

Alterationen der immunologischen Antwort im Rahmen des eskalierenden SIRS nach kardiopulmonalem Bypass unter Berücksichtigung ihrer prognostischen Wertigkeit

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

vorgelegt von Valesco Wladimir Mann
aus Gießen

Gießen 2002

Aus dem Medizinischem Zentrum für Chirurgie, Anästhesiologie und Urologie
Abteilung Anaesthesiologie, Operative Intensivmedizin und Schmerztherapie
des Universitätsklinikums Gießen
Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. G. Hempelmann

Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. Hempelmann

Gutachter: Prof. Dr. Waldecker

Tag der Disputation: 27.05.2003

Gewidmet meinem verstorbenen Vater

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Mitteln angefertigt habe, 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.

Veröffentlichungen von Daten dieser Dissertation:

Originalarbeiten:

Sablutzki A, Dehne MG, Mann V, Görlach G, Mühling J, Zickmann B, Hempelmann G.
Plasmalevels of selectins and interleukins in cardiovascular surgery using cardiopulmonary bypass.
The Thoracic Cardiovascular Surgeon 1999; 47: 26-31.

Sablutzki A, Simm A, Mann V, Radke J.
Veränderungen des Zytokin-Netzwerkes bei eskalierendem SIRS nach herzchirurgischen Operationen.
Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther 2001; 36: 552-559.

Abstracts:

Sablutzki A, Mann V, Welters I, Görlach G, Dehne M, Hempelmann G.
Alterations of lymphocyte-subsets in the early postoperative course following extracorporeal circulation.
Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther 1998; 33 (3): 479-80.

Sablutzki A, Mann V, Menges T, Welters I, Hempelmann G.
Veränderungen der Lymphozyten-Subpopulationen nach unkomplizierten kardiochirurgischen Eingriffen.
J Lab Med 1998; 22 (7/8): 442.

Sablutzki A, Mann V, Friedrich I, Simm A, Czeslick E, Mühling J, Silber RE.
Influence of heparin-coated surfaces on lymphocyte-populations and acute-phase-response in patients with MODS following cardiopulmonary bypass surgery.
Thorac Cardiovasc Surgeon 2001; (Suppl.): PP24

Sablutzki A, Schubert S, Mann V, Mühling J, Zickmann B, Simm A, Friedrich I, Radke J.
Alterations of cell-mediated immunity and acute-phase-response in the postoperative course following cardiac surgery using cardiopulmonary bypass.
Eur L Anaesth 2001; (Suppl.).

Inhaltsverzeichnis

	Seite	
1	Einleitung	1
1.1	Das Systemic-Inflammatory-Response-Syndrome nach kardiopulmonalem Bypass (CPB) im Überblick	1
1.1.1	Das Postperfusionssyndrom ist eine Variante des Systemic Inflammatory Response Syndrome's	1
1.1.2	Klinische Aspekte des SIRS nach kardiopulmonalem Bypass	2
1.1.3	Pathophysiologische Aspekte des SIRS nach kardiopulmonalem Bypass	2
1.2	Immunologische Dissonanz: Wann bewirkt die immunologische Reaktion SIRS und MODS	7
1.3	Fragestellungen	9
2	Material und Methoden	11
2.1	Das Patientenkollektiv	11
2.2	Probengewinnung	11
2.3	Studienparameter	12
2.3.1	Allgemeine Parameter	12
2.3.1.1	Anamnese	12
2.3.1.2	Operationsdaten	12
2.3.1.3	Täglich untersuchte klinische Parameter und Routinelabor	12
2.3.1.4	Verlaufsdokumentation	12
2.3.2	Spezielle Parameter	13
2.3.2.1	Interleukine	13
2.3.2.2	Das Adhäsionsmolekül ICAM-1	15
2.3.2.3	Der Wachstumsfaktor TGF- β_1	15
2.3.2.4	Akute-Phase-Proteine: C-reaktives Protein und Procalcitonin	16
2.3.2.5	Lymphozytensubpopulationen	17
2.4	Immunoassays	19
2.4.1	ELISA (Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay)	19
2.4.1.1	In der Studie genutzte ELISA-KITs	19
2.4.2	Chemolumineszenz	19
2.5	Durchflußzytometrie	20
2.5.1	Probenezuführung und Analyse	20
2.5.2	Die zur Lymphozytendifferenzierung genutzten Antikörper	23
2.6	Statistische Methodik	25

	Seite
3 Ergebnisse	29
3.1 Vergleich von Kontroll- und SIRS-Gruppe	29
3.1.1 Vergleich präoperativer und operativer Merkmalsausprägungen	29
3.1.1.1 Biometrische Daten	29
3.1.1.2 Operationsdaten	30
3.1.2 Vergleich der postoperativen Parameter des Immunmonitorings	30
3.1.2.1 Betrachtung des Innersubjekteffekts	30
3.1.2.2 Betrachtung des Zwischensubjekteffekts	32
3.1.2.3 Untersuchung auf Gruppenunterschiede zu den einzelnen Messzeitpunkten	33
3.1.2.3.1 Interleukine und TGF- β_1	33
3.1.2.3.2 s-ICAM-1	35
3.1.2.3.3 Acute-Phase-Proteine: Procalcitonin und C-reaktives Protein (CRP)	35
3.1.2.3.4 Lymphozytensubpopulationen	36
3.1.3 Korrelation der Operationszeiten mit den Immunparametern	38
3.1.4 Vergleich der Verlaufparameter	39
3.2 Vergleich der Daten von Überlebenden und Verstorbenen innerhalb der SIRS-Gruppe	40
4 Diskussion	41
4.1 Diskussion der Methoden	41
4.1.1 Das Patientenkollektiv	41
4.1.2 Scoresysteme zur Risikostratifizierung	41
4.1.3 Durchflußzytometrie	42
4.2 Diskussion der Ergebnisse	44
4.2.1 Allgemeine Vorbemerkungen	44
4.2.2 Interleukine	44
4.2.2.1 Interleukin-2	44
4.2.2.2 Interleukin-6	45
4.2.2.3 Interleukin-8	45
4.2.2.4 Interleukin-10	46
4.2.3 Das Adhäsionsmolekül ICAM-1	47
4.2.4 Der Wachstumsfaktor TGF- β_1	48
4.2.5 Procalcitonin	48
4.2.6 Lymphozytensubpopulationen	50
4.2.6.1 T-Lymphozyten	50
4.2.6.2 B-Lymphozyten und natürliche Killerzellen (NK-Zellen)	53
4.3 Charakterisierung des schweren SIRS nach CPB	54
4.4 MODS oder CHAOS nach CPB: Wann führen sie zum Tode?	55

	Seite
5 Zusammenfassung	57
Literaturverzeichnis	59
Anhang I Narkoseführung, Operation und verwendetes Material zur EKZ	71
I.I Narkose	71
I.II Operationsablauf	71
I.III Materialien für die extrakorporale Zirkulation	73
Anhang II Der Apache II Score im Überblick	74
Anhang III In der Studie verwendetes Labormaterial	75
Anhang IV Wertetabellen	77
IV.I Übersichtstabelle der Daten von SIRS- und Kontrollgruppe	77
IV.II Vergleich der Daten Überlebender und Verstorbener innerhalb der SIRS-Gruppe	78
Danksagung	81
Lebenslauf	82

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung	PG	Prostaglandin
ACCP	American College of Chest Physicians	PK	Präkallikrein
ACTH	Adrenocorticotrophes Hormon	p.o.	per os
ADCC	Antigen Dependent Cellular Cytotoxicity	resp.	respirative
ALI	Acute Lung Injury	s.	siehe
APC	Antigen-Presenting-Cell	SCCM	Society of critical care Medicine
APP	Acute Phase Proteine	SD	Standard Deviation
ATP	Adenosin-Triphosphat	SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
bzw.	beziehungsweise	s.o.	siehe oben
ca.	circa	sog.	sogenannt
CARS	Compensatory inflammatory Response Syndrome	SSC	Side Scatter
CHAOS	Cardiovascular Shock, Homeostasis, Apoptosis, Organ Dysfunction and Immune Suppression	s.u.	siehe unten
CD	Cluster of Differentiation	Tab.	Tabelle
CPB	kardiopulmonaler Bypass	TGF	Transforming Growth Factor
CRP	C-reaktives Protein	T_H	T-Helferzellen
CSIF	Cytokine Synthesis Inhibitory Factor	TM	Trade Mark
d	Tag(e)	TNF	Tumor Necrosis Factor
d.h.	das heißt	u.a.	unter anderem
et al.	und andere	u.U.	unter Umständen
EKG	Elektrokardiogramm	vs.	gegen(über)
EKZ	extrakorporale Zirkulation	z.B.	zum Beispiel
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay	ZNS	Zentrales Nervensystem
etc.	et cetera		
Fa.	Firma		
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat		
FSC	Forward Scatter		
G-CSF	Granulocyte Colony-Stimulating-Factor		
h	Stunde(n)		
HLA	Human Leucocyte Antigen		
HMWK	High Molekular Weight Kininogen		
HSF	Hepatocyte-Stimulating-Factor		
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1		
i.d.R.	in der Regel		
IFN	Interferon		
IgG	Immunglobulin G		
Kap.	Kapitel		
IL	Interleukin		
KDa	Kilodalton		
LAK	Lymphokin-Aktivierte Killerzellen		
LGL	Large-Granular-Granulocyte		
LVEDP	Left-Ventricular-Enddiastolic-Pressure		
MARS	Mixed Antagonist Response Syndrome		
MHC	Major Histocompatibility Complex		
MODS	Multi-Organ Dysfunktion Syndrome		
MOF	Multi-Organ Failure		
NAP	Neutrophil Aktivating Peptide		
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards		
NO	Nitric Oxide		
NYHA	New York Heart Association		
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen		
o.g.	oben genannt		
PCT	Procalcitonin		
PE	Phycoerythrin		

1. Einleitung

1.1 Das Systemic-Inflammatory-Response-Syndrome (SIRS) nach kardiopulmonalem Bypass (CPB) im Überblick:

1.1.1 Das Postperfusionssyndrom ist eine Variante des Systemic Inflammatory Response Syndrome's

Seit der ersten erfolgreichen herzchirurgischen Operation unter extrakorporaler Zirkulation von John Gibbon im Jahre 1953 gab es erhebliche Anstrengungen auf dem technischen Sektor der Kardiochirurgie, die darauf abzielen, den gesamten Eingriff so physiologisch wie möglich zu gestalten. Dennoch gibt es heute immer noch Komplikationen, für die Kirklin und Westaby bereits in den 80er Jahren den Begriff des „Postperfusionssyndroms“ geprägt haben [19, 56, 123]. Mögliche Folgen dieses als „whole body inflammation syndrome“ beschriebenen Prozesses sind Schäden an verschiedenen Organsystemen: Pulmonale und renale Dysfunktionen, hämorrhagische Diathese, neurologische Störungen, Fieber unklarer Herkunft und Perfusionsstörungen des Splanchnikusgebietes oder des Myokards [98].

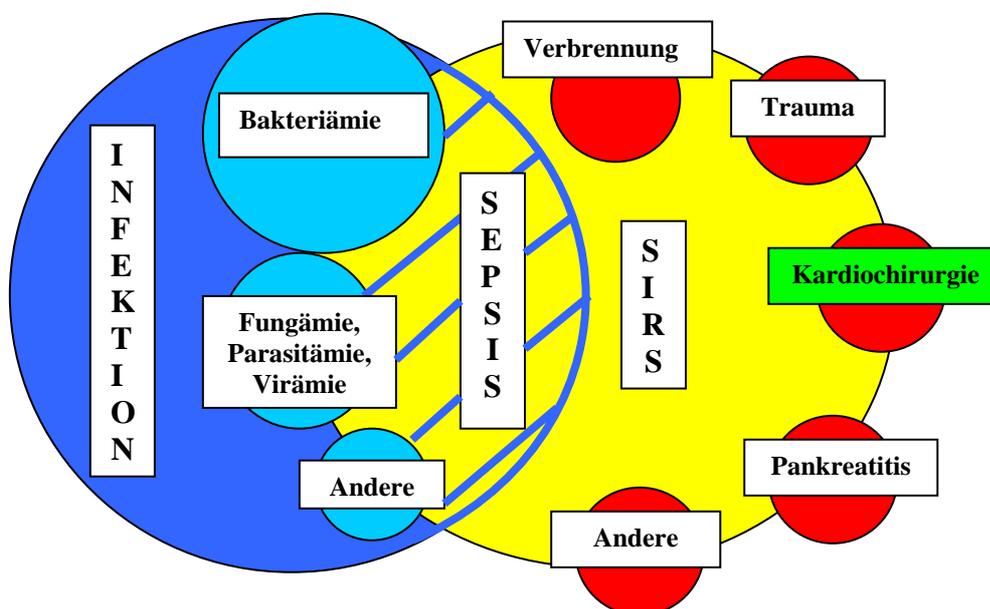


Abb.1:Darstellung der Beziehung zwischen SIRS, Sepsis und Infektion, modifiziert nach Bone RC, Balk RA, Cerra FB et al. in: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of critical Care Medicine. Chest 1992; 101:1644-1655.

Heute wird dieses Krankheitsbild gemäß den Richtlinien des American College of Chest Physicians (ACCP) und der Society of Critical Care Medicine (SCCM) dem „Systemic-Inflammatory-Response-Syndrome“ (SIRS) zugeordnet. Dabei subsumiert das SIRS genera-

lisierte inflammatorische Prozesse, bei denen der betroffene Patient mindestens zwei der folgenden klinischen Kriterien erfüllen muss:

- (1) Körpertemperatur $< 36^{\circ}\text{C}$ oder $> 38^{\circ}\text{C}$ (rektal)
- (2) Tachykardie $> 90/\text{min}$
- (3) Arterieller CO_2 Partialdruck $< 32 \text{ mmHg}$, bzw. (bei Spontanatmung) Tachypnoe $> 20/\text{min}$
- (4) Leukozytenanzahl im Blutbild $< 4000/\text{mm}^3$ oder $> 12000/\text{mm}^3$ bzw.
> 10% der Leukozyten sind stabkernige neutrophile Granulozyten

Das SIRS wird durch zahlreiche infektiöse und nichtinfektiöse Stimuli verursacht. Die Sepsis als systemische inflammatorische Reaktion auf hämatogen gestreute Infektionserreger ist ein infektiöses SIRS. Verschiedenste weitere Einflüsse wie Kardiochirurgie unter extracorporaler Zirkulation können ein nichtinfektiöses SIRS bedingen. Die Beziehung von SIRS, Sepsis und Infektion illustriert die Abbildung 1.

1.1.2 Klinische Aspekte des SIRS nach kardiopulmonalem Bypass

In Deutschland werden pro Jahr ca. 70.000 Operationen unter extrakorporaler Zirkulation mit einer durchschnittlichen Letalität von etwa 3-4 % durchgeführt. Diese Letalität ist nicht nur Folge der kardialen Grunderkrankung der betroffenen Patienten, sondern in hohem Maße durch das postoperative Auftreten von einem zum Multiorganversagen (MODS) führenden SIRS bedingt, dessen Inzidenz bei ca. 10% liegt.

Die Symptomatik der betroffenen Patienten beim SIRS ist in erster Linie durch Störungen des pulmonalen Gasaustausches bis hin zum „acute lung injury (ALI)“ gekennzeichnet. Häufig wird der Patient bei erniedrigtem peripheren Gefäßwiderstand mit hyperdynamer Kreislaufsituation und/oder durch eine entstehende Myokarddepression katecholaminpflichtig. Zudem führt eine zunehmende Kapillarleckage zur Ödembildung.

1.1.3 Pathophysiologische Aspekte des SIRS nach kardiopulmonalem Bypass

Nach herzchirurgischen Operationen unter extrakorporaler Zirkulation beobachtet man im Vergleich mit anderen größeren chirurgischen Eingriffen ausgeprägtere inflammatorische Reaktionen, bei denen die Patienten klinisch regelhaft den o.g. SIRS-Kriterien entsprechen. Dies wird für die erhöhte Mortalität solcher Interventionen mitverantwortlich gemacht [98] und folgenden spezifisch mit der extrakorporalen Zirkulation assoziierten Einflüssen zugeschrieben [53, 56, 104]:

a) Kontaktaktivierung der Thrombozyten und der Gerinnung :

Bei herzchirurgischen Operationen mit CPB werden Thrombozyten und der Gerinnungsfaktor XII durch den Kontakt mit synthetischem Material (Oberfläche von Oxygenator und Schlauchsystem der EKZ) aktiviert [36].

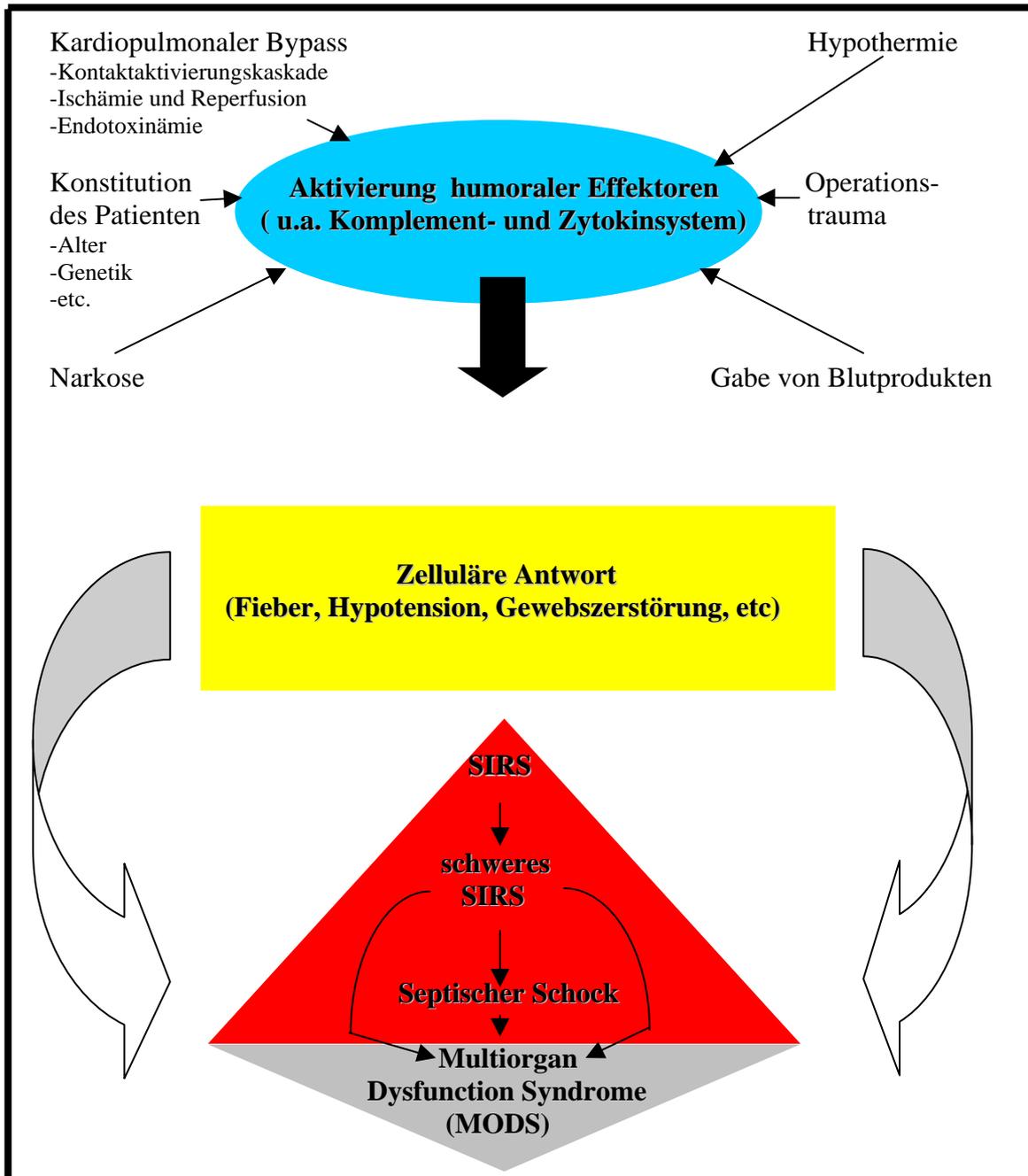


Abb. 2: Vereinfachendes Schema zur Entstehung von SIRS und MODS nach kardiopulmonalem Bypass. Das SIRS ist als Folge einer polykausalen Aktivierung humoraler Effektoren (z. B. Zytokine, Arachidonsäureprodukte) anzusehen, welche eine Antwort auf zellulärer Ebene (z.B. Phagozyten, Gewebszellen) initiieren, die je nach Ausprägung bis zum Multiorganversagen (MODS) führen kann.

Aufgrund ihrer Aktivierung formen die Thrombozyten Aggregate an der künstlichen Oberfläche und auch untereinander, was zur Entstehung von Mikroemboli führen kann.

Dies bedingt neben einer Thrombopenie auch eine reduzierte Thrombozytenfunktion, da die in der Zirkulation verbleibenden Thrombozyten einer heterogenen Ansammlung intakter, morphologisch veränderter oder auch degranulierter Zellen entsprechen.

Die Aktivierung des Faktors XII geschieht im Beisein von High-Molecular-Weight-Kininogen (HMWK) und Präkallikrein (PK). Der oberflächengebundene Faktor XII wird in FXIIa und FXII_f gespalten und Kallikrein aus PK freigesetzt. Diese Produkte wirken gegenseitig als positives Feedback in einer Art Verstärkerkreislauf. Sie führen zum „Anwerfen“ verschiedener Kaskaden des inflammatorischen Geschehens (u.a. Kininsystem, Gerinnungs- und Fibrinolyse- sowie Komplementsystem) und zudem zur Induktion der Expression neutrophilenbindender Rezeptoren durch das Endothel [36, 76, 98].

b) Ischämie-Reperfusionsschaden:

Die sich bei Operationen unter EKZ ereignende Ischämie-Reperfusionsschädigung lässt sich in eine direkte und eine indirekte Komponente unterteilen:

Die direkte geht bei der Myokardrevaskularisierung am Koronarkreislauf voran. Im Ischämiegebiet verursachen freie Radikale, die wahrscheinlich durch Abbau von ATP zu Harnsäure durch die Xanthin-Oxidase entstehen, Endothelalterationen, welche eine Komplementaktivierung, Zytokin-Induktion sowie die Aktivierung und Migration von Neutrophilen mit folgender Gewebszerstörung bedingen.

Bei der indirekten Komponente kann die Reperfusion von Ischämiegebieten Effektoren (Bradykinin, Kallikrein, freie Radikale, Proteasen) in andere Stromgebiete „verschleppen“, wo sie zu Läsionen führen, auf die weitere entzündliche Prozesse folgen.

Zudem wird eine ischämisch vorgeschädigte („geprimte“) Zelle als besonders empfindlich für weitere Zellschädigungen angesehen [19, 98].

c) Endotoxinämie:

Dieser Bestandteil gramnegativer Bakterien lässt sich bei herzchirurgischen Eingriffen in erhöhtem Maße während des kardiopulmonalen Bypasses im Plasma nachweisen [40, 76]. Seine Herkunft wird hauptsächlich auf die Translokation aus dem Darm während dessen Minderperfusion bei der EKZ zurückgeführt [3, 47, 121]. Ebenso kommt eine Kontamination des extrakorporalen Kreislaufs, der pulmonalerteriellen Katheter, von Infusionen oder Blutprodukten durch den Wandbestandteil dieser ubiquitären Keime in Frage

[76]. Endotoxin kann Komplement, die Gerinnung, das Endothel, Monozyten/Makrophagen und neutrophile Granulozyten aktivieren [19, 31, 40, 47, 76].

Diese mit dem kardiopulmonalen Bypass assoziierten Prozesse wirken zusammen mit einer Fülle von weiteren Einflüssen (Operationstrauma, Narkose, Hypothermie des Patienten während der Prozedur sowie Verabreichung von Blutprodukten) auf den betroffenen Patienten ein. In ihrer Summe bewirken sie bei der gegebenen Konstitution des Patienten das Anwerfen einer Fülle von ineinander integrierten Kaskaden, an deren Ende das klinische Bild des SIRS steht. Neben dem Gerinnungs- und Fibrinolyse-System sowie dem Kininsystem sind insbesondere die folgenden Komponenten von Bedeutung:

Das Komplementsystem: Der besondere Einfluss des CPB auf das Komplementsystem wurde bereits von mehreren Arbeitsgruppen gezeigt. So korreliert das Ausmaß der Komplementaktivierung mit der Dauer des kardiopulmonalen Bypasses [56], wogegen die C3a- und C5b-9-Komplex-Spiegel während grösserer Operationen und Herzchirurgie ohne extrakorporale Zirkulation nicht ansteigen [121]. Die bereits beschriebene Kontaktaktivierung durch den CPB aktiviert ihrerseits auf den sogenannten alternativen Weg das Komplementsystem [98]. Daneben kommt auch eine Komplementaktivierung durch Endotoxin, Hydroxyl-Radikale und Heparin-Protamin-Komplexe in Frage [47, 76, 121]. Aktivierte Komplementprodukte sind potente Mediatoren des Entzündungsgeschehens. Neben ihrer zytotoxischen Wirkung sind sie bei der Regulation der Vasomotorik, der Chemotaxis und Leukozytenaktivierung beteiligt und stimulieren Monozyten zur Zytokinproduktion (TNF, IL-1, IL-6) [76].

