

**Eine Pilotstudie zur Wertigkeit von HNA-2a als Marker der
Granulozytenaktivierung bei herzchirurgischen Eingriffen**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Judith Melchers
aus Essen

Gießen 2010

Aus dem medizinischen Zentrum für Chirurgie, Anästhesiologie und Urologie
Abteilung für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin
der Universitätskliniken Gießen und Marburg GmbH
Standort Gießen
Leiter: Prof. Dr. med. Markus A. Weigand

Gutachter: Prof. Dr. med. I. D. Welters

Gutachter: Prof. Dr. med. A. Böning

Tag der Disputation: 22.11.2010

Meinen Eltern in Liebe und Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	6
1.1 POLYMORPHKERNIGE NEUTROPHILE GRANULOZYTEN (PMN)	9
1.2 GRANULOZYTÄRE OBERFLÄCHENREZEPTOREN	11
1.2.1 CD11b	11
1.2.2 CD35	13
1.2.3 CD16	13
1.2.4 HNA-2a	14
1.3 DAS KOMPLEMENTSYSTEM	16
1.4 ZIELSETZUNG DER STUDIE	18
2. MATERIAL UND METHODEN	20
2.1 PATIENTEN	20
2.2 GRUPPENEINTEILUNG	20
2.3 AUSSCHLUSSKRITERIEN	20
2.4 ANÄSTHESIEVERFAHREN	20
2.5 CHIRURGISCHE VERFAHREN	21
2.5.1 Aortokoronare Bypassoperation mit extrakorporaler Zirkulation	21
2.5.2 Aortokoronare Bypassoperation ohne extrakorporale Zirkulation	22
2.5.3 Postoperative Betreuung	22
2.6 MESSZEITPUNKTE	23
2.7 MESSPARAMETER	24
2.7.1 Durchflusszytometrische Parameter	24
2.7.2 Biometrische Daten	24
2.7.3 Laborchemische Parameter	24
2.7.4 Perioperative Daten	24
2.7.5 Liegedauer	25
2.7.6 Komplikationen	25
2.8 PROBENGEWINNUNG UND –AUFARBEITUNG FÜR DIE MESSUNG AM FACS	25
2.8.1 Bestimmung der Oberflächenantigene CD11b, CD16 und CD35	25
2.8.2 Bestimmung des Oberflächenantigens HNA-2a	26
2.9 MESSMETHODIK	28
2.9.1 Durchflusszytometrische Messverfahren	28
2.9.2 Die graphische Darstellung der Messergebnisse	30
2.10 AUSWERTUNG DER HNA-2A DATEN	32
2.11 AUSWERTUNG DER MESSERGEBNISSE AM DURCHFLUSSZYTOMETER	34
2.12 STATISTISCHE AUSWERTUNG	34

3. ERGEBNISSE	36
3.1 BIOMETRISCHE DATEN	36
3.2 PERIOPERATIVE DATEN	36
3.3 LABORCHEMISCHE PARAMETER	37
3.2.1 Leukozytenwerte	37
3.2.2 CRP-Werte	38
3.2.3 Hb-Werte	39
3.4 INTRA- UND POSTOPERATIVER TRANSFUSIONSBEDARF	40
3.5 LIEGEDAUER	40
3.6 PERIOPERATIVES OUTCOME	41
3.7 CD11B	42
3.8 CD16	43
3.9 CD35	44
3.10 HNA-2A	45
4. DISKUSSION	46
4.1 DISKUSSION DER METHODE	46
4.1.1 Probenaufarbeitung	46
4.1.2 Durchflusszytometrie	47
4.2 DISKUSSION DER ERGEBNISSE	48
5. ZUSAMMENFASSUNG	60
6. SUMMARY	62
7. LITERATURVERZEICHNIS	63
8. ANHANG	86
8.1 TABELLARISCHE ZUSAMMENSTELLUNG DER DATEN	86
8.2 ABKÜRZUNGEN	91
8.3 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	94
8.4 TABELLENVERZEICHNIS	95
9. SCHRIFTLICHE ERKLÄRUNG	96
10. VERÖFFENTLICHUNG	97
11. DANKSAGUNG	98
12. LEBENSLAUF	99

1. Einleitung

In zahlreichen Studien wurde nachgewiesen, dass herzchirurgische Operationen mit Einsatz von extrakorporaler Zirkulation (EKZ) und kardioplegischem Herzstillstand eine systemische Entzündungsreaktion induzieren (1;2). Diese systemische Entzündungsreaktion ist Folge der Aktivierung von zellulären Komponenten des Immunsystems, unter anderem Leukozyten, Thrombozyten und Endothelzellen, aber auch von Plasma-Protein-Kaskaden, wie dem Gerinnungs- und dem Komplementsystem (2). Es kommt dabei zu einer erhöhten Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen (3) und Adhäsionsmolekülen (4), sowie zu einer gesteigerten Produktion von freien Sauerstoffradikalen (5). Neben dem Kontakt des Blutes mit den Fremdoberflächen der Herz-Lungen-Maschine (HLM) spielen Hämodilution, Kardioplegie, Hypothermie sowie die kardiopulmonale ischämische Reperfusion ebenfalls eine Rolle bei der Aktivierung des Immunsystems (1;6).

Bei den meisten Patienten bleibt die systemische Immunreaktion ohne Relevanz für den postoperativen Verlauf. Ein geringer Prozentsatz der Patienten zeigt jedoch eine überschießende Reaktion des Immunsystems, welche als Postperfusions-Syndrom bezeichnet wird (4;7). Unter diesem in den 80er Jahren von Kirklin und Westaby geprägtem Begriff werden Komplikationen wie pulmonale und renale Dysfunktion, hämorrhagische Diathese, Ödeme, Leukozytose, Vasokonstriktion sowie Fieber unklarer Genese zusammengefasst (8). Seit dem Jahr 1992 wird dieses Krankheitsbild nach den Richtlinien des American College of Chest Physicians (ACCP) und der Society of Critical Care Medicine (SCCM) dem Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) zugeordnet (9). Das SIRS ist definiert als das Auftreten von mindestens zwei der folgenden vier Symptome :

- Hyperthermie $> 38^{\circ}\text{C}$ oder Hypothermie $< 36^{\circ}\text{C}$
- Tachykardie $> 90/\text{min}$
- Arterieller CO_2 Partialdruck $< 32 \text{ mmHg}$ oder Tachypnoe $> 20/\text{min}$
- Leukozytenzahl im Blutbild $< 4000/\text{mm}^3$ oder $> 12000/\text{mm}^3$ oder $> 10\%$ der Leukozyten stabkernige neutrophile Granulozyten

Im Gegensatz zur Sepsis, bei der der Organismus auf pathogene Keime bzw. deren Produkte reagiert, wird das SIRS durch nichtinfektiöse Faktoren wie Traumen, Verbrennungen oder extrakorporale Zirkulation initiiert (10). Nach Operationen unter EKZ kann das SIRS als Vorläufer des postoperativen Multiorganversagens, welches mit einer hohen Morbidität und Mortalität verbunden ist, angesehen werden (7).

Vor diesem Hintergrund sollte die Kontaktaktivierung zellulärer und plasmatischer Blutkomponenten als Mitauslöser der postoperativen systemischen Entzündungsreaktion während der EKZ minimiert werden. So führt z.B. die Erhöhung der Biokompatibilität verschiedener Bestandteile der HLM durch Heparin oder Aprotinin zu einer Reduktion der postoperativen systemischen Entzündungsreaktion (11). Da das Ausmaß der Gewebstraumatisierung ebenfalls maßgeblich zur Entzündungsreaktion des Organismus beiträgt (12) sind minimal invasive Operationsverfahren auch für herzchirurgische Eingriffe entwickelt worden. Für die minimal invasive Bypasschirurgie über eine kleine anterolaterale Thorakotomie (Minimally Invasive Direct Coronary Artery Bypass, MIDCAB) konnte in diesem Zusammenhang bereits eine Reduktion der inflammatorischen Antwort im Vergleich zu singulären Bypassoperationen mit medianer Sternotomie aufgezeigt werden (13). Des Weiteren sehen viele Autoren einen Vorteil im Wegfall der EKZ bei sogenannten off-pump Operationen (6;14;15). Die erste koronare Bypassoperation ohne HLM wurde 1964 von Kolessov in St. Petersburg durchgeführt (16). Eine weitere Serie von koronarchirurgischen Eingriffen ohne HLM wurde 1975 von Trapp et al. vorgestellt (17). Nach Jahren fehlender Standardisierung der Operationsmethode wird die off-pump-Technik in den letzten Jahren wieder zunehmend zur Versorgung Koronarkrankter eingesetzt. Dazu hat unter anderem die Weiterentwicklung spezieller Instrumentarien sowie die Möglichkeit der mechanischen Stabilisierung der myokardialen Oberfläche beigetragen (18). Weitere Vorteile der Bypassoperation ohne HLM stellen der Verzicht auf Cardioplegie, Hypothermie und globale kardiopulmonale Ischämie und Reperfusion sowie die Minimierung des Blutkontakts mit Fremdoberflächen dar (6). Darüber

hinaus ist die Manipulation am rechten Vorhof geringer, wodurch die Inzidenz von postoperativem Vorhofflimmern reduziert wird (19). Ferner werden durch die geringere Heparinisierung und den Wegfall der Hämodilution Blutungskomplikationen und Transfusionsbedarf vermindert (19). Viele Autoren sehen den Vorteil der off-pump-Methode vor allem bei Patienten mit erhöhtem operativem Risiko (6;20;21). Dazu zählen Patienten in fortgeschrittenem Alter (> 70 Jahre), Patienten mit Begleiterkrankungen wie vorbestehender Niereninsuffizienz, respiratorischer Insuffizienz oder Systemerkrankungen wie Diabetes mellitus sowie Patienten, die sich einem Re-Eingriff unterziehen müssen. Dem gegenüber steht die Meinung, dass weniger die HLM, sondern überwiegend das chirurgische Trauma an sich zur Entzündungsantwort des Organismus führt (22-24), da das Ausmaß der Gewebstraumatisierung maßgeblich zur entzündlichen Reaktion des Organismus beiträgt. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung, dass auch andere große chirurgische Eingriffe eine systemische Entzündungsreaktion induzieren, gestützt (12).

Neben dem Kontakt des Blutes mit den Fremdoberflächen der HLM werden Ischämie- und Reperfusionsvorgänge als der Hauptauslöser des SIRS nach extrakorporaler Zirkulation angesehen (1;6). Die durch Ischämie und Reperfusion ausgelösten mikrovaskulären Schädigung beruht auf Interaktionen zwischen aktivierten polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) und aktivierten Endothelzellen (25), sowie auf der daraus folgenden gesteigerten Expression von leukozytären und endothelialen Adhäsionsmolekülen. Diese zellulären Interaktionen führen zu Adhäsion und transendothelialer Migration von zirkulierenden Leukozyten ins Gewebe (26). Für eine feste Adhäsion von neutrophilen Granulozyten an Endothelzellen spielt vor allem die Bindung von leukozytärem CR3 (CD11b/CD18) an endotheliales ICAM-1 eine wichtige Rolle (27). Die darauf folgende transendotheliale Migration wird unter anderem über das auf vaskulären Endothelzellen exprimierte PECAM-1 vermittelt (28). HNA-2a, ein auf neutrophilen Granulozyten exprimierter Oberflächenrezeptor, dessen genaue Funktion noch nicht geklärt ist, bindet an PECAM-1 und fördert so die

Migration von PMN durch die Endothelbarriere ins Gewebe (29). Dort setzen PMN neben Zytokinen und Leukotrienen (30) auch Superoxide und lysozymale Enzyme wie Elastasen und Kollagenasen frei. Letztere führen über eine direkte endotheliale Schädigung zu einer Erhöhung der kapillären Permeabilität und somit zu einer Extravasation von Flüssigkeit ins Gewebe (8). Insgesamt wird die Aggregation und Degranulation von PMN in der Mikrozirkulation diverser Organgewebe als Schlüsselereignis in der Pathogenese des SIRS mit Multiorganversagen (MOV) angesehen (31). Somit könnten Expressionsveränderungen von HNA-2a im Verlauf von ACVB-Operationen unter Verwendung der EKZ einen spezifischen Parameter zur Quantifizierung der neutrophilen Granulozyten bzw. der granulozytär vermittelten Gewebeschäden bei Ischämie- und Reperfusionsvorgängen darstellen.

1.1 Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN)

Neutrophile Granulozyten stellen mit 55-60% der zirkulierenden Leukozyten die größte Untergruppe der weißen Blutkörperchen dar. Neben dem Komplementsystem als humoraler Komponente zählen sie als zellulärer Bestandteil des Mononukleären-Phagozytose-Systems (MPS) zum unspezifischen Abwehrsystem (32). Neutrophile Granulozyten entwickeln sich unter dem Einfluss von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren, wie G-CSF, aus myeloischen Stammzellen des Knochenmarks und werden in den Blutkreislauf freigesetzt (33). Die im Blut zirkulierenden PMN kommen besonders in Kapillargebieten mit verminderter Blutflussgeschwindigkeit mit den Endothelzellen der Blutgefäße in Kontakt. Die Interaktion der PMN mit dem Endothel erfolgt in drei Teilschritten: Rolling, Adhäsion und Transmigration (Abbildung 1). Für den initialen Kontakt sind die sogenannten Selektine, eine spezielle Gruppe von Adhäsionsmolekülen, verantwortlich. Sie bewirken eine Bindung zwischen den im Blut strömenden neutrophilen Granulozyten (L-Selektin) und Endothelzellen (P-Selektin, E-Selektin). Das L-Selektin (CD62L) ist in diesem Zusammenhang für die initiale Bindung der PMN an das Endothel von besonderer Bedeutung (34). Diese initiale Bindung

induziert eine rollende Bewegung der PMN entlang der Endothelbarriere, welche durch Interaktion mit vom Endothel exprimiertem P-Selektin und E-Selektin abgebremst wird. Das darauf folgende feste Anhaften der aktivierten neutrophilen Granulozyten an die Endothelzellen wird über leukozytäre β_2 -Integrine (CD11b/CD18) und endotheliale Adhäsionsmoleküle (ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, PECAM-1) vermittelt. Anschließend beginnen die PMN mit der trans- und parazellulären Migration durch die Endothelbarriere, wodurch es zur Extravasion der neutrophilen Granulozyten in das Entzündungsgebiet kommt. Dabei können neutrophile Granulozyten aktiv in Richtung eines Stimulus wandern, der von bakteriellen Toxinen, Zytokinen wie Interleukin-8 oder aktivierten Komplementkomponenten wie C3a und C5a, ausgeht (35).

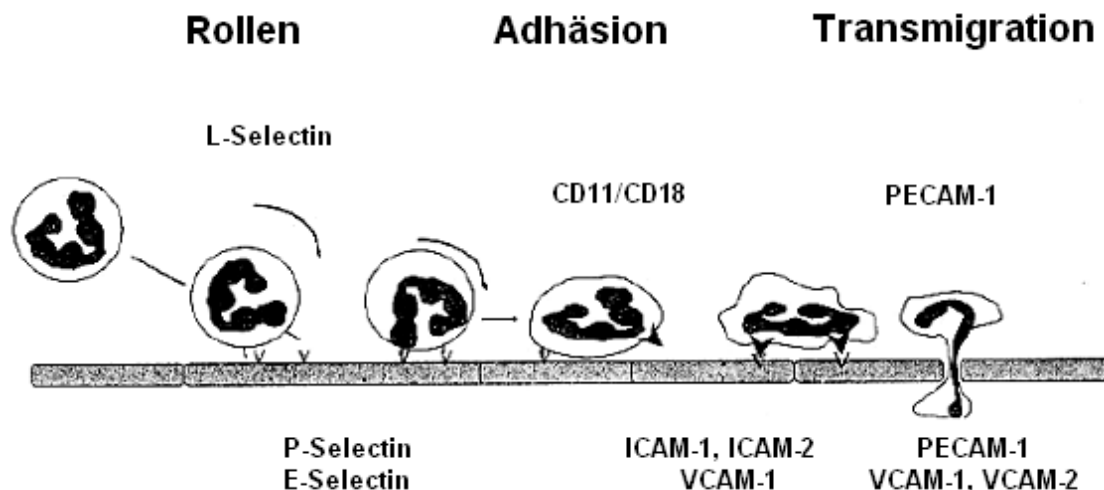


Abbildung 1: Interaktion von neutrophilen Granulozyten und Endothelzellen durch Expression von Adhäsionsmolekülen nach Aktivierung (36)

Damit ein Mikroorganismus von den PMN als körperfremd erkannt werden kann, wird er zuvor als „pathogen“ markiert, indem sich sogenannte Opsonine, wie Komplementfragmente oder Akut-Phase-Proteine, an die Oberfläche der Mikroorganismen binden. Im Anschluss an diesen als Opsonisierung bezeichneten Prozess können Mikroorganismen dann an IgG- oder Komplementrezeptoren auf der Oberfläche der neutrophilen Granulozyten gebunden und anschließend phagozytiert werden (37).

Entsprechend ihrer Funktion als Phagozyten produzieren aktivierte neutrophile Granulozyten ebenfalls eine Vielzahl chemotaktisch und zytotoxisch wirkender Substanzen (38). So induzieren Lipopolysaccharide und einige Interleukine wie IL-1 und IL-2 die Freisetzung zahlreicher Entzündungsmediatoren, wie z. B. IL-1, IL-6 und IL-8 durch neutrophile Granulozyten (39;40). Die Granula der neutrophilen Granulozyten enthalten ferner Proteasen, Myeloperoxidase, Lysozym sowie reaktive Sauerstoffmetabolite. Durch Freisetzung dieser Stoffe werden die phagozytierten Mikroorganismen intrazellulär abgetötet und lysiert. Obwohl die Zellzerstörung intrazellulär erfolgt, kann die inadäquate Freisetzung zytotoxischer Moleküle in die extrazelluläre Matrix zu Gewebsschäden führen (41). Nach Verdauung des phagozytierten Materials wird dieses aus der Zelle nach außen sezerniert und die Apoptose des Phagozyten induziert (42). Neutrophile Granulozyten spielen somit eine wichtige Rolle in der primären Immunantwort bei systemischen Entzündungsreaktionen. Ihre Aktivierung aufgrund des Einsatzes der Herz-Lungen-Maschine wird als bedeutender Faktor bei der Entstehung des SIRS sowie der SIRS-assoziierten Dysfunktionen lebenswichtiger Organe wie Lunge und Niere angesehen (43). Die Anreicherung von Granulozyten im Lungengewebe verbunden mit der Freisetzung von Proteasen und der folgenden Zerstörung des Lungenparenchyms gilt als wichtiger pathogenetischer Faktor bei der Entstehung des Acute Respiratory Distress Syndroms (ARDS) (15;43).

1.2 Granulozytäre Oberflächenrezeptoren

1.2.1 CD11b

Der Oberflächenrezeptor CD11b gehört zur Molekülklasse der Integrine. Integrine zählen zusammen mit den Selektinen und den Immunglobulinen zur Gruppe der zellulären Adhäsionsmoleküle (Cellular Adhesion Molecules = CAM) (44). Adhäsionsmoleküle vermitteln eine direkte Bindung an andere Zellen und extrazelluläre Matrixmoleküle. Sie dienen dem Austausch von

Informationen und können durch ihre Adhäsion eine Änderung der Genexpression und des Zellphänotyps bewirken (45). Die Up- und Downregulation der Adhäsionsmoleküle erfolgt überwiegend im Zusammenspiel mit lokal sezernierten Mediatoren (46). Die Bindung an Integrine stellt für die Leukozytenfunktion einen entscheidenden Vorgang dar. Integrine sind Glykoproteine der Zellmembran und steigern die Adhäsionsfähigkeit an Endothelzellen der Blutkapillaren, den Gefäßaustritt, die Migration sowie die Interaktion mit Zielzellen (47). Bei der Übertragung mechanischer Kräfte und biochemischer Signale zur Plasmamembran sind Integrine gleichzeitig Bindeglied in Signalkaskaden und grundlegende Regulatoren von Signaltransduktion und Zellfunktion (48). Chemisch betrachtet bestehen Integrine aus einer α - und einer β -Untereinheit, die miteinander verbunden sind. Beide Untereinheiten gehören zu den Typ I transmembranen Glykoproteinen und stehen intrazytoplasmatisch mit dem Zytoskelett in Verbindung (48). Entsprechend der β -Untereinheiten werden die Integrine in Subfamilien unterteilt (49). Zu den $\beta 2$ (CD18)-Integrinen gehören drei Rezeptoren mit jeweils unterschiedlichen α -Ketten (50), darunter das Integrin MAC-1 α (membran-attack-complex) auch CD11b/CD18 oder CR3 genannt. Dieser Rezeptor wird von myeloiden Zellen und NK-Zellen exprimiert (51) und vermittelt über die Bindung an ICAM-1 die Leukozytendhäsion am Gefäßendothel sowie die Migration von PMN ins Gewebe (25). Wichtige Liganden von CD11b sind Komplementproteine. Schon geringe Mengen des Komplementfaktors iC3b führen nach Bindung an CD11b zu einer Steigerung der Phagozytose, einem Anstieg des oxidativen Burst sowie zu einer erhöhten Freisetzung von Enzymen aus der intrazellulären Granula der neutrophilen Granulozyten (37;52). Bei dieser Aktivierung wird eine Freisetzung und Translokation von präformierten Komplementrezeptoren aus der intrazellulären Granula an die Zelloberfläche der neutrophilen Granulozyten beobachtet (53). Im Vergleich zu ruhenden Zellen kommt es dabei zu einer signifikant erhöhten Expressierung von CD11b (54). Durch Bindung von CD11b an endotheliales ICAM-1 wird die Adhäsion am Endothel vermittelt. Diese Interaktion zwischen Endothel und neutrophilen Granulozyten wird

unter anderem für den Reperfusionsschaden nach CPB verantwortlich gemacht und ist maßgeblich an der Entstehung des Acute Respiratory Distress Syndroms beteiligt (25;55).

