

## **3. Material und Methoden**

### **3.1 Material**

#### **3.1.1 Patientenkollektiv**

In die Studie eingeschlossen wurden alle Patienten mit einem gut- oder bösartigen Lebertumor, bei denen eine Leberteilresektion von mindestens zwei Segmenten geplant war und die eine Einwilligung zur Teilnahme in allen Bestandteilen schriftlich erklärt haben. Die Untersuchungen konnten zum Schutz der Patienten durch die Studienleitung und durch den Widerruf der Einwilligung des Patienten abgebrochen werden. Ausgeschlossen wurden Patienten unter 18 Jahren und Patientinnen mit bestehender Schwangerschaft. Zu den Ausschlusskriterien zählten weiter ein Ulcus duodeni bzw. ventriculi, Osteoporose und ein Glaukom, da eine Hochdosis-Steroidtherapie möglicherweise eine Verschlechterung der Vorerkrankungen bewirken kann und somit kontraindiziert ist. Ebenso wurden Patienten mit erhöhter Thromboseneigung, Diabetes mellitus, Adipositas (BMI>32), Leberzirrhose und ASA-Klassifizierungen IV-V ausgeschlossen.

Die vorliegende Arbeit wurde an der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie, Campus Virchow-Klinikum, Medizinische Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin durchgeführt. Im Zeitraum von November 2001 bis Mai 2004 wurden insgesamt 64 Patienten, bei denen eine Leberteilresektion geplant war und die den Einschlusskriterien entsprachen, über die Ziele und den Ablauf der Studie aufgeklärt und ihre schriftliche Einwilligung zur Teilnahme eingeholt. Erfolgreich durchgeführt werden konnten die notwendigen Blutentnahmen und Laboruntersuchungen bei 30 dieser Patienten. Die Drop-out-Rate von 34 Patienten ergab sich u. a. aus organisatorischen Gründen, der Operationsausdehnung (atypische und erweiterte Leberteilresektionen wurden ausgeschlossen) und nachträglichen Annullierungen der Einwilligungserklärung seitens der Patienten, so dass letztendlich 30 Patienten in die Studie eingeschlossen werden konnten. Von diesen 30 Patienten erfüllten 8 Patienten nachträglich nicht die zuvor im Studienprotokoll festgelegten Einschlusskriterien, 2 erhielten nicht das Studienmedikament während der Narkoseeinleitung und entfallen in der Auswertung. Die verbliebenen 20 Patienten teilten sich im Verhältnis 10:10 auf die Methylprednisolon- bzw. Placebogruppe auf. Somit wurde auch die vor Be-

ginn der Studie vom Institut für Medizinische Biometrie der Humboldt-Universität zu Berlin errechnete Fallzahl von n=10 in jeder Behandlungsgruppe gewährleistet.

Tabelle 3.1 Charakteristika der 20 gültigen Patienten zum Zeitpunkt der Operation

Parameter	Kontrollgruppe (n=10)	Steroidgruppe (n=10)
Alter in Lebensjahren: Mittelwert (Spannweite)	65 (42-76)	57 (36-66)
Geschlecht: w/m	6/4	7/3
Gewicht in kg: Mittelwert (Spannweite)	69 (45-92)	67 (46-85)
Diagnosen:		
Hepatozelluläres Karzinom (HCC)	1	2
Cholangiozelluläres Karzinom (CCC)	2	0
Lebermetastasen	4	4
Fokale noduläre Hyperplasie (FNH)	0	1
FNH und Hämangiom	0	1
Hämangiome	0	1
Sklerosierende Cholangitis	1	0
Leberabszesse	1	0
Caroli-Syndrom	1	0
Inflammatorischer myelofibroblastischer Tumor	0	1