Zytokine : Das Zytokinsystem stellt ein komplexes und hochspezifisches Regelsystem humoraler Mediatoren dar, welches einerseits zwischen den Immunzellen untereinander, andererseits zwischen Immunzellen und Gewebszellen interagiert. Ihre Herkunft ist sehr vielgestaltig: Produzenten sind Leukozyten, Endothelzellen, Fibroblasten und zahlreiche Gewebszellen. Zytokine sind für die Lebensdauer, Entwicklung, Differenzierung und Proliferation der Immunzellen mitverantwortlich, sie dienen als Chemoattraktant, haben Einfluss auf die Körpertemperatur, Hämodynamik und Akute-Phase-Reaktion. Wesentliche Vertreter dieser Mediatoren beim SIRS sind die Interleukine 2, 6, 8, 10 [19, 22, 31, 40, 76].

Das Endothel und Adhäsionsmoleküle: Das Endothel vermittelt und moduliert die inflammatorische Antwort beim SIRS. Es vollzieht wichtige vasomotorische Funktionen, hat Einfluss auf die Gerinnung und Fibrinolyse, es ist ein Zytokinproduzent und stellt eine wesentliche Komponente bei der Zelladhärenz und Zellmigration der Leukozyten ins Gewebe dar [31]. Die Leukozytendiapedese selbst wird durch Adhäsionsmoleküle vermittelt. Diese lassen sich in drei Familien aufteilen: die Selektine, die Leukozyten-Integrine und die Immunglobulin-Superfamilie. Eine zentrale Rolle bei der transendothelialen Migration von Phagozyten, welche auch die Gewebszerstörung beim SIRS ermöglicht, spielt die Bindung zwischen leukozytären Intergrinen und Molekülen der Immunglobulin-Superfamilie (ICAM-1 [69]).

Das zelluläre Abwehrsystem: Zum zellulären Abwehrsystem zählen die Granulozyten, das mononukleäre phagozytische System (Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen,...) und die Lymphozyten. Phagozytose, Zytotoxizität, Mediatorproduktion, Antigenpräsentation und Antikörperproduktion zählen zu seinen primären Aufgaben. Beim SIRS gelten die neutrophilen Granulozyten als der Haupteffektor der Gewebszerstörung [31, 47].

Auch wenn man heute wesentliche Komponenten des SIRS kennt, darf das nicht darüber hinwegtäuschen, dass über die exakten Abläufe insbesondere quantitativ wenig Evidenz besteht. So sind bedingende Trigger, wesentliche Folgereaktionen und deren Stellenwert für das Krankheitsbild heute noch nur unvollkommen verstanden und geben stetigen Anlass zu deren weiteren Erforschung.

Als Endstrecke der pathophysiologischen Abläufe im Rahmen des SIRS werden heute drei Hauptmechanismen für die Entstehung struktureller Organschäden bis hin zum Multiorganversagen verantwortlich gemacht [9, 41]:

- (1) Eine Maldistribution des Blutflusses im Bereich der Mikrozirkulation mit Störung der Verteilung von Sauerstoffbedarf und –angebot (ischämisch-hypoxische Schädigung)
- (2) Eine Einwirkung zytotoxischer Mediatoren auf Zellfunktion und Zellstrukturen wie Zellmembranen oder Zellorganellen (metabolisch-toxische Schädigung)
- (3) Ein spezifischer Effekt von Endotoxin mit Hemmung der sauerstoffmetabolisierenden Zellsysteme (endotoxisch-hypoxische Schädigung)

1.2 Immunologische Dissonanz: Wann bewirkt die immunologische Reaktion SIRS und MODS ?

Das Immunsystem hat die Aufgabe, den Organismus vor Verletzungen seiner Integrität zu bewahren. Zentrale Punkte sind hierbei die Abwehr mikrobieller Infektionen sowie der Schutz vor Tumorzellen. Wie kommt es dann im Rahmen des schweren SIRS zu einem paradoxen Verhalten dieses „Sicherheitssystems“, das dann eine lebensbedrohende Wirkung zeigt ? Bone formulierte neue Konzepte zu dieser Frage [13]:

Er sieht prinzipielle Ursprünge dieses zu Organläsionen führenden Immunprozesses in einem derart schwerwiegenden initialen Insult, der prompt zu SIRS und MODS führt, oder in einer individuellen Prädisposition, die die Patienten derart „primen“, dass sie auf einen Insult mit SIRS und MODS reagieren. So wurde als Beispiel für eine genetische Prädisposition gezeigt, dass der HLA-Haplotyp einer Person deren Fähigkeit zur Zytokinproduktion beeinflusst [15]. Die pathophysiologischen Abläufe des SIRS teilt Bone in verschiedene Stadien ein:

- (1) Der adäquate initiale Insult führt zur prompten Freisetzung pro-inflammatorischer Mediatoren. Diese Mediatoren führen zu einem feinabgestimmten Netzwerk an Reaktionen, welche in dieser Mikroumwelt pathogene Umstände bekämpfen, zerstörtes Gewebe abräumen und neues Gewebswachstum anregen. Als Vermeidung einer überschießenden Reaktion durch diese Mediatoren wird eine anti-inflammatorische Reaktion in Gang gesetzt. Ist die angesprochene Läsion schwerwiegend genug, so erscheinen diese Mediatoren auch im systemischen Kreislauf. Zu diesem Zeitpunkt ist diese Situation als normale Antwort auf einen Stimulus zu sehen, mit dem die Mikroumwelt alleine nicht „fertig wird“ und nach „Hilfe“ fordert (Neutrophilenfreisetzung aus dem Knochenmark, Akute-Phase-Reaktion).
- (2) Bei manchen Patienten kommt es bei initial überwiegend pro-inflammatorischen Einflüssen zu einer insuffizienten inflammatorischen Antwort. In diesem Zustand versterben viele der Patienten im Schock.
- (3) Bei überlebenden Patienten scheint die anti-inflammatorische Reaktion zur Kompensation auszureichen. Bei manchen Patienten kann es zu einer exzessiven anti-inflammatorischen Antwort kommen, die zur Immunsuppression führt. Dieser Situation muss nicht obligat das oben beschriebene pro-inflammatorische Stadium vorausgehen. Man nennt diesen Zustand „Compensatory Antiinflammatory Response Syndrom (CARS)“. Er erklärt die erhöhte Anfälligkeit für Infektionen beim SIRS.
- (4) Der Patient kommt in den Zustand der „immunologic dissonance“. Das Immunsystem kann den biologischen Anforderungen in keiner Hinsicht mehr gerecht werden und rea-

giert sowohl pro- als auch antiinflammatorisch überschüssig. Dieser Zustand wird folglich „**Mixed Antagonist Response Syndrome (MARS)**“ genannt [14].

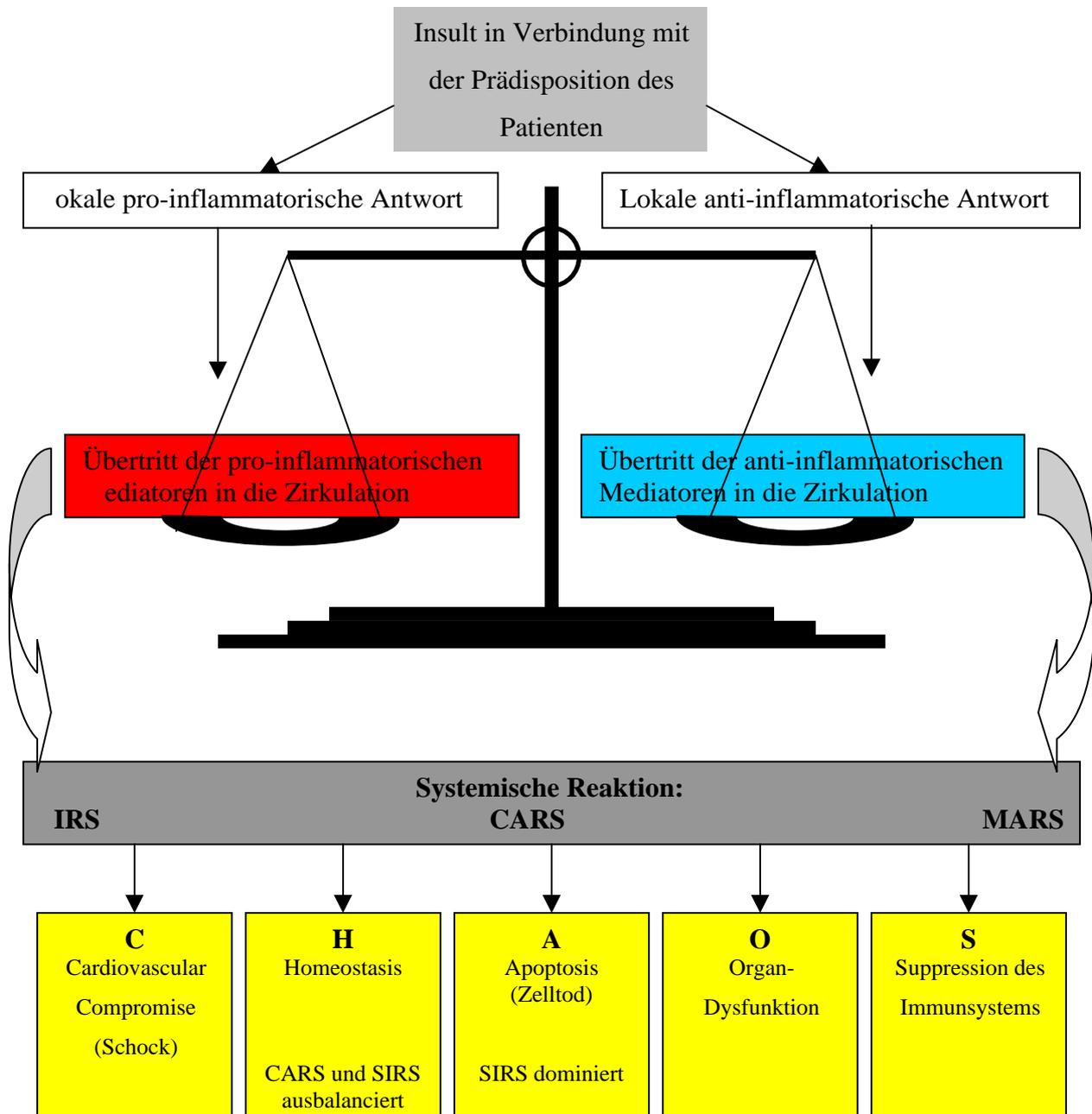


Abb. 3: SIRS, CARS, MARS und CHAOS. Darstellung modifiziert nach Bone, RC. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. Crit Care Med 1996;24(7):1125-1128 (Erläuterungen siehe Text).

Das Spektrum der Konsequenzen aus diesen Zuständen wird von Bone CHAOS (**C**ardiovascular Shock, **H**omeostasis, **A**poptosis, **O**rgan Dysfunction and Immune **S**uppression) genannt [14] (s. Abb. 3).

1.3 Fragestellungen

Patienten nach herzchirurgischen Eingriffen unter extrakorporaler Zirkulation (EKZ) können entsprechend den vorhergehenden Ausführungen als geeignete Klientel für die Untersuchung des SIRS angesehen werden. Daher sind bereits durch zahlreiche klinische und experimentelle Studien verschiedenste Aspekte immunologischer Auswirkungen dieser Operationen untersucht worden. Dennoch gibt es nur wenig Information über die inflammatorischen Vorgänge beim SIRS mit hohem Mortalitätsrisiko (schweres SIRS) bzw. über die Zusammenhänge von SIRS und MODS nach herzchirurgischen Eingriffen [22, 23, 28, 88].

Ziel dieser Studie war es, weiteren Einblick auf diesem Gebiet zu erlangen. Dazu wurden Patienten nach elektiver aortokoronarer Bypassoperation unter EKZ nach vorangegangener prospektiver Risikoevaluation basierend auf den Ergebnissen von Pilz et al. untersucht [89]. So konnten die postoperativen Immunparameter von SIRS-Patienten mit hohem Mortalitätsrisiko (SIRS-Gruppe) mit denen einer Patientengruppe mit guter Prognose (Kontrollgruppe) verglichen werden, um folgenden Fragen nachgehen zu können:

(1) Unterscheiden sich die Patienten der Risikogruppe von klinisch unauffälligen Patienten hinsichtlich der Zytokinspiegel ?

Für diese Fragestellung wurden die Spiegel der Interleukine 2, 6, 8 und 10 wegen ihrer herausragenden Rolle beim SIRS nach CPB bestimmt [19, 22, 31, 40, 76] und der Wachstumsfaktor TGF- β_1 wegen seiner multifunktional immunmodulatorischen Potenz untersucht.

(2) Unterscheiden sich die Patientengruppen hinsichtlich der Freisetzung löslicher Adhäsionsmoleküle in die Blutbahn ?

Aufgrund seiner besonderen Bedeutung für die transendotheliale Migration von Neutrophilen [69], die als Hauptakteur bei der SIRS-assoziierten Gewebszerstörung angesehen werden [31, 47], war ICAM-1, ein Adhäsionsmolekül aus der Immunglobulinsuperfamilie, hierbei von primärem Interesse.

(3) Gibt es Unterschiede zwischen den Gruppen in Bezug auf die Spiegel von Entzündungsmarkern ?

Neben dem klinischen Routineparametern C-reaktives Protein (CRP) wurde insbesondere der Verlauf der Spiegel des Entzündungsmarkers Procalcitonin (PCT) untersucht.

(4) Zeigen sich Unterschiede bei der Zusammensetzung der Lymphozytenpopulationen?

Diese Fragestellung begründet sich darauf, dass man bei Herzoperationen unter CPB von einer deutlicher als bei anderen chirurgischen Eingriffen zu Tage tretende Suppression des erworbenen Immunsystems ausgeht [51], welche mit einem Ungleichgewicht innerhalb der Lymphozytensubpopulationen in Verbindung gebracht wird [17, 71].

- (5) Hat die Zeitdauer der gesamten Operation, der Ischämie oder der extrakorporalen Zirkulation Einfluss auf die Höhe der Konzentration der einzelnen Parameter ?**
- (6) Lassen sich innerhalb der Risikopatienten Unterschiede der o.g. Immunparameter zwischen überlebenden und perioperativ verstorbenen Patienten finden?**

Durch die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollen weitere Erkenntnisse über die pathophysiologischen Abläufe insbesondere beim schweren SIRS gewonnen werden. Nur ein wachsendes Verständnis dieser Prozesse kann auf lange Sicht als Grundlage jeglicher kausaler und damit rationaler Therapie dieser bislang unzufriedenstellend behandelbaren Krankheitsentität dienen.

Die Untersuchungsergebnisse sollen zudem unter dem Aspekt ihrer prognostischen Wertigkeit beurteilt werden. So könnte man dem Kliniker evtl. Hilfsmittel in die Hand geben, die eine frühzeitige Identifikation von Risikopatienten erlauben, um bereits heute aufwendigere therapeutische Maßnahmen rechtfertigen zu können.

2. Material und Methoden

2.1 Das Patientenkollektiv

Untersucht wurden männliche Patienten im Alter von 50-75 Jahren nach elektiver Koronararterienbypassoperation, die postoperativ im Zeitraum von Juli 1997 bis Dezember 1998 auf der kardiochirurgischen Intensivstation am Klinikum der Justus-Liebig-Universität Gießen in Behandlung waren. Diese Patienten hatten sich einer standardisierten offenen Myokardrevascularisierung unter kardiopulmonalem Bypass unterzogen. Die Narkoseführung für den Eingriff erfolgte nach Prämedikation durch Flunitrazepam und Morphin per os (p.o.) mit gewichtsbezogenen Dosierungen von Sufentanil, Midazolam und Pancuronium. Die extrakorporale Zirkulation wurde mit Hohlfasermembranoxygenatoren bei einem Perfusionsdruck von 50-70 mmHg und einer moderaten Hypothermie von $33,8 \pm 1,0$ °C rektal durchgeführt (nähere Erläuterungen zur Narkose und Operation siehe Anhang I, Seite 71).

Alle Patienten mussten am Morgen des ersten postoperativen Tags mindestens zwei der SIRS-Kriterien gemäß ACCP und SCCM erfüllen.

Ausschlusskriterien waren die Erkrankung an Diabetes mellitus, eine gestörte Leber- oder Nierenfunktion, die Einnahme steroidaler Medikamente, Krebsleiden, Immundefekterkrankungen, Herzklappenerkrankungen, eine Ejektionsfraktion $< 40\%$ und Gerinnungsstörungen.

Für die Zuteilung in die jeweiligen Gruppen verwendeten wir den APACHE II Score (siehe Anhang II, Seite 74). Ausschlaggebend war die Bewertung des Patienten am ersten postoperativen Tag. Gemäß den Ausführungen von Pilz et al. konnten so Studienpatienten mit blander Prognose (Score von < 19) für die Kontrollgruppe und solche mit erhöhtem Mortalitätsrisiko für die SIRS-Gruppe (Score von ≥ 24) rekrutiert werden [89].

Die Kontrollgruppe umfasste 15 Patienten, die SIRS-Gruppe 10 Patienten.

Für die Untersuchung lag das positive Votum der Ethik-Kommission der medizinischen Fakultät der Justus-Liebig-Universität-Gießen vor.

2.2 Probengewinnung

Als Messzeitpunkte galten die ersten vier postoperativen Tage. Um einen systematischen Fehler durch Vernachlässigung einer zirkadianen Rhythmik der untersuchten Parameter zu vermeiden, wurden jeweils um 8 Uhr morgens aus der arteriellen Kanüle die notwendigen

Blutproben entnommen. So wurde EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)- und Citrat-Blut asserviert und gleich nach der Abnahme auf Eis gelegt.

Für die Durchflusszytometrie wurde EDTA-Vollblut bereitgehalten und nach einer Lyse-/Wasch-Prozedur zur Abtrennung der Erythrozyten innerhalb von 6 Stunden analysiert.

Für die ELISA- sowie Chemolumineszenstests wurde das Plasma vom EDTA- und Citratblut durch Zentrifugation gewonnen und bis zur Analyse bei -40 °C in Eppendorfröhrchen aufbewahrt.

2.3 Studienparameter

2.3.1 Allgemeine Parameter

2.3.1.1 Anamnese

Erfasst wurden biometrische Daten (Geschlecht/Größe/Alter/Gewicht), der präoperative linksventrikuläre-endsdiastolische-Druck (LVEDP), die präoperative NYHA-Klassifikation, das Vorhandensein einer Hauptstammstenose, einer Hypertonie oder einer Hyperlipidämie.

Bei vorhandenem Einverständnis und nach Überprüfung auf die genannten Ausschlusskriterien wurden die geeigneten Patienten in die Studie aufgenommen.

2.3.1.2 Operationsdaten

Es wurden die Zahl der Anastomosen, die Operationszeiten (OP-Beginn/OP-Ende/OP-Dauer), die Bypasszeit und Ischämiezeit sowie der genutzte Oxygenator festgehalten.

2.3.1.3 Täglich untersuchte klinische Parameter und Routinelabor

Erfasst wurden morgens um 8 Uhr während der ersten vier postoperativen Tage: APACHE-II-SCORE, Hämoglobinkonzentration, Hämatokrit, Leukozytenzahl, Kreatininwert, Körpertemperatur, CRP, Gabe von Blutkonserven oder Plasma, bisherige Komplikationen.

2.3.1.4 Verlaufsdokumentation

Hier wurden alle während der intensivmedizinischen Behandlung auftretenden Besonderheiten erfasst: Nachbeatmungsdauer, Zeit auf Intensivstation, Nierenersatzverfahren, Reanimation, Reoperation sowie sonstige Komplikationen wie Pneumonie, andere Infektionen oder Sepsis.

2.3.2 Spezielle Parameter

2.3.2.1 Interleukine

Interleukin-2

Interleukin-2 ist ein glykosyliertes Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 14-16 kDa. Dieser ursprünglich „T-Zell-Wachstumsfaktor“ genannte Mediator wird von CD4-positiven (CD4+) T-Helferzellen nach deren Aktivierung durch Antigenpräsentation und Einwirkung des von den antigenpräsentierenden Zellen gebildeten IL-1 sekretiert und zeigt sowohl auto-krine als auch parakrine Effekte (siehe auch Abb.4, Seite 18): T-Zellen proliferieren unter dem Einfluss von IL-2, T-Helferzellen werden zudem noch zur Produktion weiterer Zytokine wie IL-4, IL-5, IL-6 und TNF- β angeregt.

Der Effekt auf die T-Zellproliferation ist dabei nicht ungezügelt, denn das IL-2-getriggerte Wachstum macht die aktivierte T-Zelle nach Restimulation durch den T-Zellrezeptor empfindlich für die Apoptose.

Makrophagen können durch IL-2 zu verstärkter Sauerstoffradikalbildung und Tumorzytotoxizität angeregt werden [43, 92].

Interleukin-6

Interleukin-6 ist ein Glykoprotein, welches je nach Ursprungszelle ein Molekulargewicht von 21-28 kDa aufweist und eine signifikante Homologie zum Granulozyte-Colony-Stimulating-Faktor (G-CSF) zeigt. Viele vormals einzeln benannte Mediatoren verschiedenster Funktion, wie z.B. *B-Cell-Stimulatory-Factor-2 (BSF-2)*, *Interferon- β_2* oder *Hepatocyte-Stimulating-Factor (HSF)*, stellten sich letztendlich als identisch mit IL-6 heraus. Weiterhin ist IL-6 als ein „Vielzellenprodukt“ mit verschiedensten Triggern aufzufassen. Als Hauptquellen werden stimulierte Monozyten/Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen angesehen, aber auch T-/B-Lymphozyten, Knochenmarkszellen, Mastzellen, neutrophile Granulozyten, Osteoblasten oder Astrozyten sezernieren diesen Mediator. IL-6 vermittelt über unterschiedlichste Zielzellen vielfältige biologische Funktionen, wobei je nach betroffenem Zelltyp inhibitorische oder stimulierende Effekte zum Tragen kommen. Folgend seien einige wesentliche Aspekte des IL-6 im Hinblick auf inflammatorische Prozesse erläutert [2]:

- Bei B-Lymphozyten agiert IL-6 in der späten Phase der Differenzierung zu Immunglobulinproduzierenden Plasmazellen und induziert die Immunglobulinsekretion.
- IL-6 ist bei der Aktivierung, dem Wachstum und der Differenzierung von T-Lymphozyten beteiligt. Dabei wirkt IL-1 als Kofaktor der Proliferation.

- IL-6 erhöht die Aktivität von Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). Es stimuliert die Phagozytosefähigkeit und funktionelle Differenzierung bei Makrophagen.
- IL-6 induziert die Biosynthese der Akute-Phase-Proteine (APP) wie CRP, Serum-Amyloid-A, Fibrinogen und Antithrombin in der Leber. Dabei potenzieren Glucokortikoide den Effekt dieses Zytokins auf die Induktion mancher APP. Interessanterweise führt IL-6 im Zentralnervensystem neben Fieber auch zur ACTH-Freisetzung. Dadurch sezernierte Glucokortikoide dienen folglich teils als eine Art positives Feedback in der Akuten-Phase-Reaktion und teils als negatives Feedback durch ihren depressorischen Einfluss auf die Zytokinproduktion.

Interleukin-8

Interleukin-8 ist ein sehr stabiles 8 kDa Protein mit außergewöhnlich selektiver chemotaktischer Wirkung auf neutrophile Granulozyten. Neben Fibroblasten, Endothel, Monozyten/Makrophagen, Granulozyten wird IL-8 von verschiedensten Zellen nach Stimulation v.a. durch *IL-1* und *TNF α_2* produziert. Dabei scheint ein transvaskulärer Konzentrationsgradient (Gewebe/intravasaler Raum) essentiell für die Stimulation der Neutrophilen zur Diapedese/Migration zu sein.

Außer als langwirkendes Chemoattraktant fungiert dieses auch Neutrophil-Activating-Peptide-1 (NAP-1) genannte Zytokin auch als Aktivator von Neutrophilen: Spezifische Granula und sekretorische Vesikel werden auf einen Reiz durch IL-8 exozytiert, und es kommt im Rahmen dieser Exozytose auch zum IL-8 abhängigen Einbau von Adhäsionsmolekülen (u.a. CD11b/CD18, CD11c/CD18) in die Zellmembran Neutrophiler, was zusammen mit der IL-8 induzierten Gestaltänderung der Zellen die Adhärenz Neutrophiler am Endothel und an der extrazellulären Matrix erhöht.

Zusätzlich aktiviert IL-8 die NADPH-Oxidase Neutrophiler (Superoxid- und H₂O₂-Produzent) und ist bei der Initiation bzw. Verstärkung ihres Respiratory Burst's beteiligt [6, 44].

Interleukin-10

Interleukin-10, ein säurelabiles 18,5 kDa Polypeptid, wurde erstmals als Cytokine-Synthesis-Inhibitory-Factor (CSIF) beschrieben, da es als ein Produkt von T-Helferzellen des Subtyps 2 (T_H2) bei murinen T-Helferzellen des Subtyps 1 (T_H1) die Zytokinsynthese hemmt.

