200 U/min für 5 Minuten bei 4°C, ein Abschütten des Überstandes und eine Suspension der verbleibenden Zellen mit 3 ml einer Waschlösung (Cell Wash®, Becton Dickinson, San Jose, USA). Nach einer Wiederholung dieses Arbeitsschrittes erfolgte die durchflusszytometrische Analyse (FACScan®, Becton Dickinson, San Jose, USA). Die Auswertung erfolgte durch die CellQuest® Software auf einem Power Macintosh G3 (Apple Computer, Cupertino, USA) in mehreren Schritten.

1. Erstellung eines Differenzialblutbildes zur Feststellung des Lymphozytenanteils.

Erstes Diagramm mit CD14- und CD45-Fluoreszenzen aller untersuchten Zellen mit

der in Abbildung 3 dargestellten charakteristischen Verteilung. Setzen eines Gates (R1, linke Bildseite) und damit Ausschluss des linken Teils des Diagramms mit den hier enthaltenen unspezifischen Bindungen.

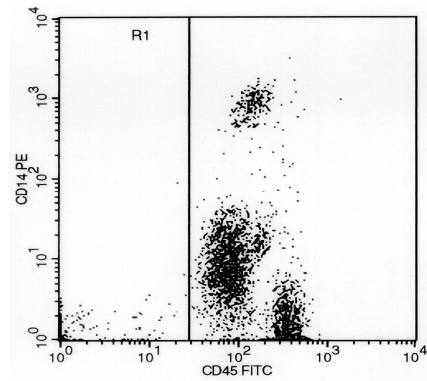


Abbildung 3: CD45/CD14-Diagramm der ungefilterten Originaldaten Achsenskalierung logarithmisch, x-Achse: CD45, y-Achse: CD14

2. Übertragung der eingeschlossenen Zellen außerhalb von R1 in ein neues CD45/CD14-Diagramm (Abbildung 4)

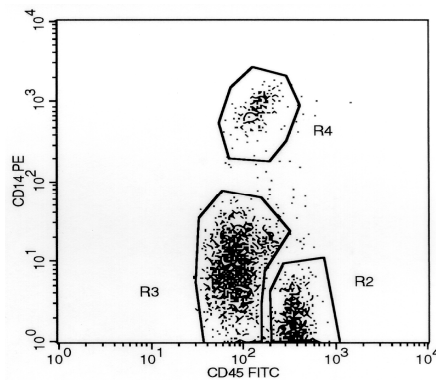


Abbildung 4: CD45/CD14-Diagramm zur Bestimmung des Differentialblutbildes R2: Lymphozyten, R3: Granulozyten, R4: Monozyten. Achsenskalierung logarithmisch, x-Achse: CD45, y-Achse: CD14

3. Zur Bestimmung der Reinheit der markierten Lymphozyten erfolgte ein Auftragen aller Zellen aus dem Gate R2 in einem FSC/SSC Diagramm (Abbildung 5). Für eine ausreichende Reinheit mussten mindestens 90 % aller Zellen dieses Diagramms im Gate R5 liegen.

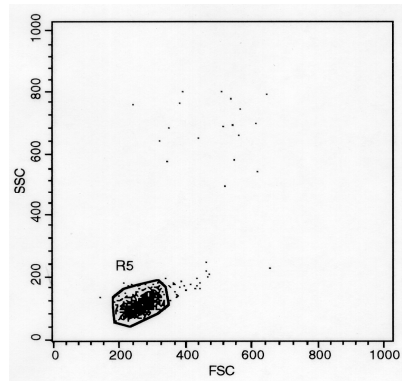


Abbildung 5: FSC/SSC Darstellung der ausgewählten Zellen (Gate R2 der Abbildung 4) X-Achse: FSC, y-Achse: SSC.

Die durch R5 umschlossenen Lymphozyten bildeten im Folgenden die Grundlage zur Analyse der T-Helferzell Subpopulation.

Die Bestimmung der T4-Helferzellzahlen aus der Probe 2 wurde dabei wie folgt durchgeführt: Eine Einteilung in vier Quadranten eröffnet die Möglichkeit jede Zelle zu einer Untergruppe zuzuordnen, wobei sich nur im rechten oberen Quadranten die T-Helferzellen mit den gewünschten Antigeneigenschaften CD3+CD4+ befinden. Der prozentuale Anteil des rechten oberen Quadranten spiegelt dabei den prozentualen Anteil der T-Helferlymphozyten wieder (Abbildung 6). Im Anschluss erfolgte bei bekannter absoluter Anzahl der gesamten Leukozyten eine Umrechnung der T-Helferzellen in 1/nl.

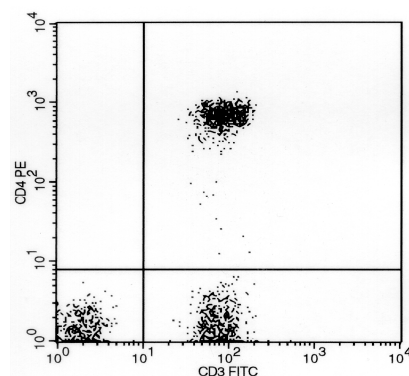


Abbildung 6: Beispielhafte Darstellung einer Doppelfärbung der Epitope an der Zelloberfläche von T-Helferlymphozyten; Achsenskalierung logarithmisch, X-Achse:CD3, y-Achse: CD4

3.5 Datenverarbeitung und statistische Auswertung

Die gewonnenen Daten wurden insgesamt mit dem „Statistical Package for the Social Sciences“, (SPSS Inc., Chicago, USA, Version 14.0) verarbeitet. Die Berechnung der Lymphozytenzahl als 1 pro nl erfolgte aus der im Cell-Dyn 1600® gemessenen Gesamtleukozytenzahl und dem prozentualen Anteil der entsprechenden T-Helferzellen am durchflusszytometrisch bestimmten Differentialblutbild. Die durch die Stimulation mit ConA ermittelten IFN- γ und IL-10-Konzentrationen wurden auf die Anzahl von 1000 Lymphozyten standardisiert.

Die intraoperativen und frühen postoperativen immunologischen Daten (Chirurgie 120 min und Tag 1) wurden in Relation zum 1. Messzeitpunkt (Baseline) gesetzt, aufgrund einer asymmetrischen Datenverteilung logarithmiert und mit Hilfe des „General Linear Models“ (GLM) für Messwiederholungen zwischen den Gruppen verglichen. Die post-hoc Analysen der Einzelzeitpunkte wurden mit Hilfe des unverbundenen t-Testes vorgenommen und für Messwiederholungen korrigiert

Der Fischer Test wurde genutzt, um nominalskalierte Daten zu analysieren.

Eine statistische Signifikanz ist durch eine Wahrscheinlichkeit (p) zur Annahme der Nullhypothese von $p < 0,05$ definiert.

4 Ergebnisse

4.1 Patienten, intra- und postoperative Daten

Sechzig Patienten wurden in die Studie eingeschlossen, sechs Patienten mussten im Folgenden wieder ausgeschlossen werden. Bei fünf dieser Patienten traten technische Probleme im Rahmen der PDK-Anlage auf, bei einem Patienten ergab sich der dringende Verdacht einer intraoperativen Fehllage des Peridualekatheters.

Die Studiengruppen der Kombinationsanästhesie und die Kontrollgruppe setzten sich daher aus jeweils siebenundzwanzig Patienten zusammen. Bei mehreren Patienten stellten sich zu verschiedenen Zeitpunkten postoperative Fehllagen des PDK ein, so dass sieben Patienten der Kombinationsanästhesie-Gruppe und fünf Patienten der Kontrollgruppe die Studie vorzeitig beendeten (Tabelle 8).

Tabelle 8: Übersicht über die Anzahl und Zeitpunkte des vorzeitigen Ausscheidens bei mechanisch bedingten postoperativen Fehllagen des Peridualekatheters.

	Kombinationsanästhesie (n)	Kontrollgruppe (n)
1. Tag (post OP)	3	2
2. Tag (post OP)	1	1
3. Tag (post OP)	1	2
4. Tag (post OP)	2	0

n: Patientenzahl, Kombinationsanästhesie: intra- und postoperative Analgesie durch PDK, Kontrollgruppe: nur postoperative Analgesie durch PDK

Insgesamt fanden sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Geschlechts, des Alters, der Körpergröße, des Körpergewichts und möglicher immunsuppressiver Begleiterkrankungen, wie Diabetes mellitus und Alkoholmissbrauch zwischen den Studiengruppen. Die Werte können der Tabelle 9 entnommen werden.

Tabelle 9: Epidemiologie, Begleiterkrankungen, Art des chirurgischen Eingriffs

	Kombinationsanästhesie	Kontrollgruppe
Alter (Jahren)	55 (34-77)	59 (29-80)
Geschlecht m/w	16/11	18/9
Körpergröße (cm)	172 ± 1	171 ± 2
Gewicht (kg)	69 ± 3	71 ± 3
Begleiterkrankungen		
- Alkoholmissbrauch (n)	5	4
- Diabetes mellitus (n)	2	5
Operation		
- Gastrektomie (n)	7	3
- Resektion des Kolon (n)	5	4
- Rektumamputation (n)	4	5
- Pankreatektomie (n)	6	10
- Andere (n)	5	5

Größe und Gewicht sind als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM), das Alter als Mittelwert mit Range dargestellt, n: Patientenzahl, Kombinationsanästhesie: intra- und postoperative Analgesie durch PDK, Kontrollgruppe: nur postoperative Analgesie durch PDK

Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Art und Länge des operativen Eingriffs, der BIS-Werte, der endexpiratorischen Isofluran-Konzentration und der Herzfrequenz. Die entsprechenden Werte können der Tabelle 10 entnommen werden.

Tabelle 10: Intraoperative Daten

	Kombinationsanästhesie	Kontrollgruppe
Operationsdauer (min)	222 ± 23	228 ± 19
BIS (Inzision)	46 ± 3	44 ± 2
BIS (40 min. nach Inzision)	43 ± 2	45 ± 1
Isofluran (Inzision) [%]	0.74 ± 0.04	0.73 ± 0.03
Isofluran (40 min nach Inzision) [%]	0.77 ± 0.02	0.80 ± 0.03
HF (Inzision) [1/min]	77 ± 5	67 ± 3
HF (40 min nach Inzision) [1/min]	84 ± 3	78 ± 3

Darstellung der Daten als Mittelwert ± SEM, BIS: Bispectral Index, HF: Herzfrequenz, Kombinationsanästhesie: intra- und postoperative Analgesie durch PDK, Kontrollgruppe: nur postoperative Analgesie durch PDK

Bezüglich der postoperativen Daten, der Zeitdauer einer intensivmedizinischen Betreuung, der Notwendigkeit der Wiederaufnahme einer intensivmedizinischen Betreuung, der Infektionsraten, der Tage des Klinikaufenthaltes und der Anzahl der Überlebenden ergaben sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Studiengruppen. Die Werte können aus der Tabelle 11 entnommen werden.