Die in die Studie eingeschlossenen 20 Patienten wurden doppelblind randomisiert verteilt auf eine Methylprednisolongruppe (Steroidgruppe) und eine Placebogruppe (Kontrollgruppe) mit jeweils 10 Patienten. Zwischen der Steroid- und Kontrollgruppe bestand kein signifikanter Unterschied hinsichtlich Geschlecht ( $p=0,648$ ) und Gewicht ( $p=0,733$ ) der Patienten. Das durchschnittliche Alter in der Kontrollgruppe war mit 65 Jahren signifikant höher als in der Steroidgruppe mit 57 Jahren ( $p<0,05$ ). Lebermetastasen, hepatozelluläres Karzinom und cholangiozelluläres Karzinom machten mit 65% (13/20) die Hauptdiagnosen bei den eingeschlossenen Patienten aus (siehe Tab. 3.1).

### 3.1.2 Labormaterial

#### 3.1.2.1 Verbrauchsmaterialien

2,7 ml EDTA-Monovetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
5,5 ml Lithium-Heparin-Monovetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
0,5 und 1,5 ml Eppendorfgeläße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
10-100 $\mu$ l, 50-250 $\mu$ l und 100-1000 $\mu$ l Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Micronic-Röhrchen	ICN Biomedicals, Irvine, USA
50 ml Falcon-Röhrchen, Polypropylen	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
10 ml Röhrchen, Polypropylen	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
3,5 ml Pasteur-Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
<b>3.1.2.2 Chemikalien</b>	
Ficoll-Paque Plus	Amersham Biosciences, Piscataway, USA
1640 RPMI-Medium	Biochrom, Berlin, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma, St.Louis, USA
<b>3.1.2.3 Puffer und Lösungen</b>	
FACS-Puffer (PBS, 2% FCS, 0,1% NaN <sub>3</sub> )	selbst hergestellt
FACS Lysing Solution (1:10 verdünnt mit Aqua dest.)	Becton Dickinson, San Jose, USA
Unsterile phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	Apotheke der Charité, Berlin, Deutschland
Ex vivo Stimulationskit	Milenia Biotec, Bad Nauheim, Deutschland
Immulite Teströhrchen	DPC Biermann, Bad Nauheim, Deutschland
LUMitest PCT 100	Brahms, Saint Ouen, Frankreich
<b>3.1.2.4 Antikörper, Eichbeads</b>	
QuantiBrite HLA-DR-PE/Anti-Monocyte PerCP-Cy5.5	Becton Dickinson, San Jose, USA
QuantiBrite PE	Becton Dickinson, San Jose, USA
CaliBrite3-Beads	Becton Dickinson, San Jose, USA
<b>3.1.3 Verwendete Geräte und Software</b>	
<b>3.1.3.1 Geräte</b>	
Immulite Automated Analyzer 1000	DPC Biermann, Bad Nauheim, Deutschland
FACSCalibur-Durchflusszytometer	Becton Dickinson, San Jose, USA
Kühlzentrifuge CR 4 22	Jouan, Saint Nazaire, Frankreich
Brutschrank EG 110 IR	Jouan, Saint Nazaire, Frankreich
Absaugpumpe Laboport	Neuberger, Freiburg, Deutschland
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Philadelphia, USA
Zentrifuge Centrifuge 5810	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Brutschrank	Heraeus Instruments, Langenselbold, Deutschland
<b>3.1.3.2 Software</b>	
FACS Comp	Becton Dickinson, San Jose, USA
Cell Quest	Becton Dickinson, San Jose, USA
Quanti Quest	Becton Dickinson, San Jose, USA
Quanti Calc	Becton Dickinson, San Jose, USA
Word 97 und 2002	Microsoft Corp., Redmont, USA
Excel 2002	Microsoft Corp., Redmont, USA
SPSS 11.0 für Windows	SPSS Inc., Chicago, USA

Endnote 5.0.2 für Windows  
GraphPad Prism 3.03 für Windows

ISI Researchsoft, Berkeley, California, USA  
GraphPad Software Inc., San Diego, California, USA

### 3.1.4 Verwendete Statistik

Die Berechnung des Stichprobenumfanges sowie die statistische Auswertung erfolgten unter Anleitung des Instituts für Medizinische Biometrie der Humboldt-Universität zu Berlin.