Humanes IL-10 wird von T-Helferzellen, zytotoxischen T-Zellen, Monozyten/Makrophagen, dendritischen Zellen sowie B-Lymphozyten sezerniert und ist ein Mediator mit hauptsächlich anti-inflammatorischen Funktionen [39, 49, 78, 108, 113]: Es ist ein potenter Inhibitor der

Synthese proinflammatorischer Zytokine (TNF, IL-1, IL-6, IL-8) durch Monozyten/ Makrophagen, Neutrophile, Eosinophile und Mastzellen und fördert gleichzeitig die Produktion des anti-inflammatorischen IL-1-Rezeptorantagonisten. Außerdem ist IL-10 ein Inhibitor vieler Monozyten- bzw. Makrophagen- (abhängiger)-Funktionen: Die Sauerstoffradikalsekretion und die NO-abhängige mikrobizide Aktivität der Zellen werden unterdrückt, ihre Funktion als Antigen-Präsentierende-Zelle (APC) wird u.a. durch Herunterregeln der Oberflächenexpression vom Major-Histocompatibility-Complex-II (MHC-II) und kostimulatorischer Moleküle (ICAM-1 oder B7) supprimiert. Letzteres ist zusammen mit der durch dieses Interleukin ausgelösten Reduktion der Zytokinsekretion der Grund für die Inhibition der monozyten-/makrophagenabhängigen T-Zellproliferation und NK-Aktivierung.

Bezüglich der T-Lymphozyten sind neben diesen indirekten Effekten auch direkte supresorische auf die T-Helferzellproliferation durch IL-10 beschrieben.

2.3.2.2 Das Adhäsionsmolekül ICAM-1 (Inter-Cellular-Adhesion-Molecule-1)

ICAM-1 ist ein induzierbares 90 kDa Zelloberflächenglykoprotein, welches die Leukozytenadhäsion am Endothel bei inflammatorischen Reaktionen vermittelt. Die ICAM-1-Expression auf Endothelzellen ist durch Zytokine (IL-1, TNF, $INF\gamma$) oder Endotoxin über einen Zeitraum von 24 Stunden progressiv stimulierbar.

Eine lösliche und biologisch aktive Form des Adhäsionsmoleküls, sICAM-1, die im Serum wahrscheinlich als Resultat einer proteolytischen Trennung von der Zelloberfläche nachgewiesen werden kann, wurde bestimmt. Dieses Vorgehen wird durch Boldt et al. untermauert, die die bei inflammatorischen Prozessen in den Blutkreislauf freigesetzten löslichen Adhäsionsmoleküle als potentielle Marker für Zellaktivierung, Endothelschaden und Ausmass des entzündlichen Geschehens einstufen [12].

2.3.2.3 Der Wachstumsfaktor TGF- β_1

TGF- β ist in aktiver Form ein 25 kDa Homodimer hauptsächlich thrombozytären Ursprungs. Da beim Menschen die Isoform 1 (TGF- β_1) überwiegt, wurde sie in dieser Studie bestimmt. Neben der Beeinflussung der Zellproliferation und der Förderung des Aufbaus extrazellulärer Matrix hat es mehrere immunmodulatorische Funktionen [21, 64]: Es dient im Gewebe als Chemoattraktant für Phagozyten und als autokriner Wachstumsfaktor für Monozyten/Makrophagen, jedoch vermag intravasal vorkommendes TGF- β_1 die Migration von Phagozyten durch die Reduktion endothelialer Adhäsionsmoleküle zu hemmen.

Bei Makrophagen, Kardiomyozyten und glatten Muskelzellen kann es die NO-Produktion reduzieren.

Als IL-2 Antagonist hat es einen antiproliferativen Einfluss auf das T-Zellwachstum und supprimiert die IL-1 abhängige Lymphozytenproliferation.

Weiterhin wird durch TGF- β_1 die B-Zellproliferation und -differenzierung gehemmt sowie die Funktion von NK-Zellen blockiert.

2.3.2.4 Akute-Phase-Proteine: C-reaktives Protein und Procalcitonin

C-reaktives Protein (CRP): Das C-reaktive Protein (CRP) gehört als Routinelaborparameter in die Gruppe der frühen unspezifischen Entzündungsmarker. Es lässt sich über eine Präzipitationsreaktion mit einem nichttypenspezifischen Zellwandbestandteil von Pneumokokken nachweisen. CRP liegt normalerweise nur in Spuren ($<5 \mu\text{g/ml}$) im Serum vor, es kann jedoch bei bestimmten Krankheitssituationen auf ein Vielfaches ansteigen. Zu diesen Situationen zählen infektiöse sowie nichtinfektiöse Entzündungen und nekrotisierende Prozesse (z.B. nach Traumen, Operationen, Malignomen). Innerhalb der ersten 24 Stunden einer Entzündungsreaktion steigt das CRP schnell an und sinkt nach Abklingen der akuten Entzündung, wie für ein Akute-Phase-Protein üblich, auch rasch wieder auf Normwerte ab.

Procalcitonin (PCT): Das Vorläufer-Molekül des Calcitonin, Procalcitonin (PCT), ist ein 13 kDa Protein mit einer in vivo Halbwertszeit von ca. 25-30 Stunden. Es wird als ein Marker angesehen der längerfristiger als Zytokine sowie spezifischer und früher als CRP das Entzündungsgeschehen charakterisiert [11, 124]. Gemäß histochemischen Untersuchungen werden unter entzündlichen Bedingungen neuroendokrine Zellen der Lunge als Quelle von Procalcitonin vermutet [7, 114]. Andere Autoren vermuten Leukozyten als mögliche Quelle [30]. Als ein Hauptstimulus für die Induktion von PCT wird Endotoxin angesehen. 2-4 Stunden nach Induktion folgt ein Konzentrationsanstieg des Prohormons, der nach 8-24 Stunden sein Maximum erreicht [74].

PCT gilt insbesondere als früher Indikator schwerer bakterieller (aber auch parasitärer und fungaler) Infektionen, wobei die Plasma-PCT-Spiegel mit der Schwere der Infektion korrelieren sollen. Virale Infektionen, chronische Entzündungsprozesse, Autoimmunerkrankungen oder Nekrosen haben keinen signifikanten Einfluss auf die PCT-Freisetzung [11, 97, 109]. Folgende Referenzwerte werden bei der Nutzung von PCT als Entzündungsmarker angegeben [5, 32, 73]: Gesunde $< 0,5 \text{ ng/ml}$, Patienten mit moderater lokale bakterieller Infektion $0,5-2 \text{ ng/ml}$, Patienten mit SIRS nach Polytrauma oder Verbrennungen $5-20 \text{ ng/ml}$, Patienten mit schwerer bakterieller Infektion/Sepsis/MOF $10-1000 \text{ ng/ml}$.

2.3.2.5 Lymphozytensubpopulationen

T-Lymphozyten (CD 3+)

Diese Zellpopulation macht ca. 60-80 % der rezirkulierenden Lymphozyten aus. Sie lässt sich wie folgt weiter differenzieren:

a) T-Helferzellen (CD3+/CD4+)

Sie unterstützen nach Aktivierung andere Immunzellen bei ihrer Funktion. Wesentliche Vorgänge in diesem Zusammenhang sind in Abb. 4 schematisch illustriert.

T-Helferzellen machen ca. 45 ± 10 % der Lymphozyten des peripheren Blutes aus.

b) Zytotoxische-T-Lymphozyten (CD3+/CD8+)

Diese Zellen spielen bei der Abwehr virusinfizierter Zellen und Tumorzellen eine bedeutende Rolle, indem sie diese nach MHC-I/T-Zellrezeptor-vermittelter Erkennung mittels Perforinen lysieren können. Außerdem übernehmen diese Zellen Aufgaben, die man früher den „Suppressorzellen“ zuschrieb, einer Lymphozytenpopulation, die sich als nicht vorhanden herausgestellt hat. Deswegen werden diese Lymphozyten, obwohl eine supprimierende Wirkung nicht für jede dieser Zellen experimentell nachweisbar ist, im klinischen Gebrauch zytotoxische-Suppressor-T-Zellen genannt. Sie machen im Normalfall 28 ± 8 % der peripheren Lymphozyten aus.

Mittels weiterer Oberflächenmarker (HLA-DR, CD 69) kann zudem auf das Aktivierungsniveau der verschiedenen T-Lymphozyten geschlossen werden (s. Kap. 2.5.2).

B-Lymphozyten (CD 19+)

Diese Zellen spielen nach ihrer Differenzierung eine entscheidende Rolle als Antikörperproduzent. Antigenneutralisation, Opsonisation, Zell-Lyse via Komplement oder antikörperabhängiger-zellulärer-Zytotoxizität (ADCC), etc. werden möglich. B-Lymphozyten machen ca. 10-15% der rezirkulierenden Lymphozyten aus.

NK-Zellen (CD16+/CD56+)

Diese Zellen gehören zu den sog. Null-Zellen. Sie machen ca. 5% der rezirkulierenden Lymphozyten aus und gehören in die Gruppe der nicht durch MHC-restringierten Killerzellen. Sie werden durch die funktionelle Eigenschaft definiert, dass sie in-vitro ohne vorherige Stimulierung oder Immunisierung bestimmte Tumorzellen lysieren. Die NK-Zellen erkennen ihre Zielzellen wahrscheinlich über einen lectinähnlichen Rezeptor. Bei der Zytolyse verwenden

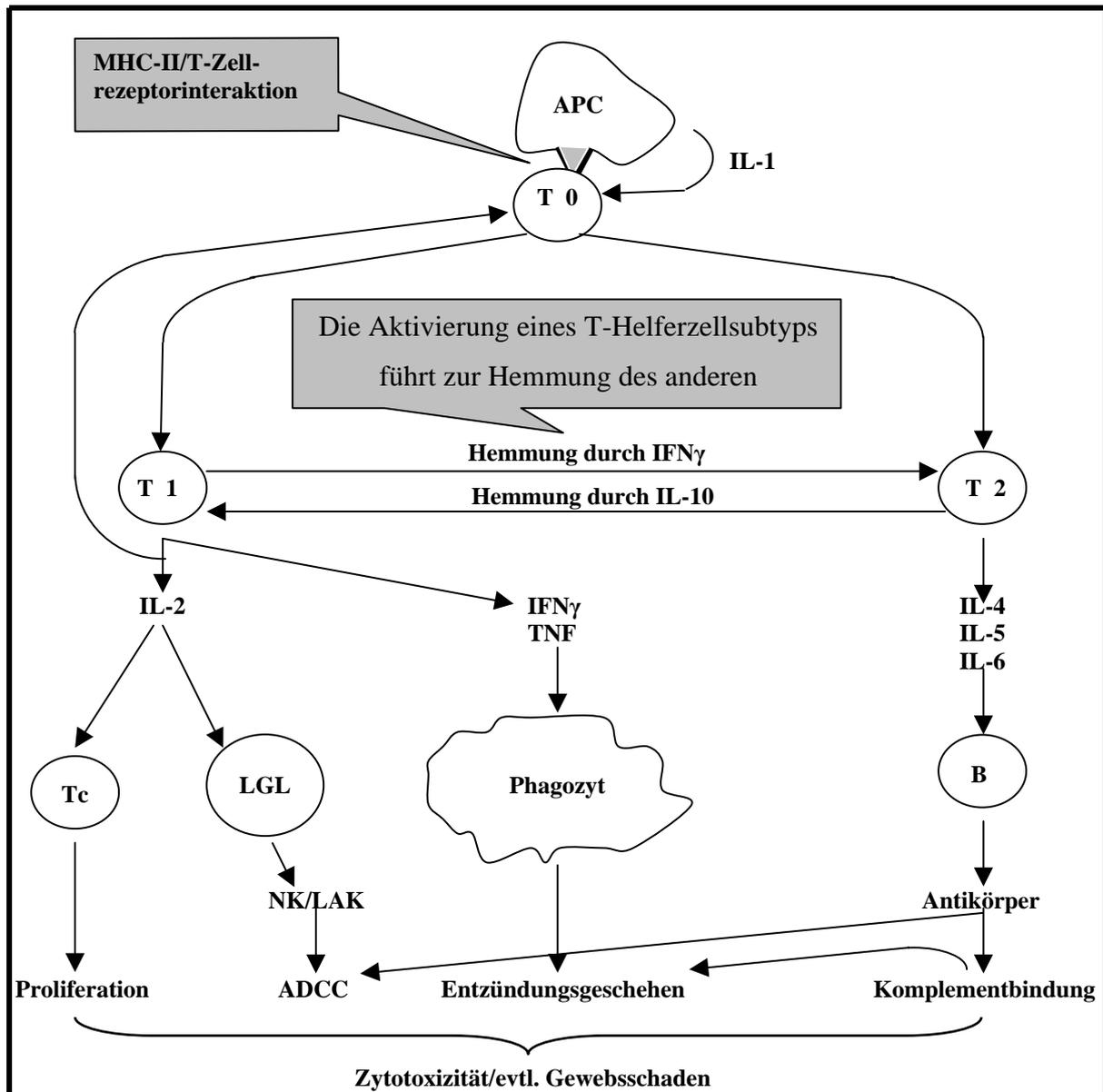


Abb.4: Lymphozyten als wesentliche Station bei Effektormechanismen: Nach MHC II/T-Zellrezeptorvermittelter Aktivierung ruhender T-Helferzellen (T_H0) durch antigenpräsentierende Zellen (APC) werden von ihnen Interleukine (IL) sekretiert und somit die eigene Proliferation sowie je nach Subtyp (T_H1 oder T_H2) die zytotoxische Immunantwort (Proliferation zytotoxischer T-Zellen (T_c), Differenzierung der Large-Granular-Lymphocytes (LGL) in natürliche Killerzellen (NK) und Lymphokin-Aktivierte-Killerzellen (LAK), Aktivierung von Phagozyten) oder die Differenzierung von B-Lymphocyten (B) zu antikörperproduzierenden Plasmazellen unterstützt.

sie vermutlich dieselbe zytolytische Maschinerie wie die zytotoxischen T-Zellen. Bei ihrer Proliferation wirken mehrere Zytokine, wie z.B. IL-2, mit (s. Abb. 4). Den NK-Zellen wird als biologische Wirkung die Modulation der Hämatopoese, eine Rolle bei der Graft-versus-host-Reaktion sowie eine Beteiligung an der Infektions- und Tumorabwehr zugesprochen. Dennoch herrscht bezüglich ihrer biologischen Bedeutung noch keine Einigkeit.

2.4 Immunoassays

2.4.1 ELISA (Enzyme-Linked-Imunosorbent-Assay)

In der vorliegenden Studie wurden ausschließlich nichtkompetitive ELISA´s gemäß der Anleitung des jeweiligen Herstellers verwendet. Die zugrundeliegende Technik war die „Two-Site-“ oder „Sandwich-Technik“: Ein auf der sog. festen Phase (Mikrotiterplatte) immobilisierter im Überschuss vorliegender spezifischer Antikörper wird zunächst mit der Standard- und den Kontrolllösungen oder dem zu testenden Antigen inkubiert. Vor einem Waschgang wird der immobilisierte Antikörper-Antigenkomplex noch mit einem Überschuss von enzymmarkierten Antikörpern, die an eine oder mehrere der verbleibenden Epitope des Analyten binden, inkubiert. Ein Substrat wird hinzugegeben. Die Enzym-Produkt-Konzentration ist nun direkt mit der Konzentration des Analyten proportional.

2.4.1.1 In der Studie genutzte ELISA-KITs

Zur Bestimmung der Interleukine IL-2, IL-6, IL-8, IL-10 wurden die entsprechenden Kits der Firma *BioSource Europe S.A., Fleurus (Belgien)* verwendet. Der Wachstumsfaktor *TGF-β1* sowie das Adhäsionsmolekül humanes *sICAM-1* wurden mit ELISA-Kits der Firma *R&D Systems, Minneapolis (USA)* gemessen.

2.4.2 Chemolumineszenz

Die Lumineszenzspektrometrie nutzt die Eigenschaft bestimmter Moleküle, Licht auszusenden, wenn diese nach Energiezufuhr vom angeregten Zustand in den Grundzustand zurückkehren. Eine Energiezufuhr zu einem solchen Molekül resultiert also in einem bestimmten messbaren Lichtquant. Bei der Chemolumineszenz erfolgt diese Energiezufuhr über eine chemische Reaktion.

In der vorliegenden Studie wurde mit dem immunoluminometrischen Assay „LUMItest® PCT“ von *Brahms Diagnostica (Berlin)* die Plasmakonzentration von Procalcitonin gemessen. Es handelt sich hierbei um einen heterogenen nichtkompetitiven Assay des Sandwich-Prinzips, bei dem beschichtete Röhrchen als feste Phase fungierten (sog. coated tube system). Der an der festen Phase immobilisierte monoklonale Antikörper bindet spezifisch an eine Unter-einheit des Procalcitonins, dem Katalacin. Der lumineszenzmarkierte monoklonale Antikörper bindet an ein anderes Epitop des Procalcitonins im Bereich der Calcitoninsequenz. Das Lumino-gen ist ein Acridinderivat, welches mittels H_2O_2 oxidiert wird. Dabei entsteht ein Acridon und ein Lichtquant, das vom Luminometer erfasst wird: Die Anzahl der bei der Durchführung

dieses Assays erfassten Lichtquanten korreliert mit den lumineszenzmarkierten Antikörpern, welche als Antigen-Antikörper-komplexe wiederum proportional zur Konzentration des Antigens (hier Procalcitonin) sind. Die exakten Procalcitoninkonzentrationen wurden durch die Luminometer-Rechner-Kombination anhand einer zuvor erstellten Standard- bzw. Masterkurve ermittelt und dokumentiert.

2.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflußzytometrie ist ein automatisiertes Verfahren zur Zelldifferenzierung anhand der physikalischen Eigenschaften wie z.B. Ladung, Lichtstreuung, Fluoreszenz von Zellen selbst oder von artifiziell gesetzten Oberflächenmarkern auf Zellen bzw. Zellbestandteilen.

2.5.1 Probenzuführung und Analyse

Die zu untersuchende Zellsuspension wird durch Überdruck aus dem Proberöhrchen über eine Stahlkapillare in die aus Quarzglas bestehende Messküvette befördert. Koaxial zu diesem Strom wird ein sogenannter zellfreier Hüllstrom (Sheath-Stream) dazu verwendet, den Probenstrom im Zentrum der Messküvette zu stabilisieren und derart zu verengen, dass die Zellen der Suspension einzeln in Reihe den Analysepunkt passieren. Man spricht von hydrodynamischer Fokussierung [81] (s. Abb. 5).

Im Analysepunkt kreuzt ein Laserstrahl den Flüssigkeitsstrom. Dieser erfasst, analysiert und klassifiziert wie folgt die vorbeifließenden Zellen :

a) Messung der Lichtstreuung

Der auf die jeweilige Zelle auftreffende Laserstrahl erzeugt als elektromagnetische Welle durch die Interaktion mit der Materie (Ladungen der Atomkerne) Streulicht.

Mullaney et al. zeigten, dass die Intensität des in einem kleinen Winkel ($0,5-2^\circ$) zum einfallenden Laserstrahl gestreuten Lichts proportional zum beleuchteten Partikelvolumen ist [79].

Diese als Vorwärtstreulicht (Forward Scatter) bezeichnete Lichtstreuung wird als Maß für die Zellgröße verwendet. Das in einem Winkel um 90° gestreute Licht wird als Seitwärtstreulicht bezeichnet (Side Scatter) und für das Maß an Granularität der jeweiligen Zelle herangezogen [66, 91, 103]. Das stärkere Vorwärtstreulicht wird von Photodioden, das schwächere Seitwärtstreulicht von signalverstärkenden Photoröhren (Photomultipliertube) quantifiziert.

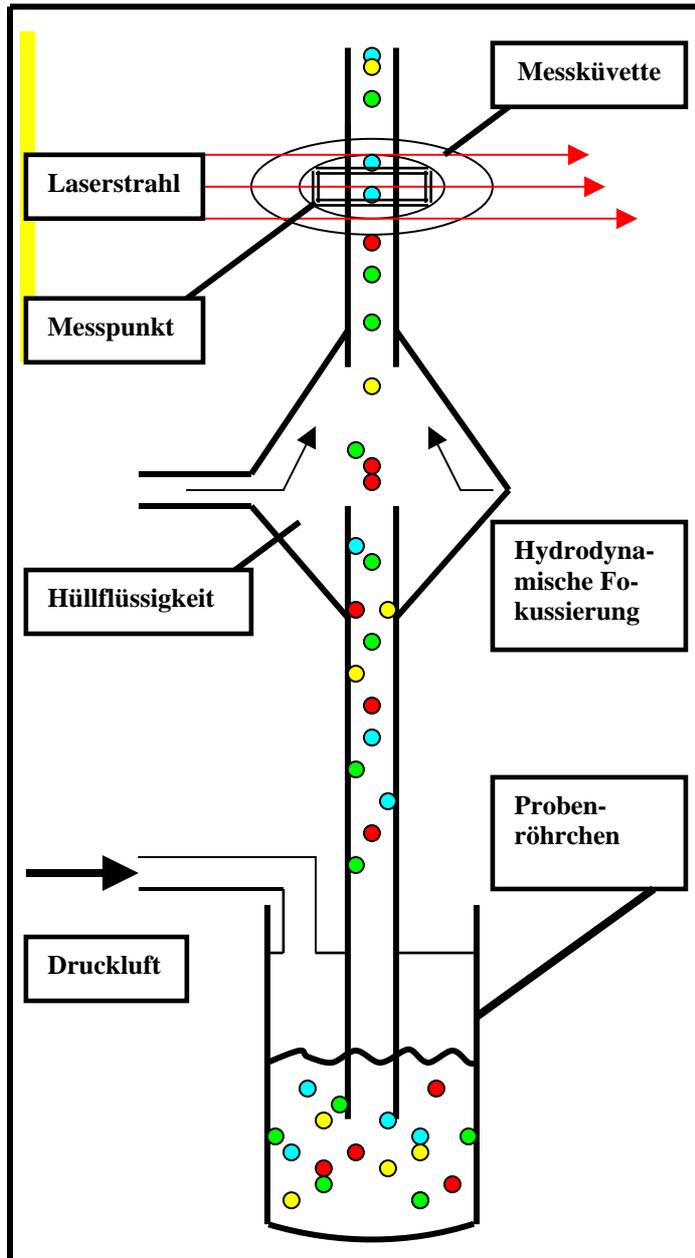


Abb. 5: Schema zur Durchflusszytometrie.

b) Messung der Fluoreszenz

Unter Fluoreszenz versteht man nach physikalischer Definition die Eigenschaft verschiedener Stoffe, während der Dauer der Belichtung ohne merkliche Trägheit selbst zu leuchten. Als primäre Fluoreszenz wird die Autofluoreszenz beschrieben, während die sekundäre eine durch sog. Fluorochrome erzeugte künstliche Fluoreszenz darstellt. Nach der Regel von Stokes besitzt das von der „fluoreszierenden Substanz emittierte Licht eine größere Wellenlänge als das von ihr absorbierte“ [120], denn Fluoreszenz ist das Ergebnis einer Anregung von Hüllelektronen durch Strahlzufuhr. Diese erhalten somit ein höheres Energieniveau. Kehren sie zu ihrem ursprünglichen Energieniveau zurück, werden Lichtquanten frei, die als charakteristisches Fluoreszenzspektrum emittiert werden.

Coons et al. schufen durch die Einführung der Immunfluoreszenz eine Grundlage für die Durchflusszytometrie von heute [26]: Spezifische antigene Epitope der zu untersuchenden Zellen werden dabei mit monoklonalen Antikörpern markiert, welche mit Fluorochromen gekoppelt sind. Für den Einsatz im Zytometer suchte man Fluorochrome, deren Absorbtionsspektren überlappend sind, aber deren Emissionsspektren charakteristisch unterschieden werden können. Im Fall des in dieser Studie genutzten Gerätes wird ein ARGON-Laser (Licht von 488 nm Wellenlänge) zur Fluoreszenzanregung genutzt. Als Fluorochrome dienen FITC (Fluoreszeinisothiocyanat) und PE (Phycoerythrin), ein Proteinmolekül, das zahlreiche Fluorochrome in seiner Struktur enthält, deren Absorbtionsspektrum mit dem des FITC u.a. bei Strahlung von 488 nm Wellenlänge überlappt. Die Gipfel der

Emissionsspektren dieser beiden Fluorochrome sind deutlich voneinander entfernt, so dass eine getrennte Messung der Fluoreszenz der beiden Farbstoffe möglich ist (s. Abb. 6). Dies geschieht dadurch, dass entsprechende Strahlenfilter die Wellenlänge der interessierenden Fluoreszenz (z.B. FITC) passieren lassen und die dazugehörige Photoröhre (Photomultiplier-tube) diese unter Kompensation der interferierenden Anteile des Spektrums der anderen Fluoreszenz (z.B. PE) quantifiziert [112].

