
Aus dem Institut für Medizinische Immunologie
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

“Differenzierte immunologische Charakterisierung der postoperativen
Immundepression nach kardiochirurgischen Eingriffen”

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Kathi Thiele
aus Bad Saarow

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. H.-D. Volk
 2. Prof. Dr. med. R.von Baehr
 3. Prof. Dr. med. U. Sack

Datum der Promotion: 18.09.2009

Zusammenfassung:

Hintergrund: Das chirurgische Trauma, der technisch bedingte Mechanismus der Organischämie und Reperfusion und die Endotoxin-Translokation aus dem Darm bewirken eine komplexe Immunantwort. In Vorarbeiten konnten wir zeigen, dass LPS, IL-10 und TGF- β in vitro eine Hemmung monozytärer Funktionen induzieren können, die dem Bild der Immundepression von ICU Patienten ähnelt. Sind auch Lymphozyten betroffen (IFN- γ Synthese), wie dies in Gegenwart von TGF- β der Fall ist, so lässt sich die Immundepression nur mit IFN- γ und GM-CSF, nicht jedoch mit IL-12/-18 (fehlende IFN- γ Synthese) revertieren. In der vorliegenden Studie sollten diese Erkenntnisse auf Patienten angewendet werden, um die Genese der Immundepression in vivo besser zu verstehen.

Versuchsplan: Das statistisch beurteilte Studienkollektiv umfasste 22 Patienten nach kardiochirurgischer Intervention über einen Beobachtungszeitraum von 4 Tagen, wobei eine weitere Unterteilung in „Patienten mit Infektionsverdacht und bestätigter Infektion“ (11) sowie „Patienten ohne Infektion“ (11) vorgenommen wurde. Es erfolgte eine Bestimmung sowohl von löslichen (IL-10, TGF- β , PCT) als auch zellulären Markern (HLA-DR-CD14, *ex-vivo* LPS-induzierten TNF- α - Sekretion). Geprüft wurde, ob IFN- γ , IL-12/-18 oder GM-CSF in der Lage waren, die verminderte TNF- α Sekretion zu revertieren. Außerdem wurde die immundepressive Kapazität der Seren auf Zellen von Normalprobanden getestet.

Ergebnisse: Alle Patienten wiesen erwartungsgemäß postoperativ eine Immundepression auf, verdeutlicht an der signifikant verminderten monozytären HLA-DR-Expression und der reduzierten *ex-vivo* TNF- α - Sekretion. Die IL-10 – Plasmaspiegel waren im Vergleich zur Kontrollpopulation (17) am 1. postoperativen Tag signifikant erhöht. Die gegenüber den Kontrollen signifikant vermindert *ex-vivo* LPS-Stimulierbarkeit am Tag 1 Post-OP konnte durch IL-12/IL-18 und GM-CSF revertiert werden. Die Inkubation des Patientenplasmas mit gesunden PBMCs bewirkte keine Verminderung der TNF- α - Sekretion nach Stimulation mit LPS.

Schlussfolgerung: Infolge perioperativen Stresses stellt sich eine kurzfristige Immundepression ein, die durch IFN- γ , IL-12/IL-18 oder GM-CSF revertierbar ist, was auf eine normale T-Lymphozytenfunktion (IFN- γ Produktion nach IL-12/IL-18) und eine fehlende Aktivierung von TGF- β in vivo hinweist. Im Gegensatz dazu haben Studien an Sepsispatienten mit „Immunparalyse“ gezeigt, dass sich hier die Monozytenfunktion durch IL-12-/IL-18 zumeist nicht revertieren lässt, was auf eine ausgeprägtere Form der Störung hinweist. Die fehlende immundepressive Aktivität der Serum Tag 1 Post-OP unterstreicht den temporären Charakter der Immundepression bei postoperativen Patienten.

Abstract:

Objectives: The surgical trauma, technically related to mechanism of organ ischemia/reperfusion and endotoxin translocation through the gut cause a complex immune response. Pre – results showed a monocyte hyporesponsiveness induced by LPS, IL-10 and TGF- β in vitro similar to appearance of immunodepression in ICU patients. If lymphocytes are involved (IFN-gamma synthesis) like in the case of TGF- β , an immunodepression reversal by IFN-gamma and GM-CSF is possible, exceptable for IL-12/IL-18 (missing IFN-gamma synthesis). The purpose of the following study was to examine the genesis of immunodepression in vivo concerning patients after postoperative stress.

Design: The study group included 22 patients after cardiac surgery in an observation period of 4 days. Patients were divided in two groups: “patients with suspicion of infection or confirmed infection” (11) and “patients without infection” (11). Both soluble (IL-10, TGF- β , PCT) and cellular indicators (HLA-DR-CD14, *ex-vivo* LPS-induced TNF-alpha secretion) were measured. We assessed, whether IFN-gamma, IL-12/IL-18 or GM-CSF are able to reverse the decreased TNF-alpha secretion. Additionally the immunodepressive capacity of patient sera was tested on healthy cells.

Results: As expected all patients featured a postoperative immunodepression, pointed out by significantly decreased monocytic HLA-DR-expression and *ex-vivo* TNF-alpha secretion. The plasma levels of IL-10 were significantly elevated in comparison to the control group (17). Significantly reduced *ex-vivo* TNF-alpha secretion at first postoperative day was countermanded by IL-12/IL-18 and GM-CSF. The incubation of patient plasma with healthy PBMCs caused no attenuated secretion of TNF-alpha after stimulation by LPS.

Conclusion: In consequence of perioperative stress, a short term immunodepression is adjusted, combined by a possible reversal with IFN-gamma, IL-12/IL-18 or GM-CSF, pointing out a normal T-lymphocyte function (IFN-gamma production after IL-12/IL-18) and a missing activation of TGF- β in vivo. By contrast, studies conducted in septic patients with immunoparalysis showed mostly an absent monocyte reversal by IL-12/IL-18, which indicates a pronounced dysfunction. The missing immunodepressive activity of patient sera at 1st postoperative day underlines the temporary character of immunodepression in postoperative patients.

Inhaltsverzeichnis

1	<i>Einleitung</i>	11
1.1	Das chirurgische Trauma und das Immunsystem	11
1.2	SIRS – CARS – Immundepression – Immunparalyse	12
1.3	LPS – Desensibilisierung und IL-10/TGF-β – Desensibilisierung als experimentelles Modell für die Immundepression/-paralyse	17
1.4	Das chirurgische Trauma am Beispiel einer elektiven kardiochirurgischen Intervention	20
1.4.1	Herzlungenmaschine	20
1.4.2	Herzlungenmaschine als Initiator eines SIRS	21
1.5	Zielstellung	23
2	<i>Material und Methoden</i>	24
2.1	Arbeitsmaterialien	24
2.2	Experimentelle Voruntersuchungen	26
2.3	Kardiochirurgische Studie	28
2.3.1	Studiendesign	28
2.3.2	Laborbestimmungen und klinische Datenerhebung	29
2.3.3	Durchflusszytometrische Bestimmung von Oberflächenproteinen	29
2.3.3.1	Grundlagen	29
2.3.3.2	HLA-DR- und Immunstatusmessung	30
2.3.4	Bestimmung humoraler Marker mittels ELISA	31
2.3.4.1	Bestimmung von IL – 10	32
2.3.4.2	Bestimmung der monozytären ex-vivo TNF- α Sekretionskapazität	32
2.3.4.3	Bestimmung von Procalcitonin (PCT)	32
2.3.5	Experimentelle Versuchsanordnung	32
2.3.5.1	Monozyten-Desensibilisierung durch IL-10 und TGF- β	33
2.3.5.2	Untersuchung der Reaktivierbarkeit deaktivierter Monozyten	34
2.3.6	Statistische Auswertung	35

3	Ergebnisse	36
3.1	Klinische und paraklinische Einteilung der Patienten	36
3.2	Datentabellen	38
3.3	Untersuchung zellulärer und löslicher Marker	46
3.4	Monozyten – Deaktivierung durch Interleukin 10 und TGF- β	52
3.4.1	Experimentelle Vorversuche	52
3.4.2	Untersuchung der Patientensera auf immunsuppressive Faktoren nach kardiochirurgischer Intervention	54
3.5	Aufhebung der Monozyten-Deaktivierung durch immunstimulierende Substanzen	58
3.5.1	Revertierung mit IFN- γ , IL-12/IL-18 und GM-CSF	58
3.5.2	ROC - Analysen	63
4	Diskussion	67
4.1	Transiente Immundepression nach kardiochirurgischem Eingriff	68
4.2	Charakterisierung der Immunkompetenz	69
4.3	Monozyten - Desensibilisierung durch IL-10 und TGF- β	70
4.4	Revertierung mit IFN- γ , GM-CSF und IL-12/IL-18	74
4.5	Immunmarker für die Prädiktion von postoperativen Infektionen und Revertierungsverhalten	80
4.6	Einschränkende Aspekte der Auswertungen	80
4.7	Therapeutischer Ausblick	81
5	Anhang	83
5.1	Literaturverzeichnis	83
5.2	Erklärung an Eides Statt	91
5.3	Lebenslauf	92
5.4	Publikationsverzeichnis	93

5.5	Posterpräsentation	93
5.6	Danksagung	94

Abkürzungsverzeichnis

AB/cell	Antibody/cell
ACCP	America College of Chest Physicians
ACTH	Adreno-corticotropes Hormon
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
ARDS	Acute respiratory distress syndrome
ATS	American Thoracic Society
AUC	Area under the Curve
CARS	Compensatory Antiinflammatory Response Syndrome
CD	Cluster of differentiation (<i>Nomenklatur für Oberflächenmoleküle</i>)
CO	Kohlenmonoxid
CO ₂	Kohlendioxid
CRP	C-reaktives Protein
DHZB	Deutsches Herzzentrum Berlin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
FKS	Fetales Kälberserum
FSC	Foward Scatter
G-CSF	Granulozyten koloniestimulierender Faktor
GM-CSF	Granulozyten-Monzyten koloniestimulierender Faktor
HLA	Human Leukozyte Antigen
HLM	Herzlungenmaschine
HMG1	High motility group 1 protein
HWZ	Halbwertszeit
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IFN- γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
IL-1 β -RA	Interleukin 1 beta – Rezeptorantagonist
LPB	LPS - bindendes Protein

LPS	Lipopolysaccharid
MARS	Mixed Antagonistic Response Syndrome
MIF	Macrophage migration inhibitory factor
MODS	Multiple Organ Dysfunction Syndrome
MOF	Multiple Organ Failure
Mono	Monozyten
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MRSA	Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus
N	Anzahl der Stichproben
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NNR	Nebennierenrinde
NO	Stickoxid
O ₂	Sauerstoff
PAF	Plättchen aktivierender Faktor
PBMC	Peripher Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphat buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCT	Procalcitonin
PE	Phycocerythrin
PerCP	Peridin-Chlorophyll
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PMT	Photomultiplier
POST-OP	postoperativer Tag
prä-op	präoperativ
RA	Rezeptor – Antagonist
ROC	Receiver Operating Characteristics
RPM	Centrifuge rotor speed
SCCM	Society of Critical Care Medicine
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
SSC	Side Scatter
sTNF- α -R	Soluble TNF- α Receptor
TGF- β	Transforming Growth Factor beta
TLR	Toll- like Receptor
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha

1 Einleitung

1.1 Das chirurgische Trauma und das Immunsystem

In den vergangenen Jahren haben experimentelle und klinische Studien im Bereich der immunologischen Forschung zunehmend zu der Erkenntnis geführt, dass im Rahmen eines chirurgischen Eingriffes sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem aktiviert und neben einer akuten Immunreaktion auch eine systemische Immundepression ausgelöst werden kann. Dieser Zustand der verminderten Immunabwehr offeriert eine erhöhte Empfänglichkeit für postoperative Infektionen und die Entstehung septischer Komplikationen.

In erster Linie induziert ein chirurgisches Trauma eine lokal begrenzte physiologische Entzündungsantwort, um Gewebeschäden einzugrenzen, infektiöse Organismen zu töten und einen Reparatursprozess einzuleiten. Gelingt es dem Erreger oder seinen Produkten hämatogen zu streuen, wird aus der physiologischen Entzündungsreaktion schnell ein häufig fatal verlaufender septischer Prozess [1]. Erreicht der Entzündungszustand systemisches Niveau, spricht man vom „Systemic Inflammatory Response Syndrome“ (SIRS) [2, 3], initiiert durch die massive Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine wie Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α), Interleukin-6, Interleukin-1 β , Interleukin-8, Interferon gamma (INF- γ) und Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF). Dieses Stadium der Entzündung besitzt Krankheitswert und Potential zur Entwicklung irreversibler Organschäden [4]. Nach dem Gesetz der physiologischen Homöostase kann eine anti-entzündliche Gegenregulation des Organismus – „Compensatory Antiinflammatory Response Syndrome“ (CARS) - eine überschießende Entzündungsreaktion verhindern [4]. Dabei wird eine Reihe antiinflammatorisch wirksamer Substanzen produziert, darunter Interleukin-10 (IL-10), Transforming Growth Factor β (TGF- β), Interleukin-1 β -Rezeptorantagonist (IL-1 β -RA), löslicher TNF- α - Rezeptor (sTNF- α -R), Prostaglandine, Katecholamine und Glukokortikoide [5, 6]. Eine ausgewogene Balance zwischen pro- und anti-inflammatorischen Faktoren scheint für die erfolgreiche Bekämpfung einer systemischen Infektion von großer Bedeutung zu sein. Im Rahmen der anti-entzündlichen Phase kann sich jedoch ein Zustand der Immundepression bis hin zur sogenannten Immunparalyse ausbilden [7]. Hierbei handelt es sich um eine Alteration des Immunsystems, welche durch eine Suppression spezifischer und unspezifischer Abwehrmechanismen gekennzeichnet ist. So zeigen Monozyten eine stark verminderte Expressi-

on des Humanen-Leukozyten-Antigens Rezeptors (HLA-DR), ein Protein, das für die Präsentation exogener Peptid-Antigene im Rahmen der erworbenen, spezifischen Immunität wortlich ist. Ebenso weisen die Monozyten ein reduziertes Potenzial zur Produktion von TNF- α nach *ex-vivo* LPS-Stimulation auf [8, 9], eine Fähigkeit, die man für bedeutend hinsichtlich adäquater Immunreaktion auf pathogene Stimuli im Rahmen der angeborenen, unspezifischen Immunreaktion hält. Die Immunparalyse ist mit einer entsprechend schlechten Prognose und hoher Letalität durch persistierende oder opportunistische Infektionen assoziiert. Eine immunmodulatorische Therapie sollte sowohl die Möglichkeit einer Überreaktion als auch einer Erschöpfung des immunologischen Systems weitestgehend minimieren. Das simultane Auftreten beider Zustände erfordert eine jeweilig entsprechende Behandlung im Sinne einer anti-inflammatorischen oder immunstimulierenden Therapie.

1.2 SIRS – CARS – Immundepression – Immunparalyse

Im Jahre 1991 führte das American College of Chest Physicians (ACCP) und die Society of Critical Care Medicine (SCCM) im Rahmen einer Konsensuskonferenz den Versuch einer Definitionsklärung oben aufgeführter Termini durch, um ein „conceptual and a practical framework to define the systemic inflammatory response to infection“ zu erarbeiten [2, 3]. Hierbei stellt SIRS eine Zusammenfassung ähnlicher pathophysiologischer Zustände dar, bei denen klinische und paraklinische Zeichen einer mindestens 2 Tage anhaltenden allgemeinen Entzündungsreaktion vorliegen [2]. Zwei oder mehr der folgenden Kriterien müssen erfüllt sein, um die Zuordnung zum „Systemic Inflammatory Response Syndrome“ gewährleisten zu können:

- Hyperthermie ($> 38^{\circ}\text{C}$) oder Hypothermie ($< 36^{\circ}\text{C}$)
- Tachykardie ($>90/\text{min}$)
- Tachypnoe ($>20/\text{min}$ oder $\text{pCO}_2 < 32\text{mmHg}$)
- Leukozytose ($>12000/:\text{l}$) oder Leukopenie ($<4000/:\text{l}$)

SIRS kann sowohl steril, infolge massiver Gewebeschädigung wie nach Verbrennung, Trauma, ausgedehnten Operationen oder Gewebehypoxie (u.a. Herzinsuffizienz, Operation unter

Verwendung einer Herzlungenmaschine) [10] , als auch infektiös verursacht sein. Insbesondere das infektiös bedingte SIRS, welches als Sepsis [6] bezeichnet wird, hat eine hohe Mortalität, vor allem wenn es mit septischem Schock und Multiorganversagen assoziiert ist [11] . Bei einer Sepsis kommt es durch Bestandteile aus der Zellwand gram-negativer Bakterien (Lipopolysaccharide – Endotoxin) wie auch gram-positiver Bakterien (Peptidglykane und Lipo-teichonsäure) oder durch Pilzstrukturen zur Aktivierung der Immunzellen und Endothelzellen [11] . Eine „Severe Sepsis“ wird definiert durch das Auftreten von multiplem Organversagen, kombiniert mit Hypoperfusion und Hypotension. Ein septischer Schock hingegen ist charakterisiert durch eine konsequente arterielle Hypotension infolge Sepsis trotz adäquater Flüssigkeitssubstitution. Das Endstadium besteht in einem „Multiple Organ Dysfunction Syndrome“ (MODS) mit Funktionseinschränkung mehrerer Organsysteme wie Lunge, Niere, Herzkreislaufsystem, Immunsystem, Gerinnung, ZNS und Nebenniere. Die genannten Syndrome (SIRS, Sepsis, Severe Sepsis, MODS) werden als Krankheitszustände zunehmender Schwere verstanden. Der anhaltende Entzündungsreiz durch den Erreger führt zu einer vermehrten Produktion pro-inflammatorischer Zytokine und induziert somit systemische Entzündungszeichen: in der Leber die Produktion von Akut-Phase-Proteinen (IL-6), im ZNS Fieber und die Induktion einer neuroendokrinen Stressreaktion sowie Veränderungen im Appetitzentrum (IL-6, IL-1), im Knochenmark die schnellere Ausreifung und Ausschüttung von unspezifischen Abwehrzellen (Granulozyten und Monozyten), im Fett-, Leber- und Muskelgewebe die Bereitstellung von Energie durch Umschalten der Stoffwechselprozesse von einer anabolen zu einer katabolen Bilanz. Das C-reaktive Protein (CRP) als klassisches Akut-Phase-Protein besitzt opsonierende und Komplement-aktivierende Eigenschaften, das LPS-bindende Protein (LBP) – ein weiteres Akut-Phase Protein- bindet das Endotoxin gramnegativer Bakterien. Die Anhebung der Körpertemperatur vermindert die Replikationsfähigkeit mikrobieller Erreger, induziert zelluläre Schutzproteine und katalysiert für die Abwehr relevante Reaktionen (Optimum der zellulären Reaktivität bei 38-38,5°C). Der Organismus gerät in einen hyperinflammatorischen Zustand mit systemischer Aktivierung des Komplementsystems, systemischer Vasodilatation, Steigerung der Gefäßpermeabilität und Aktivierung des Gerinnungssystems, woraus Volumenmangel, Verbrauchskoagulopathie und Multiorganversagen resultieren. Auch werden die Immunzellen in ihrer Abwehrleistung durch die systemische Präsenz von chemotaktischen Faktoren (IL-8) geschwächt. Seit langem anerkannte und angewandte Marker für die Erfassung einer systemischen Entzündungsreaktion sind die Akut-

Phase-Proteine, von denen CRP einer der klassischen Parameter ist. Ein neuerer Vertreter ist das LBP, das offenbar auf lokale Infektionen sehr viel sensitiver und spezifischer als CRP reagiert [12] . Weitere klassische Entzündungsparameter sind Veränderungen des weißen Blutbildes mit Granulozytose infolge G-CSF Sekretion und Lymphopenie aufgrund stressbedingter Apoptose [13] . Semiautomatisierte ELISA-Verfahren erlauben die kurzfristige und standardisierte Messung der Plasmaspiegel von TNF- α , IL-6 und IL-8. Procalcitonin (PCT), ein Vorläuferpeptid des Calcitonins, ist in erster Linie ein Diagnoseparameter für bakterielle und mykotische Infektionen mit systemisch-entzündlicher Reaktion des Organismus (Sepsis, septischer Schock). Lokal begrenzte bakterielle oder organbezogene Infektionen (z. B. Pneumonie) und gekapselte Abszesse induzieren daher in der Regel nur sehr wenig PCT. Geringe Mengen von PCT können auch infektionsunabhängig nach größeren Operationen, nach Polytraumen oder bei Neugeborenen in den ersten Tagen nach der Geburt produziert werden. Die Induktion von PCT steht im engen Zusammenhang mit dem Ausmaß und der Art der systemischen Infektion. Nach Abklingen der akuten Inflammation sinken die PCT - Werte rasch ab (HWZ 24h). PCT kann daher zur Erfolgskontrolle einer operativen Herdsanierung herangezogen werden oder wie im Falle einer Sepsis deren Schwere und die Krankheitsaktivität widerspiegeln. Der frühen Phase der Hyperinflammation folgt der bereits oben beschriebene gegenregulatorische Mechanismus, der seine Beschreibung in der Vorstellung des „Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome“ findet.

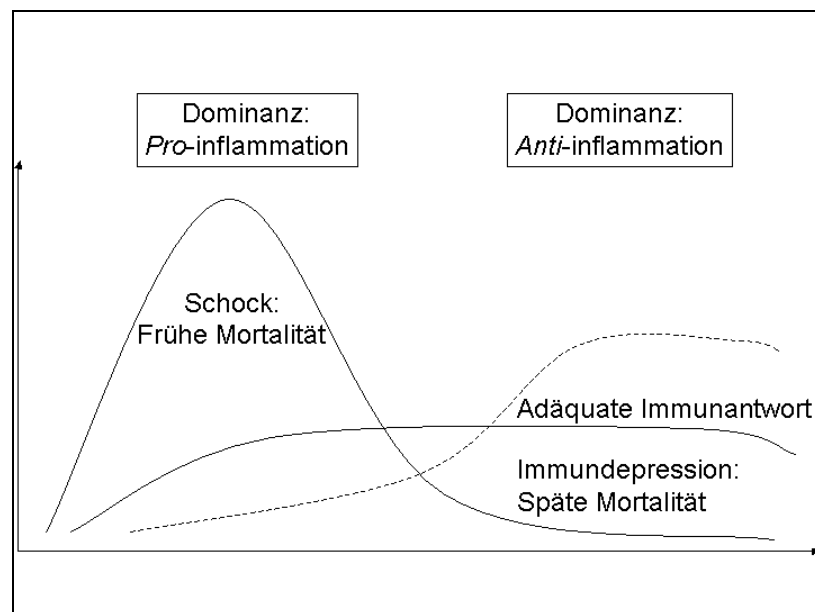


Abbildung 1: Ablauf von Hyperinflammation und Immundepression [14]

Dabei wirken Entzündungsprodukte wie TNF- α und Prostaglandine selbst auf die produzierenden Makrophagen zurück, indem z. B. IL-10, als Vertreter der anti-inflammatorischen Zytokine, ausgeschüttet wird. Dieses wiederum induziert die Bildung weiterer inhibitorischer Zytokine wie IL-1RA und sTNF- α -Rezeptoren und minimiert eine weitere Antigenpräsentation. TGF- β erhöht ebenfalls die Produktion anti-inflammatorischer Zytokine und verhindert die Leukozytenadhäsion. Neben SIRS kann auch ein massiver apoptotischer Gewebeuntergang sowie eine generelle Stressreaktion (z. B. nach Schädel-Hirntrauma, Herzinfarkt, Schlaganfall) ohne vorangehende Entzündungsreaktion zu einer systemischen Anti-Entzündung führen. Mehrere Studien zeigten einen engen Zusammenhang zwischen dem zentralen Nervensystem, der Nebennierenrinde und der Inflammation. IL-1, IL-6, TNF- α , MIF (Makrophagenmigration - Inhibitionsfaktor) und die direkte Stimulation des Hypothalamus erzeugt eine erhöhte Ausschüttung von ACTH aus der Hypophyse mit nachfolgender vermehrter Produktion von Glukokortikoiden und eine konsekutive Hemmung der Bildung pro-inflammatorischer Zytokine [15, 16] . Mit dem „cholinergic anti-inflammatory pathway“, ausgelöst durch eine Vagus-Stimulation und der nachfolgenden Ausschüttung von Acetylcholin zeigte sich ein weiterer Weg zur Verminderung der immunologischen Response. Sowohl Katecholamine als auch Glukokortikoide verfügen zusätzlich über eine direkte Induktion immunsuppressiver Mediatoren wie IL-10. Außerhalb seines pro-inflammatorischen Charakters weist IL-6 auch eine Funktion als immunregulatorisches Zytokin auf. Es verstärkt die Synthese von Glukokortikoiden, stimuliert Makrophagen zur Produktion von IL-1-RA, sTNF- α -R und Prostaglandin E₂ (PGE₂), einer der stärksten endogenen Immunsuppressoren. PGE₂ inhibiert die T-Zell-Mitogenese, die IL-2 Produktion und die IL-2-Rezeptor Expression, um schließlich ebenfalls die IL-10 Ausschüttung zu initiieren (Abbildung 2).

Resultierend aus den beschriebenen Mechanismen zeichnet sich die durch das chirurgische Trauma induzierte Immundepression durch erniedrigte Plasmaspiegel von TNF- α , IL-1, IL-12 und IFN- γ aus, wohingegen IL-10, IL-1RA und IL-6 signifikant erhöht sind [17, 18] .

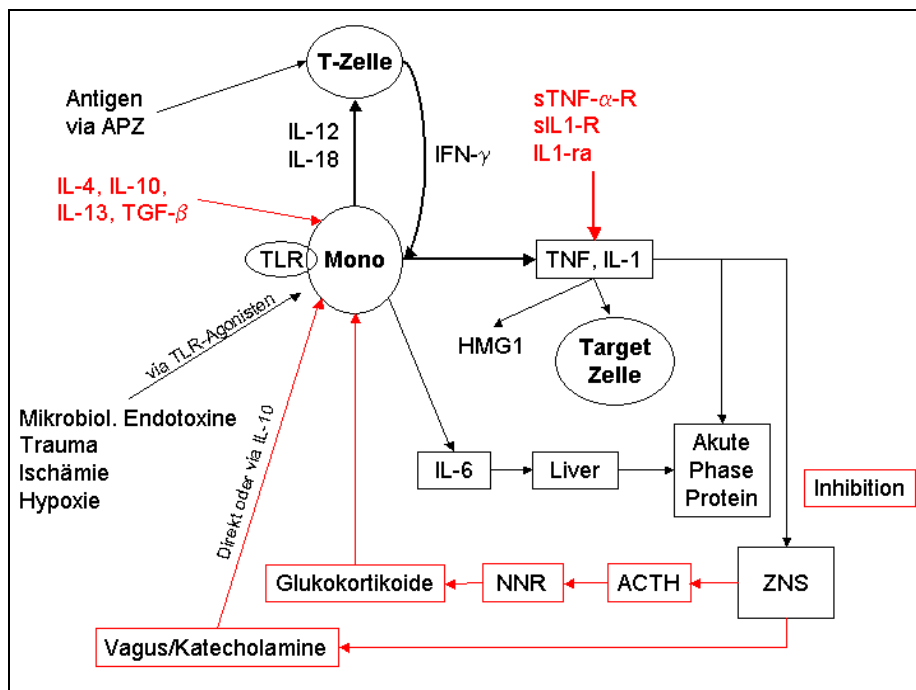


Abbildung 2: Zytokinkaskade bei Entzündung und Sepsis [17]

Neben der inadäquaten Funktionsweise von T-Zellen und Makrophagen ist auch deren Interaktion im Falle der Immunsuppression gestört. Immuninkompetenz wird unter diesen Bedingungen hauptsächlich durch die Deaktivierung der Monozyten verursacht. Dies verdeutlicht sich in der stark reduzierten HLA-Rezeptor Expression, in der Reduktion der Antigenpräsentierenden Zellkapazität und in dem Verlust dieser Zellen, ausreichend TNF- α nach Stimulation mit LPS in-vitro zu produzieren. Bei starker und langdauernder Monozytendeaktivierung nach Sepsis, umfangreichen chirurgischen Eingriffen und Stressreaktionen mit folgender Immuninsuffizienz ist das Phänomen der Immunparalyse charakterisiert. Umfangreiche Studien zeigten weiterhin, dass auch eine Modulation innerhalb der T-Helferzellen (Th-Zellen) im Rahmen der Immundepression stattfindet. Th-Zellen werden in zwei funktionale Untergruppen, Th1 und Th2, entsprechend individueller Parameter wie Zytokinsekretion unterteilt. Th1-Zellen unterstützen die inflammatorische Antwort mittels Ausschüttung von IL-2, IL-12 und IFN- γ , hingegen sich Th2-Zellen durch die Produktion anti-inflammatorischer Zytokine wie IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 auszeichnen. Hensler et al. [19] demonstrierten, dass während des postoperativen Verlaufes nach einem elektiven chirurgischen Eingriff die Zytokinsekretion einer mit T-Zellen angereicherten und mit CD3, CD28 stimulierten Fraktion von „Peripheral Blood Mononuclear Cells“ (PBMC) für IL-2,

IFN- γ und TNF- α reduziert war. Dies entspricht einer Verlagerung des Th1/Th2 – Verhältnisses zu Gunsten der Th2 – Antwort. Bestätigt wurde dies durch eine weitere Studie, die zeigte, dass durch Minimierung des chirurgischen Traumas (Laparotomie versus Laparoskopie) eine adäquate Th1/Th2 – Antwort und eine ausgeglichene Balance zwischen pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen aufrecht erhalten werden konnte [20] .

