

4. Methodik

4.1 Patienten

Diese prospektive Observationsstudie mit retrospektiver Post hoc Analyse wurde in der Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin der Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Charité Mitte und in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie der Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Charité Virchow durchgeführt. In der Studie wurden 21 Patienten prospektiv untersucht, die hinsichtlich einer Lebertransplantation evaluiert wurden und auf der Transplantationsliste für Lebertransplantation gelistet wurden.

9 Patienten waren an einer ethyltoxischen Leberzirrhose erkrankt (ALD) und 8 Patienten an einer Leberzirrhose virusinduzierter Genese (VIZ), davon hatten 6 Patienten eine chronische Hepatitis C und 2 Patienten eine Hepatitis B. 4 Patienten wurden aufgrund einer zweifachen Genese (virusinduziert und ethyltoxisch) initial evaluiert, jedoch anschließend aus der Studie ausgeschlossen.

Vor Testung wurden Basischarakteristika der Patienten (Alter, Geschlecht, Größe, Gewicht, Transplantationsgrund, Abhängigkeitsdauer bei Patienten mit ethyltoxischer Leberzirrhose, Begleiterkrankungen) sowie eine allgemeine und soziale Anamnese erhoben.

Zur Einschätzung der Alkoholkrankheit wurden der CAGE (30)- und AUDIT (92)-Fragenkatalog sowie zur Diagnosesicherung der Alkoholabhängigkeit die Kriterien nach DSM-IV (39) verwendet. Perioperative Infektionen wurden nach den „Centers for Disease (CDC)“-Kriterien (36) erfasst.

Die Diagnose der ethyltoxischen und viralen Leberzirrhose wurde anhand der Anamnese, Klinik, Labor, Lebermorphologie (Sonographie) und/oder sonographiegesteuerter Feinadelpunktion mit histologischer Aufarbeitung gesichert.

Bis Februar 2006 wurden bis zum Ende dieser Studie 8 Patienten mit ALD und 6 Patienten mit VIZ transplantiert. 3 Patienten verstarben während der Evaluationsphase beziehungsweise perioperativ nach Lebertransplantation.

4.1.1 Gruppeneinteilung

Die Einteilung erfolgte anhand der Ätiologie der Leberzirrhose.

Gruppe1:

Patientengruppe mit ethyltoxischer Leberzirrhose (ALD):

- Leberzirrhose ethyltoxischer Genese
- Alkoholabstinenz länger als 6 Monate

Gruppe2:

Patientengruppe mit virusinduzierter Leberzirrhose (VIZ):

- Leberzirrhose viraler Genese (Hepatitis B oder C)

Zur Einschätzung des Schweregrades der Leberzirrhose wurde der Child-Pugh-Score (83) verwendet (Tabelle 1).

Tabelle 1: Child-Pugh-Score

(Addition der Punkte: Child A: 5- 6, Child B: 7- 9, Child C: 10- 15)

	1 Punkt	2 Punkte	3 Punkte
Albumin i.S. (g/dl)	>3,5	2,8-3,5	<2,8
Bilirubin i.S. (mg/dl)	<2,0	2,0-3,0	>3,0
Bilirubin (µmol/l)	<35	35-50	>50
Quick (%)	>70	40-70	<40
Aszites (Sonographie)	0	leicht	mittelgradig
Enzephalopathie	0	1-2	3-4

4.1.2 Ein- und Ausschlusskriterien

Einschlusskriterien:

- zirrhotische Lebererkrankung hepatitisinduzierter oder ethyltoxischer Genese
- vorgesehene Lebertransplantation
- Alter über 18 Jahre

Ausschlusskriterien:

- Ablehnung des Patienten
- Schwangere
- Lebererkrankungen anderer Genese
- akute Infektionen
- Cortikoidtherapie

4.1.3 Diagnosesicherung der ALD

4.1.3.1 Alkoholismusrelevante Laborparameter

Zur Diagnostik der Alkoholkrankheit wurden folgende Laborparameter bestimmt: MCV (Mittleres Corpuskuläres Volumen), GGT (Gamma-Glutamylat-Transferase), GOT (Glutamat-Oxalat-Transaminase), GPT (Glutamat-Pyruvat-Transaminase), CDT (Carboanhydrate-Deficient Transferrin).

4.1.3.2 Alkoholismusrelevante Fragenkataloge

Cage- Fragenkatalog

Der CAGE- Fragenkatalog dient der Einschätzung des gefährlichen Alkoholkonsums (30). Wird eine Frage mit Ja beantwortet, liegt eine Wahrscheinlichkeit von 75 % für chronischen Alkoholismus vor. Werden zwei Fragen mit „Ja“ beantwortet, steigt die Wahrscheinlichkeit auf 85 %.

- 1.) Haben Sie jemals versucht, Ihren Alkoholkonsum zu reduzieren (**C**ut down)?
- 2.) Haben Sie sich jemals über Kritik der Umgebung an Ihrem Trinkverhalten geärgert (**A**nnoyed)?
- 3.) Hatten Sie jemals Schuldgefühle wegen Ihres Alkoholkonsums (**F**elt guilty)?
- 4.) Haben Sie jemals am Morgen Alkohol getrunken, um richtig leistungsfähig zu werden oder Entzugssymptome zu vermeiden (**E**ye-opener)?