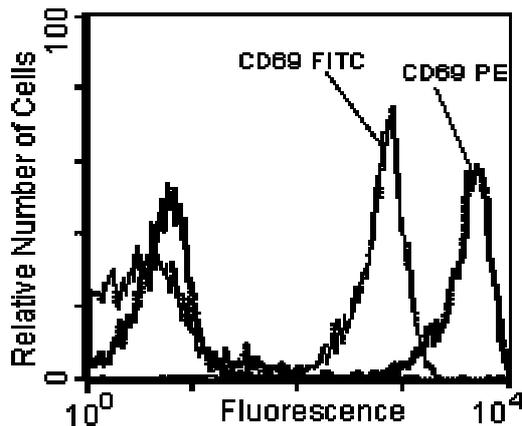


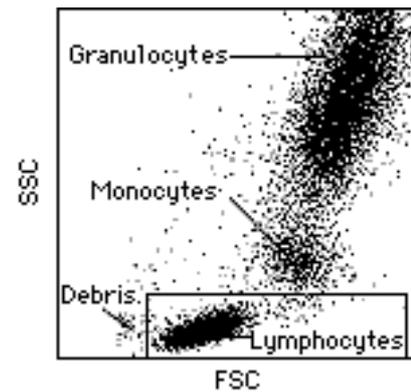
Abb.6: Floreszenzauswertung bei der Durchflusszytometrie: Man erkennt die deutlich voneinander entfernten FITC- und PE-Fluoreszenzspektren am Beispiel markierter CD69-Antikörper aus „Cytometry Source Book“, Fa. Becton Dickinson, San Jose, Cali-

b) Signalauswertung

Die so gewonnenen Informationen über die Lichtstreuung und die Antigenität der Zellen, die man, wie erklärt, fluoreszenzcodiert erhält, werden in der angeschlossenen Rechneinheit verarbeitet. Je nach seiner Konzeption kann ein Durchflusszytometer verschiedene Eigenschaften (z.B. zwei Lichtstreuungen und drei Fluoreszenzen) an einer einzelnen Zelle simultan messen und abspeichern [91]. Das dabei verwendete Prinzip einer LIST-MODE-Datenaufnahme beruht darauf, dass alle erhaltenen Eigenschaften der jeweiligen Zelle in der Reihenfolge notiert werden, in der diese den Analysepunkt passieren. So werden die Daten in einer „Liste“ gespeichert. Dadurch erhält man die Möglichkeit, durch Setzen eines „Filters“ die Messung zu „wiederholen“. Man wählt innerhalb des untersuchten Bereichs anhand einer festzulegenden spezifischen Parameterkonstellation gewünschte Teilmengen des Untersuchungsgutes heraus. Dieses Filtern wird auch „Gating“ genannt [91]. Dadurch wird z.B. die Untersuchung von Lymphozyten innerhalb einer lysierten Vollblutprobe möglich und innerhalb dieses Lymphozytenfensters erlaubt das „Gating“ wiederum die Untersuchung einzelner Lymphozytensubpopulationen (Erläuterungen zum Gating s. Kap. 4.1.3, Seite 42). Die Ausgaben der Auswertungen erfolgen als sogenannte „Two-Dot-Plots“, bei denen die Zelleigenschaften gemäß der jeweiligen Achsenparameter als Punktwolke erscheinen. Abb. 7 zeigt ein Beispiel, bei dem die Probe nach ihren Streueigenschaften analysiert wurde.

Abb. 7: Gating bei der Durchflusszytometrie:

Die Streulichtauswertung der Zellsuspension einer lysierten Vollblutprobe lässt durch das Setzen der sogenannten Gates eine Zelldifferenzierung zu. Als Beispiel ist das Gate um die Lymphozyten dargestellt. SSC=Seitwärts-streulicht, FSC=Vorwärtsstreulicht. Aus „Cytometry Source Book“, Fa. Becton Dickinson, San Jose, Californien (USA)



2.5.2 Die zur Lymphozytendifferenzierung genutzten Antikörper

Bei der weiteren Differenzierung von Lymphozyten nutzt man wie bereits erwähnt neben der zelleigenen Physik den Nachweis spezifischer antigener Determinanten auf der Zelloberfläche der jeweiligen Lymphozyten für deren Typisierung (nach der CD-Klassifikation). In der vorliegenden Studie wurden Antikörperkits der Fa. Becton Dickinson, San Jose, Californien (USA) genutzt, um diese spezifischen Epitope zu markieren. Es handelt sich hierbei um fluoreszenzgekoppelte monoklonale Antikörper der Maus, die durch Fusion von murinen Myelom- oder Lymphknotenzellen mit Milzzellen von entsprechend immunisierten (BALB/C-) Mäusen gewonnen werden. Das jeweilige Antigen wird bei der Zelldifferenzierung im Zytometer anhand des Fluoreszenzspektrums seines spezifischen fluoreszenzgekoppelten Antikörpers identifiziert. Folgende Antikörper kamen zur Anwendung:

(1) Anti-Leu-4

Der Anti-Leu-4-Antikörper reagiert mit der ϵ -Kette des CD3-Antigen-/T-Zellantigenrezeptor-Komplexes. Dieser Komplex kommt transmembranös auf allen peripheren T-Zellen, auf unreifen Thymozyten sowie im Zytoplasma von NK-Zellen vor [8, 102].

Folglich kann man mit Anti-Leu-4 im peripheren Blut spezifisch T-Lymphozyten markieren .

(2) Anti-HLA-DR

Der genutzte Anti-HLA-DR-Antikörper reagiert mit einem nichtpolymorphen HLA-DR-Epitop [16, 93]. Das HLA-DR-Antigen gehört zu den MHC-Klasse II-Molekülen, die sich in großer Menge auf B-Lymphozyten, stimulierten T-Lymphozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen, Kupffer-Sternzellen und den Langerhans-Zellen der Haut sowie auf manchen Endothelzellen finden.

Auf reifen T-Zellen gilt das HLA-DR-Antigen als Aktivierungsmarker und wird etwa 72 Stunden nach entsprechender Stimulation auf der Zelloberfläche exprimiert [61, 66].

CD3 und HLA-DR positive Zellen konnten somit als aktivierte T-Lymphozyten identifiziert werden. Diese Kombination findet sich in der Regel bei 11 ± 4 % der Lymphozyten im peripheren Blut.

(3) Anti-Leu-3a

Das CD4-Molekül wird vom Anti-Leu-3a-Antikörper erkannt. Es ist ein hauptsächlich auf T-Lymphozyten, die MHC-Klasse-II-assoziierte Antigene erkennen, transmembranös lokalisiertes Glycoprotein. CD4-positiv (CD4+) sind neben T-Lymphozyten noch Thymozyten und im geringeren Maße Monozyten bzw. Gewebsmakrophagen [87].

Ist bei der Durchflusszytometrie das Lymphozytengate etabliert, markiert das CD4-Epitop zuverlässig die T-Helfer-Lymphozyten.

(4) Anti-Leu-2a

Im peripheren Blut ist das transmembranöse Glycoprotein CD8 der Oberflächenmarker von zytotoxischen T-Lymphozyten, die spezifisch für Antigene sind, welche von MHC-I-Proteinen präsentiert werden. Es kann mit dem Anti-Leu-2a-Antikörper markiert werden.

CD8 findet sich außerdem auch auf Thymozyten und auf einer Untergruppe von NK-Zellen.

(5) Anti-Leu-23

Der Anti-Leu-23-Antikörper markiert spezifisch das CD69-Antigen. Dies wird auf einer großen Anzahl von Blutzellen exprimiert (aktivierte T-Zellen, unreife Thymozyten, B-Zellen, NK-Zellen, neutrophile Granulozyten, eosinophile Granulozyten, Monozyten und Blutplättchen [119]) und ist eines der frühesten Zelloberflächenantigene der lymphoiden Aktivierung: Die CD69-Expression erreicht bei aktivierten Lymphozyten ihren Höhepunkt nach 18 Stunden, also vor dem Erscheinen von HLA-DR, vom Interleukin-2-Rezeptor (CD25-Antigen) und vom Transferrin-Rezeptor (CD71-Antigen) [24, 117, 118].

Innerhalb des Lymphozytenfensters bei der Durchflusszytometrie lassen sich somit CD4- und CD69-positive (CD4/69+) frühaktivierte T-Helferzellen bzw. CD8- und CD69-positive (CD8/69+) frühaktivierte zytotoxische T-Lymphozyten identifizieren. Im Normalfall liegt der Anteil CD69 positiver Lymphozyten unter 10 %.

(6) Anti-Leu-11c/Anti-Leu-19

CD16 (Fc γ RIII) ist der durch den *Anti-Leu-11c* erkennbare niedrig affine Rezeptor für IgG. Er wird auf der Mehrzahl von NK-Zellen, auf neutrophilen Granulozyten und Makrophagen exprimiert und ist bei der antikörperabhängigen zellulären Zytotoxizität beteiligt.

Das CD56-Antigen ist ein membrangebundenes Glycoprotein der Immunglobulin-Superfamilie, welches mit dem *Anti-Leu-19*-Antikörper identifiziert wird und im peripheren Blut auf NK-Zellen zu finden ist [27].

Die Natürlichen Killerzellen wurden durch das simultane Vorkommen dieser beiden Epitope identifiziert.

(7) Anti-Leu-12

CD19 ist ein durch den *Anti-Leu-12*-Antikörper markierbares transmembranöses Glycoprotein der Immunglobulin-Superfamilie, welches nur auf normalen und neoplastischen B-Lymphozyten zu finden ist. Früh von B-Progenitorzellen im Knochenmark exprimiert bleibt es während allen Stadien der B-Zell-Reifung erhalten bis es bei der Differenzierung zu Plasmazellen verloren geht.

2.6 Statistische Methodik

In der vorliegenden Studie wurde mit einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ gearbeitet, Testentscheidungen mit p-Werten zwischen 0,05 und 0,01 wurden als *signifikant*, Werte kleiner als 0,01 als *hochsignifikant* bezeichnet.

Da bei den meisten Testverfahren vorausgesetzt wird, dass die Daten normalverteilt sind, wurde diese Voraussetzung mit dem von *Lilliefors modifizierten Kolmogorov-Smirnov-Test* geprüft. Für diese Arbeit ergab sich für sämtliche Daten, die im zeitlichen Verlauf gemessen wurden, in beiden Gruppen keine Verletzung der Annahme der Normalverteilung der Daten. Allerdings wurden für die anderen, einfach gemessenen, Parameter wie Alter, Größe, Gewicht die Normalverteilung nicht angenommen

Je nachdem, ob die Hypothese der Normalverteilung der Daten angenommen wurde oder nicht, wurden parametrische Tests oder nicht-parametrische (Rang-) Tests durchgeführt [18, 38, 42, 59, 68]. Die verwendeten Tests, ihre Anwendungsgebiete und die zugrundeliegenden Hypothesen zeigt die Tabelle 1.

Da Mehrfachmessungen an der gleichen experimentellen Einheit (Patient, Pflanze, Maschine, etc.) dazu tendieren, einander korreliert zu sein, wurde diesem Sachverhalt beim Vergleich der SIRS- mit der Kontrollgruppe mit multivarianten Methoden Rechnung getragen. Können

die Messungen, wie in dieser Studie, als Stufe eines experimentellen Faktors wie „Zeit“, „Behandlung“ oder „Dosis“ aufgefasst werden, so wird die bestehende Korrelation mit der Durchführung einer Varianzanalyse mit Messwiederholungen berücksichtigt.

Tab. 1: Statistische Tests der Studie, deren Anwendungsgebiet und Arbeitshypothese

Test	Anwendung	Hypothese
t-Test für unabhängige Stichproben	Gruppenvergleiche (zwei Gruppen) bei normalverteilten Daten	Gleichheit der Mittelwerte in den Gruppen
Mann-Whitney-Test	Gruppenvergleiche (zwei Gruppen) bei nicht normalverteilten Daten	Gleichheit der Mediane in den Gruppen
Messwiederholungsanalyse (multivariante Varianzanalyse)	Vergleich von mehreren abhängigen Variablen (z.B. Messungen in der Zeit) bei normalverteilten Daten	Gleichheit der Mittelwerte der abhängigen Variablen (keine Veränderung im Zeitverlauf)

In der bei der vorliegenden Studie durchgeführten Messwiederholungsanalyse sollten die folgenden Fragen geklärt werden:

- (1) Sind die Daten an den Messzeitpunkten im zeitlichen Verlauf konstant?
- (2) Unterscheiden sich die beobachteten Daten zwischen den betrachteten Gruppen im zeitlichen Verlauf ?
- (3) Unterscheiden sich die beobachteten Daten zwischen den betrachteten Gruppen im zeitlichen Durchschnitt ?

Um die Einflüsse der Gruppenzugehörigkeit auf den zeitlichen Durchschnitt (Frage 3) der untersuchten Parameter zu analysieren, wurde eine einfaktorische Varianzanalyse durchgeführt.

Weiterhin sollte geprüft werden, wie sich die Werte der zu analysierenden Parameter im zeitlichen Verlauf (Frage 1 und 2) verändern. Dafür könnte sowohl ein univarianter als auch ein multivarianter Ansatz verwendet werden [55]. Welches der beiden Verfahren in dieser Studie zur Analyse herangezogen wurde, basiert auf einer Empfehlung von Maxwell und Delaney [72]: Demnach wird der univariante Ansatz bei einer Stichprobenanzahl von $n < k + 10$ (k = Anzahl der Messwiederholungsstufen) als trennschärfer angesehen. Also wurde das univariante Verfahren in dieser Studie angewendet. Dazu wurden im Hinblick auf die eben gemachten Bemerkungen die notwendigen Voraussetzungen zur Anwendung des univarianten

Verfahrens überprüft. Zunächst ist es notwendig, die Spherizität zu prüfen. Diesem Zweck dient der Test von Mauchly. War die Voraussetzung der Spherizität nicht gewährleistet, wurde alternativ eine modifizierte Form des univariaten Ansatzes verwendet, die auf der Multiplikation der Zähler und Nennerfreiheitsgrade mit Korrekturfaktoren (Epsilon) basiert. Dabei tendiert das Greenhouse-Geisser-Epsilon das „wahre“ ϵ zu „unterschätzen“ (konservativ), und das Huynh-Feldt-Epsilon das ϵ zu „überschätzen“ [72]. Für den Fall, dass die Voraussetzung der Spherizität nicht erfüllt war, wurde die Greenhouse-Geisser-Korrektur verwandt. Sind wie in dieser Studie mehrere Gruppen involviert, kommt eine weitere Voraussetzung zur Durchführung des univariaten Verfahrens hinzu. Diese verlangt die Gleichheit aller Varianz-Kovarianz-Matrizen der Gruppen. Diese Voraussetzung wurde mit dem Box-M Test überprüft. Handelt es sich um balancierte Daten, ist die Verletzung gleicher Varianz-Kovarianz-Matrizen nicht schwerwiegend, d.h. die verwendete univariate Teststatistik ist robust [111].

Bei der Interpretation muss zwischen einer horizontalen [Veränderungen der Messwerte im Zeitverlauf, Frage (1)], einer vertikalen [Unterschiede der Daten der Gruppen im zeitlichen Durchschnitt, Frage (3)] und einer gemischten Betrachtung [Profilanalyse bzw. Unterschiede im zeitlichen Verlauf der Messwerte der Gruppen, Frage (2)] unterschieden werden.

Die anschließend durchgeführten Einzelbetrachtungen an den einzelnen Messzeitpunkten und in den einzelnen Gruppen blenden Aspekte dieser Betrachtungen aus und können daher auch, auf den ersten Blick, zu widersprüchlichen Ergebnissen führen. Daher wurde bei der Analyse auf eine Einzelbetrachtung an den Zeitpunkten verzichtet, an denen bei der Fragestellung (3) keine signifikanten Unterschiede vorkamen. Die durchgeführten Einzelbetrachtungen zu den jeweiligen Messzeitpunkten wurden aufgrund der multiplen Vergleiche nach Bonferroni korrigiert, d.h. das Signifikanzniveau von 0,05 wurde in Abhängigkeit der Anzahl der Messwiederholungen verschärft ($p < 0.0125$).

Zur Untersuchung über die Stärke des (linearen) Zusammenhangs bzw. von Je-Desto-Hypothesen zwischen zwei oder mehr Variablen dient die Korrelationsanalyse, deren Kennzeichnungsmaßzahl der "Korrelationskoeffizient" (r) für gleichskalierte metrische oder ordinale Variablen ist. Bei den in der Arbeit zu untersuchenden Variablen, die metrisch skaliert und nicht normalverteilt sind, wurde der (Rang-) Korrelationskoeffizient nach SPEARMAN bestimmt. Ähnlich dem bekannteren Pearson'schen Korrelationskoeffizienten handelt es sich hierbei um eine standardisierte dimensionslose Größe, die Werte zwischen -1 und +1

annehmen kann, wobei die Werte ± 1 einen perfekten linearen Zusammenhang anzeigen. Haben jedoch die Werte zweier Variablen einen solchen Zusammenhang nicht, zeigt sich dies an einem Koeffizienten nahe bei Null. Anders als der Pearson'sche Koeffizient misst der Korrelationskoeffizient nach Spearman nicht den linearen Zusammenhang, sondern den monotonen Zusammenhang zweier Variablen [je größer, desto größer (resp. niedriger)]. Bei der Korrelationsanalyse wurde die Hypothese getestet, dass der jeweilige Koeffizient gleich null ist. Korrelationskoeffizienten ab 0,7 wurden für einen Zusammenhang als bedeutend gewertet.

Der Test auf Unabhängigkeit bei den Kontingenztafeln mit ordinalen bzw. nominalen Zeilen- und Spaltenmerkmalen wurde in Anbetracht der in dieser Arbeit vorherrschenden kleinen Fallzahlen mit dem exakten Fisher-Test durchgeführt, der die statistische Hypothese, dass vollständige Unabhängigkeit herrscht, prüft. Wird diese Hypothese abgelehnt, so kann davon ausgegangen werden, dass die Spalten- und Zeilenverteilungen in der Tafel nicht gleich sind. Wird die Hypothese nicht abgelehnt, so kann von Unabhängigkeit der Merkmale ausgegangen werden.

3. Ergebnisse

3.1 Vergleich von Kontroll- und SIRS-Gruppe

3.1.1 Vergleich präoperativer und operativer Merkmalsausprägungen

3.1.1.1 Biometrische Daten

In einem ersten Schritt wurden die beiden Gruppen auf Unterschiede der biometrischen Daten untersucht, um ihre Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Die Patientengruppen wurden im Hinblick auf Alter, Körpergröße, Gewicht, linksventrikulärer-enddiastolischer-Druck (LVEDP), präoperative NYHA-Klassifikation und Vorliegen einer Hauptstammstenose, einer Hypertonie oder Fettstoffwechselstörung verglichen.

Bei den Variablen Alter, Größe, Gewicht und LVEDP wurde unter der Annahme nicht normalverteilter Daten auf einen Gruppenunterschied mit dem Mann-Whitney-Test geprüft (Tab.: 2).

Tab. 2: Vergleich der biometrischen Daten von SIRS- und Kontrollgruppe

Parameter	SIRS-Gruppe (N=10)		Kontrollgruppe (N=15)		Signifikanzniveau¹⁾
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD	
Alter (Jahre)	67,30	7,60	65,67	9,13	0,85
Größe (cm)	175,70	5,44	170,13	5,58	p < 0,05
Gewicht (kg)	83,90	6,94	79,20	7,96	0,12
LVEDP (mm Hg)²⁾	13,50	3,87	16,67	8,04	0,53

¹⁾ Exakte Signifikanz Mann-Whitney

²⁾ praeoperativer Wert

Bei den Variablen NYHA-Klassifikation (NYHA I-IV), Hauptstammstenose (ja/nein), Hypertonie (ja/nein) und Fettstoffwechselstörung (ja/nein) wurde der exakte Fisher-Test für 2x2-Kontingenztafeln auf gleiche Zeilen/Spaltenverteilungen durchgeführt.

Es zeigten sich bis auf den Parameter Körpergröße keine Unterschiede zwischen den beiden Patientengruppen. Dieser Parameter ist für den zu untersuchenden Sachverhalt als nicht wesentliche Einflussgröße zu betrachten. Daher wurde von einer vergleichbaren Gruppenkonstellation ausgegangen.

3.1.1.2 Operationsdaten

Als nächstes wurden die Gruppen bzgl. der Einflußgröße „Operation“ verglichen. Da die Studienpatienten bei vergleichbarem Grundleiden (Revaskularisationsbedarf) einem standardisierten Eingriff (Aortokoronare Bypassoperation unter extrakorporaler Zirkulation) unterzogen wurden, galt es in diesem Zusammenhang, im Hinblick auf die Operationszeiten (gesamte Operationsdauer (OP-Zeit), die Dauer der extrakorporalen Zirkulation (EKZ-Zeit), die Ischämiezeit) und die Anzahl der im Rahmen der Operation geschaffenen Anastomosen zu vergleichen. Unter der Annahme nicht normalverteilter Daten wurde hierfür der Mann-Whitney-Test angewendet (s.: Tab. 3):

Tab. 3: Vergleich der Operationsdaten von SIRS- und Kontrollgruppe

Parameter	SIRS-Gruppe (N=10)		Kontrollgruppe (N=15)		Signifikanzniveau ¹⁾
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD	
OP-Zeit (min)	309,10	64,27	213,33	39,04	p < 0,01
EKZ-Zeit (min)	150,60	48,72	106,73	20,13	p < 0,01
Ischämiezeit (min)	82,60	28,86	64,47	13,56	p < 0,05
Anastomosenanzahl	3,40	0,84	3,60	0,91	0,53

¹⁾ Exakte Signifikanz Mann-Whitney

Es fand sich bei der SIRS-Gruppe eine hochsignifikant längere Dauer der Operation (OP-Zeit) und der extrakorporalen Zirkulation (EKZ-Zeit) sowie eine signifikant längere Ischämiezeit.

3.1.2 Vergleich der postoperativen Parameter des Immunmonitorings

Da es sich bei den erfassten immunologischen bzw. Entzündungs-Parametern um eine Mehrfachmessung im Zeitverlauf handelte, wurde für den Vergleich der Daten eine Messwiederholungsstudie durchgeführt (s. Kap. 2.6/Tab. 4).

3.1.2.1 Betrachtung des Innersubjekteffekts

Die Betrachtung des Innersubjekteffekts im Hinblick auf das zeitliche Mittel der gepoolten Daten der Beobachtungsgruppen (Innersubjekteffekt/Zeit) liefert u.a. Hinweise auf die Kinetik der untersuchten Parameter. Es fanden sich hierbei im Verlauf signifikante Veränderungen der Parameter Temperatur (p<0,05), CRP (p<0,01), Interleukin-6 (p<0,01), sICAM-1 (p<0,01) und Procalcitonin (p<0,01). Bei den Lymphozyten änderte sich der Anteil an T-Zellen (CD3+/p<0,01), der T-Helfer- und T-Suppressorzellsubpopulationen (CD4+; p<0,05 bzw. CD8+; p<0,01), der frühaktivierten T-Helferzellen (CD4/CD69+; p<0,05) und der NK-Zellen (CD16/56+; p<0,01).

Die Auswertung im Hinblick auf die Parallelitätshypothese (Innersubjekteffekt/Zeit * Gruppe) vergleicht die Daten der beiden Beobachtungsgruppen (SIRS- und Kontrollgruppe) im Hinblick auf deren zeitlichen Verlauf. Hier finden sich Unterschiede der Verlaufsprofile beim Anteil der B-Lymphozyten ($p < 0,01$) und beim Entzündungsparameter Procalcitonin ($p < 0,05$). Im Umkehrschluss konnte die Hypothese eines parallelen Verlaufs der Profile der übrigen Parameter nicht abgelehnt werden (s. Graphik 1 und 2).

Tab. 4: Vergleich der postoperativen Daten des Immunmonitorings von SIRS- und Kontrollgruppe

Parameter	Innersubjekteffekt ¹⁾		Zwischensubjekteffekt ⁴⁾ Gruppen	Unterschiede der Parameter zu den Messzeitpunkten ⁵⁾
	Zeit ²⁾	Zeit*Gruppe ³⁾		
APACHE-Score	0,11	0,27	$p < 0,01$	alle 4
Temperatur	$p < 0,05$	0,15	$p < 0,01$	alle 4
Hämoglobin	0,08	0,32	0,23	-
Hämatokrit	0,06	0,29	0,93	-
Leukozytenzahl	0,21	0,56	$p < 0,05$	2, 3 und 4
C-reaktives Protein	$p < 0,01$	0,63	0,19	-
Creatinin	0,38	0,59	0,12	-
Interleukin-2	0,08 ⁶⁾	-	$p < 0,05$ ⁷⁾	2 und 3
Interleukin-6	$p < 0,01$	0,23	$p < 0,01$	2 und 3
Interleukin-8	0,15	0,16	$p < 0,01$	2, 3 und 4
Interleukin-10	0,17	0,23	0,09	-
ICAM-1	$p < 0,01$	0,07	$p < 0,01$	alle 4
TGF- β_1	0,47	0,29	$p < 0,05$	1 und 2
Procalcitonin	$p < 0,01$	$p < 0,05$	$p < 0,01$	alle 4
CD3+ Lymphozyten ⁸⁾	$p < 0,01$	0,32	$p < 0,05$	1 und 4
CD3/HLA-DR+ Lymphozyten ⁸⁾	0,42	0,12	0,19	-
CD4+ Lymphozyten ⁸⁾	$p < 0,05$	0,57	0,73	-
CD8+ Lymphozyten ⁸⁾	$p < 0,01$	0,43	$p < 0,01$	2, 3 und 4
CD4/CD69+ Lymphozyten ⁸⁾	$p < 0,05$	0,17	$p < 0,01$	3 und 4
CD8/CD69+ Lymphozyten ⁸⁾	0,77	0,55	0,35	-
CD16/CD56+ Lymphozyten ⁸⁾	$p < 0,01$	0,18	0,58	-
CD19+ Lymphozyten ⁸⁾	0,08	$p < 0,01$	$p < 0,01$	2, 3 und 4

¹⁾Univariate Verfahren, da geringer Stichprobenumfang. Falls Sphärität nicht gegeben, wurde Greenhouse-Geisser verwendet.