1.3 LPS – Desensibilisierung und IL-10/TGF- β – Desensibilisierung als experimentelles Modell für die Immundepression/-paralyse

Unter der Vorstellung, dass bei der Entstehung einer Immunparalyse im Rahmen einer bakteriellen Sepsis die spezielle Situation der wiederholten oder persistierenden Erregerexposition eine Rolle spielt, haben sich verschiedene Untersucher des in-vitro-Modells der LPS-Desensibilisierung zur näheren Charakterisierung der beteiligten Pathomechanismen bedient [21, 22, 23] . Es beschreibt den Umstand, dass Monozyten, inkubiert mit einer niedrigen Dosis von LPS, eine verminderte Kapazität zur Produktion von TNF- α nach Restimulation mit einer zweiten höheren Dosis von LPS aufweisen. Zusätzlich ist die Produktion von IFN- γ durch T- und NK-Zellen reduziert. LPS interagiert auf der Oberfläche von Monozyten mit dem Toll-Like-Rezeptor 4 [12] . Über diesen wird eine intrazelluläre Signalkaskade ausgelöst, die schließlich in der Produktion pro- und anti-inflammatorischer Moleküle mündet. Der genaue Mechanismus der Monozyten-Deaktivierung ist nicht bekannt. Die Vielzahl der Forschungsergebnisse legt jedoch ein Zusammenwirken mehrerer Mechanismen nahe, darunter die Herunterregulation von TLR, die Blockade intrazellulärer Signalkaskaden, die Blockade der Transkription pro-inflammatorischer Zytokine und den Einfluss anti-inflammatorischer Zytokine. Randow et al. [21] konnten zeigen, dass auch die anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF- β direkt einen der LPS-Desensibilisierung ähnlichen Zustand induzieren. Dabei wurden nur durch die kombinierte Primärstimulation mit beiden Zytokinen vergleichbare supprimierte TNF- α - Werte nach sekundärer LPS-Stimulation erreicht wie durch LPS-Primärstimulation. Neutralisation von TGF- β durch TGF- β Antikörper in die Primärkultur führte nur zur einer geringen Erhöhung der TNF- α Synthese in der Sekundärkultur nach erneuter LPS-Stimulation verglichen mit desensibilisierten Kontrollzellen. Hingegen zeigte die Blockung von IL-10 durch den entsprechenden monoklonalen Antikörper eine wesentlich

höhere Effektivität und führte zu einer vierfach gesteigerten Sekretion von TNF- α [24] . Um jedoch die vollständige Aufhebung der LPS vermittelten LPS-Toleranz zu erreichen, wurde in den genannten Studien der Einsatz beider Antikörper benötigt. Der Zustand der Monozyten-Deaktivierung, unabhängig, ob mittels LPS- oder IL-10/TGF- β - Präinkubation induziert, ist durch die exogene Zufuhr von IFN- γ reversibel. Eine Übertragbarkeit dieser in in-vitro erzielten Ergebnisse konnte in verschiedenen Arbeiten gezeigt werden. Bundschuh et al. [25] demonstrierten die Aufhebbarkeit der LPS-Toleranz in Mäusen durch die exogene Gabe von IFN- γ . Ebenso konnte die verminderte *ex-vivo* TNF- α - Konzentration bei immunparalytischen Patienten und ihr klinisches Outcome durch IFN- γ verbessert werden [26] . Resultierend aus diesen Ergebnissen spielt IFN- γ , hauptsächlich von T- und NK-Zellen produziert, eine Schlüsselrolle im Regulationsmechanismus zwischen T- Zellen und Monozyten [22] . Hohe Plasmaspiegel zeigen sich nur unter pathologischen Zuständen wie Trauma, Infektion und Autoimmunerkrankungen. Es reguliert u.a. die antigen-spezifische Immunantwort, indem es sowohl in Antigen-präsentierende als auch in die Antigen-erkennende Mechanismen eingreift und versetzt Makrophagen und Endothelzellen in einen aktivierten Zustand. Nach LPS-Stimulation produzieren Monozyten eine Reihe IFN- γ - induzierende Zytokine, u.a. IL-12, der stärkste Induktor für die Sekretion von IFN- γ [26, 27] . Überraschenderweise gelang durch IL-12 nur die Aufhebung der LPS-induzierten Desensibilisierung, wohingegen die IL-10/TGF- β -Desensibilisierung wenigstens zur partiellen Reaktivierung einen weiteren Cofaktor benötigt. Hierbei handelt es sich um das IL-18, neben IL-12 der wichtigste endogene Stimulator für die IFN- γ Produktion durch NK- und T-Zellen und mit gleicher Herkunft (Makrophagen, Endothelzellen) wie das synergistisch wirkende IL-12 [28, 29, 30] . Aus diesen Beobachtungen heraus resultierten die Erkenntnisse, dass die anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF- β auf unterschiedliche Art und Weise fungieren. IL-10 beeinflusst weitestgehend die T-Zell-Antwort durch suppressive Effekte direkt auf den Monozyten und inhibiert dadurch die Ausschüttung von IL-12. Im Unterschied dazu unterbindet TGF- β die Ausschüttung von IFN- γ durch seine direkte Modulation an T- und NK-Zellen mit daraus resultierender Unfähigkeit, die durch TGF- β -induzierte Desensibilisierung durch die kombinierte Gabe von IL-12 und IL-18 aufzuheben [22] (Abbildung 3). Auf der anderen Seite ist IL-10 nicht alleine befähigt, einen immunparalytischen Zustand auszulösen. So konnte bei der Behandlung von psoriatischen Patienten mit IL-10 nur eine temporäre Immundepression ver-

zeichnet werden, welches auf die Involvierung weiterer suppressiver Faktoren in der Pathogenese der Immunparalyse hinweist [31] .

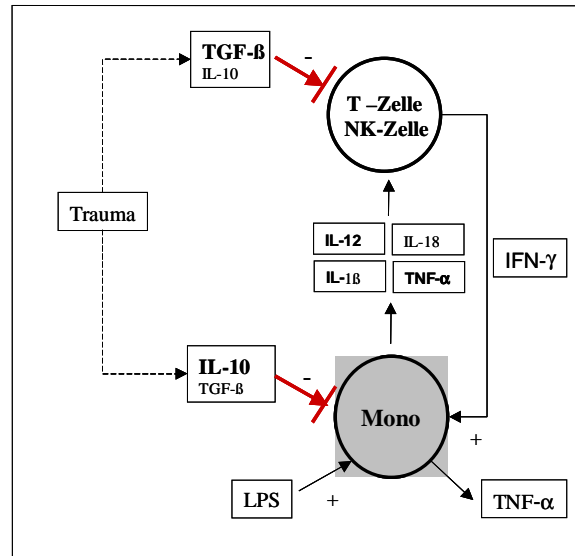


Abbildung 3: Schematische Zusammenfassung der IL-10/TGF-β Interaktionen [22]

Das therapeutische Ziel im Falle der Immunparalyse definiert sich durch die Wiederherstellung der verlorenen Immunkompetenz. Neben dem bereits beschriebenen Einsatz von IFN- γ , IL-12 und IL-18 zeichnete sich mit GM-CSF ein weiterer nutzbarer Immunstimulator ab [32, 33] . Der Wirkungsradius von GM-CSF, produziert von T-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen, Endothelzellen, Fibroblasten und glatten Muskelzellen, ist vielfältig. Dem Namen folgend stimuliert er die Reifung von Progenitorzellen zu Neutrophilen, Eosinophilen und Monozyten, beteiligt sich direkt an der Ausbildung der Megakaryozyten, minimiert die Apoptosis von Neutrophilen mit folglich längerer Halbwertszeit, reguliert die Expression von Zelladhäsionsmolekülen wie Beta-Integrine und CD11b/CD18 herauf und induziert eine erhöhte Genexpression und Ausschüttung von IL-1, TNF- α und IL-6 mit resultierender Aktivierung von Monozyten/Makrophagen. Physiologisch ist GM-CSF nicht detektierbar in der Blutzirkulation einer gesunden Person, hingegen es bei Infektion, Fieber und Neutropenie nachgewiesen werden kann. Verschiedene Arbeiten zeigten, dass auch GM-CSF die LPS-induzierte Zytokinausschüttung potenzieren, in-vitro demonstriert an Knochenmarkzellen von Mäusen, in-vivo direkt an Mäusen [25] , wie auch die LPS-induzierte Desensibilisierung in-vitro [34] aufheben kann.

Zusammenfassend bestätigen die geschilderten Resultate ein zweiphasiges Therapiekonzept hinsichtlich immunparalytischer Patienten. So gilt es, in der frühen hyperinflammatorischen Phase anti-inflammatorische Therapiestrategien (z. B. anti-TNF mAK) zu verfolgen, während in der späten Phase der verminderten Monozyten Antwort immunstimulierende Ansätze (IFN- γ , GM-CSF, anti-IL-10 mAK) eine Durchbrechung dieses Zustandes induzieren können [35]. Welches in-vitro Modell am geeignetsten die immunologischen Abläufe im Falle der Immundepression nach kardiochirurgischen Eingriffen widerspiegelt, soll in der nachfolgenden Arbeit näher untersucht werden. Nach einer initialen Deaktivierung der Monozytenantwort, erholen sich die immunologischen Funktionen in den meisten Fällen nach kurzer Zeit wieder. Diese frühe Herunterregulation des Immunsystems kann jedoch seine biologische Signifikanz in der Vermeidung von Überreaktionen auf Verletzung und Infektion haben.

1.4 Das chirurgische Trauma am Beispiel einer elektiven kardiochirurgischen Intervention

1.4.1 Herzlungenmaschine

Mit Einführung der Herzlungenmaschine (HLM) in den frühen fünfziger Jahren begann die moderne Ära der Herzchirurgie. Obwohl sich der Einsatz der HLM für eine Vielzahl der Operationen am offenen Herzen als unentbehrlich erwies, musste man sich jedoch der Erkenntnis stellen, dass ihre Verwendung mit einer unerwünschten systemischen Immunreaktion verbunden ist [36, 37, 38].

Funktionsprinzip der Herzlungenmaschine

Die Herzlungenmaschine, apparativer Ersatz von Herz und Lunge, ermöglicht eine künstliche Ventilation und Perfusion. Hauptkomponenten der HLM sind die Blutpumpe mit wahlweiser pulsatiler oder kontinuierlicher Funktionsweise, der Oxygenator, der mittels einer semi-permeablen Membran eine O₂-Aufnahme bei gleichzeitiger CO₂-Abgabe ermöglicht, der Wärmetauscher für das rasche Kühlen und Erwärmen des Perfusates und der Sauger, um das oxygenierte Blut der physiologischen Zirkulation zurückzuführen. Mittels Katheter im rechten Atrium oder in der oberen und unteren Hohlvene wird das venöse Blut zur HLM geleitet, wo es den Wärmeaustauscher und den Oxygenator passiert, um durch einen weiteren in der Aorta ascendens platzierten Katheter dem Blutkreislauf wieder zugeführt zu werden. Optimale Re-

sultate eines herzchirurgischen Eingriffes fordern neben den chirurgischen Fähigkeiten eine minimale Schädigung des myokardialen Zellverbandes und die Erhaltung der physiologischen Zellfunktion während der Verwendung der HLM. Zur Vermeidung der kardialen Ischämie haben sich zwei Schutzmaßnahmen bewährt: zum einen der Einsatz der systemischen und lokalen kardialen Hypothermie (10-15°C), zum anderen die Perfusion der Koronararterien mit einer kaliumreichen Lösung über einen selektiv eingebrachten Katheter. Die damit erreichte elektromechanische Entkopplung versetzt das Herz in einen kardioplegischen Zustand. Ersteres reduziert den basalen Sauerstoffverbrauch, während letzteres den mit elektrischer und mechanischer Aktivität verbundenen Energiekonsum aufhebt.

1.4.2 Herzlungenmaschine als Initiator eines SIRS

Das „post pump - systemic Inflammatory Response Syndrome“ wird durch eine Reihe von Prozessen wie Aortenklemmzeit, kardioplegische Technik, allogene Bluttransfusionen oder operatives Trauma beeinflusst. Im Falle der Herzlungenmaschine zeichnet sich ein dreifaktorielles Konzept ab: 1. der Kontakt des Patientenblutes mit unphysiologischen Oberflächen entsprechend dem Apparataufbau der HLM, 2. die ebenfalls durch die Funktionsweise der HLM hervorgerufene Entwicklung eines Ischämie-Reperfusionsschadens infolge der Umstellung der extrakorporalen auf die physiologische Zirkulation und 3. die Präsenz von Endotoxinen durch fragliche Translokation aus der Darmmukosa. Die Translokation wird durch die ischämische Darmwand infolge einer verminderten Blutversorgung des Splanchnikusgebietes erleichtert [39]. Die aufgeführten Prozesse induzieren eine komplexe Immunantwort, einschließlich Komplement- und Leukozytenaktivierung mit entsprechender Expression von Adhäsionsmolekülen wie P-Selectin und ICAM-1. Mittels aktivierter Endothelzellen erfolgt zusätzlich eine erhöhte Produktion des Vasorelaxans NO, induziert durch die „inducible Nitric Oxide Synthase“. Ebenfalls werden Arachidonsäurederivate (PGE₂), Plättchen-aktivierender Faktor, der Vasokonstriktor Endothelin sowie reaktive O₂-Radikale durch neutrophile Granulozyten vermehrt freigesetzt. Aufgrund dieser ausgelösten Kaskade können sich im postoperativen Verlauf respiratorische und renale Dysfunktionen, Blutungsstörungen, neurologische Komplikationen bis hin zum multiplen Organversagen (MOF) entwickeln. Die Morbidität nach HLM ist mit 1-2% aller Fälle als gering einzuschätzen, so erhöht sich jedoch die Mortalität nach Entwicklung einer akuten pulmonalen Erkran-

kung (ARDS) postoperativ auf 50-70% [10]. Äquivalent zu den Ausführungen über die systemische Inflammation werden bei HLM-Anwendung erhöhte Serumspiegel von TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-6 und IL-8 gemessen, assoziiert mit klinischen Manifestationen wie Fieber, reduzierter Bewußtseinslage, hämodynamischer Instabilität und myokardialer Depression. Dieses Phänomen korreliert eng mit der Dauer der kardialen Ischämiezeit. Auswirkungen auf das zelluläre Immunsystem schlagen sich in einem Anstieg der CD8-positiven und einer Verminderung der CD4-positiven T-Zellen, vor allem der TH1-Zellen, nieder. Eine physiologische Gegenregulation erfolgt wie im bereits beschriebenen Modell der Immundepression durch die Ausschüttung der anti-inflammatorischen Zytokine IL-10, sTNF- α -R und IL-1-RA. Innerhalb der letzten fünfzig Jahre hielten aufgrund des verbesserten pathophysiologischen Verständnisses zahlreiche Veränderungen im Hinblick auf die Reduktion der postoperativen Morbidität ihren Einzug. Die Entwicklung höherwertiger biokompatibler Materialien, der Einsatz von Membranoxygenatoren und die Verwendung von zentrifugalen Pumpen anstelle von Rollenpumpen resultierten in einer geringeren operativen Hämolyse, einer reduzierten Blutgerinnungsaktivierung und einer Verminderung der zirkulierenden Embolie. Auch konnten die Oberflächenmodifikation der HLM-Schläuche mit Heparin und der Einsatz pharmakologischer Substanzen wie Aprotinin und Glukokortikoide die systemische immunologische Antwort minimieren. Viele der angesprochenen therapeutischen Strategien erreichten eine Senkung des mit der HLM verbundenen Risikos, doch noch sind komplikationsträchtige postoperative Verläufe insbesondere bei Patienten mit stark reduzierter linksventrikulärer Ejektionsfraktion, eingeschränkter Nieren- und Lungenfunktion sowie bei Patienten höheren Alters zu verzeichnen. Während das Risiko für postoperative Infektionen insgesamt mit einigen Prozent eher gering ist, steigt es mit zunehmender Anzahl an Risikofaktoren und Alter auf zweistellige Prozentwerte.

1.5 Zielstellung

Das chirurgische Trauma, der technisch bedingte Mechanismus der Organ – Ischämie und Reperfusion und die Endotoxin-Translokation aus dem Darm bewirken eine komplexe Immunantwort. In Vorarbeiten konnten wir zeigen, dass LPS, IL – 10 und TGF – β in vitro eine Hemmung monozytärer Funktionen induzieren können, die dem Bild der Immundepression von ICU Patienten ähnelt. Sind auch Lymphozyten betroffen (IFN - γ Synthese), wie dies in Gegenwart von TGF - β der Fall ist, so lässt sich die Immundepression nur mit IFN - γ und GM – CSF, nicht jedoch mit IL – 12/- 18 (fehlende IFN - γ Synthese) revertieren.

Erstes Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der zellulären und im Plasma befindlichen immunologischen Faktoren (Immunstatus, *ex-vivo* TNF - α , IL – 10, PCT, HLA – DR), welche im Rahmen eines elektiven kardiochirurgischen Eingriffes primär eine transiente Immundepression verursachen. Hierbei wird eine prolongierte Immundepression, definierte an o.g. Parametern, bei Patienten mit bestätigter Infektion bzw. Verdacht auf eine Infektion im Vergleich zu Patienten ohne Anhalt für einen Infekt angenommen.

Zweitens wird untersucht, ob eine definierte nachgewiesene Immundepression durch die in – vitro Gabe von IL - 10 und TGF - β - Antikörper entsprechend des LPS – Desensibilisierung – Modells frühzeitig wieder aufgehoben werden kann. Hierbei wird der Hypothese gefolgt, dass IL – 10 und TGF - β zentrale Immunsuppressoren im Rahmen einer postoperativen Immundepression darstellen.

Drittens wird der Hypothese nachgegangen, ob eine Revertierung mit IFN - γ , IL – 12/-18 oder GM – CSF in diesem Patientenkollektiv möglich ist und hierbei eine Differenzierung zwischen beiden Patientengruppierungen vorgenommen. Fraglich ist hierbei insbesondere die Revertierung mit IL – 12/-18, welche eine intakte Lymphozytenfunktion voraussetzt.

2 Material und Methoden

2.1 Arbeitsmaterialien

Geräte

- FACS-Calibur – Durchflußzytometer	[Becton Dickinson; San Jose. USA]
- Immulite	[DPC Biermann; Bad Nauheim, D]
- ELISA – Mess – System	[Anthos Labtec Instruments; Salzburg, A]
- Megafuge 1.0	[Heraeus Sepatech; Osterode, D]
- Kühlzentrifuge CR422	[Jouan; Saint Nazaire, F]
- Mikrozentrifuge	[Eppendorf; Hamburg, D]
- Brutschrank EG 110 R	[Jouan ; Saint Nazaire, F]
- Absaugpumpe Laboport	[Neuberger; Freiburg, D]
- Pipetten	[Eppendorf; Hamburg, D]
- Mikroskop	[Olympus CK2/Japan]
- Sterilbox	[Herasafe; Heraeus Instruments, D]
- Neubauer – Zählkammer	[Marienfeld; D]

Verbrauchsmaterialien

- Venenpunktionsbesteck	[Abbott, Irland]
- Multiadapter für S-Monovette	[Sarstedt; Nürnberg, D]
- Softasept N	[Braun, D]
- S-Monovette 4,5 ml Lithium – Heparin	[Sarstedt; Nürnberg, D]
- S-Monovette 2,7 ml EDTA	[Sarstedt; Nürnberg, D]
- Falcon Zellkulturplatten 48 well	[Becton Dickinson; New York, USA]
- Nunc-Immuno 96 Microwell MaxiSorp	[Nunc Gmbh; Wiesbaden, D]
- Cellstar TC-Tube	[Greiner Bio-one; D]
- Falcon Blue Max 50ml	[Becton Dickinson; San Jose, USA]
- Reaktionsgefäße	[Eppendorf; Hamburg, D]
- Polypropylene Tube	[ICN; Niederlande]
- Pipettenspitzen	[Sarstedt; Nürnberg, D]
- SafeSeal Tips Premium	[Biozym; Oldendorf, D]
- Pipettierhilfe Pipettus standard	[Hirschmann; Eberstadt, D]

- Transferpipette

[Sarstedt; Nürnberg, D]

Biochemikalien / Reagenzien

- PBS Dulbecco´s

[Hausapotheke Charite; Berlin, D]

- Ficoll – Pâque Plus

[Amersham Pharmacia; USA]

- Aqua-dest

[Braun; Melsungen, D]

- RPMI 1640 Zell-Kultur-Medium

[Biochrom KG; Berlin, D]

- Fetal Bovine Serum

[Biochrom KG; Berlin, D]

- L – Glutamin

[Biochrom KG; Berlin, D]

- Penicillin – Streptomycin

[Invitrogen Corporation; UK]

- Essigsäure 100%

[Merck; Darmstadt, D]

- Trypanblau 1%

[Dr. K. Hollborn + Söhne; Leipzig, D]

- Anti – HLA-DR PE/ Anti-CD14 PerCP-Cy 5.5. Antikörper

[Becton Dickinson; San Jose, USA]

- Anti – CD 2 Fitc

[Becton Dickinson; San Jose, USA]

- Anti – CD 16 Fitc

[Immunotech; USA]

- Anti – CD 3 PE

[Immunotech; USA]

- Anti – CD 19 PE

[Becton Dickinson; San Jose, USA]

- Anti – CD 45 PerCP

[Becton Dickinson; San Jose, USA]

- Anti – CD 14 APC

[Becton Dickinson; San Jose, USA]

FACS – Puffer, Zusammensetzung

- PBS

[Biochrom KG; Berlin, D]

- 2% FKS (bezogen auf Volumen)

[Serva; Heidelberg, D]

- 0,1% NaN₃ (bezogen auf Masse)

FACS Lysing Solution

[Becton – Dickinson; San Jose, USA]

- Lipopolysaccharid (E.coli)

[Sigma; Heidelberg, D]

- Rekombinantes Humanes IL – 12

[RnD Systems; Heidelberg, D]

- Rekombinantes Humanes IL – 18

[Medical&Biological Laboratories; Japan]

- Rekombinantes Humanes GM – CSF

[RnD Systems; Heidelberg, D]

- Imukin, Interferon gamma – 1b

[Boehringer Ingelheim; D]

- Monoklonaler IL – 10 Antikörper

[hergestellt von Robert Sabbat; Charité, D]

- Monoklonaler TGF – β1,2,3 Antikörper

[RnD Systems; Heidelberg, D]

- Mause IgG1 Isotyp Kontrolle

[RnD Systems; Heidelberg, D]

- Rekombinantes humanes TGF-β1

[RnD Systems; Heidelberg, D]

- Rekombinantes humanes IL-10

[RnD Systems; Heidelberg, D]

Test-/ Reaktions-Kits

- CaliBRITE™ – Beads	[Becton Dickinson; San Jose, USA]
- QuantiBRITE™ PE	[Becton Dickinson; San Jose, USA]
- LUMITEST PCT Assay	[BRAHMS Diagnostica GmbH; Berlin, D]
- ex vivo LPS – Stimulation Kit	[Milenia Biotec GmbH ; Bad Nauheim, D]
- DuoSet ELISA TNF - γ	[RnD; Heidelberg, D]
- Human IL – 10 Ultrasentive	[BioSource; California, USA]
- TGF – β 1 EASIA	[BioSource; California, USA]

Software

- FACS Comp™	[Becton Dickinson; San Jose, USA]
- CellQuest™	[Becton Dickinson; San Jose, USA]
- QuantiCALCTM	[Becton Dickinson; San Jose, USA]
- MS Office 2000, SPSS 11.0, SAS Version 8	

Die im Folgenden aufgeführten Untersuchungen wurden mit dem zuvor aufgelisteten Materialien durchgeführt.

2.2 Experimentelle Voruntersuchungen

Für alle Experimente dieses Versuchsteils wurde Blut von freiwilligen gesunden Spendern (Laborpersonal) verwendet. Das Blut wurde mittels des oben genannten Blutabnahmesystems in Lithium Heparin Monovetten abgenommen und die PBMCs nach dem Dichtegradienten-Verfahren durch Ficoll-Paque-Überschichtung gewonnen. Dabei werden 14ml CELLSTAR – Röhrchen mit jeweils 3ml FICOLL-PAQUE beschickt, während das gewonnene Vollblut mit sterilem PBS (Phosphate buffered saline) 1:1 verdünnt wird. Das FICOLL – PAQUE wird danach vorsichtig mit 8ml verdünntem Vollblut überschichtet und für 20min bei 1000g und Raumtemperatur zentrifugiert, wobei an der verwendeten Zentrifuge eine Beschleunigung von 5 – 6 und eine Bremswirkung von 0 eingestellt ist. Nach der Zentrifugation stellt sich die Zellansammlung als weißer Ring dar, welcher mit Hilfe einer Pasteur – Pipette geerntet und in

ein FALCON BLUE MAX – Röhrchen überführt werden kann. Im Sediment befinden sich die separierten Erythrozyten und Granulozyten. Die Röhrchen werden bis zur 50ml – Marke mit sterilem PBS aufgefüllt und in einem dreischriftigen Waschgang gereinigt. Im ersten und zweiten Waschgang werden die Proben bei 210g für jeweils 10min bei Raumtemperatur (Bremse 5) zentrifugiert, anschließend dekantiert, die Zellen vorsichtig resuspendiert und mit sterilem PBS bis zur 50ml – Marke erneut aufgefüllt. Auch der letzte Waschschrift folgt demselben Zentrifugationsmuster, jedoch werden die Zellen anschließend in komplettes Medium aufgenommen und die Zellzahl mittels Trypan-Blau- und Essigsäure-Färbung in der Neubauer-Zählkammer auf 2 Mio/ml eingestellt. Alle Zellkulturansätze wurden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Messung von TNF- α aus den Kulturüberständen erfolgte unter Verwendung des TNF- α - ELISA .

Ziel dieser experimentellen Voruntersuchungen war es, aufbauend auf bereits bekannten Ergebnissen die entsprechenden Antikörperkonzentrationen von IL-10- und TGF- β Antikörper zu ermitteln, um sie im ersten Versuchteil der kardiochirurgischen Studie anwenden zu können. Für die Desensibilisierung wurden die PBMC mit jeweils 0,5 ng/ml LPS, 10 ng/ml IL-10 und 10 ng/ml TGF- β wie oben beschrieben für 24h kultiviert. Danach wurden die Überstände abgenommen. Die in den Wells verbliebenen Zellen wurden 3x mal mit 900:1 kompletten Medium gewaschen und jeweils mit 100g für fünf Minuten bei 4°C herunter zentrifugiert. Nach dem letzten Waschen erfolgte eine erneute Stimulation mit 100ng/ml LPS und eine weitere Inkubationsphase von 24h. Aus den Kulturüberständen wurde jeweils TNF- α bestimmt. Weitere Ansätze ergaben sich durch eine gestufte Konzentrationszunahme der jeweiligen Antikörper. Im Einzelnen bedeutet dies eine Zugabe von 10ng/ml, 100ng/ml, 1 μ g/ml, 10 μ g/ml und 20 μ g/ml Antikörper IL-10. Im Falle von TGF- β Antikörper handelte es sich um eine Konzentrationsabstufung von 15 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml und 100ng/ml. Nachdem die entsprechenden Konzentrationen ermittelt wurden, ergab sich ein zusätzlicher Ansatz durch die Kombination beider Antikörper bzw. durch die Einführung einer Negativkontrolle in Form der IgG₁-Isotyp-Kontrolle. Tabelle 1 soll noch einmal die Versuchsansätze zusammenfassen:

Tabelle 1: Stimulationsansätze zur Konzentrationsbestimmung von AK-IL-10/AK-TGF- β

0 – 24h		24 – 48h
-	PBMC – gesunder Spender	100ng/ml LPS
LPS 0,5ng/ml	PBMC – gesunder Spender	100ng/ml LPS
IL-10 10ng/ml	PBMC – gesunder Spender	100ng/ml LPS
TGF- β 10ng/ml	PBMC – gesunder Spender	100ng/ml LPS
AK – IL-10 10ng/ml, 100ng/ml, 1 μ g/ml, 10 μ g/ml, 20 μ g/ml	PBMC – gesunder Spender	100ng/ml LPS
AK – TGF- β 100ng/ml, 1 μ g/ml, 10 μ g/ml, 15 μ g/ml	PBMC – gesunder Spender	100ng/ml LPS
IL-10 10ng/ml + AK – IL-10 jeweilige Konzentrationen	PBMC – gesunder Spender	100ng/ml LPS
TGF- β 10ng/ml + AK – TGF- β jeweilige Konzentrationen	PBMC – gesunder Spender	100ng/ml LPS
LPS 0,5ng/ml + IL-10 10ng/ml und/oder TGF- β 10ng/ml	PBMC – gesunder Spender	100ng/ml LPS
LPS 0,5ng/ml + AK – IL-10 + IL-10 10ng/ml	PBMC – gesunder Spender	100ng/ml LPS
LPS 0,5ng/ml + AK – TGF- β + TGF- β 10ng/ml	PBMC – gesunder Spender	100ng/ml LPS
LPS 0,5ng/ml + AK – IL-10 + AK – TGF- β	PBMC – gesunder Spender	100ng/ml LPS

2.3 Kardiochirurgische Studie

2.3.1 Studiendesign

Von April 2002 bis August 2002 wurden 33 Patienten aus dem Deutschen Herzzentrum, welche sich einer Bypass- oder Klappenersatzoperation unterzogen haben, in die Studie für einen Beobachtungszeitraum von maximal sechs postoperativen Tagen eingeschlossen. Einschlusskriterium für die Studie war ein elektiver operativer Eingriff unter Verwendung der Herzlungenmaschine mit postoperativer Verlegung auf die Intensivstation. Eines der folgenden Kriterien sollte ebenfalls positiv beantwortet werden können: Mindestalter von 70 Jahren, Mindestbypasszeit von 120 min, der notwendige Einsatz von Katecholaminen innerhalb der ersten 24h postoperativ oder eine präoperative Ejektionsfraktion von weniger als 25 %. Das Ziel bestand darin, eine Patientenpopulation mit erhöhtem Risiko für postoperative Komplikationen einzugrenzen. Hingegen ausgeschlossen aus der Studie wurden Transplantatempfänger, Patienten mit bekannter HIV-Infektion, postoperativer Kortikosteroidtherapie für mehr als 24h, mit präoperativ notwendiger Dialyse und Patienten mit bereits präoperativ bestehendem Verdacht einer Infektion. Die ursprüngliche Anzahl von 33 Patienten reduzierte sich auf 30 Patienten, da eine Mindestbeobachtungszeit von 3 postoperativen Tagen vorliegen sollte. Die

Studie wurde von der lokalen Ethik-Kommission genehmigt, auch liegen Einverständniserklärungen für alle Patienten in schriftlicher Form vor. Des Weiteren wurde neben einem innerkollektiven Vergleich auch ein direkter Vergleich mit einer gesunden Probandenpopulation angestrebt. Hierzu erfolgte eine freiwillige Blutentnahme von 17 gesunden Spendern, deren Altersstreuung von 23 – 82 Jahren reicht.