AUDIT-Fragenkatalog

Ein Screening auf gefährlichen und schädlichen Alkoholabusus kann mit dem AUDIT (Alcohol-Use Disorder Identifikation Test) erfolgen, der über 90 % des gefährlichen Alkoholkonsums aufdecken kann (92). Die Punktzahlen werden addiert. Eine Summe mehr als acht, weist auf einen gefährlichen und schädlichen Alkoholkonsum hin.

1.) Wie häufig nehmen Sie ein alkoholhaltiges Getränk zu sich?

- (0) *nie* (1) *1 Mal im Monat oder weniger* (2) *2-4 Mal im Monat*
(3) *2-4 Mal in der Woche* (4) *4 Mal oder mehr in der Woche*

2.) Wieviele alkoholhaltige Getränke nehmen Sie an einem typischen Tag zu sich, wenn sie trinken?

- (0) *1 oder 2* (1) *3 oder 4* (2) *5 oder 6*
(3) *7-9* (4) *10 oder mehr*

3.) Wie häufig trinken Sie sechs oder mehr Drinks bei einer Gelegenheit?

- (0) *nie* (1) *< als ein Mal im Monat* (2) *ein Mal im Monat*
(3) *ein Mal in der Woche* (4) *täglich oder fast täglich*

4.) Wie häufig ist es Ihnen im letzten Jahr passiert, dass Sie nicht mehr aufhören konnten zu trinken, wenn Sie einmal angefangen haben?

- (0) *nie* (1) *< als ein Mal im Monat* (2) *ein Mal im Monat*
(3) *ein Mal in der Woche* (4) *täglich oder fast täglich*

5.) Wie häufig im letzten Jahr haben Sie sich anders verhalten, als normalerweise von Ihnen erwartet wird?

- (0) *nie* (1) *< als ein Mal im Monat* (2) *ein Mal im Monat*
(3) *ein Mal in der Woche* (4) *täglich oder fast täglich*

6.) Wie häufig im letzten Jahr haben Sie einen ersten Drink am Morgen gebraucht, um einen Kater loszuwerden?

- (0) *nie* (1) *< als ein Mal im Monat* (2) *ein Mal im Monat*
(3) *ein Mal in der Woche* (4) *täglich oder fast täglich*

7.) Wie häufig im letzten Jahr, hatten Sie Schuldgefühle oder Gewissensbisse nachdem Sie getrunken haben?

- (0) *nie* (1) *< als ein Mal im Monat* (2) *ein Mal im Monat*
(3) *ein Mal in der Woche* (4) *täglich oder fast täglich*

8.) Wie häufig im letzten Jahr konnten Sie sich nicht mehr daran erinnern, was in der Nacht zuvor passiert war, weil Sie getrunken hatten?

- (0) *nie* (1) *< als ein Mal im Monat* (2) *ein Mal im Monat*
(3) *ein Mal in der Woche* (4) *täglich oder fast täglich*

9.) Haben Sie sich oder jemanden anderes verletzt als Ergebnis des Trinkens?

- (0) *nein* (1) *ja, aber nicht im letzten Jahr*
(2) *ja, während des letzten Jahres*

10.) War ein Verwandter oder Freund, ein Arzt oder ein anderer Mitarbeiter des Gesundheitssystems beunruhigt über Ihr Trinkverhalten und empfahl ihnen weniger zu trinken?

- (0) *nein* (1) *ja, aber nicht im letzten Jahr*
(2) *ja, während des letzten Jahres*

4.1.3.3 Diagnosesicherungen der Alkoholabhängigkeit

Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM)-IV-Kriterien

Nach den Kriterien des DSM-IV müssen mindestens 3 der aufgelisteten Kriterien innerhalb von 12 Monaten aufgetreten sein, um als alkoholabhängig zu gelten (39).

- 1.)Toleranzentwicklung nach Definition durch eines der folgenden Kriterien:
Verlangen nach Dosissteigerung, um einen Intoxikationszustand oder erwünschten Rausch herbeizuführen, deutlich abgeschwächte Wirkung bei Beibehaltung der gleichen Dosis.
- 2.)Entzugssymptome, die sich durch eines der folgenden Kriterien äußert:
Alkoholrespektive verwandte Substanzen werden eingenommen, um Entzugssymptome zu vermeiden oder zu lindern, Entwicklung eines charakteristischen Alkoholentzugssymptoms.
- 3.)Alkoholkonsum öfter und ausgeprägter als beabsichtigt.
- 4.)Anhaltender Wunsch oder ein oder mehrere Versuche, den Alkoholkonsum zu kontrollieren und einzuschränken.
- 5.)Starke zeitliche Beschäftigung mit Alkohol und Besetzung durch das Thema.
- 6.)Vernachlässigung oder Aufgabe von wichtigen beruflichen, sozialen oder freizeithlichen Aktivitäten aufgrund des Alkoholmissbrauches.
- 7.)Unfähigkeit zur Einschränkung oder zum Verzicht auf den Alkoholkonsum trotz des Erkennens sozialer, psychischer oder gesundheitlicher Probleme, die durch Alkohol verursacht oder verschlechtert wurden.

4.1.4 Diagnosesicherung der VIZ

Die Diagnose der Virushepatitis stützt sich neben anamnestischer Daten, Klinik und charakteristischer morphologischer Merkmale (Biopsie, Sonographie, Abdomen-CT), auf veränderte Leberlaborwerte (Leitbefund: hoher Transaminasenanstieg) und den Nachweis von Antikörpern gegen Hepatitisviren bzw. ihre Bestandteile in der Serologie.

