

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie
und dem Institut für Medizinische Immunologie
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

Dissertation

Einfluss der präoperativen Hochdosis-Methylprednisolongabe
auf die postoperative systemische inflammatorische Reaktion in
der Leberchirurgie: eine prospektive randomisierte Studie

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité -
Universitätsmedizin Berlin

von

Susanne Hamann

aus Gifhorn

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. J.-M. Langrehr
2. Prof. Dr. med. U. Settmacher
3. Priv.-Doz. Dr. med. M. Strik

Datum der Promotion: 12. Juni 2007

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Tabellen	5
Verzeichnis der Graphiken	5
Verzeichnis der Figuren.....	6
Abkürzungsverzeichnis.....	6
1. Einleitung	9
1.1 Hemihepatektomie und Leberregeneration.....	10
1.2 Einfluss der Chirurgie auf das Immunsystem	11
1.2.1 Chirurgie und inflammatorische Reaktion	11
1.2.2 Chirurgie und Immunsuppression.....	11
1.2.3 Leberchirurgie und inflammatorische Reaktion.....	12
1.3 Pharmakologische Modulation der chirurgischen Stressreaktion	12
1.3.1 Rezeptorvermittelte genomische Effekte	13
1.3.2 Unspezifische rezeptorunabhängige Sofortwirkungen.....	14
1.4 Laborchemische Parameter für Entzündungen, Lebererkrankungen und Nierenfunktionsstörungen.....	15
1.4.1 Entzündungsparameter CRP und Leukozyten.....	15
1.4.2 Parameter für Leberzellschädigung: AST und ALT	16
1.4.3 Cholestaseparameter t-Bilirubin, AP und γ -GT	16
1.4.4 Parameter für Synthesestörungen der Leber: Albumin und TPZ-INR.....	16
1.4.5 Nierenfunktionsparameter Kreatinin	17
1.5 Entzündungsreaktionen	17
1.5.1 Proinflammatorische Zytokine	18
1.5.1.1 Interleukin-6.....	18
1.5.1.2 Interleukin-8.....	19
1.5.1.3 TNF- α	19
1.5.2 Antiinflammatorische Zytokine	20
1.5.2.1 Interleukin-10.....	20
1.5.3 Parameter zur Messung der Immunkompetenz.....	21
1.5.3.1 HLA-DR-Expression auf Monozyten	21
1.5.3.2 TNF- α nach LPS-Vollblutstimulation.....	22
1.5.4 Weitere lösliche Mediatoren zur Beurteilung einer Entzündung/Infektion	23
1.5.4.1 Procalcitonin (PCT).....	23
2. Problemstellung und Ziele.....	24
3. Material und Methoden.....	26
3.1 Material.....	26
3.1.1 Patientenkollektiv	26
3.1.2 Labormaterial.....	27
3.1.2.1 Verbrauchsmaterialien.....	27
3.1.2.2 Chemikalien.....	28
3.1.2.3 Puffer und Lösungen	28
3.1.2.4 Antikörper, Eichbeads.....	28
3.1.3 Verwendete Geräte und Software.....	28
3.1.3.1 Geräte.....	28
3.1.3.2 Software	28
3.1.4 Verwendete Statistik	29
3.1.4.1 Festlegung des optimalen Stichprobenumfangs	29
3.1.4.2 Statistische Auswertungsverfahren.....	30
3.2 Methoden.....	30
3.2.1 Gabe des Studienmedikamentes.....	30