2.3.2 Laborbestimmungen und klinische Datenerhebung

Die Blutentnahme (2,7ml EDTA und 4,5ml Lithium-Heparin) erfolgte vom 1. bis zum 6. postoperativen Tag mittels Monovettensystem. Die EDTA – Blutentnahme wurde zur Bestimmung der Oberflächenexpression von HLA-DR und eines Vollblut-Immunistatus mit Hilfe der Durchflußzytometrie genutzt, weiterhin diente sie zur Messung von IL-10- und PCT-Plasmaspiegeln sowie zur Bestimmung der *ex-vivo* TNF- α - Sekretionskapazität. Die Heparin-Blutentnahmen fanden Anwendung in den später beschriebenen experimentellen Versuchsanordnungen.

Zusätzlich wurden täglich klinische und paraklinische Daten der Patienten bezüglich des Auftretens von Infektionen erhoben. Hierzu zählen u.a. die Antibiotikavergabe, mikrobiologische Befunde, Röntgen – Thoraces, vom DHZB bestimmte CRP – Werte, die Erhebung der SIRS – Kriterien und medikamentöse und therapeutische Auffälligkeiten. Auf dieser Grundlage erfolgte die klinische Einteilung der Patienten.

2.3.3 Durchflußzytometrische Bestimmung von Oberflächenproteinen

2.3.3.1 Grundlagen

Mit Hilfe der Durchflußzytometrie ist es möglich, Zellen oder andere Partikel auf der Grundlage von Streulicht und Fluoreszenzeigenschaften zu untersuchen (FACSTM – Methode). Sie quantifiziert im Vergleich zu Mikroskopie simultan mehrere optische Eigenschaften kompletter Zellen mit hoher Durchsatzrate. Dabei wird die Suspension, in der die Zellen einzeln vorliegen müssen, durch eine Röhre geleitet und mittels einer Mantelflüssigkeit derartig beschleunigt, dass eine laminare, nicht – turbulente Strömung entsteht. Die Zellen gelangen einzeln nacheinander zum Messpunkt, auf den ein Argon-Laserstrahl fokussiert ist. Die resul-

tierende Streuung des Lichtes ergibt sich aus den physikalischen Eigenschaften der Zelle. Ihre relative Größe wird durch das Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter – FSC), ihre relative Granularität oder ihre interne Komplexität durch das 90° - Seitwärtsstreulicht (Side Scatter – SSC) bestimmt. Mit diesen Angaben ist es bereits möglich, die einzelnen leukozytären Populationen – Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten - zu unterscheiden. Eine weitere Differenzierung in Subpopulationen wird durch das Anfärben mit fluoreszenzmarkierten spezifischen Antikörpern gegen spezielle Oberflächenmoleküle ermöglicht. Durch das Laserlicht werden Fluoreszenzmoleküle (FITC, PE, PerCP und APC) angeregt und emittieren ihrerseits Licht eines bestimmten Wellenlängenbereiches, welches durch zusätzliche Photomultiplier detektiert wird. Da sich Lichtemissionen eines Fluoreszenzfarbstoffes über einen größeren Wellenlängenbereich erstrecken und sich die Spektren einiger Farbstoffe überlappen, können Messwertverfälschungen entstehen. Um dieses zu vermeiden, wird mittels spezieller Software der Vorgang der „Kompensation“ durchgeführt.

Mit der Auswertungssoftware ist es möglich, die Zellpopulationen in verschiedenen Parameterkombinationen darzustellen und auch die durchschnittliche Menge an markierten Antikörpern pro Zelle zu quantifizieren, indem mit Hilfe synthetischer Partikel (Beads), die eine bestimmte Anzahl an Farbstoffmolekülen auf ihrer Oberfläche tragen, die gemessenen Signale auf einer Standardkurve verifiziert werden.

2.3.3.2 HLA-DR- und Immunstatusmessung

Zu jeweils 50:1 auf Eis gelagertes EDTA – Blut wurden je 20:1 Antikörperlösung gegeben. Im Falle der HLA-DR – Bestimmung enthielt die Suspension PerCP-CY5.5-konjugierte Antikörper gegen das vor allem auf Monozyten exprimierte Molekül CD14. Durch den Cyanofarbstoff CY5.5 wird die Spezifität des Antikörpers für Monozyten zusätzlich erhöht. Zur Charakterisierung der Lymphozytenpopulation dienten CD2/CD16 FITC, CD3/CD19 PE, CD45 PerCP und CD14 APC als Parameterkombination zur Messung (Anti-CD3 für T-Zellen, Anti-CD16 für NK-Zellen, Anti-CD19 für B-Zellen, Anti-CD14 für Monozyten, Anti-CD45 für alle hämatopoetischen Zellen). Es folgte eine 30minütige Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur, gefolgt vom Zentrifugieren bei 200g und dem Absaugen des Überstandes. Anschließend wurden die Erythrozyten mit 0,5ml FACS – Lysing Solution für 30min bei

Raumtemperatur im Dunkeln lysiert, danach wiederum mit 200g zentrifugiert und der Überstand entfernt. Abschließend wurde die Proben mit 1ml FACS – Puffer gewaschen.

Die Messung der Ansätze erfolgte mit einem FACS – Calibur™ Durchflusszytometer und der zum Gerät gehörigen CellQuest™ – Software. An jedem Tag wurde zu Beginn der Messung eine Geräte – Kalibrierung mit dem Programm FACSComp™ und dem „CaliBRITE™ – Beads – Kit“ durchgeführt.

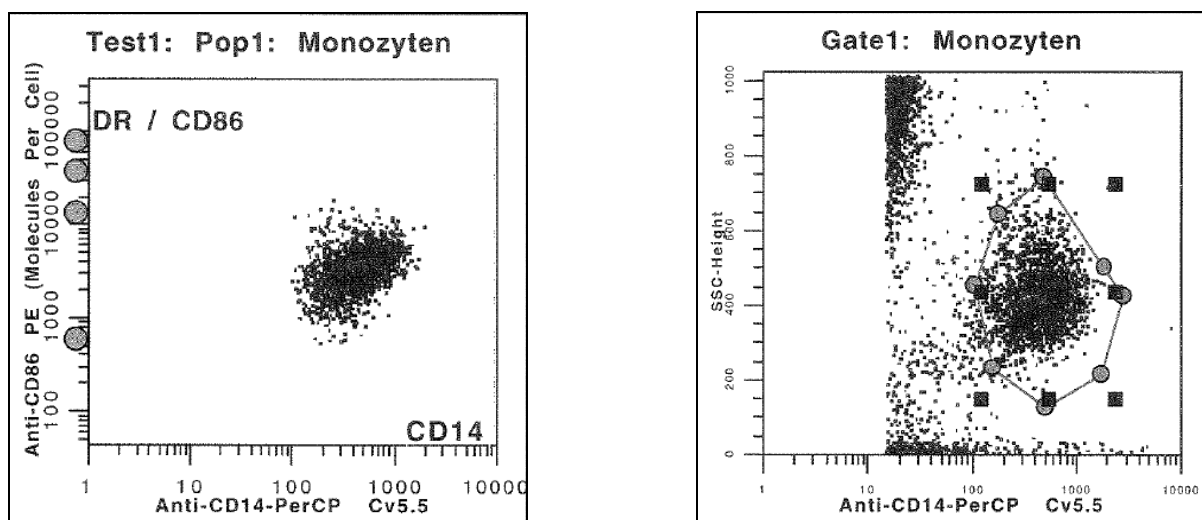


Abbildung 4: Abbildung einer HLA-DR- und Immunstatusmessung mittels FACS

2.3.4 Bestimmung humoraler Marker mittels ELISA

Der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) stellt ein immunologisches Nachweisverfahren dar, welches auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert, dar. In der klassischen „Sandwich-Technik“ binden Coating- und Detektionsantikörper an das gesuchte Antigen, wobei ein Farbumschlag durch die ebenfalls am Detektionsantikörper gebundene Merrettichperoxidase und einem zugegebenen Farbsubstrat hervorgerufen wird. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Photometers der Firma Anthos labtec Instruments.

2.3.4.1 Bestimmung von IL – 10

Anwendung fand das Prinzip der „Sandwich-Technik“ bei der Bestimmung von IL – 10 am 1. und letzten postoperativen Tag (Verlassen des DHZ; max. 6 postoperative Tage) mittels des Human IL – 10 Ultrasensitive Immunoassay Kits.

2.3.4.2 Bestimmung der monozytären ex-vivo TNF- α Sekretionskapazität

Der „ex-vivo Stimulation Kit“ der Firma Milenia diente zur Erfassung der TNF- α - Sekretionskapazität. Es wurden nur die im Stimulations-Kit enthaltenen, pyrogenfreien und einzeln verpackten Materialien (Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße) verwendet, um zusätzliche Stimuli für die TNF- α Bildung möglichst auszuschließen. 50:1 heparinisiertes, bei Raumtemperatur gelagertes Blut wurde mit 500:1 LPS – Lösung (500pg/ml) versetzt und zur Stimulation der Monozyten für 4 Stunden bei 37° inkubiert. Der gewonnene Überstand nach Zentrifugation mit 1000g wurde bei –70° gelagert. Die definitive Messung erfolgte mit Hilfe des „DuoSet ELISA – TNF- α “.

2.3.4.3 Bestimmung von Procalcitonin (PCT)

Die PCT – Messungen fanden vom 1. bis maximal 6. postoperativen Tag statt. PCT wurde mit einem Kit der Firma Brahms Diagnostica und dem Luminometer „Beri-Lux Analyzer 250“ der Firma Behring gemäß der Arbeitsanleitung des Herstellers gemessen.

2.3.5 Experimentelle Versuchsanordnung

Der experimentelle Versuchsaufbau setzt sich aus zwei Versuchsanteilen zusammen.

Der erste Versuchsaufbau basiert auf der Inkubation von PBMCs gesunder Spender mit den Sera, welche postoperativ von den kardiochirurgischen Patienten gewonnen wurden. Primär sollte der fraglichen suppressiven Wirkung der verwendeten Seren nachgegangen werden und bei Nachweis dieser anhand verminderter TNF- α - Produktion nach erfolgter LPS-Stimulation eine Aufhebung mittels Zugabe von AK-IL-10 und/oder AK-TGF- β erreicht werden.

Im zweiten Versuchsabschnitt hingegen erfolgte die Präinkubation entsprechend der Präparationsanleitung von Patientenblut gewonnener PBMCs mit bekannten Immunstimulanzen wie INF- γ , IL-12/-18 und GM-CSF.

Für alle Experimente dieses Versuchteils wurde Patienten mittels Lithium-Heparin Monovette 4,5 ml Blut vom 1. bis maximal 6. postoperativen Tag entnommen bzw. erfolgte bei den Probanden eine einmalige Blutentnahme.

2.3.5.1 Monozyten-Desensibilisierung durch IL-10 und TGF- β

In Anlehnung an das Standard-Protokoll für die Herstellung mononukleärer Zellen (PBMC), basierend auf dem Konzept des Dichtegradienten-Verfahrens durch Ficoll-Paque Überschichtung, konnte die Herstellung der PBMCs von Blut gesunder Spender (Laborpersonal) vorgenommen werden. Die Zellen wurden in komplettes Medium (VLE RPMI Medium mit 10% Fetale Bovine Serum, 1% Penicillin-Streptomycin und 1% Glutamin) aufgenommen und die Zellzahl mittels Trypan-Blau-Färbung und Essigsäure in der Neubauer-Zählkammer so eingestellt, dass in der Kultur jeweils eine Konzentration von 1Mio. Zellen/ml vorlag. Alle Zellkulturansätze wurden bei 37° und 5% CO₂ inkubiert. Die Messung von TNF- α aus den Kulturüberständen erfolgte mit dem TNF- α ELISA Kit von RnD.

Für die Versuche zur Aufhebbarkeit von LPS-, IL-10- und TGF- β -induzierter Monozytendesensibilisierung erfolgte die Applikation von Plasmen kardiochirurgisch versorgter Patienten zu den im Vorfeld gewonnener PBMCs. 1ml heparinisiertes Blut diente der Gewinnung von Plasma, wobei eine Trennung der korpuskulären von der flüssigen Phase durch Zentrifugation bei 1000 RPM für 10min erreicht wurde. Ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt des Überstandes bei 3000 RPM für 5min fand anschließend statt, um restliche Zellüberstände zu entfernen. In der Primärkultur wurden die PBMCs mit dem gewonnenen Plasma, sowohl von Patienten als auch von gesunden Kontrollprobanden, versetzt. Insgesamt ergaben sich 6 verschiedene Ansätze durch die einzelne Zugabe von jeweils 10 μ g/ml IL-10 Antikörper, 10 μ g/ml TGF- β Antikörper, 10 μ g/ml Maus – IgG₁ Isotyp Kontrolle und der kombinierten Gabe von IL-10- und TGF- β Antikörper. Die einzelnen Ansätze der Primärkultur sind in der folgenden Tabelle noch einmal übersichtlich dargestellt.

Tabelle 2: Zusammenfassung der Versuchsansätze

1	PBMC – gesunder Spender	-	-
2	PBMC – gesunder Spender	Patientenplasma	-
3	PBMC – gesunder Spender	Patientenplasma	10µg/ml IL-10 AK
4	PBMC – gesunder Spender	Patientenplasma	10µg/ml TGF-β AK
5	PBMC – gesunder Spender	Patientenplasma	10µg/ml Maus – IgG ₁ Isotyp Kontrolle
6	PBMC – gesunder Spender	Patientenplasma	10µg/ml IL-10- + 10µg/ml TGF-β AK

Identische Ansätze wurden ebenfalls für die Kontrollpopulation durchgeführt, wobei das Patientenplasma durch das der gesunden Probanden ersetzt wurde. Nach einer Inkubation der Primärkultur für 24h wurden die Kulturüberstände durch einen anschließenden Zentrifugationsschritt (100g, 5min, 4°) gefahrlos gewonnen. Es folgte eine dreimaliger Waschgang, bei dem die in den Wells verbliebenen Zellen jeweils mit 400:1 Medium gewaschen, mit 100g für 5 Minuten bei 4° wieder herunter zentrifugiert und die Überstände entfernt wurden. Nach dem letzten Waschschritt wurden alle Ansätze mit 100 ng/ml LPS versetzt und für weitere 24h inkubiert. Der anschließende Zentrifugationsschritt mit 100g für 5min bei 4°C ermöglichte die saubere Abnahme der Zellüberstände, welche mittel eines TNF-α - ELISA ausgewertet wurden.

2.3.5.2 Untersuchung der Reaktivierbarkeit deaktivierter Monozyten

Für die Versuche der Reaktivierbarkeit deaktivierter Monozyten wurde hinsichtlich Methoden und Rekrutierung der Patienten und Kontrollprobanden wie im ersten Versuchsteil verfahren. Es erfolgte eine erneute Präparation von mononukleären Zellen (PBMC) aus 3,5ml des gewonnenen Patientenblutes mit einer Einstellung von 0,5Mio. Zellen/ml nach dem bereits oben beschriebenen Protokoll. Alle Zellkulturansätze wurden bei 37° und 5% CO₂ inkubiert. Es wurden jeweils 250:1 PBMC in einer 48well Platte mit drei unterschiedlichen Stimulationsansätzen versehen, wobei ein Gesamtvolumen von 500:1 pro Well mittels Auffüllen durch komplettes Medium erreicht wurde. Im 1. Ansatz, der zur Darstellung der Negativkontrolle diente, erfolgte die Kultivierung der PBMC nur mit Medium. In den folgenden Ansätzen wurden die PBMCs in der Primärkultur jeweils mit 20ng/ml INF_γ, 50 ng/ml GM-CSF und der additiven Gabe von 50ng/ml IL-18 und 20ng/ml IL-12 versetzt. Alle Zellkulturansätze wurden für die nächsten 24h unter den oben beschriebenen Bedingungen inkubiert. Die weitere Versuchs-

ordnung deckt sich hinsichtlich Waschvorgang mit den entsprechenden Zentrifugationsschritten des ersten Versuchsaufbaus. Nach dem letzten Waschgang wurden die Zellen mit 100ng/ml LPS stimuliert und erneut für weitere 24h inkubiert. Aus den entstandenen Zellüberständen gelangte die Messung von TNF- α mittels ELISA.

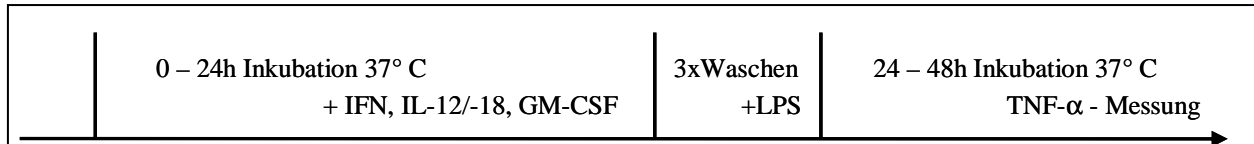


Abbildung 5: Darstellung des zeitlichen Ablaufs

2.3.6 Statistische Auswertung

Da sich bei der Datenanalyse keine Normalverteilung darstellte, diente als Grundlage zur statistischen Auswertung das sogenannte BRUNNER – Modell, ein nicht-parametrisches Modell, in dem das Versuchsergebnis zu einem bestimmten Zeitpunkt von vornherein relativ zu allen anderen Ergebnissen des Versuchs dargestellt wird. Neben der bekannten graphischen Darstellung anhand von Boxplots ermöglicht dieses Analysemodell auch die graphische Darstellung von zeitlichen Verläufen anhand relativer Marginaleffekte. Auf diese Weise erhält man einen Eindruck, wie sich diese relativen Effekte mit der Zeit verändern oder sich zwischen den einzelnen Versuchsgruppen unterscheiden. Ein relativer Effekt $p < 1/2$ bedeutet, dass die Versuchsergebnisse in der Gruppe x zum Zeitpunkt s gegenüber den Versuchsergebnissen in allen anderen Gruppen zu allen anderen Zeitpunkten zu kleineren Werten tendieren. In gleicher Weise bedeutet in einem nicht-parametrischen Marginalmodell $p > 1/2$ eine Tendenz zu größeren Werten [40] .

3 Ergebnisse

3.1 Klinische und paraklinische Einteilung der Patienten

Von den 33 eingeschlossenen Studienpatienten wurden nach Beendigung der Studie diejenigen mit einer Studien-Evaluationszeit von weniger als 3 Tagen (N=3) ausgeschlossen, da dieses als zu kurzer Beobachtungszeitraum eingestuft wurde. Eine weitere Differenzierung des Patientenklientel ergab sich durch die Gruppierung in Patienten mit Verdacht auf eine Infektion bzw. bestätigter Infektion und Patienten mit keinem Anhalt für eine Infektion. Patienten mit „Verdacht auf Infektion bzw. bestätigter Infektion“ definierten sich durch das Auftreten von mindestens zwei positiven SIRS – Kriterien, die Behandlung mit einem therapeutischen Antibiotikum und mindestens einem der folgenden Kriterien: purulentes Trachealsekret, bronchopulmonare Infiltrationen, diagnostiziert im Röntgenbild, ein kontinuierlicher Anstieg des C-reaktiven Proteins oder der Leukozyten. Ausschlaggebend für die bestätigte Infektion war ein positiver mikrobiologischer Befund mit eindeutigem Keimnachweis. Die Zuordnung zu der Patientengruppe mit „Verdacht auf Infektion“ erfolgte durch das Auftreten von positiven klinischen Infekt- und entsprechenden Laborparametern, jedoch ohne Nachweis eines positiven mikrobiologischen Befundes. Sofern keines der aufgeführten Kriterien zutraf, erfolgte die Zuordnung des Patienten in die Gruppe „Keine Infektion“. Auch hier betrug die perioperative Gabe eines prophylaktischen Antibiotikums nicht mehr als 48h. Aufgrund dieser Einteilung ergab sich ein weiterer Ausschluss von insgesamt 8 Patienten, da hier entsprechend der oben aufgeführten Kriterien keine genaue Zuordnung erfolgen konnte. Die Endzusammensetzung lieferte ein Patientenkollektiv von N= 22, wobei jeweils 11 Patienten in der Gruppe der „Verdacht auf Infektion und bestätigte Infektion“ und in der Gruppe „Keine Infektion“ am 1. postoperativen Tag vertreten waren (Abbildung 6, Tabelle 3-5). Insgesamt wurden die Patienten bis zum 6. postoperativen Tag betreut. Aufgrund der stark reduzierten Patientenzahlen ab dem 4. postoperativen Tag bei verkürzten Liegezeiten, erfolgte die statistische Auswertung nur bis zum 4. postoperativen Tag, um statistisch relevante Stichprobenzahlen aufweisen zu können.

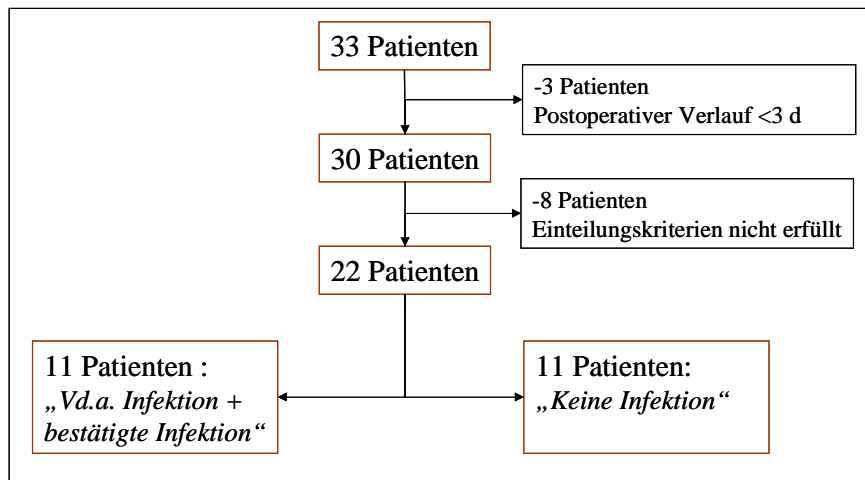


Abbildung 6: Entwicklung Patientenkollektiv

Tabelle 3: Alter, Geschlecht, Beobachtungszeitraum, Verteilung SIRS – Kriterien

	Keine Infektion	Verdacht auf Infektion + (bestätigte Infektion)
N	11	11 (2)
Alter (Range)	74 (60 – 82)	77 (71-87)
Geschlecht m/w	6/5	5/6
Evaluation		
1. postoperativer Tag	11	11
2. postoperativer Tag	11	11
3. postoperativer Tag	11	11
4. postoperativer Tag	8	11
SIRS positiv/negativ Tag 1	2/9	4/7
SIRS positiv/negativ Tag 2	3/8	6/5
SIRS positiv/negativ Tag 3	1/10	7/4
SIRS positiv/negativ Tag 4	1/7	7/4
SIRS positiv/negativ Tag 5	0/4	8/2
SIRS positiv/negativ Tag 6	0/0	4/3

Tabelle 4: Spektrum der mikrobiologischen Befunde innerhalb des Beobachtungszeitraumes

Mikrobiologische Befunde	N-Zahl	Mikroorganismen
Hautabstrich, Frage nach MRSA	1	Staphylococcus aureus
Trachealsekret	2	Citrobacter diversus/koseri, Proteus vulgaris, Klebsiella oxytoca

Tabelle 5: Spektrum der mikrobiologischen Befunde außerhalb des Beobachtungszeitraumes

Mikrobiologische Befunde	N-Zahl	Mikroorganismen
Trachealsekret	4	Proteus vulgaris, Klebsiella oxytoca, Klebsiella pneumonia, Trichosporon asahii, Staphylococcus aureus, Citrobacter diversus, Citrobacter koseri, Pseudomonas aeruginosa
Sputum	2	Escherichia coli, Enterobacter cloacae, Staphylococcus koag. neg.
Sternalabstrich	2	Staphylococcus koag. neg., Candida albicans
Urin	5	Candida albicans, Enterococcus faecalis, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Proteus mirabilis
Blutkultur	2	Staphylococcus aureus, Staphylococcus koag. Neg.
Zentralvenenkatheter	3	Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis, Staphylococcus koag. neg.
Andere Wundabstriche	3	Escherichia coli, Enterococcus faecalis, Staphylococcus aureus, Enterococcus faecium, Trichosporon asahii
Pleurapunktion	1	Aspergillus fumigatus
Hautabstrich	1	Staphylococcus koag. neg., Staphylococcus aureus

3.2 Datentabellen

Die folgenden Tabellen dienen der Darstellung aller erhobenen Messungen im Rahmen dieser Studie. Hierbei erfolgt sowohl eine jeweilige Zuordnung zu den beschriebenen Gruppierungen als auch die Auflistung der Mediane und der 25%- und 75%-Perzentilen. Eingrenzend muss erwähnt werden, dass die ex-vivo TNF- α – Messungen nur eine stark reduzierte Probenzahl aufweisen. Grund hierfür ist die im Nachhinein festgestellte Verunreinigung einer verwendeten Charge. Um jedoch einen Eindruck des immunologischen Verhaltens zu erhalten, ist die Auflistung dieser Daten ebenfalls vorgenommen worden.

Tabelle 6: Mediane sowie 25%- und 75%- Perzentile der gemessenen zellulären und löslichen Faktoren für die Gruppe „Keine Infektion“

	Post-OP 1	Post-OP 2	Post-OP 3	Post-OP 4	Post-OP 5	Post-OP 6
	N=11	N=11	N=11	N=8	N=4	N=0
Immunologische Marker						
HLA-DR (AB/cell)	10457 (6122-12799)	12561 (7420-13860)	13956 (8991-15784)	16245 (14363-18872)	21062 (16564-30736)	
IL-10 (pg/ml)	7 (6-10)					5* (4-8)*
PCT (pg/ml)	301 (205-493)	300 (174-484)	197 (149-251)	172 (80-274)	301 (216-686)	
	N=4	N=4	N=4	N=4	N=3	N=0
ex-vivo – TNF α (pg/ml)	444 (376-587)	350 (254-512)	444 (353-476)	363 (227-453)	541 (329-583)	

* Messwerte am jeweils letzten Tag innerhalb der Studienzeit durchgeführt

Tabelle 7: Mediane sowie 25%- und 75%- Perzentile der gemessenen Immunstaten für die Gruppe „Keine Infektion“

	Post-OP 1	Post-OP 2	Post-OP 3	Post-OP 4	Post-OP 5	Post-OP 6
	N=11	N=11	N=11	N=8	N=4	N=0
Immunstaten						
Leukozyten	10500 (8500-11900)	11700 (8720-13800)	9840 (8300-10700)	8340 (6950-9600)	7110 (6230-7825)	
Lymphozyten (%)	4,8 (3,5-7,4)	6,9 (5,3-8,7)	13,1 (5,6-13,7)	14,4 (10,6-15,7)	12,5 (5,4-16,2)	
Monozyten (%)	7,6 (5,3-9,6)	7,4 (6,0-9,1)	6,7 (6,4-7,8)	7,5 (6,6-8,1)	9,2 (7,8-10,1)	
Granulozyten (%)	89,0 (85,1-90,3)	85,0 (83,4-87,2)	80,2 (78,6-87,9)	78,2 (75,9-82,4)	79,7 (74,6-84,4)	
B-Zellen (% Lymphozyten)	17,0 (8,4-21,4)	18,8 (13,8-22,8)	15,2 (9,9-18,7)	13,6 (6,8-16,6)	14,4 (3,8-21,4)	
T-Zellen (% Lymphozyten)	51,7 (42,1-68,3)	66,8 (57,9-77,2)	67,2 (60,3-74,4)	73,5 (59,1-81,3)	67,0 (58,3-79,4)	
NK-Zellen (% Lymphozyten)	25,7 (19,8-46,5)	13,1 (5,3-20,6)	13,8 (5,7-21,5)	7,2 (4,2-29,6)	10,7 (5,8-36,2)	
CD4 (% T-Zellen)	75,6 (51,6-79,8)	70,9 (62,5-79,8)	74,9 (65,0-82,0)	78,7 (71,2-82,8)	63,6 (59,9-79,7)	
CD8 (% T-Zellen)	20,6 (18,3-41,1)	19,1 (17,8-35,6)	20,6 (14,2-32,4)	16,7 (14,4-26,7)	34,5 (17,8-34,8)	

Tabelle 8: Mediane sowie 25%- und 75%- Perzentile für die beiden Versuchsreihen der Monozytendesensibilisierung (Neutralisation) und der Reaktivierbarkeit von Monozyten (Revertierung) in der Gruppe „Keine Infektion“

		Post-OP 1	Post-OP 2	Post-OP 3	Post-OP 4	Post-OP 5	Post-OP 6
		N=11	N=11	N=11	N=8	N=4	N=0
Neutralisation	24-48h						
	-/LPS (pg/ml)	2030 (1383-3002)	3002 (1160-3592)	2734 (1466-3915)	1640 (1049-3150)	1567,5 (1307-1828)	
Revertierung	24 - 48h						
	- /LPS						
	absolut (pg/ml)	905 (457-1090)	1026 (795-1307)	695 (527-905)	645 (457-695)	513 (308-767)	
	100% IFN/LPS	7,8 (4,0-9,7)	6,7 (4,4-14,5)	10,6 (5,6-12)	7,7 (4,9-15,8)	5,6 (2,5-11,5)	
	24 - 48h						
	IFN/LPS						
	absolut (pg/ml)	13508 (10816-21632)	12771 (6004-24933)	8514 (4699-15536)	10720 (4303-17887)	13719 (4755-16622)	
	100% -/LPS	1293,9 (1033,5-2755,3)	1493,1 (688,1-2287,4)	940,8 (839,2-1792,8)	1308,1 (644,0-2130,1)	1894,6 (939,3-4811,5)	
	IL-12 + IL-18/LPS						
	absolut (pg/ml)	11668 (9864-16622)	10776 (7184-17760)	10816 (5003-16622)	9252 (3524-18674)	14054 (6669-18321)	
100% IFN/LPS	93,0 (78,0-100,0)	84,0 (49,0-131,5)	127,0 (81,8 -152,2)	98,9 (67,0-129,0)	111,0 (101,2-165,8)		
100% -/LPS	1271,8 (1012,5-2518,5)	904,1 (550,4-1963,1)	1358,8 (719,6-2437,7)	929,0 (787,7-2412,4)	1934,9 (1463,3- 5393,3)		
GM-CSF/LPS							
absolut (pg/ml)	6576 (3656-9240)	4398 (2614-8202)	3656 (2614-5468)	2351,9 (2267-5935)	5217 (2764-7753)		
100% IFN/LPS	56,4 (33,0-68,4)	32,2 (21,0-64,0)	45,6 (29,0-62,0)	40,8 (21,0-54,8)	51,1 (35,3-68,3)		
100% -/LPS	781,1 (424,1-1126,3)	350,0 (330,3-569,9)	507,2 (400,0-765,6)	437,5 (291,2-762,9)	965,9 (616,8-1567,1)		