Bei 2 Patienten mit virusinduzierter Leberzirrhose fand sich eine positive Serologie für Hepatitis B und bei weiteren 6 Patienten für Hepatitis C.

Hepatitis B:

Labor: Der Titer der HBV-DNA wurde mit einer PCR (PCR= Polymerasekettenreaktion) bestimmt. Der Titer korreliert mit dem Ausmaß der Infektiosität.

Die Diagnostik stützt sich wesentlich auf den Nachweis von Bestandteilen des Virus und seiner Genprodukte (HBsAg, HBeAg, HBcAg) und dem Nachweis der Wirtsreaktion (Anti-HBs, Anti-HBe, Anti-HBc). Als Screening auf eine möglicherweise vorliegende aktuelle Hepatitis-B-Infektion dient der Nachweis von HBsAg.

Der Nachweis von HBV-DNA konnte mit dem AMPLICOR HBV ROCHE MONITOR TEST aufgezeigt werden. Durch ein Enzym-Immunoassay gelangen die Nachweise von HbsAg und anti-HBs-Antikörper.

Anti-HBc (global IgG und IgM) dient der Überprüfung einer Durchseuchung und weist nach, ob Kontakt mit HBV stattgefunden hat. Anti-HBc-IgM zeigt eine frische HBV-Infektion an; es ist die erste Wirtsantwort (45).

Hepatitis C:

Labor: Die Diagnose wurde durch Nachweis von Anti-HCV-Antikörpern und durch den spezifischen Nachweis von HCV-RNA mit der PCR (AMPLICOR HCV MONITOR Test, Fa. Roche) gestellt.

Durch die Nachweise von anti-HCV-IgG und HCV-RNA (AMPLICOR HCV MONITOR Test, Fa. Roche) im Serum, konnte eine mittlere Virus-Last von 1 087 490 IU/ml (Spannbreite von 65 05 23 bis 7 80 05 00 IU/ml) nachgewiesen werden.

Es finden zwei Testmethoden ihre Anwendungen:

1. indirekte Tests: Nachweis von Antikörpern gegen Hepatitis C (anti-HCV)
2. direkte Tests: Nachweis von Virusbestandteilen (HCV-RNA-Nachweis, Core-Antigen – ein Surrogatmarker der Virusreplikation) (45).

Als einziger direkter Nachweis einer HCV-Infektion kommt eine PCR-Reaktion (Polymerase-Kettenreaktion) in Betracht. Bestätigungstests sind durch separaten Nachweis von NS3, NS4 und Core-Protein möglich (45).

4.1.5 Lebertransplantation

Indikationen (45):

- alkoholische chronische Hepatitis (6 monatige Alkoholabstinenz)
- posthepatische Leberzirrhose
- chronische Hepatitis
- akutes fulminantes Leberversagen
- maligne Lebererkrankungen u.a.

Kontraindikationen (45):

- bestehender Alkoholismus oder Drogenkonsum
- Malignome/Metastasen außerhalb der Leber
- fortgeschrittene renale oder kardiopulmonale Erkrankungen u.a.

Indikationszeitpunkt (45):

- im Stadium der Dekompensation, Lebenserwartung ohne Transplantation <1 Jahr
- Zirrhosefolgen wie beginnende Enzephalopathie, nicht beherrschbarer Aszites, rezidivierende Ösophagusvarizenblutungen, Nierenfunktionsstörungen

Häufigste Komplikationen (45):

- postoperatives Transplantationsversagen
- Abstoßungsreaktionen
- Reinfektionen (HBV 30 %, HCV 99%)
- Infektionen, Sepsis

4.1.6 Infektion und Rejektion bei Lebertransplantation

Alle Infektionen wurden anhand der Kriterien der „Centers for Disease Control and Prevention“ (36) definiert. Retrospektiv wurden prä-, peri- und postoperative Infektionen dokumentiert (präoperative Infektionen: ein Jahr bis zur Testung und postoperative Infektionen bis 3 Monate nach LTX). Folgende Infektionen wurden berücksichtigt:

Pneumonie

Muß einem der folgenden Kriterien (1. oder 2.) entsprechen:

1. Rasselgeräusche bei Auskultation oder Dämpfung bei Perkussion und eines der folgenden Anzeichen:

- Neues Auftreten von eitrigem Sputum oder Veränderung der Charakteristika
- Mikroorganismen aus der Blutkultur isoliert
- Krankheitserreger aus Bronchoalveolärer Lavage, Bronchialabstrich, transtrachealem Aspirat oder Biopsieprobe isoliert

2. Röntgenuntersuchung des Thorax zeigt neues oder progressives Infiltrat, Verdichtung, Kavitation oder pleuralen Erguss und eines der folgenden Zeichen:

- Neues Auftreten von eitrigem Sputum oder Veränderung der Charakteristika
- Mikroorganismen aus Blutkultur isoliert
- Krankheitserreger aus Bronchoalveolärer Lavage, Bronchialabstrich, transtrachealem Aspirat oder Biopsieprobe isoliert

Tracheobronchitis

Ohne Anzeichen der Pneumonie müssen zwei der anschließenden Kriterien:

- Fieber (38°C)
- Husten
- Neue oder erhöhte Sputumproduktion
- Trockene Rasselgeräusche
- Giemen

und eines der folgenden Kriterien erfüllt sein:

- Kulturelle Isolierung eines Mikroorganismus aus dem Trachealsekret oder dem bei der Bronchoalveolären Lavage gewonnenen Material
- Positiver Antigen-Test in den Atemwegen

Wundinfektionen

Oberflächliche postoperative Wundinfektion :

Infektionen an der Inzisionsstelle innerhalb von 30 Tagen nach der Operation, die nur Haut oder sukutanes Gewebe mit einbezieht, und eines der folgenden Kriterien erfüllt:

- Eitrige Sekretion aus der oberflächlichen Inzision
- Kultureller Nachweis eines Mikroorganismus aus einem aseptisch entnommenen Wundsekret oder Gewebekultur von der oberflächlichen Inzision
- Eines der folgenden Anzeichen:
 - Schmerz
 - Empfindlichkeit
 - lokalisierte Schwellung
 - Rötung oder Überwärmung
 - Chirurg öffnet die oberflächliche Inzision bewusst, es sei denn, es liegt eine negative Kultur vor
- Diagnose des Chirurgen.

Tiefe postoperative Wundinfektion:

Infektion innerhalb von 30 Tagen nach Operation, Infektion schien mit der Operation in Verbindung zu stehen und erfasst Faszienschichten und Muskelgewebe und eines der folgenden Kriterien:

- Eitrige Sekretion aus tiefem Einschnitt, aber nicht aus Organ bzw. Raum
- Fieber ($>38^{\circ}\text{C}$), lokalisierter Schmerz oder Empfindlichkeit, negative Kultur
- Abszess oder sonstige Zeichen einer Infektion bei einer histopathologischen oder radiologischen Untersuchung
- Diagnose des Chirurgen.

Harnwegsinfektion

Dabei müssen eines der folgenden Kriterien erfüllt sein: Fieber ($>38^{\circ}\text{C}$), Harndrang, Häufigkeit, Dysurie oder suprapubische Missempfindungen und Urinkultur von $>10^5$ Kolonien/ml Urin mit nicht mehr als zwei Arten von Mikroorganismen.

Oder zwei der anschliessenden: Fieber ($>38^{\circ}\text{C}$), Harndrang, Häufigkeit, Dysurie oder suprapubische Missempfindungen und eines der nachfolgend aufgelisteten Anzeichen:

- Harnteststreifen für Leukozytenesterase und/oder Nitrat positiv
- Pyurie (>10 weiße Blutkörperchen/ ml^3 oder >3 Leukozyten/Gesichtsfeld bei starker Vergrößerung im nicht-zentrifugiertem Urin)
- Bei Gram-Färbung einer nicht-zentrifugierten Urinprobe Nachweis von Mikroorganismen.

- zwei Urinkulturen mit wiederholter Isolierung des gleichen Uropathogens mit $>10^2$ kolonien/ml Urin im Katheterurin
- Urinkultur mit $>10^5$ Kolonien/ml Urin einzelner Uropathogene bei Patienten, die mit der entsprechenden antimikrobiellen Therapie behandelt werden

Nosokomiale Infektionen

Als Reaktion auf das Vorhandensein von Mikroorganismen oder ihrer Toxine liegen lokale oder systemische Infektionszeichen vor. Es dürfen keine Hinweise existieren, dass die Infektion bereits vor der Aufnahme in das Krankenhaus oder in der Inkubationsphase vorhanden war.

4.2 Studienprotokoll

4.2.1 Endogener und exogener Stresstest

In der präoperativen Evaluationsphase unterzogen sich die in der Studie eingeschlossenen Patienten einem endogenen Stresstest und einem exogenen CRH-Test (28), welche im cross-over design an zwei verschiedenen präoperativen Tagen durchgeführt wurden.

Der Beginn der Untersuchung erfolgte 8 Uhr morgens, zu diesem Zeitpunkt wurde ein Venenverweilkatheter gelegt über den mehrere Blutentnahmen durchgeführt wurden. Um 8 Uhr erfolgte die Basismessung, die um 10 Uhr und 10.25 Uhr wiederholt wurde. Diese 3 Blutabnahmen waren nicht signifikant unterschiedlich und wurden zu einer „baseline“ Messung zusammengefasst. Um exakt 10.30 Uhr wurde der Stresstest beziehungsweise die CRH-Gabe durchgeführt. Danach erfolgten in regelmäßigen Abständen noch weitere acht Blutabnahmen (Tabelle 2).

Der präoperative endogene Stresstest umfasst einen mentalen arithmetischen Test (28), der aus Rechenaufgaben besteht, die der Patient während der gesamten Zeitdauer des Testes (5min) lösen muss (aktiver psychologischer Test), Hintergrundgräusche, die aus Alarmsignalen wie dem Martinshorn eines Einsatzfahrzeuges bestehen (passiver psychologischer Test), und der Immersion eines Fusses in 8 °C kaltes Wasser (Kältetest, Zeitdauer: 3 min).

Der präoperative exogene Stresstest besteht aus einer intravenösen CRH-Gabe (CRH Ferring 100 µg in 5 ml 0,9% NaCl über 30 s).