#### 3.1.4.1 Festlegung des optimalen Stichprobenumfanges

Die Absicht der Studie bestand in dem Nachweis, dass die Gabe von Methylprednisolon den IL-6-Plasmaspiegel nach einer Leberteilresektion beeinflusst. Als Hauptzielkriterium wurde die IL-6-Konzentration am ersten postoperativen Tag gewählt, so dass es um den Test folgender Hypothesen (zum Niveau  $\alpha/2=5\%$ ) ging:

$H_0$  (Nullhypothese): IL-6 (Kontrolle)=IL-6 (Methylprednisolon), d. h. die Gabe von Methylprednisolon beeinflusst die IL-6-Konzentration nicht.

$H_A$  (Alternativhypothese-einseitig): IL-6 (Kontrolle)>IL-6 (Methylprednisolon), d. h. die Gabe von Methylprednisolon beeinflusst die IL-6-Konzentration.

Dafür wurden die optimalen Stichprobenumfänge unter den gegebenen Bedingungen nach J. Bock (1998) und L. Hintze (1996) berechnet. Als klinisch relevante Differenz  $\delta$  wurde eine Senkung des IL-6-Wertes in der Methylprednisolongruppe um 80% angenommen. Die Drop-out-Rate wurde auf 10% geschätzt, so dass die ermittelten optimalen Stichprobenumfänge um diesen Wert erhöht werden mussten.

Die folgenden Vorgaben führten zu einem optimalen Stichprobenumfang von  $n=10$  ( $9+\text{Drop-out-Rate von } 10\%= 9+1$ ) in jeder Behandlungsgruppe:

- Fehler 1. Art:  $\alpha=5\%$
- Fehler 2. Art:  $\beta\leq 20\%$
- Power  $1-\beta\geq 80\%$
- Normwert IL-6: 250 pg/ml
- Klinisch relevante Differenz  $\delta=-210$  pg/ml (Senkung um ca. 80%)
- Standardabweichung des Normwertes:  $\sigma_1=60$  pg/ml
- Standardabweichung der Methylprednisolongruppe:  $\sigma_2=8$  pg/ml
- Gemeinsame Standardabweichung:  $\sigma=114$  pg/ml
- Effektgröße:  $\delta=\delta/\sigma=-1,842$

Die Fallzahlplanung orientierte sich außerdem an Ergebnissen der Arbeit von Shimada et al. [14].

### **3.1.4.2 Statistische Auswertungsverfahren**

Die Befunde der Zielgrößen wurden zunächst explorativ untersucht und deskriptiv ausgewertet. Da die Verteilungen schief waren und z. T. Ausreißer vorlagen, kamen nichtparametrische Verfahren zur Darstellung, Beschreibung und Auswertung der Daten zur Anwendung. Zum Vergleich stetiger Parameter (z. B. IL-6) zwischen den beiden Gruppen wurden Mann-Whitney-U-Tests verwendet, zum Vergleich nominaler Merkmale (z. B. Komplikationen) wurden Chi<sup>2</sup>-Tests bzw. der exakte Test nach Fisher berechnet.

Als Hauptzielkriterium wurde der IL-6-Wert am ersten postoperativen Tag gewählt, alle anderen Vergleiche wurden nur explorativ betrachtet. Zusätzlich wurde für den Vergleich der Gruppen über die Zeit für die immunologischen und laborchemischen Parameter eine nichtparametrische zweifaktorielle Analyse für Messwiederholungen mit den Faktoren Steroidgruppe und Messzeitpunkt durchgeführt [68]. Als signifikant wurden p-Werte <0,05 betrachtet.