Tabelle 9: Mediane sowie 25%- und 75%- Perzentile der gemessenen zellulären und löslichen Faktoren für die Gruppe „Verdacht auf Infektion und bestätigte Infektion“

	Post-OP 1	Post-OP 2	Post-OP 3	Post-OP 4	Post-OP 5	Post-OP 6
	N=11	N=11	N=11	N=11	N=10	N=7
Immunologische Marker						
HLA-DR (AB/cell)	7873,5 (7441-10353)	8761 (6594-10266)	9138,5 (6202-11215)	13672 (8145-17068)	12742 (7797-18206)	10895 (6121-13860)
IL-10 (pg/ml)	11,6 (9,1-32,9)					7* (4,9-9,6)*
PCT (pg/ml)	583 (228-2725)	280 (159-2024)	267 (161-1859)	381 (226-1229)	490 (265-1199)	582 (116-1595)
<hr/>						
ex-vivo - TNF α (pg/ml)	N=5 273 (156-350)	N=5 359 (238-484)	N=5 329 (226-471)	N=5 359 (210-500)	N=5 392 (277-409)	N=3 300 (116-500)

* Messwerte am jeweils letzten Tag innerhalb der Studienzeit durchgeführt

Tabelle 10: Mediane sowie 25%- und 75%- Perzentile der gemessenen Immunstaten für die Gruppe „Verdacht auf Infektion und bestätigte Infektion“

	Post-OP 1	Post-OP 2	Post-OP 3	Post-OP 4	Post-OP 5	Post-OP 6
	N=11	N=11	N=11	N=11	N=10	N=7
Immunstaten						
Leukozyten	11100 (8800-14100)	13000 (10100-15500)	13600 (10800-16500)	11200 (9520-14800)	11350 (8598-14125)	10300 (9370-12500)
Lymphozyten (%)	5,3 (3,6-7,3)	6,7 (4,8-9,7)	7,8 (3,4-9,3)	7,7 (4,2-10,3)	7,9 (4,1-11,0)	8,6 (5,9-10,7)
Monozyten (%)	8 (6,4-10,1)	7,5 (7,1-11,8)	6,3 (5,4-9,1)	7 (5,4-9,8)	9,1 (6,1-10,7)	9,4 (6,2-15,8)
Granulozyten (%)	86,8 (84,6-89,9)	85,5 (81,7-87,6)	86,8 (83,6-87,6)	83,4 (80,4-88,4)	83,5 (80,0-86,6)	82,7 (78,0-85,5)
B-Zellen (% Lymphozyten)	14,6 (7,0-27,2)	19,9 (8,4-28,1)	19,3 (11,7-26,1)	17,5 (13,3-27,2)	23,4 (18,0-27,7)	20,5 (14,8-22,7)
T-Zellen (% Lymphozyten)	56,2 (40,4-76,6)	67,9 (52,1-79,5)	69,2 (57,0-80,5)	69,2 (56,2-82,6)	64,2 (57,5-72,9)	69,6 (57,8-79,6)
NK-Zellen (% Lymphozyten)	15,6 (4,3-9,5)	4,6 (4,3-9,5)	8,2 (5,5-11,8)	8,6 (3,9-16,4)	7,2 (4,6-20,7)	8,1 (5,4-19,7)
CD4 (% T-Zellen)	78,3 (52,0-81,5)	79,4 (68,0-86,9)	76,7 (63,5-83,2)	79,9 (61,0-84,3)	80,1 (70,8-86,9)	82,6 (60,6-89,6)
CD8 (% T-Zellen)	20,0 (15,6-37,7)	17,6 (11,2-23,9)	20,8 (15,6-26,3)	16,6 (14,2-29,2)	15,9 (10,7-24,1)	16,4 (8,3-30,0)

Tabelle 11: Mediane sowie 25%- und 75%- Perzentile für die beiden Versuchsreihen der Monozytendesensibilisierung (Neutralisation) und der Reaktivierbarkeit von Monozyten (Revertierung) in der Gruppe „Verdacht auf Infektion und bestätigte Infektion“

	Post-OP 1	Post-OP 2	Post-OP 3	Post-OP 4	Post-OP 5	Post-OP 6
	N=11	N=11	N=11	N=11	N=10	N=7
Neutralisation 24-48h						
-/LPS (pg/ml)	2294 (396-3002)	3002 (795-4620)	2734 (795-3915)	3002 (696-5003)	3011 (1097-5104)	3601,5 (1426-4444)
Revertierung 24/48h						
- /LPS						
absolut (pg/ml)	905 (527-1589)	1026 (606-1466)	606 (367-1160)	795 (606-1640)	1026 (618-1400)	905 (327-905)
100% IFN/LPS	5,0 (4,0-11,0)	5,0 (4,1-9,2)	4,0 (3,3-6,0)	5,5 (3,0-11,0)	6,6 (4,6-12,8)	4,5 (2,5-5,0)
IFN/LPS						
absolut (pg/ml)	16622 (12564-28422)	18948 (7830-25015)	606 (367-1160)	15536 (9612-24933)	12564 (9260-18124)	18948 (12472-23451)
100% -/LPS	1979,3 (912,3-2450,2)	1974,9 (1084,8-2438,1)	2450,2 (1633,4-2947,1)	1826,8 (921,4-2944,0)	1514,2 (783,7-2192,0)	2239,1 (2028,2-4760,9)
IL-12 + IL-18/LPS						
absolut (pg/ml)	15004 (7184-21747)	10776 (7830-36245)	21660 (6576-27040)	17178 (7830-30270)	14498 (5841-19513)	18846 (8812-19605)
100% IFN/LPS	94,8 (49,0-119,0)	87,2 (48,0-144,9)	100,0 (60,9-132,0)	107,0 (90,3-135,4)	100,0 (51,1-146,0)	99,5 (46,0-103,3)
100% -/LPS	1181,3 (885,9-2472,4)	1244,7 (757,0-2858,1)	2149,4 (1483,4-2888,8)	1648,8 (877,0-3345,1)	1033,4 (657,6-2082,1)	2093,9 (1548,4-3016,6)
GM-CSF/LPS						
absolut (pg/ml)	12564 (5484-18846)	6576 (4498-16440)	8514 (4498-15009)	7830 (4966-21747)	7449 (6022-12764)	10006 (6594-22323)
100% IFN/LPS	52,3 (41,4-93,0)	57,0 (28,0-81,1)	53,0 (41,4-60,0)	59,0 (46,7-83,2)	63,0 (46,7-113,3)	84,0 (44,9-96,3)
100% -/LPS	924,2 (758,3-1624,7)	881,6 (566,9-1292,5)	1030,2 (803,6-1817,2)	1326,0 (338,9-1754,0)	1005,9 (545,6-1797,6)	1792,7 (949,8-4757,2)

Tabelle 12: Mediane sowie 25%- und 75%- Perzentile der gemessenen zellulären und löslichen Faktoren für die Gruppe „Betätigte Infektion“

	Post-OP 1	Post-OP 2	Post-OP 3	Post-OP 4	Post-OP 5	Post-OP 6
	N=2	N=2	N=2	N=2	N=2	N=2
Immunologische Marker						
HLA-DR (AB/cell)	8832 (7495-10169)	7970 (6377-9563)	6389 (5095-7682)	7291 (6437-8145)	9386 (4839-13933)	9991 (6121-13860)
IL-10 (pg/ml)	9,8 (7,9-11,6)					22,62* (7,9-14,7)*
PCT (pg/ml)	5615 (2725-8505)	7665 (2024-13307)	4430 (1859-7001)	3050 (1229-4872)	5913 (610-11216)	13021 (577-25465)
ex-vivo - TNF α (pg/ml)	N=0	N=0	N=0	N=0	N=0	N=0

* Messwerte am jeweils letzten Tag innerhalb der Studienzeit durchgeführt

Tabelle 13: Mediane sowie 25%- und 75%- Perzentile der gemessenen Immunstaten für die Gruppe „Betätigte Infektion“

	Post-OP 1	Post-OP 2	Post-OP 3	Post-OP 4	Post-OP 5	Post-OP 6
	N=2	N=2	N=2	N=2	N=2	N=2
Immunstaten						
Leukozyten	8520 (8300-8740)	11850 (9400-14300)	11350 (9700-13000)	11600 (10500-12700)	12950 (12200-13700)	9850 (9400-10300)
Lymphozyten (%)	5,3 (3,3-7,3)	4,9 (2,5-7,3)	7,9 (7,7-8,1)	6,9 (6,1-7,7)	6,4 (3,7-9,1)	8,8 (8,6-9,0)
Monozyten (%)	9,5 (6,8-12,2)	9,7 (7,8-12,2)	5,5 (5,1-6,0)	5,7 (5,4-6,0)	5,6 (5,4-5,8)	7,1 (5,5-8,7)
Granulozyten (%)	85,2 (80,5-89,9)	85,4 (80,5-90,3)	86,6 (86,3-86,7)	87,4 (86,3-88,4)	88 (85,5-90,5)	84,1 (82,7-85,5)

Tabelle 14: : Mediane sowie 25%- und 75%- Perzentile für die beiden Versuchsreihen der Monozytendesensibilisierung (Neutralisation) und der Reaktivierbarkeit von Monozyten (Revertierung) in der Gruppe „Bestätigte Infektion“

	Post-OP 1	Post-OP 2	Post-OP 3	Post-OP 4	Post-OP 5	Post-OP 6
	N=2	N=2	N=2	N=2	N=2	N=2
Neutralisation 24-48h						
-/LPS (pg/ml)	2249	4439	4003	4298	4146	4086
	(2249)	(4257-4620)	(3002-5003)	(3592-5003)	(3288-5003)	(3915-4257)
Revertierung 24-48h						
- /LPS						
absolut (pg/ml)	611	1093	567	745	783	905
	(527-695)	(1026-1160)	(527-606)	(695-795)	(541-1026)	(904-905)
100% IFN/LPS	4,2	5,2	5,0	4,2	4,7	4,8
	(4,1-4,2)	(2,5-8,0)	(3,9-6,0)	(4,0-4,5)	(2,9-6,6)	(4,5-5,1)
IFN/LPS						
absolut (pg/ml)	14593	28026	11757	16648	17191	19011
	(12564-16622)	(14498-41555)	(10006-13508)	(15536-17760)	(15536-18846)	(17760-20262)
100% -/LPS	2387,5	2650,0	2106,9	2234,9	2499,5	2100,9
	(2384,1-2391,0)	(1249,8-4050,2)	(1650,6-2563,2)	(2234,8-2235,1)	(1514,2-3484,8)	(1962,6-2239,1)
IL-12 + IL-18/LPS						
absolut (pg/ml)	14882	23510	16238	30789	18748	19605
	(10816-18948)	(10776-36245)	(10816-21660)	(17178-44400)	(12564-24933)	(18948-20262)
100% IFN/LPS	100,0	80,8	148,3	191,3	106,4	103,3
	(86,0-114,0)	(74,3-87,2)	(80,1-216,5)	(96,7-285,8)	(80,8-132,0)	(100,0-106,7)
100% -/LPS	2389,0	2230,8	2812,7	4274,2	2917,5	2166,5
	(2052,4-2725,5)	(929,0-3532,7)	(2052,4-3573,1)	(2161,8-6386,7)	(1224,6-4610,4)	(2093,9-2239,1)
GM-CSF/LPS						
absolut (pg/ml)	5874	6576	5251	8212	6458	8595
	(5468-6280)	(6576)	(4498-6004)	(7184-9240)	(5468-7449)	(7184-10006)
100% IFN/LPS	41,5	30,4	46,7	49,7	37,6	44,9
	(32,9-50,0)	(15,8-45,0)	(33,3-60,0)	(40,5-59,0)	(35,2-40,0)	(40,5-49,4)
100% -/LPS	989,1	603,9	922	1116,6	955,2	949,8
	(786,5-1191,7)	(566,9-640,9)	(853,5-990,4)	(904,1-1329,1)	(532,9-1377,4)	(793,9-1105,8)

Tabelle 15: Mediane sowie 25%- und 75%- Perzentile der gemessenen zellulären und löslichen Faktoren, Immunstaten sowie für beiden Versuchsreihen der Monozytendesensibilisierung (Neutralisation) und der Reaktivierbarkeit von Monozyten (Revertierung) in der Gruppe „Probanden“

		N=17
Immunologische Marker		
HLA-DR (AB/cell)		42843 (30233-50204)
IL-10 (pg/ml)		2,9 (2,3-4,0)
PCT (pg/ml)		128 (92-189)
		N=9
ex-vivo - TNF α (pg/ml)		462 (426-753)
		N=17
Immunstaten		
Leukozyten		5000 (4150-6400)
Lymphozyten (%)		29 (25,2-35,0)
Monozyten (%)		8,2 (6,9-10,0)
Granulozyten (%)		62,9 (56,4-67,9)
		N=17
Neutralisation 24-48h		
-/LPS (pg/ml)		1390,4 (650,7-3280,0)
		N=17
Revertierung 24-48h		
- /LPS		
absolut (pg/ml)		2030 (1093-2577)
100% IFN/LPS		17,0 (13,5-37,0)
IFN/LPS		
absolut (pg/ml)		8514 (6917-9240)
100% -/LPS		585,2 (274,1-748,7)
IL-12 + IL-18/LPS		
absolut (pg/ml)		9170 (5736-15017)
100% IFN/LPS		100,0 (84,0-167,0)
100% -/LPS		583,9 (352,9-770,9)
GM-CSF/LPS		
absolut (pg/ml)		5726 (2773-7216)
100% IFN/LPS		65,0 (39,0-85,5)
100% -/LPS		254,8 (217,1-500,5)

3.3 Untersuchung zellulärer und löslicher Marker

Zur Charakterisierung des jeweiligen Immunaktivierungszustandes erfolgte die Bestimmung standardisierter Immunparameter in Form von löslichen Markern wie PCT, HLA-DR, IL-10 als auch zellulärer Marker wie Leukozyten, Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten (Abbildung 7-18).

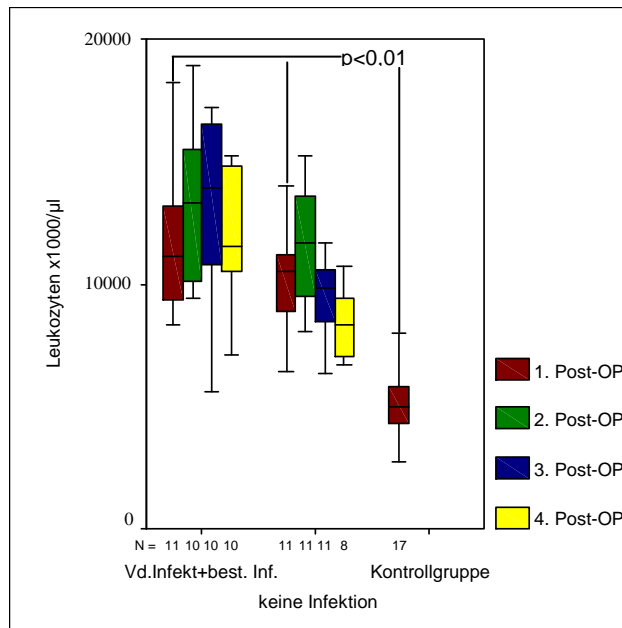


Abbildung 7: Signifikante Leukozytose in beiden Patientengruppen am 1. postoperativen Tag gegenüber der Kontrollgruppe.

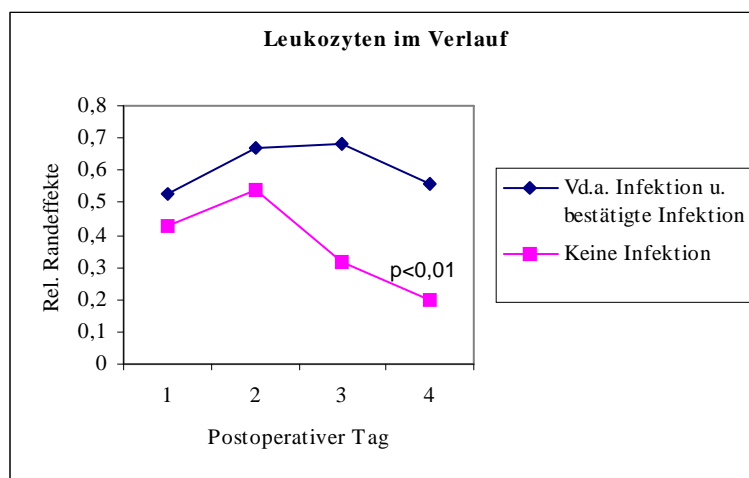


Abbildung 8: Signifikante Abnahme der Leukozytenzahl im Beobachtungszeitraum in der Patientengruppe „Keine Infektion“ ($p=0,0023$). Kein signifikanter Verlauf in der Patientengruppe „Verdacht auf Infektion“ ($p=0,1285$).

Bezugnehmend auf die kardiochirurgische Studie zeigt sich erwartungsgemäß eine signifikante Erhöhung der Leukozyten gegenüber den Probanden am 1. postoperativen Tag. Die Annäherung der Leukozyten an die Normwerte erfolgt in der Patientengruppe „Keine Infektion“ signifikant schneller als in der Gruppe „Verdacht auf Infektion und bestätigte Infektion“ (Abbildung 8). Die Lymphozyten hingegen sind stark reduziert gegenüber der Kontrollgruppe im gesamten Beobachtungszeitraum, wobei sich sowohl in der Gruppe „Verdacht auf Infektion“ als auch in der Gruppe „Keine Infektion“ eine signifikante Erholung zeigt (Abbildung 9-10). Die Monozyten und Granulozyten weisen ein ähnliches Verhalten wie die Leukozyten mit signifikanter Erhöhung gegenüber den Kontrollen und einer signifikanten Differenzierung zwischen beiden Gruppen auf (nur Granulozyten abgebildet, Abbildung 11). Im Gegensatz zu den Monozyten kehren die Granulozyten in der Gruppe „Keine Infektion“ signifikant schneller zu ihrem physiologischen Normalwert zurück als bei den Patienten mit Infektionsverdacht (Abbildung 12).

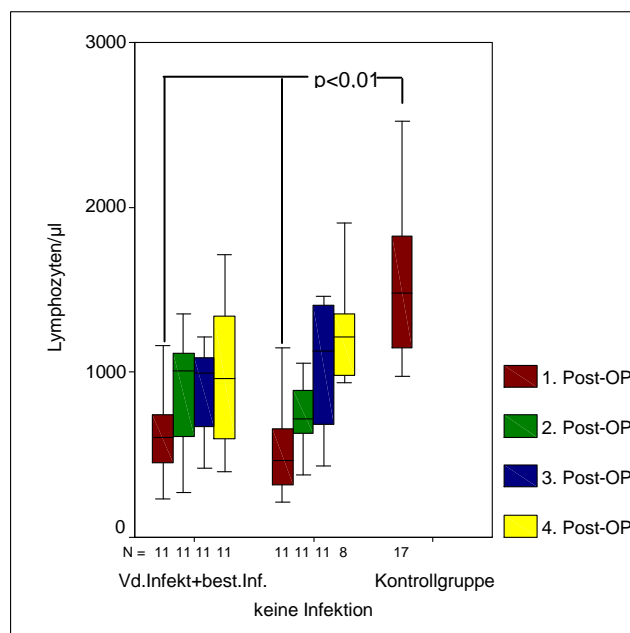


Abbildung 9: Signifikante Lymphozytopenie in beiden Patientengruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p < 0,01$). Kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Patientengruppen am 1. postoperativen Tag ($p = 0,48$).

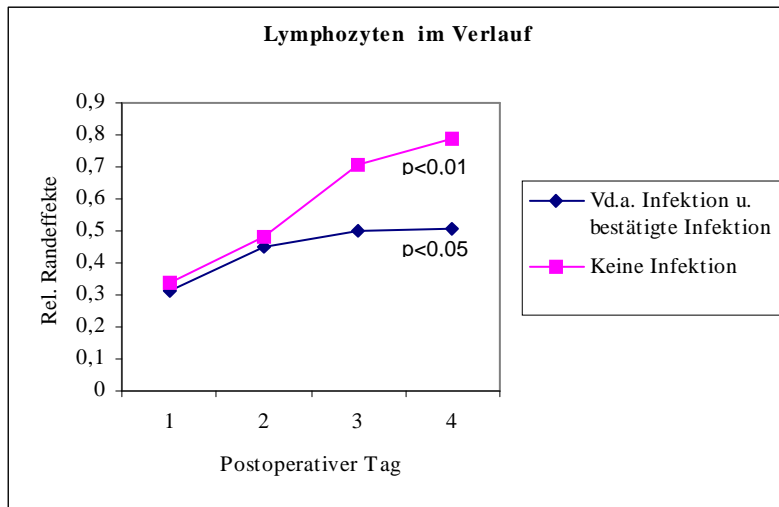


Abbildung 10: Innerhalb beider Patientengruppen signifikante Erholung ($p = 0,0129$ und $p = 0,0001$) vom 1. bis zum 4. postoperativen Tag.

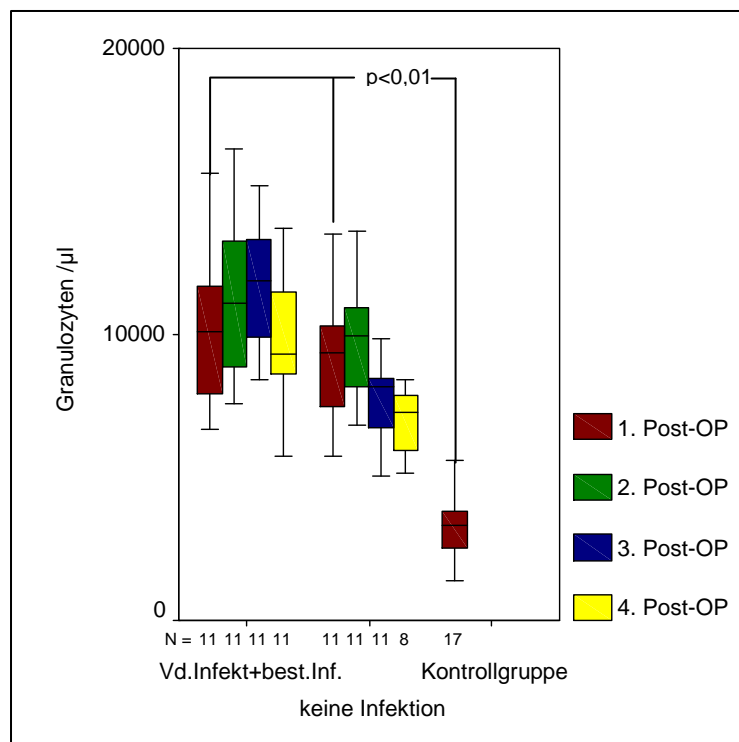


Abbildung 11: Signifikante Granulozytose am 1. postoperativen Tag im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p < 0,01$).

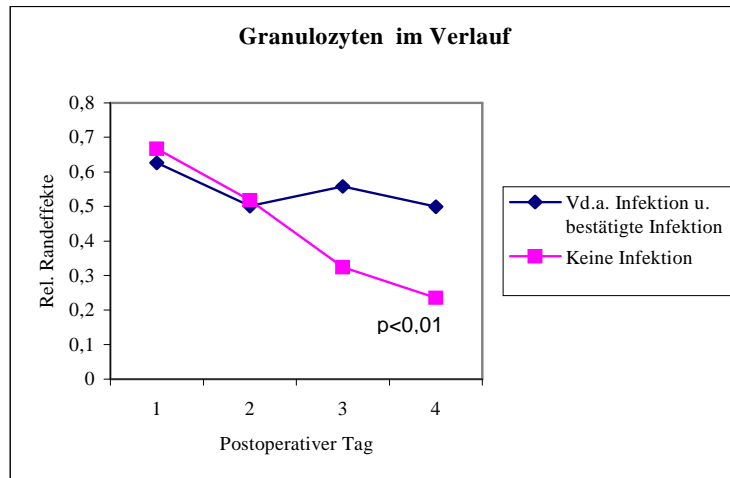


Abbildung 12: Innerhalb der Patientengruppe „Verdacht auf Infektion und bestätigte Infektion“ keine signifikante Reduktion ($p=0,1759$), hingegen in der Gruppe „Keine Infektion“ signifikante Erholung ($p = 0,001$). Als Zeichen für eine Immundepression zeigte sich in beiden Patientengruppen eine Erniedrigung der monozytären Expression von HLA-DR sowie eine Reduktion der ex-vivo TNF- α - Sekretion (Abbildung 13, 19). Ebenso konnte eine signifikante Erhöhung der IL-10 - Werte im Vergleich zu den Kontrollprobanden nachgewiesen werden, welche sich jedoch im Verlauf des Beobachtungszeitraumes (3-4. postoperativer Tag) der Vergleichspopulation wieder anglich (Abbildung 15) .

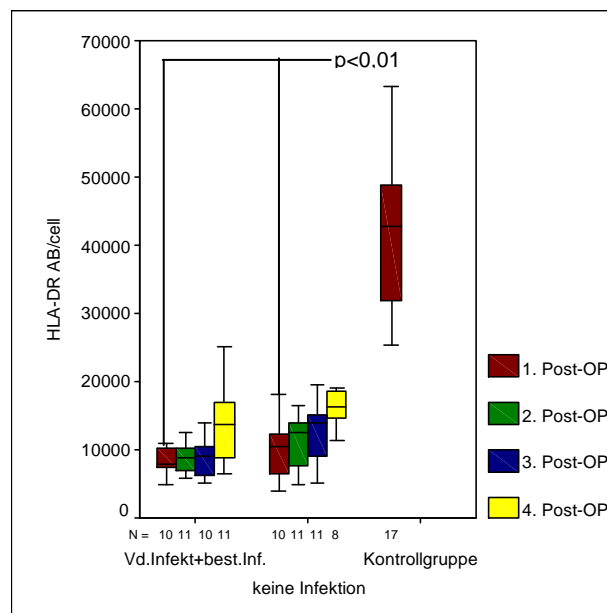


Abbildung 13: Signifikante HLA-DR Reduktion in beiden Patientengruppen über den gesamten Beobachtungszeitraum.

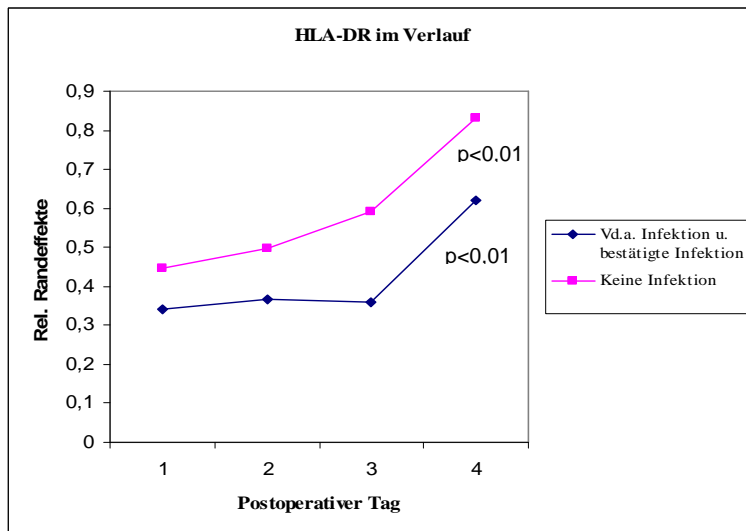


Abbildung 14: In beiden Patientengruppen zeigt sich eine signifikante Erholung im Beobachtungszeitraum mit Anstieg der HLA-DR – Werte ($p = 0,0058$ und $p = 0,0017$).

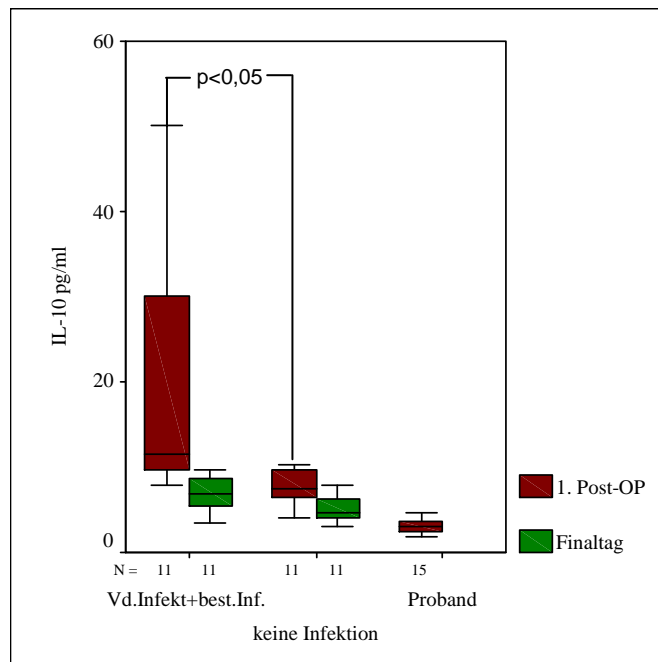


Abbildung 15: Signifikante Erhöhung der IL-10 Werte gegenüber den Kontrollprobanden am 1. postoperativen Tag. Ebenso zeigt sich eine signifikante Differenzierung zwischen beiden Patientengruppen am 1. postoperativen Tag ($p = 0,013$).

Procalcitonin als löslicher Marker für das Vorliegen einer Endotoxämie zeigt sich in der Patientengruppe mit Verdacht auf Infektion deutlich erhöht im gesamten Beobachtungszeitraum gegenüber den Patienten ohne Infektion (Abbildung 16,17).