1.2.2 CD35

CD35, oder auch Complementrezeptor 1 (CR1) genannt, ist ein polymorphes Membranglykoprotein das aus einer Polypeptidkette besteht (56). Es spielt eine wichtige Rolle bei der Verarbeitung von Immunkomplexen sowie der Regulation der Immunantwort (57). Des Weiteren stellt CD35 ähnlich wie CD11b einen wichtigen Oberflächenrezeptor für die Phagozytose dar (53;58), indem es über transmembrane Aktivierungsprozesse die Aufnahme von potentiell pathogenen Immunkomplexen durch neutrophile Granulozyten erhöht (59). Außer auf neutrophilen Granulozyten wird CD35 auch auf der Oberfläche von Erythrozyten, Monozyten, Makrophagen und B-Zellen exprimiert (51;56). CD35 vermittelt über spezifische Oberflächenproteine die Bindung der Komplementfaktoren C3b und C4b an die zu phagozytierenden Partikel (60) und initiiert dadurch die Phagozytose (51). Ferner kann CD35 die Synthese und Funktion der C3/C5-Konvertase beeinflussen und somit die Komplementaktivierung über den klassischen und auch über den alternativen Weg hemmen (61). Nach der Aktivierung von neutrophilen Granulozyten durch chemotaktische Faktoren wird die Expression von CD35 auf der Zelloberfläche signifikant gesteigert (54). Wie bereits für CD11b dargestellt werden dabei präformierte CD35-Rezeptorproteine aus der intrazellulären Granula auf die Plasmamembran transferiert (56). Auch wenn bislang unklar ist, ob CD35 direkt interzelluläre Signaltransduktionsketten initiiert, gilt die Interaktion mit CD11b und Fc-Rezeptoren, die fähig sind, intrazelluläre Signalkaskaden zu aktivieren, als gesichert (59).

1.2.3 CD16

CD16, auch HNA-1 oder Fc γ -RIII-Rezeptor genannt, gehört zur Gruppe der Fc γ -Rezeptoren und wird im Regelfall auf mehr als 85% der PMN präsentiert (50). Fc γ -Rezeptoren sind transmembranäre Glykoproteine, die IgG-

opsonierte Partikel oder Erreger spezifisch binden. Auf neutrophilen Granulozyten werden drei verschiedene Rezeptoren für die Fc-Region von IgG exprimiert: Fc γ -RI (CD64), Fc γ -RII (CD32) und Fc γ -RIII (CD16) (50;62). CD16 (Fc γ -RIII) ist der am häufigsten exprimierte Fc γ -Rezeptor auf neutrophilen Granulozyten und bindet IgG-Komplexe mit niedriger Affinität (63). Durch die Bindung des Fc-Fragments am CD16-Rezeptor werden überwiegend Ca²⁺-abhängige intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden aktiviert, die zu Aufnahme und Vernichtung des Bakteriums durch den Granulozyten führen (37). Neben polymerem IgG bindet CD 16 auch IgG-Komplexe. Kommt es durch Bindung von IgG-Immunkomplexen zu einer Quervernetzung von IgG-Rezeptoren, triggern diese eine Vielfalt an Effektorfunktionen, wie Phagozytose, antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität, Freisetzung von Entzündungsmediatoren, Clearance von Immunkomplexen und die Regulation der Antikörperproduktion (64). Somit vermitteln die Fc γ -Rezeptoren ein wichtiges Feedback zwischen dem humoralen und dem zellulären Teil des Abwehrsystems (65). Bei der Induktion von Phagozytose und oxidativem Burst wirken CD16 und CD11b synergistisch (66). Nach der Stimulation neutrophiler Granulozyten mit f-MLP wurde eine gesteigerte Expression von CD16 beobachtet (67). Bei schweren Infektionen, wie z.B. der Sepsis, sowie nach der Gabe von G-CSF nimmt die CD16-Expression hingegen ab (68;69). CD16 wird in sekretorischen Vesikeln, die als intrazellulärer Pool dienen, gespeichert (70) und außer auf PMN auch auf Makrophagen und NK-Zellen exprimiert (51).

1.2.4 HNA-2a

HNA-2a ist ein 56 kDa bis 62 kDa großes Plasmamembranglykoprotein (71), welches 1971 erstmals im Rahmen einer durch HNA-2a-Antikörper ausgelösten neonatalen Immunneutropenie entdeckt wurde (72). Die dabei initial eingesetzte Bezeichnung NB1 wurde im Jahr 2002 durch die Bezeichnung Human-Neutrophil-Antigen-2a (HNA-2a) aktualisiert sowie im Rahmen der Aufnahme in das Cluster-of-Differentiation-Schema durch die Bezeichnung CD177 ergänzt (73). HNA-2a ist zusammen mit dem CD16-

Rezeptor die stärkste immunogene Struktur der Granulozytenmembran (74) und ist ebenso wie CD16 über einen Glycosylphosphatidylinositol-Anker mit der Zellmembran verbunden (75). HNA-2a ist sowohl auf der Zellmembran als auch intrazellulär in kleinen Vesikeln und Granula lokalisiert (71) und wird nur auf neutrophilen Granulozyten und deren Vorläuferzellen exprimiert (76). Charakteristisch für dieses Antigen ist eine heterogene Expression, so dass in einem Individuum Subpopulationen von neutrophilen Granulozyten vorliegen, die HNA-2a exprimieren und solche, die es nicht tun (74). Der Anteil der exprimierenden Zellpopulation schwankt interindividuell von 0-100% (71). HNA-2a wird bei 88-97% der gesunden Individuen auf allen oder einem Teil der neutrophilen Granulozyten exprimiert (75;77) und scheint über die Bindung an Plättchen-Endothelzell-Adhäsionsmolekül-1 (PECAM-1) eine Rolle bei der Granulozytentransmigration zu spielen (29). Auch wenn die genaue Funktion von HNA-2a noch unklar ist, wird eine Rezeptorfunktion vermutet (71;74). Nach Stimulation mit f-MLP kann eine gesteigerte HNA-2a-Expression auf neutrophilen Granulozyten und durch Antigen-Antikörper-Bindung eine Aktivierung des oxidativen Burst beobachtet werden (71;78). Weiterhin ist ein Anstieg der Expression nach G-CSF Stimulation und bei schweren bakteriellen Infektionen beschrieben (79). Ferner könnte HNA-2a eine Rolle bei der Aktivierung von neutrophilen Granulozyten durch ANCAs bei der Wegenerschen-Granulomatose spielen. Die Überexpression an HNA-2a-mRNA gilt als Biomarker für Polycytämia vera sowie für die essentielle Thrombozytämie (80). Antikörper gegen HNA-2a können zahlreiche Erkrankungen hervorrufen, wie Immunneutropenien nach Knochenmarkstransplantationen (81) oder das sogenannte Transfusion Related Acute Lung Injury (TRALI) (82). Im Falle des TRALI beruht die Pathogenese auf der erschwerten Lungenpassage der durch HNA-2a-Antikörper aktivierten PMN. Die in den Lungenkapillaren adhären Granulozyten setzen Sauerstoffradikale sowie Enzyme frei, welche die Endothelzellen schädigen. Dadurch wird die Kapillarpermeabilität erhöht und es folgt ein Plasmaausstrom mit resultierendem Lungenödem (83).

Im Rahmen von Ischämie- und Reperfusionsvorgängen zeigen sich endothelial-leukozytäre Interaktionen auf molekularer und zellulärer Ebene, welche eine entscheidende Bedeutung für den späteren Reperfusionsschaden des Gewebes besitzen (84). In diesem Zusammenhang könnte die durch Bindung von HNA-2a an PECAM-1 vermittelte Granulozytentransmigration eine wichtige Rolle bei den durch Leukozyten vermittelten Reperfusionsschäden nach ACVB-Operationen spielen.

1.3 Das Komplementsystem

Wie bereits oben kurz dargestellt, besitzt das Komplementsystem eine besondere Bedeutung für die Aktivierung neutrophiler Granulozyten. Es ist Teil der unspezifischen humoralen Immunabwehr und besteht aus verschiedenen Aktivator- und Plasmaproteinen, die ein multifaktorielles Kaskadensystem bilden. Das Komplementsystem stellt ein wichtiges Bindeglied zwischen humoraler und zellulärer Aktivierung des Immunsystems dar. Bei der Komplementaktivierung werden zwei Wege unterschieden (Abbildung 2). Der klassische Reaktionsweg, bei dem die Komplementfaktoren spezifisch über Antikörper aktiviert werden, gliedert sich in die drei Phasen: „Erkennung“ (C1q, C1r, C1s), „Aktivierung“ (C4, C2, C3) und „zytotoxischer Angriff“ (C5-C9) (32). Der alternative Weg umgeht die ersten Komplementkomponenten und aktiviert das System auf der Stufe von C3. C3 ist eine der wichtigsten Komplementkomponenten, da hier der alternative und der klassische Weg zusammenlaufen und sich zur zytolytischen Angriffsphase vereinigen. Bei seiner Aktivierung zerfällt C3 in die biologisch aktiven Bruchstücke C3a und C3b. C3b induziert unter anderem die Margination und Aggregation von Leukozyten in Entzündungsgebieten (32;85). Beiden Aktivierungswegen gemeinsam ist die Entstehung von so genannten Anaphylatoxinen wie C3a und C5a. Die Anaphylatoxine führen zu einer Veränderung der Gefäßpermeabilität, zu einer Kontraktion glatter Muskelzellen, zur Chemotaxis neutrophiler Granulozyten sowie zur Degranulation von Phagozyten und vermitteln so wichtige Elemente einer Entzündungsreaktionen (86).

Das Komplementsystem stellt einen Haupteffektor des nach EKZ beobachteten Reperfusionsschadens dar (87). Dabei wird die Komplementkaskade bedingt durch Ischämie und Reperfusion sowohl über den klassischen als auch über den alternativen Weg aktiviert (88).

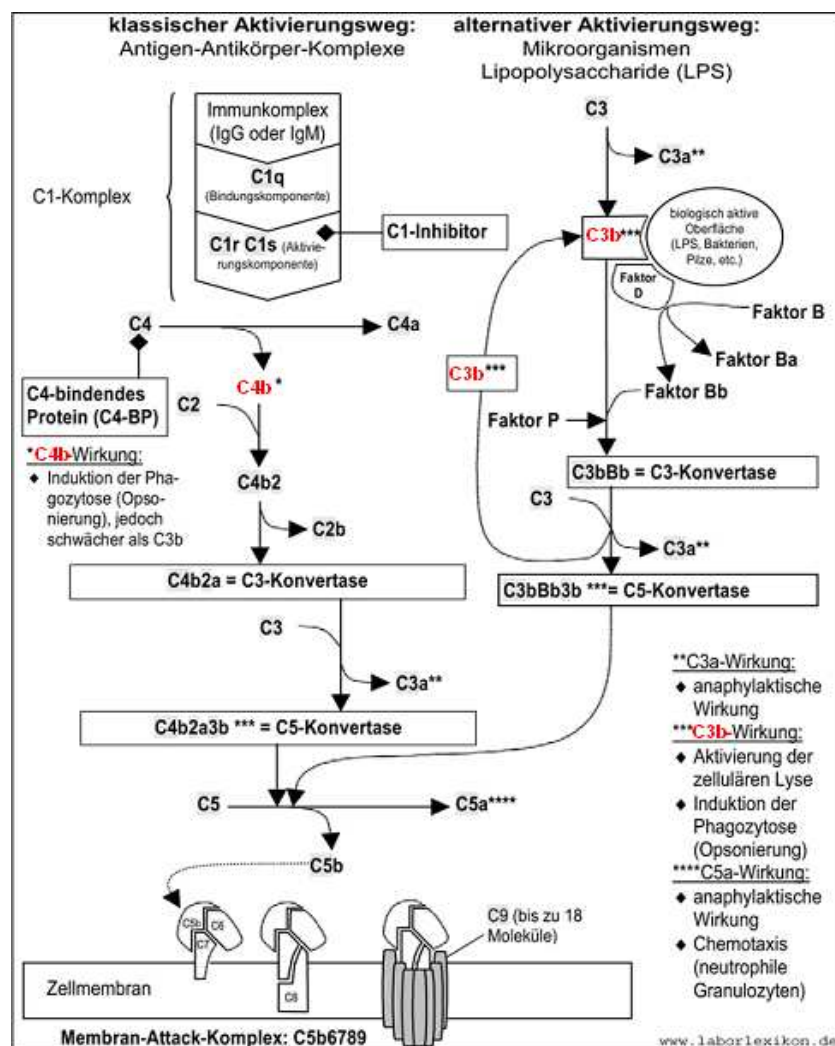


Abbildung 2: Das Komplementsystem (89)

1.4 Zielsetzung der Studie

Traumen, chirurgische Eingriffe und insbesondere herzchirurgische Operationen unter Verwendung der Herz-Lungen-Maschine induzieren eine systemische Entzündungsantwort des Organismus (10). Diese führt neben einer Aktivierung verschiedener Plasma-Protein-Kaskaden auch zur Stimulation von zellulären Komponenten des Immunsystems (2). Dabei spielt insbesondere die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten eine wichtige Rolle in der primären Immunantwort dieser systemischen Entzündungsreaktion (90).

Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel, die Wertigkeit von HNA-2a als Marker der Aktivierung von neutrophilen Granulozyten bei herzchirurgischen Eingriffen zu untersuchen. Während Oberflächenrezeptoren wie CD11b, CD16 oder CD35 als Marker der Granulozytenaktivierung bereits hinreichend untersucht sind, existieren für HNA-2a kaum Studien über die Aussagekraft bezüglich der Neutrophilenaktivierung. HNA-2a wird intrazellulär in sekundären Granula gespeichert (71), so dass die Expression durch Verlagerung an die Zelloberfläche schnell hochreguliert werden kann. Des Weiteren wird HNA-2a im Gegensatz zu CD11b, CD16 und CD35 ausschließlich auf neutrophilen Granulozyten und deren Vorläuferzellen exprimiert (76), was HNA-2a zu einem spezifischeren Parameter bezüglich der Aktivierung von neutrophilen Granulozyten werden lässt. Untersucht werden soll in dieser Studie, ob sich durch die Bestimmung der HNA-2a-Expression die CPB-induzierte PMN-Aktivierung einfacher und schneller quantifizieren lässt, da dies in zukünftigen Studien den Nachweis der Neutrophilenaktivierung vereinfachen könnte. Da die Funktion von HNA-2a weiterhin unklar ist, soll diese Studie dazu beitragen die Funktion des HNA-2a-Rezeptors aufzuklären.

Die Expression des Oberflächenrezeptors HNA-2a wurde in der vorliegenden Arbeit zu fünf verschiedenen Zeitpunkten intra- und postoperativ bei ACVB-Operationen mit und ohne EKZ durchflusszytometrisch bestimmt und mit der Expression der im Rahmen der Granulozytenaktivierung bereits etablierten Oberflächenrezeptoren CD11b, CD16 und CD35 verglichen. Zugrunde lag die

Fragestellung, ob auch HNA-2a sich als Marker für die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten eignet und inwieweit sein Aktivierungsmuster mit demjenigen der etablierten Marker vergleichbar ist.

Eine ergänzende Fragestellung in dieser Studie war, ob sich ein Unterschied in der Expression der untersuchten Oberflächenrezeptoren zwischen der on- und off-pump Gruppe nachweisen lässt.

2. Material und Methoden

2.1 Patienten

Untersucht wurde Blut von 27 männlichen Patienten, die sich einer elektiven aortokoronaren Bypass-Operation (ACVB) mit bzw. ohne EKZ unterziehen mussten. Die Patienten wurden über Inhalt, Vorgehensweise und Untersuchungsziel der Studie aufgeklärt und nach schriftlicher Einverständniserklärung in die Studie aufgenommen. Die Studie wurde von der zuständigen Ethikkommission begutachtet und genehmigt (Antragsnummer 53/02).

2.2 Gruppeneinteilung

Die Patienten wurden anhand des Operationsverfahrens in zwei Gruppen eingeteilt:

Gruppe 1 (n = 18)

Dieser Gruppe wurden alle on-pump operierten Patienten zugeordnet.

Gruppe 2 (n = 9)

Dieser Gruppe wurden alle off-pump operierten Patienten zugeteilt.

2.3 Ausschlusskriterien

Um eine vorbestehende Veränderung der Stoffwechselaktivität von neutrophilen Granulozyten auszuschließen, wurden folgende Ausschlusskriterien festgelegt:

- Nikotinkonsum
- Immunsuppressive Therapie (Kortikosteroide, Methotrexat)
- akute oder chronische Infektionen (CRP präoperativ > 20 mg/dl)
- Autoimmunerkrankungen

2.4 Anästhesieverfahren

Das Anästhesieverfahren sowie das intraoperative Monitoring (EKG, invasiver Blutdruck, Temperatur, Einfuhr/Ausfuhr, periphere Sauerstoffsättigung, end-expiratorisches CO₂, Blutgase, Labor, ZVD, PAP, TEE) waren für alle

Patienten standardisiert. Präoperativ erhielten die Patienten 2mg Flunitrazepam und 30mg Morphin p.o. Die Einleitung der Narkose erfolgte mit 5mg Midazolam und 0,3-0,4µg/kg KG Sufentanil. Die Relaxierung zur Intubation wurde mit 0,1mg/kg KG Pancuroniumbromid erreicht. Nach der Einleitung erhielten die Patienten zur perioperativen antibiotischen Prophylaxe 2g Cephazolin als Kurzinfusion. Die Anästhesie wurde mit der Gabe von Propofol (2-4mg/kg/h) und Sufentanil (0,2-0,4µg/kg KG repetitiv bedarfsadaptiert) aufrechterhalten. Zur Muskelrelaxation bekamen die Patienten Pancuroniumbromid (0,1mg/kg KG repetitiv bedarfsadaptiert). Die Beatmung erfolgte volumenkontrolliert mit einem PEEP von 5mmHg. Die Flüssigkeitssubstitution erfolgte mit der Gabe von Ringer-Lösung. Bei Bedarf wurde die Volumengabe mit Hydroxyäthylstärke 10% oder Erythrozytenkonzentraten ergänzt. Das perioperative hämodynamische Monitoring erfolgte über einen Swan-Ganz-Einschwemmkatheter und über eine invasive arterielle Blutdruckmessung. Der mittlere arterielle Druck wurde während der Zeit am Bypass bei Bedarf mit Katecholaminen über 50mmHg gehalten, ansonsten wurde ein Wert von über 70mmHg angestrebt.

2.5 Chirurgische Verfahren

Bei beiden Verfahren war die mediane Sternotomie der Zugangsweg zum Operationsgebiet. Nach Durchtrennung des Sternums wurde, wenn anatomisch möglich, die Arteria thoracica interna auf der linken Seite präpariert und mit dem Ramus interventricularis anterior anastomosiert. Ergänzend wurden Venen aus dem Unterschenkel entnommen und für 1-4 weitere Bypässe verwendet. Nach Fertigstellung der Anastomosen wurden vor dem Sternum- bzw. Wundverschluss eine intraperikardiale sowie eine retrosternale Drainage eingelegt. War perioperativ eine Eröffnung der Pleura erfolgt, so wurde auch hier eine Drainage eingelegt.

2.5.1 Aortokoronare Bypassoperation mit extrakorporaler Zirkulation

Die Herz-Lungenmaschine wurde mit 2300ml Priminglösung (2000ml Ringerlösung, 250ml Humanalbumin 5%, 50ml NaCl) gefüllt. Kurz vor

Anschluss des Patienten an die HLM wurde die aktivierte Gerinnungszeit (ACT) durch die Gabe von Heparin (300IE/kg) auf 480sec oder darüber eingestellt. Die Antikoagulation wurde während des gesamten Eingriffs überwacht und bei Werten von weniger als 480sec wurden zusätzlich 100IE/kg gegeben. Der kardiopulmonale Bypass begann nach Kanülierung der Aorta und des rechten Vorhofs. Es wurden Membranoxygenatoren (Jostra, Hirrlingen, Germany; Dideco, München, Germany) und nicht-pulsatile Rollerpumpen (Stöckert, München, Germany) eingesetzt. Die Flussrate lag während des gesamten Bypasses bei 2,4 l/min/m². Die Körpertemperatur des Patienten wurde zwischen 33°C und 34°C in moderater Hypothermie gehalten. Die Myokardprotektion wurde mit einer Cardioplegielösung (Blutkardioplegie nach Buckberg) gewährleistet. Nach Beendigung des Bypasses wurde mit Hilfe von 1IE Protamin pro IE Heparin die Antikoagulation aufgehoben.

2.5.2 Aortokoronare Bypassoperation ohne extrakorporale Zirkulation

Diese Operation wurde am schlagenden, normothermen Herz durchgeführt. Zur Stabilisierung des jeweils zu operierenden Gebietes wurde ein Octopus-System (Medtronic, Düsseldorf, Germany; Guidant, Giessen, Germany) verwendet. Die Stabilisierung wird bei diesem System durch einen Unterdruck an kleinen Saugnäpfen erreicht, welche sich an zwei gegenüberliegenden Plattformen befinden. Diese Plattformen werden entlang der zu operierenden Herzkranzarterie aufgesetzt, das Epikard durch den Unterdruck leicht angehoben und somit zur Anastomosierung fixiert. Kurz vor der ersten Anastomose erhielten die Patienten 100IE/kg Heparin, um die ACT auf über 250sec zu bringen. Nach der letzten Anastomose wurde die Blutgerinnung mit 1IE Protamin pro Einheit Heparin wieder normalisiert.

2.5.3 Postoperative Betreuung

Alle Patienten wurden nach Beendigung der Operation zur weiteren Überwachung intubiert und beatmet auf die chirurgische Intensivstation verlegt. Es erfolgte ein kontinuierliches Monitoring von Herzfrequenz, MAP,

ZVD, PAP, Temperatur und Diurese sowie regelmäßige Blutgasanalysen. Bis zum Erreichen der Normothermie erfolgte die Analgesie mit Dipidolor (0,1mg/kgKG) und bei Bedarf eine Sedierung mit Propofol (2-4mg/kgKG/h). Die Entwöhnung vom Respirator wurde durchgeführt, sobald der Patient hämodynamisch stabil, wach und kooperativ war, Spontanatmung zeigte, sowie einen Oxygenierungsindex von mehr als 200 bei einer $FiO_2 \leq 0,4$ hatte. Nach der Extubation wurde die Analgesie mit Dipidolor (0,1mg/kgKG) und ergänzend mit 1g Paracetamol i.v. alle 6h fortgeführt. Bei komplikationslosem postoperativem Verlauf wurden die Patienten am Folgetag auf die Normalstation verlegt.