## **3.2 Methoden**

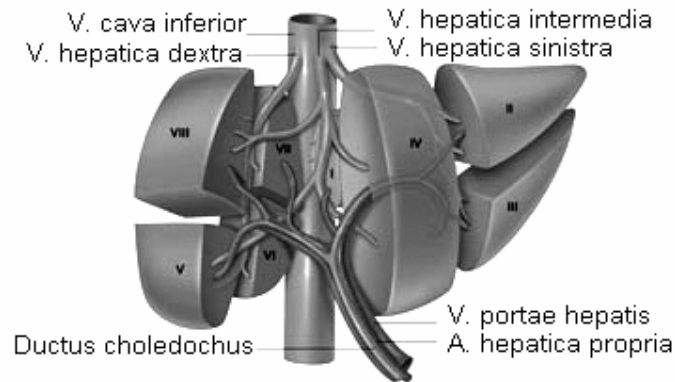
### **3.2.1 Gabe des Studienmedikamentes**

Beide Studiensubstanzen, Placebo und Methylprednisolon, wurden von der Klinikapotheke in entsprechend codierten Infusionsflaschen geliefert, so dass bis zum Studienabschluss der doppelblinde Charakter der Studie gewährleistet wurde.

Die Patienten, die der Glucocorticoidbehandlung zugeordnet wurden, erhielten 90 Minuten vor der Narkoseeinleitung 30 mg/kg KG Methylprednisolon (Urbason<sup>®</sup>) in 50 ml NaCl 0,9% aufgelöst als Kurzinfusion über 15 Minuten. Die Kontrollgruppe erhielt als Placebosubstanz NaCl 0,9% im gleichen Volumen (50 ml), ebenfalls als Kurzinfusion über 15 Minuten.

### 3.2.2 Operationsverfahren und intraoperativer Ablauf

---



---

Figur 3.1 Übersicht der Leber mit ihren 8 Segmenten [69]

#### 3.2.2.1 Hemihepatektomie rechts

Nach Rückenlagerung des Patienten und ITN erfolgen eine ausgiebige Hautdesinfektion des Abdomens und das Abdecken mit sterilen Tüchern. Der Bauchraum wird eröffnet durch eine quere Oberbauchlaparotomie mit median aufgesetzter Erweiterung zum Xyphoid. Nach dem Einsetzen von Rochardhaken werden der Ductus cysticus und die Arteria cystica dargestellt; beide Strukturen werden zwischen Overholdklemmen durchtrennt und es schließt sich eine retrograde Cholecystektomie an. Nach Darstellung der Pfortadergabel und Anschlingen des rechten Pfortaderhauptastes wird die rechte Leberarterie präpariert und der rechte Gallengang angeschlungen. Anschließend wird nach Absetzen der rechten Lebervene, des rechten Pfortaderastes und der rechten Leberarterie die rechtsseitige Hemihepatektomie mit dem Ultraschall Dissektor durchgeführt; kleinere Gefäße und Gallengänge werden zwischen Titanclips durchtrennt.

#### 3.2.2.2 Hemihepatektomie links

Nach Rückenlagerung in ITN, Hautdesinfektion und sterilem Abdecken wird das Abdomen durch einen ausgedehnten Oberbauchquerschnitt mit median aufgesetzter Erweiterung zum Xyphoid eröffnet. Es werden Rochardhaken eingesetzt. Der Ductus cysticus und die Arteria cystica werden nach ihrer Darstellung zwischen Overholdklemmen durchtrennt und die retrograde Cholecystektomie durchgeführt. Nun wird zunächst die Pfortadergabel dargestellt und der linke Pfortaderhauptast

angeschlingt. Die linke Leberarterie wird präpariert und der linke Gallengang wird angeschlingt, bevor die Leber ausgelöst und von der Vena cava abpräpariert wird. Die linke Lebervene wird ebenfalls präpariert, der linke Pfortaderast und die linke Leberarterie werden zwischen Overholdklemmen durchtrennt. Ebenso durchtrennt werden der linke Ductus choledochus und die linke Lebervene; es erfolgt die linksseitige Leberteileresektion mit dem Ultraschall Dissektor.