²⁾ H_0 : Die Messwiederholungsvariablen liefern im Mittel den gleichen Wert.

³⁾ H_0 : Zwischen den betrachteten Gruppen gibt es keine Unterschiede bzgl. des zeitlichen Verlaufs des Profils (Parallelitätshypothese).

⁴⁾ H_0 : Zwischen den betrachteten Gruppen gibt es keinen Unterschied bzgl. des zeitlichen Durchschnitts der Daten.

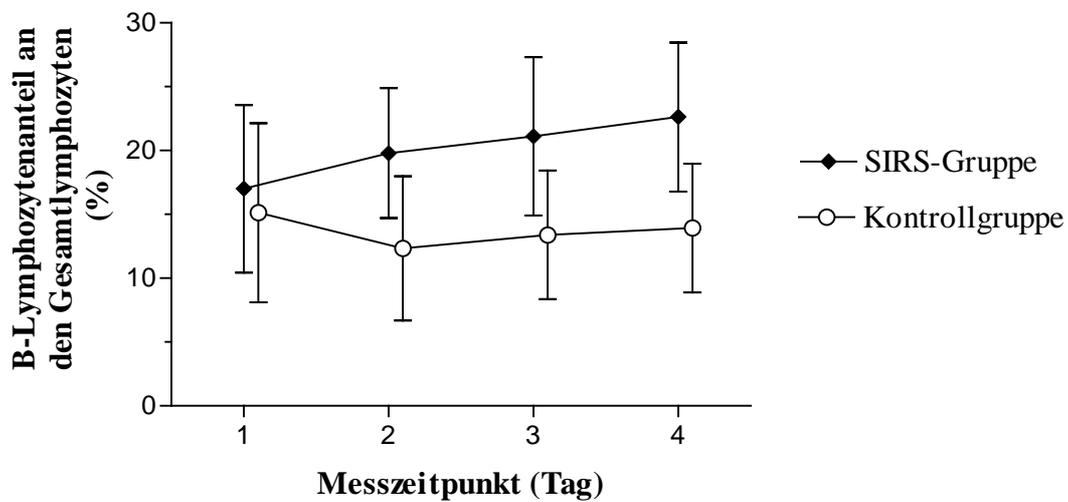
⁵⁾Messzeitpunkte, die Unterschiede der Parameterausprägung der beiden Gruppen (SIRS- und Kontrollgruppe) auf multiplem Signifikanzniveau ergeben ($p < 0,0125$). 1=1. postoperativer Tag, 2=2. postoperativer Tag, usw.

⁶⁾Nur Daten in der SIRS-Gruppe getestet.

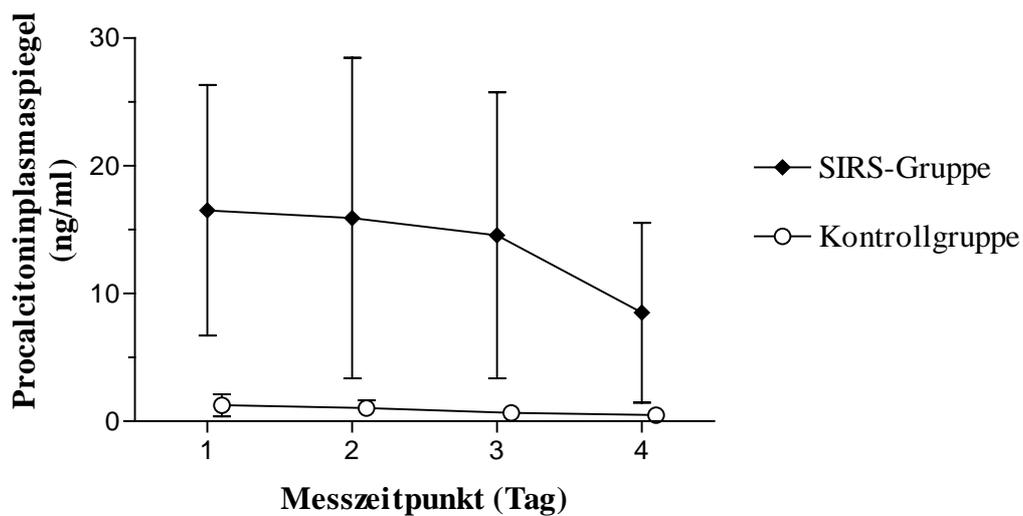
⁷⁾Nur Daten in der SIRS-Gruppe getestet, Test auf Unterschiede des Mittelwertes zum fixen Wert 0,1 IU/ml als untere Nachweisgrenze des angewendeten Nachweisverfahrens.

⁸⁾Bei den Lymphozytensubpopulationen wurde gemäß der Empfehlung von The National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) jeweils der Anteil der Zellen, welche den jeweiligen Marker tragen, an den Gesamtlmphozyten in Prozent angegeben und nicht die Anzahl aller Ereignisse im Gate als Grundmenge genutzt.

Graphik 1: Parameter B-Lymphozytenanteil nach Gruppen im Zeitverlauf



Graphik 2: Parameter Procalcitonin nach Gruppen im Zeitverlauf



3.1.2.2 Betrachtung des Zwischensubjekteffekts

Der Vergleich des zeitlichen Durchschnitts der Merkmalausprägungen der jeweiligen Gruppen (Zwischensubjekteffekt) zeigte Unterschiede bei den Messwerten für die Temperatur ($p < 0,01$), die Leukozytenzahl ($p < 0,01$), Interleukin-2 ($p > 0,05$), Interleukin-6 ($p < 0,01$), Interleukin-8 ($p < 0,01$), von *sICAM-1* ($p < 0,01$), *TGF β ₁* ($p < 0,05$) und Procalcitonin ($p < 0,01$). Bei den zellulären Markern ergaben sich Unterschiede bei den CD3+ ($p < 0,05$), CD4/49+ ($p < 0,01$), CD8+ ($p < 0,01$) und CD 19+ ($p < 0,01$) Lymphozyten.

3.1.2.3 Untersuchung auf Gruppenunterschiede zu den einzelnen Messzeitpunkten

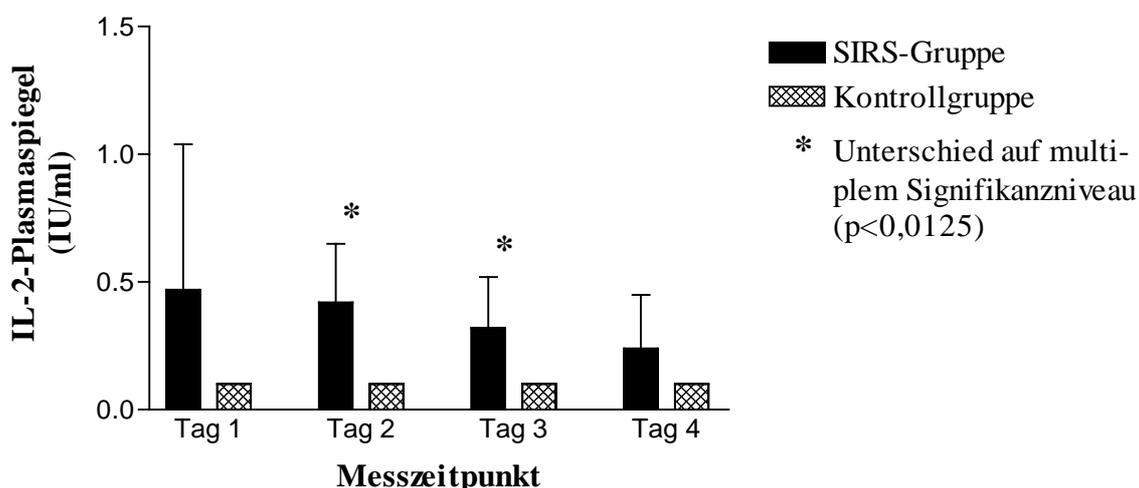
Die Parameter, deren Ausprägung beim Gruppenvergleich einen signifikanten Unterschied bzgl. des Zwischensubjekteffekts zeigten (Gruppenunterschied des zeitlichen Durchschnitts der Messwerte), wurden in einem weiteren Schritt einer Einzelbetrachtung unterzogen.

So konnten die Messzeitpunkte eruiert werden, an denen auf multipltem Signifikanzniveau ($p < 0,0125$) ein Unterschied zwischen den Daten der beiden Gruppen bestand. Die Merkmale Temperatur und Leukozytenanzahl wurden dabei nicht weiter ausgewertet, da sie als Parameter des APACHE-II-Scores zur Zuteilung der Patienten in die jeweiligen Beobachtungsgruppen beitrugen.

3.1.2.3.1 Interleukine und TGF- β_1

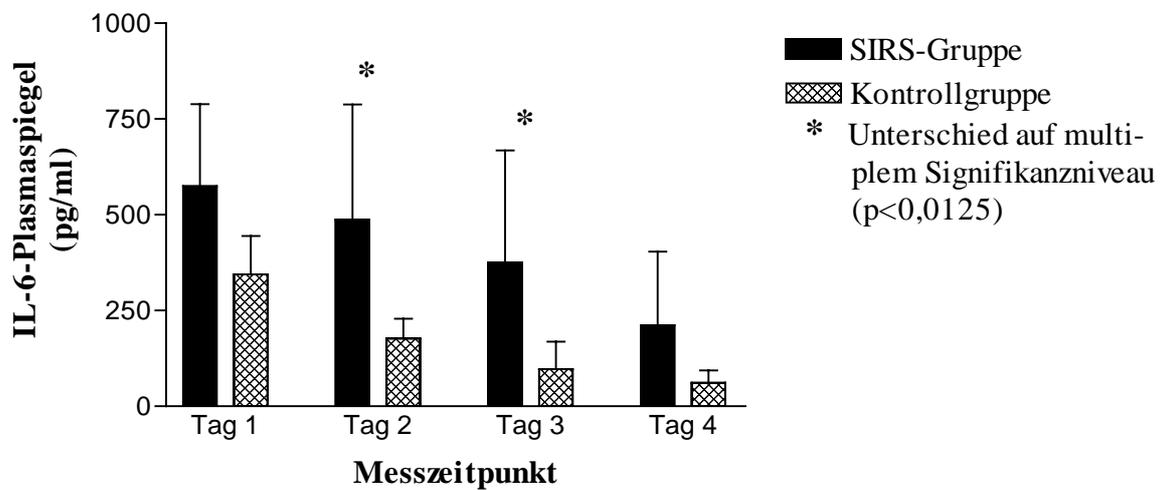
Für **Interleukin-2** wurde bei der Kontrollgruppe ein Plasmaspiegel von 0.1 IU/ml angenommen. Dieser Wert entsprach der unteren Nachweisgrenze des angewendeten Messverfahrens, mittels dessen für die Kontrollgruppe kein IL-2 nachweisbar war. Unter diesen Voraussetzungen zeigten sich in der SIRS-Gruppe am zweiten und dritten postoperativen Tag signifikant erhöhte Spiegel (s. Graphik 3).

Graphik 3: Vergleich der Interleukin-2-Konzentrationen zwischen SIRS- und Kontrollgruppe

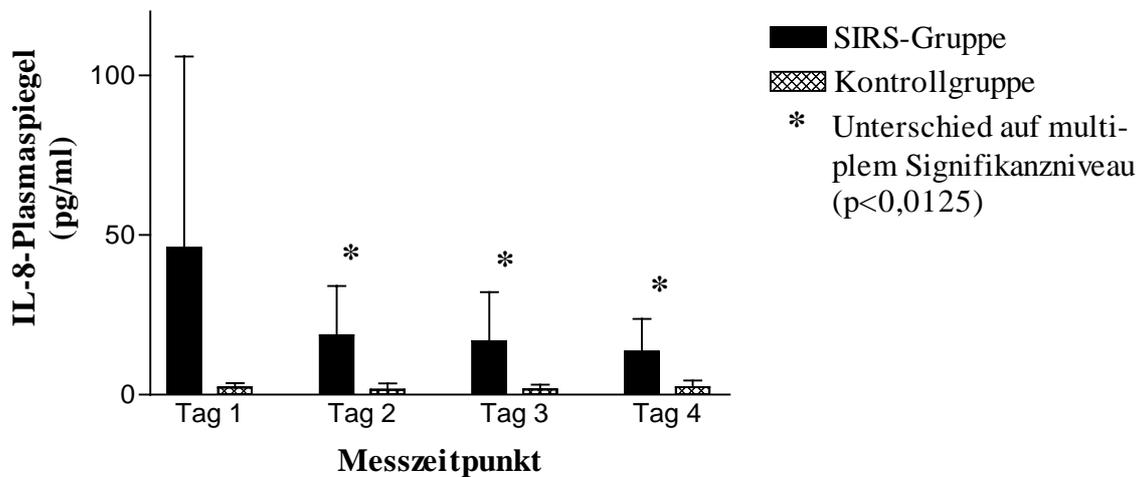


Die Graphiken 4 und 5 zeigen, dass für **Interleukin-6** in der SIRS-Gruppe ebenfalls am zweiten und dritten postoperativen Tag signifikant erhöhte Werte zu beobachten waren, während bei **Interleukin-8** zusätzlich auch am vierten postoperativen Tag ein ebensolcher Unterschied zu verzeichnen war.

Graphik 4: Vergleich der Interleukin-6-Konzentrationen zwischen SIRS- und Kontrollgruppe



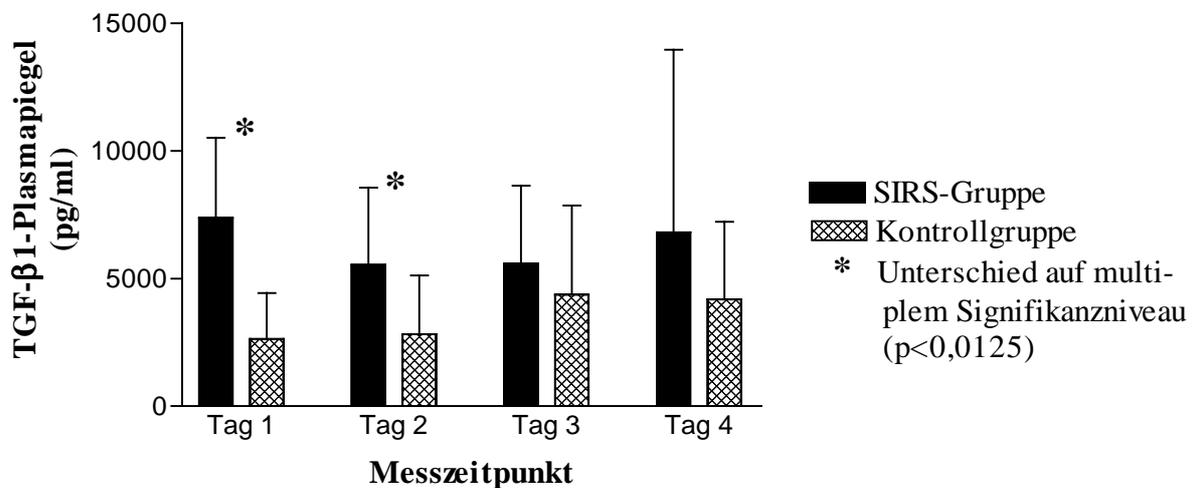
Graphik 5: Vergleich der Interleukin-8-Konzentrationen zwischen SIRS- und Kontrollgruppe



Für **Interleukin-10** konnte trotz höheren Niveaus der Konzentrationen in der SIRS-Gruppe kein Gruppenunterschied zu den einzelnen Messzeitpunkten gefunden werden.

Die Graphik 6 demonstriert die Verhältnisse bei dem Wachstumsfaktor **TGF- β_1** . Hier liegen in der SIRS-Gruppe an den ersten beiden postoperativen Tagen signifikant höhere Konzentrationen vor.

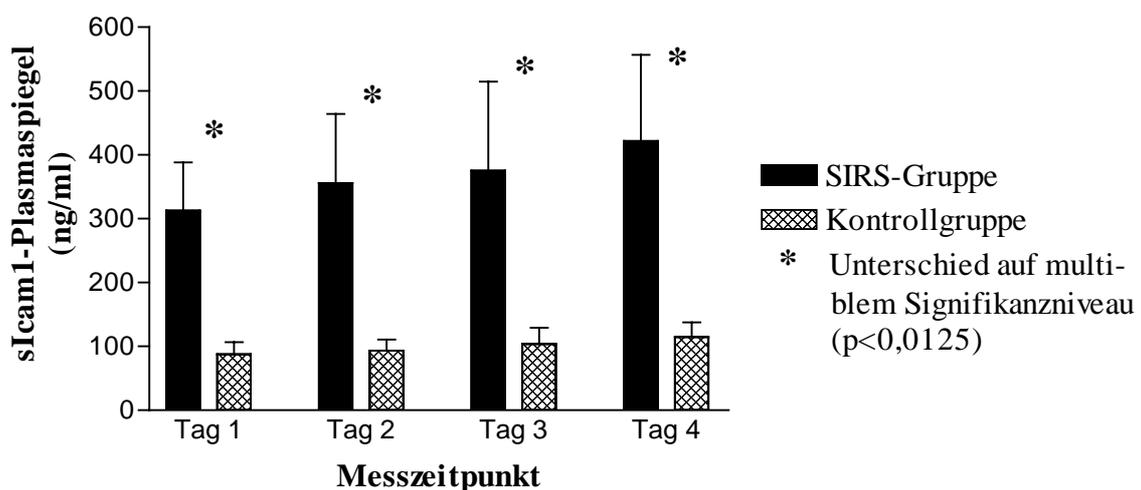
Graphik 6: Vergleich der TGF- β 1-Konzentration zwischen SIRS- und Kontrollgruppe



3.1.2.3.2 s-ICAM-1

Die Serumkonzentrationen der löslichen Form des Adhäsionsvermittlers ICAM-1 waren zu allen Zeitpunkten bei den Patienten der SIRS-Gruppe signifikant höher als bei denen der Kontrollgruppe (Graphik 7).

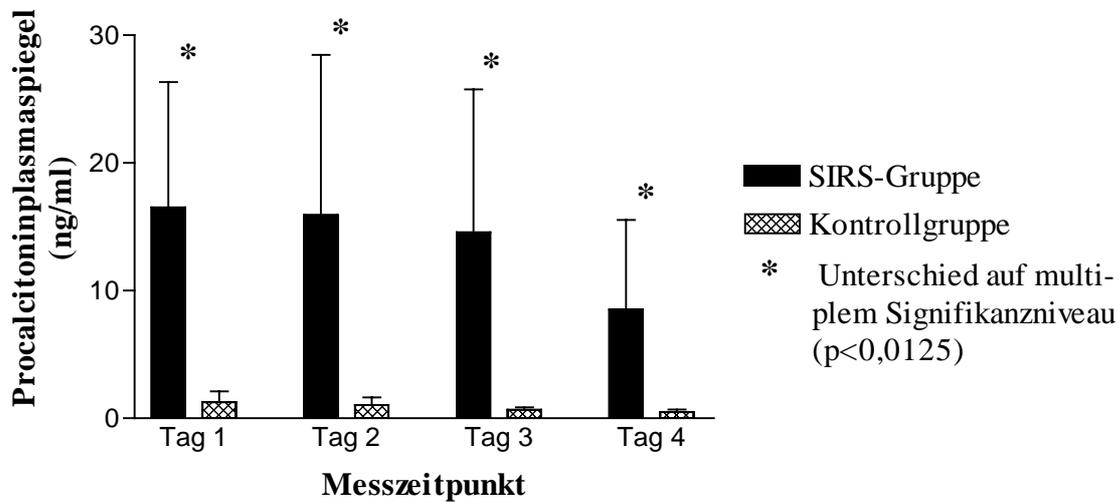
Graphik 7: Vergleich des Parameters sIcam-1 zwischen SIRS- und Kontrollgruppe



3.1.2.3.3 Akute-Phase-Proteine: Procalcitonin und C-reaktives Protein (CRP)

Das Procalcitonin war neben sICAM-1 der einzige Parameter, der zu allen Messzeitpunkten signifikant höhere Konzentrationen bei den Patienten der SIRS-Gruppe zeigte (Graphik 8).

Graphik 8: Vergleich des Parameters Procalcitonin zwischen SIRS- und Kontrollgruppe

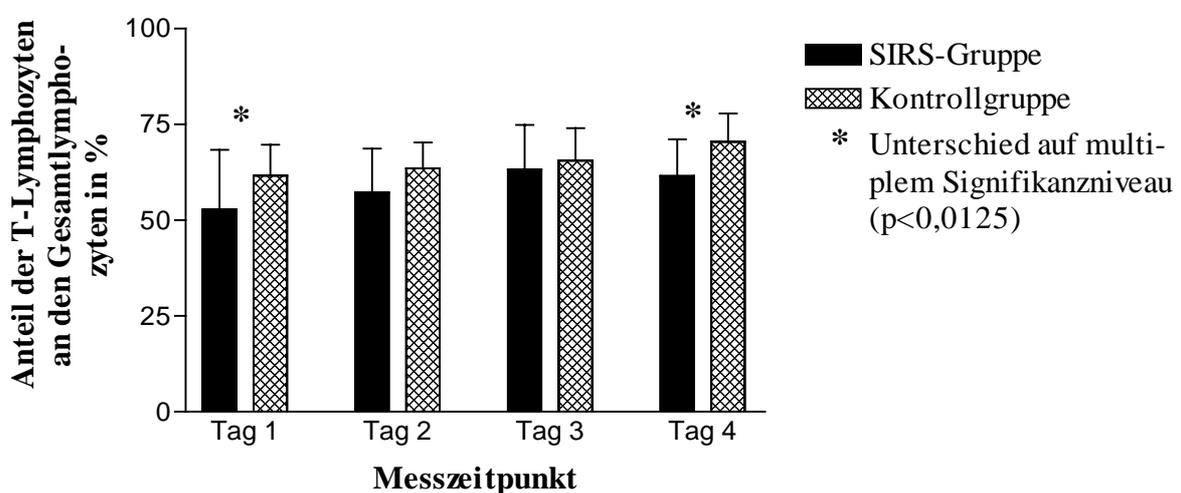


Die Auswertung der Messwerte für das CRP ließ Unterschiede zwischen den Untersuchungsgruppen vermissen .

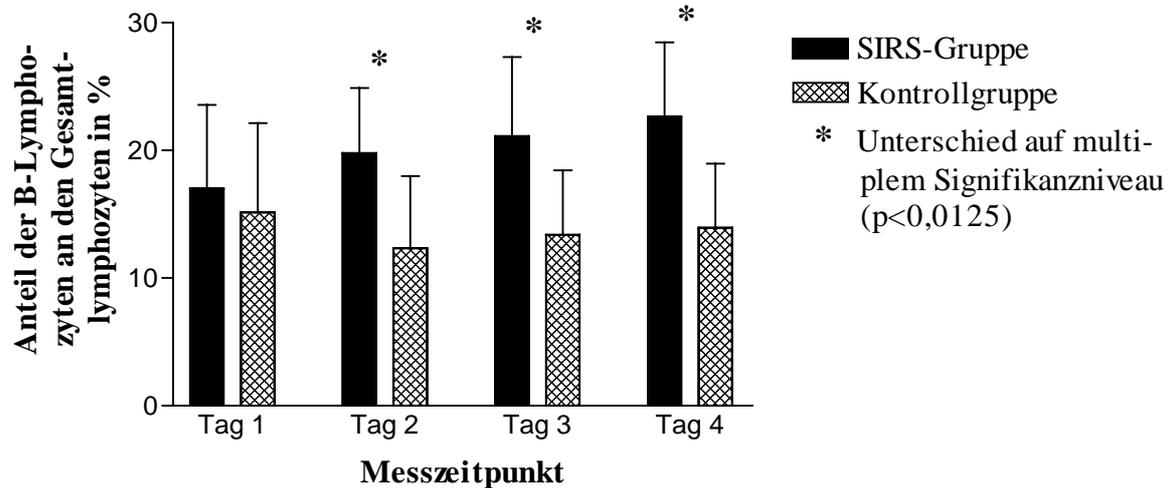
3.1.2.3.4 Lymphozytensubpopulationen

Bei der Untersuchung der Lymphozytensubpopulationen konnten in der SIRS-Gruppe am ersten und vierten postoperativen Tag signifikant reduzierte Anteile an T-Lymphozyten (CD3+) erfasst werden (s. Graphik 9). Gleichzeitig konnten aber in dieser Gruppe für die Messzeitpunkte 2, 3 und 4 signifikant erhöhte Anteile an B-Lymphozyten (CD19+) verzeichnet werden (Graphik 10).