Tabelle 11: Postoperativer Daten

	Kombinationsanästhesie	Kontrollgruppe
Tage ICU-Aufenthalt	5.2 ± 1.4	3.5 ± 0.9
ICU Wiederaufnahme (n)	5	3
Tage Klinikaufenthalt	16.2 ± 1.7	22.1 ± 5.6
Infektionen (n)	3	2
Überlebende (n)	25	26

Darstellung der Daten als Mittelwert ± SEM, 24h: ICU: Intensivstation, n: Anzahl der Patienten, Kombinationsanästhesie: intra- und postoperative Analgesie durch PDK, Kontrollgruppe: nur postoperative Analgesie durch PDK

4.2 Kortisol

Intraoperativ stieg in der Kontrollgruppe die Kortisol-Konzentration an und war 40 Minuten nach Hautschnitt signifikant höher als in der Kombinationsanästhesie-Gruppe ($p=0.016$)

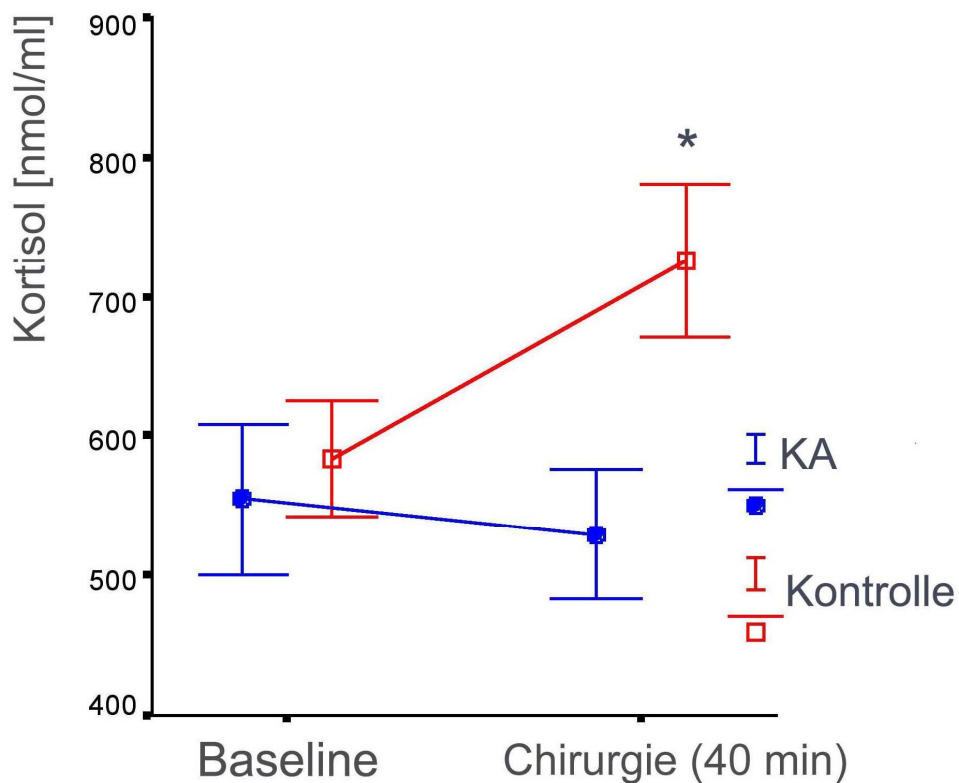


Abbildung 7: Präsentation der Daten auf der Basis des Mittelwerts \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM): *: $p < 0.05$, KA (Kombinationsanästhesie-Gruppe): intra- und postoperative Analgesie durch PDK, Kontrolle (Kontrollgruppe): nur postoperative Analgesie durch PDK

4.3 Adrenalin

Intraoperativ stieg der Adrenalin-Plasmaspiegel in beiden Studiengruppen an, in der Kontrollgruppe wurde jedoch nach 40 Minuten ein signifikant höherer Wert gemessen ($p=0.036$).

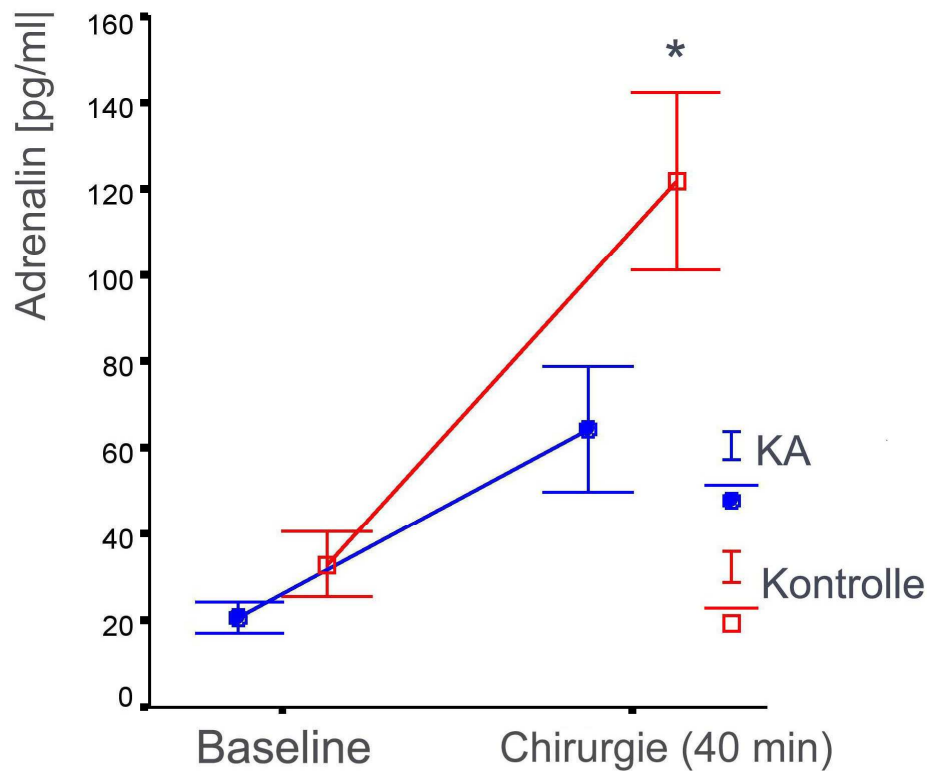


Abbildung 8: Präsentation der Daten auf der Basis des Mittelwerts \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM): *: $p<0.05$, KA (Kombinationsanästhesie-Gruppe): intra- und postoperative Analgesie durch PDK, Kontrolle (Kontrollgruppe): nur postoperative Analgesie durch PDK

4.4 T-Helfer-Lymphozyten

Die Anzahl der T-Helfer-Lymphozyten im peripheren Blut verminderte sich in beiden Gruppen intraoperativ im Vergleich zum Ausgangswert, ohne einen signifikanten Unterschied im GLM zu erreichen. Die post-hoc Analyse zeigte allerdings zum Messzeitpunkt Tag 1 eine signifikant höhere Anzahl der T-Helferzellen in der Kombinationsanästhesie-Gruppe ($p=0.036$).

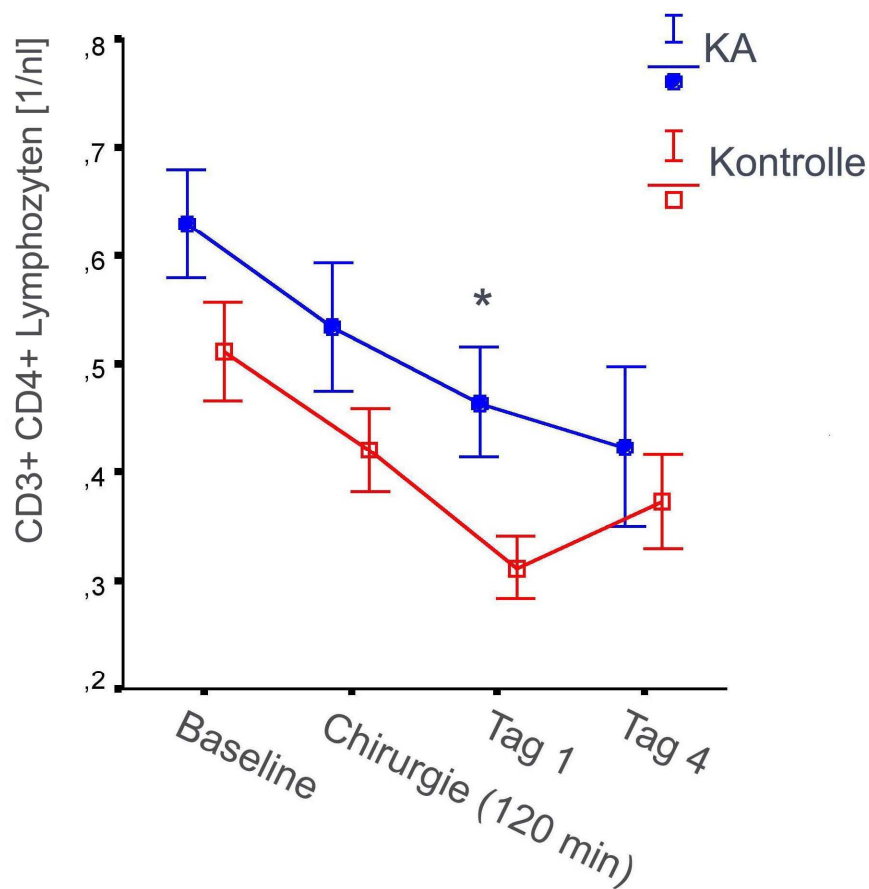


Abbildung 9: Präsentation der Daten auf der Basis des Mittelwerts \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM): *: $p<0.05$ in der post-hoc Analyse, KA (Kombinationsanästhesie-Gruppe): intra- und postoperative Analgesie durch PDK, Kontrolle (Kontrollgruppe): nur postoperative Analgesie durch PDK

4.5 IFN- γ (Plasma)

Bei der Messung der IFN- γ -Plasmaspiegel ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Studiengruppen. Die entsprechenden Plasmaspiegel verminderten sich sowohl in der Kombinationsanästhesie-Gruppe als auch in der Kontrollgruppe intraoperativ (Messzeitpunkt Chirurgie 120 min) im Vergleich zum Ausgangswert.