2.6 Messzeitpunkte

Die Blutproben wurden zu folgenden Abnahmezeitpunkten entnommen:

Gruppe 1 (on-pump):

1. Abnahmezeitpunkt: vor der Narkoseeinleitung
2. Abnahmezeitpunkt: 20 Minuten nach Beginn der EKZ
3. Abnahmezeitpunkt: OP-Ende
4. Abnahmezeitpunkt: 6 Stunden nach Beginn der EKZ
5. Abnahmezeitpunkt: 24 Stunden postoperativ

Gruppe 2 (off-pump):

1. Abnahmezeitpunkt: vor der Narkoseeinleitung
2. Abnahmezeitpunkt: vor der ersten Anastomose
3. Abnahmezeitpunkt: OP-Ende
4. Abnahmezeitpunkt: 6 Stunden nach der ersten Anastomose
5. Abnahmezeitpunkt: 24 Stunden postoperativ

2.7 Messparameter

Folgende Parameter wurden erhoben:

2.7.1 Durchflusszytometrische Parameter

Mittels der Durchflusszytometrie wurde die Expression der Oberflächenrezeptoren CD11b, CD16, CD35 und HNA-2a bestimmt.

2.7.2 Biometrische Daten

Messgröße	Einheit
Größe	[cm]
Gewicht	[kg]
Alter	[Jahre]

Tabelle 1: Maßeinheiten der biometrische Daten

2.7.3 Laborchemische Parameter

Messparameter	Einheit	Messzeitpunkt
Leukozytenzahl	[giga/l]	vor der OP
		1. Tag post OP
		2. Tag post OP
CRP	[mg/dl]	vor der OP
		1. Tag post OP
		2. Tag post OP
Hämoglobin	[g/dl]	intraoperativ
		postoperativ

Tabelle 2: Maßeinheiten der laborchemischen Parameter

2.7.4 Perioperative Daten

Messgröße	Einheit	Messzeitpunkt
OP-Dauer (Schnitt-Naht-Zeit)	[min]	
Anzahl der Bypässe	Absolut	
Intubationszeit	[h]	
EK-Gaben	a 300ml	intraoperativ
		postoperativ
FFP-Gaben	a 200ml	intraoperativ
		postoperativ

Tabelle 3: Maßeinheiten der perioperativen Daten

2.7.5 Liegedauer

Beobachtungsparameter	Einheit
Intensivstation	[h]
Klinik	[d]

Tabelle 4: Maßeinheiten der Liegedauer

2.7.6 Komplikationen

Beobachtungsparameter	
Wundinfektion	Anzahl
absolute Arrhythmie postoperativ	Anzahl
Apoplex	Anzahl
Myokardinfarkt	Anzahl
Tod	Anzahl

Tabelle 5: Maßeinheiten der Komplikationen

2.8 Probengewinnung und –aufarbeitung für die Messung am FACS

Die Probenentnahme war bei allen Patienten vergleichbar. Sie erfolgte bei jedem Patienten zu den fünf verschiedenen oben genannten Zeitpunkten. Das Blut wurde über den Zugang zur invasiven Blutdruckmessung aus der Arteria radialis entnommen. Um eine Verunreinigung oder Verdünnung der Proben zu verhindern, wurden vor der eigentlichen Abnahme 5ml Blut entnommen und verworfen. Die Blutproben wurden dann in zwei EDTA-Röhrchen (Fa. KABE) je 3ml abgenommen, wobei ein Röhrchen unmittelbar nach Abnahme zur Bestimmung der Oberflächenrezeptoren verwendet wurde, während das andere zentrifugiert und das Serum in Eppendorf-Hütchen bei –80°C bis zur weiteren Aufarbeitung eingefroren wurde.

2.8.1 Bestimmung der Oberflächenantigene CD11b, CD16 und CD35

Das Testprinzip beruht auf der Markierung der an der Oberfläche der Granulozyten exprimierten Oberflächenrezeptoren CD11b, CD16 und CD35 mit FITC markierten monoklonalen Antikörper und der nachfolgenden durchflusszytometrischen Messung der Grünfluoreszenz. Unmarkierte Antikörper gegen den jeweiligen Rezeptor wurden als Negativkontrolle verwendet. Zusätzlich wurde ein Probenröhrchen mit einem gegen humanes

IgG gerichteten Antikörper angesetzt, um fehlerhafte Messergebnisse durch unspezifische Bindungen auszuschließen. Bei den durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden die in Tabelle 6 aufgelisteten Antikörper verwendet.

Anti-Human IgG, FITC	Fa. Pharmingen
Anti-CD11b, Clone 44	Fa. Sigma
Anti-CD11b, Clone 44, FITC	Fa. Sigma
Anti-CD16, Clone 3G8, freeze-dried (0,2 mg in 2 ml Aqua dest. gelöst)	Fa. Immunotech
Anti-CD16, Clone 3G8, FITC	Fa. Sigma
Anti-CD35 (E-11)	Fa. Santa Cruz Biotechnologie
Anti-CD35 (E-11), FITC	Fa. Santa Cruz Biotechnologie

Tabelle 6: Verwendete Antikörper

Zu Beginn jeder Messreihe wurden 100µl mit EDTA versetztem Vollblut in jedes Probenröhrchen pipettiert. Dann wurden jeweils 5µl markierte bzw. unmarkierte Antikörper hinzu gegeben. Nach guter Durchmischung wurden die Proben lichtgeschützt bei Raumtemperatur für 15min inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden alle Proben mit 2ml FACS-Lysing-Solution® (Fa. Becton Dickinson) versetzt und nochmals 15min unter den oben genannten Bedingungen inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Probenröhrchen für 5 min bei 1200 Umdrehungen pro Minute (U/min) zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und alle Proben mit 2ml PBS-Puffer (Fa. BAG Lich) versehen. Dann wurden sie erneut für 5min bei 1200 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen und die Röhrchen mit 1ml PBS-Puffer aufgefüllt. Die so gewonnenen Proben wurden nach Möglichkeit sofort durchflusszytometrisch gemessen, spätestens aber nach 2h Lagerung bei Zimmertemperatur im Dunkeln.

2.8.2 Bestimmung des Oberflächenantigens HNA-2a

Dieser Test beruht auf der Markierung des an der Granulozytenoberfläche exprimierten Rezeptors HNA-2a mit einem monoklonalen Antikörper, der im Verlauf der Aufarbeitung mit FITC markiert wird. Zusätzlich zu der

eigentlichen Probe wurden in jeder Messreihe eine negative (IgG) und eine positive Kontrolle (CD16/3G8) angesetzt und wie die HNA-2a Probe aufgearbeitet. Ferner wurden Calibration-Beads und Set-Up-Beads angesetzt, um die gewonnenen Messergebnisse der Proben mit Hilfe von Eichkurven berechnen zu können. Zur Bestimmung der HNA-2a-Expression wurden folgende monoklonale Mausantikörper verwendet:

- Anti-IgG (dieser Antikörper wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Bux, Abteilung für Immunologie und Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Gießen, zur Verfügung gestellt),
- Anti-CD16, Clone 3G8, Freezed-dried, Fa. Immunotech (0,2mg in 2ml Aqua dest. gelöst und 1:10 verdünnt),
- Anti-HNA-2a, Clone 7D8 (dieser Antikörper wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Bux, Abteilung für Immunologie und Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Gießen, zur Verfügung gestellt).

In jedes Probenröhrchen wurden 100µl EDTA-Vollblut gegeben. Anschließend wurden in die Negativ- und Positivkontrolle jeweils 20µl unmarkierter Antikörper und in das HNA-2a Röhrchen 25µl des unmarkierten HNA-2a-Antikörpers gegeben. Nach sorgfältigem Durchmischen wurden die Proben für 30min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Proben mit Aqua dest. (Fa. Baxter) lysiert. Dazu wurden pro Röhrchen 1800µl Aqua dest. zur Lyse der Erythrozyten hinzugegeben. Nach 1min wurde die Lyse durch 200µl PBS-Puffer (PBS 10x, ohne Calcium und Magnesium, Fa. Gibco) gestoppt. Im Anschluss daran wurden die Proben mit 1ml PBS-Puffer (1x, ohne Mg^{2+} und Ca^{2+}) aufgefüllt und bei 1000U/min 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Proben, nachdem sie mit 2ml PBS-Puffer versetzt worden waren, erneut bei 1200U/min 5min zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen und die Proben mit je 100µl FITC-Lösung versetzt. Dazu wurde die FITC-Stammlösung (Rabbit-anti-Mouse, Fa. DAKO) 1:40 verdünnt. Im Anschluss daran wurden die Proben 30min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert und erneut mit je 2ml PBS-Puffer aufgefüllt und bei 1000U/min für 5min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Proben zur durchflusszytometrischen Messung mit 350µl

PBS-Puffer aufgefüllt. Die Messung erfolgte nach Möglichkeit sofort, spätestens aber 1h nach Aufarbeitungsende. Für die Aufarbeitung der Beads (Qifikit der Firma Dako, Code No. K0078) wurden je 300ml PBS-Puffer in die beiden Probenröhrchen gegeben. In eines der Reagenzgefäße wurden 100µl der Calibration-Beads pipettiert, in das andere 100µl der Set-Up-Beads. Beide Ansätze wurden anschließend für 5min bei 1400U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Röhrchen erneut mit 2ml PBS-Puffer aufgefüllt und für 5min bei 1400U/min zentrifugiert. Wieder wurde der Überstand verworfen und die Proben wie oben mit der FITC-Lösung versetzt. Nach 30min Inkubation lichtgeschützt bei Raumtemperatur wurden sie mit 2ml PBS-Puffer aufgefüllt und bei 1000U/min 5min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Proben zur Messung am FACS mit 350µl PBS-Puffer aufgefüllt. Die Messung erfolgte auch hier nach Möglichkeit sofort, spätestens aber 1h nach Fertigstellung der Proben.

2.9 Messmethodik

2.9.1 Durchflussszytometrische Messverfahren

Die Durchflussszytometrie ermöglicht die Differenzierung von funktionellen und strukturellen Eigenschaften der verschiedenen Leukozytenpopulationen im Vollblut als physiologischem Medium (91). Bei entsprechender Standardisierung der Versuchsbedingungen besitzt die Methode eine hohe Validität mit geringer Standardabweichung (92) und guter Reproduzierbarkeit der Ergebnisse (93). Die Methode der Durchflussszytometrie beruht auf der simultanen Messung verschiedener struktureller und funktioneller Eigenschaften von Zellen mit Hilfe eines Laserstrahls. Dabei werden die in einem Flüssigkeitsstrom fokussierten Zellen einzeln zu einem Messpunkt, an dem Fluoreszenz und Streulichteigenschaften erfasst werden, geführt. Sämtliche Proben wurden an einem FACSCalibur-Durchflussszytometer (Fa. Becton Dickinson) gemessen. Das Zytometer war mit einem Power-Mac-Computer (Fa. Apple) verbunden und die Auswertung erfolgte mit der Software

CellQuest® (Fa. Becton Dickinson). Die erhaltenen Daten wurden zur Archivierung auf Zip-Disketten gespeichert.

2.9.1.1 Fluidsystem

Die vorbereitete Zellsuspension wird aus dem Probenröhrchen angesaugt und durch Überdruck in das Zentrum der Messkammer transportiert. Die Zellen passieren einzeln an definierter Stelle den Messpunkt, an dem sich der fokussierte Laserstrahl befindet. Diese so genannte hydrodynamische Fokussierung wird erreicht, indem die Zellsuspension in eine durch die Messkammer fließende partikelfreie Trägerflüssigkeit (FACS-Flow, Fa. Becton-Dickinson) injiziert wird. Die so im Zentrum der Trägerflüssigkeit stabilisierten Zellen werden durch im Durchmesser abnehmende Küvetten (von 200µm zu 10µm) zur Messzelle geleitet. Dadurch wird gewährleistet, dass die Zellen einzeln, hintereinander und optimal positioniert den Messpunkt durchlaufen.

2.9.1.2 Optisches Messsystem

Das optische Messsystem analysiert das Streulicht und die Fluoreszenzsignale der am Messpunkt mit Laserlicht beleuchteten Zellen und besteht aus dem Anregungs- und dem Detektionsteil. Der Anregungsteil wird von einem Argon-Ionenlaser gebildet. Er emittiert eine elektromagnetische Strahlung mit der Wellenlänge $\lambda = 488\text{nm}$. Dieses Laserlicht ist in der Lage, spezifische Fluoreszenzfarbstoffe ähnlicher Wellenlänge anzuregen. Der zweite Bereich des optischen Systems kann in Abhängigkeit vom Ablenkungswinkel des Laserlichts weiter unterteilt werden: Der eine Teilbereich registriert das Vorwärtsstreulicht (FSC). Er ist gegenüber dem Laser angebracht und sammelt das Licht, das in einem Winkel von 2-20° gestreut wird. Dies ist der größte Teil der Streuung und korreliert mit der Größe der detektierten Zellen. Der andere Teilbereich registriert das Seitwärtsstreulicht (SSC). Er ist so angebracht, dass er das Streulicht im rechten Winkel (90°) zum ursprünglich geradlinigen Verlauf des Laserstrahls sammeln kann. Hier wird der geringere Teil der Streuung, der mit der Dichte bzw. Zellinnenstruktur der gemessenen

Zellen korreliert, registriert. Um optimale Ergebnisse zu erzielen, müssen die für die Untersuchung gewählten fluoreszierenden Substanzen (=Fluorochrome) im Anregungsbereich des emittierten Laserlichts liegen. Fluoreszierende Verbindungen absorbieren Lichtenergie eines für sie charakteristischen Wellenlängenbereichs und emittieren ihrerseits wiederum Licht. Das in dieser Studie verwendete Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) liegt im Anregungsbereich des Argon-Ionenlasers und emittiert eine Grünfluoreszenz, die im Durchflusszytometer als Fluoreszenz 1 (FL 1) gemessen wird. Zusätzlich wird häufig der rotfluoreszierende Farbstoff Propidiumjodid verwendet, welcher dann als Fluoreszenz 2 (FL 2) gemessen wird. Beide Farbstoffe zeigen eine spezifische Differenz zwischen Anregungs- und Emissionswellenlänge, die als Stoke'scher Shift bezeichnet wird. So wird eine Mehrfarbenfluoreszenzanalyse ermöglicht und der Anwendungsbereich des Durchflusszytometers erheblich erweitert.

2.9.1.3 Signalverarbeitung

Die Fotozellen und Lichtdioden in den beiden Teilbereichen des Detektionssystems wandeln die auftreffenden Lichtsignale in elektrische Signale um. Mit Hilfe einer Photoröhre werden diese elektrischen Signale zunächst verstärkt und dann durch einen Analog-Digital-Wandler in digitale Signale umgewandelt. Diese digitalen Signale werden dann durch den Computer mit Hilfe des Analyseprogramms CellQuest® auf dem Monitor dargestellt.

2.9.2 Die graphische Darstellung der Messergebnisse

2.9.2.1 Punktehistogramm (Dot Plot)

In dieser Darstellungsform wird jeder Zelle entsprechend ihrer Eigenschaften (Größe, Dichte, Fluoreszenz) ein Punkt im Koordinatensystem zugeordnet. Als Achsen dieses Koordinatensystems dienen das Vorwärts- (FSC) und das Seitwärtsstreulicht (SSC). Innerhalb dieser Darstellungsform können anhand

der entstehenden Punktwolken die einzelnen Leukozytenpopulationen (Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten) gegeneinander abgegrenzt werden. Zur Auswertung wird nun um die Granulozytenpopulation ein Auswertungsfenster gelegt, d.h. nur die in diesem Fenster enthaltenen Zellen werden in der weiteren Analyse berücksichtigt (Abbildung 3). In dieser Granulozytenpopulation sind neben den neutrophilen Granulozyten auch eosinophile und basophile Granulozyten enthalten, die aber aufgrund ihrer quantitativen Unterlegenheit die Aussage über neutrophile Granulozyten nicht nachhaltig beeinflussen.

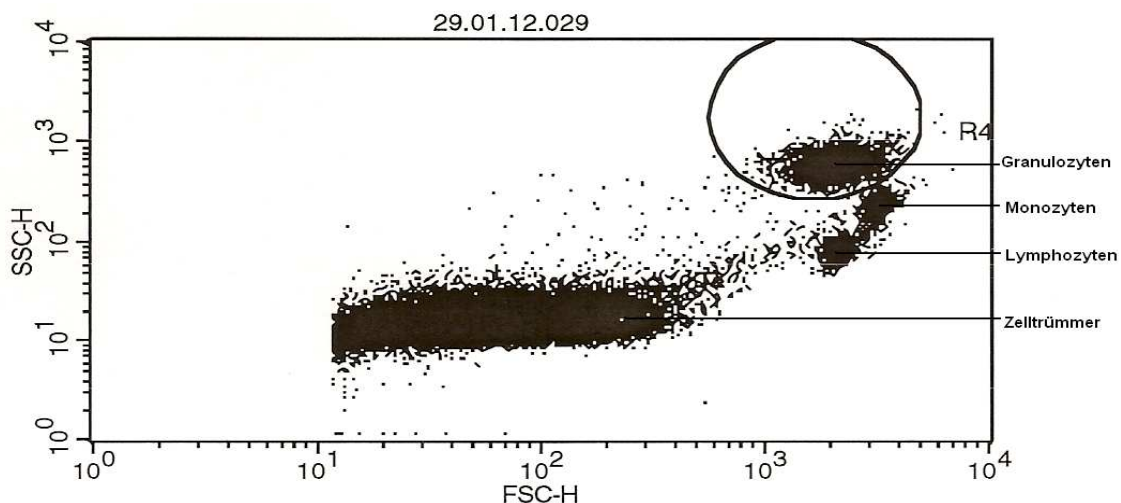


Abbildung 3: FSC/SSC-Diagramm (Originalregistrierung); um die Granulozyten ist zur Abgrenzung gegen die übrigen Leukozytenpopulationen ein Auswertefenster gelegt

2.9.2.2 Häufigkeitsdiagramm

In dieser Darstellung werden die sich oben im Auswertungsfenster befindlichen Zellen entsprechend ihrer Fluoreszenzaktivität (Pulsamplitude in Volt) in Klassen eingeteilt (je nach Einstellung der Signalverarbeitung in 256 oder 1024) und gegen die absolute Zellzahl aufgetragen. Zur Analyse des Diagramms werden Auswertungsfenster, so genannte Gates eingesetzt, um die Fluoreszenz der Zellen entweder als negativ (nicht fluoreszierend) oder positiv (fluoreszierend) zu klassifizieren. Um zu definieren, welche Zellen als

negativ zu werten sind, wird mit Hilfe einer unmarkierten Kontrollprobe das negative Gate festgelegt, d.h. der Messbereich, in dem eine Zelle als nicht fluoreszierend gelten kann. Alle Zellen, die in der folgenden Messung höhere Messwerte aufweisen, werden als positiv bewertet und in einem weiteren Auswertungsfenster analysiert. Um einen Vergleich der gewonnen Ergebnisse zu ermöglichen, wird bei jeder Messung der Peak der negativen Kontrolle (FITC-anti-IgG) auf einen festgelegten Wert, in der vorliegenden Studie entsprechend der Autofluoreszenz der Zellen auf $\leq 10^1$, eingestellt und so die FL 1 Verstärkung für die Probenmessung festgelegt.

2.10 Auswertung der HNA-2a Daten

Die Fluoreszenzintensität ist ein Maß für die Anzahl der gebundenen und entsprechend markierten Antikörper pro Zelle. Vergleicht man die Fluoreszenzintensität zweier Zellpopulationen, läßt sich unter der Voraussetzung, dass der zur Markierung verwendete Antikörper im Überschuß vorlag, eine Aussage darüber machen, welche Zellpopulation die markierten Oberflächenmoleküle vermehrt exprimiert. Um aber Zellen nicht nur in Relation zueinander beurteilen zu können, ist es notwendig, die Zellen gegen Proben zu messen, deren genaue Antigenexpressionsdichte bekannt ist. Für diese Arbeit wurde dafür das Qifikit (Quantitative-immunofluorescence-indirect-assay) von Dako (Baar, Swiss) verwendet. Es enthält als Referenzproben 2 Sorten von Beads: sogenannte Set-Up-Beads, welche aus unmarkierten Beads und Beads mit einer sehr hohen Anzahl an Mausantikörper bestehen und zur Definition eines Negativ- sowie Positivbereichs dienen und sogenannte Calibration-Beads, die aus fünf verschiedenen Beads mit bekannter Mausantikörperdichte bestehen. Die Beads aus dem Kit werden mit einem FITC konjugierten Rabbit-anti-Mouse-Antikörper markiert und am Durchflusszytometer gemessen. Die Set-Up-Beads dienen dabei zur Verstärkereinstellung des FITC-Kanals. Die Einstellung wird so gewählt, dass die unmarkierte Population im Bereich zwischen 10^0 und 10^1 dargestellt wird. Die so eingestellte Verstärkung im FITC-Kanal wird dann für alle weiteren Messungen beibehalten. Bei der

Messung der Calibration-Beads werden die Messergebnisse in einem Histogramm dargestellt, wobei die verschiedenen Populationen der Calibration-Beads durch setzen von Fenstern markiert werden, um getrennte Werte der Fluoreszenzintensität zur späteren Berechnung der Antigendichte zu erhalten (Abbildung 4). Das geometrische Mittel der Fluoreszenzintensität ergibt sich aus der zugehörigen Histogrammstatistik. Die Antigendichte pro Partikel der fünf Untergruppen der Beads ist chargenspezifisch und kann der Packungsbeilage des Kits entnommen werden.