Tabelle 2: Blutabnahmezeiten

Blutabnahme	1	2	3	<i><u>Test</u></i>	4	5	6	7	8	9	10	11
Uhrzeit	8.00	10.00	10.25	10.30	10.40	10.50	11.00	11.15	11.30	12.00	13.00	14.00
	Uhr	Uhr	Uhr	Uhr	Uhr	Uhr	Uhr	Uhr	Uhr	Uhr	Uhr	Uhr

4.2.2 Probenverarbeitung

Patientenvollblut (5ml) wurde mit einem Vacutainer (S-Monovette Sarstedt 2,7ml, CAT.Nummer:05.1167) gewonnen und sofort auf 4 °C gekühlt. Innerhalb von 10 Minuten erfolgte die Weiterverarbeitung: Die Proben wurden bei 800g 15 Minuten zentrifugiert (SIGMA, Laborzentrifugen Typnummer:2-15, Fabriknummer:32041), der Überstand in Reaktionsgefäße (Safe-Lock Tubes 0,5ml, CAT.Nummer:00300121023) abpipettiert (Pipette 500µl, Eppendorf, Deutschland, CAT.Nummer:7543) und bei -80 °C eingefroren (Tiefkühltruhe SANYO ultra low).

Im Labor wurden die Proben innerhalb von 6 Monaten mittels eines ELISA gemessen. Während des Testes wurden Vitalparameter (Blutdruck, Puls) und Auffälligkeiten wie Wärmegefühl, allergische Reaktionen, Geschmack- und Geruchswahrnehmungen beobachtet und notiert.

4.3 Methoden

4.3.1 Immunoassay (ELISA)

Die Bestimmung von TNFalpha, IL-6 und IL-10 erfolgte mittels eines Enzymimmunoassay.

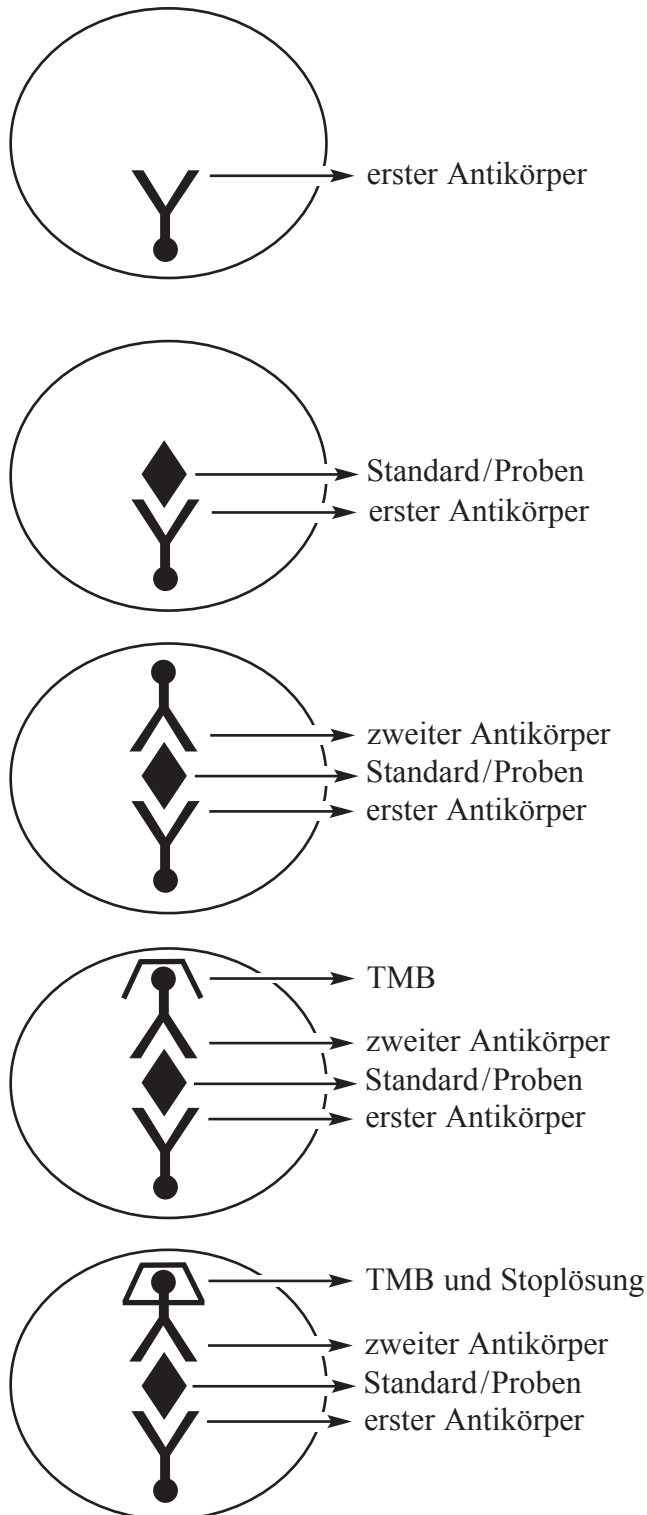


Abbildung1: Prinzip des Enzymimmunoassays

Die im Kit enthaltene Mikrotiterplatte ist mit einem monoklonalen Antikörper gegen die zu untersuchende Substanz beschichtet (1. Antikörper).

Zuerst werden die Standards oder Proben in die entsprechenden Vertiefungen pipettiert und reagieren mit dem 1. Antikörper. Nach Abschluß der Reaktion werden überschüssige Bestandteile der Proben durch Waschen entfernt.