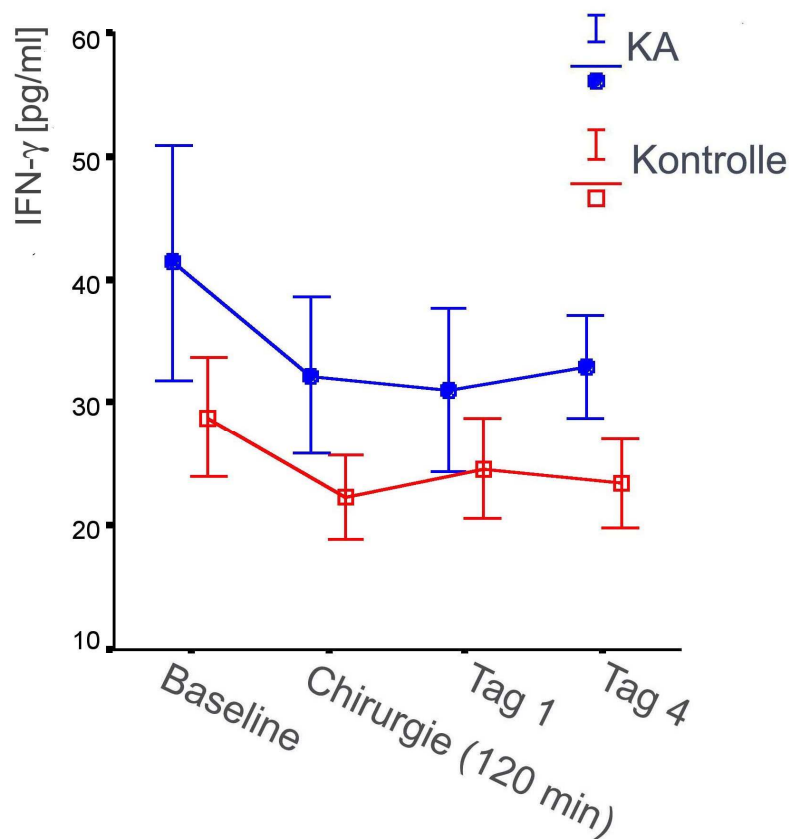


Abbildung 10: Präsentation der Daten auf der Basis des Mittelwerts \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM): KA (Kombinationsanästhesie-Gruppe): intra- und postoperative Analgesie durch PDK, Kontrolle (Kontrollgruppe): nur postoperative Analgesie durch PDK

4.6 IL-10 (Plasma)

In beiden Gruppen stiegen die Plasmaspiegel des IL-10 an. Die entsprechenden Plasmaspiegel innerhalb der Kontrollgruppe waren im GLM ($p=0.012$) signifikant höher. Das IL-10 war in der intraoperativen Messung (Chirurgie 120 min) tendenziell erhöht, die post-hoc Analyse verfehlte das Signifikanzniveau allerdings knapp ($p=0.056$).

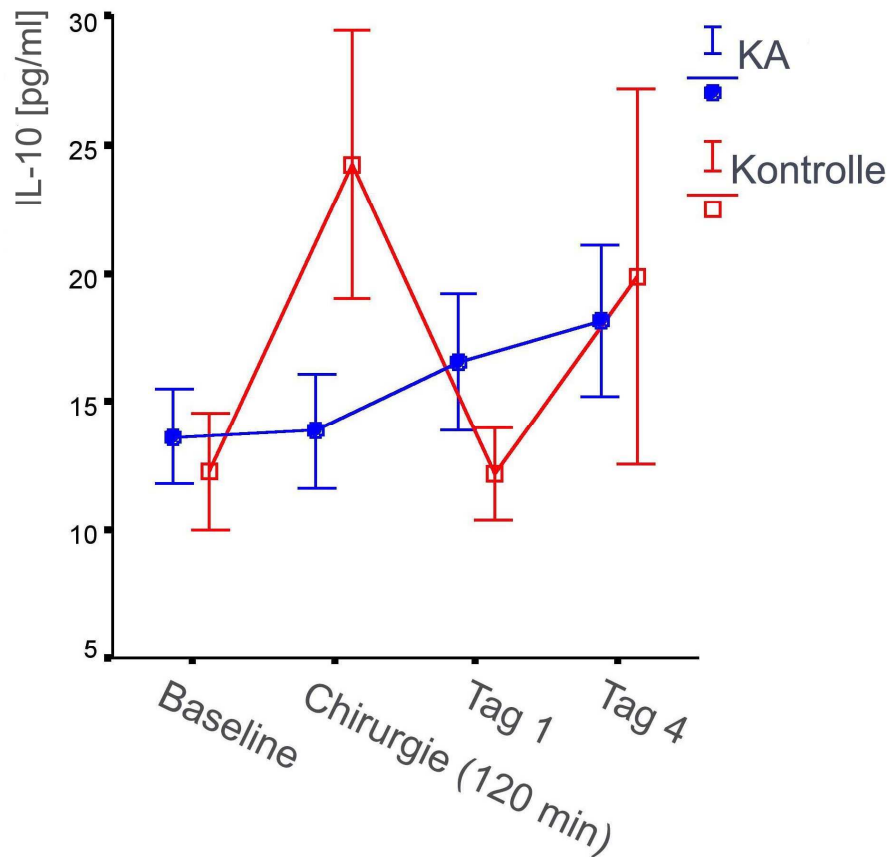


Abbildung 11: Präsentation der Daten auf der Basis des Mittelwerts \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM): KA (Kombinationsanästhesie-Gruppe): intra- und postoperative Analgesie durch PDK, Kontrolle (Kontrollgruppe): nur postoperative Analgesie durch PDK

4.7 IFN- γ /IL-10 Ratio (Plasma)

In beiden Gruppen verminderte sich die IFN- γ /IL-10 Ratio intraoperativ. Die Plasma IFN- γ /IL-10 Ratio wurde innerhalb der Kombinationsanästhesie-Gruppe zum Zeitpunkt Chirurgie 120 min in der post-hoc Analyse signifikant höher bestimmt ($p=0.012$). Dieses Ergebnis resultiert dabei in erster Linie aus einer Erhöhung der IL-10-Plasmakonzentration in der Kontrollgruppe und nicht aus einer Verminderung des IFN- γ im Plasma.

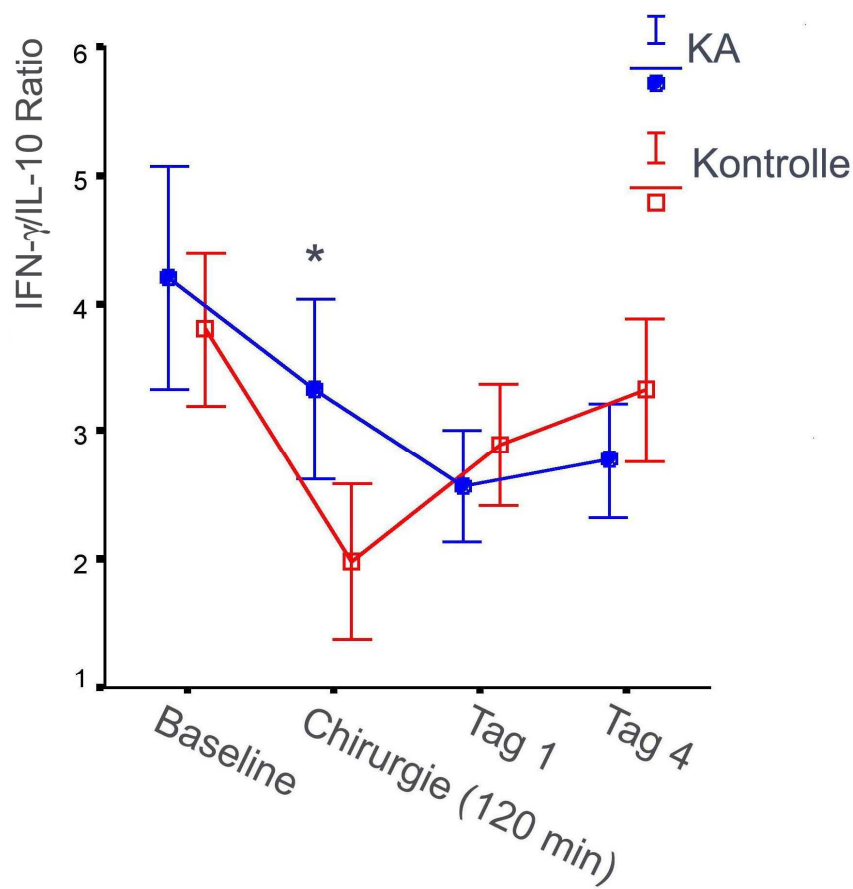


Abbildung 12: Präsentation der Daten auf der Basis des Mittelwertes \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM): *: $p < 0.05$ in der post-hoc Analyse, KA (Kombinationsanästhesie-Gruppe): intra- und postoperative Analgesie durch PDK, Kontrolle (Kontrollgruppe): nur postoperative Analgesie durch PDK

4.8 IFN- γ (Concanavalin A)

Das stimulierte IFN- γ wurde auf 1000 Lymphozyten standardisiert. In beiden Studiengruppen verminderte sich die ConA abhängige IFN- γ Stimulation im Vergleich zum Ausgangswert. In der Studiengruppe der Kombinationsanästhesie ergab sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant höhere ConA abhängige Stimulierbarkeit des IFN- γ im GLM ($p=0.003$). Es zeigte sich in der post-hoc Analyse zu den Messzeitpunkten Chirurgie 120 min ($p=0.014$) und Tag 1 ($p=0.05$) eine signifikant höhere Stimulierbarkeit des IFN- γ in der Studiengruppe Kombinationsanästhesie. Der entsprechende Verlauf kann aus der Abbildung 13 entnommen werden.