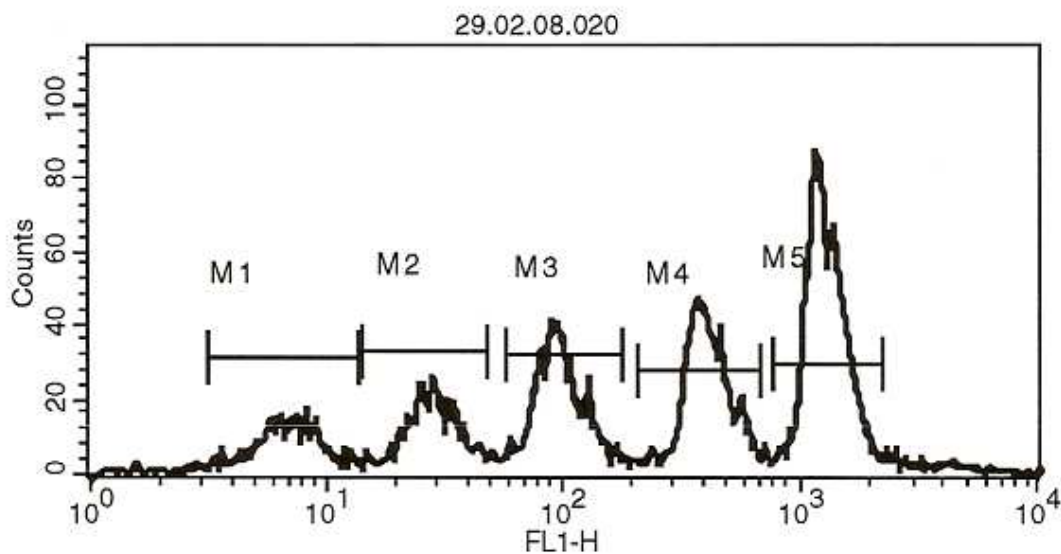


Abbildung 4: Fluoreszenzintensität der Calibration-Beads (Originalregistrierung); die fünf Untergruppen sind durch Fenster markiert

In einer Tabelle wurden die mittlere Fluoreszenzintensität der fünf Populationen der Calibration-Beads sowie die jeweilige Antigendichte eingetragen und im Anschluss graphisch eine Eichkurve erstellt (Abbildung 5). Anhand der resultierenden Geradengleichung konnte die Antigendichte auf den Zellen wie folgt berechnet werden: **SABC = ABC – BAE** wobei SABC (Specific-Antibody-Binding-Capacity) die Anzahl der pro Zelle gebundenen Primärantikörper nach Abzug des Backgrounds bezeichnet, ABC (Antibody-Binding-Capacity) die Anzahl der gebundenen Primärantikörper pro Zelle und BAE (Background-Antibody-Equivalent) die gemessene ABC der Negativ-

kontrolle, die sich aufgrund der Eigenfluoreszenz und der unspezifisch gebundenen Kontrollantikörper ergibt.

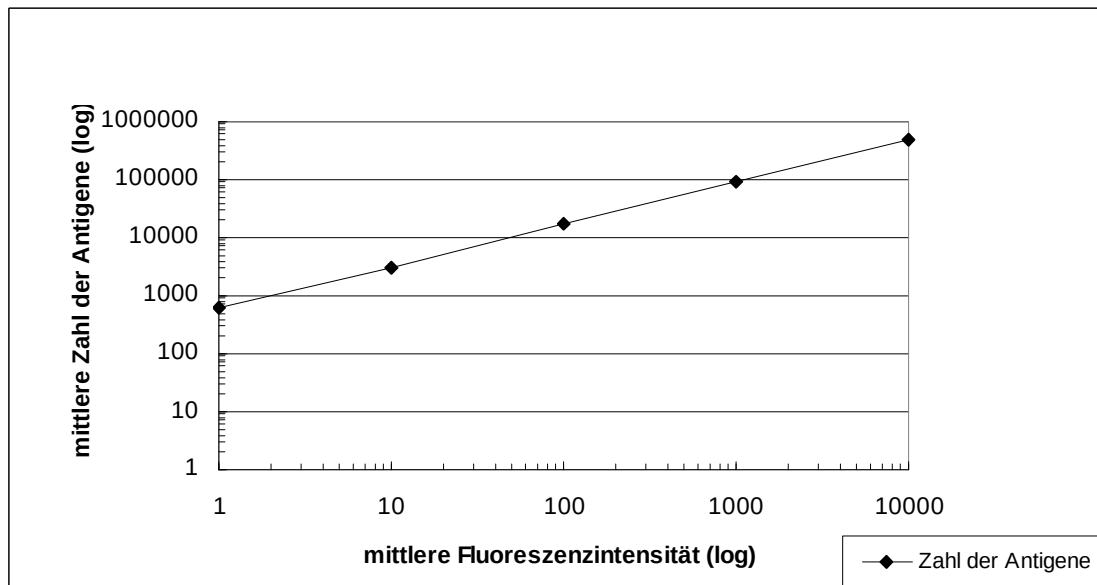


Abbildung 5: Eichkurve zur Berechnung der mittleren Antigendichte; für die Calibration-Beads wurden Beispielwerte eingetragen und eine Ausgleichsgerade gezogen

2.11 Auswertung der Messergebnisse am Durchflusszytometer

Die Auswertung der Messungen am FACS erfolgte mittels der Software CellQuest® (Fa. Becton Dickinson). Bei jeder Probe wurden dazu 10.000 Zellen erfasst und deren Fluoreszenzintensität anhand des Medians der sich im Auswertungsfenster befindlichen Zellen ermittelt.

2.12 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Messergebnisse bezüglich der Oberflächenrezeptoren erfolgte mit Hilfe der Statistiksoftware SPSS, Version 14. Es wurde eine Varianzanalyse für Messwiederholungen (repeated measures analysis) angewendet. Waren die Voraussetzungen zur Durchführung nicht erfüllt, wurde die Prüfgröße nach Greenhouse-Geisser korrigiert (94).

Mit einer Varianzanalyse für Messwiederholungen wurden die Effekte für die Faktoren „Gruppe“ und „Zeit“ sowie die Wechselwirkung „Gruppe x Zeit“ untersucht. Man spricht von einem „Zeit-Effekt“, wenn die Daten der gesamten Stichprobe sich für einen Parameter über die Zeit verändern, also nicht konstant verlaufen. Ein „Gruppen-Effekt“ bezeichnet eine systematische Differenz zwischen den betrachteten Gruppen, die sich zu allen Zeitpunkten, inklusive des ersten Zeitpunktes, unterscheiden. Der in der Regel wichtigste Effekt ist die Wechselwirkung zwischen der Gruppe und dem zeitlichen Verlauf (Gruppe x Zeit). Tritt ein solcher Effekt auf, so bedeutet dies, dass sich die Gruppen im zeitlichen Verlauf unterschiedlich verändert haben.

Die statistische Auswertung der biometrischen Daten, der laborchemischen Parameter, der perioperativen Daten sowie der Liegedauer und des Transfusionsbedarfes wurden mit dem T-Test für unabhängige Stichproben ermittelt. Das Signifikanzniveau dieser Arbeit wurde für alle Ergebnisse mit $p < 0,05$ festgelegt. Für die graphische Darstellung im Ergebnisteil wurden der Mittelwert und die Standardabweichung verwendet.

3. Ergebnisse

Ausgewertet wurden die Daten von 18 Patienten, die konventionell mit HLM operiert wurden (Gruppe 1) und von 9 Patienten, die mittels off-pump-Verfahren ohne HLM operiert wurden (Gruppe 2).

3.1 Biometrische Daten

Beide Gruppen waren hinsichtlich Körpergröße, Körpergewicht und Alter vergleichbar.

	Gruppe 1 (n = 18)	Gruppe 2 (n = 9)	Signifikanzniveau
Größe [cm]	174,45 ± 6,48	174,1 ± 8,5	NS (p = 0,856)
Gewicht [kg]	84,85 ± 13,08	87,1 ± 23,54	NS (p = 0,901)
Alter [Jahre]	66,9 ± 10,43	67,6 ± 8,71	NS (p = 0,737)

Tabelle 7: Mittelwerte und Standardabweichungen der biometrischen Daten

3.2 Perioperative Daten

Die Dauer des operativen Eingriffs war in Gruppe 2 mit 187,1 ± 45,98 Minuten etwas kürzer als in Gruppe 1 mit 221,47 ± 52,97 Minuten. Dieser Unterschied war nicht signifikant (p = 0,094). Die Anzahl der Bypässe war in Gruppe 2 mit 2,89 ± 1,17 signifikant (p = 0,015) geringer als in Gruppe 1 mit 4,05 ± 1,1. Die Intubationszeit war in Gruppe 2 mit 21,56 ± 12 Stunden deutlich länger als in Gruppe 1 mit 15,75 ± 4,96 Stunden. Dieser Unterschied kam durch 2 Ausreißer in Gruppe 2 zustande und war statistisch nicht signifikant (p = 0,073).

	Gruppe 1 (n = 18)	Gruppe 2 (n = 9)	Signifikanzniveau
OP-Dauer [min]	221,47 ± 52,97	187,1 ± 45,98	NS (p = 0,094)
Anzahl der Bypässe	4,05 ± 1,1	2,89 ± 1,17	S (p = 0,015)
Intubationszeit [h]	15,75 ± 4,96	21,56 ± 12	NS (p = 0,073)

Tabelle 8: Perioperative Daten; dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung

3.3 Laborchemische Parameter

3.2.1 Leukozytenwerte

In beiden Gruppen kam es im Verlauf vom Operationsbeginn bis zum 2. postoperativen Tag zu einem signifikanten ($p < 0,01$) Anstieg der Leukozytenanzahl. Die beiden Gruppen unterschieden sich dabei nur am 2. Abnahmezeitpunkt signifikant von einander: In Gruppe 2 stieg die Leukozytenzahl mit $12,53 \pm 1,26$ giga/l dabei signifikant ($p < 0,02$) höher an als in Gruppe 1 mit $8,75 \pm 2,15$ giga/l.

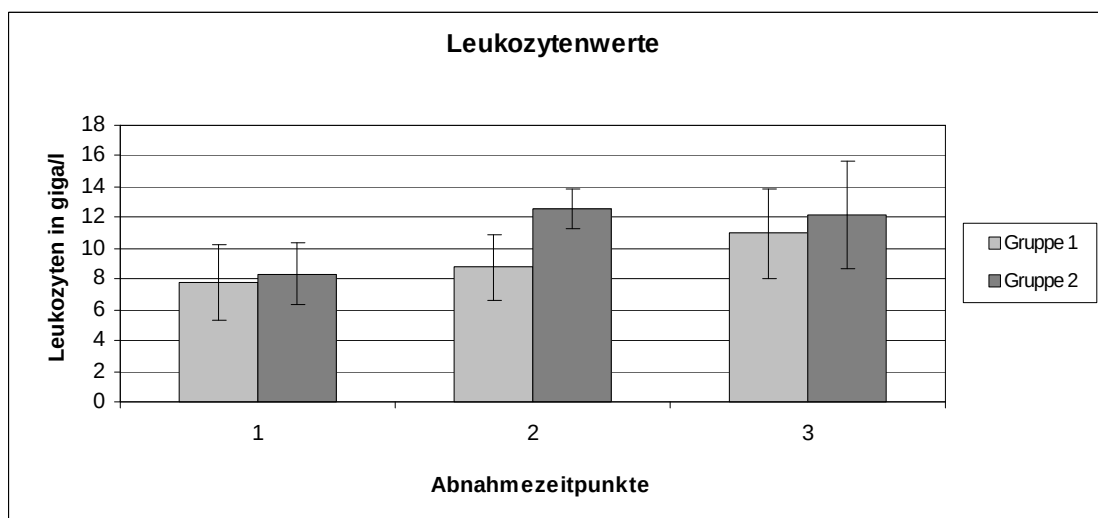


Abbildung 6: Leukozytenkonzentrationen der Gruppen 1 und 2 präoperativ, sowie am 1. und 2. postoperativen Tag; dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung

3.2.2 CRP-Werte

In beiden Gruppen kam es im Verlauf vom Operationsbeginn bis zum 2. postoperativen Tag zu einem signifikanten ($p < 0,001$) Anstieg der CRP-Konzentrationen im Blut. In Gruppe 2 war der Anstieg auf $191,19 \pm 95,95$ mg/dl geringfügig höher als in Gruppe 1 auf $155,74 \pm 38,8$ mg/dl. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant ($p = 0,163$).

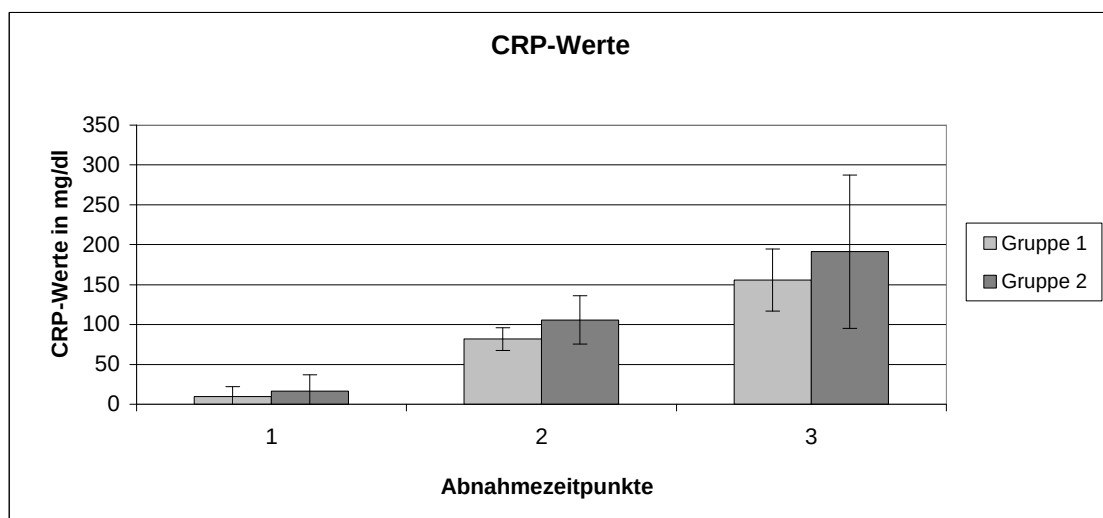


Abbildung 7: CRP-Konzentrationen der Gruppen 1 und 2 präoperativ, sowie am 1. und 2. postoperativen Tag; dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung

3.2.3 Hb-Werte

In beiden Gruppen kam es im Verlauf der Operation zu einem signifikanten ($p < 0,001$) Abfall der Hämoglobinkonzentration im Blut. Dabei fiel in Gruppe 1 der Hb von $14,05 \pm 1,62$ g/dl präoperativ auf $8,49 \pm 0,71$ g/dl postoperativ und in Gruppe 2 von $13,81 \pm 1,6$ g/dl auf $9,14 \pm 1,06$ g/dl. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war nicht signifikant ($p = 0,057$).

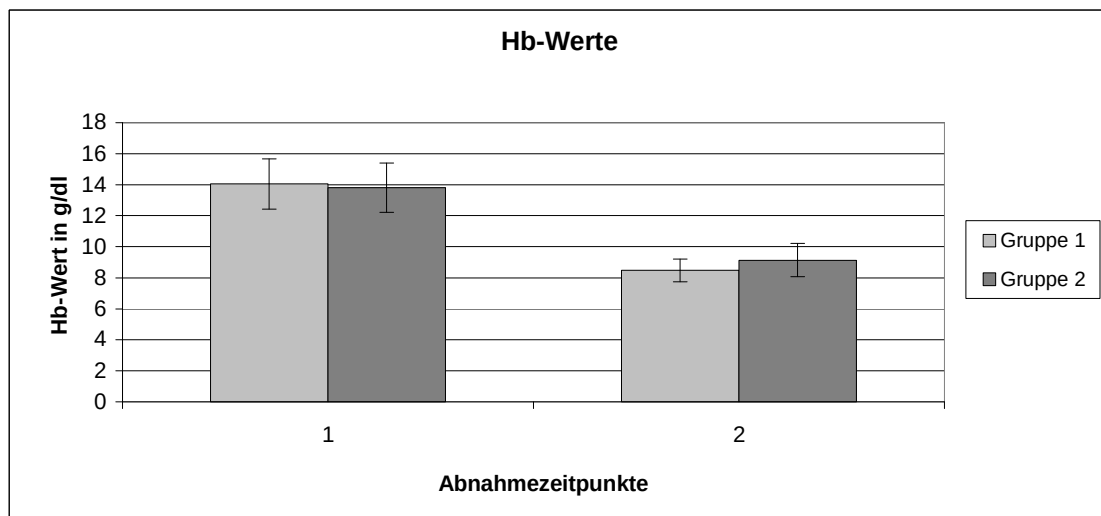


Abbildung 8: Hb-Konzentrationen der Gruppen 1 und 2 prä- und postoperativ; dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung

3.4 Intra- und postoperativer Transfusionsbedarf

In der Gruppe 1 ($10/18 \cong 55\%$) erhielten mehr Patienten intraoperativ Erythrozytenkonzentrate als in der Gruppe 2 ($2/9 \cong 22\%$). Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant ($p = 0,054$).

Der Bedarf an Erythrozytenkonzentraten postoperativ sowie an Fresh Frozen Plasma (FFP) intra- und postoperativ war in beiden Gruppen vergleichbar.

Insgesamt konnte bezüglich des Transfusionsbedarfs beider Gruppen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

	Gruppe 1 n = 18	Gruppe 2 n = 9
EK-Erhalt intraoperativ [Patientenanzahl]	10	2
EK-Erhalt postoperativ [Patientenanzahl]	5	7
FFP-Erhalt intraoperativ [Patientenanzahl]	2	1
FFP-Erhalt postoperativ [Patientenanzahl]	4	2
Transfusionspflichtige Patienten insgesamt	$13/18 \cong 72\%$	$7/9 \cong 77\%$

Tabelle 9: Transfusionsbedarf der Gruppen 1 und 2

3.5 Liegedauer

Der Aufenthalt auf der Intensivstation lag in Gruppe 1 bei $49,35 \pm 17,27$ Stunden und in Gruppe 2 bei $73,22 \pm 68,23$ Stunden. Dieser Unterschied kam durch einen Patienten aus der Gruppe 2 zu Stande, der aufgrund einer respiratorischen Insuffizienz für 10 Tage auf der Intensivstation überwacht werden musste. Zwischen den Gruppen lag kein signifikanter ($p = 0,149$) Unterschied vor. Der gesamte Klinikaufenthalt betrug in Gruppe 1 $12,8 \pm 6$

Tage und in Gruppe 2 $11,67 \pm 3,74$ Tage. Auch dieser Unterschied war nicht signifikant ($p = 0,607$).

	Gruppe 1 (n = 18)	Gruppe 2 (n = 9)	Signifikanzniveau
Intensivstation [h]	$49,35 \pm 17,27$	$73,22 \pm 68,23$	NS ($p = 0,149$)
Klinik [d]	$12,8 \pm 6$	$11,67 \pm 3,74$	NS ($p = 0,607$)

Tabelle 10: Mittelwerte und Standardabweichung zu den Daten der Liegedauer

3.6 Perioperatives Outcome

Bei einem Patienten aus der Gruppe 1 kam es postoperativ zu einer Wundinfektion. Des Weiteren kam es in Gruppe 1 sowie auch in der Gruppe 2 zum Auftreten von postoperativem Vorhofflimmern. Als häufige postoperative Komplikation nach aortokoronarer Bypassoperation wurde die Inzidenz von thromboembolischen Ereignissen sowie postoperativem Myokardinfarkt erfasst. In beiden Gruppen gab es weder einen Apoplex noch einen Myokardinfarkt. Die Letalität des untersuchten Patientenkollektivs lag bei 0%.

	Gruppe 1 n = 18	Gruppe 2 n = 9
Wundinfektion	1	0
absolute Arrhythmie postoperativ	5	4
Apoplex	0	0
Myokardinfarkt	0	0
Tod	0	0

Tabelle 11: Anzahl der Komplikationen

3.7 CD11b

Die CD11b-Expression wurde in beiden Gruppen zu 5 definierten Zeitpunkten ermittelt. Im zeitlichen Verlauf vom 1. zum 5. Abnahmezeitpunkt ließen sich weder in Gruppe 1 noch in Gruppe 2 innerhalb der jeweiligen Gruppe signifikante Unterschiede feststellen ($p = 0,226$). Zu den einzelnen Abnahmezeitpunkten konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ermittelt werden ($p = 0,835$). Allerdings unterschied sich der Gesamtverlauf zwischen den Gruppen signifikant ($p = 0,048$).

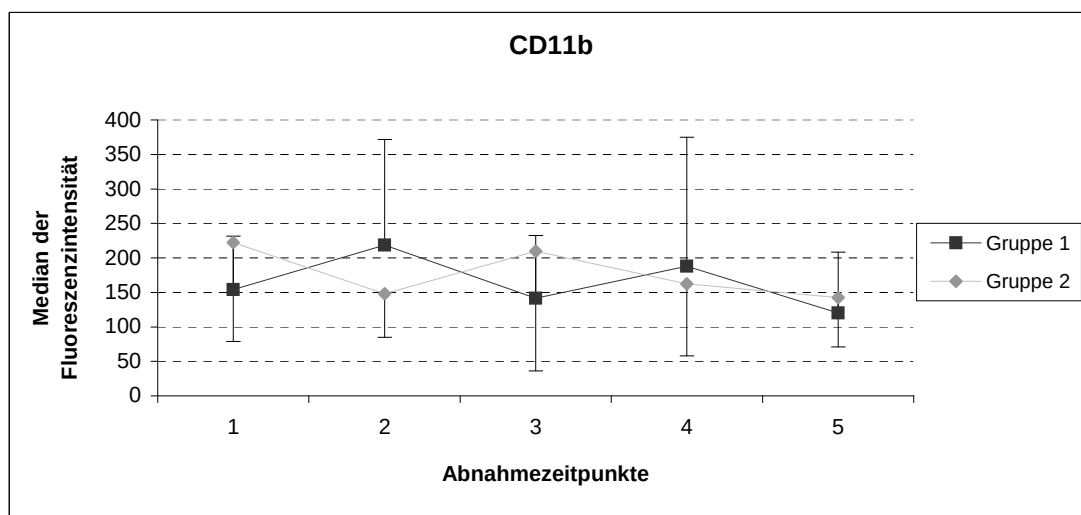


Abbildung 9: Mittelwerte und Standardabweichungen der Fluoreszenzintensität nach Fluoreszenzmarkierung mit Anti-CD11b Antikörper zu den verschiedenen Abnahmezeitpunkten

3.8 CD16

Im zeitlichen Verlauf der Fluoreszenzintensität des Oberflächenrezeptors CD16 vom 1. bis zum 5. Abnahmezeitpunkt zeigte sich in beiden Gruppen ein signifikanter ($p < 0,01$) Abfall der CD16-Expression. In Gruppe 1 fiel der Ausgangswert vor der Narkoseeinleitung $2564,5 \pm 1031$ kontinuierlich bis zum 5. Meßzeitpunkt 24 h postoperativ auf $1401,8 \pm 507,1$. In Gruppe 2 kam es ebenfalls zu einem kontinuierlichen Abfall der Fluoreszenzintensität von $2363 \pm 793,3$ präoperativ auf $1434 \pm 619,9$ 24 h postoperativ. Bei Vergleich der einzelnen Messzeitpunkte zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ($p = 0,259$). Auch im Gesamtverlauf der CD16-Expression unterschieden sich die Gruppen 1 und 2 nicht signifikant ($p = 0,151$) von einander.