Nach Zugabe von markiertem polyklonalen Antikörpern (2. Antikörper) kann sich in einer anschließenden Inkubation ein Sandwich-Komplex aus dem 1. Antikörper, der zu untersuchenden Substanz in der Probe und dem enzymmarkierten Antikörper (2. Antikörper) bilden. Überschüssige enzymmarkierte Antikörper werden durch Waschen entfernt.

Mit Zugabe der chromogenen Lösung (Tetramethylbenzidin = TMB) beginnt die Bildung eines farbigen Endproduktes, wobei die Farbintensität der Menge der zu untersuchenden Substanz in der Probe oder im Standard proportional ist.

Diese Reaktion wird durch Zugabe einer Säurelösung beendet. Anschließend wird die Absorption des farbigen Endproduktes bei 450 nm gemessen und ausgewertet.

4.3.2 Bestimmung des Zytokins TNFalpha

Zur Bestimmung des Zytokins TNFalpha wurde ein Test der Firma Immunotech Human TNFalpha ELISA Kit (Beckmann Coulter Company, Marseille, Frankreich) verwendet.

4.3.2.1 Assaykomponenten und Reagenzien

- 1.) Polystyren-Mikrotiterplatte
- 2.) TNFalpha-Standard (10 ng/ml): Der Standard ist gefriergetrocknet in Gegenwart von Proteinen und einem Konservierungsstoff. Ein natürlicher humaner TNFalpha-Standard kalibriert gegen den internationalen WHO-TNFalpha-Standard (87/650). Die Auflösung findet in destilliertem Wasser statt.
- 3.) TNFalpha-Konjugat: Das Konjugat besteht aus alkalische Phosphatase konjugierter Anti-TNFalpha-Antikörper und ist gefriergetrocknet in Gegenwart eines Proteins und eines Konservierungsstoffes.
- 4.) Verdünnungslösung I: Die Verdünnungslösung enthält Proteine und Natrium-Azide (< 0,1 %).
- 5.) Verdünnungslösung II: Die Verdünnung beinhaltet menschliches Serum.
- 6.) Waschlösung: 20fach konzentriert
- 7.) Substrat-Puffer (pH:9,8): Die Waschlösung besteht aus Dietholamin-HCL.
- 8.) Substrat: Das Substrat besteht aus Para-Nitrophenylphosphate (2 Tabletten je 15mg).
- 9.) Stopp-Lösung: Die Lösung besteht aus Natriumhydroxid.
- 10.) TNFalpha- Kontrollserum

4.3.2.2 Geräte

Es wurden folgende Geräte für die ELISA- Bestimmungen benutzt:

Mikropipetten 1 - 5 μ l, 10 - 100 μ l, 100 – 1000 μ l (Fa. Eppendorf Deutschland), Mikropipettenspitzen (Fa. Eppendorf Deutschland), Multipipette und Combitips 50 μ l, 100 μ l (Fa. Eppendorf Deutschland), Zentrifuge (SIGMA, Laborzentrifugen Typnummer: 2 - 15, Fabriknummer: 32041), Plattenschüttler (VEB MLW Prüfgeräte - Werk Medingen, S410, Fa. Heidolph, Typ DSG 304/M4), Vortex (Fa. Jahnke und Kunkel, VF2, IKA Labortechnik Staufen), Photometer (ELISA-Reader Dynatech MR 5000, CAT. Nummer: DL 1000), Auswertungs-programm (Star Multit - Font LC 24-100).

4.3.2.3 Durchführung

Vorbereitung der Reagenzien

Alle Reagenzien werden vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht und geschwenkt.

50 ml des Waschkonzentrats werden in 950 ml destilliertem Wasser aufgelöst. Das gefriergetrocknete Standardpulver, die Verdünnungslösung II, das gefriergetrocknete TNFalpha-Kontrollserum ebenfalls mit destilliertem Wasser gelöst. Zusätzlich wird das TNFalpha-Konjugat in die Verdünnungslösung I zur Auflösung gebracht.

Erstellung der Standardreihe

Tabelle 4: Standardkonzentrationen (pg/ml)

	TNFalpha
Standard 1	1000
Standard 2	250
Standard 3	62,5
Standard 4	15,6
Standard 5	0

I. Inkubationsschritt

Alle Nöpfchen der Mikrotiterplatte, außer der Blanklöcher werden mit jeweils 100 µl des Konjugats und anschließend mit 100 µl Standard bzw. 100 µl Kontrollserum oder 100 µl der Serumproben paarweise gefüllt Die Platte wird anschließend mit dem Deckel bedeckt und auf dem Plattenschüttler (Frequenz 350 U/min) bei Raumtemperatur zwei Stunden lang inkubiert. Nach 90 Minuten Inkubationszeit wird die Substrat-Lösung hergestellt, indem man 2 Tabletten des Substrats in den Substratpuffer gibt.

Waschprozedur

Die Platte wird dreimal mit der verdünnten Waschlösung unter Zuhilfenahme der Multipipette (Fa. Eppendorf Deutschland) gewaschen und anschließend auf Saugpapier ausgeklopft.

II. Inkubationsschritt

In jedes Nöpfchen werden 200 µl der Substrat-Lösung gegeben. Die Platte wird mit dem Deckel geschlossen und anschließend 30 Minuten auf dem Plattenschüttler (350 U/min) bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

Stoppreaktion

Zuletzt gibt man in alle Nöpfchen 50 µl Stopplösung und führt innerhalb von einer halben Stunde mit dem an einen Computer angeschlossenen Photometer die Messung der Extinktionen bei einer Wellenlänge von 450 nm durch.