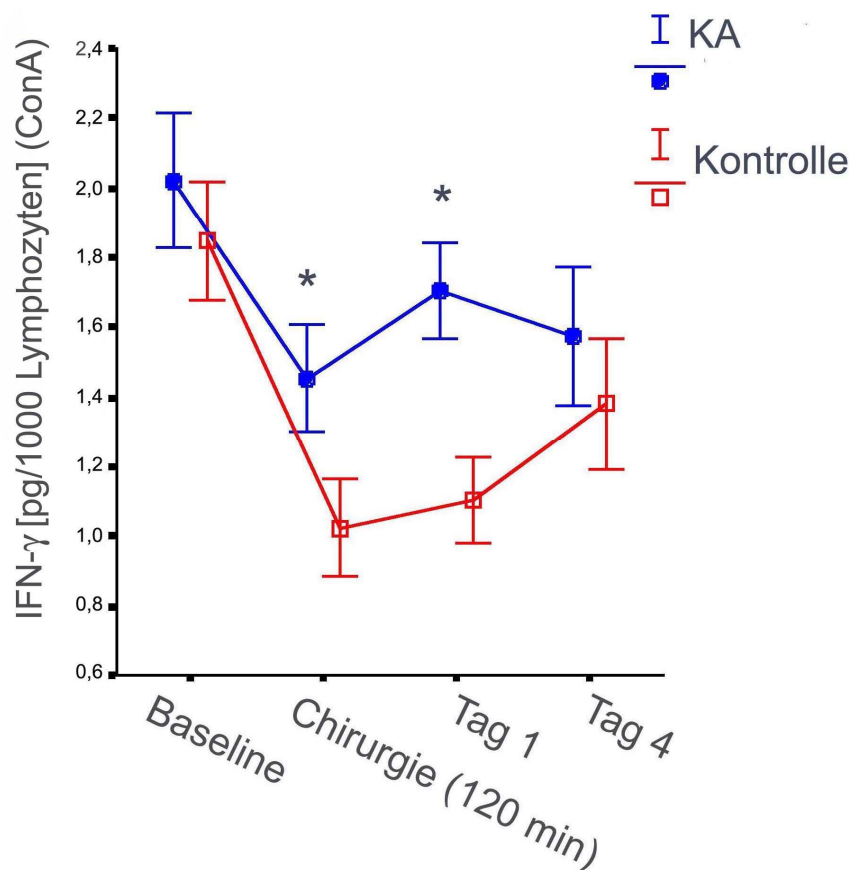


Abbildung 13: Präsentation der Daten auf der Basis des Mittelwerts \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM): *: $p < 0.05$ in der post-hoc Analyse, KA (Kombinationsanästhesie-Gruppe): intra- und postoperative Analgesie durch PDK, Kontrolle (Kontrollgruppe): nur postoperative Analgesie durch PDK

4.9 IL-10 (Concanavalin A)

Das stimulierte IL-10 wurde auf 1000 Lymphozyten standardisiert. Bei der Messung des ConA stimulierten IL-10 ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Studiengruppen. In beiden Gruppen zeigte sich eine erhöhte IL-10 Stimulierbarkeit durch ConA zum Messzeitpunkt Tag 1.

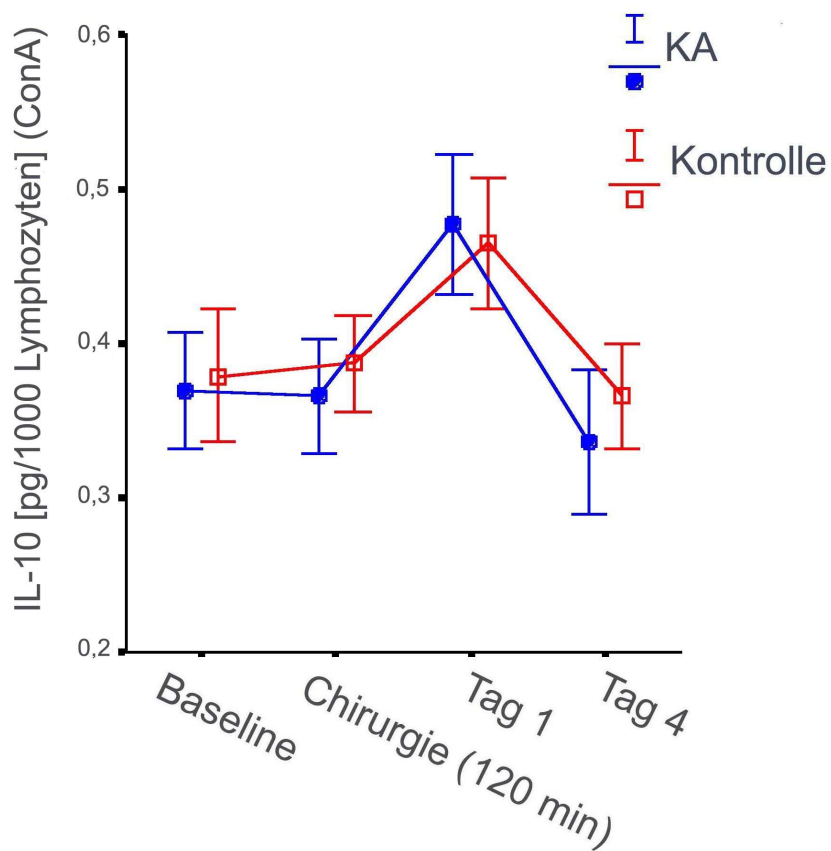


Abbildung 14: Präsentation der Daten auf der Basis des Mittelwerts \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM): KA (Kombinationsanästhesie-Gruppe): intra- und postoperative Analgesie durch PDK, Kontrolle (Kontrollgruppe): nur postoperative Analgesie durch PDK

4.10 IFN- γ /IL-10 Ratio (Concanavalin A)

Die Con-A stimulierte IFN- γ /IL-10 Ratio verminderte sich in beiden Studiengruppen im Vergleich zum Ausgangswert. In der Kombinationsanästhesie-Gruppe ergab sich eine signifikant höhere Ratio im GLM ($p=0.017$). In der post-hoc Analyse zeigte sich sowohl zum Messzeitpunkt Chirurgie 120 min ($p=0.023$) als auch am Tag 1 ($p=0.030$) eine signifikant höhere IFN- γ /IL-10 Ratio innerhalb der Kombinationsanästhesie-Gruppe. Die signifikant höhere IFN- γ /IL-10 Ratio ist dabei in der Hauptsache durch eine signifikante Reduzierung des IFN- γ -Spiegels (GLM: $p=0.003$) in der Kontrollgruppe bedingt und nicht durch Veränderungen der IL-10-Konzentration begründet.

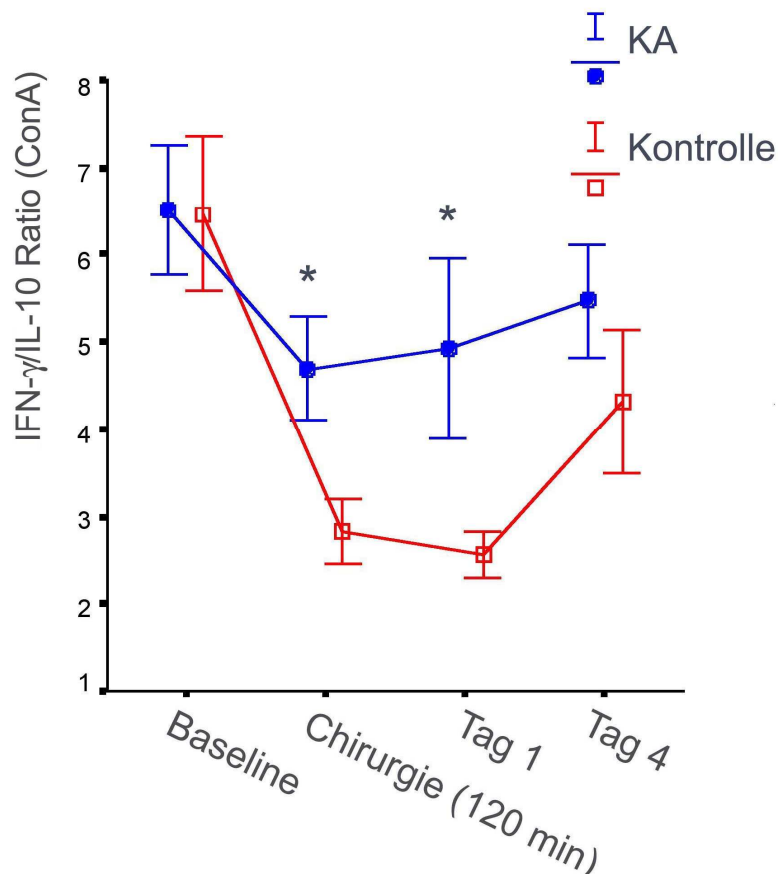


Abbildung 15: Präsentation der Daten auf der Basis des Mittelwerts \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM), *: $p < 0.05$ in der post-hoc Analyse, KA (Kombinationsanästhesie-Gruppe): intra- und postoperative Analgesie durch PDK, Kontrolle (Kontrollgruppe): nur postoperative Analgesie durch PDK

5 Diskussion

Die vorliegende Studie untersucht die Hypothese einer Verminderung der Stressantwort und einer damit einhergehenden Konservierung der spezifischen immunologischen Kapazität durch eine Kombinationsanästhesie bei großen abdominalchirurgischen Operationen. Um eine etwaige Reduktion der Stressantwort zu detektieren, wurden die Stresshormone Kortisol und Adrenalin bestimmt. Zur Untersuchung einer verbesserten Kapazität des spezifischen Immunsystems wurde die Anzahl der T-Helferzellen im peripheren Blut, das IFN- γ und das antiinflammatorische IL-10 sowohl in vivo als auch durch ConA-Stimulation ermittelt. Hinsichtlich möglicher klinischer Auswirkungen der Kombinationsanästhesie wurden die Tage des Klinikaufenthaltes, die Wiederaufnahmen auf die Intensivstation, die Anzahl der postoperativen Infektionen und die Anzahl der Überlebenden erfasst.