3.2.2 Operationsverfahren und intraoperativer Ablauf	31
3.2.2.1 Hemihepatektomie rechts	31
3.2.2.2 Hemihepatektomie links.....	31
3.2.3 Anästhesiologisches Management	32
3.2.4 Rekonvaleszenz-Score.....	33
3.2.5 Blutentnahmen	34
3.2.6 Zytokinmessungen mittels Immulite®	35
3.2.7 Messung der monozytären HLA-DR-Expression	35
3.2.7.1 Flowzytometrische Analyse	35
3.2.7.2 Messung der HLA-DR-Expression auf Monozyten	36
3.2.8 TNF- α -Messung nach LPS-Vollblutstimulation	36
3.2.9 Bestimmung von PCT.....	37
3.2.10 Weitere laborchemische Blutuntersuchungen	37
4. Ergebnisse	39
4.1 Klinische Parameter.....	39
4.1.1 Intraoperativer Blutverlust.....	39
4.1.2 Operationsdauer	39
4.1.3 Postoperative Komplikationen	39
4.1.4 Postoperative Rekonvaleszenz	41
4.1.5 Postoperativer Krankenhausaufenthalt.....	42
4.2 Immunologische Parameter.....	43
4.2.1 IL-6	43
4.2.2 IL-8	44
4.2.3 TNF- α	46
4.2.4 IL-10	47
4.2.5 Monozytäre HLA-DR-Expression.....	49
4.2.6 TNF- α nach LPS-Stimulation	50
4.2.7 Procalcitonin (PCT).....	51
4.3 Laborchemische Parameter.....	53
4.3.1 CRP	53
4.3.2 Leukozyten	54
4.3.3 AST.....	56
4.3.4 ALT	57
4.3.5 t-Bilirubin.....	59
4.3.6 AP.....	60
4.3.7 γ -GT.....	62
4.3.8 Albumin.....	63
4.3.9 TPZ-INR	65
4.3.10 Kreatinin	66
5. Diskussion	68
5.1 Schlussfolgerungen aus den Ergebnissen der Zytokin-messungen	69
5.2 Schlussfolgerungen aus den Ergebnissen der Messungen der monozytären HLA-DR-Expression und der TNF- α -Synthese nach LPS-Stimulation.....	71
5.3 Schlussfolgerungen aus den Ergebnissen der PCT-Messungen.....	72
5.4 Schlussfolgerungen aus den Ergebnissen der Messungen der laborchemischen Parameter	73
5.5 Schlussfolgerungen aus den Ergebnissen der klinischen Untersuchungen.....	76
5.6 Hochdosis-Steroidtherapie und unerwünschte Nebenwirkungen	78
5.7 Auswirkungen der Steroidgabe auf die Leberregeneration.....	79
5.8 Beurteilung	80
6. Zusammenfassung	82

7. Literaturverzeichnis.....	85
8. Anhang	90
Danksagung	90
Publikation	91
Lebenslauf	92
Eidesstattliche Erklärung	93

Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1.1 Spezifische rezeptorvermittelte Glucocorticoidwirkungen	14
Tabelle 1.2 Unspezifische rezeptorunabhängige Wirkungen.....	15
Tabelle 3.1 Charakteristika der 20 gültigen Patienten zum Zeitpunkt der Operation	27
Tabelle 3.2 Verteilung nach Operationsverfahren	32
Tabelle 3.3 Rekonvaleszenz-Score	34
Tabelle 3.4 Referenzbereiche der verwendeten Laborparameter.....	38
Tabelle 4.1 Postoperative Komplikationen in der Steroid- und Kontrollgruppe	40
Tabelle 4.2 Ergebnisse des Rekonvaleszenz-Scores.....	41
Tabelle 4.3 Ergebnisse der IL-6-Messungen	43
Tabelle 4.4 Ergebnisse der IL-8-Messungen	44
Tabelle 4.5 Ergebnisse der TNF- α -Messungen	46
Tabelle 4.6 Ergebnisse der IL-10-Messungen	47
Tabelle 4.7 Ergebnisse der Messungen der monozytären HLA-DR-Expression	49
Tabelle 4.8 Ergebnisse der TNF- α -Messungen nach LPS-Stimulation.....	50
Tabelle 4.9 Ergebnisse der PCT-Messungen	51
Tabelle 4.10 Ergebnisse der CRP-Messungen.....	53
Tabelle 4.11 Ergebnisse der Leukozytenmessungen	54
Tabelle 4.12 Ergebnisse der AST-Messungen	56
Tabelle 4.13 Ergebnisse der ALT-Messungen.....	58
Tabelle 4.14 Ergebnisse der t-Bilirubin-Messungen	59
Tabelle 4.15 Ergebnisse der AP-Messungen	60
Tabelle 4.16 Ergebnisse der γ -GT-Messungen	62
Tabelle 4.17 Ergebnisse der Albuminmessungen	63
Tabelle 4.18 Ergebnisse der TPZ-INR-Messungen	65
Tabelle 4.19 Ergebnisse der Kreatininmessungen	66