Auswertung

Die Auswertung erfolgt automatisch im Anschluss an die photometrische Messung mit dem Softmax, Version 2.01d. Dabei berechnet das Programm für jedes Nöpfchenpaar die Mittelwerte der Absorptionen. Das Programm subtrahiert den berechneten Mittelwert der Blanklöcher von allen anderen berechneten Mittelwerten der restlichen Nöpfchen.

Im Anschluss daran werden die ermittelten Absorptionen der Standards auf die Ordinate und deren Konzentrationen auf die Abszisse einer linearen Koordinate aufgetragen und so die am besten ermittelte lineare Standardkurve ermittelt. Anhand dieser, werden die Konzentrationen der untersuchten Proben bestimmt und mit dem Verdünnungsfaktor „1“ multipliziert.

Laut Herstellerangaben hat der Test folgende Sensitivität:

Der Test für TNFalpha hat eine Sensitivität von 5 pg/ml.

Laut Herstellerangaben hat der Test folgende Spezifität:

Keine bekannten Kreuzreaktionen mit TNF β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IFN γ , GCSF, GMCSF, SIL-2R oder SIL-6R.

Der Intravariationskoeffizient von TNFalpha betrug 19,9%, der Intervariationskoeffizient 34,2%. Die Nachweisgrenze lag bei 5 pg/ml.

4.3.3 Bestimmung des Zytokins IL-6

Zur IL-6-Bestimmung wurde ebenso ein Test der Firma Immunotech Human IL-6 ELISA Kit (Beckmann Coulter Company, Marseille, Frankreich) verwendet.

4.3.3.1 Assaykomponenten und Reagenzien:

- 1.) Polystyren-Mikrotiterplatte
- 2.) IL-6-Standard (5 ng/ml): Der Standard ist gefriergetrocknet in Gegenwart von Proteinen und einem Konservierungsstoff. Ein natürlicher humaner IL-6-Standard kalibriert gegen den internationalen WHO-IL-6-Standard (89/548). Die Auflösung findet in destilliertem Wasser statt.
- 3.) IL-6-Konjugat: Das Konjugat besteht aus Acetylcholinesterase und konjugiertem Anti-IL-6-Antikörper und ist gefriergetrocknet in Gegenwart eines Proteins und eines Konservierungsstoffes.

- 4.) Verdünnungslösung I: Die Verdünnungslösung enthält Proteine und Natrium-Azide (< 0,1 %).
- 5.) Verdünnungslösung II: Die Verdünnung beinhaltet menschliches Serum.
- 6.) Waschlösung: 20fach konzentriert
- 7.) Substrat: Das Substrat besteht aus Acetylthiocholin und Dithiobenzoate.
- 8.) Stopp-Lösung: Die Lösung besteht aus Natriumhydroxid.
- 9.) IL-6-Kontrollserum

4.3.3.2 Geräte

Es wurden die gleichen Geräte wie unter 4.3.2.2. benutzt.

4.3.3.3 Durchführung

Vorbereitung der Reagenzien

Die Reagenzien wurden wie unter 4.3.2.3. hergestellt.

Erstellung der Standardreihe

Tabelle 5: Standardkonzentrationen (pg/ml)

	IL-6
Standard 1	1000
Standard 2	250
Standard 3	62,5
Standard 4	15,6
Standard 5	0

I. Inkubationsschritt

Alle Nöpfchen der Mikrotiterplatte, mit Ausnahme der Blanklöcher werden mit jeweils 100 µl des Konjugats und anschließend mit 100 µl Standard bzw. 100 µl Kontrollserum oder 100 µl der Serumproben paarweise gefüllt. Die Platte wird anschließend mit dem Deckel bedeckt und auf dem Plattenschüttler (Frequenz 350 U/min) bei Raumtemperatur zwei Stunden lang inkubiert.

Waschprozedur

Die Platte wird dreimal mit der verdünnten Waschlösung unter Zuhilfenahme der Multipipette gewaschen und anschließend auf Saugpapier ausgeklopft.

II. Inkubationsschritt

In jedes Nöpfchen werden 200 µl der Substrat-Lösung gegeben. Die Platte wird mit dem Deckel verschlossen und anschließend 30 Minuten auf dem Plattenschüttler (350 U/min) bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

Stoppreaktion

Zuletzt gibt man in alle Nöpfchen 50 µl Stopplösung und führt innerhalb von einer halben Stunde eine Messung der Extinktionen bei einer Wellenlänge von 450 nm durch.

Auswertung

Die Auswertung erfolgte wie beschrieben unter 4.3.2.3

Laut Herstellerangaben hat der Test folgende Sensitivität:

Der Test für IL-6 hat eine Sensitivität von 3 pg/ml.

Laut Herstellerangaben haben der Test folgende Spezifität:

Es wurden keine Kreuzreaktionen mit IL-1 bis IL-4, IL-7, IL-8, GM-CSF und TNFalpha gemessen.

Der Intravariationskoeffizient von IL-6 betrug 11,5%, der Intervariationskoeffizient 13,7%. Die Nachweisgrenze lag bei 3 pg/ml.

4.3.4 Bestimmung des Zytokins IL-10

Zur Bestimmung des Zytokins IL-10 wurde ein Test der Firma Immunotech® Human IL-10 ELISA Kit (Beckmann Coulter Company, Marseille, Frankreich) verwendet.