5.1 Reduktion der Stressantwort

Die untersuchten Studiengruppen unterschieden sich nicht signifikant hinsichtlich der epidemiologischen Patientendaten und der Art und Dauer der Operationen. Ebenso konnten keine signifikanten Unterschiede der Narkosetiefe bzw. BIS-Werte, der endexpiratorischen Isofluran-Konzentration und der intraoperativen Herzfrequenz festgestellt werden. Auf der Basis dieser Daten kann darauf geschlossen werden, dass zwischen der Studiengruppe der Kombinationsanästhesie und der Kontrollgruppe gleiche Bedingungen bestanden bzw. eine qualitativ gleichwertige Narkose vorlag. Die Messdaten der Kortisol- und Adrenalin-Plasmaspiegel waren während der intraoperativen Messung innerhalb der Kombinationsanästhesie-Gruppe signifikant niedriger. Ein Anstieg des Adrenalins im Plasma konnte in dieser Gruppe wirkungsvoll verhindert werden, da sich der entsprechende Wert als unverändert zum Ausgangswert präsentierte. Es ist bekannt, dass der Anstieg von Kortisol und Adrenalin im Plasma mit der Stärke des chirurgischen Stresses einher geht (Chernow, 1987, Schuetz, 2006). Vor diesem Hintergrund kann anhand der vorliegenden Ergebnisse bezüglich der genannten Hormone auf eine verbesserte Abschirmung des durch den chirurgischen Eingriff verursachten Stresses durch die Verwendung der Kombinationsanästhesie geschlossen werden. Die in der vorliegenden Studie gezeigte intraoperative Verminderung der Kortisol- und Adrenalin-Plasmaspiegel durch die Verwendung der

Periduralanästhesie wurde bereits in anderen wissenschaftlichen Arbeiten gezeigt (Rem, 1980, Volk, 2003).

Als ursächlich wird dabei eine durch die Kombinationsanästhesie erreichte Verringerung der neuronalen Stimuli aus dem Wundgebiet angesehen (Rem, 1980). Darüber hinaus sind noch weitere Effekte der Periduralanästhesie bezüglich der Verminderung der Stresshormone in Betracht zu ziehen. Die sympathische Versorgung der Nebenniere, die die Adrenalin Synthese und Inkretion steuert, geht auf autonome Nervenabgänge in Höhe des thorakalen Segmentes 6 bis in Höhe des lumbalen Segmentes 2 zurück (Bonica, 1968). Da in der vorliegenden Studie in dieser Höhe auch die intraoperative Periduralanästhesie durchgeführt wurde, ist zu einem Teil die Verringerung der Adrenalin-Plasmaspiegel durch eine efferente Blockade des Nebennierenmarks erklärbar und nicht ausschließlich auf eine vermehrte Stressabschirmung zurückzuführen.

Des Weiteren ist die Kortisolsynthese der Nebennierenrinde (NNR) vom lokalen Hormonmilieu des Adrenalins abhängig und bei einer Verminderung dieses Katecholamins resultiert auch eine verringerte Syntheserate von Kortisol (Haidan, 1998). Klinisch konnte auch bei schmerzfreien Patienten eine signifikante Reduzierung der Adrenalin- und Kortisolspiegel durch den Periduralkatheter bei unbeeinflusster ACTH-Plasmakonzentration festgestellt werden (Yokoyama, 2001). Es ist somit anzunehmen, dass die Periduralanästhesie zu einem Teil auch stressunabhängig die Plasmaspiegel des Kortisols durch eine efferente Blockade der Nebenniere vermindert.

5.2 Auswirkungen der Kombinationsanästhesie auf die Anzahl und die immunologische Funktion der TH1-Lymphozyten

5.2.1 Anzahl der TH1-Zellen

Starker Stress und das in der Folge vermehrt auftretende Kortisol und Adrenalin bedingen bedeutende Veränderungen des Immunsystems. Dabei bewirken differente Arten von Stressreizen, wie etwa psychische Traumata, starke Belastungen durch sportliche Übungen, Kälte-Expositionen als auch größeren Verletzungen eine relativ gleichartig antiinflammatorisch geprägte Stressantwort (Munford, 2001). Glukokortikoide führen zu einer vermehrten Apoptose der Lymphozyten und verringern die Fähigkeit aller T-Helferzellen zur Proliferation (Almawi, 1991, Almawi, 2002). In der vorliegenden

Studie gelang in der post-hoc Analyse der Nachweis einer signifikant abgeschwächten Verminderung der absoluten Anzahl der T-Helferzellen im peripheren Blut durch die Kombinationsanästhesie zum Messzeitpunkt Tag 1. Anhand der zuvor genannten wissenschaftlichen Literatur kann vermutet werden, dass dieser signifikant verringerte Abfall der T-Helferzellen mit der ebenfalls signifikanten Verminderung der Kortisol-Plasmakonzentration durch die Kombinationsanästhesie in ursächlichem Zusammenhang steht. Eine verminderte Reduktion der absoluten Anzahl der T-Helferzellen im Rahmen der Kombinationsanästhesie konnte bereits in der Vergangenheit nachgewiesen werden (Tonnesen, 1988). In der vorliegenden Studie wurde durchflusszytometrisch die absolute Anzahl der gesamten T-Helferzellen bestimmt. Für die Unterscheidung in TH1- oder TH2-Zellen kann nur die Berücksichtigung des entsprechenden Hormon- bzw. Zytokinmilieus Hinweise liefern.

Die Freisetzung von Glukokortikoiden in Folge der Stressantwort führt zu einer Verschiebung der TH1/TH2-Balance zugunsten der TH2-Antwort (Elenkov, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass Glukokortikoide neben der bekannten Verminderung der TH1-Zytokine, wie beispielsweise des IFN- γ und des für die TH1-Zell Proliferation wichtigen IL-12 aber auch die TH2-Antwort durch die Suppression spezifischer Transkriptionsfaktoren inhibieren (Lieberman, 2009). Die immunologischen Auswirkungen erhöhter Adrenalin-Plasmaspiegel im Rahmen der Stressantwort manifestieren sich ebenfalls in einer Verminderung der TH1-Antwort zugunsten der TH2-Antwort. In diesem Zusammenhang konnte durch die Verwendung eines β_2 -Rezeptor-Agonisten eine verminderte Freisetzung des für die Entwicklung immunkompetenter TH1-Zellen notwendigen IL-12 durch humane Monozyten gezeigt werden (Panina-Bordignon, 1997). Ebenso konnte durch entsprechende β_2 -Rezeptor-Agonisten bei humanen TH1-Zellen in direkter Weise eine Verminderung des für die TH1-Antwort zentralen IFN- γ nachgewiesen werden (Borger, 1998). Die Freisetzung von IL-10 wird durch Kortisol und Adrenalin erhöht (Platzer, 2000). IL-10 bewirkt synergistisch zu dem Hormon Kortisol eine absolute Verminderung der TH1- und TH2-Funktion, bedingt aber durch die hochgradige Suppression des IFN- γ eine relative Zunahme der TH2-Antwort (Asadullah, 2003). IFN- γ wird dabei als dominierendes Charakteristikum der TH1-Zellen angesehen (Seder, 2003). In den spezifischen T-Zellstimulationen durch ConA zeigte sich sowohl im GLM als auch in der post-hoc Analyse zu den Messzeitpunkten Chirurgie und Tag 1 in Relation zur Kontrollgruppe

signifikant höhere IFN- γ -Spiegel. Vor dem Hintergrund der bereits besprochenen signifikanten Verminderung des Kortisol- und Adrenalin-Anstieges und der signifikant verringerten IL-10-Plasmakonzentration im GLM ist damit in der Studiengruppe Kombinationsanästhesie von einer Verminderung der Verschiebung der TH1/TH2-Balance zugunsten einer relativ verbesserten TH1-Polarität mit einer erhöhten absoluten Anzahl der TH1-Zellen im peripheren Blut auszugehen.

5.2.2 Immunologische Funktion der TH1-Zellen

Die TH1-Zellen erleiden durch ausgedehnte chirurgische Eingriffe einen Defekt, der sich in einer verminderten Proliferation und einer reduzierten Fähigkeit zur IFN- γ Synthese manifestiert. In der reduzierten immunologischen Kapazität der TH1-Helferzellen kann dabei der Hauptmechanismus einer insgesamt verminderten Funktion des Immunsystems bei chirurgischen Patienten gesehen werden (Hensler, 1997). In diesem Zusammenhang erscheint auch die Wirkung der TH1-Zellen auf die APC von zentraler Bedeutung. Die phagozytäre Aktivität und die Antigenpräsentation der APC über MHC-II werden durch IFN- γ bedeutend stimuliert. Eine Erregererkennung als Grundlage einer immunologischen Reaktion (Erkennungsphase) ist durch das IFN- γ hochgradig mitbestimmt. Tritt dagegen in spezifischen Phasen der Immunantwort ein Mangel an IFN- γ ein, so kann ablesbar an einer verminderten Antigenpräsentation der APC via MHC-II im Extremfall sogar eine „Immunparalyse“ mit schweren Infektionen resultieren (Volk 1996). Die TH1-Zellen fördern darüber hinaus die immunologische Effektorphase. So wird beispielsweise die spezifische Synthese opsonierender Antikörper mit einer nachfolgend erhöhten phagozytären Aktivität der neutrophilen Granulozyten unterstützt (Annunziato, 2009). In der Folge wird entsprechend der reduzierten TH1-spezifischen Unterstützung durch chirurgische Eingriffe, die immunologische Kapazität der Effektorphase ebenfalls vermindert. Bei ausgedehnten operativen Eingriffen sind reduzierte IFN- γ -Plasmaspiegel (Schinkel, 2003) und eine Verminderung der IFN- γ Syntheseleistung der TH1-Zellen bei einer entsprechenden ConA Stimulation zu erwarten (Angele, 2005). Hiermit steigt die Wahrscheinlichkeit für das Erleiden schwerwiegender Infektionen an.

Es ist bekannt, dass Glukokortikoide (Agarwal, 2001) und Adrenalin zu einer Verminderung des für die TH1-Antwort notwendigen IFN- γ führen (Borger, 1998).

Ebenfalls sind erhöhte IL-10-Plasmaspiegel durch eine vermehrte Kortisol und Adrenalin Inkretion beispielsweise durch die Stressantwort im Sinne einer Kostimulation zu erwarten (Volk, 2001, Elenkov 2000). In der vorliegenden Studie zeigte sich eben dieser Effekt, da sich in beiden Studiengruppen IFN- γ sowohl im Plasma, als auch durch ConA Stimulation im Rahmen des chirurgischen Eingriffs mit einem Anstieg des Kortisols, des Adrenalins und des IL-10 verminderte.