Verzeichnis der Graphiken

Graphik 4.1 Postoperative Rekonvaleszenz.....	41
Graphik 4.2 Postoperativer Krankenhausaufenthalt	42
Graphik 4.3 Verlauf der IL-6-Plasmakonzentrationen.....	44
Graphik 4.4 Verlauf der IL-8-Plasmakonzentrationen.....	45
Graphik 4.5 Verlauf der TNF- α -Plasmakonzentrationen.....	47
Graphik 4.6 Verlauf der IL-10-Plasmakonzentrationen.....	48
Graphik 4.7 Verlauf der monozytären HLA-DR-Expression.....	49
Graphik 4.8 Verlauf der TNF- α -Plasmakonzentrationen nach LPS-Stimulation	51
Graphik 4.9 Verlauf der PCT-Konzentrationen	52
Graphik 4.10 Verlauf der CRP-Konzentrationen.....	54
Graphik 4.11 Verlauf der Leukozytenkonzentrationen.....	55

Graphik 4.12 Verlauf der AST-Konzentrationen	57
Graphik 4.13 Verlauf der ALT-Konzentrationen	58
Graphik 4.14 Verlauf der t-Bilirubin-Konzentrationen	59
Graphik 4.15 Verlauf der AP-Konzentrationen.....	61
Graphik 4.16 Verlauf der γ -GT-Konzentrationen	62
Graphik 4.17 Verlauf der Albuminkonzentrationen	64
Graphik 4.18 Verlauf des TPZ-INR.....	65
Graphik 4.19 Verlauf der Kreatininkonzentrationen	67

Verzeichnis der Figuren

Figur 1.1 Strukturformel von Methylprednisolon	13
Figur 3.1 Übersicht der Leber mit ihren 8 Segmenten	31

Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AK	Antikörper
ALT	Alanin-Aminotransferase
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Antigen presenting cell (Antigen-präsentierende Zelle)
APP	Akute-Phase-Protein
Aqua dest.	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
ASA	American Society of Anesthesiologists
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
BMI	Body mass index
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CCC	Cholangiozelluläres Karzinom
CD	Cluster of differentiation (internationale Nomenklatur zellulärer Oberflächenmarker)
CRP	C-reaktives Protein
d. h.	das heißt
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
EDTA	Ethyldiamin tetraic acid (Ethyldiamintetra-Essigsäure)
EGF	epidermal growth factor (epidermaler Wachstumsfaktor)
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ERC	endoskopische retrograde Cholangiographie
ERCP	endoskopische retrograde Cholangiopancreatographie
FACS	Fluorescence-activated cell sorting (Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung bzw. -analyse)
FCS	Fetal calf serum (fetales Kälberserum)
FNH	Fokale noduläre Hyperplasie
FSC	Forward scatter (Vorwärtsstreulicht)
g	Einheit der relativen Zentrifugalkraft
g	Gramm
γ -GT	gamma-Glutamyltransferase

G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
GM-CSF	Granulozyten Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
h	Stunde(n)
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HGF	hepatocyte growth factor (Hepatozyten-Wachstumsfaktor)
HLA	Human leukocyte antigen (menschliches MHC-Protein)
HLA-DR	MHC-II-Molekül
HWZ	Halbwertszeit
i. A.	im Allgemeinen
IAP	immunosuppressive acidic protein (immunsuppressives säurebildendes Antigen)
i. d. R.	in der Regel
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-1RA	Interleukin-1-Rezeptorantagonist
iNOS	inducible nitric oxide synthase (induzierbare Stickstoffoxid-Synthase)
ITN	Intubationsnarkose
i. v.	intravenös
kD	KiloDalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
mAB	monoclonal antibodies (monoklonale Antikörper)
M-CSF	Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
mg	Milligramm
MHC	major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter Quecksilber
mRNA	messenger-ribonucleic acid (Messenger-Ribonukleinsäure)
MW	Mittelwert
MWU	Mann-Whitney-U
NADH	reduzierte Form des Nikotinsäureamid-adenin-dinukleotid
NAP-1	Neutrophilen-aktivierendes Protein-1
NK-Zelle	Natürliche-Killer-Zelle
n	Fallzahl
nl	Nanoliter
NaCl	Natriumchlorid
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells (periphere blutmononukleäre Zellen)
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PEEP	Positive endexpiratory pressure (positiver endexpiratorischer Druck)
PE-Moleküle	Phycoerythrin-Moleküle
PerCP	Peridin-Chlorophyll-A-Protein
pg	Picogramm
postop.	postoperativ

präop.	präoperativ
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
S.	Seite
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome (systemische inflammatorische Reaktion)
SSC	Sideward scatter (Seitwärtsstreulicht)
sog.	sogenannt
syn.	synonym
Tab.	Tabelle
TGF- α	Transforming Growth Factor- α (umwandelnder Wachstumsfaktor- α)
Th1-Zellen	T-Helfer-Zellen Typ1
Th2-Zellen	T-Helfer-Zellen Typ2
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
TPZ	Thromboplastinzeit
TPZ-INR	Thromboplastinzeit-International Normalized Ratio (international einheitliches Verhältnis)
U	Unit (Einheit)
u. a.	unter anderem
usw.	und so weiter
v. a.	vor allem
vgl.	vergleiche
w/m	weiblich/männlich
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
ZVD	Zentraler Venendruck
ZVK	Zentralvenöser Katheter