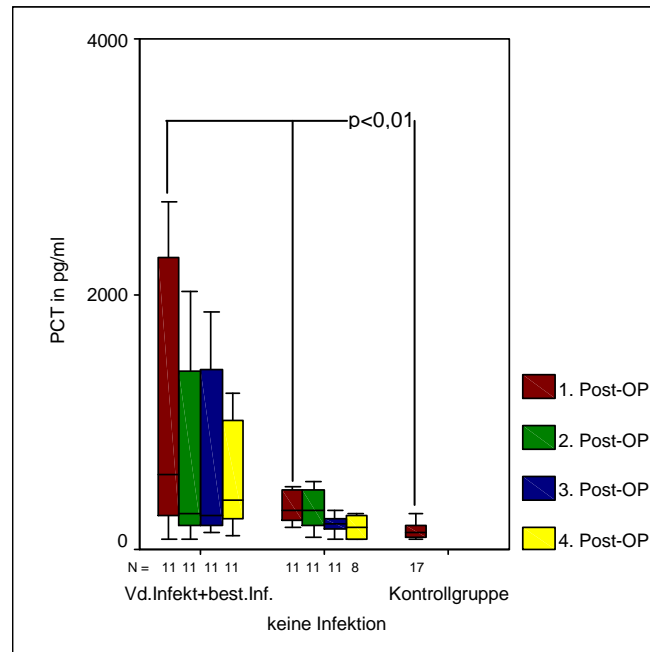


Abbildung 16: Signifikante Erhöhung der PCT - Werte gegenüber den Kontrollprobanden am 1. postoperativen Tag ($p=0,0001$).

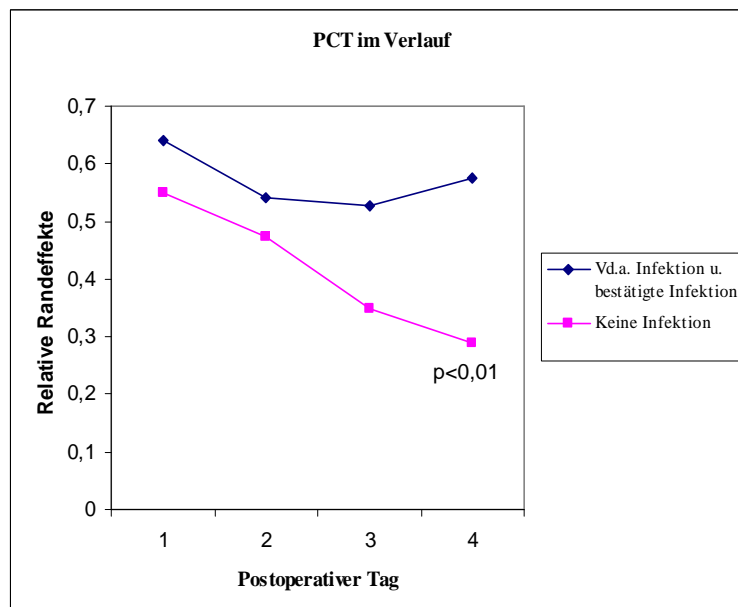


Abbildung 17: Kein signifikanter Unterschied im zeitlichen Verlauf beider Gruppen, jedoch in den jeweiligen Einzelbetrachtungen. So zeigt sich im Verlauf der infektfreien Patienten eine signifikant schnellere Reduzierung der PCT- Werte ($p = 0,006$), nicht hingegen bei Patienten mit Infektverdacht ($p=0,2888$).

3.4 Monozyten – Deaktivierung durch Interleukin 10 und TGF- β

3.4.1 Experimentelle Vorversuche

Das Verhalten von in-vitro - desensibilisierten Zellen sollte nun mit dem von in-vivo - desensibilisierten Zellen von Patienten mit postoperativer Immunsuppression verglichen werden, um Rückschlüsse auf die Übertragbarkeit der analysierten in-vitro - Modelle auf die Situation in-vivo zu erhalten. Im in-vitro - Desensibilisierungsmodell sezernieren Monozyten nach Stimulation mit LPS die immunsuppressiven Zytokine IL-10 und TGF- β . Vor dem in der Einleitung beschriebenen theoretischen und experimentellen Hintergrund (Abbildung 3) interessiert jedoch zunächst die Frage der Konzentrationsbestimmung der einzelnen Antikörper und ihrer in-vitro prozentual möglichen Aufhebung der Monozyten-Desensibilisierung. In standardisierten Vorversuchen bei einer zuvor ermittelten Konzentration von jeweils 10 μ g Antikörper IL-10 und TGF- β zeigte sich ein geschlechter- und altersabhängiges Sensibilisierungsverhalten, wobei die optimalste Aufhebung der Desensibilisierung bei der Kombination beider Antikörper erreicht werden konnte (122% der ursprünglichen reinen LPS - Sensibilisierung). Hierbei zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen Männern und Frauen zugunsten des männlichen Geschlechtes ($p=0,01$) (Abbildung 18). Der Einfluss des Alters wird in einer geschlechtsspezifischen Unterteilung, gruppiert nach Lebensalter <35 und >70 Jahre, deutlich. Das Auslassen der mittleren Jahrgänge ergab sich durch die Altersverteilung der Kontrollprobanden im Labor und in der Studie. Ein überproportionales Sensibilisierungsverhalten zeigen hierbei die jungen Männer unter 35 Jahren. Bei alleiniger Gabe von AK - IL-10 ergibt sich ein durchschnittlicher Anteil der TNF- α - Produktion prozentual der reinen LPS - Stimulation von 48%, wobei ein signifikanter Unterschied zwischen Männern und Frauen unter 35 Jahren besteht. Im Falle von TGF- β konnte nur ein 26%iger Anstieg nach Zugabe des Antikörpers ohne signifikante Differenzierungen zwischen den einzelnen Geschlechtern erreicht werden (Abbildung 19). Bei der durch LPS induzierten TNF- α - Produktion und der reinen LPS - Desensibilisierung zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Männern und Frauen.

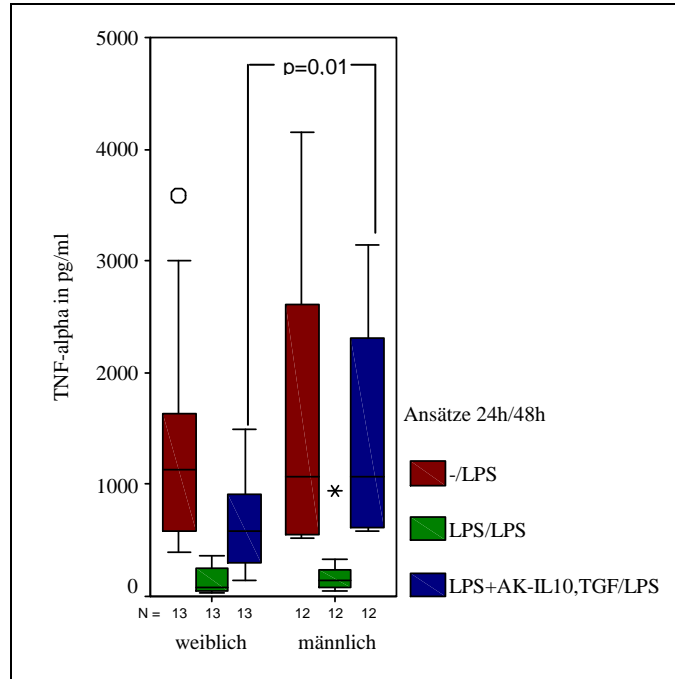


Abbildung 18: Signifikant höhere TNF- α - Produktion nach kombinierter Gabe von AK-IL – 10/TGF- β bei Männern.

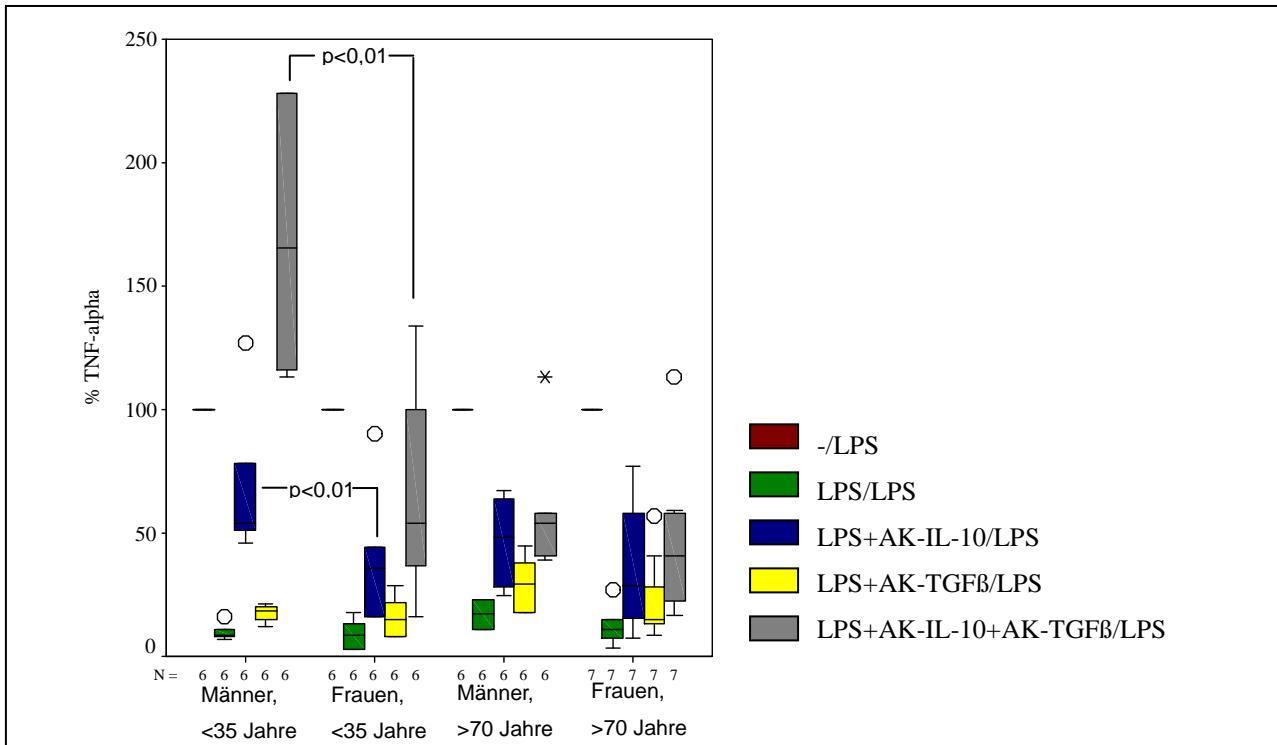


Abbildung 19: Signifikant höhere TNF- α - Produktion nach alleiniger AK-IL – 10 und kombinierter Gabe von AK-IL – 10/TGF - β bei Männern unter 35 Jahren.

3.4.2 Untersuchung der Patientensera auf immunsuppressive Faktoren nach kardiochirurgischer Intervention

Der zweite experimentelle Teil der Arbeit diente der Prüfung der Übertragbarkeit der in-vitro erlangten Ergebnisse auf die postoperative Immunsuppression bei kardiochirurgischen Patienten. Für eine vorliegende Immunsuppression im beschriebenen Patientenkollektiv sprachen sowohl die tendenziell erniedrigten ex-vivo- TNF- α - Absolutwerte im Vollblut – durchschnittlich 351pg/ml in der Patientengruppe versus 566pg/ml in der Kontrollgruppe als auch die signifikant geringere TNF- α - Produktion der aus dem Patientenblut gewonnenen PBMCs nach LPS-Stimulation im Vergleich zur Kontrollpopulation (durchschnittlich 992pg/ml versus 1974pg/ml), dargestellt in der späteren Abbildung 26.

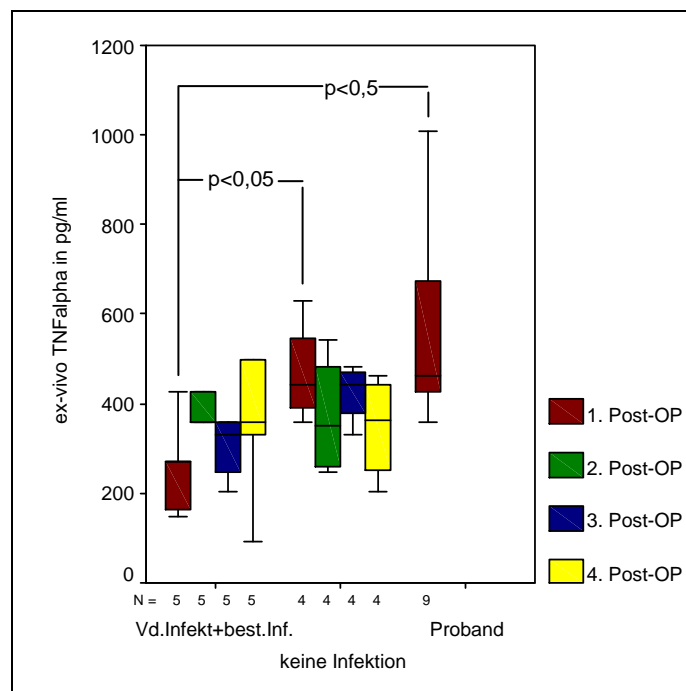


Abbildung 20: Signifikant reduzierte Produktion in der Patientengruppe mit Infektionsverdacht und bestätigter Infektion gegenüber der infektfreien Patientengruppe ($p=0,032$). Ebenfalls signifikanter Unterschied zwischen der Patientengruppe mit „Vd.a. Infektion und bestätigter Infektion“ und den Kontrollprobanden ($p=0,012$) am 1. postoperativen Tag. Kein signifikanter Erholungseffekt in beiden Patientengruppen ($p=0,5470$; $p=0,3470$).

Mit dieser Arbeit wird der Vermutung nachgegangen, dass im Patientenplasma befindliche Faktoren wie IL-10 und TGF- β mitunter für die beschriebene Immunsuppression verantwortlich sind. Zu diesem Zweck wurden PBMCs gesunder Kontrollprobanden mit dem Patientenplasma zusammengefügt, in der Annahme, dass die im Plasma befindlichen immunsuppressiven Interleukine die TNF- α - Produktion nach LPS - Stimulation vermindern oder gänzlich unterdrücken. Weiterführend in der Annahme sollte sich mittels Zugabe von Antikörper IL-10 wie auch TGF- β eine Erholung bzw. ein Anstieg der TNF- α - Produktion einstellen. Bei der Durchführung dieses Experimentes zeigte sich jedoch, dass durch die alleinige Zugabe von Patientenplasma zu gesunden, produktionsfähigen Monozyten die TNF- α - Produktion nicht erniedrigt werden konnte. Sowohl in der Patientengruppe mit Infektionsverdacht als auch bei den Patienten ohne Infektionsnachweis konnte keine signifikante Reduktion der TNF- α - Werte gegenüber den Kontrollprobanden festgestellt werden ($p=1,00$ bzw. $p=0,458$). Dahingegen waren die PBMCs der Patienten nur noch zu einer signifikant verringerten Produktion von TNF- α nach LPS-Stimulation in beiden Patientengruppierungen fähig ($p=0,037$ und $p=0,001$).

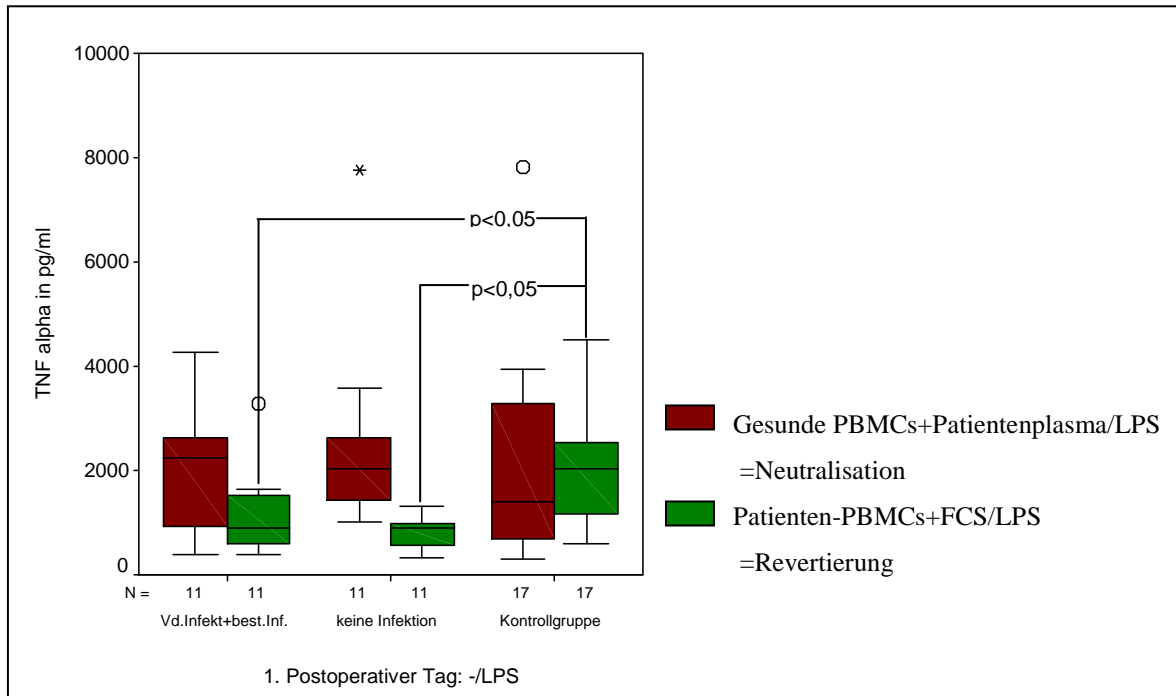


Abbildung 21: Signifikant reduzierte TNF- α - Produktion in beiden Patientengruppen im Versuch der Revertierung gegenüber den Kontrollen ($p=0,037$; $p=0,001$). Kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Patientengruppierungen bei der Neutralisation oder Revertierung ($p=0,898$ und $p=0,332$). Bei der Neutralisation ebenfalls keine Signifikanz der Patientenpopulation zu den Kontrollprobanden.

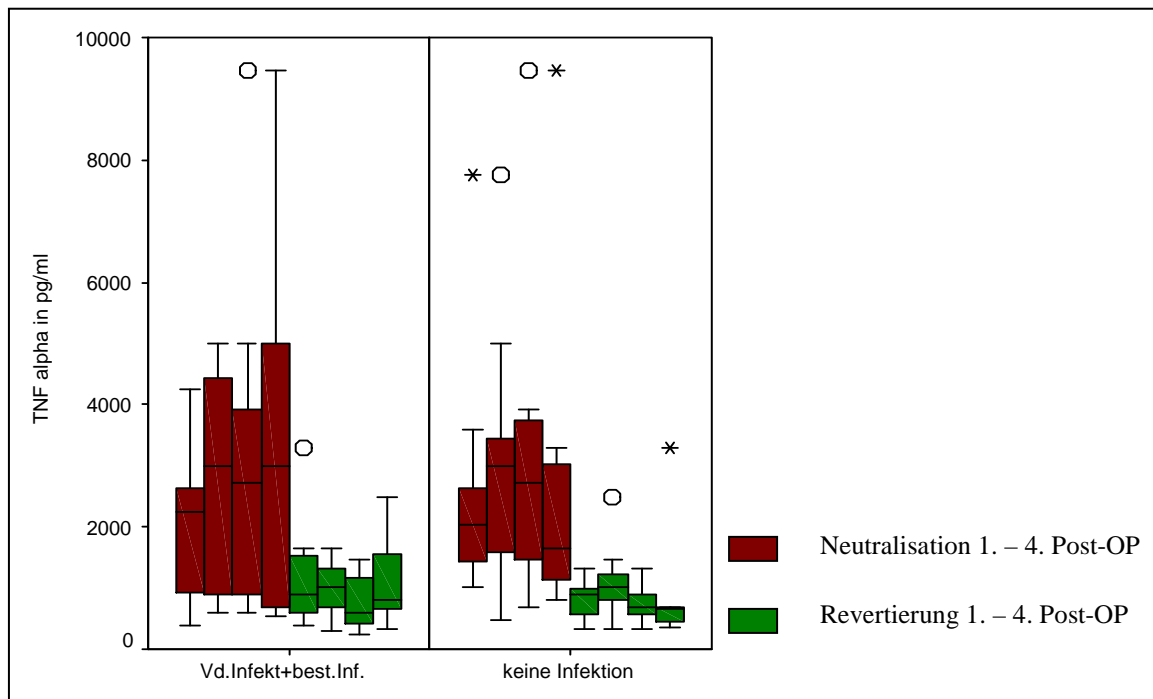


Abbildung 22: Identische Ansätze wie in Abbildung 21 im gesamten Beobachtungszeitraum vom 1. bis 4. postoperativen Tag in beiden Patientengruppierungen. Kein signifikanter Unterschied bei der Neutralisation bzw. Revertierung zwischen beiden Patientengruppen über die Zeit ($p=0,09$; $p=0,07$). Signifikant erniedrigte TNF- α - Werte in der infektverdächtigen Patientengruppe zwischen dem Versuchsaufbau der Revertierung und Neutralisation ($p=0,01581$) ebenso in der Gruppe „Keine Infektion“ ($p = 0,0001$).

Einschränkend für diesen Versuchsaufbau muss die Vielzahl der immunologischen Einflussfaktoren erwähnt werden, welche in weiteren Studien noch zu klären sind. Um auszuschließen, dass Anteile der beobachteten Signifikanzen innerhalb der gesunden PBMC - Spender durch High- und Low-TNF- α - Producer oder einer bestimmten Geschlechterzugehörigkeit verursacht worden sind, erfolgte ein jeweiliger Doppelansatz von gesunden PBMC-Spendern sowohl für die Patientengruppierungen als auch für die Kontrollprobanden. Mittels eines statistischen Auswertungsverfahrens der Varianzanalyse mit zufälligen Effekten konnte in dieser Population kein signifikanter Einfluss ($p=0,3989$) festgestellt werden.

Nach Erhalt der oben beschriebenen Ergebnisse wurde auf fortführende Versuche mit additiver Zugabe von Anti - IL-10 und TGF- β bei ausbleibender TNF- α - Reduktion bei Kombination von Patientenplasma mit gesunden PBMCs verzichtet (Abbildung 23).

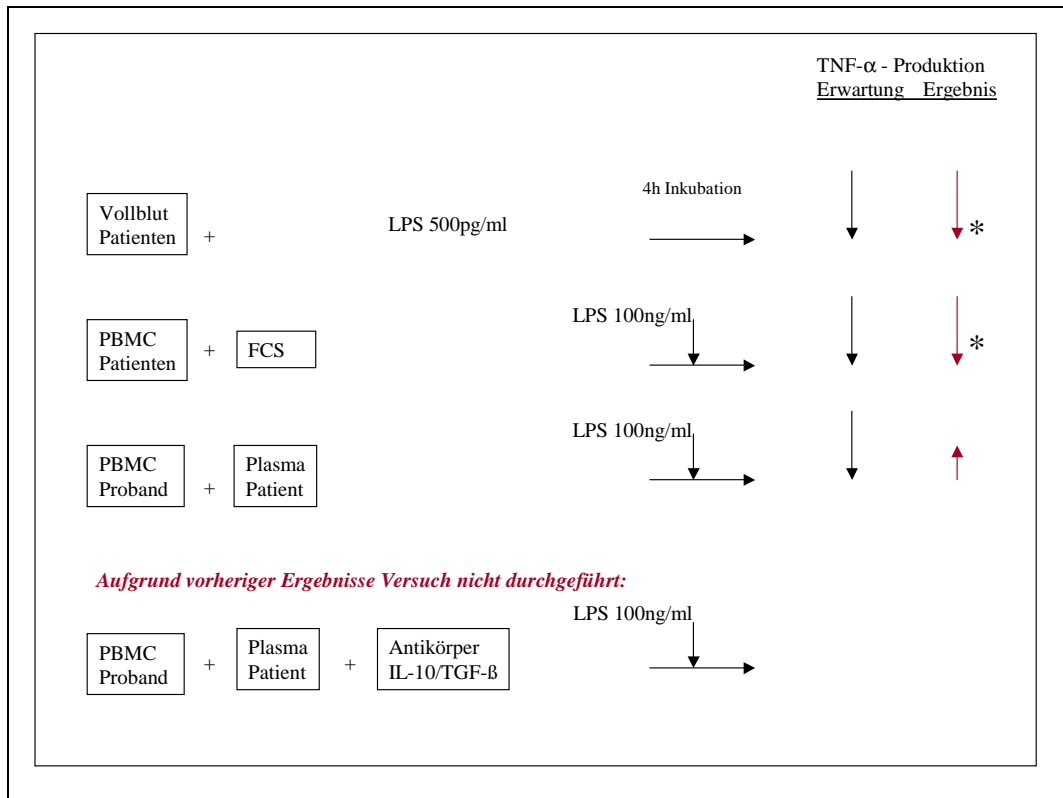


Abbildung 23: Schematische Darstellung der Versuchsanordnung mit zu erwartenden und tatsächlich erhaltenen Ergebnissen; *signifikante Resultate

3.5 Aufhebung der Monozyten-Deaktivierung durch immunstimulierende Substanzen

3.5.1 Revertierung mit IFN- γ , IL-12/IL-18 und GM-CSF

Im folgenden werden die Ergebnisse der Versuche zur Reaktivierbarkeit von den in vivo desensibilisierten Monozyten durch IFN, GM-CSF und der additiven Gabe von IL-12 und IL-18 dargestellt, wobei der Nachweis der Desensibilisierung durch den ersten Versuchsansatz geführt wird. Hierbei zeigt sich bei reiner Stimulation mit LPS der aus Patientenblut gewonnenen PBMCs eine signifikant reduzierte TNF- α – Produktion gegenüber den Kontrollprobanden. Im Gegensatz dazu dient als Positivkontrolle die Stimulation mittels IFN- γ als direkter Signalinduktor für die TNF- α – Produktion der Monozyten. In der Gesamtpopulation zeigen sich im gesamten Beobachtungszeitraum vom 1. bis zum 4. postoperativen Tag signifikant erhöhte TNF- α – Werte, welche die TNF - Produktionsfähigkeit der gewonnenen Monozyten unter Beweis stellt. Ohne vorweg eine Gruppierung der Patientenpopulation vorzunehmen, betrachten wir das Verhalten der Monozyten bei einer Stimulation mit der in-vitro beschriebenen Kombination von IL-12, IL-18 sowie GM-CSF. Bei beiden Ansätzen konnte eine eindeutige Vermehrung der TNF- α – Produktion nachgewiesen werden, wobei die Kombination beider Interleukine eine signifikant höhere Produktion verursachte als die reine Gabe von GM-CSF ($p=0,001$).

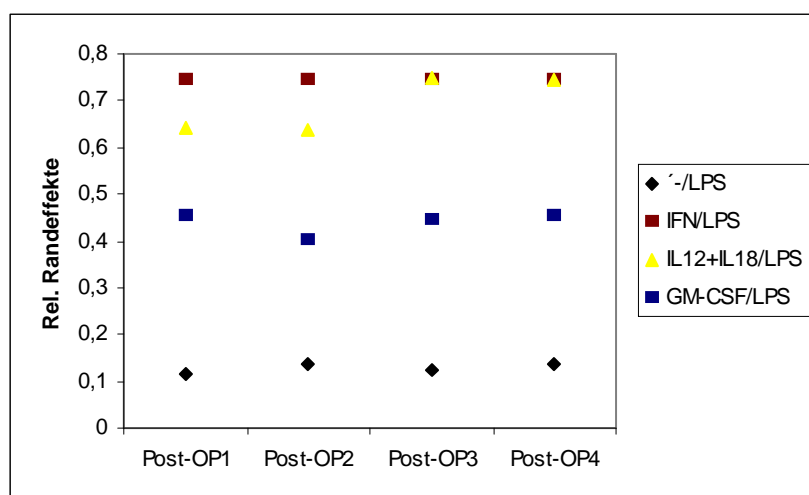


Abbildung 24: Darstellung der einzelnen Stimulationsansätze als Relative Randeffekte vom 1. bis zum 4. postoperativen Tag. Signifikanter Unterschied ($p = 0,0001$) zwischen fast allen Stimulationsansätzen. Ausnahme: keine Signifikanz zwischen IL12+IL18/LPS und IFN/LPS ($p = 0,521$).

Bei der Betrachtung der einzelnen Patientengruppierungen und den jeweiligen Stimulationsansätzen zeigt sich dasselbe Verhältnis der Stimulationsansätze zueinander wie in der Gesamtpopulation (Daten nicht dargestellt). Der Vergleich beider Patientengruppierungen „Verdacht auf Infektion oder bestätigte Infektion“ versus „Keine Infektion“ erbrachte keinen signifikanten Unterschied in der TNF- α – Produktion nach einfacher LPS - Stimulation, so auch nicht nach Revertierung mittels IFN- γ oder der Kombination mit IL-12 und -18. Hinsichtlich der Geschlechterspezifität ist eine signifikant höhere TNF- α – Produktion bei Frauen mit Infektsverdacht nach LPS - Stimulation auffallend. Bei insgesamt signifikant erhöhter TNF- α – Produktion nach GM-CSF - Gabe im Vergleich zur Patientengruppierung „Keine Infektion“, ist erneut auf eine Differenzierung innerhalb der fraglichen Infektionsgruppe zugunsten der Frauen mit signifikant höherer TNF- α – Produktion nach GM-CSF hinzuweisen (Abbildung 26). Der Vergleich der Patientengruppierungen mit der Kontrollpopulation am 1. postoperativen Tag ergab signifikant erniedrigte TNF- α - Werte nach reiner LPS - Stimulation als Hinweis auf eine bestehende Immundepression. Die Revertierung durch IFN, IL-12/IL-18 und GM-CSF hingegen erbrachte nur im Falle der Patienten mit Infektionsverdacht eine signifikante Differenz hinsichtlich der TNF- α – Produktion bei Gabe von IFN- γ als Positivkontrolle. Zusammenfassend ist die Revertierbarkeit sowohl in den Patientengruppierungen als auch in der Kontrollgruppe durch alle drei Stimulationsansätze gegeben, jedoch ohne eine statistische Signifikanz zwischen den einzelnen Gruppierungen aufzuweisen. Lediglich eine Revertierung mit GM-CSF erhöhte die TNF- α - Produktion in der Patientengruppe mit „Vd.a. Infektion und bestätigter Infektion“ signifikant gegenüber der Kontrollgruppe (Abbildung 22-24).