IL-10 unterbindet in den T-Helferzellen die IFN- γ Synthese und die Etablierung einer inflammatorischen TH1-Antwort (Asadullah, 2003). In diesem Zusammenhang ist das Verhältnis des inflammatorischen IFN- γ zu dem antiinflammatorischen IL-10 von Bedeutung, welches über die IFN- γ /IL-10 Ratio aufgestellt werden kann. Die IFN- γ /IL-10 Ratio des Plasmas zeigte sich in der Kombinationsanästhesie-Gruppe zum Zeitpunkt Chirurgie in der post-hoc Analyse signifikant erhöht. Ebenfalls in der Kombinationsanästhesie-Gruppe konnten die IFN- γ /IL-10 Ratios auf der Basis der ConA Stimulationen zum Messzeitpunkt Chirurgie als auch am Tag 1 in der post-hoc Analyse signifikant höher bestimmt werden. Im Rahmen der Kombinationsanästhesie weisen diese Ergebnisse auf eine im Vergleich zur Kontrollgruppe relative Erhöhung der TH1-spezifischen immunologischen Kapazität und damit auch auf eine verringerte Reduzierung der Erkennungs- und Effektorphase des Immunsystems hin.

5.3 Klinische Auswirkungen der Kombinationsanästhesie in der vorliegenden Studie

Obwohl sich für die Kombinationsanästhesie im Vergleich zur Kontrollgruppe Hinweise für eine verminderte Abschwächung sowohl der Anzahl der TH1-Zellen im peripheren Blut, als auch der inflammatorischen Funktion der TH1-Zellen ergaben, konnte klinisch kein relevanter Unterschied zwischen den Studiengruppen festgestellt werden. So zeigten sich die Infektionsraten, die Zeitdauer einer intensivmedizinischen Betreuung, die Notwendigkeit der Wiederaufnahme einer intensivmedizinischen Betreuung, die Tage des Klinikaufenthaltes und die Anzahl der Überlebenden ohne signifikante Unterschiede zwischen den Studiengruppen.

5.4 Bedeutung der Stressantwort und die Rolle der Kombinationsanästhesie

Die neuronale Transmission aus dem Wundgebiet, die bei einem nicht hypnotisierten Patienten als Schmerz empfunden wird, ist einer der Mechanismen, der die Stressantwort verursacht. Bei der Evolution des Menschen und der Säugetiere führt die Stressreaktion unter anderem im Rahmen einer körperlicher Auseinandersetzung bzw. einer Verletzung zu einer Leistungssteigerung (Fight or Flight) (Selye, 1936). Ebenso kann die Nahrungsaufnahme durch den katabolen Charakter des Kortisol eingeschränkt werden. Dies ist beispielsweise notwendig durch eine, in einer Auseinandersetzung erlittenen Verwundung, die eine Nahrungssuche für einen gewissen Zeitraum verhindert (Desborough, 2000). Evolutionär betrachtet ist die menschliche Konstitution nur auf Verletzungen bis zu einer gewissen Grenze ausgelegt, da schwerere Verwundungen nicht überlebt werden konnten. Die moderne Medizin ermöglicht das Überleben auch solcher Verletzungen, wie bei den in dieser Studie untersuchten Patienten. Die Stressantwort des chirurgischen Patienten, die das Bestehen in der Auseinandersetzung mit einer feindlichen Umwelt garantieren soll, bleibt allerdings ebenfalls existent und kann eventuell pathologische Zustände verursachen, die als nicht mehr adaptiv erscheinen und selbst eine Gefährdung darstellen können (Buckingham, 1985). In diesem Zusammenhang wurden durch operative Eingriffe infolge der Antiinflammation gesteigerte IL-10-Plasmaspiegel beobachtet, die mit einer erhöhten Komplikationsrate durch Infektionen einhergingen (Sander, 2002). Vor diesem Hintergrund kann die durch die Kombinationsanästhesie bedingte abgeschwächte Verringerung des IFN- γ in den ConA-Stimulationen als auch der verringerte Anstieg des IL-10 im Plasma in der vorliegenden Studie als positive Abschwächung der antiinflammatorischen und nicht mehr als adaptiv zu wertenden Stressantwort beurteilt werden.

Die durch die Chirurgie bedingten Gewebsverletzungen etablieren unter anderem aber auch eine lokale Freisetzung von stark inflammatorisch wirksamen Mediatoren, die das Wundmilieu mitbestimmen. Es entsteht im Bereich der Wunde eine zumindest anfänglich abakterielle Wundinflammation, die eine notwendige Voraussetzung der Wundheilung darstellt. Diese inflammatorischen Wundfaktoren, wie beispielsweise das TNF- α , erlangen Anschluss an die systemische Zirkulation und entfalten eine systemisch-inflammatorische Wirkung, die über das lokale Wundgeschehen hinausweist (Baker, 2006). Insgesamt betrachtet, stellt dieser Vorgang eine

Gefährdungen des dynamischen Gleichgewichtes (Homöostase) des Immunsystems dar. Der Begriff Stress bezeichnet eine Störung der Homöostase, die Stressantwort stellt den physiologischen Versuch dar, durch eine Gegenregulation die Homöostase der inflammatorischen und antiinflammatorischen Faktoren zu reetablieren (Chrousos, 1998). Überträgt man diese Vorstellung auf das Immunsystem unter den Bedingungen der Chirurgie, so kann die in direkter Folge des Traumas auftretende chirurgische Wundinflammation als Störung des immunologisch-dynamischen Gleichgewichts begriffen werden. Da eine vom Wundtrauma ausgehende unkontrollierte Inflammation zu einer Schädigung des eigenen Organismus führen kann, also die immunologische Homöostase gefährdet ist, resultiert eine systemisch antiinflammatorische Stressantwort, die die Inflammation auf das Wundgebiet begrenzt (Munford, 2001).

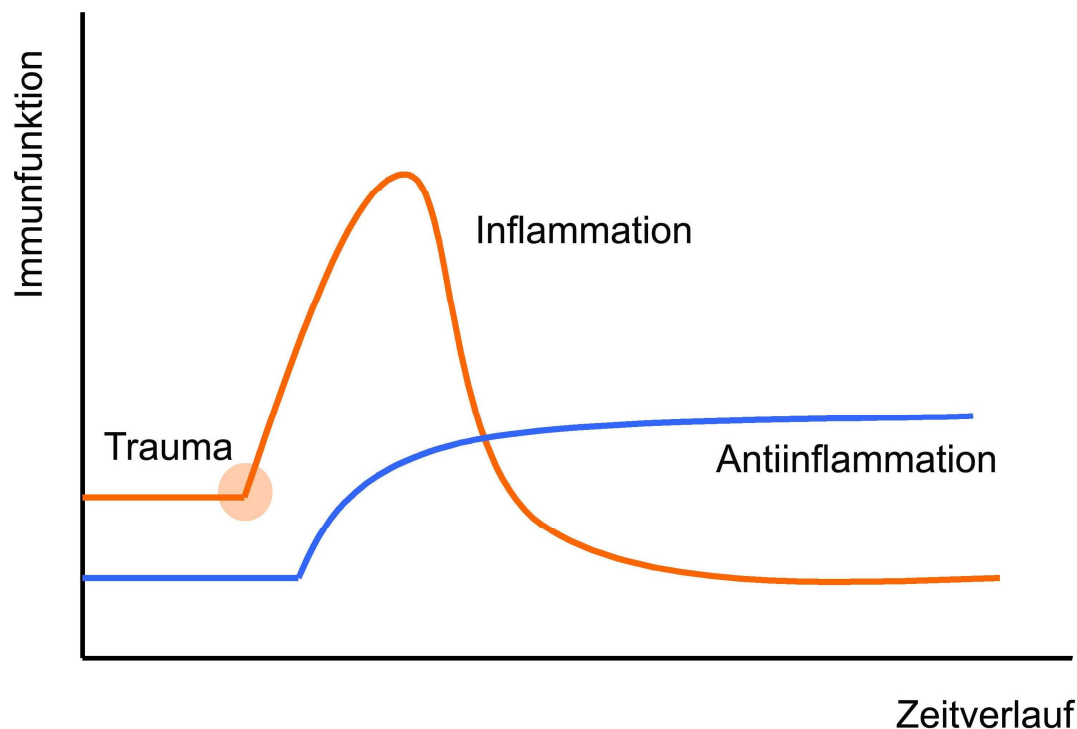


Abbildung 16: Schematische Darstellung der inflammatorischen und antiinflammatorischen Veränderungen in Folge eines chirurgischen Eingriffs. Durch ein Wundtrauma entsteht eine Inflammation deren Faktoren sich in der systemischen Zirkulation nachweisen lassen (rote Kurve). Die Inflammation der Wunde und die Stressantwort bedingen unter anderem eine systemische Gegenregulation durch antiinflammatorische Faktoren (blaue Kurve), die insgesamt zu einer Kapazitätsverminderung der inflammatorischen Faktoren in der systemischen Zirkulation führen und eine erhöhte Infektionsrate verursachen können.

Die Stressantwort kann zu einer physiologischen Reetablierung der immunologischen Homöostase, also einem neuen Gleichgewicht inflammatorischer und antiinflammatorischer Faktoren führen und den Organismus vor einem pathologischen Überwiegen der Inflammation schützen. Dieser Umstand könnte die klinische Beobachtung einer Bimodalität der durch die Chirurgie ausgelösten immunologischen Veränderungen erklären, dass auf die Anzeichen einer Inflammation antiinflammatorische Veränderungen anschließen (Volk, 1996, Menger, 2004). Die intraoperative Periduralanästhesie greift in diese antiinflammatorische Gegenregulation ein, indem Kortisol, Adrenalin und IL-10 vermindert und die Auslenkung in Richtung einer inflammatorischen TH1-Antwort in der systemischen Zirkulation relativ gesteigert wird. Möglicherweise führt dieser Eingriff zu einer Behinderung der Reetablierung einer Homöostase zwischen dem inflammatorischen Wundmilieu und der systemischen Antiinflammation mit der Folge einer erhöhten Wahrscheinlichkeit pathologisch inflammatorischer Zustände. Die Ursachen für lebensbedrohlichen Stress einschließlich ausgedehnter operativer Eingriffe sind typischerweise mit variablen Zuständen der Inflammation des kritisch kranken Patienten verbunden (Schuetz, 2006), so dass insgesamt von der Notwendigkeit eines antiinflammatorischen Feedbackmechanismus ausgegangen werden kann. Als klinisches Beispiel für die wichtige Rolle des Kortisol als Feedbackregulator der Inflammation können Patienten dienen, die ein Polytrauma erlitten hatten und eine Analgosedierung mit Etomidate erhielten, welches zu verminderten Kortisol-Plasmaspiegeln führt und bei kritisch kranken Patienten eine erhöhte Mortalität verursachte (Lendingham, 1983). Die Rolle des Interleukin-10 ist neben der des Kortisol ebenfalls im Zusammenhang mit einer physiologischen Immunregulation zur Verhütung einer körpereigenen Schädigung durch das Immunsystem zu sehen (O`Garra, 2007). So konnte klinisch auch ein protektiver Effekt des IL-10 bei Patienten mit Sepsis durch eine Limitierung der Inflammation nachgewiesen werden (Mege, 2006). Durch die Kombinationsanästhesie wird in diesem Zusammenhang nicht nur die neuronale Transmission vermindert, sondern wie bereits erwähnt auch die Effektorfunktion der Nebenniere eingeschränkt. Somit wird eventuell eine möglicherweise bedarfsgerechte bzw. adaptierte Variationsbreite der antiinflammatorischen Stressantwort wenig physiologisch eingeschränkt.