6. Zusammenfassung

Postoperative Komplikationen wie Infektionen und Entzündungen, Sepsis und Multiorganversagen stellen nach wie vor ein großes Problem bei größeren abdominalchirurgischen Eingriffen wie Leberteilresektionen dar. Sie sind direkt assoziiert mit einer überschießenden generalisierten inflammatorischen Reaktion, welche gekennzeichnet ist durch ein Missverhältnis von pro- und antiinflammatorisch wirkenden Zytokinen. Ein balanciertes Verhältnis dieser Zytokine ist wichtig für eine angemessene Immunantwort; sowohl exzessive Entzündungsreaktionen als auch eine unzureichende Immunreaktion können zu postoperativen Komplikationen führen. Mitverantwortlich für diese posttraumatische inflammatorische Reaktion ist u. a. eine gesteigerte Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen, hierunter IL-6 als wichtigstes proinflammatorisches Zytokin, welches als sensitiver Indikator für operativen Stress gilt.

Die in die Studie eingeschlossenen 20 Patienten wurden doppelblind randomisiert auf eine Steroidgruppe mit 10 Patienten und eine Kontrollgruppe mit 10 Patienten verteilt. Die Patienten, die der Glucocorticoid-Behandlung zugeordnet wurden, erhielten 90 Minuten präoperativ 30 mg/kg KG Methylprednisolon, in der Kontrollgruppe wurde als Placebosubstanz NaCl 0,9% verabreicht. Bei allen eingeschlossenen Patienten wurde eine Leberteilresektion ohne Pringle-Manöver durchgeführt.

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss der präoperativen Hochdosis-Steroidgabe auf die postoperative Immunfunktion der Patienten zu untersuchen. Hauptzielkriterium war der postoperative IL-6-Plasmaspiegel. Hierfür wurden die postoperativen Plasmakonzentrationen der proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-8 und TNF- α , sowie des antiinflammatorisch wirkenden Zytokins IL-10 gemessen. Anhand von Messungen der monozytären HLA-DR-Expression und der TNF- α -Synthese nach LPS-Stimulation ließ sich der Einfluss der Steroidgabe auf die zelluläre Immunität untersuchen. Um eine eventuelle Beeinträchtigung der postoperativen Leberfunktion bzw. Synthesestörungen oder eine Cholestase nachweisen zu können, wurden ALT, AST, Albumin und TPZ-INR sowie t-Bilirubin, AP und γ -GT bestimmt. Als wichtige Indikatoren einer Akuten-Phase-Reaktion wurden postoperativ CRP und die Leukozytenanzahl gemessen. Die Bestimmung des Kreatininwertes diente zur Beurteilung der postoperativen Nierenfunktion.

Den postoperativen klinischen Verlauf der Patienten bewerteten wir anhand der postoperativen Komplikationen, der Rekonvaleszenz und der Dauer des postoperativen Krankenhausaufenthaltes. Außerdem wurden der intraoperative Blutverlust sowie die Operationsdauer berücksichtigt.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Plasmaspiegel der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8 postoperativ signifikant niedriger in der Steroidgruppe als in der Kontrollgruppe waren. Somit scheint bestätigt zu sein, dass durch die einmalige hochdosierte Methylprednisolongabe eine überschießende postoperative inflammatorische Reaktion effektiv gehemmt wurde. Ebenso waren die IL-10- und TNF- α -Konzentrationen in der Steroidgruppe leicht supprimiert. Eine niedrige IL-10-Konzentration bedeutet hier eine verminderte Hemmung der TNF- α -Synthese und somit einen positiven Effekt auf den Ablauf der Leberregeneration. Als indirekte Marker der zellulären Immunität untersuchten wir die HLA-DR-Expression auf Monozyten sowie die TNF- α -Synthese nach LPS-Stimulation. Die TNF- α -Konzentration nach LPS-Stimulation war in der Steroidgruppe vier Stunden postoperativ signifikant erniedrigt, nahm jedoch ab dem ersten postoperativen Tag im weiteren Verlauf wieder zu. Unsere Ergebnisse bezüglich der monozytären HLA-DR-Expression zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Steroid- und Kontrollgruppe. Daraus schließen wir, dass durch die Hochdosis-Steroidgabe die zelluläre Immunität der Patienten unbeeinträchtigt bleibt.