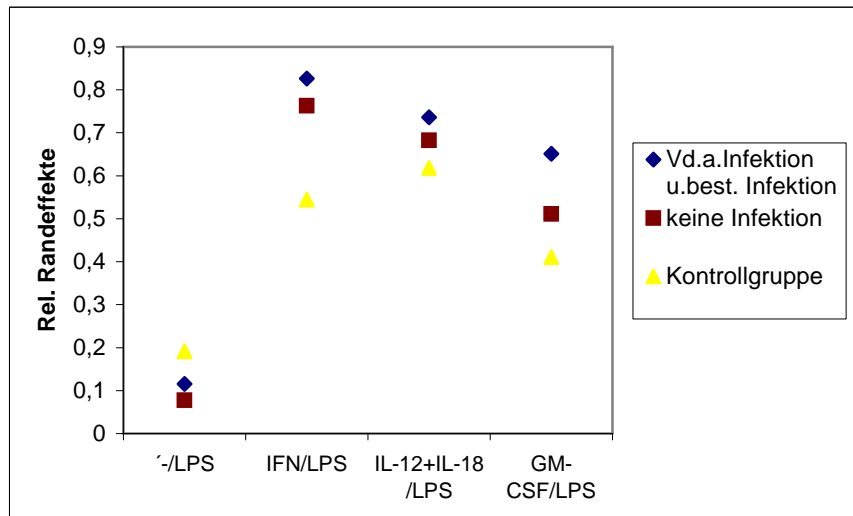


Abbildung 25: 1. postoperativen Tag: -/LPS in beiden Patientengruppen signifikant erniedrigt gegenüber den Kontrollprobanden ($p=0,037$ und $p=0,001$). Kein signifikanter Unterschied bei allen Stimulationsansätzen zwischen den Patientengruppen (-/LPS: $p=0,332$, IFN/LPS: $p=0,217$, IL12+IL18/LPS: $p=0,365$, GM-CSF/LPS: $p=0,208$). Tendenziell erhöhte TNF- α - Produktionen in den Patientengruppen bei allen Ansätzen, jedoch nur signifikant in „Vd.a. Infektion“ versus „Kontrollgruppe“ ($p=0,017$) bei GM-CSF/LPS.

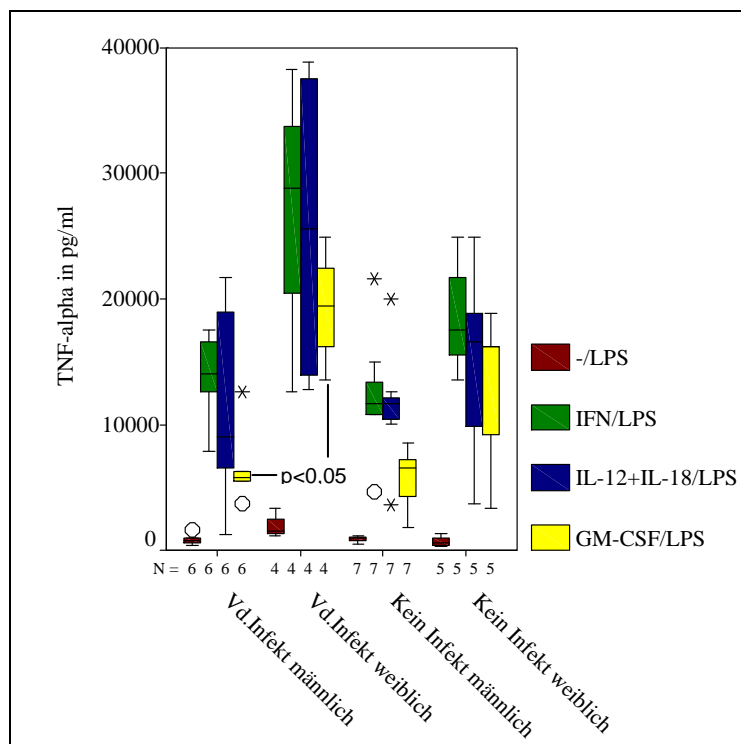


Abbildung 26: Revertierungsverhalten am 1. postoperativen Tag in Abhängigkeit des Geschlechtes und der Gruppierung. Signifikanter Unterschied innerhalb der Gruppe „Vd.a. Infekt und bestätigte Infektion“ nach Stimulation mit LPS ($p=0,038$) und mit GM-CSF/LPS ($p=0,019$).

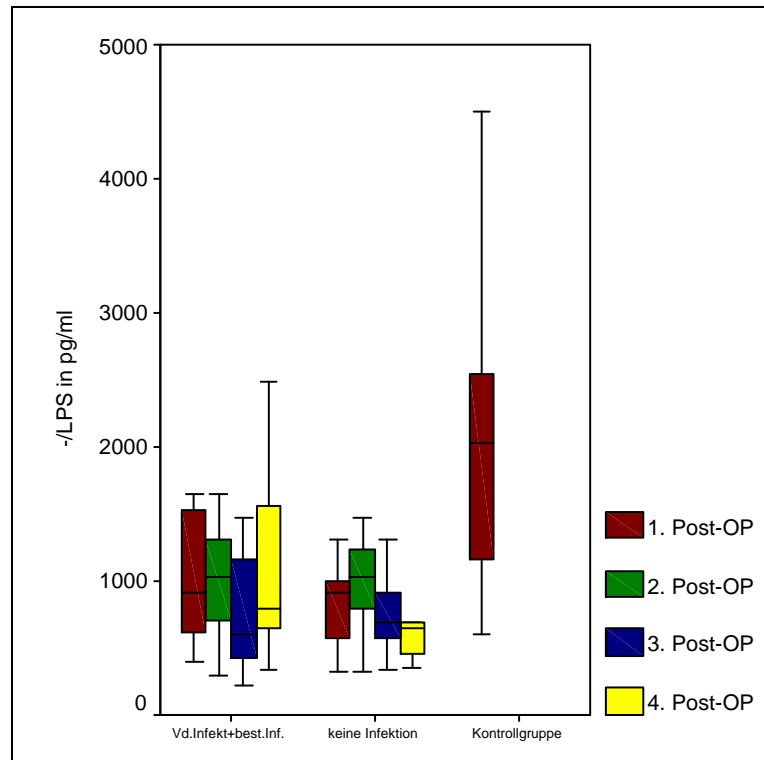


Abbildung 27: Kein signifikanter Unterschied im zeitlichen Verlauf für -/LPS sowohl im Vergleich bd. Patientengruppen ($p=0,0693$) als im Verlauf der jeweiligen Gruppe ($p=0,2741$ und $p=0,1067$).

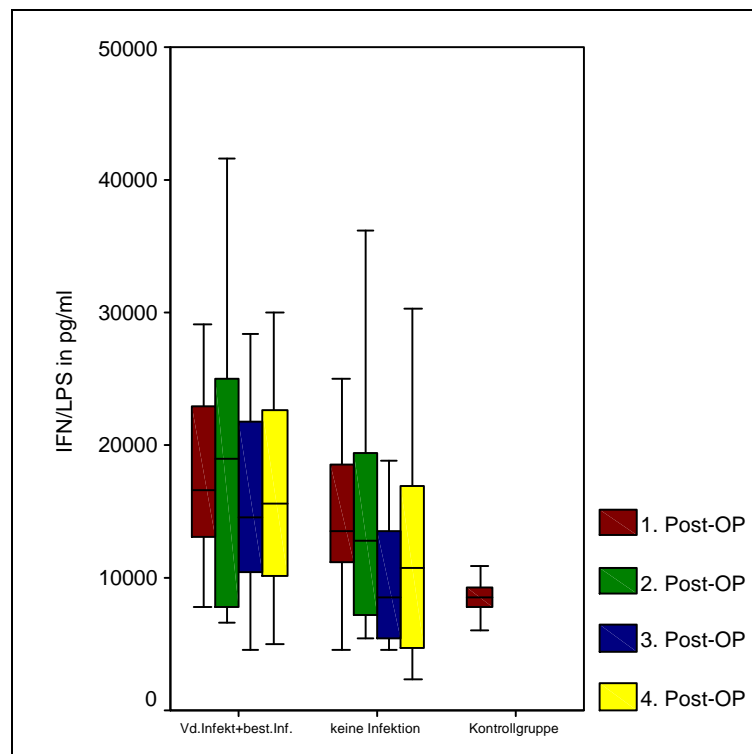


Abbildung 28: IFN/LPS: Kein signifikanter Unterschied im zeitlichen Verlauf sowohl im Vergleich bd. Patientengruppen ($p=0,1054$) als auch im Verlauf der jeweiligen Gruppe ($p=0,7424$ und $p=0,1458$).

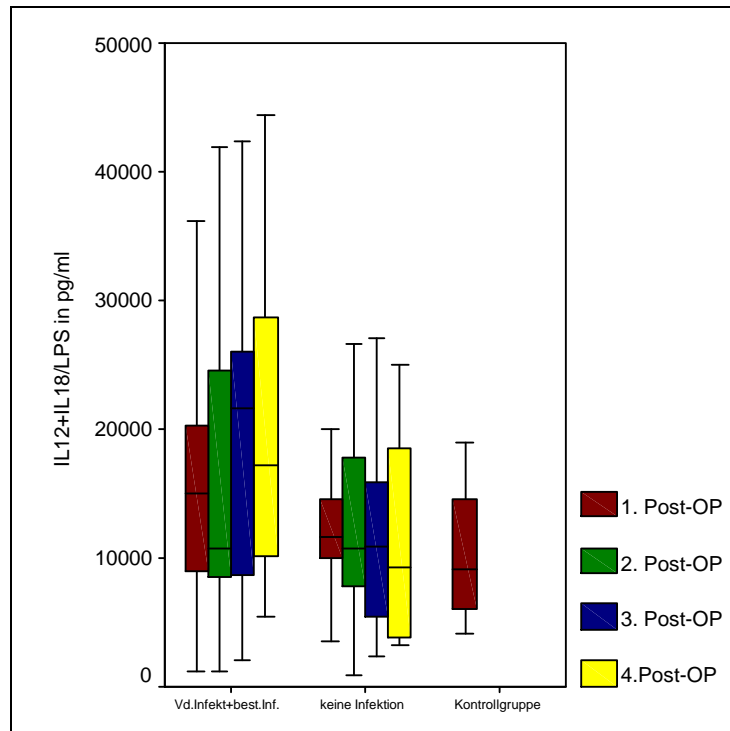


Abbildung 29: IL12+IL18/LPS: Kein signifikanter Unterschied im zeitlichen Verlauf sowohl im Vergleich bd. Patientengruppen ($p=0,9299$) als auch im Verlauf der jeweiligen Gruppe ($p=0,3724$ und $p=0,9022$).

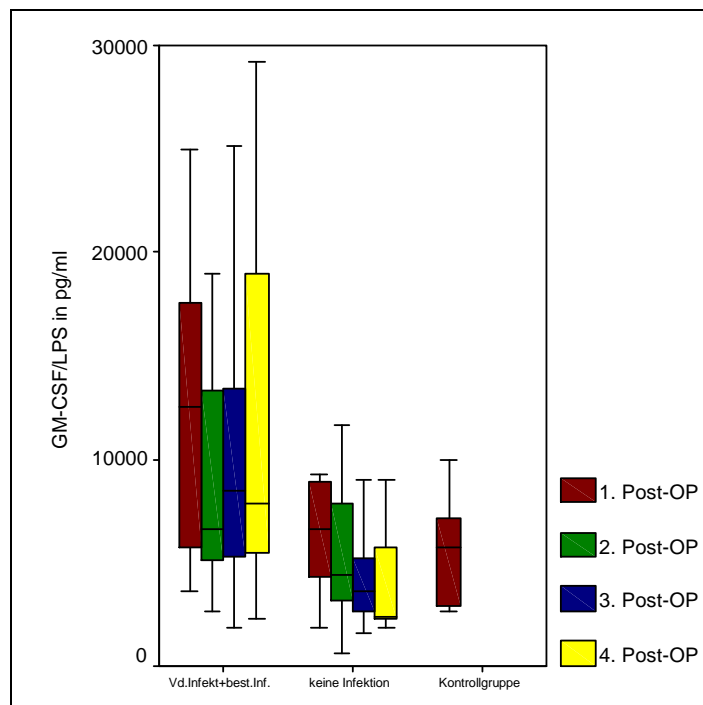


Abbildung 30: GM-CSF/LPS: Signifikanter Unterschied beider Gruppen im zeitlichen Verlauf ($p=0,0361$). Innerhalb der Patientengruppe mit „Vd.a. Infektion bzw. bestätigter Infektion“ keine signifikante Verringerung der TNF- α - Produktion ($p=0,5904$), jedoch rasche signifikante Reduktion innerhalb der Patientengruppe „Keine Infektion“ ($p=0,0203$).

3.5.2 ROC - Analysen

Um Marker zu erhalten, die zwischen Patienten ohne und jenen Patienten mit Infektionsverdacht im viertägigen postoperativen Verlauf möglichst frühzeitig, bereits am 1. postoperativen Tag, unterscheiden zu können, erfolgten Analysen auf der Grundlage von Receiver Operating Characteristics (ROC)-Kurven. Dabei zeigten sich die monozytäre HLA-DR-Expression und das IL-10 am 1. postoperativen Tag als die Marker mit dem größten Diskriminierungspotenzial bei einer jeweiligen Fläche unter der ROC - Kurve (Area Under Curve - AUC) für HLA-DR von 0,700 und für IL-10 von 0,785. Einschränkend muss jedoch erwähnt werden, dass für HLA-DR das 95%-Konfidenz-Intervall bei $p = 0,08$ liegt. Procalcitonin hingegen zeigte hier ein geringeres bzw. nicht signifikantes Diskriminierungsverhalten mit einer AUC von 0,656.

Tabelle 16: Darstellung der ROC - Analyse für HLA-DR, Interleukin 10, PCT

<i>Einzelparameter</i>	<i>AUC (95%KI)</i>	<i>p-Wert</i>	<i>Schwellenwert</i>	<i>Sensitivität</i>	<i>Spezifität</i>
HLA-DR	0,700 (0,490-0,910)	0,08	8195,50 AB/cell	0,60	1,00
Interleukin 10	0,785 (0,622-0,947)	0,01	7,69 pg/ml	1,00	0,47
Procalcitonin	0,656 (0,444-0,867)	0,16	538,00 pg/ml	0,55	0,74

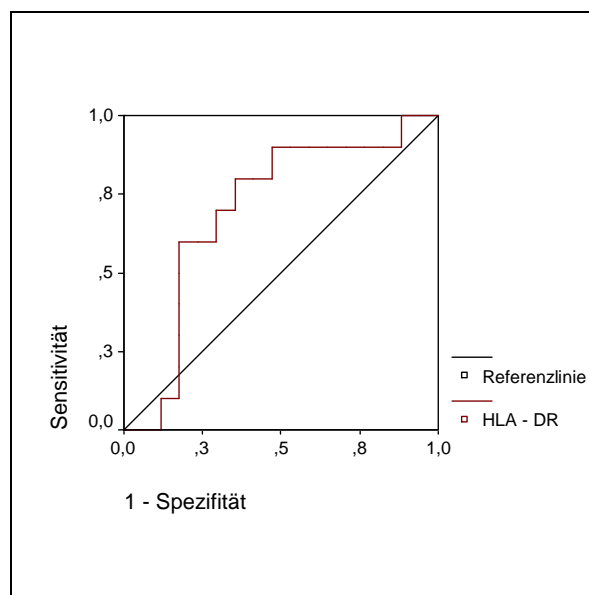


Abbildung 31: ROC - Kurve des 1. postoperativen Tages für HLA-DR bezüglich des Auftretens einer möglichen Infektion im postoperativen Verlauf. AUC = 0,07.

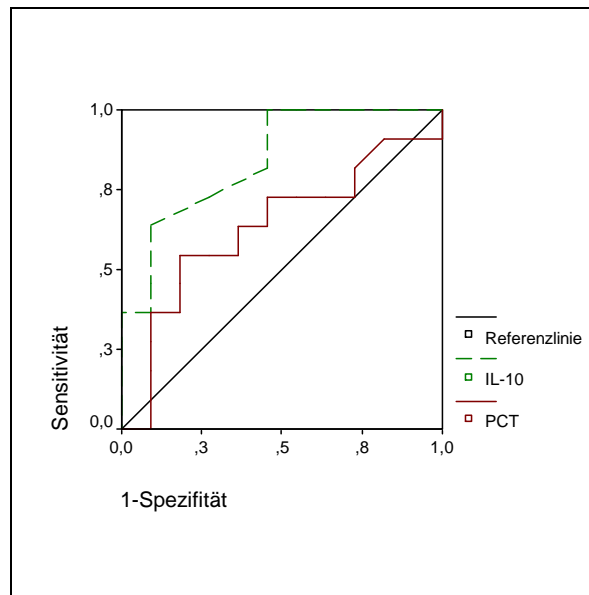
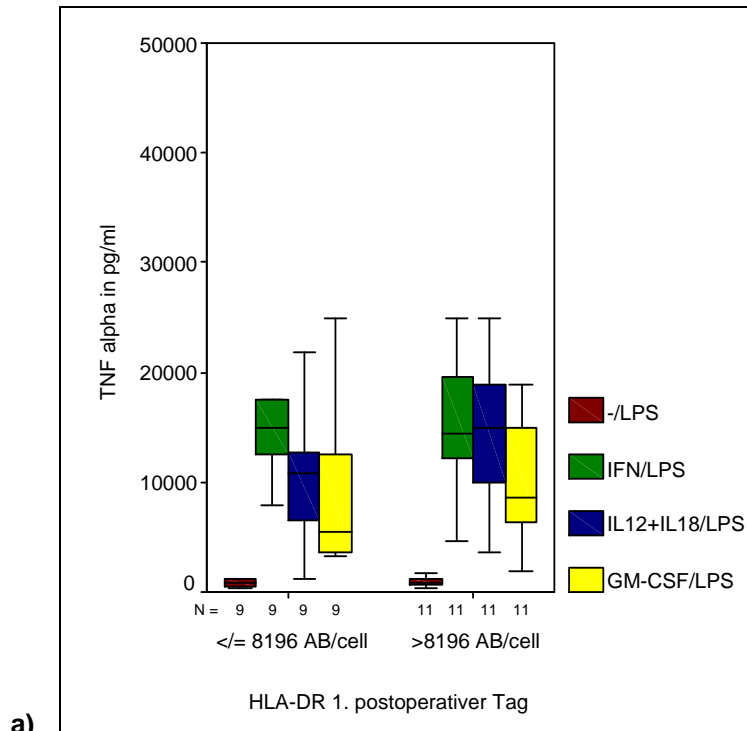
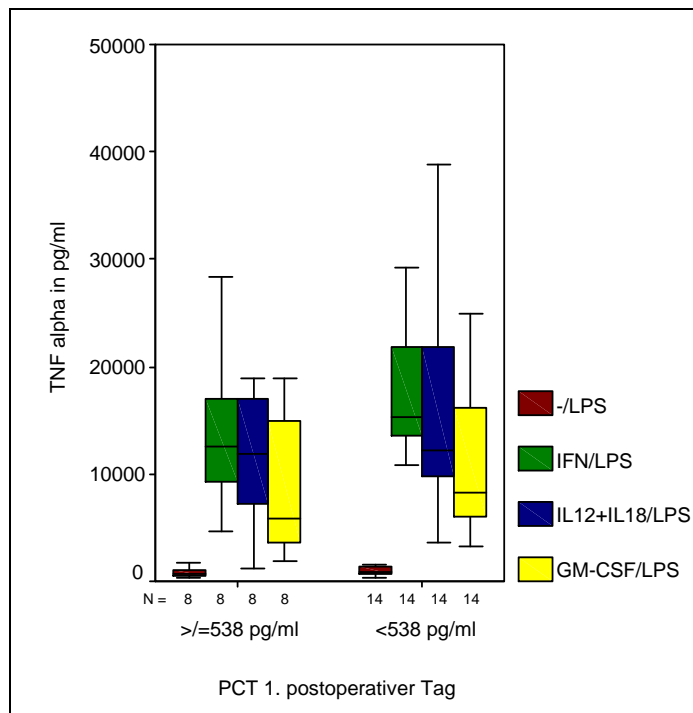


Abbildung 32: ROC - Kurve des 1. postoperativen Tages für IL-10 und PCT bezüglich des Auftretens einer möglichen Infektion im postoperativen Verlauf. AUC = 0,785 für IL-10, AUC = 0,656 für PCT.

Inwiefern diese immunologischen Marker mit ihren definierten Cut-offs am 1. postoperativen Tag signifikante Aussagen über das Revertierungsverhalten treffen können, zeigen Abbildung 33/34. So erfolgt eine jeweilige Gruppierung in Patienten mit einer monozytären HLA-DR Expression von ≤ 8196 bzw. > 8196 (Abbildung 33a). Entsprechend gleich wird mit den Cut-offs von Procalcitonin (Abbildung 33b) und Interleukin 10 (Abbildung 34) verfahren. Dabei zeigte sich jedoch, dass in keiner der Gruppierungen ein signifikanter Unterschied innerhalb der einzelnen Stimulationsansätze nachgewiesen werden konnte. Folglich lässt sich in dieser Patientenpopulation keine Aussage über die Revertierungsfähigkeit der Monozyten anhand von erhobenen Messwerten wie HLA-DR, PCT oder IL-10 am 1. postoperativen Tag treffen. Auch am 4. postoperativen Tag zeigten sich keine signifikanten Differenzen in den einzelnen Gruppierungen (Abbildung 34b). Ausnahme bildet hierbei die IL-10 - Differenzierung in Werte unter 7,69 und über 7,69. Einzig bei Stimulation mit GM-CSF zeigten die Monozyten eine Borderline – Signifikanz in ihrem Revertierungsverhalten ($p=0,05$).

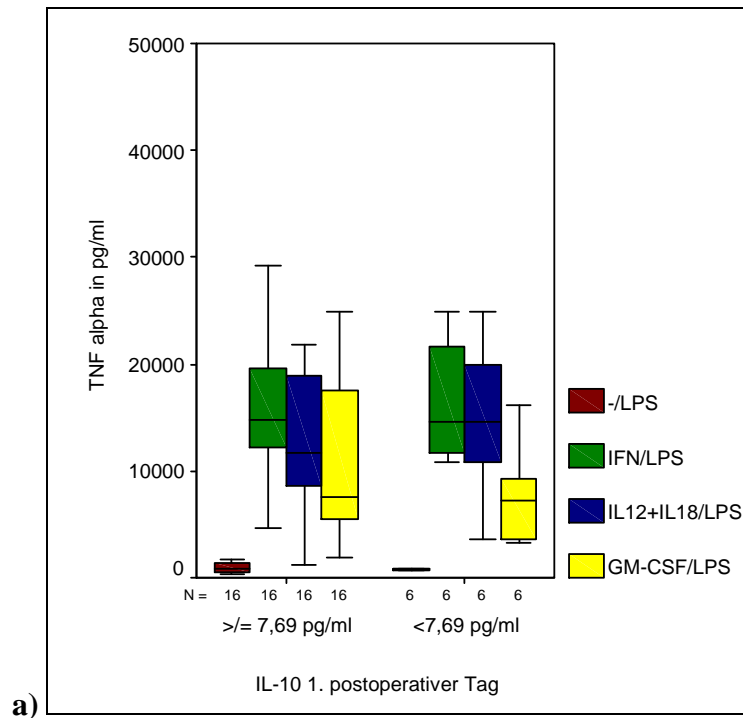


a)

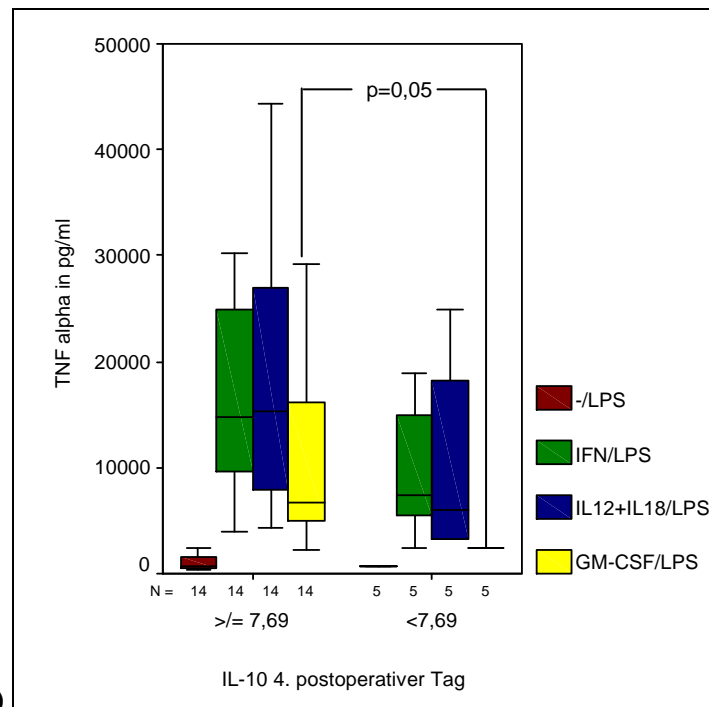


b)

Abbildung 33: a-b: In allen Gruppierungen **keine signifikanten Unterschiede** der einzelnen Stimulationsansätze entsprechend der mittels ROC - Analyse gewonnenen Cut-offs für HLA-DR und PCT am 1. postoperativen Tag.. a) HLA-DR p-Werte: -/LPS 0,824 ; IFN/LPS 0,882 ; IL12+IL18/LPS 0,552 ; GM-CSF/LPS 0,370. b) PCT p-Werte : -/LPS 0,267 ; IFN/LPS 0,165 ; IL12+IL18/LPS 0,441 ; GM-CSF/LPS 0,297.



a)



b)

Abbildung 34 a-b: a) Keine signifikante Differenzierung entsprechend der Cut – off – Werte für IL-10 am 1. postoperativen Tag; p-Werte: -/LPS 0,590 ; IFN/LPS 0,914 ; IL12+IL18/LPS 0,590 ; GM-CSF/LPS 0,494. b) Borderline Signifikanz bei der Stimulanz mit GM-CSF/LPS entsprechend der mittels ROC - Analyse gewonnenen Cut-offs IL-10 am 4. postoperativen Tag: GM-CSF/LPS 0,05. (p-Werte: -/LPS 0,964 ; IFN/LPS 0,186 ; IL12+IL18/LPS 0,219).

4 Diskussion

Bezugnehmend auf die unter 1.5 formulierten Hypothesen können folgende Aussagen getroffen werden:

1. Anhand der erhobenen Immunparameter zeigt sich eine deutliche postoperative Immundepression im kardiochirurgischen Patientenkollektiv im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auffällig ist hierbei auch eine signifikante frühzeitige immunologische Erholung (Leukozytose ↓, Granulozytose ↓, Lymphozytopenie ↑, PCT ↓, HLA-DR ↑, IL - 10↓) in der Patientengruppierung „Keine Infektion“.
2. Eine ätiologisch vergleichsweise Immunsuppression entsprechend der LPS – und IL-10/TGF-β - Desensibilisierungsmodelle durch immunmodulatorisch wirksame Faktoren im Plasma (IL – 10, TGF – β) konnte in diesem Patientenkollektiv nicht nachgewiesen werden. Dies wird belegt durch die fehlende signifikante Reduktion der TNF-α - Produktion nach LPS-Stimulation von gesunden PBMCs mit Patientenplasma, unabhängig von der jeweiligen Patientengruppierung.
3. Die durch perioperativen Stress induzierte kurzfristige Immundepression ist durch IFN - γ, IL-12/-18 und GM – CSF revertierbar, was auf eine normale T-Lymphozytenfunktion (IFN - γ Produktion nach IL-12/IL-18) und eine fehlende Aktivierung durch TGF - β in vivo hinweist. Konträr dazu Sepsispatienten, wo eine Revertierung durch IL-12/-18 bei gestörter Monozyten- und Lymphozytenfunktion nicht möglich ist, was auf eine ausgeprägtere Form der Störung hinweist.

4.1 Transiente Immundepression nach kardiochirurgischem Eingriff

Das chirurgische Trauma in Form eines kardiochirurgischen Eingriffes unter Verwendung der Herzlungenmaschine führt im Rahmen einer überschießenden systemischen Aktivierung des Immunsystems auch zu einer kurzfristigen systemischen Depression des Systems. Dieser Zustand der verminderten Immunabwehr offeriert eine erhöhte Empfänglichkeit für postoperative Infektionen und die Entstehung septischer Komplikationen. Ausführliche experimentelle und klinische Studien haben die Möglichkeit der Charakterisierung der augenblicklichen Immunkompetenz anhand von löslichen und zellulären Markern wie HLA-DR und *ex-vivo* TNF α – Bestimmung ermöglicht [41, 42, 43]. Nach einer initialen postoperativen Downregulation des monozytären Systems erholt sich das Immunsystem in der Mehrzahl der Fälle am 2. - 3. postoperativen Tag.

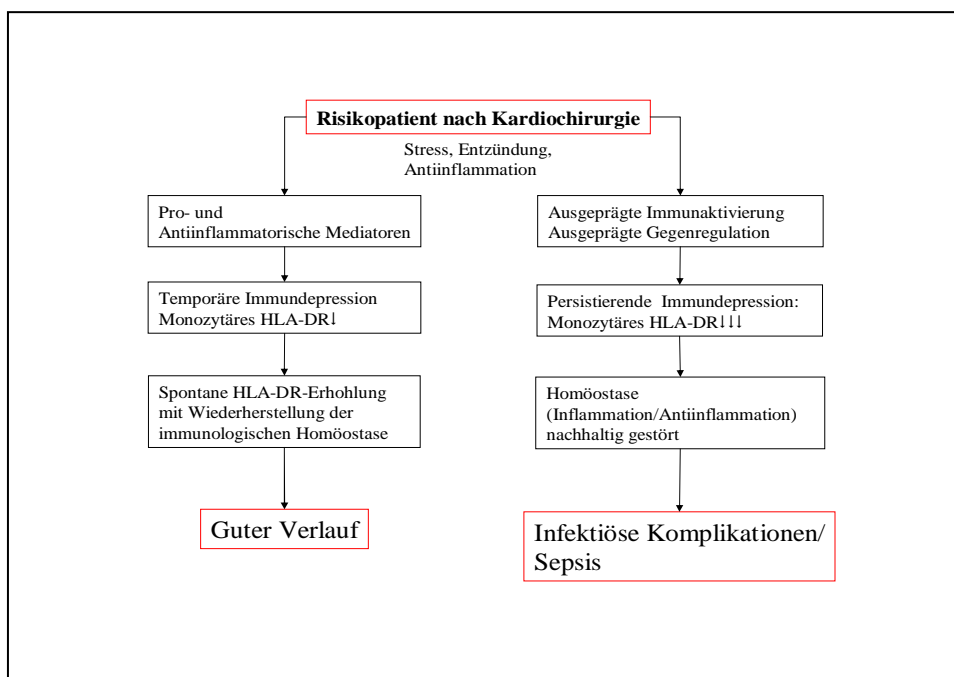


Abbildung 35: Immundepression/Sepsis nach kardiochirurgischem Eingriff
(modifiziert Strohmeyer et al. [44])

Der zum Teil parallele Ablauf von Aktivierung und Suppression erfordert zum einen die Definition des aktuellen Status der Immunkompetenz wie auch ein differenziertes Einsetzen immunmodulatorischer Therapien. Docke et al. [45] forderte schon 1997 die Differenzierung von mindestens zwei Gruppen. Zum einen Patienten mit einem Zustand der Hyperaktivität des Immunsystems, bestimmt anhand hoher TNF- α – und IL-6 - Werte im Plasma, welche

eher von einer anti-inflammatorischen Therapie profitieren. Im Gegensatz dazu, Patienten, die unter einer insuffizienten Aktivierung ihres Immunsystems leiden, beispielsweise im Rahmen einer überschießenden Gegenregulation, erhalten eher Benefiz durch eine immunstimulatorische Therapie.