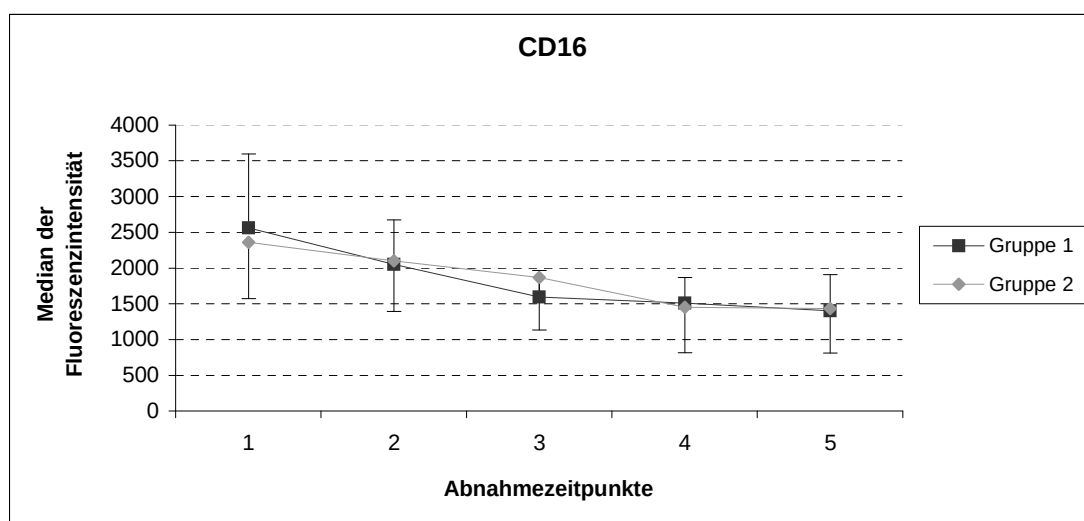


Abbildung 10: Mittelwerte und Standardabweichungen der Fluoreszenzintensität nach Fluoreszenzmarkierung mit Anti-CD16 Antikörper zu den verschiedenen Abnahmezeitpunkten

3.9 CD35

Bezüglich der Expression des CD35 Rezeptors ließen sich in dieser Studie keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen darstellen. Weder im zeitlichen Verlauf ($p = 0,327$), noch im direkten Vergleich der beiden Gruppen zu den verschiedenen Abnahmezeitpunkten ($p = 0,197$) oder im Vergleich des Kurvenverlaufs zeigten sich statistisch relevante Differenzen ($p = 0,783$).

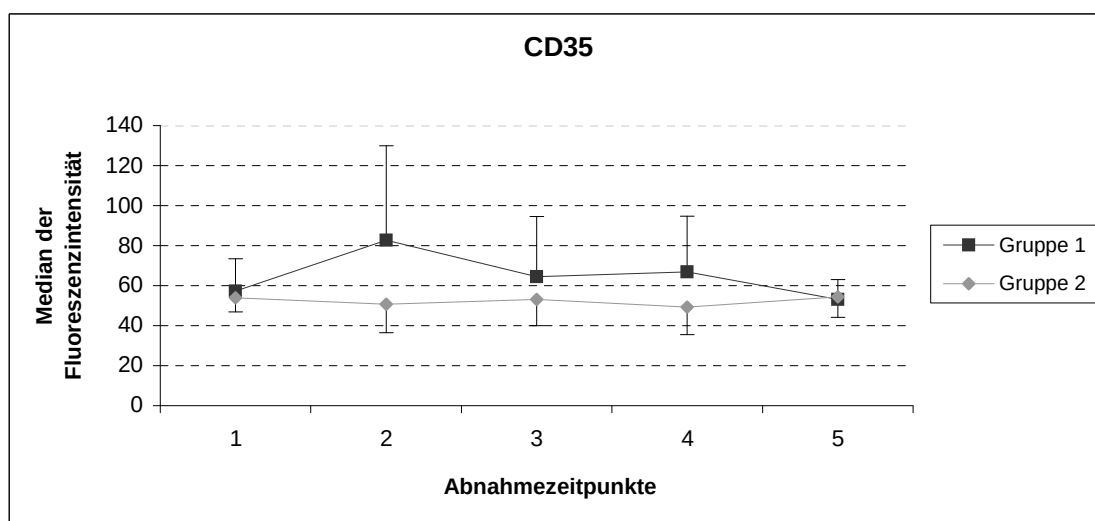


Abbildung 11: Mittelwert und Standardabweichung der Fluoreszenzintensität nach Fluoreszenzmarkierung mit Anti-CD35 Antikörper zu den verschiedenen Abnahmezeitpunkten

3.10 HNA-2a

Bei Betrachtung des zeitlichen Verlaufs der Fluoreszenzintensität des Oberflächenrezeptors HNA-2a fand sich in beiden Gruppen ein signifikanter Anstieg der HNA-2a -Expression auf den neutrophilen Granulozyten.

In der Gruppe 1 stieg die HNA-2a-Expression vom 1. Abnahmezeitpunkt vor der Narkoseeinleitung von 40951 ± 12546 bis zum 5. Messzeitpunkt 24 h postoperativ auf 65646 ± 26576 signifikant ($p < 0,01$) an. In der Gruppe 2 kam es ebenfalls zu einem signifikanten ($p < 0,01$) Anstieg der Fluoreszenzintensität von 40128 ± 11491 präoperativ auf $54010 \pm 9705,7$ 24 h postoperativ. In der Gruppe 2 war dieser Anstieg kontinuierlich.

Beim Vergleich der einzelnen Messzeitpunkte zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ($p = 0,769$). Auch im gesamten Kurvenverlauf der HNA-2a-Expression unterschieden sich die Gruppen 1 und 2 nicht signifikant ($p = 0,171$) voneinander.

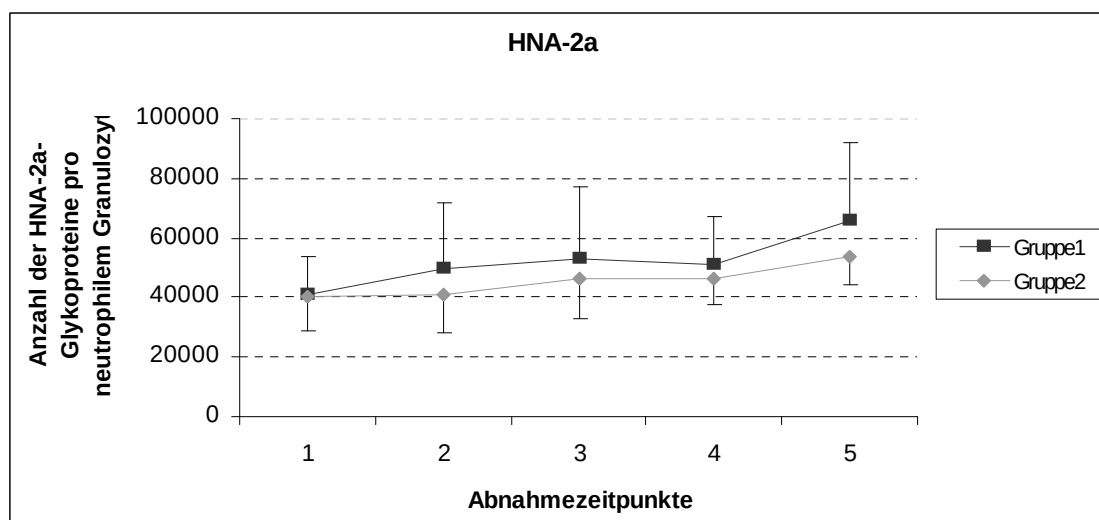


Abbildung 12: Mittelwert und Standardabweichung der HNA-2a-Glykoproteine pro neutrophilem Granulozyt nach Fluoreszenzmarkierung mit Anti-HNA-2a Antikörper zu den verschiedenen Abnahmezeitpunkten

4. Diskussion

4.1 Diskussion der Methode

4.1.1 Probenaufarbeitung

In dieser Studie wurde für alle zytometrischen Messungen eine Vollblutmethode verwendet. Dabei dient das Blut als physiologisches Medium und es kann auf physikalische Trennverfahren oder Zellfixierung verzichtet werden. Wir entschieden uns für die Verwendung der Vollblutmethodik, weil in früheren Studien im Vergleich zu unstimulierten Vollblutansätzen nach Verwendung von Separationsverfahren Veränderungen der Antigenexpression auf der Oberfläche neutrophiler Granulozyten nachgewiesen werden konnten (95;96). Bei Verwendung von Vollblut konnte durch eine Reduktion der Arbeitsschritte eine Beeinflussung der Zellfunktion der neutrophilen Granulozyten vermindert werden (97). Bei der Aufarbeitung von Vollblut ist zu berücksichtigen, dass die zellulären Strukturen innerhalb einer kurzen Zeitspanne quantitativen Veränderungen unterliegen können. So kann eine verlängerte Aufarbeitungszeit von Vollblut zu einer vermehrten Expression von Oberflächenmolekülen führen (95). Aus diesem Grund wurden die Proben in dieser Studie sofort nach der Entnahme verarbeitet und innerhalb von 2 h am Durchflusszytometer ausgewertet.

Bei der Auswertung von Vollblutproben gilt die präanalytische Lyse der Erythrozyten als Standard (97). In der vorliegenden Studie wurde bei der Bestimmung der Oberflächenrezeptoren CD11b, CD16 und CD35 die FACS-Lysing-Solution® verwendet. Sie beinhaltet als lysierende Substanzen Formaldehyd und Diglycol. Im Vergleich mit anderen Lyselösungen ermöglicht die FACS-Lysing-Solution® eine deutlichere Abgrenzung der verschiedenen Zellpopulationen voneinander, da die Menge an Zelltrümmern während der durchflusszytometrischen Analyse der Proben gering ist (97). Die FACS-Lysing-Solution® war in einer vergleichenden Studie von Romeu et al. nicht mit einem signifikanten Verlust an neutrophilen Granulozyten assoziiert (98). Bei der Bestimmung des Oberflächenrezeptors HNA-2a wurde Aqua dest. zur

Lyse der Erythrozyten verwendet. Dieses Verfahren wurde von Prof. Dr. Bux aus der Abteilung für Immunologie und Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Gießen übernommen. Bereits in früheren Untersuchungen zur Analyse der HNA-2a-Expression mittels Durchflusszytometrie wurde die Lyse mit einem nichtionischen Detergens beschrieben (99).

Durch die Lyse der Erythrozyten bei durchflusszytometrischen Messungen kann das Streulicht der neutrophilen Granulozyten beeinflusst werden, auch wenn das Fluoreszenzsignal der Zellen nicht verändert wird (97). Da eine durch die Lyse des Vollbluts erhöhte Hintergrundfluoreszenz als erhöhte unspezifische Antikörperbindung im Blut gedeutet werden kann (100), wurde in der vorliegenden Studie das Vollblut zuerst mit dem Antikörper inkubiert und im Anschluß daran lysiert. Bei der durchflusszytometrischen Messung resultiert die ermittelte Fluoreszenz aus der Bindung der verwendeten Fluorochrome - in dieser Studie das FITC - an spezifische Bindungsstellen auf der Zellmembranoberfläche und aus der Eigenfluoreszenz der Zelle (101). Diese Spontanfluoreszenz der Zelle wird von intrazellulären Flavoproteinen emittiert (101). Zusätzlich kann auch die unspezifische Bindung von Antikörpern zu einem erhöhten Fluoreszenzsignal führen. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit ein Kontrollansatz mit einem FITC-markierten, gegen humanes IgG gerichteten Antikörper angesetzt, um Messfehler durch unspezifische Bindungen auszuschließen. Weiterhin wurde Vollblut mit unmarkierten Antikörpern gegen die auszuwertenden Rezeptoren inkubiert, um einen negativen Kontrollwert zu etablieren.

Zur Bestimmung der Anzahl der exprimierten HNA-2a Moleküle wurde für die Messung der HNA-2a-Expression ein Kit (Qifikit®, Dako, Swiss) verwendet, das die Quantifizierung der exprimierten Rezeptoren ermöglicht. Dieses Verfahren wurde in Anlehnung an frühere Untersuchungen von Prof. Dr. Bux übernommen und ist bereits durch mehrere Untersuchungen validiert (102).

4.1.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie stellt prinzipiell eine Weiterentwicklung der Fluoreszenzmikroskopie dar und ermöglicht die Messung großer Zellzahlen in

relativ kurzer Zeit. Darüber hinaus kann bei durchflusszytometrischen Verfahren durch die Differenzierung von funktionellen und strukturellen Eigenschaften der verschiedenen Leukozytenpopulationen (91) eine hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erreicht werden (93). Das durchflusszytometrisch gemessene Streulicht ist abhängig von Form, Oberflächenstruktur und intrazellulärer Granularität der Zellen (103). Da neutrophile Granulozyten und Monozyten aufgrund ähnlicher Größe und Granularität ein vergleichbares Streulichtsignal aufweisen, kann die Abgrenzung der beiden Populationen im FSC/SSC-Diagramm erschwert sein. Es gilt aber als gesichert, dass die fehlerhaft mitanalysierten Monozyten bei insgesamt 10.000 gemessenen Zellen wegen ihres prozentual geringeren Anteils einen zu vernachlässigenden Einfluss auf das Ergebnis der Messung haben (104). Die gemessenen Fluoreszenzsignale sind innerhalb des Häufigkeitsdiagramms um einen Mittelwert gestreut (105). Der in dieser Studie bestimmte Median der Fluoreszenzintensität beschreibt denjenigen Messwert, der von 50% der Messungen über- bzw. unterschritten wird. Der Median besitzt gegenüber dem Mittelwert den Vorteil, dass er relativ stabil gegenüber Ausreißern in einer Messreihe mit starker Streuung ist. Daher ergibt sich bei der Auswertung des Medians eine bessere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sowie eine höhere Präzision der Probenanalyse (106).

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Neutrophile Granulozyten stellen zusammen mit den Makrophagen die Haupteffektorzellen des angeborenen, unspezifischen Immunsystems dar. Nach Traumen wie z.B. Eingriffen unter Verwendung der Herz-Lungen-Maschine wird ihre Aktivität durch Zytokine und Komplement gesteigert (107). Als initiale Abwehrzellen gegen Mikroorganismen werden neutrophile Granulozyten innerhalb kürzester Zeit aktiviert (107) und spielen daher eine wichtige Rolle in der Kontrolle der inflammatorischen Antwort nach herzchirurgischen Operationen mit kardiopulmonalem Bypass (2;43).

Die schnell einsetzende Aktivierung von neutrophilen Granulozyten spiegelt sich in unserer Studie in den Veränderungen der HNA-2a- und der CD16-Expression wider.

Für die Expression des Oberflächenrezeptors HNA-2a (CD177 oder NB1) wurde im zeitlichen Verlauf ein signifikanter Anstieg sowohl in der on-pump als auch in der off-pump Gruppe beobachtet. Zwischen den Gruppen gab es dabei keine signifikanten Unterschiede. In früheren Studien wurde ebenfalls eine vermehrte Expression von HNA-2a nach Aktivierung von neutrophilen Granulozyten beschrieben. Göhring et al. fanden bei Patienten mit schwerer bakteriellen Infektion eine signifikant gesteigerte HNA-2a-Expression (79). Die Steigerung der Expression von HNA-2a auf der Zelloberfläche bei Infektionen kann zum einen durch eine Verlagerung von den in sekundären Granula gelagerten HNA-2a-Rezeptoren (71) und zum anderen durch eine vermehrte de-novo-Synthese erklärt werden, wie der Anstieg des HNA-2a-mRNA-Gehalts nach Aktivierung der Neutrophilen nahelegt (108). Ebenso induzieren die in vitro Stimulation mit f-MLP (67;71) und die Gabe von G-CSF an gesunden Probanden eine erhöhte HNA-2a-Expression (68). Auffallend war bei der Stimulation mit f-MLP, dass nur auf den Zellen eine Hochregulation erfolgte, die auch im unstimuliertem Zustand HNA-2a auf ihrer Zelloberfläche exprimierten. Die Eigenschaft, HNA-2a zu exprimieren, wird vermutlich bereits auf der Ebene der Vorläuferzellen festgelegt, da der prozentuale Anteil HNA-2a-präsentierender Neutrophiler während der Stimulation konstant blieb (67;71). Bei der Stimulation mit f-MLP fiel zudem auf, dass HNA-2a-exprimierende neutrophile Granulozyten eine stärkere chemotaktische Reaktion zeigen, als solche, die kein HNA-2a-Protein auf ihrer Oberfläche präsentieren (109). Der Einfluss von G-CSF auf die Expression von HNA-2a wurde in verschiedenen Studien belegt (68;79;108). G-CSF ist ein Wachstumsfaktor, der von Zellen der Monozyten- und Makrophagenlinie sowie von Endothelzellen, Fibroblasten, Mesothelzellen produziert wird (110), Anzahl und Funktion Neutrophiler beeinflusst (111) und somit als Regulator sowohl der basalen Neutrophilenzahl zum Ausgleich der Zellmauserung als auch zur stressinduzierten Steigerung der Neutrophilenzahl z.B. bei

bakteriellen Infektionen dient. In diesem Zusammenhang können im Vergleich zu Gesunden bei akuten Infektionen und Sepsis neben einer signifikant gesteigerten HNA-2a-Expression auch erhöhte G-CSF Spiegel im Blut nachgewiesen werden (112). G-CSF kann darüber hinaus die Migrationsrate neutrophiler Granulozyten vom Blut ins Gewebe und besonders ins entzündete Gewebe unabhängig vom chemotaktischen Gradienten erhöhen (111). Dies könnte insbesondere im Hinblick auf ein Zusammenspiel mit PECAM-1 bei der transendothelialen Migration von neutrophilen Granulozyten relevant sein. In vorangegangenen Untersuchungen wurden bei gesunden Individuen 36.000 - 318.000 HNA-2a-Glykoproteine pro neutrophilem Granulozyt gemessen (113). Somit liegen die in der vorliegenden Studie gemessenen Werte im Erwartungsspektrum, auch wenn die Angaben zur mittleren Fluoreszenzintensität aufgrund von unterschiedlichen Geräteeinstellungen nicht direkt verglichen werden können. Nach Gabe von G-CSF könnte synergistisch mit der Down-Regulation des CD16-Rezeptors, die zur Verlängerung der Lebensspanne von PMN führt, durch die gesteigerte Expression von HNA-2a die Apoptose verzögert und somit die Effizienz der Immunabwehr gesteigert werden (114). Obwohl zahlreiche Studien auf eine Interaktion von HNA-2a und G-CSF hinweisen (68;79;108), ist die genaue Funktion von HNA-2a noch unbekannt. Zum einen wird eine Rezeptorfunktion vermutet, da HNA-2a durch seine GPI-Verankerung in der äußeren Schicht der Phospholipiddoppelmembran eine hohe laterale Mobilität besitzt. Ferner wurde bei aktivierten neutrophilen Granulozyten eine Verlagerung von HNA-2a aus der Plasmamembran in Lyso- und Endosomen beschrieben, was ebenfalls auf eine Rezeptorfunktion hinweist (71). Zum anderen wird für HNA-2a auch eine Funktion im Rahmen der Phagozytose vermutet, da Antikörper gegen HNA-2a die Phagozytose inhibieren (78) und die Produktion von ROS vermindern (115). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wurde nach Stimulation mit G-CSF eine gesteigerte ROS-Produktion (70) und eine verbesserte Phagozytoseleistung bei neutrophilen Granulozyten beschrieben (68). Vor kurzem konnten Sachs et al. nachweisen, dass HNA-2a einen Liganden für das Plättchen-Endothelzell-Adhäsionsmolekül-1 (PECAM-1)

darstellt (29). Dies ist insbesondere im Zusammenhang mit der Aktivierung von PMN während der EKZ interessant, da diese zu einer erhöhten Exprimierung von Adhäsionsmolekülen führt (116;117) und es in Folge dessen zu einer verstärkten Migration von PMN durch das Gefäßendothel ins Gewebe kommt. Für die Transmigration von PMN spielt HNA-2a über die Bindung an PECAM-1 eine entscheidende Rolle (29). PECAM-1 (CD31), ein einsträngiges Glykoprotein, gehört zur Immunglobulin-Superfamilie mit adhäsiven Eigenschaften und stellt einen integralen Bestandteil der Zellmembranen dar (118). PECAM-1 wird vor allem auf vaskulären Endothelzellen, aber auch auf neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Thrombozyten exprimiert. Auf den Endothelzellen lässt sich PECAM-1 insbesondere an den Zell-zu-Zell-Verbindungen nachweisen (119). Im akuten Entzündungsgeschehen spielt PECAM-1 eine entscheidende Rolle bei der Lösung dieser kapillären Zell-zu-Zell-Verbindungen, ein Vorgang, der für die transendotheliale Migration von Leukozyten aus den Gefäßen in das perivaskuläre Gewebe erforderlich ist (28). Eine Interaktion zwischen neutrophilem HNA-2a und dem an Zell-Zell-Verbindungen lokalisiertem endothelialelem PECAM-1 könnte damit die Transmigration neutrophiler Granulozyten zwischen den Endothelzellen hindurch einleiten. Nach der Migration durch die Gefäßwand führen die zytotoxischen Effekte der aktivierten neutrophilen Granulozyten im Gewebe zu einer Schädigung der betroffenen Zellen, es kommt zum sogenannten Capillary Leakage Syndrome (120). Dabei führt die Freisetzung von Superoxiden und lysozymalen Enzymen aus den PMN zu einer direkten endothelialen Schädigung mit Auflösung bzw. Auflockerung der Tight Junctions und damit zu einer Erhöhung der kapillären Permeabilität mit Extravasation von Flüssigkeit und interstitiellem Ödem (8). Da insbesondere im pulmonalen Gefäßbett eine erhöhte Akkumulationsneigung von aktivierten Leukozyten besteht, können diese Vorgänge klinisch zu einer respiratorischen Insuffizienz führen (121). Insgesamt ist die pulmonale Dysfunktion im Rahmen des SIRS eine der häufigsten Komplikationen nach Einsatz der Herz-Lungen-Maschine (8;9). Dies ist insbesondere im Hinblick auf das durch HNA-2a-Antikörper

verursachte TRALI von Interesse, da hierbei ein ähnlicher Pathomechanismus über eine Aktivierung von neutrophilen Granulozyten eine pulmonale Dysfunktion hervorruft. Beim TRALI können die durch HNA-2a-Antikörper aktivierten neutrophilen Granulozyten die Lungenkapillaren nur erschwert passieren (122). Die am Endothel adhärierenden Granulozyten schädigen die Endothelzellen durch die Freisetzung von Sauerstoffradikalen, wodurch die Kapillarpermeabilität erhöht und ein Lungenödem verursacht wird (83). Ursächlich für das TRALI ist die Übertragung von Antikörpern gegen HNA-2a der Empfängergranulozyten zumeist durch Frischplasma oder Thrombozytenkonzentrate. Klinisch zeigt sich eine während oder bis zu 6 Stunden nach der Transfusion einsetzende akute Luftnot bis hin zur beatmungspflichtigen respiratorischen Insuffizienz (123). Die Mortalität des Krankheitsbildes liegt bei 16,3% (124). Für die Prognose einer schweren TRALI-Reaktion ist die frühzeitige Therapie entscheidend, da sich die Patienten bei rechtzeitiger Intubation und Beatmung in der Regel schnell und vollständig erholen (125). Da die Transfusion von Blutbestandteilen bei herzchirurgischen Operationen häufig vorkommt, besteht bei diesem Patientenkollektiv möglicherweise ein erhöhtes Risiko für das Auftreten eines TRALI, das bei postoperativer respiratorischer Insuffizienz differentialdiagnostisch in Betracht gezogen werden muss. In dieser Studie entwickelte ein Patient im postoperativen Verlauf eine behandlungsbedürftige respiratorische Insuffizienz. Da dieser Patient jedoch im Röntgen-Thorax pneumonische Infiltrate zeigte und weder Fresh Frozen Plasmen noch Thrombozytenkonzentrate erhalten hat, ist ein TRALI in diesem Fall ausgeschlossen.