Tabelle 3.2 Verteilung nach Operationsverfahren

	Kontrollgruppe (n= 10)	Steroidgruppe (n= 10)
Hemihepatektomie links, anatomischer Typ: Segmente II-IV	5	4
Hemihepatektomie rechts, anatomischer Typ: Segmente V-VIII	5	6

Bei allen in die Studie eingeschlossenen Patienten konnte auf die Durchführung eines Pringle-Manövers verzichtet werden.

### 3.2.3 Anästhesiologisches Management

Für die Leberteileresektionen wurde ein balanciertes Anästhesieverfahren in ITN durchgeführt. Die Narkoseeinleitung erfolgte mit 3-5 mg/kg KG Thiopental (Trapanal®) und 0,001-0,0015 mg/kg KG Fentanyl. Zur Aufrechterhaltung der Narkose wurde Desfluran in einem Sauerstoff/Lachgasgemisch in einer Konzentration von 3,5-6 Vol.% im Low- oder Minimal-flow-Verfahren zugeführt. Zur Muskelrelaxation kamen cis-Atracurium oder Vecuronium zum Einsatz, zur intraoperativen Analgesie Fentanyl. Neben dem Standard-Monitoring wie EKG, Pulsoxymetrie und Relaxometrie wurde über einen i. d. R. über die rechte Vena jugularis interna eingebrachten zentralvenösen Katheter (ZVK) der zentrale Venendruck (ZVD) und über einen in die linke Arteria radialis eingebrachten Gefäßkatheter der arterielle Blutdruck kontinuierlich gemessen. Über den ZVK erfolgten außerdem die Blutentnahmen für die immunologischen und laborchemischen Untersuchungen.

Alle Patienten erhielten einen Blasenkatheter und eine Magensonde. Das hämodynamische Management galt der Aufrechterhaltung der Normovolämie, zum Volumenersatz wurde ein balanciertes Kristalloid/Kolloid-Schema angewendet. Die Transfusion von Erythrozytenkonzentraten erfolgte nach Unterschreiten eines zuvor für jeden Patienten in Abhängigkeit von Begleiterkrankungen und Alter individuell festge-

legten Transfusionstriggers. Die Patienten wurden i. d. R. im volumenkontrollierten zeitgesteuerten Beatmungsmodus beatmet, und, falls zur Vermeidung erhöhter Beatmungsdrücke erforderlich, im drucklimitierten Modus unter Verwendung der PEEP-Stufen von 3-10 mmHg. Während der Resektionsphase wurde ein ZVD von 5 mmHg und weniger angestrebt und der PEEP auf null gesetzt. Nach Beendigung der Hautnaht wurden die Patienten extubiert und auf eine Intensivstation verlegt.

### **3.2.4 Rekonvaleszenz-Score**

Die postoperative Rekonvaleszenz als Maß für die Wiederherstellung der normalen körperlichen Aktivität wurde anhand eines Scoring-Systems berechnet, welches die Mobilisationsfähigkeit des Patienten berücksichtigt [70]. Dazu wurden die Fähigkeit zur Flüssigkeits- und Nahrungsaufnahme sowie zur selbständigen Körperpflege ebenso wie Kontinenz, Mobilität und der psychische Zustand des Patienten mit Punktwerten zwischen 0 und -2 bewertet und vier Stunden postoperativ sowie fortlaufend täglich bis einschließlich zum siebten postoperativen Tag beurteilt. Bei einer möglichen Punktesumme von 0 bis -12 lassen Werte, die sich 0 annähern, eine gute Rekonvaleszenz des Patienten erkennen, während größere negative Werte auf eine verlangsamte, gestörte Erholung vom operativen Eingriff hinweisen.