Der Entzündungsparameter CRP war in der Steroidgruppe vom ersten bis zum vierten postoperativen Tag signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe. Durch die Steroidgabe unbeeinflusst zeigten sich die Marker für Leberfunktionsstörungen ALT und AST sowie die Syntheseparameter Albumin und TPZ-INR. Der Cholestaseparameter t-Bilirubin war in der Steroidgruppe nahezu konstant niedriger, am sechsten postoperativen Tag auch signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe. Wir können daher keine Beeinträchtigung der postoperativen Leberfunktion durch die präoperative Hochdosis-Methylprednisolongabe feststellen.

Die steroidinduzierte Suppression der IL-6-Sekretion scheint fraglich mit einer Verkürzung des postoperativen Krankenhausaufenthaltes assoziiert zu sein. Der Krankenhausaufenthalt war in der Steroidgruppe zwar signifikant kürzer als in der Kontrollgruppe, doch wird dieses Ergebnis beeinflusst durch die komplikationsbedingt verlängerte Aufenthaltsdauer einer Patientin in der Kontrollgruppe.

Hinsichtlich der Rate postoperativer Komplikationen und der Rekonvaleszenz der Patienten war kein signifikanter Unterschied zwischen der Steroid- und Kontrollgruppe und deshalb kein unmittelbarer Zusammenhang zu der supprimierten IL-6-Freisetzung zu erkennen.

8. Anhang

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand an der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie, Campus Virchow-Klinikum, in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Immunologie, Campus Mitte, Medizinische Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Jan M. Langrehr für die Überlassung des Themas und die Unterstützung und Förderung dieser Arbeit. Herrn Prof. Dr. med. Hans-Dieter Volk danke ich sehr für die wissenschaftliche Betreuung und die Möglichkeit, in seinem Institut die Untersuchungen durchführen zu dürfen.

Mein Dank gilt den Patienten, die sich zur Verfügung gestellt und somit die Grundlage für diese Arbeit geschaffen haben.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Conny Höflich. Ohne ihre immer freundliche und zuverlässige Unterstützung sowie Fülle an wertvollen Tipps wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Bedanken möchte ich mich bei Sven Christian Schmidt für seine wissenschaftliche Betreuung und Hilfe, wann immer es nötig war.

Mein herzlicher Dank gilt Jens Mittler, der unermüdlich neben seiner täglichen Klinikarbeit die Patientenaufklärungen durchführte.

Bei Christa Liebenthal, Kristin Neuhaus, Ingrid Jäkel, Anke Bonke und Ulrike Mönich möchte ich mich ebenfalls für die freundliche Unterstützung, die ich stets bei Fragen und Problemen hatte, herzlich bedanken. Die angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor wird mir in schöner Erinnerung bleiben.

Mein Dank gilt Frau Inge Uhl, die geduldig meine täglichen Anrufe entgegen nahm und eine große Hilfe bei der Patientenrekrutierung war.

Herzlichen Dank an Matthias Müller für das Lesen der Arbeit und die Ratschläge zur Korrektur.

Zuletzt bedanke ich mich ganz herzlich bei Maurice de Ruijter. Er ermöglichte es mir, diese Arbeit mit Spaß zu bewältigen und stand mir in jeder Situation mit Rat und Tat zur Seite, so dass die vorliegende Arbeit entstehen konnte.

Publikation

Eine Veröffentlichung dieser Arbeit ist in Vorbereitung und akzeptiert zur Publikation im Journal of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery:

Preoperative high dose steroid administration attenuates the surgical stress response following liver resection: results of a prospective randomized study.

S. C. Schmidt, S. Hamann, Jan M. Langrehr, C. Höflich, J. Mittler, D. Jacob, P. Neuhaus

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Susanne Hamann, an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbst und ohne die Hilfe Dritter verfasst wurde und auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt. Die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur sind vollständig angegeben.

Berlin, 08. Juli 2007