Bezüglich des Oberflächenrezeptors CD16 fanden wir einen signifikanten Abfall der Expression auf der Zelloberfläche von neutrophilen Granulozyten sowohl in der on-pump als auch in der off-pump Gruppe, wobei keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen auftraten. Eine Abnahme der CD16-Expression als Ausdruck der Aktivierung von neutrophilen Granulozyten wurde bei Infektionen und Sepsis sowie nach Stimulation mit LPS oder G-CSF in verschiedenen Studien beschrieben (68;69). So führt die G-CSF Gabe bei gesunden Probanden innerhalb von 8-24h zu einer um 50-

80% geringeren CD16-Expression und zu einer weiteren Abnahme bei erneuter G-CSF Gabe (68;126). Ebenso fanden White-Owen et al. einen signifikanten Abfall der Expression von CD16 auf neutrophilen Granulozyten bei Patienten mit schwerem Trauma. Dieser Rückgang wurde maßgeblich durch die Schwere der Verletzungen beeinflusst (50). Wagner et al. vermuten, dass die Zellen durch eine geringere Expression des CD16-Rezeptors der vorzeitigen Apoptose entgehen und somit länger der Immunabwehr zur Verfügung stehen (69). Weiterhin scheint die Anzahl der CD16-Rezeptoren klinisch relevant zu sein. Patienten mit einer präoperativ hohen CD16-Rezeptor-Expression und einer deutlichen postoperativen Herunterregulation entwickelten im Verlauf seltener Infektionen als Patienten mit einer präoperativ geringen Expression an CD16-Rezeptoren und auch nur einer geringen postoperativen Abnahme (127). Bei der Aktivierung von neutrophilen Granulozyten mit f-MLP kommt es zu einer proteolytischen Ablösung des CD16 Rezeptors von der Zelloberfläche, was auf eine Funktion der löslichen Form im Entzündungsgeschehen hindeutet (128) und eine Erklärung für die Abnahme der Expression an der Zelloberfläche sein könnte. Koene et al. beschrieben in diesem Zusammenhang eine Korrelation zwischen der Menge der löslichen Form des Fc γ -RIII (sFc γ -RIII), die sich im Plasma nachweisen lässt (129) und dem der Zellmembran exprimierten Fc γ -RIII (130). Insgesamt stellt CD16 einen etablierten Parameter für die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten bei Infektionen und Traumen sowie nach G-CSF Stimulation dar. Da Bypassoperationen mit HLM bekannterweise eine systemische Entzündungsreaktion induzieren (1;2), ist eine Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und somit eine Expressionsänderung von CD16 zu erwarten. Dies wurde in dieser Studie durch die signifikante Abnahme der CD16-Expression in der on-pump Gruppe bestätigt. Da es auch in der off-pump Gruppe zu einer signifikanten Abnahme der CD16-Expression kam, scheinen das chirurgische Trauma, die mediane Sternotomie und die Manipulation am Herzen einen maßgeblichen Anteil an der Aktivierung der neutrophilen Granulozyten und somit der Expressionsabnahme zu haben. Des Weiteren hat sich die Expression des CD16-Rezeptors in dieser Studie als robust im

Vergleich zu den Oberflächenrezeptoren CD11b/CD18 und CD35 gezeigt. Für die Expression des CD16-Rezeptors konnten trotz eines kleinen Stichprobenumfangs von insgesamt 27 Patienten signifikante Ergebnisse ermittelt werden. Stroncek et al. erzielten bei einem kleinen Kollektiv von 7 Patienten relevante CD16-Expressionsveränderungen nach G-CSF Stimulation (68), ebenso Michon et al., die 13 Patienten in ihrer Studie untersuchten (126). Zusammenfassend kann die Expression von CD16 als geeigneter Marker für die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten nach Traumen, Infektion und extrakorporaler Zirkulation angesehen werden.

Für die Oberflächenrezeptoren CD11b und CD35 konnten Wehlin et al. in ihrer Studie einen signifikanten Unterschied in der Expression von CD11b sowie auch in der Expression von CD35 nachweisen (131). Die Expression beider Rezeptoren stieg 24h postoperativ signifikant an, wobei allerdings keine Unterschiede zwischen der on- und off-pump Gruppe festgestellt werden konnten. Im Gegensatz hierzu konnten wir keine signifikanten Veränderungen in der Expression dieser Rezeptoren nachweisen. Das Patientenkollektiv war bei Wehlin et al. mit insgesamt 37 Patienten etwas größer als in unserer Studie mit 27 Patienten. Zudem fielen in unserer Studie hohe interindividuelle Unterschiede auf, so dass der gewählte Stichprobenumfang die Darstellung von Unterschieden im Operationsverfahren verhindert haben könnte. Ein größerer Stichprobenumfang hätte hier zu einer besseren Power hinsichtlich Unterschieden im Operationsverfahren geführt; unsere Studie war jedoch auf die HNA-2a-Expression als Zielparameter ausgelegt.

Die Entzündungsreaktion nach herzchirurgischen Eingriffen ist jedoch nicht nur eine Folge der Leukozytenaktivierung, sondern wird auch durch Aktivierung des Komplement- und Gerinnungssystems, sowie von Endothelzellen und Thrombozyten begünstigt. Zusammenfassend wird diese generalisierte Entzündungsantwort des Organismus als SIRS bezeichnet. Neben der EKZ können u.a. schwere Traumen, große Operationen und Verbrennungen das SIRS auslösen (10). Daraus resultierende Organdysfunktionen betreffen vor allem die Lunge (pulmonale Insuffizienz, ARDS), die Niere (Funktionseinschränkungen bis zum Versagen) und das

kardiovaskuläre System (myokardiale Kontraktilitätsstörungen bis hin zum kardiogenen Schock) (4). Dieses Multiple Organ Dysfunction Syndrome (MODS) kann bis zum Multiorganversagen (MOV) führen und endet häufig letal, wobei sich vor allem bestehende Vorerkrankungen und zunehmendes Lebensalter prädisponierend auswirken (132). Aufgrund der Wechselwirkungen zwischen kardiopulmonalem Bypass und der assoziierten Verfahrensweisen haben Operationen mit CPB möglicherweise eine höhere Inzidenz an Organdysfunktionen. In den letzten Jahren haben daher minimal-invasive Verfahren und off-pump-Techniken bei herzchirurgischen Eingriffen zunehmend an Bedeutung gewonnen. Insgesamt sind die bisher aufgezeigten Unterschiede zwischen on- und off-pump Chirurgie bezogen auf das SIRS jedoch eher quantitativer als qualitativer Natur. Die Mediatorsysteme (Komplement, Koagulation, Zytokine) sowie die Leukozyten, Thrombozyten und Endothelzellen werden unabhängig vom OP-Verfahren aktiviert, so dass lediglich das Ausmaß der Aktivierung zwischen den Gruppen variiert (30). Hochrisikopatienten könnten somit am meisten von der neuen off-pump Operationsmethode profitieren (6;20;21). Trotz ähnlichem Trauma fanden Schulze et al. eine signifikante Reduktion des SIRS sowie des frühen Katecholaminbedarfs bei off-pump Operierten. Dies könnte insbesondere bei kritisch kranken Patienten zu einer verbesserten Organfunktion und somit zu einer schnelleren Erholung des Patienten beitragen (133). Bei Patienten mit niedrigem Operationsrisiko, die sich einer einfachen Revaskularisation unterziehen müssen, hat die HLM vermutlich weniger Einfluss auf die entzündliche Antwort als erwartet. Gerade bei diesen Patienten gewinnt das Trauma durch Sternotomie und Thorakotomie an Bedeutung für die inflammatorische Reaktion des Organismus (134). Viele Ergebnisse aus vorangegangenen Untersuchungen lassen vermuten, dass die Leukozytenaktivierung durch die extrakorporale Zirkulation zwar beschleunigt werden könnte, letztendlich aber durch das chirurgische Trauma determiniert ist (30). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie deuten ebenfalls darauf hin, dass das Trauma der Operation die entzündliche Reaktion des Körpers womöglich stärker beeinflusst, als die extrakorporale Zirkulation. Die Verwendung der off-

pump Technik konnte in diesem Zusammenhang weder einen Anstieg der HNA-2a-Expression noch ein Abfallen der CD16-Expression verhindern. Bei der Betrachtung von Leukozytenanzahl und CRP-Konzentration im Blut, ausgehend von den präoperativen Werten hin zu den am 2. postoperativen Tag gemessenen zeigt sich ein signifikanter Anstieg der Leukozytenzahl sowie auch der CRP-Konzentration ohne signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Dies passt zu der Beobachtung von Salo et al. (137), dass es bei großen chirurgischen Traumata zu einer systemischen Entzündungsreaktion kommt. Gu et al. sowie Diegeler et al. beobachteten ebenfalls einen raschen perioperativen Leukozytenanstieg in der off-pump wie auch in der on-pump Gruppe (23;138) was im Gegensatz zu Ascione et al. steht (15), die eine geringere Ausprägung der inflammatorischen Antwort des Organismus in der off-pump Gruppe fanden.

Für die perioperativen Daten ließen sich in dieser Studie keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen aufzeigen. Im Verlauf der Operation kam es in beiden Gruppen zu einem signifikanten Abfall der Hämoglobinkonzentration im Blut. Relevante Unterschiede zwischen den beiden Operationsverfahren, wie Matata et al. sie in ihrer Studie finden konnten (21), zeigten sich dabei nicht. Auch bezüglich des Transfusionsbedarfs ließ sich im Gegensatz zu Matata et al. und Sohrabi et al. (14) in der vorliegenden Studie keine Reduktion des Transfusionsbedarfs in der off-pump-Gruppe feststellen, wobei der Stichprobenumfang nicht auf diese Fragestellung ausgelegt war. Bezüglich der Verweildauer der Patienten auf der Intensivstation und des gesamten Krankenhausaufenthaltes, ließen sich in dieser Studie ebenfalls keine signifikanten Differenzen zwischen den beiden Gruppen aufzeigen, was im Einklang mit den Ergebnissen von Shroyer et al. steht (135). Sohrabi et al. fanden im Gegensatz dazu für den Aufenthalt auf der Intensivstation und ebenso für den gesamten Krankenhausaufenthalt bei off-pump Patienten eine signifikant kürzere Verweildauer (14). Das perioperative Outcome war in dieser Studie in beiden Gruppen vergleichbar. In der on-pump Gruppe entwickelte ein Patient eine postoperative Wundinfektion und in beiden Gruppen traten postoperative

Arrhythmien auf. Eine geringere Inzidenz von Vorhofflimmern ließ sich in der off-pump Gruppe im Gegensatz zu Allen et al. nicht aufzeigen (136). Einschränkend muss hier wiederum angemerkt werden, dass die vorliegende Studie in Bezug auf den Stichprobenumfang nicht auf diese Fragestellungen ausgelegt war. Bezüglich der perioperativen Daten zeigten sich in der vorliegenden Studie Unterschiede zwischen den Operationsverfahren. So war die OP-Dauer in der on-pump Gruppe im Mittel 33 min länger als in der off-pump Gruppe. Hierzu könnte die Tatsache beigetragen haben, dass in der off-pump Gruppe mit $2,89 \pm 1,17$ signifikant weniger Bypässe angelegt wurden als in der on-pump Gruppe mit $4,05 \pm 1,1$. Insgesamt ist der Stichprobenumfang und die gewonnene Datenmenge bezüglich des Vergleichs zwischen dem on-pump und dem off-pump Verfahren aufgrund des Pilotstudiencharakters dieser Untersuchung zu gering, um Unterschiede zwischen den beiden Operationstechniken ermitteln zu können.

Herzchirurgische Operationen stellen einen etablierten Stimulus für eine systemische Immunantwort dar (1;2;139), ohne dass eine infektiöse Genese nachgewiesen werden kann. Für generalisierte bakterielle Infektionen konnte die Bedeutung von HNA-2a als Immunparameter bereits belegt werden (79). Mit dieser Studie liefern wir weitere Ergebnisse, dass HNA-2a als Immunparameter auch bei nichtinfektiösen Immunreaktionen, wie dem SIRS nach herzchirurgischen Operationen, als Verlaufsparemeter geeignet ist. Neben der EKZ trägt vor allem das chirurgische Trauma zur Aktivierung des Immunsystems bei (137), wobei die erheblichen Gewebsverletzungen durch Sternotomie oder Thorakotomie ausgeprägte Immunreaktionen schon vor Beginn des CPB induzieren (140). Da in dieser Studie der operative Zugangsweg in der on-pump sowie auch in der off-pump Gruppe über eine mediane Sternotomie erfolgte, ist von einem signifikanten chirurgischen Trauma auszugehen. Dies spiegelt sich in den Ergebnissen wider, die für sämtliche Patienten unabhängig vom gewählten Operationsverfahren vergleichbare Verläufe zeigen. Sowohl in der on-pump als auch in der off-pump Gruppe stieg die HNA-2a-Expression im zeitlichen Verlauf zwar

signifikant an, zwischen den Gruppen traten jedoch keine signifikanten Unterschiede auf. Der Anstieg der HNA-2a-Expression ist assoziiert mit einem Abfall des Oberflächenrezeptors CD16 als Ausdruck der Aktivierung neutrophiler Granulozyten. Da HNA-2a im Gegensatz zu CD11b, CD16 und CD35 ausschließlich auf neutrophilen Granulozyten und deren Vorläuferzellen exprimiert wird (76), stellt dieser Oberflächenmarker im Vergleich zu den oben genannten Oberflächenrezeptoren, die auch auf anderen Immunzellen, insbesondere Monozyten, exprimiert werden, möglicherweise einen spezifischeren Parameter für die Aktivierung neutrophiler Granulozyten dar. Dabei könnte insbesondere die schnelle Hochregulierung der HNA-2a-Expression durch Freisetzung aus sekundärer Granula von Bedeutung sein, wie sie nach G-CSF Gabe (71) und im Rahmen schwerer Infektionen (79) nachgewiesen werden konnte. Die schnelle Expressionssteigerung durch Mobilisation von intrazellulären Speichern ist ebenso für die Oberflächenrezeptoren CD11b (47) und CD35 (57) beschrieben und ermöglicht die Quantifizierung der PMN-Aktivierung innerhalb eines kurzen Beobachtungszeitraums. Ergänzend zur schnellen Expressionsteigerung an der Zelloberfläche lässt sich die Zellaktivierung auch anhand des HNA-2a-mRNA Anstiegs als Ausdruck einer gesteigerten de-novo-Synthese nachweisen (108). Trotz des Pilotstudiencharakters dieser Untersuchung konnten auch bei einem kleinen Stichprobenumfang von 18 bzw. 9 Patienten signifikante ($p < 0,01$) Ergebnisse ermittelt werden. Göhring et al. konnten in ihrer Untersuchung ebenfalls signifikante Effekte bei Gruppengrößen von 8 bzw. 14 Patienten nachweisen (79). Somit scheint HNA-2a auch bei kleinen Patientenkollektiven ein geeigneter Immunparameter für die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten zu sein. Zusammenfassend deuten die Ergebnisse dieser Studie darauf hin, dass die gesteigerte Expression von HNA-2a die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten während und nach herzchirurgischen Operationen widerspiegelt. Da unsere Untersuchung nicht die Aussagekraft zur Detektion signifikanter Unterschiede zwischen den verschiedenen Eingriffsarten on-pump und off-pump aufwies, sollte eine entsprechende Untersuchung an einem größeren Patientenkollektiv erfolgen.

Ergänzend bietet sich dabei die Bestimmung der G-CSF-Spiegel im Blut sowie der PECAM-1-Expression verschiedener Immunzellen an, da G-CSF maßgeblich an der Hochregulierung der HNA-2a-Expression beteiligt ist (79;108) und PECAM-1 über die Bindung an HNA-2a die Granulozyten-transmigration fördert (28;29).

5. Zusammenfassung

In dieser Pilotstudie wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie perioperative Expressionsveränderungen des Oberflächenrezeptors HNA-2a (CD177, NB1) auf neutrophilen Granulozyten bei Patienten ermittelt, die sich einer elektiven koronaren Bypassoperation mit und ohne Herz-Lungen-Maschine unterziehen mussten. Neutrophile Granulozyten sind maßgeblich an der Pathogenese von Infektionen sowie Sepsis beteiligt und die Herzchirurgie ist bekanntermaßen mit einer systemischen Entzündungsantwort assoziiert. HNA-2a ist ein Oberflächenrezeptor, der nur auf neutrophilen Granulozyten exprimiert und als neuer Marker der Neutrophilenaktivierung bei Sepsis und Autoimmunerkrankungen beschrieben wird. Ferner wurde die Expression der Komplementrezeptoren CD11b/CD18 (CR3) und CD35 (CR1) sowie CD16 (FcγRIII) als etablierte Marker der Aktivierung von neutrophilen Granulozyten durchflusszytometrisch bestimmt.

Die Ergebnisse dieser Studie unterstützen die These, dass HNA-2a als Verlaufsparemeter systemischer Immunreaktionen, wie dem SIRS nach herzchirurgischen Operationen, geeignet ist. Trotz des Pilotstudiencharakters dieser Untersuchung ließ sich bereits bei einem kleinen Stichprobenumfang von insgesamt 27 Patienten im zeitlichen Verlauf eine signifikante ($p < 0,01$) Steigerung der HNA-2a-Expression nachweisen. Somit konnten wir eine rasche Hochregulierung der HNA-2a-Expression bestätigen, welche die Quantifizierung der PMN-Aktivierung innerhalb eines kurzen Beobachtungszeitraums ermöglicht. Bei der CD16-Expression zeigte sich im zeitlichen Verlauf in beiden Gruppen eine signifikante ($p < 0,01$) Abnahme der CD16-Expression, was als Ausdruck der PMN-Aktivierung im Einklang mit der für HNA-2a dargestellten Expressionssteigerung steht.

Außer einer signifikant geringeren Anzahl von gesetzten Bypässen konnten wir keine statistisch relevanten Unterschiede zwischen den Operationsverfahren mit und ohne kardiopulmonalem Bypass nachweisen. Die Verwendung der off-pump Technik konnte weder den Anstieg der HNA-2a-Expression noch den Abfall der CD16-Expression verhindern. Zur Validierung

der HNA-2a-Ergebnisse sowie zur Detektion möglicher Unterschiede zwischen beiden Operationsverfahren sollte eine weiterführende Untersuchung mit adäquater Power erfolgen.

6. Summary

In this pilot study we used flow cytometry to assess perioperative changes of HNA-2a (CD177, NB1) expression on neutrophils in patients undergoing elective on-pump or off-pump cardiac surgery. Activation of neutrophils is a crucial step in innate immunity and initiates different inflammatory reactions. Furthermore, cardiac surgery is associated with a systemic inflammatory response. HNA-2a, a glycoprotein exclusively expressed on human neutrophils, has been described as a new marker of neutrophil activation in sepsis and inflammatory diseases. In addition, we assessed the perioperative changes of the surface receptors CD11b/CD18 (CR3), CD35 (CR1) and CD16 (FcγRIII) using flow cytometry. These receptors have been thoroughly investigated as markers of neutrophil activation in coronary artery bypass grafting.

The results indicate that increases in HNA-2a expression may reflect neutrophil activation as part of the systemic inflammatory response observed after cardiac surgery. In the on-pump as well as in the off-pump group we found a significant ($p < 0,01$) increase of HNA-2a expression during and after surgery. We could also demonstrate a fast upregulation of the HNA-2a expression, which allows a quantification of PMN activation during a short observation period. Moreover, we were able to show significant ($p < 0,01$) differences in the perioperative course of CD16 expression. In both groups we observed a downregulation of CD16 expression, which is in line with the increase of the HNA-2a expression as a marker of the PMN activation.

Except for a significant lower number of bypasses in the off-pump group, we could not detect any other statistically relevant differences between the groups. The use of off-pump surgical techniques could neither prevent the increase in HNA-2a expression nor the decrease in CD16 expression. However, a follow-up investigation with appropriate power to validate the HNA-2a results as well as to detect possible differences between the on- and off-pump procedures is recommended.