Tabelle 3.3 Rekonvaleszenz-Score [70]

Parameter		Punkte
Flüssigkeitseinfuhr	Patient trinkt ohne Hilfe	0
	Patient trinkt, benötigt jedoch Unterstützung durch i.v. Infusion	-1
	Patient trinkt nicht, benötigt ausschließlich i.v. Infusion	-2
Nahrungseinfuhr	Patient isst ohne Hilfe	0
	Patient isst mit Hilfe	-1
	Patient muss gefüttert werden/ benötigt eine Magensonde	-2
Körperpflege	Patient wäscht sich außerhalb des Bettes ohne Hilfe	0
	Patient wäscht sich im Bett ohne Hilfe	-1
	Patient benötigt Körperpflege im Bett	-2
Blasen- und Darmfunktion	Patient ist kontinent und unabhängig	0
	Patient benötigt teilweise eine Bettpfanne	-1
	Patient ist inkontinent und benötigt eine Bettpfanne	-2
Mobilität	Patient ist vollmobilisiert	0
	Patient ist teilmobilisiert	-1
	Patient ist immobil	-2
Psychische Verfassung	Patient benötigt wenig psychologische Unterstützung	0
	Patient benötigt psychologische Unterstützung	-1
	Patient benötigt viel psychologische Unterstützung	-2
Summe der Punktzahl		0 bis -12

### 3.2.5 Blutentnahmen

Zur Bestimmung der immunologischen Parameter wurden präoperativ am Morgen des Operationstages, 4 Stunden postoperativ und am ersten, zweiten, dritten und siebten postoperativen Tag venöse Blutproben in jeweils zwei 5,5 ml Lithium-Heparin-Monovetten und zwei 2,7 ml EDTA-Monovetten entnommen. Die Blutentnahme erfolgte präoperativ über eine periphere Vene, nach der Operation wurde hierfür der nach der Narkoseeinleitung gelegte ZVK genutzt. Die Blutproben für die laborchemischen Untersuchungen wurden vom Stationspersonal täglich morgens mit entnommen; sofern dies aus organisatorischen Gründen möglich war vom Tag vor der Operation täglich bis zur Entlassung des Patienten.

### **3.2.6 Zytokinmessungen mittels Immulite®**

Das Immulite® der Firma DPC Biermann ist ein vollautomatisches Chemilumineszenz-Immunoassay System, dessen enzymkatalysierte Chemilumineszenzreaktion hochsensitive Immunoassays mit weitem Messbereich ermöglicht. Bei den biochemischen Reaktionen während des Messvorgangs spielt eine antikörperbeschichtete Polystyrolkugel eine wichtige Rolle. Sie befindet sich in einem patentierten Teströhrchen, das als Gefäß für die Reaktion, die Inkubation, die Waschvorgänge und die Signalentwicklung dient. Nach erfolgter Inkubation der Probe mit einem Enzymkonjugat (AP) werden mehrere Waschvorgänge in der Waschstation durchgeführt. Das Röhrchen wird dort mit hoher Geschwindigkeit um seine Hochachse gedreht, die im Röhrchen befindliche Flüssigkeit wird dadurch in den integrierten Auffangkrügen gedrückt. Das System kann innerhalb weniger Sekunden vier oder mehr solcher Waschvorgänge durchführen. Am Ende ist das Röhrchen frei von ungebundenem Enzymkonjugat. Das gebundene Enzymkonjugat hydrolisiert ein nach dem Waschvorgang zugegebenes Dioxetan-Substrat. Das dabei entstehende instabile Zwischenprodukt zerfällt unter Lichtemission. Zur Messung der einzelnen Zytokine wurden die Patientenproben mit mindestens 100 µl Überschuss in die Probenröhrchen überführt. Für die IL-6- und IL-8-Messungen wurden 100 bzw. 50 µl Patienten-EDTA-Plasma benötigt; IL-10 und TNF-α wurden in jeweils 100 µl Patienten-Heparin-Plasma bestimmt.