Graphik 9: Vergleich der Anteile an T-Lymphozyten (CD3+) an den Gesamtlymphozyten zwischen SIRS- und Kontrollgruppe

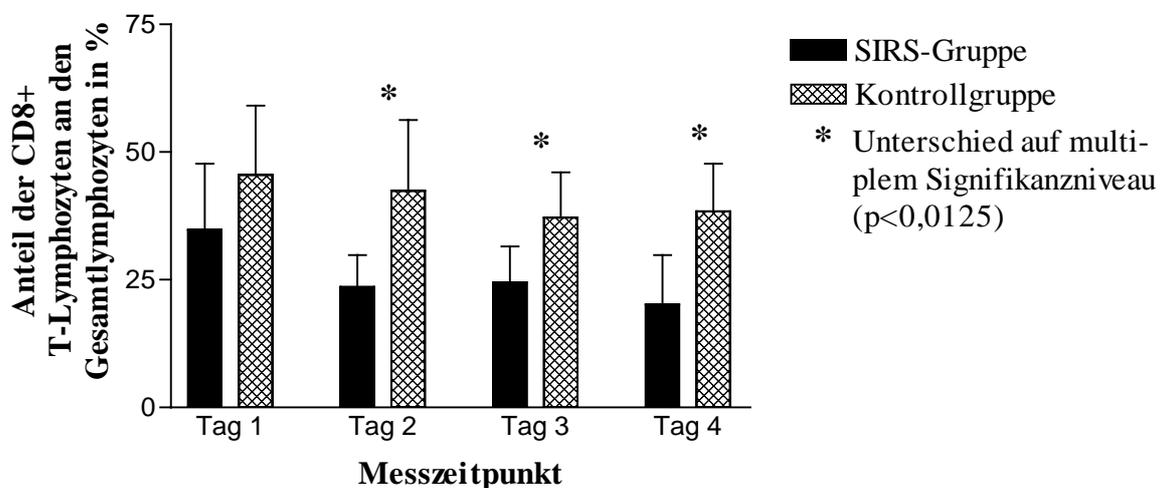


Graphik 10: Vergleich der Anteile der B-Lymphozyten (CD19+) an den Gesamtlymphozyten zwischen SIRS- und Kontrollgruppe



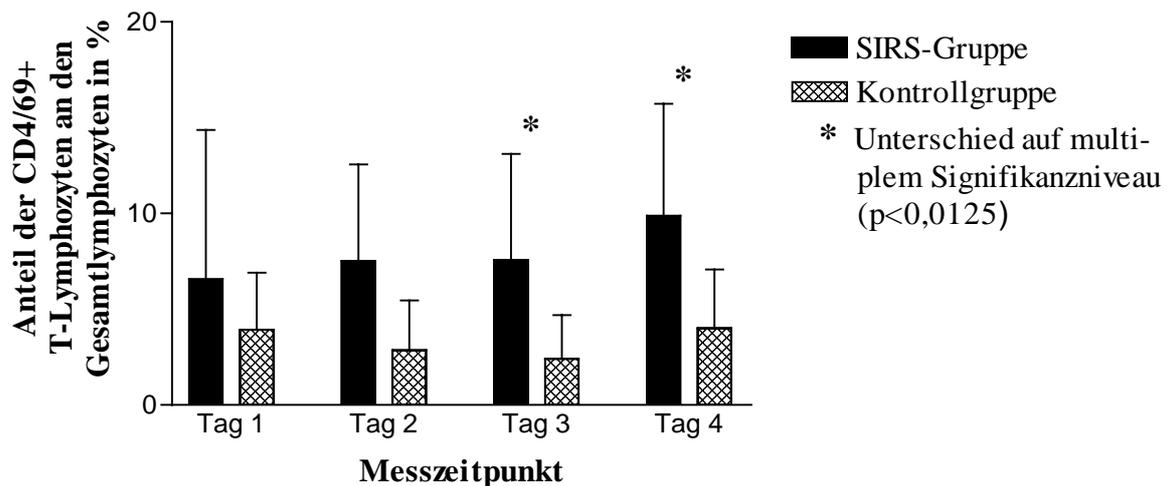
Bei den Subpopulationen der T-Lymphozyten wurden am 2., 3. und 4. postoperativen Tag signifikante Unterschiede bei den Anteilen der zytotoxischen-Suppressor-T-Lymphozyten (CD8+ Lymphozyten) beobachtet. Wiederum waren geringere Anteile dieser Zellen in der SIRS-Gruppe zu finden (Graphik 11).

Graphik 11: Vergleich der Anteile der CD8+ T-Lymphozyten an den Gesamtlymphozyten zwischen SIRS- und Kontrollgruppe



Was die frühaktivierten T-Helferzellen angeht, so wurden am 3. und 4. postoperativen Tag bei der SIRS-Gruppe signifikant höhere Anteile gemessen (Graphik 12).

Graphik 12: Vergleich der Anteile der CD4/CD69+ T-Lymphozyten an den Gesamtlymphozyten zwischen SIRS- und Kontrollgruppe



Keine Unterschiede wurden beim Vergleich der Anteile der T-Helferzellen (CD4+), der aktivierten T-Lymphozyten (CD3/HLA-DR+), den frühaktivierten Zytotoxischen-Supressor-T-Zellen (CD8/CD69+) sowie den Natürlichen Killerzellen (CD16/56+) gefunden.

Eine tabellarische Aufstellung der einzelnen Mittelwerte und Standardabweichungen beim Vergleich der erfassten Parameter zwischen Kontroll- und SIRS-Gruppe zeigt Anhang IV.I, Seite 82.

3.1.3 Korrelation der Operationszeiten mit den Immunparametern

Die Operationszeiten wurden bereits als eine mögliche Einflussgröße in Kapitel 3.1.1.2 (Seite 28) herausgearbeitet. Deshalb wurden die Operationsdauer, die Dauer der extrakorporalen Zirkulation und die Ischämiezeit mit allen postoperativ erfassten Parametern korreliert. Dabei ergaben sich nur vereinzelte auf verschiedene Zeitpunkte beschränkte Beziehungen, so dass man die in dieser Studie erhaltenen Merkmalsausprägungen als nicht mit den gemessenen Operationszeiten korrelierbar ansehen muss. Hier bräuchten u.U. Erhebungen an größeren Patientenkollektiven eindeutigere Ergebnisse.

3.1.4 Vergleich der Verlaufsparemeter

Abschließend wurden die postoperativen Verläufe der beiden Gruppen verglichen. Parameter hierfür waren die Dauer der postoperativen Nachbeatmung, des Aufenthalts auf der Intensivstation, die Inzidenz von Infektionen und das Anwenden einer Nierenersatztherapie.

Tab. 5: Vergleich der Verlaufsparemeter von SIRS- und Kontrollgruppe I

Parameter	SIRS-Gruppe (N=10)		Kontrollgruppe (N=15)		Signifikanzniveau ¹⁾
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD	
Nachbeatmungszeit (h)	97,20	58,93	12,89	3,60	p < 0,01
Intensivaufenthalt (d)	8,00	4,16	2,27	0,70	p < 0,01

¹⁾ Exakte Signifikanz Mann-Whitney

Tab. 6: Vergleich der Verlaufsparemeter von SIRS- und Kontrollgruppe II

Kreuztabelle Infektion / Gruppe	Infektion		p<0.0005 (hochsignifikant ¹⁾)
	ja	nein	
SIRS-Gruppe	8	2	
Kontrollgruppe	1	14	

¹⁾ Gemäß exaktem Fischer-Test für 2x2-Kontingenztafeln

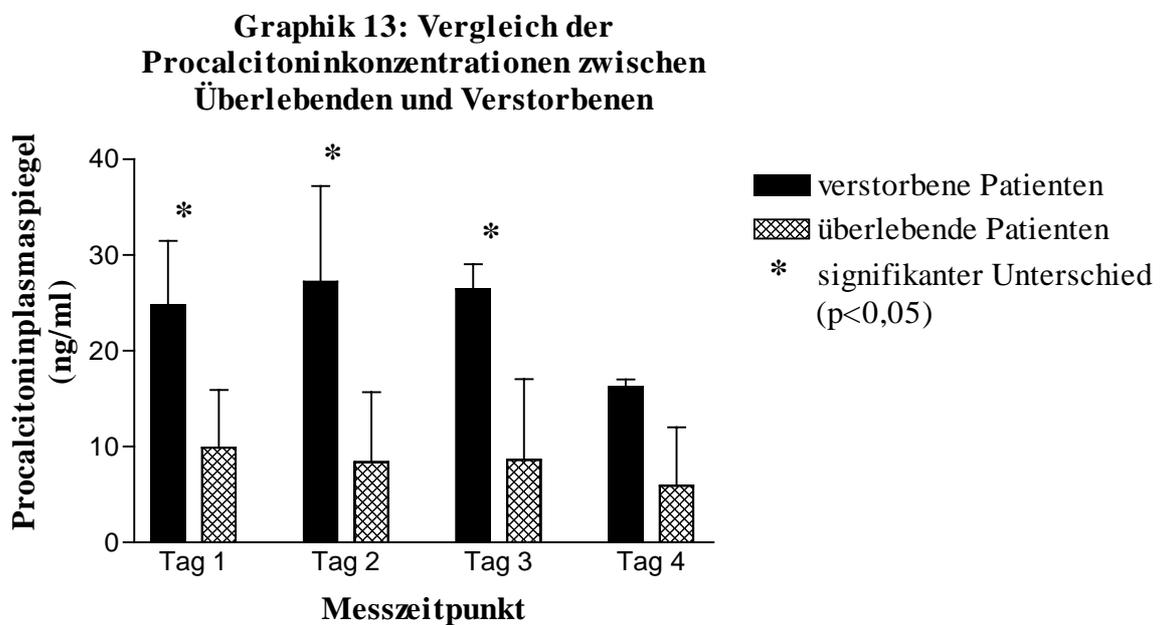
Es zeigte sich dabei, dass die Patienten der SIRS-Gruppe eine hochsignifikant längere Nachbeatmungszeit und Intensivpflichtigkeit aufwiesen (s. Tab 5). Außerdem waren in dieser Gruppe hochsignifikant mehr Infektionsfälle (p<0,0005) zu verzeichnen, deren Inzidenz frühestens am 10. postoperativen Tag zu verzeichnen war (s. Tab. 6).

3.2 Vergleich der Daten von Überlebenden und Verstorbenen innerhalb der SIRS-Gruppe

Eine weitere Untersuchung galt dem etwaigen Unterschied der Merkmalsausprägungen innerhalb der SIRS-Gruppe (n=10) zwischen überlebenden (n=6) und verstorbenen (n=4) Patienten. Dabei galt der Beobachtungszeitraum bis zwei Wochen postoperativ als ausschlaggebend für die Gruppenunterteilung.

Es handelte sich bei dieser Untersuchung wiederum um biometrisch vergleichbare Gruppenkonstellationen (s. Anhang IV.II).

Abgesehen von vereinzelten Unterschieden innerhalb der Parameter im Zeitverlauf zeigte nur der Parameter Procalcitonin bei diesen Gruppen konsistent Unterschiede mit bis zu dreimal höheren Spiegeln in der Gruppe der verstorbenen Patienten (s. Graphik 13/ Anhang IV.II).



4. Diskussion

4.1 Diskussion der Methoden

4.1.1 Das Patientenkollektiv

Ziel unserer Studie war es, systematisch die bisher nur unzureichend untersuchten initialen Geschehnisse beim eskalierenden SIRS zu verfolgen. Für diese Zwecke boten sich Patienten nach kardiochirurgischen Eingriffen unter extrakorporaler Zirkulation an, da diese regelhaft postoperativ die SIRS-Kriterien nach ACCP und SCCM erfüllen. Aus diesem Kollektiv wurden jedoch ausschließlich Patienten nach elektiver koronararterieller Bypassoperation rekrutiert, um bei vergleichbarem chirurgischen Trauma von einem einheitlichen Auslöser des SIRS ausgehen zu können. Zudem konnte man so den Beobachtungen von Welters et al. gerecht werden, die zeigten, dass je nach kardialer Grunderkrankung unterschiedliche Einflüsse auf immunologische Parameter der Patienten bestehen können [122].

Um die Ereignisse beim schweren SIRS umfänglich dokumentieren zu können, bedarf es einer frühestmöglichen Identifizierung der betroffenen Patienten. Den Schlüssel hierfür stellte die Risikoevaluation mittels APACHE-II-Score basierend auf den Ergebnissen von Pilz dar [89]. So konnte ein Patientenkollektiv mit blander Prognose einer Risikogruppe („SIRS-Gruppe“) gegenübergestellt werden .

4.1.2 Scoresysteme zur Risikostratifizierung

Unter einem Score versteht man ein Punktesystem zur quantitativen Erfassung von Befunden. Das Wesen dieser Systeme liegt darin, dass der jeweilige erarbeitete Punktwert eine Anzahl eingehender Parameter subsumiert und dabei versucht, letztere auch in Bezug auf die Prognose der Patienten zu bewerten. Für die Prognose des Einzelfalls sind die Scoresysteme ungeeignet, es handelt sich also um einen statistischen Prognoselieferanten, mit dem man das Letalitätsrisiko von Patientengruppen abschätzen kann [85, 94, 106, 116]. Dennoch bieten die Scores die Möglichkeit einer Schweregradklassifikation von Krankheitszuständen einzelner Patienten und erlauben so neben der Kontrolle der Effektivität von Therapieprinzipien [89] oder der eigenen Therapieeffizienz [58] auch einen Vergleich verschiedener Patientenkollektive im Rahmen klinischer Studien [57, 90].

Die Grundlage für die Verwendung des APACHE II Sores bei dieser Studie stellten die Ergebnisse von Pilz et al. dar. Diese Gruppe zeigte, dass man mit dem APACHE II Score bei kardiochirurgischen Patienten bereits am ersten postoperativen Tag mit „hoher Zuverläss-

sigkeit und Trennschärfe“ das große Kollektiv von Niedrigrisikopatienten mit unkompliziertem Verlauf von der kleinen Patientengruppe mit hohem Risiko abgrenzen kann. Die Hochrisikoklientel machte dabei 2-3 % der herzchirurgischen Patienten aus und hatte eine Mortalität von 76% [89]. Weiterhin qualifizierten die folgenden Eigenschaften den APACHE II Score für diese Studie:

- (1) Die Parameter, die in den Score eingehen (siehe Anhang II, Seite 79), werden bei der üblichen Intensivpflege im Routineablauf erhoben, so dass die Ermittlung des Scores einfach und für die Patienten mit keiner zusätzlichen Belastung verbunden ist.
- (2) Dieser Score besitzt den Vorteil einer minimalen subjektiven Beeinflussbarkeit [125] und eine zuverlässige Reproduzierbarkeit [29].
- (3) Aufgrund seiner wiederholten prognostischen Validierung bei septischen Patienten ist dieser Score ausdrücklich von einer Konsensuskonferenz zur Schweregradquantifizierung bei Sepsisstudien empfohlen worden [84, 90].

4.1.3 Durchflusszytometrie

Die Lymphozytensubpopulationen wurden durch die direkte Zweifarbenfluoreszenz als „Vollblutmethode“ identifiziert, bei der die Lymphozyten über direkt fluorochromkonjugierte monoklonale Antikörper markiert werden. Die Erythrozyten wurden dabei durch einen Lyse-schritt abgetrennt. Vorteilhaft ist bei dieser Methode, dass man eine geringe Menge Zellen benötigt, dass alle Leukozyten als Grundmenge erfasst werden, dass die Problematik unspezifischer Bindung über den Fc-Rezeptor kaum zum Tragen kommt und dass es sich um eine einfach durchzuführende Probenvorbereitung handelt.

Von den drei Arbeitsschritten der Immunfluoreszenzanalyse ist die Probenvorbereitung und Färbung die primäre Fehlerquelle, da die wenigsten verfügbaren experimentellen Protokolle in allen Punkten optimiert sind und möglicherweise Artefakte durch schlechtes Zell- oder Färbematerial entstehen.

Eine weitere Fehlerquelle stellt das „Gating“ im Rahmen der Durchflusszytometrie dar. Hier können Zellen bei der Analyse „verloren gehen“ und Interferenzen durch kontaminierende Zellen, die ähnliche Epitope wie das zu untersuchende Zellmaterial aufweisen (z.B. CD4 als Antigen auf T-Helferzellen und Makrophagen), entstehen, die die Ergebnisse verfälschen.

Um diese Fehler zu minimieren, nutzt die bei dieser Studie verwendete SimulSettm-Software bei der Lymphozytendifferenzierung die sogenannte „Back-Gating“-Technik, die bereits von Loken et al. im Detail beschrieben worden ist [67]. Hierbei wird die Auswertung der CD45- und CD14-spezifischen Fluoreszenzsignale in Kombination mit Daten der Streueigenschaften

der untersuchten Zellen zur Etablierung und Validierung der Lymphozytengates genutzt. Die so erhaltenen Gates beinhalten $> 95\%$ aller Lymphozyten der Probe. Innerhalb der Gates finden sich $\geq 90\%$ Lymphozyten $\leq 3\%$ Monozyten, $\leq 6\%$ Granulozyten und $\leq 10\%$ Debris [34]. Damit werden die Forderungen vom amerikanischen „National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Division of Aids“ im „Guideline for Cytometric Immunophenotyping“ bei weitem erfüllt: Hier wird für ein Lichtstreuungs-Gate die Validierung mittels fluorochromkonjugierter CD 45- und CD14-Antikörpern verlangt. Zudem soll das Gate im optimalen Fall $\geq 95\%$ aller Lymphozyten enthalten, gefordert wird jedoch ein Minimum von 90% . Desweiteren müssen die phänotypisch ausgemachten Lymphozyten innerhalb dieses Gates mindestens 85% aller vorkommenden Elemente ausmachen [20].

Zur Elimination von Einflüssen auf die Fluoreszenzauswertung in Rahmen der weiteren Lymphozytendifferenzierung wie „Hintergrundrauschen“, Autofluoreszenz und zur Minimierung der Beeinträchtigung der Messgenauigkeit durch antigenunabhängige Antikörperbindungen, wie sie v.a. durch Fc-Rezeptoren erfolgen, wurden nach Auffinden des Gates die sogenannten Fluoreszenzmarker gesetzt: Durch fluorochrommarkierte monoklonale Antikörper, welche spezifisch mit einem im menschlichen Blut nicht vorkommenden Antigen (Hämocyanin von Lochschnecken) reagieren, werden innerhalb des etablierten Gates die Grenzen um die ungefärbte bzw. fluoreszenznegative Lymphozytenpopulation gesetzt. Diese Grenze entspricht also dem „cut off“ zwischen negativer und positiver Fluoreszenz.

Wenn jedoch nach Setzen der Fluoreszenzmarker $> 5\%$ der erfassten Ereignisse außerhalb des erstellten „Negativ“-Quadranten des Gates lagen, musste eine antigenunspezifische Antikörperbindung angenommen und folglich die Probe verworfen werden.

Diese Prozedur zum Auffinden und Validieren der Lymphozytengates und das Setzen der Fluoreszenzmarker wurde für jede Probe einzeln vor deren weiteren Analyse durchgeführt. Als interne Qualitätskontrolle wurden die Streulicht- und Fluoreszenzkanäle täglich mit fluoreszenten Latexpartikeln (CaliBRITEtm, Becton, Dickinson) kalibriert.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Allgemeine Vorbemerkungen

Wir konnten für unsere SIRS-Gruppe im Vergleich mit der Kontrollgruppe neben einer höheren Mortalität (40 % bei der SIRS-Gruppe vs. 0 % bei der Kontrollgruppe) auch eine höhere Inzidenz postoperativer Komplikationen (Infektionen, Nachbeatmungsdauer, Dauer der Intensivbetreuung), also für ein MODS typische Beobachtungen, verzeichnen. Somit war ein klinisches Korrelat der aufgrund des APACHE-II-Scores prognostizierten Risikoeinschätzung nachzuweisen und auch klinisch ein Vergleich zwischen einer unkomplizierten Kontrollgruppe mit einer Gruppe von Patienten mit schwerem SIRS verifizierbar.

4.2.2 Interleukine

4.2.2.1 Interleukin-2

Im statistischen Vergleich dieses Parameters wurde für die Kontrollgruppe als Plasmakonzentration ein fiktiver Wert von 0,1 IU/ml entsprechend der unteren Nachweisgrenze des genutzten ELISA-Tests von < 0.1 IU/ml angenommen, da sich mittels dieses Tests in der Kontrollgruppe durchgehend kein IL-2 nachweisen liess. Selbst unter diesen Voraussetzungen konnten wir zum ersten Mal einem kontinuierlichen Trend gesteigerter IL-2-Spiegel bei Patienten mit schwerem SIRS demonstrieren, der am 2. und 3. postoperativen Tag sogar Signifikanzniveau erreichte.

In der Literatur finden sich nur wenige Arbeiten, bei denen über einen längeren postoperativen Zeitraum hinweg IL-2-Spiegel untersucht wurden. Die vorhandenen Arbeiten beschäftigen sich ausschliesslich mit komplikationsfreien Postbypasspatienten bis 24 Stunden nach dem CPB und können lediglich (bei einer Umrechnung der Einheiten gemäss Kolitz et al.: 10^6 U = 1 mg IL-2-Protein [60]) die Werte unserer Kontrollgruppe bestätigen [33, 110].

Die für die SIRS-Gruppe gezeigten höheren postoperativen IL-2-Spiegel sollten gemäss der physiologischen Wirkungen dieses Mediators bei den betroffenen Patienten eine Proliferation von T-Lymphozyten erwarten lassen, die sich aber in unserer Studie nicht nachweisen ließ. Eine Erklärung hierfür bieten die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Lahat. Sie berichtet bei Patienten nach CPB von einer Neutralisation des immunologisch messbaren IL-2 durch den mit einer gewissen Latenz auftretenden löslichen IL-2-Rezeptor (sIL-2R) [62].

4.2.2.2 Interleukin-6

Auch für IL-6 konnten wir als erste Arbeitsgruppe bei Patienten mit schwerem SIRS im Vergleich zum Kontrollkollektiv kontinuierlich höhere IL-6-Spiegel mit signifikanten Unterschieden am zweiten und dritten postoperativen Tag beobachten. Systematische Betrachtungen von Patienten mit schwerem SIRS nach CPB fehlen in der Literatur. Wiederum untersuchen die vorliegenden Arbeiten lediglich Patienten mit unkompliziertem Verlauf nach Herzchirurgie unter CPB und validieren unsere Ergebnisse bei der Kontrollgruppe [33, 50, 110].

Eine Ausnahme stellt die Arbeitsgruppe um Cremer dar. Diese verglich Patienten nach Herzchirurgie mit CPB nach Einteilung in eine Beobachtungsgruppe mit hyperdynamer, katecholaminpflichtiger hämodynamischer Instabilität und eine diesbezüglich unauffällige Gruppe. Hier konnte man jedoch nur bis zur dritten postoperativen Stunde signifikante höhere IL-6-Spiegel bei den hämodynamisch instabilen Patienten nachweisen [28].

IL-6 hat als laborchemischer Parameter in der Routinediagnostik eine herausragende Bedeutung, gilt es doch aktuell bei Patienten mit SIRS und MODS als bester „outcome-Predictor“ [19, 22, 95]. Casey berichtet bei septischen Patienten von einer Mortalität von 75%, wenn die IL-6-Serumspiegel einen Grenzwert von 500 pg/ml überschreiten [22]. Dieser Wert wurde von den Patienten unserer SIRS-Gruppe am ersten postoperativen Tag mit 575 ± 214 pg/ml und von den verstorbenen Patienten dieser Gruppe mit 622 ± 263 pg/ml erreicht bzw. übertroffen. Dieses Ergebnis unterstreicht das Mortalitätsrisiko unserer SIRS-Gruppe und steht im Einklang mit den Ergebnissen von Pilz et al., nach denen wir für die Patienten der SIRS-Gruppe eine Mortalität um 76 % annehmen müssen [89].

Für die pathophysiologischen Abläufe des SIRS scheint der pleiotrope Mediator IL-6 insbesondere durch zwei Funktionen bedeutungsvoll: Es initiiert die Akute-Phase-Reaktion mit Fieber und hat einen konzentrationsabhängigen negativ inotropen Effekt auf das Myokard, der als iNos (inducible NO-Synthetase) vermittelt angesehen wird [2]. Hennein et al. konnten diesbezüglich sogar erhöhte IL-6 Spiegel mit einer Verschlechterung der im transoesophagealen Ultraschall festgestellten myokardialen Wandbewegung korrelieren [45].

Hierbei lässt sich also zumindest ein Teil des klinischen Bildes des SIRS nach CPB (Fieber/Herzinsuffizienz) in einen Zusammenhang mit den erhöhten IL-6-Spiegeln bringen.

4.2.2.3 Interleukin-8

In unserer Studie konnten wir für die Patienten mit schwerem SIRS nach CPB im Vergleich mit der komplikationsfreien Kontrollgruppe erstmals an den ersten vier postoperativen Tagen

bis zu 20-fach höhere Plasmakonzentrationen von IL-8 nachweisen. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Beobachtungsgruppen fand sich dabei ab dem zweiten postoperativen Tag.

IL-8 ist ein wichtiger Mediator, der beim SIRS nach CPB das Ausmass der entstehenden Organläsionen beeinflusst. So wurde gezeigt, dass IL-8 im Rahmen des Ischämie-Reperfusionsgeschehens durch die Aktivierung und Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten die Gewebszerstörung vermitteln kann [31, 52, 75].

Da jedoch bei herzchirurgischen Operationen unter CPB die IL-8-Konzentrationserhöhungen nicht mit einer gleichsinnigen Veränderung seiner potentesten Stimuli IL-1 β - oder TNF α -Spiegel einhergehen [52, 101], muss man in diesem Rahmen einen weiteren Trigger zur IL-8-Produktion postulieren. Hier liefert die Gruppe um Metinko interessante Ergebnisse: Sie demonstrierte, dass alleine eine auf Monozytenkulturen einwirkende Folge von Anoxie und Hyperoxie eine Stimulierung IL-8-Synthese dieser Zellen auf Transkriptionsebene initiiert, die durch gleichzeitiges Einwirken von Endotoxin verstärkt werden kann. Weiterhin zeigte diese Gruppe, dass die IL-8-Produktion der Monozytenkultur signifikant mit der Dauer der auf sie einwirkenden Anoxie steigt [75].