4.3.4.1. Assaykomponenten und Reagenzien

- 1.) Polystyren-Mikrotiterplatte
- 2.) L-10-Standard (20 ng/ml): Der Standard ist gefriergetrocknet in Gegenwart von Proteinen und einem Konservierungsstoff. Ein natürlicher humaner IL-10-Standard kalibriert gegen den internationalen WHO-IL-10-Standard (92/516). Die Auflösung findet in destilliertem Wasser statt.
- 3.) Monoklonaler Anti-IL-10-AK
- 4.) Verdünnungslösung I: Die Verdünnungslösung enthält Proteine und Natriumazid.
- 5.) Konjugat: Das Konjugat besteht aus Streptavidin- Peroxidase.
- 6.) Waschlösung: 20fach konzentriert
- 7.) Substrat
- 8.) Stopp-Lösung: Die Lösung besteht aus Natriumhydroxid .

4.3.4.2 Geräte

Es wurden die gleichen Geräte für die ELISA- Bestimmungen benutzt wie unter 4.3.2.2. beschrieben.

4.3.4.3 Durchführung

Vorbereitung der Reagenzien

Alle Reagenzien werden vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht und geschwenkt. 50 ml des Washkonzentrats werden in 950 ml destilliertem Wasser gelöst. Das gefriergetrocknete IL-10-Standardpulver wird mit destilliertem Wasser aufgelöst.

Erstellung der Standardreihe

Tabelle 6: Standardkonzentrationen (pg/ml)

	IL-10
Standard 1	2000
Standard 2	400
Standard 3	80
Standard 4	16
Standard 5	0

I. Inkubationsschritt

Alle Nöpfchen der Mikrotiterplatte, mit Ausnahme der Blanklöcher werden mit jeweils 50 µl des Standards bzw. 50 µl der Serumproben paarweise gefüllt. Die Platte wird anschließend mit dem Deckel bedeckt und auf dem Plattenschüttler (Frequenz 350 U/min) bei Raumtemperatur zwei Stunden lang inkubiert.

I. Waschprozedur

Die Platte wird dreimal mit der verdünnten Waschlösung unter Zuhilfenahme der Multipipette gewaschen und anschließend auf Saugpapier ausgeklopft.

II. Inkubationsschritt:

In jedes Nöpfchen werden 50 µl des IL-10-Antikörpers und anschließend 100 µl des Konjugats hinzugegeben. Die Platte wird mit dem Deckel verschlossen und für 30 Minuten auf dem Plattenschüttler (350 U/min) bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

II. Waschprozedur

Die Platte wird wiederum dreimal mit der verdünnten Waschlösung gewaschen und anschließend auf Saugpapier ausgeklopft.

III. Inkubationsschritt

Zum Schluss werden jeweils 100 µl des Substrats in jedes Nöpfchen gegeben und nach Verschliessen der Platte 15 Minuten auf dem Plattenschüttler (350 U/min) bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

Stoppreaktion

Zuletzt gibt man in alle Nöpfchen 50 µl Stopplösung und führt innerhalb von einer halben Stunde mit dem an einen Computer angeschlossenen Photometer die Messung der Extinktionen bei einer Wellenlänge von 450 nm durch.

Auswertung

Wie schon unter 4.3.2.3. beschrieben, findet die Auswertung statt.

Laut Herstellerangaben hat der Test folgende Sensitivität:

IL-10 hat eine Sensitivität von 5 pg/ml.

Laut Herstellerangaben hat der Test folgende Spezifität:

Keine Kreuzreaktionen sind mit IL-1alpha, IL-1beta, IL-3, GM-CSF, M-CSF, G-CSF bekannt.

Der Intravariationskoeffizient von IL-10 betrug 7,4%, der Intervariationskoeffizient 7,0%. Die Nachweisgrenze lag bei 5 pg/ml.

4.3.5 Herstellerangaben von IL-6, TNFalpha und IL-10

Tabelle 7: Herstellerangaben der Assays

	Immunoassay Kit	Hersteller CAT. Nummer	Sensitivität i.S./Plasma (pg/ml)	Probenvolumen (µl)
IL-6	Immunotech, Marseille	1120	3	100
TNFalpha	Immunotech, Marseille	1121	5	100
IL-10	Immunotech, Marseille	1987	5	50

4.4 Statistische Analyse

Alle Kennziffern für die beschreibende Statistik wurden als Median und Spannweite angegeben. Die statistische Analyse zwischen den Interventionen erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test für numerische Kennziffern. Dichotome Variablen wurden mittels Chi-Quadrat-Test beziehungsweise bei zu kleiner Fallzahl mittels Fishers exakten Tests auf Signifikanz geprüft. Für die Signifikanzprüfung der Parameter über den Verlauf wurde die Brunner-Analyse (ANOVA) verwandt. Ein $p \leq 0,05$ (*) wurde als statistisch signifikant festgelegt.

Alle Auswertungen und statistischen Tests wurden mit dem „Statistical Package for the social Sciences“ (SPSS/PC+) PC-Version 11.0 durchgeführt. Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit Sigma-Plot, Version 2001.

Zur Betrachtung der Maximalwerte wurden die Maximalwerte (höchste Werte innerhalb einer Gruppe im zeitlichen Verlauf) vor und nach Stress-und CRH-Test mit den Medianen und Standardabweichungen mittels T-Test errechnet.