### **3.2.7 Messung der monozytären HLA-DR-Expression**

#### **3.2.7.1 Flowzytometrische Analyse**

Die Flowzytometrie ermöglicht die Charakterisierung von Antigenen auf und in einer Zelle mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern. Die Zellen werden hierfür zunächst in einem Flüssigkeitsmantel als einzelne Partikel in eine laminare Strömung gebracht, bevor sie in die Messkammer eintreten. Dort trifft Laserlicht auf die einzelne Zelle und damit auf die an Antikörper gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe. Durch das Laserlicht angeregt, emittieren diese ihrerseits Licht eines definierten Wellenlängenspektrums, welches von Sensoren in der Messkammer als Impuls aufgenommen, verstärkt und anschließend rechnergestützt aufbereitet wird. Gleichzeitig wird das Laserlicht je nach Beschaffenheit der getroffenen Zelle charakteristisch gestreut. Aus der Interpretation von FSC (ein globales Maß für die Größe) und SSC (ein globales Maß für die Granularität) sind Rückschlüsse auf die Größe und Granularität der Zelle

möglich. Bei einem Vier-Farben-Durchflusszytometer wie dem FACSCalibur können durch die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen mit ähnlichen Absorptions-, aber unterschiedlichen Emissionsmaxima bis zu sechs Parameter (vier Antigene sowie Größe und Granularität) gleichzeitig untersucht werden.

### **3.2.7.2 Messung der HLA-DR-Expression auf Monozyten**

Das Prinzip der HLA-DR-Quantifizierung auf Monozyten beruht auf der Erstellung einer Eichkurve mittels QuantiBrite PE-Beads und der Färbung von HLA-DR mit einem anti-HLA-DR-Antikörper, der im Verhältnis 1:1 mit PE-Molekülen konjugiert ist. Zur Messvorbereitung wurden 20 µl des Antikörpergemisches in ein Micronic-Röhrchen gegeben und 50 µl EDTA-Patientenvollblut dazu pipettiert. Der Ansatz wurde gut gemischt und 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Innerhalb dieses Zeitraums binden die AK an die entsprechenden Zielzellen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden nach erneutem Mischen 500 µl FACS Lysing Solution dazugegeben, um die Erythrozyten zu lysieren. Dieser Ansatz wurde wiederum 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach dem sich anschließenden Waschvorgang wurde die Probe am FACS Calibur Durchflusszytometer gemessen. Zuvor wurde täglich als Grundlage der Standardisierung die QuantiBrite Beadmessung durchgeführt. Die QuantiBrite PE-Beads sind mit definierten Mengen an PE-Molekülen markiert und wurden mit den gleichen Geräteeinstellungen gemessen wie die Monozyten in der vorbereiteten Patientenprobe. Die Fluoreszenzintensitäten der Beads werden gegen die definierten Mengen an PE-Molekülen pro Bead aufgetragen und erlauben so die Übertragung der Fluoreszenzintensitäten der HLA-DR-Messung in PE-Moleküle pro Monozyt. Die Monozyten werden mit Hilfe des Monozytendifferenzierungsantigens CD 14 „gated“. Ausgewertet wurden die Patientenproben mittels der QuantiCalc Software. Als Maß für die monozytäre HLA-DR-Expression wurde die mediane FL2-Fluoreszenz in die Anzahl der pro Monozyt gebundenen monoklonalen Antikörper (mAB) konvertiert [71].

### **3.2.8 TNF- $\alpha$ -Messung nach LPS-Vollblutstimulation**

Venöses Blut der Patienten wurde in 5,5 ml Lithium-Heparin-Monovetten entnommen und hieraus 50 µl zu einer Stimulationslösung gegeben, welche ein Zellkulturmedium und 500 pg/ml LPS enthielt. Dieser Ansatz wurde gut gemischt und vier Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre im Brutschrank inkubiert. Die Immunzellen im Vollblut, v. a. Monozyten und Makrophagen, werden hierdurch angeregt, Zytokine zu

bilden. Nach Ablauf der vierstündigen Inkubationszeit wurde der Ansatz wiederum gut gemischt und durch fünfminütige Zentrifugation bei 1000 g und Raumtemperatur ein klarer Überstand gewonnen, der die synthetisierten Zytokine enthält. 90 µl des Überstandes wurden mit 180 µl 1640 RPMI-Medium verdünnt und im Immulite® die Konzentration des zu bestimmenden Zytokins TNF- $\alpha$  gemessen. Im Falle einer Immunsuppression weisen Monozyten und Makrophagen eine verminderte TNF- $\alpha$ -Sekretion nach LPS-Stimulation auf. Die genannte Stimulationslösung wurde unter Anwendung des ex vivo Stimulationskits der Firma Milenia Biotec hergestellt.