Wir konnten in der vorliegenden Studie im Vergleich zur Kontrollgruppe bei den Patienten mit schwerem SIRS eine längere Operations-, EKZ- und Ischämiezeit festhalten. So kann man eine verlängerte Anoxiephase der durch den CPB ausgeschalteten Stromgebiete postulieren, die ihrerseits nach den obigen Ausführungen als Stimulus der beobachteten verstärkten IL-8-Produktion fungieren könnte. Die Folge dieser verstärkten IL-8-Produktion wäre eine ausgeprägtere Aktivierung und Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten ins Gewebe, wo sie schließlich Läsionen verursachen können. Das Ausmass dieser Gewebs- bzw. Organläsionen bestimmt seinerseits deutlich den klinischen Verlauf des SIRS-Patienten.

In diesem Zusammenhang betonen die Ergebnisse unserer Studie die Relevanz der eingangs genannten spezifischen Trigger wie Ischämie- und Reperfusion oder Endotoxinämie für erhöhte Inzidenz eines SIRS nach herzchirurgischen Eingriffen unter CPB.

4.2.2.4 Interleukin-10

Beim Vergleich des postoperativen Verlaufs der Spiegel dieses Zytokins zwischen den Studiengruppen fallen im Vergleich zu den Patienten der Kontrollgruppe zwar mehr als zehnfach höhere Mittelwerte bei den Patienten mit schwerem SIRS auf, die erhebliche Streuung der einzelnen Messwerte verhindert aber, dass eine statistische Signifikanz erreicht werden konnte. Dennoch kann man von einer Hochregulation dieses Zytokins bei den

kritischen Patienten ausgehen, was nachfolgende Untersuchungen unserer Gruppe an einem vergleichbaren Patientengut bestätigten [101].

Die Ergebnisse von Chernoff et al. verdeutlichen die Bedeutung dieses anti-inflammatorischen Zytokins beim SIRS nach CPB [25].:

Man untersuchte zuerst bei gesunden freiwilligen Versuchspersonen die in-vivo-Reaktionen auf die intravenöse Gabe verschiedener Dosierungen humanen rekombinanten IL-10. Diese Interleukin-10-Gaben führten zu einer Leukozytose mit Neutrophilie, zu erhöhten Monozytenzahlen, zu einem Abfall der Lymphozytenwerte bei reduzierten T-Zellen und unveränderter B-Zell-Population. Das entspricht den Veränderungen zellulärer Parameter, wie sie qualitativ auch bei Patienten nach CPB zu finden sind [35, 77].

Als nächstes führte diese Gruppe in-vitro Experimente an Zellkulturen monozytärer Zellen des peripheren Blutes nach in-vivo-Applikation von IL-10 durch. Dieser Applikation folgte eine Reduktion der mitogenstimulierten Zellproliferation und der endotoxininduzierten Produktion pro-inflammatorischer Zytokine, ohne dass eine Minimierung der anti-inflammatorischen endotoxininduzierten Effektoren vonstatten ging. Bei funktionellen Untersuchungen an Zellkulturen von Patienten nach Herzoperationen unter CPB findet man ebenfalls eine reduzierte proliferative Reaktion der mononukleären Zellen auf Mitogene [48, 96], sowie eine reduzierte mitogenstimulierte Produktion pro-inflammatorischer Mediatoren [48, 70, 71, 80]. Mögliche Einschränkungen der Aussagekraft dieser in-vitro-Zellkultur-experimente werden unter Kapitel 4.2.6.1. auf Seite 51 diskutiert.

Es drängt sich dennoch auch bei diesem Zytokin der Verdacht auf, dass es sich um einen anti-inflammatorisch wirkenden „Brückenbauer“ zwischen humoraler inflammatorischer Reaktion und zellulärer Antwort handeln könnte, welcher für die postoperativen zellulären Veränderungen des Immunsystems bei Patienten nach CPB zumindest mitverantwortlich ist.

4.2.3 Das Adhäsionsmolekül ICAM-1

Wesentlich für den Verlauf der inflammatorischen Antwort auf den CPB ist die zytokin-getriggerte adhäsionsmolekülvermittelte Zell-Zell-Interaktion mit der Folge einer transendothelialen Migration von Phagozyten und der damit potentiell verbundenen Gewebeschädigung. Malik konnte die herausragende Bedeutung des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 bei diesem Geschehen belegen, indem er zeigte, dass die Inkubation von Endothel mit Anti-ICAM-1-Antikörpern eine Reduktion der Adhäsion Neutrophiler am stimulierten Endothel um 50 % und eine Verringerung deren Migration um > 85% zur Folge hatte [69]. Daneben

dient ICAM-1 auch als Rezeptor an leukozytären Zielzellen [76]. Kilbride konnte nachweisen, dass die extrakorporale Zirkulation die Expression myokardialer ICAM-1-mRNA steigert [54]. Entman und Smith berichten von einer ICAM-1 abhängigen Neutrophilenadhäsion an Kardiomyozyten im Rahmen ihrer Schädigung durch reaktive Sauerstoffmetabolite bei der Ischämie-Reperfusionverletzung [37, 107].

In der vorliegenden Studie wurde die lösliche Form des Adhäsionsmoleküls bestimmt, da von einer Relation zwischen zellulärem ICAM-1 und dessen löslicher Form (sICAM-1) allgemein ausgegangen wird und sICAM-1 als Indikator für Zellaktivierung, Endothelschaden und Ausprägung des entzündlichen Geschehens gilt [12, 28]. Tatsächlich fanden sich zu allen Messzeitpunkten in der SIRS-Gruppe signifikant höhere sICAM-1-Plasmakonzentrationen als bei den Kontrollpatienten. Also muss in diesem Zusammenhang von einem weiteren Indiz für eine „hochgeregelte“ pro-inflammatorische Komponente mit konsekutivem Zellschaden beim schweren SIRS ausgegangen werden.

4.2.4 Der Wachstumsfaktor TGF β ₁

Man konnte in der vorliegenden Studie erstmals bei Patienten mit schwerem SIRS nach CPB im Vergleich zu unauffälligen Patienten zu allen Messzeitpunkten höhere Spiegel des Wachstumsfaktors TGF β ₁ bei signifikanter Erhöhung an den beiden ersten postoperativen Tagen finden. Damit konnten wir wiederum die Erhöhung eines anti-inflammatorischen Mediators beim schweren SIRS nachweisen. Wie bereits erwähnt wirkt TGF β ₁ antiproliferativ auf Lymphozyten und reduziert die transendotheliale Migration von Phagozyten. So konnten Schmitt et al. im Tierversuch an Mäusen demonstrieren, dass TGF β ₁ die Differenzierung von naiven anti-CD3-aktivierten T-Zellen zu TH₁-Zellen inhibierte [105]. Ausserdem konnten Lefer et al. an einem Tiermodell kardioprotektive Effekte von TGF β ₁ nachweisen, welche sich im Rahmen des Ischämie-Reperfusionsschadens entwickelten und offensichtlich durch eine Inhibition der endothelvermittelten Adhärenz Neutrophiler erreicht wurden [65].

4.2.5 Procalcitonin

In der vorliegenden Studie konnten wir für die Patienten der Kontrollgruppe zu allen Messzeitpunkten Plasmakonzentrationen unter 2 ng/ml mit einem Maximum am ersten postoperativen Tag nachweisen. Solche Procalcitoninkonzentrationen sind typisch für Patienten mit unkompliziertem postoperativen Verlauf nach Operationen unter CPB, wobei höhere

Spiegel auf komplikationsträchtige Verläufe mit drohender Organdysfunktion hinweisen [1, 4, 46]. Wir konnten bei den Patienten mit schwerem SIRS nicht nur zeigen, dass tatsächlich höhere Procalcitoninspiegel vorlagen, sondern auch, dass zu allen Messzeitpunkten im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikante Unterschiede bestanden. Infektionen als potentielle Ursachen dieser Procalcitoninwerte waren zu diesem Zeitpunkt in dieser Gruppe nicht nachweisbar. Auch eine Beeinflussung der Procalcitoninspiegel im Rahmen herzchirurgischer Eingriffe durch die EKZ ist auszuschliessen [1, 10, 11], so dass die längere Dauer der extrakorporalen Zirkulation bei der Operation der Patienten der SIRS-Gruppe dieser Studie nicht als Auslöser angeschuldigt werden kann.

Als Novum konnten wir zudem zum ersten Mal zeigen, dass sich selbst innerhalb der SIRS-Gruppe die Procalcitoninspiegel von verstorbenen Patienten an den ersten drei postoperativen Tagen signifikant von denen der Überlebenden unterscheiden. Bei den Verstorbenen fanden sich zu diesen drei Messzeitpunkten Konzentrationen mit einem Mittelwert von über 20 ng/ml, bei den Überlebenden Mittelwerte von unter 10 ng/ml. Bei keinem anderen der erhobenen Parameter konnte ein vergleichbarer Unterschied beobachtet werden, insbesondere der Standardentzündungsparameter C-reaktives Protein ließ eine diskriminierende Potenz bei diesen Vergleichen vermissen. Unsere Ergebnisse lassen bei Patienten nach Eingriffen unter CPB die Thesen zu,

- (1) dass sich die Plasmaprocalcitoninkonzentrationen im Einklang mit den Literaturangaben bereits am ersten postoperativen Tag signifikant bei unkomplizierten Patienten und solchen mit schwerem SIRS unterscheiden.
- (2) dass sich die Procalcitoninspiegel bei Patienten mit schwerem SIRS bereits am ersten postoperativen Tag bei Überlebenden und Verstorbenen signifikant unterscheiden.
- (3) dass gemäss der vorliegenden Untersuchungen Procalcitoninspiegel von 10-30 ng/ml nach kardiochirurgischen Operationen unter extrakorporaler Zirkulation nicht als sicheres diagnostisches Kriterium für ein infektiöses Geschehen bakteriellen Ursprungs verwertbar sind (s. Referenzwerte für Procalcitonin unter Kap. 2.3.2.4, Seite 14).

Somit steht für diese Patientenklientel ein Parameter zur Verfügung, welcher als Indikator für den Schweregrad und die drohende Mortalität nutzbar zu sein scheint, hingegen aber nur eingeschränkt als Frühmarker infektiöser Prozesse verwendbar ist.

4.2.6 Lymphozytensubpopulationen

4.2.6.1 T-Lymphozyten

Bezüglich der T-Lymphozyten wurde sowohl bei der Betrachtung der Absolutzahlen als auch der Anteile ihrer Subpopulation an den Gesamtlymphozyten eine Dezimierung nach Eingriffen unter extrakorporaler Zirkulation beobachtet, welche hauptsächlich durch eine Reduktion der CD4⁺ T-Helferzellen verursacht ist und zu einer reduzierten CD4/CD8-Ratio führt. Diese Veränderungen erreichen bis zum ersten postoperativen Tag ihren Höhepunkt und zeigen eine Normalisierungstendenz im weiteren postoperativen Verlauf, wobei frühestens nach einer Woche die präoperativen Ausgangswerte wieder erreicht werden [35, 48, 51, 70, 115].

Auch bei früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten wir einen signifikanten Abfall von CD3⁺ und CD4⁺ T-Zellen am ersten postoperativen Tag nach unkomplizierten kardiochirurgischen Operationen nachweisen [100]. Die nun vorliegende Studie belegt die o.g. Daten für die weitere postoperative Phase. Es finden sich in beiden Beobachtungsgruppen steigende Anteile der gesamten T-Lymphozytenpopulation (CD3⁺) und der T-Helferzellen (CD4⁺) bei leicht rückläufigen Werten für die zytotoxischen T-Zellen (CD8⁺).

Die Abläufe, welche zu dem o.g. reduzierten CD4/CD8-Verhältnis führen, wurden bisher mit einem immunkompromittierten Zustand verglichen, welcher die Patienten empfänglich für Infektionen machen könnte. Dies wurde dadurch untermauert, dass man bei in-vitro-Tests Hinweise auf eine reduzierte Lymphozytenfunktion zumindest innerhalb der ersten postoperativen Tage fand. Die lymphoproliferative Reaktion auf Mitogene wie Phytohemagglutinin oder Concanavalin A [48, 96], die IL-2 Produktion auf Mitogenstimulation [48, 70, 71] sowie die mitogenstimulierte IFN γ -Sekretion [70, 80] fielen reduziert aus, ebenso wie Funktionstests bzgl. der Zytotoxizität von CD8-Zellen [82].

Die Ergebnisse unserer Studie lassen zumindest Zweifel an der These einer reinen Immunsuppression der Patienten mit SIRS nach CPB aufkommen. Denn bei der Untersuchung der Anteile frühaktivierter T-Helferzellen am den Gesamtlymphozyten konnten wir erstmals zeigen, dass bei den Patienten mit schwerem SIRS im Vergleich mit der Kontrollgruppe am dritten und vierten postoperativen Tag signifikant erhöhte Anteile vorlagen. Die einzige weitere Veröffentlichung einer Untersuchung dieses Antigens auf Leukozyten bei postoperativen Patienten nach Eingriffen unter CPB stammt von der Arbeitsgruppe um Misoph, wonach von einem negativen Nachweis dieses Epitops auf Lymphozyten und Monozyten ausgegangen wird [77].

Natürlich muss man als limitierend für die Aussagekraft der Untersuchung von Lymphozyten ex-vivo durch Oberflächenmarker ansehen, dass man zwar Aussagen über den Grad der Aktivierung der Lymphozyten treffen kann, dieser aber nicht im direkten Zusammenhang mit der funktionellen Potenz dieser Zellen zu werten ist. Dennoch lässt ein Blick auf die Methodik der oben zitierten Studien, die eine Immunsuppression nach CPB belegen wollen, die Aussagekraft der durchgeführten Funktionstests zumindest relativieren:

- (1) Die zitierten in-vitro-Untersuchungen wurden an Kulturen peripherer mononucleärer Zellen (Lymphozyten) durchgeführt, die alle mit derselben Technik gewonnen wurden. Nguyen et al. konnten für diese Zellkulturen nicht nur zu einzelnen Zeitpunkten eine Kontamination durch Monozyten nachweisen, sondern zudem demonstrieren, dass man nach Depletion dieser kontaminierenden Zellen die zuvor reduzierte NK- bzw. CD8-Zellvermittelte Zytotoxizität wieder herstellen konnte [82].
- (2) Bei den in-vitro Versuchen bzgl. der IL-2 Sekretion durch Lymphozytenkulturen fällt z.B. auf, dass die Arbeitsgruppen um Hisatomi und Markewitz mittels Bioassays biologisch aktives IL-2 nachwiesen, wogegen die Gruppe um Naldini immunologisch aktives aber biologisch durch einwirkende Faktoren potentiell neutralisierbares IL-2 mit Immunoassays untersuchten. Während die ersten beiden Autoren am ersten postoperativen Tag eine signifikante Reduktion der IL-2-Sekretion ihrer Zellkulturen im Vergleich zu präoperativ fanden, konnte die Naldini 24 Stunden nach der Operation keine solche Reduktion feststellen [48, 70, 71, 80].

Daher sollte man nicht von vorneherein postulieren, dass die beschriebenen Veränderungen zellulärer Parameter bei Patienten nach CPB als Immunsuppression zu werten sind, zumal bis heute keine klinische Korrelation zu den Laborwerten bzgl. Zellzahlen und -funktionen nachgewiesen werden konnte. Vielmehr könnten sie auch in der Ausnahmesituation nach solchen Eingriffen als physiologische Adaptation gelten, bei der auch pro-inflammatorische Aspekte eine Rolle spielen. Einen weiteren Beleg hierfür bringen unsere Ergebnisse bzgl. der oftmals als Korrelat der Immunsuppression angesehenen Reduktion des CD4/CD8-Verhältnisses. Dieser Quotient fiel nämlich in unserer Studie bei den SIRS-Patienten verglichen mit der Kontrollgruppe durchweg erhöht aus.

So zwiespältig die Interpretation der zellulären Parameter bei Patienten nach CPB ist, so unklar ist deren Genese und die dahinterstehende Pathophysiologie:

Diegeler und Mitarbeiter konnten Hinweise dafür finden, dass nicht die extrakorporale Zirkulation als solches, sondern eher das chirurgische Trauma als Ursache für die Veränderungen der Zellpopulationen nach koronararterieller Bypassanlage anzusehen ist [35].

Über die pathophysiologischen Hintergründe dieser Veränderungen kann jedoch nur spekuliert werden:

- (1) Ide und Mitarbeiter vermuten aufgrund ihrer Untersuchungen eine Redistribution der Lymphozyten zwischen Knochenmark und peripherem Blut als Mechanismus für diese Vorgänge [51].
- (2) Die Erhöhung der Serumkortikoidspiegel könnte für die Reduktion der Lymphozytenanteile im peripheren Blut verantwortlich sein. Gegen diesen Ansatz spricht, dass keine Korrelation zwischen dem Serumkortisolspiegel und den Veränderungen der Lymphozytenanteilen nachgewiesen werden konnte [51, 96].
- (3) Prostaglandin E₂ (PGE₂) wird in seiner Funktion als Suppressor von Monozyten und Aktivator von supprimierenden T-Zellen als möglicher Initiator der verminderten Immunantwort v.a. in der Gruppe um Faist und Markewitz genannt. Diese Gruppe demonstrierte eine Wiederherstellung „physiologischer“ Laborparameter von Patienten nach Operationen unter CPB, wozu jedoch neben dem Cyclooxygenaseinhibitor Indometacin als PGE₂-Antagonist noch das T-Zell-Stimulans Thymopentin verwendet wurde [70, 71]. Der Nachweis eines klinisch fassbaren Benefits solcher Behandlungsstrategien steht allerdings noch aus. Zudem scheint es fragwürdig, die Beurteilung der Funktionsfähigkeit des Immunsystems an ausschliesslich einem Mediator festmachen zu wollen.
- (4) Als weitere Faktoren, welche im Rahmen dieser Geschehnisse von Bedeutung sein können, werden von Naldini et al. der Komplementfaktor C3a und TGF-β₁ genannt [80]. Was den potentiellen Einfluss von TGF-β₁ auf das zugrundeliegende Geschehen betrifft, so konnte die vorliegende Studie widersprechende Hinweise erbringen. Die erhöhten Spiegel dieses Mediators in der SIRS-Gruppe gingen nicht mit einer Verstärkung der Alteration der Verteilung der Lymphozytensubpopulationen einher.
- (5) Brody vermutet, dass die T-Zellen ihre Epitope während des chirurgischen Eingriffs verlieren und selbige dann im postoperativen Verlauf reexprimieren [17].
- (6) Die Arbeitsgruppe um Lahat berichtet bei Patienten nach CPB von einer Neutralisation des immunologisch messbaren IL-2 durch den mit einer gewissen Latenz auftretenden löslichen IL-2-Rezeptor (sIL-2R). Zudem konnte eine Korrelation von IL-2 und sIL-2R in diesem Zusammenhang nachgewiesen werden [62]. Dies ist ein Ansatz, welcher das Auftreten erhöhter IL-2-Spiegel in der SIRS-Gruppe dieser Studie ohne fassbaren proliferativen Einfluss auf die T-Zellen erklärbar machen könnte.

4.2.6.2 B-Lymphozyten und natürliche Killerzellen (NK-Zellen)

In der vorliegenden Studie wurden im Vergleich mit der Kontrollgruppe ab dem zweiten postoperativen Tag signifikant erhöhte Anteile CD19+ Lymphozyten bei Patienten der SIRS-Gruppe gefunden, wobei die Wertebereiche der erfassten Anteile beider Studiengruppen durchaus mit den Angaben der vorhandenen Literatur vereinbar sind [35, 51, 77, 96, 115]. Möglicherweise lässt ein erhöhter Anteil an B-Lymphozyten, welche Vorläufer der antikörperproduzierenden Plasmazellen sind, in diesem Zusammenhang auf eine höhere Belastung mit extrazellulärem Antigen schliessen. Diese Antigenbelastung könnte z.B. aus Zelldebris und Mikropartikeln bestehen, die bei den signifikant längeren Operationszeiten der Patienten der SIRS-Gruppe in erhöhter Maße und Zahl anfallen.

Bei der Untersuchung der Anteile der NK-Zellen konnten wir in dieser Studie keine signifikanten Unterschiede zwischen den Untersuchungsgruppen finden. In Übereinstimmung mit bereits veröffentlichten Arbeiten zeigt der postoperative Verlauf der Anteile der NK-Zellen an den Gesamtlmphozyten auch bei unserer Studie eine leicht fallende Tendenz [35, 120]. Studien, die mit in-vitro-Tests die zytotoxische Potenz der NK-Zellen untersuchten, zeigten divergierende Ergebnisse. Die meisten Arbeiten berichten im postoperativen Verlauf von einer reduzierten zytolytischen Aktivität der NK-Zellen, wobei jedoch Hinweise auf einen dieses Ergebnis bedingenden systematischen Fehler bei der genutzten Methodik vorliegen [82, 99, 120]. Im Gegensatz dazu berichten Tajima und Mitarbeiter von einer erhöhten NK-Aktivität, welche bis zum siebten postoperativen Tag nachweisbar sei [115].

4.3 Charakterisierung des schweren SIRS nach CPB

Die in unserer Studie erarbeiteten Ergebnisse des Vergleichs von Patienten mit schwerem SIRS nach CPB mit der komplikationsfreien Kontrollgruppe lassen folgende qualitative Aussagen über das schwere SIRS nach CPB zu:

- (1) Es konnte bei Patienten mit schwerem SIRS zum ersten Mal gezeigt werden, dass sowohl auf pro-inflammatorischer (IL-2, IL-6, IL-8) als auch auf anti-inflammatorischer Seite (IL-10, TGF β_1) höhere Mediatorkonzentrationen vorlagen, wobei grösstenteils signifikante Unterschiede zu verzeichnen waren.
- (2) Die statistische Auswertung der Verläufe der Zytokinspiegel der Beobachtungsgruppen konnte die Parallelitätshypothese nicht widerlegen, d.h. bei unterschiedlichem Konzentrationsniveau waren die Spiegelveränderungen dieser humoralen Parameter im Zeitverlauf gleichsinnig (s. Kap. 3.1.2.1, Seite 28).
- (3) Wir konnten zeigen, dass weitere Indikatoren für den Schweregrad inflammatorischer Geschehen (Procalcitonin, sICAM-1) bei der SIRS-Gruppe zu allen Messzeitpunkten signifikant höhere Spiegel aufwiesen.
- (4) Unsere Ergebnisse bei der Untersuchung der Lymphozytensubpopulationen deuten an, dass beim SIRS nach CPB nicht nur von Veränderungen zu berichten ist, die auf eine Immunsuppression schliessen lassen. Vielmehr sollte man von einer Adaptation des zellulären Systems an die vorliegende pathophysiologische Sondersituation ausgehen, bei der auch pro-inflammatorische Effekte bedeutsam zu sein scheinen.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass man das schwere SIRS nach CPB gemäss den Ausführungen von Bone in der Einleitung dieser Arbeit als “Mixed Antagonist Response Syndrome (MARS)” bezeichnen kann [13]. Das schwere SIRS nach CPB zeichnet sich demnach als ein Prozess mit gleichzeitiger Hochregulation von pro- und anti-inflammatorischen Effekten aus, bei der das Immunsystem seiner Aufgabe nicht mehr gerecht werden kann. Führt man sich vor Augen, dass bei der SIRS-Gruppe dieser Studie (hoch-)signifikant längere Operationszeiten (Operationsdauer, EKZ-Zeit, Ischämiezeit) vorlagen, so drängt sich der Verdacht auf, mit der zeitlichen Komponente des Eingriffs eine potentielle Einflussgröße („Insult“) für die Ausprägung des SIRS nach herzchirurgischen Eingriffen unter extrakorporaler Zirkulation identifiziert zu haben. Ein mögliches pathophysiologisches Korrelat dieser These wurde bereits für IL-8 diskutiert. Weitere Studien an größeren Patientenkollektiven sollten diesen potentiellen Zusammenhang genauer untersuchen.

4.4 MODS oder CHAOS nach CPB: Wann führen sie zum Tode?

Die schwerwiegendste Folge des schweren SIRS/MARS ist ohne Zweifel das letale MODS/CHAOS. Deswegen wurde innerhalb der SIRS-Gruppe nach Unterschieden zwischen den überlebenden und verstorbenen Patienten gesucht. Interessanterweise fand sich auf Zytokinebene kein signifikanter Unterschied. Diese Feststellung könnte durchaus an den kleinen Beobachtungsgruppen in dieser Untersuchung begründet liegen, aber auch andere potentielle Einflussfaktoren bleiben zu diskutieren:

- (1) Man sollte hierbei an eine interindividuell verschiedene Beanspruchung des Organismus durch eine messbar vergleichbare Belastung inflammatorischer Einflüsse denken.
- (2) Außerdem muss man bei der Bestimmung von Zytokinkonzentrationen beachten, dass man es i.d.R. mit kurzlebigen Mediatoren zu tun hat, die einem schnellen Abbau durch Plasmaproteasen oder einer Clearance durch Zellrezeptoren bzw. spezifischen plasmatischen Bindungsproteinen ausgesetzt sind. Zwischenzeitliche Zytokinspiegelveränderungen können somit leicht „verpasst“ oder „maskiert“ werden.
- (3) Es bestehen Hinweise auf eine synergistische Wirkungsweise verschiedener Zytokine. Diese Zytokinsynergie postulieren Casey et al. für pro-inflammatorische Einflüsse. [23]. Aber auch für eine synergistische Wirkungsweise von anti-inflammatorischen Zytokinen bestehen experimentelle Hinweise. [86]. Also wäre es denkbar, dass nur geringe Veränderungen der Spiegel einzelner Zytokine ohne signifikante Ausprägungen bei den beobachteten „High-Risk-“ Patienten in ihrer Summe beim „Orchester“ der ablaufenden immunologischen Reaktionen die deletäre Auswirkungen auf den Organismus bedingen.