So ist es Ziel der vorliegenden Studie, primär den Aktivierungszustand anhand relevanter, medizinisch anerkannter Marker zu definieren und stützend auf dem Modell der Zytokinkaskaden in „Entzündung und Sepsis“ (Abbildung 2) die Relevanz der Therapien

1. auf Ebene der IL-10/TGF- β – Inhibition
2. auf Ebene der Revertierung mit IFN γ , IL-12 und IL-18 sowie GM-CSF,

aber auch im gleichen Sinne die Übertragbarkeit der verfügbaren Modelle der in-vitro - Desensibilisierung [22] im Falle postoperativer Immundepression zu überprüfen.

4.2 Charakterisierung der Immunkompetenz

Die allgemeine Entzündungsreaktion der Studienpatienten, definiert durch eine bestehende Leukozytose wie auch durch eine prolongierte Erhöhung des Procalcitonins als Zeichen einer Endotoxämie bei den Infektionspatienten wurde von einer ausgeprägten Immundepression zum physiologischen Schutz einer überschießenden Inflammation begleitet. Insgesamt wiesen die Patienten einen erhöhten Spiegel von IL-10, eine reduzierte monozytäre HLA-DR - Expression sowie eine erniedrigte ex-vivo Produktionskapazität von TNF- α auf. Im Gegensatz zur Patientengruppe, welche im postoperativen Verlauf eine Infektion oder zumindest einen nahliegenden Verdacht eines Infektes aufwies, normalisierte sich die Immunkompetenz, gemessen am HLA-DR der Patientengruppe ohne Infektion, schneller und zeigte schon am 2. postoperativen Tag erhöhte Werte. HLA-DR ist maßgeblich an der Antigen-Präsentation auf Antigen – präsentierenden Zellen (APZ) beteiligt [46] und bildet mit der induzierten TNF- α - Produktion durch Monozyten eine wichtige Grundvoraussetzung für die Ausbildung einer adäquaten und notwendigen Entzündungsreaktion. Eine ausgeprägte Immundepression, in diesem Zusammenhang vor allem die stark erniedrigte monozytäre Expression von HLA-DR, ist sowohl in dieser als auch in zahlreichen anderen Studien mit signifikant schlechterem Krankheitsverlauf und hoher Anfälligkeit für septische Komplikationen assoziiert [5, 8, 19,

37, 47] . IL-10 zählt u.a. neben TGF- β zu den stärksten Inhibitoren des Immunsystems, indem es die T-Zellantwort via suppressivem Effekt auf APZ durch Downregulation von HLA-DR - Expression moduliert und indem es die Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen, einschließlich IL-12, verhindert [22] . Basierend auf dieser Informationsgrundlage ist die erhöhte Ausschüttung von IL-10 sowie die noch signifikante Differenz am Entlassungstag in der Gruppe „Patienten mit Infektionsverdacht bzw. bestätigter Infektion“ am ersten postoperativen Tag im Vergleich zu den „Patienten ohne Infektion“ bzw. den „Kontrollprobanden“ nicht verwunderlich.

4.3 Monozyten - Desensibilisierung durch IL-10 und TGF- β

Die LPS-Desensibilisierung beschreibt nach Randow et al. ein experimentelles Modell für den Zustand der Immundepression/Immunparalyse [21] . Monozyten, inkubiert mit einer Low - dosis LPS, verfügen über eine verminderte Kapazität zur Produktion von TNF- α nach Restimulation mit einer zweiten höheren LPS - Dosis [25, 45] . Weiterführend kann auch IL-10 und TGF- β direkt diesen Status einer LPS - Desensibilisierung induzieren [21, 48, 49] . Somit stehen zwei in-vitro - Modelle, welche einen ähnlichen Phänotyp der LPS - Desensibilisierung induzieren, zum Vergleich mit einer in-vivo - Immunsuppression zur Verfügung. Neben einer fraglichen Übertragbarkeit der in-vitro - Modelle bei noch unbekanntem suppressiven Induktionswegen innerhalb der Zytokinkaskade, sind Einflussfaktoren wie Ausmaß und Art der chirurgischen Intervention, die der Sepsis zugrundeliegenden Krankheit, Umweltfaktoren und der genetische Background zu beachten [50, 51] . Schon die durchgeführten in-vitro Vorversuche zur Bestimmung der jeweiligen IL-10 und TGF- β Konzentration zeigten einen nicht unerheblichen Einfluss der Geschlechter- und Altersstruktur auf die TNF- α - Sekretion in den entsprechenden Stimulationsansätzen. Auffallend hierbei ist eine überdimensionale Aufhebung der LPS-induzierten TNF- α - Reduktion durch die kombinierte Gabe von Antikörpern beider suppressiv wirkenden Zytokine bei jungen Männern. Dieses Phänomen ist bei Männern in der Altersgruppe über 70 Jahre nicht mehr in dieser Ausprägung gegeben. Ursachen für die geschlechterspezifischen Differenzen sind bereits in zahlreichen Studien untersucht worden. So kristallisiert sich einheitlich heraus, dass Männer, unbeachtet der Tatsache, ob posttraumatisch, postoperativ oder postinfektiös bedingt, ein schlechteres Outcome nach Sepsis aufweisen als Frauen [5, 51, 52] . Auch im Rahmen der vorliegenden kardio-

chirurgischen Studie zählen die zwei Patienten mit mikrobiologisch nachgewiesener Infektion zum männlichen Geschlecht. Als Ursachenklärung werden vor allem der unterschiedliche Gehalt an Gestagenen und Androgenen mit ihren differenzierten suppressiven und aktivierenden Wirkungen herangezogen. Im Tiermodell konnte beispielsweise durch die Applikation von 17- β -Estradiol in männliche und weibliche ovariectomierte Tiere mit hämorrhagischem Trauma eine vollständige Wiederherstellung der kardialen, hepatozellulären und auch immunologischen Funktion erreicht werden [5] . Progesteron hingegen wird eine potente inhibitorische Funktion bei der Produktion von TNF- α - Proteinen in aktivierten Makrophagen zugeschrieben [53] . Frühere Studien erbrachten den Nachweis, dass auch Rezeptoren der Geschlechtshormone auf immunologisch relevanten Zellen einschließlich Monozyten, Makrophagen und CD4+ und CD8+ - T-Zellen vertreten sind. Indirekt scheint hiermit zusätzlich eine Regulation der INF- γ - Sekretion der T/NK-Zellen als Verteidigungsmechanismus gegen pathogene Mikroorganismen vorzuliegen. Die Behauptung einer besseren femininen Immunresponse stützend, zeigte Ono et al. [54] eine reduzierte INF- γ - Produktion von PBMCs am 1. postoperativen Tag nach einem elektiven operativen Eingriff bei Männern im Vergleich zu präoperativen Werten. Die INF- γ - Spiegel, produziert von PBMCs weiblicher Patientinnen, zeigten keine Schwankungen hinsichtlich einer Reduktion im Vergleich prä- und postoperativer Werte. Ono et al.[54] vermutet aufgrund der verminderten INF- γ - Bildung postoperativ bei Männern eine höhere postoperative Infektionsrate. Vergleichende Aussagen mit der vorliegenden Studien sind hinsichtlich der INF-Produktion bei fehlenden Messungen nicht möglich. Anders gestaltet sich die Betrachtung der TNF- α - Sekretion nach erfolgter LPS - Stimulierung. Während in dieser Studie eine signifikant höhere TNF- α - Produktion bei Frauen mit hohem Infektionsverdacht vorliegt, postuliert Ono et al. eine höhere TNF- α - Produktion bei Männern. Verstärkt legt sie jedoch dabei Augenmerk auf den Vergleich zwischen prä- und postoperativen Werten, ohne eine weitere Unterteilung in spezifische Untergruppen ihrer Patientenpopulation vorzunehmen, so dass auch hier nur eingeschränkt vergleichend gearbeitet werden kann. Die monozytäre HLA-DR - Expression zeigt sich in beiden Studien stark supprimiert. Eine Differenzierung zwischen den Geschlechtern gelingt im Falle der kardiochirurgischen Patienten jedoch nicht, vielmehr imponiert erneut die Korrelation zwischen Schwere der Immuninkompetenz mit konsekutiver höherer Infektionsrate und der stark reduzierten monozytären HLA-DR - Expression. Ein genetischer Background hinsichtlich des sexuellen

Dimorphismus bei der Entstehung der Sepsis wird u.a. von Schröder et al. [51] in Betracht gezogen. Anhand der genotypischen Verteilung bei septischen Patienten von homozygoten TNFB1 bzw. homozygoten oder heterozygoten TNFB2 zwischen Männern und Frauen beweist er die erhöhte Mortalität bei Männern, welche Träger des homozygoten Genotyps TNFB2 sind. Zusammenfassend erscheint der Einfluss des Geschlechts auf immunologischer Ebene deutlich. Eine absolute Ursache, basierend auf hormonellen, zellulären oder genetischen Erklärungen, kann im Rahmen dieser Studie nicht gefunden werden. Sowohl Versuchsaufbau als auch die Anzahl der Versuchsteilnehmer lassen allgemeingültige Aussagen nicht zu, tendenzielle Reaktionsmuster sind jedoch erkennbar und im größeren Studiendesign zu diskutieren. Der in den Vorversuchen deklarierte Alterseinfluss kann in der eigentlichen kardiochirurgischen Studie nicht weiter verfolgt werden, da u.a. das Patientenalter ein Einschlusskriterium darstellte und folglich eine homogene Alterststruktur (60. bis 87. Lebensjahr) vorlag. Verthelyi et al. [52] präferieren einen Einfluss des Alters eher durch einen verringerten Aktivierungszustand der Zellen als durch eine verminderte Anzahl Zytokin - produzierender Zellen.

Zusätzlich zu den bekannten inhibitorischen Funktionen von IL-10 und TGF- β interessierte nun das Verhalten funktionsfähiger PBMCs unter Einfluss von Sera, gewonnen von Patienten nach kardiochirurgischen Eingriffen. Der Beweis der transienten postoperativen Immundepression wurde bereits anhand anerkannter Marker wie einer reduzierten monozytären HLA-DR-Expression und einer verringerten TNF- α - Produktion nach LPS - Stimulation erbracht. Die aufgestellte Hypothese - einen Anstieg der TNF- α - Produktion nach Zugabe von AK-IL-10 und AK-TGF- β bei nachfolgender LPS - Stimulation - konnte aufgrund fehlender immunsuppressiver Effektoren im gewonnenen Plasma nicht bekräftigt werden. Diesem Ergebnis steht das Vielfach in der Literatur beschriebene Phänomen der plasmalöslichen suppressiv wirkenden Faktoren im Falle der Sepsis gegenüber. Dem in-vitro Phänomen der IL-10/TGF- β - Desensibilisierung folgend, unternahm Randow et al. [21] Messungen von TNF- α , IL-10 und IL-1RA an PBMCs, gewonnen von 36 septischen Patienten, vor. Hierbei zeigte sich eine deutliche Verringerung der TNF- α - Produktion in der Gruppe von Patienten mit einer monozytären HLA-DR - Expression <30% verglichen mit zwei weiteren vorgenommenen Gruppierungen (HLA-DR 30-45% bzw. HLA-DR >45%) nach LPS - Stimulation. Interessanterweise erwies sich auch die IL-10 - Produktion als deutlich reduziert in der Gruppe der stark

verringerten HLA-DR - Expression. Das vorerst widersprüchliche Reaktionsverhalten konnte aber durch den Fakt, dass IL-10 eher essential für die Induktion einer Immundepression als für deren Erhaltung wichtig ist, erklärt werden. Der sukzessive Ablauf von primärer Immunaktivierung und sekundärer Immundepression zeigt sich normalerweise in der zeitlichen Nachweisgrenze von 10-12h für IL-10. Im Falle der Gruppe HLA-DR<45% konnte IL-10 mRNA bzw. im Überstand befindliches IL-10 jedoch bei einem Großteil der Patienten schon nach 4h signifikant detektiert werden. Resultierend aus diesen Ergebnissen, spricht der fehlende IL-10 Nachweis nach 24h für eine durch die frühe Sekretion eingeleitete selbstlimitierende Downregulation. Auch Sfeir et al.[24] unterstützen mit ihren Ergebnissen die von Randow/Schröder [21, 22] postulierte IL-10/TGF β induzierte Immundepression/ Immunparalyse im Falle von Patienten mit septischem Schock. Inkubation gesunder PBMCs mit Sera septischer Patienten zeigten unter Zugabe von AK-IL-10 einen TNF- α - Konzentrationsanstieg vergleichbar mit Werten im normalen Serum. AK-TGF- β erzielte keinen signifikanten Anstieg der TNF- α - Produktion. Die kombinierte Gabe beider Antikörper wurde in dieser Studie nicht unter Beweis gestellt. Im Rahmen der Literaturrecherche kristallisierte sich jedoch zunehmend heraus, dass der Versuch der Neutralisation von im Plasma befindlichen IL-10 und TGF- β durch entsprechende Antikörper in der Regel mit Sera septischer Patienten durchgeführt worden ist. So kann im Fall einer postoperativ (z. B. HLM) herbeigeführten Immundepression die Monozytendeaktivierung nur bedingt durch lösliche Plasmafaktoren erklärt werden und den Aussagen von Murata et al.[55] folgend, sollten „subtle modifications of reactivity of circulating cells (...) during infectious and non-infectious SIRS“ angenommen werden. Eine weiterführende Abklärung bzw. der Nachweis einer direkten Inhibition auf Ebene primärer Zellen im Knochenmark können zukünftige Studien ergeben.

4.4 Revertierung mit IFN- γ , GM-CSF und IL-12/IL-18

Der zweite Teil der Studie beschäftigt sich mit einer weiteren Entwicklung eines therapeutischen Ansatzes zur Verbesserung der Immunkompetenz mittels Verwendung von Immunstimulanzen. Im genauen fanden hierbei IFN- γ , klinisch bereits 1980 als Imukin zur Behandlung von viralen und diversen Autoimmunerkrankungen verwendet, die kombinierte Gabe von IL-12 und IL-18 sowie GM-CSF ihren Einsatz. Ohne eine Differenzierung innerhalb der Patientengruppe vorzunehmen, zeigte sich in allen drei Revertierungsmöglichkeiten eine deutliche Verbesserung der TNF- α - Produktion als Zeichen einer verbesserten Immunkompetenz nach erneuter LPS - Stimulation im gesamten Beobachtungszeitraum. Hierbei ist es so erstaunlicher, dass die kombinierte Interleukinapplikation einen ähnlichen Effekt erzielt wie IFN- γ als Direktstimulator der Monozyten, da IL-12 und IL-18 erst indirekt über eine IFN- γ - Induktion der T-/NK-Zellen wirken [22] . Bezugnehmend auf den von Schröder et al. [22] postulierten Inhibitionsweg von TGF- β auf T- und NK-Zellen scheint er im Falle von einer postoperativen transienten Immundepression nicht richtungsführend zu sein. Nach vorgenommener Differenzierung in „Patienten ohne Infektion“ bzw. „mit Verdacht und bestätigter Infektion“ zeigt sich ein ähnliches Verteilungsmuster. Trotz fehlender Signifikanz ergeben sich tendenziell erhöhte TNF- α - Werte für die Patientengruppe mit dem höchsten Infektionsrisiko in allen Revertierungsansätzen, insbesondere die Applikation von GM-CSF führt zu einem deutlichen Anstieg gegenüber der Kontrollgruppe.

GM-CSF, eingeführt in die Immuntherapie als Molgramostin, fand vorerst seinen Einsatz als hämatopoetischer Wachstumsfaktor nach myelosuppressiver Chemotherapie oder im Bereich der autologen Stammzelltransplantation. Eine Reihe von Studien, vereinzelt zusammengestellt in nachfolgender Tabelle (Tabelle 19), bewiesen jedoch sein aktivierendes Potential für Monozyten und Makrophagen. Randow et al. [26] zeigten bereits in den entwickelten in-vitro Modellen der LPS - Desensibilisierung und der LPS - Hyporesponsiveness als Imitationsmodelle für eine in-vivo stattfindende Immundepression die Fähigkeit von GM-CSF, die über zwei verschiedene Suppressionswege herbeigeführte reduzierte TNF- α - Produktion wieder anzuheben. Hingegen konnte die alleinige Gabe von IL-12 eine durch IL-10/TGF- β verminderte TNF- α - Produktion nach LPS - Stimulation nicht regenerieren. Der Versuch der kombinierten Applikation von IL-12 und IL-18 war zum damaligen Zeitpunkt noch nicht vorgenommen worden. Noch im selben Jahr konnten die in-vitro - Ergebnisse der aktivierenden

Funktion von GM-CSF durch Bundschuh et al. [25] im Mäusemodell bestätigt werden. In einer Vielzahl der Studien wurde im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit die Kompetenz bzw. der Erfolg der eingesetzten Immunmodulatoren über die prä- und postoperative monozytäre HLA-DR - Expression sowie über die ex-vivo TNF- α - Produktion im Vollblut nach Zusatz der Reagenz definiert. In der vorliegenden Arbeit wird jedoch die TNF- α - Produktion der isolierten PBMCs nach Reagenzienzugabe als Immunantwort betrachtet, so dass ein Vergleich nur begrenzt durchgeführt werden kann. Trotz statistisch eingeschränkter Komparation der einzelnen Ergebnisse, einschließlich der hier vorliegenden, scheinen jedoch alle zu zeigen, dass unterschiedliche Mechanismen im Falle von Operation, Trauma oder Sepsis eine Reduktion der Immunantwort herbeiführen. Flohe et al. [34] zeigte beispielsweise bei Zustand nach HLM einen mit gesunden Spendern vergleichbaren *postoperativen* Wert der monozytären HLA-DR - Expression und TNF- α - Produktion nach einmaliger GM-CSF - Applikation in-vitro, wohingegen nur ein geringer Anstieg der reduzierten TNF- α - Produktion, induziert durch multiple Verletzungen und Sepsis, erreicht werden konnte. Die Homogenität der Gruppe als auch die Dauer der Therapie scheinen als beispielhaft genannte Einflussfaktoren die Heterogenität der Ergebnisse zu erklären. Kontrovers dazu finden sich in der Literatur auch positive Resultate hinsichtlich des Anstiegs der HLA-DR - Expression im Falle von schwerer Sepsis und nach Polytrauma [32] . Bögermann et al. [41] wiederum untersuchte anhand von 16 Patienten, welche sich eines kardiochirurgischen Eingriffes elektiv unterzogen, die HLA-DR - Expression auf Monozyten, T- und B-Lymphozyten direkt postoperativ, am 2. und am 10. postoperativen Tag mittels Flowzytometrie. Postoperativ zeigte sich eine deutliche Reduktion der monozytären HLA-DR - Expression wie auch der B-Lymphozyten, die der T-Lymphozyten veränderte sich zu keinem Zeitpunkt im gesamten Beobachtungszeitraum. Nachfolgende in-vitro GM-CSF - Behandlung von Vollblutkulturen konnte einen signifikanten Anstieg der monozytären Expression erreichen, nicht jedoch in der Gruppe der B-Lymphozyten. Wiederum scheinen die T-Zellen nicht in ihrer Funktion als Signalinduktor beeinflusst zu sein, so dass die hohe TNF- α - Produktion nach INF- γ und IL-12/IL-18 erklärbar ist. Interessanter Weise beschreibt keine dieser Studien eine überschießende Zytokinproduktion nach GM-CSF - Applikation mit toxischen Effekten wie z.T. bei IFN- γ - Therapie gezeigt wurde [45] . Einschränkend muss hier jedoch erwähnt werden, dass im Rahmen der individualisierten Immunstrategien unter Beachtung des jeweiligen aktiven oder supprimierten Immunstatus sich die Ergebnisse relativieren [56, 57]

Tabelle 17: IFN- γ

Autor	Studiendesign	Material & Methoden	Ergebnis
Livingston et al., 1988 [58]	in vivo Tiermodell (Ratte)	Applikation von Staph. aureus IFN- γ 7500 Units Einzeldosis Messgröße: Abszessgröße Zeitpunkt: 30min – 3. postoperative Tag	Keine Veränderung in Abszessgröße bei Tieren nach IFN- γ - Gabe
Döcke et al., 1997 [45]	in vivo Humanmodell	9 Patienten mit Sepsis, IFN- γ 100 μ g/Tag Meßgröße: Monozytäre HLA-DR-Expression Zeitpunkt: 1.-2.postoperative Tag	8 Pat.: Rekonvaleszenz 2 Pat.: Rückfall 1 Pat.: Todesfall (Sepsis)
Metz et al., 2004 [57]	in vitro Humanmodell	13 Patienten postoperativ IFN- γ 100 μ g/m ² /PBMC Messgröße: Monozytäre HLA-DR-Expression Zeitpunkt: 24h Inkubationszeit	HLA-DR Expression von 54% auf 92% gestiegen

Tabelle 18: IL-12/IL-18

Autor	Studiendesign	Material & Methoden	Ergebnis
Chang et al., 2000 [59]	in vitro	Stimulation naiver T-Zellen von IL-12-/-Mäusen mit IL-18 30 ng/ml	Keine IFN- γ - Produktion, aber erhöhte Produktion von IL-12 – R β 2
Golab et al., 2000 [60]	in vitro Tiermodell (Mäuse)	Peritoneale Zellexsudate IL-12 10ng/ml; IL-18 50ng/ml/PBMC Messgröße: IFN- γ Zeitpunkt: 72h	Deutlich erhöhte IFN- γ - Produktion nur nach kombinierter Gabe von IL-12/IL-18
Hiraki et al., 2007 [61]	in vitro Humanmodell	32 Pat. postoperativ/26 Septiker IL-12 20ng/ml und/oder IL-18/PBMC Messgröße: IFN- γ Zeitpunkt: 1./5./10./15. postoperativer Tag	Signifikante Erhöhung IFN- γ - Produktion nach kombinierter Gabe von IL-12/IL-18 in Gruppe der postoperativen Patienten, nicht bei den Septikern

Tabelle 19: GM-CSF

Autor	Studiendesign	Material & Methoden	Ergebnis
Bundschuh et al, 1997 [25]	in vitro/in vivo Tiermodell (Mäuse)	12 LPS-tolerante Mäuse, GM-CSF 50µg/kg, IFN 50µg/kg Messgröße: TNF-α - Produktion Zeitpunkt: 72h nach Applikation	Erhöhung der LPS-induzierten TNF-α - Produktion nach GM-CSF, IFN-γ
Randow et al., 1997 [26]	in vitro	Modell d. LPS-Desensibilisierung, IL-10/TGF-β -Desensibilisierung, IL-12 50ng/ml , IFN-γ 1200U/ml, GM-CSF 50ng/ml/PBMC (gesund) Messgröße: TNF-α - Produktion Zeitpunkt: 24h/48h Inkubationszeit	Aufhebung LPS-Desensibilisierung u. LPS-Hyporesponsiveness: IFN-γ/GM-CSF Aufhebung LPS-Desensibilisierung:IL-12
Flohe et al., 1999 [34]	in vitro Humanmodell	Vergleich Patienten nach HLM (9), Polytrauma (9), Sepsis (9) GM-CSF 1,10,100ng/ml/Vollblut+ LPS-Stimulation 100ng/ml Messgröße: HLA-DR-Expression, TNF-α - Produktion Zeitpunkt: 24h/28h Inkubationszeit	HLA-DR-Expression/TNF-α - Produktion bei Polytrauma/Sepsis: niedriger Anstieg <i>ex vivo</i> TNF-α - Produktion als in HLM - Gruppe
Bilgin et al., 2001 [62]	in vivo Humanmodell	60 Neugeborene mit Sepsis und Neutropenie GM-CSF 5µg/kg/d bis 7. Tag Messgröße: Blutbild, Outcome	Senkung der Mortalität und Dauer der Hospitalisierung
Nierhaus et al., 2003 [32]	in vivo Humanmodell	9 Patienten mit schwerer Sepsis, GM-CSF 5µg/kg/d bis 3.postoperativen Tag Messgröße: HLA-DR-Expression, <i>ex vivo</i> TNF-α - Produktion Zeitpunkt: 1.-10.d nach Applikation	Innerhalb von 24h Anstieg HLA-DR- Expression, Erhöhung <i>ex-vivo</i> TNF-α - Produktion
Lendemans et al., 2006 [63]	in vitro Humanmodell	6 Patienten nach Polytrauma GM-CSF, IFN-γ 10ng/ml/Vollblut Messgröße: TNF-α, IL-10, HLA-DR Zeitpunkt: 6h Inkubationszeit	Erhöhung monozytäre HLA-DR Expression u. <i>ex-vivo</i> TNF-α - Produktion
Börgermann et al., 2007 [41]	in vitro Humanmodell	16 Patienten nach CPB, GM-CSF 100ng/ml/Vollblut Messgröße: HLA-DR auf Monozyten, B-u. T-Lymphozyten Zeitpunkt: prä-, post-op, 2. POD, 10. POD	Monozyten: Erhöhung HLA-DR - Expression B-Lymphozyten: keine Erhöhung

Die im in-vitro - Modell gewonnenen Ergebnisse hinsichtlich der Revertierbarkeit einer monozytären Desensibilisierung durch IL-12/IL-18 sollten mit der in-vivo - Situation einer postoperativen Immundepression verglichen werden. Auf die partielle Übertragbarkeit der Ergebnisse konnte schon Golab et al. [60] in seinem Tiermodell verweisen, indem er eine deutlich erhöhte INF-γ - Produktion nach kombinierter Stimulation mit IL-12/18 erreichte. Für die

kombinierte Gabe von beiden Interleukinen plädiert auch Hiraki et al. [61], welcher Patienten nach elektiver Operation mit septischen Patienten verglich und dabei keinen Anstieg der Interferon- γ - Produktion nach IL-12 in beiden Gruppen vorweisen konnte. Interessanterweise steigerte sich die INF- γ - Produktion nach simultaner Gabe von Interleukin 12/18 nur in der Gruppe der Patienten mit definierter postoperativer Immundepression, nicht in der Gruppe der Septiker. Ursächlich hierfür ist entsprechend Hiraki et al. [61] eine verminderte IL-18R Expression auf die quantitativ identischen NK-Zellen in der Gruppe der Septiker. Daraus resultiert aus vorerst widersprüchlich erhöhtem IL-18 - Serumlevel bei Septikern eine IFN- γ - Hyporesponsiveness bei Downregulation von IL-18R auf CD56+NK-Zellen. Für einen vollständigen Vergleich mit dieser Studie bzw. Ergebnissen der Arbeitsgruppe um Buhl und Schröder besteht sowohl eine Differenz der Messzeitpunkte als auch eine fehlende LPS - Stimulation nach 48h mit nachfolgender Messung von INF- γ und TNF- α im Überstand. Jedoch zeigen die Resultate von Buhl et al. kontrovers zum vorher gesagten bei der in-vitro Stimulation von PBMCs septischer Patienten eine signifikante Erhöhung der TNF- α - und Interferon- γ - Produktion am ersten Messzeitpunkt unter gleichzeitiger Gabe von IL-12 und IL-18 nach Stimulation mit LPS, wobei in diesem Fall ein bimodales Verteilungsmuster von TNF- α -High- und Low - Producer ersichtlich wird. Einschränkend muss jedoch die geringe Stichprobenzahl (8) erwähnt werden, so dass lediglich eine Annahme ausgesprochen wurde (*Promotionsarbeit*).

Im Vergleich zu den in der Literatur beschriebenen Versuchen zur Reaktivierung von in-vivo - desensibilisierten Monozyten durch Trauma, Sepsis, Operation etc. zeigt sich, dass die in vivo desensibilisierten Zellen sich sowohl bezüglich der TNF- α - Produktion (diese Studie, [22]) wie auch der IFN- γ - Produktion [22, 61] unter den beschriebenen Kulturbedingungen zum Teil anders verhielten als Zellen, die in vitro eine Desensibilisierung durch LPS oder IL-10/TGF- β durchlaufen haben. Bezugnehmend auf die vorliegende Studie lässt sich ein Desensibilisierungsprozess entsprechend des in-vitro - Modells der reinen LPS - Desensibilisierung vermuten, da die in-vivo bestehende Immundepression durch INF- γ , GM-CSF als auch IL-12/18 aufgehoben werden konnte. Die gezeigten Daten unter Beachtung der derzeitigen Literaturlage machen jedoch deutlich, dass es für eine Untersuchung der verschiedenen bei der Entstehung einer Immundepression/Immunparalyse beteiligten Mechanismen notwendig ist, die zu untersuchenden Patienten entsprechend der Ursache der Immuninkompetenz in weitere

Untergruppen (posttraumatisch, postoperativ, postinfektiös etc.) zu unterteilen, um pathogenetisch unterschiedliche Entitäten zu berücksichtigen. LPS- oder IL-10/TGF- β - Desensibilisierung stellen möglicherweise nur für einen Teil der untersuchten Patienten ein adäquates in-vitro – Modell dar.