5.5. Schlussbemerkung

Die Kombinationsanästhesie besitzt das Potential, die in der modernen Medizin zu einem Teil als pathologisch zu begreifende Stressantwort zu reduzieren. Die Aufgabe der Anästhesie ist in diesem Zusammenhang, die Stressreaktion auch im Hinblick einer Bewahrung der immunologischen Kapazität des chirurgischen Patienten abzuschwächen, aber gemessen an den immunologischen Vorgängen der Wundinflammation weiterhin eine adaptierte antiinflammatorische Stressantwort zu ermöglichen, da die Quelle der Inflammation in Form des chirurgischen Wundgebietes von der Anästhesie weiterhin unabhängig existiert. Sollte die im Rahmen der chirurgischen Stressreaktion bis zu einer gewissen Grenze als physiologisch zu wertende Stressantwort zu stark abgeschwächt werden, könnte die durch die Chirurgie bedingte Inflammation nicht genügend antiinflammatorisch gegenreguliert werden und pathologisch inflammatorische Zustände entstehen.

Vor diesem Hintergrund besteht das Problem der außerordentlichen Plastizität und Komplexität des Immunsystems in Verbindung mit der Stressantwort. Anhand des aktuellen wissenschaftlichen Standes und der zur Verfügung stehenden Messmethoden sind exakte Aussagen zur strikten Grenzziehung einer durch chirurgischen Stress bedingten physiologischen oder bereits pathologischen Antiinflammation bzw. Inflammation und damit auch die Bewertung der Kombinationsanästhesie in diesem Kontext limitiert. Insofern weisen die in der vorliegenden Studie gewonnenen Resultate auf eine verminderte Reduktion der immunologischen Kapazität der spezifischen TH1-Antwort bei zugrundeliegender Abschwächung des Anstieges der antiinflammatorischen Stresshormone und des IL-10 durch die Kombinationsanästhesie hin.

In diesem Zusammenhang konnte aber hinsichtlich des Auftretens postoperativer Infektionen kein signifikanter Unterschied zwischen den Studiengruppen erfasst werden. Allerdings ist die Anzahl von 54 untersuchten Patienten als statistisch zu gering zu erachten, um diesbezüglich eine Aussage treffen zu können. Vor diesem Hintergrund sind somit weitere Studien zur Klärung einer möglicherweise verbesserten Reduktion postoperativer Infektionen durch die Kombinationsanästhesie bei großen abdominalchirurgischen Eingriffen anhand einer entsprechend großen Fallzahl notwendig.

6 Zusammenfassung

Intraoperativer Stress kann zu einer verminderten Kompetenz des spezifischen Immunsystems führen. Die TH1-Zellen erleiden durch ausgedehnte chirurgische Eingriffe einen Defekt, der sich in einer verminderten Proliferation und einer reduzierten Fähigkeit zur IFN- γ Synthese manifestiert. In der reduzierten Kapazität der TH1-Helferzellen kann dabei der immunologische Hauptmechanismus einer insgesamt verminderten Funktion des Immunsystems bei chirurgischen Patienten gesehen werden. In diesem Zusammenhang erscheint die Wirkung der TH1-Zellen auf die APC von zentraler Bedeutung. Die phagozytäre Aktivität und die Antigenpräsentation der APC via MHC-II werden durch die TH1-Antwort bedeutend stimuliert. Eine Erregererkennung als Grundlage einer immunologischen Reaktion in der Erkennungsphase und die letztendliche Erregerelimination in der Effektorphase beispielsweise durch eine spezifische Synthese opsonierender und einer nachfolgend erhöhten Phagozytose durch neutrophile Granulozyten wird durch die TH1-Antwort hochgradig mitbestimmt. Die vorliegende Studie untersucht die Hypothese einer Verminderung der Stressantwort und einer damit einhergehenden verbesserten Konservierung der TH1-Zellen gestützten spezifischen immunologischen Kapazität durch die Verwendung einer intraoperativen Periduralanästhesie (PDA). Hierzu wurden 54 Patienten, die sich ausgedehnten abdominalchirurgischen Operationen unterziehen mussten, präoperativ mit einem Periduralkatheter (PDK) versorgt. In der Kombinationsanästhesie-Gruppe wurde über den PDK die intraoperative Analgesie gewährleistet, während in der Kontrollgruppe die Analgesie während der Operation durch die systemische Gabe von Opioiden erfolgte. In beiden Gruppen wurde postoperativ der liegende PDK zur patientenkontrollierten Schmerztherapie benutzt. Die Entnahme von Blutproben für immunologische Analysen erfolgte vor dem Beginn der Narkose, 2 Stunden nach Beginn der Operation und am 1. und am 4. Tag postoperativ. Zu diesen Zeitpunkten erfolgte die Bestimmung der Anzahl der T-Helferzellen, die IL-10 und IFN- γ -Plasmakonzentrationen und die IL-10 und IFN- γ -Konzentrationen nach Concanavalin A Stimulation. Ebenso erfolgte vor Beginn der Narkose als auch 40 Minuten nach Beginn der Operation die Bestimmung der Plasmaspiegel von Adrenalin und Kortisol. Zusätzlich wurde die Narkosetiefe anhand des bispektralen Index erfasst und weitere post- und intraoperative Daten wie beispielsweise die postoperativen Infektionsraten gesammelt. Die untersuchten Studiengruppen unterschieden sich nicht

signifikant hinsichtlich der epidemiologischen Patientendaten und der Art und Dauer der Operationen. Ebenso konnten keine signifikanten Unterschiede der Narkosetiefe bzw. BIS-Werte, der endexpiratorischen Isofluran-Konzentration und der intraoperativen Herzfrequenz festgestellt werden. Es zeigten sich in der Kombinationsanästhesie-Gruppe bei qualitativ gleichwertiger Narkose ein signifikant verminderter Anstieg der Adrenalin- und Kortisol-Plasmaspiegel, ein signifikant verringerter Abfall der absoluten Anzahl der T-Helferzellzahl am Messzeitpunkt Tag 1, eine signifikant reduzierte Verringerung der IFN- γ /IL-10 Ratio anhand der Plasmakonzentrationen, als auch eine signifikant verminderte Reduktion der IFN- γ Stimulierbarkeit durch Concanavalin A. Anhand des postoperativen klinischen Verlaufes ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Studiengruppen. Insgesamt kann aber anhand der vorliegenden Ergebnisse darauf geschlossen werden, dass die intraoperative Verwendung einer thorakalen Peridualanästhesie den operativen Stress reduziert und mittels einer geringeren Verminderung der spezifischen inflammatorischen Funktion der lymphozytären TH1-Zellen bei ausgedehnten abdominalchirurgischen Operationen eine relative Verbesserung der immunologischen Kapazität bedingt.

7 Literaturverzeichnis

Abbas AK, Murphy KM, Sher A: Functional diversity of helper T-lymphocytes. *Nature* 1996; 383:787-793

Adams HA, Hempelmann G: Die endokrine Streßreaktion in Anästhesie und Chirurgie – Ursprung und Bedeutung. *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 1991; 26:294-305

Agarwal SK, Marshall GD: Dexamathason promotes type 2 cytokine production primarily through inhibition of type 1 cytokines. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 2001; 21(3):147-155

Almawi WY, Melemedjian OK: Negative regulation of nuclear factor-NFκB activation and function by glucocorticoids. *Journal of Molecular Endocrinology* 2002; 28:69–78

Almawi WY, Lipman ML, Stevens AC, Zanker B, Hadro ET, Strom TB: Abrogation of glucocorticosteroid-mediated inhibition of T cell proliferation by the synergistic action of IL-1, IL-6, and IFN-gamma. *Journal of Immunology* 1991; 146:3523–3527

Angele MK, Chaudry IH: Surgical trauma and immunosuppression; pathophysiology and potential immunomodulatory approaches. *Langenbecks Arch Surg* 2005; 390:333–341

Annunziato F, Romagnani S: Heterogeneity of human effector CD4+ T cells. *Arthritis Research & Therapy* 2009; 11:257-265

Asadullah K, Sterry W, Volk HD: Interleukin-10 Therapy – Review of a New Approach. *Pharmacol Rev* 2003; 55:241 – 269

Baker EA, El-Gaddal S, Williams L, Leape DJ: Profiles of inflammatory cytokines following colorectal surgery: Relationship with wound healing and outcome. *Wound Rep Reg.* 2006; 14:566–572

Beutler B: Innate immunity: an overview. *Mol Immunol* 2003; 40:845-859

Bonica JJ: Autonomic Innervation of the Viscera in Relation to nerve Block. *Anesthesiology* 1968; 29:793-813

Borger P, Hoekstra Y, Esselink MT, et al.: β -Adrenoceptor-mediated Inhibition of IFN- γ , IL-3, and GM-CSF mRNA Accumulation in Activated Human T Lymphocytes Is Solely Mediated by the β_2 -Adrenoceptor Subtype. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998;19:400–407

Buckingham JC: Hypothalamo-Pituitary Responses To Trauma. *British Medical Bulletin* 1985; 41(3): 203-211

Chernow B, Alexander HR, Smallridge RC, et al.: Hormonal Responses to Graded Surgical Stress; *Arch Intern Med* 1987; 147(7):1273-1278