### **3.2.9 Bestimmung von PCT**

Der LUMItest PCT® ist ein immunoluminometrischer Assay der Firma Brahms und dient zur Messung von PCT im Humanserum und -plasma. Dabei werden zwei antigenspezifische monoklonale Antikörper, die das PCT (Antigen) an zwei verschiedenen Stellen, dem Calcitonin- und dem Katalcalcin-Anteil, binden, im Überschuss eingesetzt. Einer der beiden Antikörper ist lumineszenzmarkiert („Tracer“), der andere ist auf der Innenseite der Röhrrchen fixiert („Coated tube system“). Im Verlauf einer sich anschließenden Inkubation reagieren beide Antikörper mit den PCT-Molekülen der Probe zu einem so genannten „Sandwich-Komplex“, wodurch der lumineszenzmarkierte Antikörper an die Röhrrchenoberfläche gebunden wird. Nach dem Reaktionsende wird der Tracerüberschuss durch sorgfältiges Waschen vollständig aus den Röhrrchen entfernt und entsorgt. Der nach dem Waschen an der Röhrrchenwand verbliebene Traceranteil wird durch die Messung des Lumineszenzsignals in einem dafür geeigneten Luminometer unter Verwendung der LUMI-Test Basiskit-Reagenzien ermittelt. Die Größe des Lumineszenzsignals (RLU) ist der PCT-Konzentration der jeweiligen Probe direkt proportional. Mit den Lumineszenzsignalwerten der mitgeführten Standards (bekannte Antigenkonzentrationen, kalibriert an synthetischem, intaktem humanem PCT) lässt sich eine Standardkurve erstellen, an der die unbekanntes PCT-Konzentrationen der Patientenserum bzw. -plasmen abgelesen werden können.

### **3.2.10 Weitere laborchemische Blutuntersuchungen**

Die für die laborchemischen Untersuchungen täglich entnommenen Blutproben wurden in das Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie, Campus Virchow-Klinikum, Medizinische Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin gesandt und dort bearbeitet. Für die vorliegende Arbeit relevant waren die Parameter Leukozyten,

CRP, AST, ALT, t-Bili-rubin, AP,  $\gamma$ -GT, Albumin, TPZ-INR und Kreatinin. Es wurden die Werte vom präoperativen Tag, vom Tag der Operation und vom ersten bis einschließlich siebten postoperativen Tag gemessen. Die in Tabelle 3.4 angegebenen Referenzbereiche werden vom Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie verwendet und gelten als Grundlage für die Beurteilung der Messergebnisse.

Tabelle 3.4 Referenzbereiche der verwendeten Laborparameter

Parameter	Einheit	Referenzbereich (w/m)
Leukozyten	[ /nl]	4,4-11,3 (w/m)
CRP	[mg/dl]	bis 0,8 (w/m)
AST	[U/l]	bis 15 (w), bis 19 (m)
ALT	[U/l]	bis 19 (w), bis 23 (m)
t-Bilirubin	[mg/dl]	0,1-1,2 (w/m)
AP	[U/l]	60-190 (w/m)
$\gamma$ -GT	[U/l]	4-18 (w), 6-28 (m)
Albumin	[g/dl]	3,5 - 5,0 (w/m)
TPZ-INR	[ ]	0,9 - 1,25 (w/m)
Kreatinin	[mg/dl]	0,66-1,09 (w), 0,81-1,25 (m)