7. Literaturverzeichnis

1. Fransen E, Maessen J, Dentener M, Senden N, Geskes G, Buurman W: Systemic inflammation present in patients undergoing CABG without extracorporeal circulation. Chest 1998; 113:1290-1295.
2. Edmunds Jr LH: Inflammatory Response to Cardiopulmonary Bypass. Ann.Thorac.Surg.1998, 66:12-6 2003.
3. Frering B, Philip I, Dehoux M, Rolland C, Langlois JM, Desmonts JM: Circulating cytokines in patients undergoing normothermic cardiopulmonary bypass. J.Thorac.Cardiovasc.Surg. 1994; 108:636-641.
4. Butler J, Rocker GM, Westaby S: Inflammatory response to cardiopulmonary bypass. Ann.Thorac.Surg. 1993; 55:552-559.
5. Cavarocchi NC, England MD, Schaff HV, Russo P, Orszulak TA, Schnell WA, Jr., O'Brien JF, Pluth JR: Oxygen free radical generation during cardiopulmonary bypass: correlation with complement activation. Circulation. 1986; 74:III130-III133.
6. Wan S, Yim AP, Ng CS, Arifi AA: Systematic organ protection in coronary artery surgery with or without cardiopulmonary bypass. J.Card Surg.2002.Nov.-Dec.;17(6.):529.-35. 2002; 17:529-535.

7. Kirklin JK, Westaby S, Blackstone EH, Kirklin JW, Chenoweth DE, Pacifico AD: Complement and the damaging effects of cardiopulmonary bypass. *J.Thorac.Cardiovasc.Surg.* 1983; 86:845-857.
8. Kirklin JK GJHW: The inflammatory response to cardiopulmonary bypass in *Cardiopulmonary Bypass – Principles and practice*. Williams & Wilkins, 1993.
9. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med.* 1992; 20:864-874.
10. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G: 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med.* 2003; 29:530-538.
11. Paparella D, Yau TM, Young E: Cardiopulmonary bypass induced inflammation: pathophysiology and treatment. An update. *Eur.J.Cardiothorac.Surg.* 2002; 21:232-244.
12. Salo M: Effects of anaesthesia and surgery on the immune response. *Acta Anaesthesiol.Scand.* 1992; 36:201-220.

13. Gu YJ, Mariani MA, van Oeveren W, Grandjean JG, Boonstra PW:
Reduction of the inflammatory response in patients undergoing minimally
invasive coronary artery bypass grafting. *Ann.Thorac.Surg.* 1998;
65:420-424.
14. Sohrabi F, Mispireta LA, Fiocco M, Dibos LA, Buescher PC, Sloane PJ:
Effects of off-pump coronary artery bypass grafting on patient outcome.
*J.Investig.Med.*2003.Feb.;51.(1):27.-31. 2003; 51:27-31.
15. Ascione R, Lloyd CT, Underwood MJ, Lotto AA, Pitsis AA, Angelini GD:
Inflammatory response after coronary revascularization with or without
cardiopulmonary bypass. *Ann.Thorac.Surg.*2000 Apr;69.(4):1198.-204.
2000; 69:1198-1204.
16. Kolessov VI: Mammary artery-coronary artery anastomosis as method of
treatment for angina pectoris. *J.Thorac.Cardiovasc.Surg.* 1967; 54:535-
544.
17. Trapp WG, Bisarya R: Placement of coronary artery bypass graft without
pump oxygenator. *Ann.Thorac.Surg.* 1975; 19:1-9.
18. Kessler P, Lischke V, Westphal K: Anästhesiologische Besonderheiten
bei minimalinvasiver Herzchirurgie. *Anaesthesist* 2000, 49:592-608
2003.

19. Cartier R, Brann S, Dagenais F, Martineau R, Couturier A: Systematic off-pump coronary artery revascularization in multivessel disease: experience of three hundred cases. *J.Thorac.Cardiovasc.Surg.*2000 Feb.;119.(2):221.-9. 2000; 119:221-229.
20. Cartier R: Current Trends and Technique in OPCAB Surgery. *J.Card Surg.*2003, 18:32-46 2003.
21. Matata BM, Sosnowski AW, Galinanes M: Off-pump bypass graft operation significantly reduces oxidative stress and inflammation. *Ann.Thorac.Surg.*2000.Mar.;69.(3):785.-91. 2000; 69:785-791.
22. Wan S, Izzat MB, Lee TW, Wan IY, Tang NL, Yim AP: Avoiding cardiopulmonary bypass in multivessel CABG reduces cytokine response and myocardial injury. *Ann.Thorac.Surg.* 1999; 68:52-56.
23. Gu YJ, Mariani MA, Boonstra PW, Grandjean JG, van Oeveren W: Complement activation in coronary artery bypass grafting patients without cardiopulmonary bypass: the role of tissue injury by surgical incision. *Chest.* 1999; 116:892-898.
24. Hiesmayr MJ, Spittler A, Lassnigg A, Berger R, Laufer G, Kocher A, Artemiou O, Boltz-Nitulescu G, Roth E: Alterations in the number of circulating leucocytes, phenotype of monocyte and cytokine production in

- patients undergoing cardiothoracic surgery. Clin.Exp.Immunol. 1999; 115:315-323.
25. von Andrian UH, Chambers JD, McEvoy LM, Bargatze RF, Arfors KE, Butcher EC: Two-step model of leukocyte-endothelial cell interaction in inflammation: distinct roles for LECAM-1 and the leukocyte beta 2 integrins in vivo. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 1991; 88:7538-7542.
26. Butcher EC: Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. Cell. 1991; 20;67:1033-1036.
27. Dunne JL, Collins RG, Beaudet AL, Ballantyne CM, Ley K: Mac-1, but not LFA-1, uses intercellular adhesion molecule-1 to mediate slow leukocyte rolling in TNF-alpha-induced inflammation. J.Immunol. 2003; 171:6105-6111.
28. Buckley CD, Doyonnas R, Newton JP, Blystone SD, Brown EJ, Watt SM, Simmons DL: Identification of alpha v beta 3 as a heterotypic ligand for CD31/PECAM-1. J.Cell Sci. 1996; 109:437-445.
29. Sachs UJ, Andrei-Selmer CL, Maniar A, Weiss T, Paddock C, Orlova VV, Choi EY, Newman PJ, Preissner KT, Chavakis T, Santoso S: The neutrophil-specific antigen CD177 is a counter-receptor for platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31). J.Biol.Chem. 2007; 282:23603-23612.

30. Borgermann J, Scheubel RJ, Simm A, Silber RE, Friedrich I:
Inflammatory Response in On- Versus Off-Pump Myocardial
Revascularization: Is ECC Really the Culprit? Thorac.Cardiovasc.Surg.
2007; 55:473-480.
31. Nuytinck HK, Offermans XJ, Kubat K, Goris JA: Whole-body
inflammation in trauma patients. An autopsy study. Arch.Surg. 1988;
123:1519-1524.
32. Gemsa D, Kalden JR, Resch K: Immunologie, 4. Auflage ed. Thieme-
Verlag, 1997.
33. Roitt IM, Brostoff J, Male DK: Kurzes Lehrbuch der Immunologie, Georg
Thieme Verlag Stuttgart, New York, 1995.
34. Ley K, Tedder TF: Leukocyte interactions with vascular endothelium.
New insights into selectin-mediated attachment and rolling. J.Immunol.
1995; 155:525-528.
35. Bokoch GM: Chemoattractant signaling and leukocyte activation. Blood.
1995; 86:1649-1660.
36. Schuster HP, Werdan K: Intensivtherapie bei Sepsis und
Multiorganversagen Springer Verlag Berlin/Heidelberg, 2000.

37. Edwards SW, Watson F: The cell biology of phagocytes. *Immunol.Today*. 1995; 16:508-510.
38. Smedly LA, Tonnesen MG, Sandhaus RA, Haslett C, Guthrie LA, Johnston RB, Jr., Henson PM, Worthen GS: Neutrophil-mediated injury to endothelial cells. Enhancement by endotoxin and essential role of neutrophil elastase. *J.Clin.Invest*. 1986; 77:1233-1243.
39. Wertheim WA, Kunkel SL, Standiford TJ, Burdick MD, Becker FS, Wilke CA, Gilbert AR, Strieter RM: Regulation of neutrophil-derived IL-8: the role of prostaglandin E2, dexamethasone, and IL-4. *J.Immunol*. 1993; 151:2166-2175.
40. Lloyd AR, Oppenheim JJ: Poly's lament: the neglected role of the polymorphonuclear neutrophil in the afferent limb of the immune response. *Immunol.Today*. 1992; 13:169-172.
41. Weiss SJ: Tissue destruction by neutrophils. *N.Engl.J.Med*. 1989; 320:365-376.
42. Swartz DE, Seely AJ, Ferri L, Giannias B, Christou NV: Decreased systemic polymorphonuclear neutrophil (PMN) rolling without increased PMN adhesion in peritonitis at remote sites. *Arch.Surg*. 2000; 135:959-966.

43. Levy JH, Tanaka KA: Inflammatory response to cardiopulmonary bypass. Ann.Thorac.Surg.2003 Feb.;75.(2):S715.-20. 2003; 75:S715-S720.
44. Grimminger, F, Walmrath, H. D., and Lasch, H.-G. Granulozyten-Endothel-Interaktion. Hämostaseologie (14:7-15),1994.
45. Turner ML: Cell adhesion molecules: a unifying approach to topographic biology. Biol.Rev.Camb.Philos.Soc. 1992; 67:359-377.
46. Carlos TM, Harlan JM: Leukocyte-endothelial adhesion molecules. Blood. 1994; 84:2068-2101.
47. Arnaout MA: Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18. Blood. 1990; 75:1037-1050.
48. Calderwood DA, Shattil SJ, Ginsberg MH: Integrins and actin filaments: reciprocal regulation of cell adhesion and signaling. J.Biol.Chem. 2000; 275:22607-22610.
49. Hynes RO: Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. Cell. 1992; 69:11-25.
50. White-Owen C, Alexander JW, Babcock GF: Reduced expression of neutrophil CD11b and CD16 after severe traumatic injury. J.Surg.Res. 1992; 52:22-26.

51. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M: Immunologie, 5. Auflage ed. Spektrum Akademischer Verlag, 2002.
52. Rest RF: Measurement of human neutrophil respiratory burst activity during phagocytosis of bacteria. *Methods Enzymol.* 1994; 236:119-36.:119-136.
53. O'Shea JJ, Brown EJ, Seligmann BE, Metcalf JA, Frank MM, Gallin JI: Evidence for distinct intracellular pools of receptors for C3b and C3bi in human neutrophils. *J.Immunol.* 1985; 134:2580-2587.
54. Watson F, Robinson JJ, Edwards SW: Neutrophil function in whole blood and after purification: changes in receptor expression, oxidase activity and responsiveness to cytokines. *Biosci.Rep.* 1992; 12:123-133.
55. Alonso A, Whitten CW, Hill GE: Pump prime only aprotinin inhibits cardiopulmonary bypass-induced neutrophil CD11b up-regulation. *Ann.Thorac.Surg.* 1999; 67:392-395.
56. Fearon DT: Human complement receptors for C3b (CR1) and C3d (CR2). *J.Invest Dermatol.* 1985; 85:53s-57s.
57. Weiss L, Fischer E, Haeffner-Cavaillon N, Jouvin MH, Appay MD, Bariety J, Kazatchkine M: The human C3b receptor (CR1). *Adv.Nephrol.Necker Hosp.* 1989; 18:249-69.:249-269.

58. Berger M, O'Shea J, Cross AS, Folks TM, Chused TM, Brown EJ, Frank MM: Human neutrophils increase expression of C3bi as well as C3b receptors upon activation. *J.Clin.Invest.* 1984; 74:1566-1571.

59. Fallman M, Andersson R, Andersson T: Signaling properties of CR3 (CD11b/CD18) and CR1 (CD35) in relation to phagocytosis of complement-opsonized particles. *J.Immunol.* 1993; 151:330-338.

60. Thomsen BS: Human erythrocyte complement receptor type one (CR1): expression, function and role in the pathogenesis of inflammatory connective tissue diseases. *Dan.Med.Bull.* 1988; 35:414-422.

61. Klickstein LB, Bartow TJ, Miletic V, Rabson LD, Smith JA, Fearon DT: Identification of distinct C3b and C4b recognition sites in the human C3b/C4b receptor (CR1, CD35) by deletion mutagenesis. *J.Exp.Med.* 1988; 168:1699-1717.

62. Galon J, Gauchat JF, Mazieres N, Spagnoli R, Storkus W, Lotze M, Bonnefoy JY, Fridman WH, Sautes C: Soluble Fcgamma receptor type III (FcgammaRIII, CD16) triggers cell activation through interaction with complement receptors. *J.Immunol.* 1996; 157:1184-1192.

63. Edwards SW: Neutrophils and host defence, *Biochemistry and physiology of the neutrophil in* Cambridge University Press, 1994.

64. Gessner JE, Heiken H, Tamm A, Schmidt RE: The IgG Fc receptor family. *Ann.Hematol.* 1998; 76:231-248.
65. Ravetch JV, Bolland S: IgG Fc receptors. *Annu.Rev.Immunol.* 2001; 19:275-90.:275-290.
66. Edberg JC, Kimberly RP: Modulation of Fc gamma and complement receptor function by the glycosyl-phosphatidylinositol-anchored form of Fc gamma RIII. *J.Immunol.* 1994; 152:5826-5835.
67. Skubitz KM, Stroncek DF, Sun B: Neutrophil-specific antigen NB1 is anchored via a glycosyl-phosphatidylinositol linkage. *J.Leukoc.Biol.* 1991; 49:163-171.
68. Stroncek DF, Jaszcz W, Herr GP, Clay ME, McCullough J: Expression of neutrophil antigens after 10 days of granulocyte-colony-stimulating factor. *Transfusion.* 1998; 38:663-668.
69. Wagner C, Deppisch R, Deneffle B, Hug F, Andrassy K, Hansch GM: Expression patterns of the lipopolysaccharide receptor CD14, and the FCgamma receptors CD16 and CD64 on polymorphonuclear neutrophils: data from patients with severe bacterial infections and lipopolysaccharide-exposed cells. *Shock.* 2003; 19:5-12.

70. de Haas M, Kerst JM, van der Schoot CE, Calafat J, Hack CE, Nuijens JH, Roos D, van Oers RH, dem Borne AE: Granulocyte colony-stimulating factor administration to healthy volunteers: analysis of the immediate activating effects on circulating neutrophils. *Blood*. 1994; 84:3885-3894.
71. Goldschmeding R, van Dalen CM, Faber N, Calafat J, Huizinga TW, van der Schoot CE, Clement LT, dem Borne AE: Further characterization of the NB 1 antigen as a variably expressed 56-62 kD GPI-linked glycoprotein of plasma membranes and specific granules of neutrophils. *Br.J.Haematol*. 1992; 81:336-345.
72. Lalezari P, Murphy GB, Allen FH, Jr.: NB1, a new neutrophil-specific antigen involved in the pathogenesis of neonatal neutropenia. *J.Clin.Invest*. 1971; 50:1108-1115.
73. Stroncek D: Neutrophil-specific antigen HNA-2a (NB1, CD177): serology, biochemistry, and molecular biology. *Vox Sang*. 2002.Aug.;83.Suppl 1:359.-61. 2002; 83 Suppl 1:359-361.
74. Bux J: Granulocyte immunology. *Wien.Klin.Wochenschr.*, 2001. Oct.30.;113.(20.-21):799-805. 2001; 113:799-805.
75. Stroncek DF, Skubitz KM, McCullough JJ: Biochemical characterization of the neutrophil-specific antigen NB1. *Blood*. 1990; 75:744-755.

76. Stroncek DF, Shankar R, Litz C, Clement L: The expression of the NB1 antigen on myeloid precursors and neutrophils from children and umbilical cords. *Transfus.Med.* 1998; 8:119-123.
77. Kissel K, Santoso S, Hofmann C, Stroncek D, Bux J: Molecular basis of the neutrophil glycoprotein NB1 (CD177) involved in the pathogenesis of immune neutropenias and transfusion reactions. *Eur.J.Immunol.* 2001.May.;31.(5):1301.-9. 2001; 31:1301-1309.
78. Bux J, Dickmann JO, Stockert U, Mueller-Eckhardt C: Influence of granulocyte antibodies on granulocyte function. *Vox Sang.* 1993; 64:220-225.
79. Gohring K, Wolff J, Doppl W, Schmidt KL, Fenchel K, Pralle H, Sibelius U, Bux J: Neutrophil CD177 (NB1 gp, HNA-2a) expression is increased in severe bacterial infections and polycythaemia vera. *Br.J.Haematol.* 2004; 126:252-254.
80. Stroncek DF: Neutrophil-specific antigen HNA-2a, NB1 glycoprotein, and CD177. *Curr.Opin.Hematol.* 2007; 14:688-693.
81. Stroncek DF, Shapiro RS, Filipovich AH, Plachta LB, Clay ME: Prolonged neutropenia resulting from antibodies to neutrophil-specific antigen NB1 following marrow transplantation. *Transfusion.* 1993; 33:158-163.

82. Bux J, Becker F, Seeger W, Kilpatrick D, Chapman J, Waters A:
Transfusion-related acute lung injury due to HLA-A2-specific antibodies
in recipient and NB1-specific antibodies in donor blood. Br.J.Haematol.
1996; 93:707-713.
83. Reil A, Bux J. Transfusionsassoziierte akute Lungeninsuffizienz.
Deutsches Ärzteblatt 15, 904-909. 2007.
84. Eppihimer MJ, Granger DN: Ischemia/reperfusion-induced leukocyte-
endothelial interactions in postcapillary venules. Shock. 1997; 8:16-25.
85. Löffler G: Das Komplementsystem in Basiswissen Biochemie Springer,
2001.
86. Hugli TE: Biochemistry and biology of anaphylatoxins. Complement.
1986; 3:111-127.
87. Mollnes TE, Fosse E: The complement system in trauma-related and
ischemic tissue damage: a brief review. Shock. 1994; 2:301-310.
88. Baldwin WM, III, Pruitt SK, Brauer RB, Daha MR, Sanfilippo F:
Complement in organ transplantation. Contributions to inflammation,
injury, and rejection. Transplantation. 1995; 59:797-808.
89. www.laborlexilon.de. 2008.

90. Martins PS, Kallas EG, Neto MC, Dalboni MA, Blecher S, Salomao R: Upregulation of reactive oxygen species generation and phagocytosis, and increased apoptosis in human neutrophils during severe sepsis and septic shock. *Shock*. 2003; 20:208-212.
91. Zhang J, Kaupke CJ, Yousefi S, Cesario TC, Vaziri ND: Flow cytometric investigation of neutrophil activation pathways by n-formyl-Met-Leu-Phe and phorbol myristate acetate. *Biol.Cell*. 1995; 84:147-153.
92. Vowells SJ, Sekhsaria S, Malech HL, Shalit M, Fleisher TA: Flow cytometric analysis of the granulocyte respiratory burst: a comparison study of fluorescent probes. *J.Immunol.Methods*. 1995; 178:89-97.
93. Hickstein DD, Locksley RM, Beatty PG, Smith A, Stone DM, Root RK: Monoclonal antibodies binding to the human neutrophil C3bi receptor have disparate functional effects. *Blood*. 1986; 67:1054-1062.
94. Stevens J: *Applied multivariate statistics for the social science* Lawrence Erlbaum, New Jersey, 1992.
95. Bikoue A, George F, Poncelet P, Mutin M, Janossy G, Sampol J: Quantitative analysis of leukocyte membrane antigen expression: normal adult values. *Cytometry*. 1996; 26:137-147.

96. Limb GA, Hamblin AS, Wolstencroft RA, Dumonde DC: Selective up-regulation of human granulocyte integrins and complement receptor 1 by cytokines. *Immunology*. 1991; 74:696-702.
97. Bossuyt X, Marti GE, Fleisher TA: Comparative analysis of whole blood lysis methods for flow cytometry. *Cytometry*. 1997; 30:124-133
98. Romeu MA, Mestre M, Gonzalez L, Valls A, Verdaguer J, Corominas M, Bas J, Massip E, Buendia E: Lymphocyte immunophenotyping by flow cytometry in normal adults. Comparison of fresh whole blood lysis technique, Ficoll-Paque separation and cryopreservation. *J.Immunol.Methods*. 1992; 154:7-10.
99. Stroncek DF, Shankar RA, Noren PA, Herr GP, Clement LT: Analysis of the expression of NB1 antigen using two monoclonal antibodies. *Transfusion*. 1996; 36:168-174.
100. Repo H, Jansson SE, Leirisalo-Repo M: Anticoagulant selection influences flow cytometric determination of CD11b upregulation in vivo and ex vivo. *J.Immunol.Methods*. 1995; 185:65-79.
101. Nebe, C. T. Durchflußzytometrische Meßtechnik und Datenauswertung. *Infusionstherapie und Transfusionsmedizin* 23, 111-113. 1996.

102. Serke S, van Lessen A, Huhn D: Quantitative fluorescence flow cytometry: a comparison of the three techniques for direct and indirect immunofluorescence. *Cytometry*. 1998; 33:179-187.
103. Donabedian H, Sawyer T, Senitzer D: Inhibition of neutrophil shape change by an inhibitor of chemotaxis. *J.Leukoc.Biol.* 1987; 42:510-518.
104. Sucic M, Kolevska T, Kopjar B, Kosanovic M, Drobnjak M, Zalud I, Marusic M: Accuracy of routine flow-cytometric bitmap selection for three leukocyte populations. *Cytometry*. 1989; 10:442-447.
105. Perschel, W. T., Langefeld, T., and Yildiz, M. Beschreibung einer Methode zur Quantifizierung der granulozytären Phagozytose von *Staphylokokoccus aureus* K 807. *medwelt* 45, 100-105. 1994.
106. Sachs L: *Angewandte Statistik. Anwendung statistischer Methoden.* in Springer Verlag. Berlin Heidelberg New York, 1997.
107. Hietbrink F, Koenderman L, Rijkers G, Leenen L: Trauma: the role of the innate immune system. *World J.Emerg.Surg.* 2006; 20;1:15.:15.
108. Wolff J, Brendel C, Fink L, Bohle RM, Kissel K, Bux J: Lack of NB1 GP (CD177/HNA-2a) gene transcription in NB1 GP- neutrophils from NB1 GP-expressing individuals and association of low expression with NB1

- gene polymorphisms. *Blood* 2003 Jul.15.; 102.(2):731.-3. 2003; 102:731-733.
109. Stroncek DF, Herr GP, Plachta LB: Neutrophil-specific antigen NB1 inhibits neutrophil-endothelial cell interactions. *J.Lab Clin.Med.* 1994; 123:247-255.
110. Demetri GD, Griffin JD: Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood.* 1991; 78:2791-2808.
111. Nussler AK, Wittel UA, Nussler NC, Beger HG: Leukocytes, the Janus cells in inflammatory disease. *Langenbecks Arch.Surg.* 1999; 384:222-232.
112. Barth E, Fischer G, Schneider EM, Wollmeyer J, Georgieff M, Weiss M: Differences in the expression of CD64 and mCD14 on polymorphonuclear cells and on monocytes in patients with septic shock. *Cytokine.* 2001; 14:299-302.
113. Bux J, Sohn M, Hachmann R, Mueller-Eckhardt C: Quantitation of granulocyte antibodies in sera and determination of their binding sites. *Br.J.Haematol.* 1992; 82:20-25.