Chrousos GP: Stressors, Stress, and Neuroendocrine Integration of the Adaptive Response, The 1997 Hans Selye Memorial Lecture: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1998; 851:311-35

Del Prete G, De Carli M, Amerigogna F, Giudizi MG, Biagiotti R, Romagni S: Humal IL-10 Produced by Both Type 1 Helper (TH1) and Type 2 (TH2) T Cell Clones and Inhibits Their Antigen-Specific Proliferation and Cytokine Production. *The Journal of Immunology* 1993; Vol. 150, 353–360

Desborough JP: The stress response to trauma and surgery. *Br J Anaesth* 2000; 85:109-117

Dieing A, Ahlers O, Kerner T, et al.: Whole body hyperthermia induces apoptosis in subpopulations of blood lymphocytes. *Immunobiol* 2003; 207:265-73

Doecke WD, Randow F, Syrbe U, et al.: Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment. *Nat Med* 1997; 3:678–681

Dong C, Flavell R: Th1 and Th2 cells. *Curr Opin Hematol* 2001; 8: 47-51

Elenkov IJ: Glucocorticoids and the Th1/Th2 Balance. *Ann NY Acad Sci* 2004; 1024:138–146

Elenkov IJ, Chrousos GP: Stress Hormones, Proinflammatory and Antiinflammatory Cytokines, and Autoimmunity. *Ann NY Acad Sci* 2002; 966:290–303

Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP, Viti S: The Sympathetic Nerve – An Integrative Interface between Two Supersystems: The Brain and the Immune Systems. *Pharmacological Reviews* 2000; 52:595-638

Glass P, Bloom M, Kearse L, Rosow C, Sebel P, Manberg P: Bispectral analysis measures sedation and memory effects of propofol, midazolam, isoflurane and alfentanil in healthy volunteers. *Anesthesiology* 1997; 86:836-47

Haidan A, Bornstein SR, Glasow A, Uhlmann K, Luebeke C, Ehrhart-Bornstein M: Basal Steroidogenic Activity of Adrenocortical Cells Is Increased 10-Fold by Coculture with Chromaffin Cells. *Endocrinology* 1998; 139(2):772-80

Hensler T, Hecker H, Heeg K, et al.: Distinct mechanisms of immunosuppression as a consequence of major surgery. *Infect Immun* 1997; 65:2283–2291

Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM: Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* 1993; 260(5107):547-9

Janeway CA Jr.: How the immune system works to protect the host from infection: A personal view. *PNAS* 2001; 98:7461-7468

Johansen JW, Sebel PS: Development and clinical application of electroencephalographic bispectrum monitoring. *Anesthesiology* 2000; 93:1336-44

Kawasaki T, Ogata M, Kawasaki C, Okamoto K, Sata T: Effects of epidural anaesthesia on surgical stress-induced immunosuppression during upper abdominal surgery. *British Journal of Anaesthesia* 2007; 98(2):196–203

Lanzavechia A: Receptor-mediated antigen uptake and its effect on antigen presentation to class II-restricted T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 1990; 8:773-93

Lendingham IM, Watt I: Influence of sedation on mortality in critically ill multiple trauma patient. *Lancet* 1983; 1:1270

Liberman AC, Druker J, Refojo D, Holsboer F, Arzt E: Glucocorticoids inhibit GATA-3 phosphorylation and activity in T cells. *FASEB J* 2009; 23:1558–1571

Mege L, Meghari S, Honstettre A, Capo C, Raoult D: The two faces of interleukin 10 in human infectious diseases. *Lancet Infect Dis* 2006; 6:557–69

Menger MD, Vollmar B: Surgical trauma: hyperinflammation versus immunosuppression? *Langenbecks Arch Surg* 2004; 389:475–484

Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O`Garra A: Interleukin-10 and the interleukin-receptor. *Annu Rev Immunol* 2001; 683 – 765

Munford RS, Pugin J: Normal Responses to Injury Prevent Systemic Inflammation and Can Be Immunosuppressive. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 316–321

Murphy R: The Lineage Decision Of Helper T-Cells. *Nature Reviews Immunology* 2002; 2:933 – 944

Murray PJ: Understanding and exploiting the endogenous Interleukin-10/STAT3 mediated anti-inflammatory response. *Current Opinion Pharmacology* 2006; 6:379 – 386

Nance DM, Sanders VM: Autonomic innervation and regulation of the immune system (1987 – 2007). *Brain Behav Immun* 2007; 21(6):736-45

O`Garra A, Vieira P: TH1 cells control themselves by producing Interleukin-10. *Nature Reviews Immunology* 2007; 7:425-428

Palacios R: Concanavalin A triggers T lymphocytes by directly interacting with their receptors for activation. *J Immunol* 1982; 128:337-342

Panina-Bordignon P, Mazzeo D, Lucia PD, D'Ambrosio Det al.: Beta2-agonists prevent Th1 development by selective inhibition of interleukin 12. *J Clin Invest* 1997; 100(6):1513-9

Platzer C, Döcke WD, Volk HD, Prösch S: Catecholamines trigger IL-10 release in acute systemic stress reaction by direct stimulation of its promoter/enhancer activity in monocytic cells. *Journal of Neuroimmunology* 2000;105:31–38

Rem L, Brandt MR, Kehlet H: Prevention Of Postoperative Lymphopenia And Granulozytosis By Epidural Analgesia. *The Lancet*, 1980;1(8163):283-4

Robinson JP: Handbook of Flow Cytometry Methods. Wiley-Liss Inc 1993, New York City, USA

Romagnani S: Biology of human TH1 and TH2 cells. J Clin Immunol 1995; 15:121–129

Sander M, Irwin M, Sinha P, Naumann E, Kox WJ, Spies C: Suppression of interleukin-6 to interleukin-10 ratio in chronic alcoholics: association with postoperative infections. Intensive Care Med 2002; 28:285–92.

Schinkel C: The Role of IFN- γ in Surgical Patients. Journal Of International Interferon & Cytokine Research 2003, 23:341-349

Schuetz P, Muller B: The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in Critical Illness, Endocrinol Metab Clin N Am 2006, 35:823–838

Seder RA, Ahmed R: Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation. Nature Immunology 2003; 4(9):835-42

Seder RA, Gazzinelli R, Sher A, Paul WE: Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. Proc Natl Acad Sci 1993; 90(21):10188–10192

Selye H: A syndrome produced by diverse nocuous agents. Nature 1936; 138:32

Swain SL: Helper T cell differentiation. Curr Opin Immunol 1999; 11:180-185

Tonnesen E, Wahlgreen C: Influence of extradural and general anaesthesia on natural killer cell activity and lymphocyte subpopulations in patients undergoing hysterectomy. Br J Anaesth 1988; 60:500-507

Volk HD, Reinke P, Krausch D, et al.: Monocyte deactivation-rationale for a new therapeutic strategy in sepsis. Intensive Care Med 1996; 22(4):474-481

Volk T, Schmutzler M, Engelhardt L, et al.: Influence of aminosteroid and glucocorticoid treatment on inflammation and immune function during cardiopulmonary bypass. Crit Care Med 2001; 29:2137-42

Volk T, Döpfner UR, Schmutzler M, et al.: Stress induced IL-10 does not seem to be essential for early monocyte deactivation following cardiac surgery. *Cytokine* 2003; (24):237-243

Wolk K, Höflich C, Zuckermann-Becker H, Döcke WD, Volk HD, Sabat R: Reduced monocyte CD86 expression in postinflammatory immunodeficiency. *Crit Care Med* 2007; 35(2):458-67

Yokoyama M, Itano Y, Mizobuchi S, et al.: The Effects of Epidural Block on the Distribution of Lymphocyte Subsets and Natural-Killer Cell Activity in Patients with and without Pain. *Anesth Analg* 2001; 92:463-469

Yoshimura S, Bondeson J, Foxwell BM, Brennan FM, Feldmann M: Effective Antigen presentation by Dendritic Cells is NFκB dependent: coordinate regulation of MHC, co-stimulatory molecules and cytokines. *Int Immunol* 2001;13(5):675-683

8 Danksagung

Ich möchte mich insbesondere bei meinem Doktorvater PD Dr. Didier Keh der Universitätsklinik für Anästhesiologie mit Schwerpunkt operative Intensivmedizin CVK/CCM für die Ermöglichung der Dissertation durch die Schaffungen der wissenschaftlichen Voraussetzungen, die konstruktive Kritik und den fachlichen Beistand bedanken.

Mein ausdrücklicher und besonderer Dank gilt der zeitintensiven fachlichen Beratung und der sehr persönlichen Begleitung durch meinen Betreuer Dr. Olaf Ahlers der Universitätsklinik für Anästhesiologie mit Schwerpunkt operative Intensivmedizin CVK/CCM.

Für die Überlassung der Daten der im Rahmen der intraoperativen Kombination Epidural-Allgemeinanästhesie (IKEA-Studie) ermittelten Kortisol- und Adrenalinmessungen zur Bewertung der immunologischen Auswirkungen der Kombinationsanästhesie danke ich sehr herzlich dem verantwortlichen Studienleiter Herrn Dr. Georg Fritz.

Ebenso danke ich der ebenfalls in der Arbeitsgruppe tätigen Doktorandin und Ärztin Katharina Schulmeister für die Freundschaft, das emotionale Wohlbefinden und die gemeinsam geleistete Arbeit im Labor.

Ganz besonders möchte ich an dieser Stelle noch die Verdienste der in der Arbeitsgemeinschaft Immunologie tätigen Study Nurse Frau Anne Gössinger hervorheben, die mit hohem fachlichem Beistand die Messungen begleitete und mir ebenfalls große freundschaftliche Zuwendung entgegenbrachte.

Ich danke meinen Eltern Renate Lenze und Jürgen Müller-Lenze für die finanzielle Unterstützung während des Studiums.

9 Erklärung an Eides statt

Ich, Jan Lenze erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:
Auswirkungen der intraoperativen thorakalen Periduralanästhesie bei ausgedehnten
abdominalchirurgischen Operationen auf die Stressantwort und die inflammatorische
Kapazität der T-Helferzellen selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen
Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in
Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, den 16.09.2010

Jan Lenze

10 Publikationsliste

Ahlers O, Nachtigall I, Lenze J, Goldmann A, Schulte E, Höhne C, Fritz G, Keh D:
Intraoperative thoracic epidural anaesthesia attenuates stress-induced
immunosuppression in patients undergoing major abdominal surgery. Br J Anaesth
2008;101(6):781-7

11 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.