Tabelle 20: Zusammenfassung der in-vitro - Modelle zur Darstellung der Immundepression/Immunparalyse. Bisherige Ergebnisse der fraglichen Übertragbarkeit in-vivo. Die fett gedruckten Werte entsprechen den Ergebnissen dieser Studie

	Inhibition durch	Revertierung durch IFN- γ	Revertierung durch IL-12	Revertierung durch IL-12/18	Revertierung durch GM-CSF
In-vitro	LPS-Desensibilisierung (Schröder et al. [22])	+ (TNF- α)	+ (TNF- α) + (IFN- γ)	+ (TNF- α) - (IFN- γ)	+ (TNF- α) ?
	IL-10 Desensibilisierung (Schröder et al. [22])	+ (TNF- α)	- (TNF- α) - (IFN- γ)	+ (TNF- α) - (IFN- γ)	?
	TGF- β Desensibilisierung (Schröder et al. [22])	+ (TNF- α)	- (TNF- α) + (IFN- γ)	- (TNF- α) - (IFN- γ)	?
	IL-10/TGF- β Desensibilisierung (Schröder et al. [22])	+ (TNF- α)	- (TNF- α) - (IFN- γ)	- (TNF- α) - (IFN- γ)	?
In- vitro	Septiker (Buhl et al.)	+ (TNF- α)	- (TNF- α) - (IFN- γ)	+ (TNF- α) + (IFN- γ)	?
	Septiker (Peritonitis) (Hiraki et al. [61])		? - (IFN- γ)*	? - (IFN- γ)*	?
	Polytrauma (Lendemans et al.[63])	+ (TNF- α)			+ (TNF- α)
	Pat. nach abdomineller elektiver OP (Hiraki et al. [61])	- (TNF- α)*	? - (IFN- γ)*	? + (IFN- γ)*	?
	Pat. nach kardiochirurgischer OP (Thiele)	+ (TNF- α)	?	+ (TNF-α) ?	+ (TNF-α) ?

*Keine LPS-Stimulation nach 24h vorgenommen

4.5 Immunmarker für die Prädiktion von postoperativen Infektionen und Revertierungsverhalten

Von besonderer klinischer Relevanz im Zusammenhang mit den Veränderungen auf Mediatorenebene während systemischer Immunaktivierung und Immundepression ist die Frage, welches prädiktive Potenzial immunologische Parameter hinsichtlich ihrer Eignung als diagnostische Infektionsmarker haben. Hierbei konnten die Ergebnisse von Strohmeyer et al.[44] bei identischer Patientenpopulation, jedoch unterschiedlicher Gruppierung, zum Teil bestätigt werden. Wie auch bei Strohmeyer erwiesen sich die monozytäre HLA-DR - Expression und IL-10 am 1. postoperativen Tag als Marker mit dem größten Diskriminierungspotenzial bei einer jeweiligen Fläche unter ROC - Kurve (AUC) für HLA-DR von 0,700 (Cut-off 8195AB/cell) und für IL-10 von 0,785 (Cut-off 7,69pg/dl). Zusätzlich unterstrich Strohmeyer et al. in seinen Auswertungen die Ineffektivität der konventionellen klinischen Infektionsparameter wie CRP und die SIRS - Kriterien. Inwiefern HLA-DR, IL-10 oder auch PCT mit ihren definierten Cut-offs am 1. postoperativen Tag signifikante Aussagen über das Revertierungsverhalten treffen können, zeigten durchgeführte Korrelationen. Dabei stellte sich jedoch heraus, dass in keiner der Gruppierungen ein signifikanter Unterschied innerhalb der einzelnen Stimulationsansätze nachgewiesen werden konnte und somit die erwähnten Marker in dieser Patientenpopulation am 1. und auch 4. postoperativen Tag keine potentielle Vorhersage über ein mögliches Revertierungsverhalten treffen können. Die Frage, ob dieses fehlende Vorhersagepotential auf die geringe Stichprobenzahl bzw. die spezifische Patientenpopulation oder auf das schon in den Vorversuchen dargestellte nicht signifikant unterschiedliche Revertierungsverhalten zurückzuführen ist, muss in größeren Studienformaten abgeklärt werden.

4.6 Einschränkende Aspekte der Auswertungen

Vor dem Hintergrund der beschriebenen Verteilung der Einzelmesswerte muss bei der Auswertung der hier diskutierten Ergebnisse beachtet werden, dass bei der kleinen Zahl der Experimente trotz des Einsatzes von Tests für nicht - parametrische Verteilungen die Gefahr besteht, wichtige Informationen zu übersehen oder Schlüsse aus den vorliegenden Daten zu ziehen, die von denen aus einer größeren Stichprobe entscheidend abweichen.

Einschränkend muss in bezug auf die vorliegenden Ergebnisse in erster Linie die geringe Stichprobenzahl angemerkt werden, die sich vor allem durch strikte Einschlusskriterien für die einzelnen Gruppierungen „Kein Infekt“ und „Verdacht auf Infekt“ ergeben haben. Dahingehend erfolgte eine Dezimierung der ehemals 33 eingeschlossenen auf 22 Patienten. Aufgrund dessen konnten bei einigen Items allenfalls Annahmen bzw. Tendenzen (z. B. Geschlechtereinfluss) ohne statistische Untermauerung angeführt werden.

Auch muss eingrenzend erwähnt werden, dass die *ex-vivo* TNF- α –Messungen nur eine stark reduzierte Stichprobenzahl aufweisen. Ursächlich hierfür ist die im Nachhinein festgestellte Verunreinigung einer verwendeten Charge.

Des Weiteren unterliegt der erste Teil der Studie hinsichtlich einer möglichen Deaktivierung durch IL-10 und TGF- β zahlreichen Einflussfaktoren, welche nur bedingt im Versuchsaufbau beachtet werden konnten. Hauptaugenmerk hierbei liegt auf den Low- und High - Producern innerhalb der TNF- α - Produktivität nach LPS - Stimulation, welche schon im Bereich gesunder PBMC - Spender ein breites Spektrum offerieren. Sowohl Doppelansätze als auch das statistische Auswertungsverfahren der Varianzanalyse mit zufälligen Effekten sollten diesen Fehler minimieren.

Insgesamt erfolgte in beiden Versuchsaufbauten nur die Untersuchung der Desensibilisierungs- und Revertierungsphänomene auf Ebene der Zytokinproduktion im Überstand nach LPS - Stimulation. Anlehnend an beschriebene Studien wurden zwar Proben zur mRNA - Analysen mit Untersuchung der Zytokin - Genexpression gesondert gesammelt, die Auswertung ist jedoch Thema einer nachfolgenden Arbeit und soll hier nicht besprochen werden.

4.7 Therapeutischer Ausblick

Trotz vielfältiger Ergebnisse experimenteller und klinischer Studien konvergieren sie jedoch alle im Hinblick auf die Notwendigkeit einer ausgewogenen Homöostase zwischen Inflammation und Anti-Inflammation nach elektiven chirurgischen Eingriffen zur Vermeidung postoperativ bedingter Infektexazerbationen oder die Entwicklung einer Sepsis. Neben den bereits formulierten Hauptaussagen zeigt die vorliegende Studie erneut, dass neben der bekannten chirurgischen und medikamentösen Intervention auch eine immunmodulatorische Therapie durchaus ihre Berechtigung haben kann. Um jedoch durch eine effektive Therapie

sowohl der hyperinflammatorischen Phase (SIRS, Sepsis) als auch der sekundären, ggf. transienten Immundefizienz (MARS, CARS) mit GM-CSF, INF- γ und IL-12/18 zum richtigen Zeitpunkt begegnen zu können, müssen diese anhand des klinischen Bildes nicht sofort zu trennende Syndrome zunächst immunologisch differenziert werden. Erst dann wird geeigneten Subgruppen von Patienten und gemäß eines optimalen Zeit- und Dosierungsschema die immunmodulatorische Substanz erfolgversprechend appliziert werden können. Richtungsweisend hierfür sind bereits begonnene Studien mit Prüfung der Übertragbarkeit der bekannten in-vitro - Modelle auch unter Nutzung anderer immunmodulatorischer Substanzen wie G-CSF [64] , IGF-1 [65] oder dem Steroidhormon Dehydroepiandrosteron [66] . Auch bedarf es größerer Studenumfänge zur Einschätzung bekannter Einflussfaktoren wie Geschlecht, Alter, auslösendes Ereignis oder Schwere der vorliegenden Verletzungen, um einen adäquaten Einsatz der immunmodulatorischen Substanz zeitgerecht ohne den häufig diskutierten „cytokine storm“ [67] zu initiieren. Schon Strohmeyer et al. [44] postuliert ein mögliches immunologisches Monitoring anhand Immunmarkern wie monozytäres HLA-DR, Plasma-IL-10, total IL-8 und *ex-vivo* Elastase am 1. postoperativen Tag mit hoher diskriminativer Aussagekraft zur perspektivischen Einschätzung infektiöser Komplikationen vor klinischer Manifestation. In weiteren prospektiven Multicenterstudien unter Verwendung hochstandardisierter Messmethoden sollten diese und weitere Marker sowie eine entsprechende effektvolle Immunstimulanz wie GM-CSF in der klinischen Praxis etabliert und eingesetzt werden.

5 Anhang

5.1 Literaturverzeichnis

- [1] Volk, H. D.; Reinke, P. und Docke, W. D. (2000): Clinical aspects: from systemic inflammation to 'immunoparalysis', Chem Immunol (Band 74), Seite 162-77. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10608087
- [2] Bone, R. C. (1996): Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS, Crit Care Med (Band 24), Nr. 7, Seite 1125-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8674323
- [3] Levy, M. M.; Fink, M. P.; Marshall, J. C.; Abraham, E.; Angus, D.; Cook, D.; Cohen, J.; Opal, S. M.; Vincent, J. L. und Ramsay, G. (2003): 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference, Crit Care Med (Band 31), Nr. 4, Seite 1250-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12682500
- [4] Bone, R. C.; Grodzin, C. J. und Balk, R. A. (1997): Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process, Chest (Band 112), Nr. 1, Seite 235-43. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9228382
- [5] Angele, M. K. und Faist, E. (2002): Clinical review: immunodepression in the surgical patient and increased susceptibility to infection, Crit Care (Band 6), Nr. 4, Seite 298-305. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12225603
- [6] Angus, D. C. und Wax, R. S. (2001): Epidemiology of sepsis: an update, Crit Care Med (Band 29), Nr. 7 Suppl, Seite S109-16. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11445744
- [7] Goris, R. J. (1996): MODS/SIRS: result of an overwhelming inflammatory response?, World J Surg (Band 20), Nr. 4, Seite 418-21. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8662124
- [8] Volk, H. D. (2002): Immunodepression in the surgical patient and increased susceptibility to infection, Crit Care (Band 6), Nr. 4, Seite 279-81. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12225595
- [9] Reinke, P. und Volk, H. D. (1992): Diagnostic and predictive value of an immune monitoring program for complications after kidney transplantation, Urol Int (Band 49), Nr. 2, Seite 69-75. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1441015

-
- [10] Hall, R. I.; Smith, M. S. und Rucker, G. (1997): The systemic inflammatory response to cardiopulmonary bypass: pathophysiological, therapeutic, and pharmacological considerations, *Anesth Analg* (Band 85), Nr. 4, Seite 766-82. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9322454
- [11] Cohen, J. (2002): The immunopathogenesis of sepsis, *Nature* (Band 420), Nr. 6917, Seite 885-91. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12490963
- [12] Schumann, R. R. und Latz, E. (2000): Lipopolysaccharide-binding protein, *Chem Immunol* (Band 74), Seite 42-60. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10608081
- [13] Rinder, C. S.; Mathew, J. P.; Rinder, H. M.; Tracey, J. B.; Davis, E. und Smith, B. R. (1997): Lymphocyte and monocyte subset changes during cardiopulmonary bypass: effects of aging and gender, *J Lab Clin Med* (Band 129), Nr. 6, Seite 592-602. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9178725
- [14] Kox, W. J.; Volk, T.; Kox, S. N. und Volk, H. D. (2000): Immunomodulatory therapies in sepsis, *Intensive Care Med* (Band 26 Suppl 1), Seite S124-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10786969
- [15] Asadullah, K.; Woiciechowsky, C.; Docke, W. D.; Liebenthal, C.; Wauer, H.; Kox, W.; Volk, H. D.; Vogel, S. und Von Baehr, R. (1995): Immunodepression following neurosurgical procedures, *Crit Care Med* (Band 23), Nr. 12, Seite 1976-83. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7497720
- [16] Borovikova, L. V.; Ivanova, S.; Zhang, M.; Yang, H.; Botchkina, G. I.; Watkins, L. R.; Wang, H.; Abumrad, N.; Eaton, J. W. und Tracey, K. J. (2000): Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin, *Nature* (Band 405), Nr. 6785, Seite 458-62. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10839541
- [17] Vincent, Jean -Louis (2002): *The sepsis text*, Kluwer Academic Publisher Group, Norwell, ISBN: 0-7923-7620.
- [18] Hoflich, C. und Volk, H. D. (2002): [Immunomodulation in sepsis], *Chirurg* (Band 73), Nr. 11, Seite 1100-4. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12430060
- [19] Hensler, T.; Hecker, H.; Heeg, K.; Heidecke, C. D.; Bartels, H.; Barthlen, W.; Wagner, H.; Siewert, J. R. und Holzmann, B. (1997): Distinct mechanisms of immunosuppression as a consequence of major surgery, *Infect Immun* (Band 65), Nr. 6, Seite 2283-91. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9169765

-
- [20] Carlei, F.; Schietroma, M.; Cianca, G.; Risetti, A.; Mattucci, S.; Ngome Enang, G. und Simi, M. (1999): Effects of laparoscopic and conventional (open) cholecystectomy on human leukocyte antigen-DR expression in peripheral blood monocytes: correlations with immunologic status, *World J Surg* (Band 23), Nr. 1, Seite 18-22. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9841758
- [21] Randow, F.; Syrbe, U.; Meisel, C.; Krausch, D.; Zuckermann, H.; Platzer, C. und Volk, H. D. (1995): Mechanism of endotoxin desensitization: involvement of interleukin 10 and transforming growth factor beta, *J Exp Med* (Band 181), Nr. 5, Seite 1887-92. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7722463
- [22] Schroder, M.; Meisel, C.; Buhl, K.; Profanter, N.; Sievert, N.; Volk, H. D. und Grutz, G. (2003): Different modes of IL-10 and TGF-beta to inhibit cytokine-dependent IFN-gamma production: consequences for reversal of lipopolysaccharide desensitization, *J Immunol* (Band 170), Nr. 10, Seite 5260-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12734375
- [23] Wolk, K.; Docke, W.; von Baehr, V.; Volk, H. und Sabat, R. (1999): Comparison of monocyte functions after LPS- or IL-10-induced reorientation: importance in clinical immunoparalysis, *Pathobiology* (Band 67), Nr. 5-6, Seite 253-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10725796
- [24] Sfeir, T.; Saha, D. C.; Astiz, M. und Rackow, E. C. (2001): Role of interleukin-10 in monocyte hyporesponsiveness associated with septic shock, *Crit Care Med* (Band 29), Nr. 1, Seite 129-33. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11176172
- [25] Bundschuh, D. S.; Barsig, J.; Hartung, T.; Randow, F.; Docke, W. D.; Volk, H. D. und Wendel, A. (1997): Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and IFN-gamma restore the systemic TNF-alpha response to endotoxin in lipopolysaccharide-desensitized mice, *J Immunol* (Band 158), Nr. 6, Seite 2862-71. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9058823
- [26] Randow, F.; Docke, W. D.; Bundschuh, D. S.; Hartung, T.; Wendel, A. und Volk, H. D. (1997): In vitro prevention and reversal of lipopolysaccharide desensitization by IFN-gamma, IL-12, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, *J Immunol* (Band 158), Nr. 6, Seite 2911-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9058829
- [27] Okamura, H.; Tsutsi, H.; Komatsu, T.; Yutsudo, M.; Hakura, A.; Tanimoto, T.; Torigoe, K.; Okura, T.; Nukada, Y.; Hattori, K. und et al. (1995): Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells, *Nature* (Band 378), Nr. 6552, Seite 88-91. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7477296

-
- [28] Munder, M.; Mallo, M.; Eichmann, K. und Modolell, M. (2001): Direct stimulation of macrophages by IL-12 and IL-18 - a bridge built on solid ground, *Immunol Lett* (Band 75), Nr. 2, Seite 159-60. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11137142
- [29] Nakanishi, K.; Yoshimoto, T.; Tsutsui, H. und Okamura, H. (2001): Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses, *Annu Rev Immunol* (Band 19), Seite 423-74. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11244043
- [30] Spolarics, Z.; Siddiqi, M.; Siegel, J. H.; Garcia, Z. C.; Stein, D. S.; Denny, T. und Deitch, E. A. (2003): Depressed interleukin-12-producing activity by monocytes correlates with adverse clinical course and a shift toward Th2-type lymphocyte pattern in severely injured male trauma patients, *Crit Care Med* (Band 31), Nr. 6, Seite 1722-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12794411
- [31] Asadullah, K.; Sterry, W.; Stephanek, K.; Jasulaitis, D.; Leupold, M.; Audring, H.; Volk, H. D. und Docke, W. D. (1998): IL-10 is a key cytokine in psoriasis. Proof of principle by IL-10 therapy: a new therapeutic approach, *J Clin Invest* (Band 101), Nr. 4, Seite 783-94. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9466973
- [32] Nierhaus, A.; Montag, B.; Timmler, N.; Frings, D. P.; Gutensohn, K.; Jung, R.; Schneider, C. G.; Pothmann, W.; Brassel, A. K. und Schulte Am Esch, J. (2003): Reversal of immunoparalysis by recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with severe sepsis, *Intensive Care Med* (Band 29), Nr. 4, Seite 646-51. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12595977
- [33] Presneill, J. J.; Waring, P. M.; Layton, J. E.; Maher, D. W.; Cebon, J.; Harley, N. S.; Wilson, J. W. und Cade, J. F. (2000): Plasma granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor levels in critical illness including sepsis and septic shock: relation to disease severity, multiple organ dysfunction, and mortality, *Crit Care Med* (Band 28), Nr. 7, Seite 2344-54. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10921563
- [34] Flohe, S.; Borgermann, J.; Dominguez, F. E.; Majetschak, M.; Lim, L.; Kreuzfelder, E.; Obertacke, U.; Nast-Kolb, D. und Schade, F. U. (1999): Influence of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) on whole blood endotoxin responsiveness following trauma, cardiopulmonary bypass, and severe sepsis, *Shock* (Band 12), Nr. 1, Seite 17-24. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10468047
- [35] Volk, H. D.; Reinke, P.; Krausch, D.; Zuckermann, H.; Asadullah, K.; Muller, J. M.; Docke, W. D. und Kox, W. J. (1996): Monocyte deactivation--rationale for a new

-
- therapeutic strategy in sepsis, *Intensive Care Med* (Band 22 Suppl 4), Seite S474-81. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8923092
- [36] Hill, G. E. (1996): The inflammatory response to cardiopulmonary bypass, *Int Anesthesiol Clin* (Band 34), Nr. 2, Seite 95-108. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8799748
- [37] Hill, G. E. (1998): Cardiopulmonary bypass-induced inflammation: is it important?, *J Cardiothorac Vasc Anesth* (Band 12), Nr. 2 Suppl 1, Seite 21-5. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9583572
- [38] Hill, G. E.; Whitten, C. W. und Landers, D. F. (1997): The influence of cardiopulmonary bypass on cytokines and cell-cell communication, *J Cardiothorac Vasc Anesth* (Band 11), Nr. 3, Seite 367-75. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9161906
- [39] Landow, L. und Andersen, L. W. (1994): Splanchnic ischaemia and its role in multiple organ failure, *Acta Anaesthesiol Scand* (Band 38), Nr. 7, Seite 626-39. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7839769
- [40] Brunner, Edgar (1999): *Nichtparametrische Analyse longitudinaler Daten R*. Oldenbourg Verlag, München, ISBN: 3-486-24915-0.
- [41] Borgermann, J.; Friedrich, I.; Scheubel, R.; Kuss, O.; Lendemans, S.; Silber, R. E.; Kreuzfelder, E. und Flohe, S. (2007): Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) restores decreased monocyte HLA-DR expression after cardiopulmonary bypass, *Thorac Cardiovasc Surg* (Band 55), Nr. 1, Seite 24-31. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17285470
- [42] Flohe, S.; Flohe, S. B.; Schade, F. U. und Waydhas, C. (2007): Immune response of severely injured patients - influence of surgical intervention and therapeutic impact, *Langenbecks Arch Surg* (Band 392), Nr. 5, Seite 639-48. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17605036
- [43] Grundmann, U.; Rensing, H.; Adams, H. A.; Falk, S.; Wendler, O.; Ebinger, N. und Bauer, M. (2000): Endotoxin desensitization of human mononuclear cells after cardiopulmonary bypass: role of humoral factors, *Anesthesiology* (Band 93), Nr. 2, Seite 359-69. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10910482
- [44] Strohmeyer, J. C.; Blume, C.; Meisel, C.; Doecke, W. D.; Hummel, M.; Hoeflich, C.; Thiele, K.; Unbehau, A.; Hetzer, R. und Volk, H. D. (2003): Standardized immune monitoring for the prediction of infections after cardiopulmonary bypass surgery in risk patients, *Cytometry B Clin Cytom* (Band 53), Nr. 1, Seite 54-62. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12717692

-
- [45] Docke, W. D.; Randow, F.; Syrbe, U.; Krausch, D.; Asadullah, K.; Reinke, P.; Volk, H. D. und Kox, W. (1997): Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment, *Nat Med* (Band 3), Nr. 6, Seite 678-81. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9176497
- [46] Wolk, K.; Kunz, S.; Crompton, N. E.; Volk, H. D. und Sabat, R. (2003): Multiple mechanisms of reduced major histocompatibility complex class II expression in endotoxin tolerance, *J Biol Chem* (Band 278), Nr. 20, Seite 18030-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12637533
- [47] Menger, M. D. und Vollmar, B. (2004): Surgical trauma: hyperinflammation versus immunosuppression?, *Langenbecks Arch Surg* (Band 389), Nr. 6, Seite 475-84. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15173946
- [48] Cavaillon, J. M. (1994): Cytokines and macrophages, *Biomed Pharmacother* (Band 48), Nr. 10, Seite 445-53. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7858154
- [49] Cavaillon, J. M.; Fitting, C. und Adib-Conquy, M. (2004): Mechanisms of immunodysregulation in sepsis, *Contrib Nephrol* (Band 144), Seite 76-93. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15264400
- [50] Ono, S.; Aosasa, S.; Tsujimoto, H.; Ueno, C. und Mochizuki, H. (2001): Increased monocyte activation in elderly patients after surgical stress, *Eur Surg Res* (Band 33), Nr. 1, Seite 33-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11340270
- [51] Schroder, J.; Kahlke, V.; Book, M. und Stuber, F. (2000): Gender differences in sepsis: genetically determined?, *Shock* (Band 14), Nr. 3, Seite 307-10; discussion 310-3. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11028548
- [52] Verthelyi, D. und Klinman, D. M. (2000): Sex hormone levels correlate with the activity of cytokine-secreting cells in vivo, *Immunology* (Band 100), Nr. 3, Seite 384-90. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10929062
- [53] Miller, L. und Hunt, J. S. (1998): Regulation of TNF-alpha production in activated mouse macrophages by progesterone, *J Immunol* (Band 160), Nr. 10, Seite 5098-104. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9590261
- [54] Ono, S.; Tsujimoto, H.; Hiraki, S.; Takahata, R.; Kinoshita, M. und Mochizuki, H. (2005): Sex differences in cytokine production and surface antigen expression of peripheral blood mononuclear cells after surgery, *Am J Surg* (Band 190), Nr. 3, Seite 439-44. URL:

-
- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16105533
- [55] Murata, A.; Kikuchi, M.; Mishima, S.; Sakaki, S.; Goto, H.; Matsuoka, T.; Tanaka, H.; Yukioka, T. und Shimazaki, S. (1999): [Cytokine imbalance in critically ill patients: SIRS and CARs], *Nippon Geka Gakkai Zasshi* (Band 100), Nr. 7, Seite 414-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10481845
- [56] Flohe, S.; Lendemans, S.; Schade, F. U.; Kreuzfelder, E. und Waydhas, C. (2004): Influence of surgical intervention in the immune response of severely injured patients, *Intensive Care Med* (Band 30), Nr. 1, Seite 96-102. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14605804
- [57] de Metz, J.; Romijn, J. A.; Endert, E.; Ackermans, M. T.; Weverling, G. J.; Busch, O. R.; de Wit, L. T.; Gouma, D. J.; ten Berge, I. J. und Sauerwein, H. P. (2004): Interferon-gamma increases monocyte HLA-DR expression without effects on glucose and fat metabolism in postoperative patients, *J Appl Physiol* (Band 96), Nr. 2, Seite 597-603. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14506092
- [58] Livingston, D. H. und Malangoni, M. A. (1988): Interferon-gamma restores immune competence after hemorrhagic shock, *J Surg Res* (Band 45), Nr. 1, Seite 37-43. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3134579
- [59] Chang, J. T.; Segal, B. M.; Nakanishi, K.; Okamura, H. und Shevach, E. M. (2000): The costimulatory effect of IL-18 on the induction of antigen-specific IFN-gamma production by resting T cells is IL-12 dependent and is mediated by up-regulation of the IL-12 receptor beta2 subunit, *Eur J Immunol* (Band 30), Nr. 4, Seite 1113-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10760800
- [60] Golab, J.; Zagodzón; Stoklosa, T.; Kaminski, R.; Kozar, K. und Jakobisiak, M. (2000): Direct stimulation of macrophages by IL-12 and IL-18--a bridge too far?, *Immunol Lett* (Band 72), Nr. 3, Seite 153-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10880834
- [61] Hiraki, S.; Ono, S.; Kinoshita, M.; Tsujimoto, H.; Seki, S. und Mochizuki, H. (2007): Interleukin-18 restores immune suppression in patients with nonseptic surgery, but not with sepsis, *Am J Surg* (Band 193), Nr. 6, Seite 676-80. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17512275
- [62] Bilgin, K.; Yaramis, A.; Haspolat, K.; Tas, M. A.; Gunbey, S. und Derman, O. (2001): A randomized trial of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in neonates with sepsis and neutropenia, *Pediatrics* (Band 107), Nr. 1, Seite 36-41. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11134431
- [63] Lendemans, S.; Kreuzfelder, E.; Waydhas, C.; Schade, F. U. und Flohe, S. (2007): Differential immunostimulating effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating

-
- factor (GM-CSF), granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and interferon gamma (IFNgamma) after severe trauma, *Inflamm Res* (Band 56), Nr. 1, Seite 38-44. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17334669
- [64] Schaefer, H.; Engert, A.; Grass, G.; Mansmann, G.; Wassmer, G.; Hubel, K.; Loehlein, D.; Ulrich, B. C.; Lippert, H.; Knoefel, W. T. und Hoelscher, A. H. (2004): Perioperative granulocyte colony-stimulating factor does not prevent severe infections in patients undergoing esophagectomy for esophageal cancer: a randomized placebo-controlled clinical trial, *Ann Surg* (Band 240), Nr. 1, Seite 68-75. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15213620
- [65] Fukushima, R.; Saito, H.; Inoue, T.; Fukatsu, K.; Inaba, T.; Han, I.; Furukawa, S.; Lin, M. T. und Muto, T. (1999): Prophylactic treatment with growth hormone and insulin-like growth factor I improve systemic bacterial clearance and survival in a murine model of burn-induced gut-derived sepsis, *Burns* (Band 25), Nr. 5, Seite 425-30. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10439151
- [66] Oberbeck, R.; Nickel, E.; von Griensven, M.; Tschernig, T.; Wittwer, T.; Schmitz, D. und Pape, H. C. (2002): The effect of dehydroepiandrosterone on hemorrhage-induced suppression of cellular immune function, *Intensive Care Med* (Band 28), Nr. 7, Seite 963-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12122537
- [67] Flohe, S.; Lendemans, S.; Selbach, C.; Waydhas, C.; Ackermann, M.; Schade, F. U. und Kreuzfelder, E. (2003): Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on the immune response of circulating monocytes after severe trauma, *Crit Care Med* (Band 31), Nr. 10, Seite 2462-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14530752

5.2 Erklärung an Eides Statt

„Ich, Thiele, Kathi, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Differenzierte immunologische Charakterisierung der postoperativen Immundepression nach kardiochirurgischen Eingriffen“ 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.“

12.10.2008

5.3 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

5.4 Publikationsverzeichnis

1. Strohmeyer JC, Blume C, Christian M, Doecke WD, Hummel M, Hoefflich C, Thiele K, Unbehaun A, Hetzer R, Volk HD (2003): Standardized immune monitoring for the Prediction of Infections after cardiopulmonary bypass surgery in risk patients. *Clinical Cytometry* 53B: 54-62
2. In Vorbereitung:
Pöhlmann H, Thiele K, Zuckermann-Becker H, Volk HD, Meisel C: In vitro reversal of post – operative and septic immune paralysis.

5.5 Posterpräsentation

WIT 2003: “Differenzierte immunologische Charakterisierung der postoperativen Immundepression nach kardiochirurgischen Eingriffen“

5.6 Danksagung

Die Anzahl der Mitarbeiter und Helfer an dieser Promotionsarbeit ist vielfältig. In erster Linie danke ich Professor Volk für seine Unterstützung und Fähigkeit, aus einer enormen Datensammlung Aussagen zu formulieren und der Arbeit einen Leitfaden gegeben zu haben. Auch bedanke ich mich für die anfängliche Unterstützung durch meine eigentliche Betreuerin Katharina Buhl, deren Weggang freundlicherweise durch Christian Meisel mit konstruktiven Ideen und Hilfen im Bereich der Auswertung kompensiert werden konnte.

Besonderen Dank gilt allen weiteren Mitarbeitern meines Instituts, insbesondere Christa Liebenthal, die mir half, viele labortechnische Komplikationen zu lösen.

Die wissenschaftliche Betreuung auf der einen Seite ist die emotionale Unterstützung durch meine engsten Vertrauten wie meinen Freund Daniel und meine lieben Eltern nicht ungleich gleichbedeutend. Auch ohne immunologisches Hintergrundwissen haben sie sich mit meiner Arbeit auseinandergesetzt, sie kritisch bewertet und mir geholfen, die Dissertation nicht aus den Augen zu verlieren. Auch verdanke ich meiner Oma Käte eine deutliche Reduktion meiner grammatikalischen Fehlerquote.

Insbesondere möchte ich meinem Nachfolgepromoventen Holger Pöhlmann danken, der mich in seiner logischen, akribischen und unnachgiebigen Art dazu veranlasst hat, diese Arbeit zu beenden.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meiner engen Freundin Berit, die sich meinen Selbstzweifeln jedes Mal aufs Neue angenommen hat und mir immer wieder Hoffnung auf die Fertigstellung dieser Arbeit gegeben hat.