114. Basu S, Hodgson G, Katz M, Dunn AR: Evaluation of role of G-CSF in the production, survival, and release of neutrophils from bone marrow into circulation. *Blood*. 2002; 100:854-861.
115. Bartunkova J, Araujo A, Hrusak O, Sediva A: Autoimmunity to polymorphonuclears: functional consequences of the binding of antibodies to membrane and cytoplasmic target antigens of polymorphonuclear leukocytes. *J.Clin.Immunol*. 1997; 17:455-461.
116. Ilton MK, Langton PE, Taylor ML, Misso NL, Newman M, Thompson PJ, Hung J: Differential expression of neutrophil adhesion molecules during coronary artery surgery with cardiopulmonary bypass. *J.Thorac.Cardiovasc.Surg*. 1999; 118:930-937.
117. Asimakopoulos G, Taylor KM: Effects of cardiopulmonary bypass on leukocyte and endothelial adhesion molecules. *Ann.Thorac.Surg*. 1998; 66:2135-2144.
118. DeLisser HM, Newman PJ, Albelda SM: Platelet endothelial cell adhesion molecule (CD31). *Curr.Top.Microbiol.Immunol*. 1993; 184:37-45.:37-45.
119. Parums DV, Cordell JL, Micklem K, Heryet AR, Gatter KC, Mason DY: JC70: a new monoclonal antibody that detects vascular endothelium

- associated antigen on routinely processed tissue sections. *J.Clin.Pathol.* 1990; 43:752-757.
120. Le Deist F, Menasche P, Bel A, Lariviere J, Piwnica A, Bloch G: Patterns of changes in neutrophil adhesion molecules during normothermic cardiopulmonary bypass. A clinical study. *Eur.J.Cardiothorac.Surg.* 1996; 10:279-283.
121. Utley JR: Pathophysiology of cardiopulmonary bypass: current issues. *J.Card Surg.* 1990; 5:177-189.
122. Doerschuk CM: Neutrophil rheology and transit through capillaries and sinusoids. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 1999; 159:1693-1695.
123. European Haemovigilance Network (ENH). Definitions of Adverse Transfusion Events. bbb . 20-7-2007.
124. Federico A: Transfusion-related acute lung injury. *J.Perianesth.Nurs.* 2009; 24:35-37.
125. Popovsky MA, Saidman SL: Case 40-1998 - A49-year old woman with thrombotic thrombocytopenic purpura and severe dyspnea during plasmapheresis and transfusion. *N.Engl.J.Med.* 1998; 339:2005-2012.

126. Michon JM, Gey A, Moutel S, Tartour E, Meresse V, Fridman W, Teillaud JL: In vivo induction of functional Fc gammaRI (CD64) on neutrophils and modulation of blood cytokine mRNA levels in cancer patients treated with G-CSF (rMetHuG-CSF). *Br.J.Haematol.* 1998; 100:550-556.
127. Viedma Contreras JA: Leucocyte activation markers in clinical practice. *Clin.Chem.Lab Med.* 1999; 37:607-622.
128. Huizinga TW, van der Schoot CE, Jost C, Klaassen R, Kleijer M, dem Borne AE, Roos D, Tetteroo PA: The PI-linked receptor FcRIII is released on stimulation of neutrophils. *Nature.* 1988; 333:667-669.
129. Huizinga TW, de Haas M, Kleijer M, Nuijens JH, Roos D, dem Borne AE: Soluble Fc gamma receptor III in human plasma originates from release by neutrophils. *J.Clin.Invest.* 1990; 86:416-423.
130. Koene HR, de Haas M, Kleijer M, Roos D, dem Borne AE: NA-phenotype-dependent differences in neutrophil Fc gamma RIIb expression cause differences in plasma levels of soluble Fc gamma RIII. *Br.J.Haematol.* 1996; 93:235-241.
131. Wehlin L, Vedin J, Vaage J, Lundahl J: Activation of complement and leukocyte receptors during on- and off pump coronary artery bypass surgery. *Eur.J.Cardiothorac.Surg.* 2004.Jan.;25.(1):35.-42. 2004; 25:35-42.

132. Brun-Buisson C, Doyon F, Carlet J, Dellamonica P, Gouin F, Lepoutre A, Mercier JC, Offenstadt G, Regnier B: Incidence, risk factors, and outcome of severe sepsis and septic shock in adults. A multicenter prospective study in intensive care units. French ICU Group for Severe Sepsis. JAMA. 1995; 274:968-974.
133. Schulze C, Conrad N, Schutz A, Egi K, Reichenspurner H, Reichart B, Wildhirt SM: Reduced expression of systemic proinflammatory cytokines after off-pump versus conventional coronary artery bypass grafting. Thorac.Cardiovasc.Surg.2000.Dec.;48.(6.):364.-9. 2000; 48:364-369.
134. Czerny M, Baumer H, Kilo J, Lassnigg A, Hamwi A, Vukovich T, Wolner E, Grimm M: Inflammatory response and myocardial injury following coronary artery bypass grafting with or without cardiopulmonary bypass. Eur.J.Cardiothorac.Surg.2000.Jun.;17(6.):737.-42. 2000; 17:737-742.
135. Shroyer AL, Grover FL, Hattler B, Collins JF, McDonald GO, Kozora E, Lucke JC, Baltz JH, Novitzky D: On-pump versus off-pump coronary-artery bypass surgery. N.Engl.J.Med. 2009; 361:1827-1837.
136. Allen KB, Matheny RG, Robison RJ, Heimansohn DA, Shaar CJ: Minimally invasive versus conventional reoperative coronary artery bypass. Ann.Thorac.Surg. 1997; 64:616-622.

137. Salo M: Effects of anaesthesia and surgery on the immune response.
Acta Anaesthesiol.Scand. 1992; 36:201-220.
138. Diegeler A, Tarnok A, Rauch T, Haberer D, Falk V, Battellini R,
Autschbach R, Hambsch J, Schneider P, Mohr FW: Changes of
leukocyte subsets in coronary artery bypass surgery: cardiopulmonary
bypass versus 'off-pump' techniques. Thorac.Cardiovasc.Surg. 1998;
46:327-332.
139. Elahi MM, Khan JS, Matata BM: Deleterious effects of cardiopulmonary
bypass in coronary artery surgery and scientific interpretation of off-
pump's logic. Acute.Card Care. 2006; 8:196-209.
140. Biglioli P, Cannata A, Alamanni F, Naliato M, Porqueddu M, Zanobini M,
Tremoli E, Parolari A: Biological effects of off-pump vs. on-pump
coronary artery surgery: focus on inflammation, hemostasis and
oxidative stress. Eur.J.Cardiothorac.Surg.2003.Aug.;24.(2):260.-9. 2003;
24:260-269.

8. Anhang

8.1 Tabellarische Zusammenstellung der Daten

	Gruppe 1 (n = 18)	Gruppe 2 (n = 9)
Leukozytenzahl präoperativ [giga/l]	7,74 ± 2,46	8,33 ± 2,03
Leukozytenzahl 1.Tag postoperativ [giga/l]	8,75 ± 2,15	12,53 ± 1,26
Leukozytenzahl 2.Tag postoperativ [giga/l]	10,99 ± 2,92	12,19 ± 3,47
CRP-Konzentration präoperativ [mg/dl]	9,53 ± 12,62	16,64 ± 20,28
CRP-Konzentration 1.Tag postoperativ [mg/dl]	81,8 ± 14,15	105,87 ± 30,46
CRP-Konzentration 2.Tag postoperativ [mg/dl]	155,74 ± 38,8	191,19 ± 95,95
Hb-Konzentration präoperativ [g/dl]	14,05 ± 1,62	13,81 ± 1,6
Hb-Konzentration postoperativ [g/dl]	8,49 ± 0,74	9,14 ± 1,06

Tabelle 12: Mittelwerte und Standardabweichungen der laborchemischen Parameter

on-pump										off-pump					
Variablen	n	MW	±	SD	CI	X _{0,5}	IQA	n	MW	±	SD	CI	X _{0,5}	IQA	p-Wert
CD11b_1	18	154,1	±	77,5	[115,6 ; 192,7]	138,8	[98,7 ; 194,2]	9	222,3	±	143,4	[112,1 ; 332,6]	144,6	[104,6 ; 341,6]	p = 0,118
CD11b_2	17	218,5	±	153,1	[139,8 ; 297,2]	161,8	[122,8 ; 262,8]	9	148	±	63,1	[99,6 ; 196,5]	159,6	[91,9 ; 213]	p = 0,201
CD11b_3	18	141,4	±	90,9	[96,2 ; 186,6]	108,5	[76,7 ; 160]	9	209,9	±	173,7	[76,4 ; 343,3]	120,8	[85,3 ; 345,6]	p = 0,187
CD11b_4	18	188,1	±	187	[95,1 ; 281,1]	129,8	[80,6 ; 191,2]	9	162,2	±	104,2	[82,1 ; 242,3]	125,2	[93,6 ; 200,3]	p = 0,704
CD11b_5	17	120,1	±	88,4	[74,6 ; 165,6]	93,9	[69,5 ; 127,8]	8	142,4	±	71,3	[82,8 ; 202]	127,1	[85,5 ; 196,6]	p = 0,54

CD11b_x	Zeit-Effekt	F(2,49) = 1,51	p = 0,226
	Zeit x Gruppe Effekt	F(2,49) = 2,99	p = 0,048
	Gruppen-Effekt	F(1) = 0,04	p = 0,835

Tabelle 13: **Statistische Auswertung von CD11b zu den 5 verschiedenen Abnahmezeitpunkten; MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, CI = Confidenzintervall, X_{0,5} = 0,5-Quantil, IQA = Interquartilsabstand**

on-pump						off-pump						p-Wert			
Variablen	n	MW	±	SD	CI	X _{0,5}	IOA	n	MW	±	SD		CI	X _{0,5}	IOA
CD16_1	15	2564,5	±	1031	[1993,6 ; 3135,4]	2207	[1945,6 ; 3078,1]	9	2363	±	793,3	[1752,9 ; 2972,4]	2110	[1770,5 ; 3012,8]	p = 0,62
CD16_2	14	2033,4	±	623,1	[1693,6 ; 2413,2]	2004	[1570,8 ; 2441,1]	9	2103	±	712,4	[1555,5 ; 2650,7]	1827	[1546,9 ; 2594,7]	p = 0,861
CD16_3	15	1592,4	±	372,4	[1386,1 ; 1798,6]	1582	[1286,4 ; 1730]	9	1867	±	730,4	[1305,8 ; 2428,7]	1715	[1299,1 ; 2379,9]	p = 0,233
CD16_4	14	1509,1	±	359,7	[1301,5 ; 1716,8]	1554	[1210,7 ; 1746,8]	9	1451	±	633	[964,7 ; 1937,8]	1310	[1033,7 ; 1939,2]	p = 0,781
CD16_5	14	1401,8	±	507,1	[1109 ; 1694,6]	1336	[990,8 ; 1715,3]	8	1434	±	619,9	[916 ; 1952,6]	1308	[854,4 ; 2123,2]	p = 0,895

CD16_x	Zeit-Effekt	F(2,2) = 29,07	p < 0,01
	Zeit x Gruppe Effekt	F(2,2) = 1,4	p = 0,259
	Gruppen-Effekt	F(1) = 2,31	p = 0,151

Tabelle 14: **Statistische Auswertung von CD16 zu den 5 verschiedenen Abnahmezeitpunkten; MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, CI = Confidenzintervall, X_{0,5} = 0,5-Quantil, IQA = Interquartilsabstand**

on-pump										off-pump					
Variablen	n	MW	±	SD	CI	X _{0,5}	IOA	n	MW	±	SD	CI	X _{0,5}	IOA	p-Wert
CD35_1	18	57,4	±	16,1	[49,4 ; 65,3]	51,2	[44,9 ; 66,3]	9	54	±	7,1	[48,5 ; 59,4]	56,7	[48,7 ; 57,3]	p = 0,553
CD35_2	17	82,6	±	47,3	[58,3 ; 106,9]	69,2	[50 ; 92,9]	9	50,8	±	14,3	[39,8 ; 61,7]	44,9	[43,2 ; 51,2]	p = 0,062
CD35_3	18	64,6	±	29,8	[49,8 ; 79,4]	55,7	[46,6 ; 70]	9	53,2	±	13	[43,1 ; 63,2]	47,8	[43,3 ; 63]	p = 0,285
CD35_4	17	67	±	27,7	[52,7 ; 81,2]	53,8	[48,9 ; 79,8]	9	49,3	±	13,7	[38,7 ; 59,9]	45,1	[42,6 ; 50]	p = 0,086
CD35_5	16	53,2	±	10	[47,8 ; 58,5]	49,8	[46,9 ; 59,9]	8	54,5	±	10,3	[45,9 ; 63,1]	53,3	[45,4 ; 64,4]	p = 0,768

CD35_x	Zeit-Effekt	F (1,36) = 1,09	p = 0,327
	Zeit x Gruppe Effekt	F (1,36) = 1,76	p = 0,197
	Gruppen-Effekt	F (1) = 0,08	p = 0,783

Tabelle 15: **Statistische Auswertung von CD35 zu den 5 verschiedenen Abnahmezeitpunkten; MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, CI = Confidenzintervall, X_{0,5} = 0,5-Quantil, IQA = Interquartilsabstand**

on-pump							off-pump						
Variablen	n	MW	± SD	CI	X _{0,5}	IQA	n	MW	± SD	CI	X _{0,5}	IQA	p-Wert
HNA-2a_1	19	40951	± 12546	[34904,2 ; 46997,7]	43830	[28594 ; 48195]	10	40128	± 11491	[31907,5 ; 48347,9]	38735	[30031,3 ; 51048]	p = 0,864
HNA-2a_2	18	49352	± 22170	[38327,1 ; 60376,4]	47265	[36265,3 ; 56369,8]	10	40903	± 12473	[31980,2 ; 49825,4]	40203	[32225,3 ; 43361,8]	p = 0,279
HNA-2a_3	19	53120	± 24331	[41393,2 ; 64847,2]	48291	[41197 ; 60480]	10	46470	± 13600	[36741,3 ; 56199,3]	42879	[36846 ; 52221,8]	p = 0,433
HNA-2a_4	17	51307	± 15983	[43089,5 ; 59524,7]	48391	[40723 ; 61086,5]	10	46635	± 8961,8	[40224,4 ; 53046,2]	43869	[40606,5 ; 55136,3]	p = 0,406
HNA-2a_5	15	65646	± 26576	[50928,5 ; 80363,1]	53939	[41942 ; 90428]	9	54010	± 9705,7	[46549,6 ; 61470,4]	56571	[49425 ; 60790,5]	p = 0,223

HNA-2a_x	Zeit-Effekt	F(2,92) = 7,36	p < 0,01
	Zeit x Gruppe Effekt	F(2,92) = 0,37	p = 0,769
	Gruppen-Effekt	F(1) = 2,09	p = 0,171

Tabelle 16: **Statistische Auswertung von HNA-2a zu den 5 verschiedenen Abnahmezeitpunkten; MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, CI = Confidenzintervall, X_{0,5} = 0,5-Quantil, IQA = Interquartilsabstand**

8.2 Abkürzungen

ABC	Antibody Binding Capacity
ACCP	American College of Chest Physicians
ACT	Activated Clotting Time
ACVB	Aorto-coronarer Venenbypass
ANCA	Anti-Neutrophile cytoplasmatische Antikörper
Aqua dest	Aqua destillatum
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
BAE	Background Antibody Equivalent
Ca ²⁺	Calzium-Ion
CAM	Cellular Adhesion Molecule
CD	Cluster of Differentiation
CI	Confidenzintervall
CPB	Cardio-Pulmonary Bypass
CR	Complement Rezeptor
CRP	C-reaktives Protein
dl	Deziliter
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EK	Erythrozytenkonzentrat
EKG	Elektrokardiogramm
EKZ	Extrakorporale Zirkulation
Fa	Firma
FACS	Fluorescent Activated Cell Sorter
Fc	Fragment crystalline
FiO ₂	inspiratorische Sauerstofffraktion
FITC	Fluoresceinisoithiocyanat
FFP	Fresh Frozen Plasma
FL	Fluoreszenz
f-MLP	N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
FSC	Forward Side Scatter
G-CSF	Granulozyten koloniestimuliernder Faktor

GPI	Glycosyl-phosphatidylinositol
°C	Grad Celsius
h	Stunde
Hb	Hämoglobin
HLM	Herz-Lungen-Maschine
HNA	Human Neutrophil Antigen
ICAM	Inter-Cellular Adhesion Molecule
IE	Internationale Einheit
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IQA	Interquartilsabstand
i.v.	intravenös
kDA	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
m	Meter
MAC	Membran Attack Complex
MAP	Mean Arterial Pressure
mg	milligramm
Mg ²⁺	Magnesium-Ion
MIDCAB	Minimally invasive direct coronary artery bypass
min	Minute
ml	Mililiter
mmHg	Milimeter Quecksilbersäule
MODS	Multiple Organ Dysfunction Syndrome
MOV	Multiorganversagen
MPS	Mononukleäres Phagozytose System
mRNA	messenger Ribonucleic Acid
MW	Mittelwert
µg	Mikrogramm

μl	Mikroliter
NaCl	Natrium-Clorid
NB1	N (Neutrophil), B (Genlocus), 1 (Allel)
NK	natürliche Killerzelle
OP	Operation
OPCAB	Off-pump Coronary Artery Bypass
PAP	Pulmonary Artery Pressure
PBS	Phosphat buffered saline
PECAM	Platelet endothelial cell adhesion molecule
PEEP	Positive Endexpiratory Pressure
PMN	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
p.o.	per os
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SABC	Specific Antibody Binding Capacity
SCCM	Society of Critical Care Medicine
SD	Standardabweichung
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
SSC	Side Scatter
TEE	Transesophageal Echocardiography
TRALI	Transfusion Related Acute Lung Injury
U/min	Umdrehungen pro Minute
ZVD	zentralvenöser Druck

8.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Interaktion von neutrophilen Granulozyten und Endothelzellen durch Expression von Adhäsionsmolekülen nach Aktivierung ..	10
Abbildung 2: Das Komplementsystem	17
Abbildung 3: FSC/SSC-Diagramm (Originalregistrierung)	31
Abbildung 4: Fluoreszenzintensität der Calibration-Beads (Originalregistrierung)	33
Abbildung 5: Eichkurve zur Berechnung der mittleren Antigendichte.....	34
Abbildung 6: Leukozytenkonzentrationen der Gruppen 1 und 2 präoperativ, sowie am 1. und 2. postoperativen Tag	37
Abbildung 7: CRP-Konzentrationen der Gruppen 1 und 2 präoperativ, sowie am 1. und 2. postoperativen Tag.....	38
Abbildung 8: Hb-Konzentrationen der Gruppen 1 und 2 prä- und postoperativ	39
Abbildung 9: Mittelwerte und Standardabweichungen der Fluoreszenz- intensität nach Fluoreszenzmarkierung mit Anti-CD11b Antikörper	42
Abbildung 10: Mittelwerte und Standardabweichungen der Fluores- zenzintensität nach Fluoreszenzmarkierung mit Anti-CD16 Antikörper	43
Abbildung 12: .Mittelwert und Standardabweichung der HNA-2a-Glykoproteine pro neutrophilem Granulozyt nach Fluoreszenzmarkierung mit Anti-HNA-2a Antikörper.....	45

8.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Maßeinheiten der biometrische Daten.....	24
Tabelle 2: Maßeinheiten der laborchemischen Parameter	24
Tabelle 3: Maßeinheiten der perioperativen Daten.....	24
Tabelle 4: Maßeinheiten der Liegedauer	25
Tabelle 5: Maßeinheiten der Komplikationen.....	25
Tabelle 6: Verwendete Antikörper.....	26
Tabelle 7: Biometrischen Daten	36
Tabelle 8: Perioperative Daten	36
Tabelle 9: Transfusionsbedarf der Gruppen 1 und 2	40
Tabelle 10: Daten der Liegedauer	41
Tabelle 11: Anzahl der Komplikationen	41
Tabelle 12: Laborchemischen Parameter.....	86
Tabelle 13: Statistische Auswertung von CD11b	87
Tabelle 14: Statistische Auswertung von CD16	88
Tabelle 15: Statistische Auswertung von CD35	89
Tabelle 16: Statistische Auswertung von HNA-2a	90

9. Schriftliche Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Judith Melchers

10. Veröffentlichung

J. Melchers, C. Neuhäuser, M. Kwapisz, M. Müller, S. Scholz, J. Bux,
I.D. Welters.

CD177 as a marker of neutrophil activation in coronary artery bypass grafting
Intensiv care medicine, Volume 33, Supplement 2, September 2007.
(Abstract)

11. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Dr. h. c. Gunter Hempelmann möchte ich dafür danken, dass er mir die Laboreinrichtungen sowie die nötigen Mittel, die zum Erstellen dieser Arbeit unabdingbar waren, zur Verfügung gestellt hat.

Frau Prof. Dr. med. Ingeborg Welters danke ich für die Überlassung des Themas sowie für die sehr gute Betreuung in allen Phasen dieser Studie. Sie war eine immer engagierte und sehr kompetente Ansprechpartnerin.

Herrn Dipl.-Math. Martin Mogk möchte ich für die statistischen Auswertung dieser Studie danken.

Dem Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin der JLU-Gießen sowie Herrn Prof. Dr. med. Jürgen Bux möchte ich für die gute Zusammenarbeit und Bereitstellung der HNA-2a-Antikörper danken.

Ich danke allen Patienten für die Bereitschaft, ihr Blut für diese Untersuchung zur Verfügung zu stellen.

Meike Sobota und Ines Powaga danke ich für die abschließende Durchsicht dieser Arbeit.

Ganz besonderer Dank gilt zu guter Letzt meinen Eltern, da sie mir durch ihre zuverlässige Unterstützung mein Studium und diese Dissertation überhaupt erst ermöglicht haben.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**