Umso bedeutender erscheint bei diesem Hintergrund der potentielle Nutzen des Entzündungsparameters Procalcitonin im Hinblick auf seine prognostische Wertigkeit. Dieser Parameter zeigte in der vorliegenden Studie nicht nur eine signifikant unterschiedliche Ausprägung zwischen der Kontrollgruppe und den Patienten mit schweren SIRS, sondern auch als einziger der untersuchten Merkmale innerhalb der SIRS-Gruppe mit Konstanz einen signifikanten Unterschied zwischen den überlebenden und verstorbenen Patienten. Bei auszuschließender infektiöser Beteiligung zeichnet sich hier ab, dass mit Procalcitonin ein geeigneter Prognoseindikator für Patienten nach Kardiochirurgie unter CPB vorhanden sein könnte. Weitere Studien an grösseren Patientenkollektiven sollten durchgeführt werden, um die Aussagekraft dieses Parameters validieren zu können. Danach könnte sich Procalcitonin als Erweiterung bereits bewährter prognostischer Scores, wie z.B. dem hier genutzten APACHE II-Score,

etablieren oder auch als einzelner Parameter die Diagnosemöglichkeiten des Kliniklers erweitern.

Die pathophysiologischen Eigenschaften von Procalcitonin sind aktuell noch weitgehend ungeklärt. Dennoch konnte bei Tierversuchen an Hamstern gezeigt werden, dass eine Procalcitonininjektion, welche keinen Einfluss auf gesunde Hamster hatte, bei septischen Hamstern zu einer deutlichen Mortalitätssteigerung beitrug. Zudem wurde festgestellt, dass eine Procalcitonininjektion bei gesunden wie auch septischen Hamstern nicht zur Induktion pro-inflammatorischer Zytokine ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$) führte, dass aber im Umkehrschluss eine $\text{TNF}\alpha$ -Applikation eine Steigerung der Serumkonzentration von Procalcitonin bei Hamstern verursachte [83, 124]. Procalcitonin könnte also durchaus als sekundärer inflammatorischer Mediator auf einen inflammatorisch „geprimten“ Organismus wirken. Zukünftige Studien werden diese Zusammenhänge klären müssen.

5. Zusammenfassung:

Bei der Untersuchung der Pathophysiologie des SIRS sind die Patienten nach herzchirurgischen Eingriffen unter extrakorporaler Zirkulation eine geeignete Patientenklientel, da sie postoperativ regelhaft die nötigen Kriterien nach der ACCP- und SCCM-Definition des SIRS erfüllen. Deshalb haben wir in der vorliegenden Studie männliche Patienten zwischen 50 und 75 Jahren nach elektiver Koronararterienbypassoperation unter extrakorporaler Zirkulation immunologisch untersucht. Mittels des angewendeten APACHE II Scores konnten wir Patienten mit blander postoperativer Prognose von „high-risk-“ Patienten für ein MODS unterscheiden und so als erste Arbeitsgruppe einem Vergleich hinsichtlich der inflammatorischen Reaktion zugänglich machen. Ausschlusskriterien für die Patienten waren ein bestehender Diabetes mellitus, Leber- oder Nierenfunktionsstörungen, Steroidmedikation, Krebsleiden, vorliegende Immundefekterkrankungen, Herzklappenerkrankungen, eine reduzierte Ejektionsfraktion des Herzens sowie Gerinnungsstörungen.

Die Kontrollgruppe hatte 15 Patienten, die SIRS-Gruppe mit drohendem MODS umfasste 10 Patienten.

Bei vergleichbarer Narkoseführung wurde bei den Patienten eine standardisierte elektive Myokardrevaskularisierung unter extrakorporaler Zirkulation durchgeführt.

Jeweils am Morgen der ersten vier postoperativen Tage wurden den Patienten aus arteriellen Kanülen Blutproben entnommen und mittels kommerziell erhältlicher Nachweisverfahren untersucht. Die Spiegel der Zytokine IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, TGF β ₁ sowie der löslichen Form des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 wurden mit ELISA-Kits, die des Entzündungsparameters Procalcitonin durch einen Chemolumineszenzassay und die Anteile spezifischer Lymphozytensubpopulationen (T-Lymphozyten, aktivierte T-Lymphozyten, T-Helferzellen, frühaktivierte T-Helferzellen, zytotoxische-Suppressor-T-Zellen, frühaktivierte zytotoxische-Suppressor-T-Zellen, natürliche Killerzellen, B-Lymphozyten) an den Gesamtlymphozyten auf Basis der Immunfluoreszenzmethodik durchflusszytometrisch bestimmt.

Die Ergebnisse der Zytokinuntersuchungen waren für die Kontrollgruppe durchaus mit der vorhandenen Literatur vereinbar. Wir konnten darüber hinaus zum ersten Mal zeigen, dass Patienten mit schwerem SIRS nach CPB signifikant höhere Spiegel von pro-inflammatorischen Zytokinen (IL-2, IL-6, IL-8) vorweisen, die mit einer ähnlichen Tendenz der Spiegel anti-inflammatorischer Mediatoren einhergingen: Für IL-10 konnten höhere Konzentrationen ohne Signifikanz, für TGF β ₁ signifikant höhere Spiegel bei der SIRS-Gruppe beobachtet werden.

Ein weiterer Hinweis auf eine verstärkte Aktivierung der pro-inflammatorischen Komponente im Rahmen des schweren SIRS nach CPB wurde bei der Untersuchung des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 gefunden: Die sICAM-1 Plasmakonzentrationen der SIRS-Gruppe waren zu allen Messzeitpunkten signifikant höher.

Gemäss weiterer Ergebnisse dieser Studie scheint mit Procalcitonin ein Entzündungsmarker mit herausragender prognostischer Wertigkeit zur Verfügung zu stehen. Die Plasmaspiegel dieses Parameters unterschieden sich nicht nur beim Vergleich der SIRS-Gruppe mit der Kontrollgruppe zu allen Messzeitpunkten signifikant, sondern auch beim Vergleich innerhalb der SIRS-Gruppe zwischen perioperativ verstorbenen und überlebenden Patienten.

Bei den Untersuchungen der zellulären Parameter fand man bei der Kontrollgruppe mit der Literatur übereinstimmende Veränderungen der Lymphozytenpopulationen. Es kam frühpostoperativ initial zu einer v.a. durch Reduktion der Anteile der T-Helferzellen ausgelösten Verringerung der Anteile der T-Lymphozyten mit nachfolgender Normalisierungstendenz. Diese u.a. zur Reduktion der T4/T8-Ratio führende Veränderung wird allgemein als Ausdruck einer Immunkompromittierung angesehen. Wir erhoben in dieser Studie jedoch dieser Annahme widersprechende Befunde: Es zeigten sich Veränderungen bei den T-Zellen, die auf eine grössere T4/T8-Ratio der SIRS-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe hinweisen. Zudem wurden in der SIRS-Gruppe signifikant erhöhte Anteile frühaktivierter T-Helferzellen gefunden. Bei den aktivierten T-Lymphozyten, den T-Helferzellen, den frühaktivierten zytotoxischen-Suppressorzellen sowie den NK-Zellen zeigten sich zwischen den Patientengruppen keine Unterschiede. Für die B-Lymphozyten wurde in der SIRS-Gruppe ab dem zweiten postoperativen Tag signifikant höhere Anteile gemessen.

Die Veränderungen bei Anteilen der Lymphozytenpopulationen deuten wir als eine adaptive pathophysiologische Reaktion auf den vorliegenden Insult (Operation, CPB, etc.), welche nicht ohne weiteres als immunsupprimierter Zustand zu werten ist. Bislang konnte auch noch kein klinisches Korrelat der gemäss den Labordaten postulierten Immunsuppression gefunden werden.

Abschliessend interpretieren wir die immunologischen Vorgänge beim schweren SIRS als ein „Mixed Antagonist Response Syndrome (MARS)“ gemäss den Ausführungen von Bone [13-15] mit Hochregulation sowohl pro- als auch anti-inflammatorischer Effektoren. Die zeitliche Ausdehnung des Eingriffs erachten wir als wesentlich für den Schweregrad des entstehenden SIRS nach CPB. Wir betonen gleichzeitig die prognostische Wertigkeit des Entzündungsmarkers Procalcitonin bei SIRS-Patienten nach Herzchirurgie unter extrakorporaler Zirkulation.

Literatur

- 1. Adamik B, Kubler-Kielb J, Golebiowska B, et al.:**
Effect of sepsis and cardiac surgery with cardiopulmonary bypass on plasma level of nitric oxide metabolites, neopterin, and procalcitonin: correlation with mortality and postoperative complications.
Intensive Care Med 2000; 26(9): **1259-67**.
- 2. Akira S, Taga T, Kishimoto T:**
Interleukin-6 in biology and medicine.
Adv Immunol 1993; 54(5 Suppl): **1-78**.
- 3. Andersen LW, Landow L, Baek L, et al.:**
Association between gastric intramucosal pH and splanchnic endotoxin, antibody to endotoxin, and tumor necrosis factor-alpha concentrations in patients undergoing cardiopulmonary bypass.
Crit Care Med 1993; 21(2): **210-7**.
- 4. Aoufi A, Piriou V, Blanc P, et al.:**
Effect of cardiopulmonary bypass on serum procalcitonin and C-reactive protein concentrations.
Br J Anaesth 1999; 83(4): **602-7**.
- 5. Assicot M, Gendrel D, Carsin H, et al.:**
High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection.
Lancet 1993; 341(8844): **515-8**.
- 6. Baggiolini M, Clark-Lewis I:**
Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine.
FEBS Lett 1992; 307(1): **97-101**.
- 7. Becker KL, Monaghan KG, Silva OL:**
Immunocytochemical localization of calcitonin in Kulchitsky cells of human lung.
Arch Pathol Lab Med 1980; 104(4): **196-8**.
- 8. Biassoni R, Ferrini S, Prigione I, et al.:**
CD3-negative lymphokine-activated cytotoxic cells express the CD3 epsilon gene.
J Immunol 1988; 140(5): **1685-9**.
- 9. Bihari DJ:**
Prevention of multiple organ failure in the critically ill.
Update in intensive care and emergency medicine. Springer, 1987: 26-39.
- 10. Boeken U, Feindt P, Micek M, et al.:**
Procalcitonin (PCT) in cardiac surgery: diagnostik value in systemic inflammatory response syndrome (SIRS), sepsis and after heart transplantation.
Cardiovasc Surg 2000; 8(7): **550-4**.

-
- 11. Boeken U, Feindt P, Petzold T, et al.:**
Diagnostic value of procalcitonin: the influence of cardiopulmonary bypass, aprotinin, SIRS, and sepsis.
Thorac Cardiovasc Surg 1998; 46(6): **348-51.**
- 12. Boldt J, Osmer C, Linke LC, et al.:**
Circulating adhesion molecules in pediatric cardiac surgery.
Anesth Analg 1995; 81(6): **1129-35.**
- 13. Bone RC:**
Immunologic Dissonance: A continuing Evolution in Our Understanding of the Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) and the Multiple Organ Dysfunction Syndrome (MODS).
Ann Intern Med 1996; 125(8): **680-7.**
- 14. Bone RC:**
Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS.
Crit Care Med 1996; 24(7): **1125-8.**
- 15. Bone RC:**
Toward a theory regarding the pathogenesis of the systemic inflammatory response syndrome: What we do and do not know about cytokine regulation.
Crit Care Med 1996; 24(1): **163-72.**
- 16. Brodsky FM:**
A matrix approach to human class II histocompatibility antigens: reactions of four monoclonal antibodies with the products of nine haplotypes.
Immunogenetics 1984; 19(3): **179-94.**
- 17. Brody JI, Pickering NJ, Fink GB, et al.:**
Altered lymphocyte subsets during cardiopulmonary bypass.
Am J Clin Pathol 1987; 87(5): **626-8.**
- 18. Bühl A, Zöfel P:**
SPSS für Windows.
Addison-Wesley GmbH, 1994.
- 19. Butler J, Rucker GM, Westaby S:**
Inflammatory response to cardiopulmonary bypass.
Ann Thorac Surg 1993; 55(2): **552-9.**
- 20. Calvelli T, Denny TN, Paxton H, et al.:**
Guideline for flow cytometric immunophenotyping: a report from the National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Division of AIDS.
Cytometry 1993; 14(7): **702-15.**
- 21. Calvo F, Solary E, Gauville C:**
Transforming growth factors alpha and beta: a review of their characteristics and potential pharmacological applications.
Nouv Rev Fr Hematol 1990; 32(1): **71-5.**
-

-
- 22. Casey LC:**
Role of cytokines in the pathogenesis of cardiopulmonary-induced multisystem organ failure.
Ann Thorac Surg 1993; 56(5 Suppl): **S92-6.**
- 23. Casey LC, Balk RA, Bone RC:**
Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome.
Ann Intern Med 1993; 119(8): **771-8.**
- 24. Chen JH, Prince H, Buck D:**
Leu-23 : An early activation antigen on human lymphocytes.
Fed Proc 1988; 2(5): **A1214.**
- 25. Chernoff AE, Granowitz EV, Shapiro L, et al.:**
A randomized, controlled trial of IL-10 in humans. Inhibition of inflammatory cytokine production and immune responses.
J Immunol 1995; 154(10): **5492-5499.**
- 26. Coons AH, Creech HJ, Jones RN:**
Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group.
Proc Soc Exptl Biol Med 1941; 47: **200.**
- 27. Costa P:**
CD56 Workshop Panel report.
Leucocyte Typing VI, White cell Differentiation Antigens.
Garland Publishing, Inc., 1997: 271-2.
- 28. Cremer J, Martin M, Redl H, et al.:**
Systemic Inflammatory Response Syndrome After Cardiac Operations.
Ann Thorac Surg 1996; 61: **1714-20.**
- 29. Damiano AM, Bergner M, Draper EA, et al.:**
Reliability of a measure of severity of illness: acute physiology of chronic health evaluation-II.
J Clin Epidemiol 1992; 45(2): **93-101.**
- 30. Dandona P, Nix D, Wilson MF, et al.:**
Procalcitonin increase after endotoxin injection in normal subjects.
J Clin Endocrinol Metab 1994; 79(6): **1605-8.**
- 31. Davies MG, Hagen PO:**
Systemic inflammatory response syndrome.
Br J Surg 1997; 84(7): **920-35.**
- 32. de Werra I, Jaccard C, Corradin SB, et al.:**
Cytokines, nitrite/nitrate, soluble tumor necrosis factor receptors, and procalcitonin concentrations: comparisons in patients with septic shock, cardiogenic shock, and bacterial pneumonia.
Crit Care Med 1997; 25(4): **607-13.**
-

-
- 33. Deng MC, Wiedner M, Erren M, et al.:**
Arterial and venous cytokine response to cardiopulmonary bypass for low risk CABG and relations to hemodynamics.
Eur J Cardio-thorac Surg 1995; 9: 22-9.
- 34. Dickinson FB:**
SimulSETtm Software User's Guide 1994.
- 35. Diegeler A, Tarnok A, Rauch T, et al.:**
Changes of leucocyte subsets in coronary artery bypass surgery: cardiopulmonary bypass versus 'off-pump' techniques.
Thorac Cardiovasc Surg 1998; 46(6): 327-32.
- 36. Edmunds LH:**
Blood-surface interactions during cardiopulmonary bypass.
J Card Surg 1993; 8(3): 404-10.
- 37. Entman ML, Youker KA, Shojit T, et al.:**
Neutrophil induced oxidative injury of cardiac myocytes: a compartment system requiring CD11b/CD18-ICAM-1 adherence.
J Clin Invest 1992; 90(4): 1335-45.
- 38. Gaensslen H, Schubö W:**
Einfache und komplexe statistische Analyse.
Ernst Reinhardt Verlag München/Basel 1976
- 39. Geissler K:**
Current status of clinical development of interleukin-10.
Curr Opin Hematol 1996; 3(3): 203-8.
- 40. Hall RI, Smith MS, Rucker G:**
The systemic inflammatory response to cardiopulmonary bypass: pathophysiological, therapeutic, and pharmacological considerations.
Anesth Analg 1997; 85(4): 766-82.
- 41. Harken AH, Lillo RS, Hufnagel HV:**
Direct influence of endotoxin on cellular respiration.
Surg Gynecol Obstet 1975; 140(6): 858-60.
- 42. Hartung J:**
Lehr- und Handbuch der angewandten Statistik, 7. Auflage.
Oldenbourg Verlag GmbH München, 1989
- 43. He YW, Malek TR:**
The structure and function of gamma c-dependent cytokines and receptors: regulation of T lymphocyte development and homeostasis.
Crit Rev Immunol 1998; 18(6): 503-24.
- 44. Hebert CA, Baker JB:**
Interleukin-8: a review.
Cancer Invest 1993; 11(6): 743-50.
-

-
- 45. Hennein HA, Ebba H, Rodriguez JL, et al.:**
Relationship of the proinflammatory cytokines to myocardial ischemia and dysfunction after uncomplicated coronary revascularization.
J Thorac Cardiovasc Surg 1994; 108(4): **626-35**.
- 46. Hensel M, Volk T, Döcke WD, et al.:**
Hyperprocalcitonemia in Patients with Noninfectious SIRS and Pulmonary Dysfunction Associated with Cardiopulmonary Bypass.
Anesthesiology 1998; 89(1): **93-104**.
- 47. Hill GE:**
The inflammatory response to cardiopulmonary bypass.
Int Anesthesiol Clin 1996; 34(2): **95-108**.
- 48. Hisatomi K, Isomura T, Kawara T, et al.:**
Changes in lymphocyte subsets, mitogen responsiveness, and interleukin-2 production after cardiac operations.
J Thorac Cardiovasc Surg 1989; 98(4): **580-91**.
- 49. Ho AS, Moore KW:**
Interleukin-10 and its receptor.
Ther Immunol 1994; 1(3): **173-85**.
- 50. Holzheimer RG, Molloy RG, Görlach H, et al.:**
IL-6 and TNF alpha Release in Association with Neutrophil Activation after Cardiopulmonary Bypass Surgery.
Infection 1994; 22(1): **37-42**.
- 51. Ide H, Kakiuchi T, Furuta N, et al.:**
The effect of cardiopulmonary bypass on T cells and their subpopulations.
Ann Thorac Surg 1987; 44(3): **277-82**.
- 52. Kawamura T, Wakusawa R, Okada K, et al.:**
Elevation of cytokines during open heart surgery with cardiopulmonary bypass: participation of interleukin 8 and 6 in reperfusion injury.
Can J Anaesth 1993; 40(11): **1016-21**.
- 53. Kharazmi A, Andersen LW, Baek L, et al.:**
Endotoxemia and enhanced generation of oxygen radicals by neutrophils from patients undergoing cardiopulmonary bypass.
J Thorac Cardiovasc Surg 1989; 98(3): **381-5**.
- 54. Kilbride PM, Mayer JE, Newberger JW, et al.:**
Induction of intercellular adhesion molecule-1 and E-selectin mRNA in heart and skeletal muscle of pediatric patients undergoing cardiopulmonary bypass.
J Thorac Cardiovasc Surg 1994; 107(5): **1183-92**.
- 55. Kirk RE:**
Experimental design, 2nd edition.
Brooks/Cole, Monterey, California., 1982
-

-
- 56. Kirklin JK, Westaby S, Blackstone EH, et al.:**
Complement and the damaging effects of cardiopulmonary bypass.
J Thorac Cardiovasc Surg 1983; 86(6): **845-57.**
- 57. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, et al.:**
APACHE II: a severity of disease classification system.
Crit Care Med 1985; 13(10): **818-29.**
- 58. Knaus WA, Le Gall JR, Wagner DP, et al.:**
A comparison of intensive care in the U.S.A. and France.
Lancet 1982; 2(8299): **642-6.**
- 59. Köhler W, Schachtel G, Voleske P:**
Biostatistik 2. Auflage.
Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, 1996
- 60. Kolitz JE, Welte K, Sykora KW, et al.:**
Interleukin 2: A Review.
Arzneim-Forsch 1985; 35(10): **1607-35.**
- 61. Krensky AM, Lanier LL, Engleman EG:**
Lymphocyte subsets and surface molecules in man.
Clin Immunol Rev 1985; 4(1): **95-138.**
- 62. Lahat N, Shtiller R, Zlotnick AY, et al.:**
Early IL-2/sIL-2R surge following surgery leads to temporary immune refractoriness.
Clin Exp Immunol 1993; 92(3): **482-6.**
- 63. Larsen R:**
Anästhesie.
5 ed. Urban&Schwarzenberg, 1995: 775.
- 64. Lawrence DA:**
Transforming growth factor-beta: a general review.
Eur Cytokine Netw 1996; 7(3): **363-74.**
- 65. Lefer AM, Ma XL, Weyrich AS, et al.:**
Mechanism of the cardioprotective effect of transforming growth faktor beta 1 in feline myocardial ischemia and reperfusion.
Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: **1018-22.**
- 66. Lewis DE, Barron KS, Miller GP, et al.:**
Multiparameter analysis of human lymphocyte subpopulations using flow cytometry.
Surv Synth Pathol Res 1985; 4(3): **237-47.**
- 67. Loken MR, Brosnan JM, Bach BA, et al.:**
Establishing optimal lymphocyte gates for immunophenotyping by flow cytometry.
Cytometry 1990; 11(4): **453-9.**
-

-
- 68. Lorenz R:**
Grundbegriffe der Biometrie, 2. Auflage.
Fischer-Verlag Stuttgart/New York, 1988, 1988
- 69. Malik AB:**
Endothelial cell interactions and integrins.
New Horiz 1993; 1(1): 37-51.
- 70. Markewitz A, Faist E, Lang S, et al.:**
Successful restauration of cell-mediated immune response after cardiopulmonary bypass by immunomodulation.
J Thorac Cardiovasc Surg 1993; 105(1): 15-24.
- 71. Markewitz A, Faist E, Lang S, et al.:**
An imbalance in T-helper cell subsets alters immune response after cardiac surgery.
Eur J Cardiothorac Surg 1996; 10(1): 61-7.
- 72. Maxwell S, Delaney H:**
Designing experiments and analyzing data.
Wadsworth, Belmont, California., 1990
- 73. Meisner M:**
Procalcitonin a new, innovative marker for severe infection and sepsis.
ISBN 3-00-000803-9, 1996
- 74. Meisner M, Tschakowsky K, Schnabel S, et al.:**
Procalcitonin-influence of temperature, storage, anticoagulation and arterial or venous asservation of blood samples on procalcitonin concentrations.
Eur J Clin Chem Clin Biochem 1997; 35(8): 597-601.
- 75. Metinko AP, Kunkel SL, Standiford TJ, et al.:**
Anoxia-hyperoxia induces monocyte-derived interleukin-8.
J Clin Invest 1992; 90(3): 791-8.
- 76. Miller BE, Levy JH:**
The inflammatory response to cardiopulmonary bypass.
J Cardiothorac Vasc Anesth 1997; 11(3): 355-66.
- 77. Misoph M, Babin-Ebell J, Schwender S, et al.:**
Response of the cellular immune system to cardiopulmonary bypass in vivo.
Thorac Cardiovasc Surg 1997; 45(5): 217-23.
- 78. Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, et al.:**
Interleukin-10.
Annu Rev Immunol 1993; 11(3): 165-90.
- 79. Mullaney PF, Van Dilla MA, Coulter JR, et al.:**
Cell sizing: a light scattering photometer for rapid volume determination.
Rev Sci Instrum 1969; 40(8): 1029-32.
-

80. Naldini A, Borelli E, Cesari S, et al.:

In vitro cytokine production and T-cell proliferation in patients undergoing cardiopulmonary Bypass.

Cytokine 1995; 7(2): 165-70.

81. Neumeier D, Pauls R, Wifling I, et al.:

Immunophenotyping of lymphocyte subpopulations using monoclonal antibodies in an analytical flow cytometer: evaluation of the method and reference values.

J Clin Chem Clin Biochem 1985; 23(11): 765-75.

82. Nguyen DM, Mulder DS, Shennib H:

Effect of cardiopulmonary bypass on circulating lymphocyte function.

Ann Thorac Surg 1992; 53(4): 611-6.

83. Nylen ES, Whang KT, Snider RH, et al.:

Mortality is increased by procalcitonin and decreased by an antiserum reactive to procalcitonin in experimental sepsis.

Crit Care Med 1998; 26(6): 1001-6.

84. Nystrom PO, Bax R, Dellinger EP, et al.:

Proposed definitions for diagnosis, severity scoring, stratification, and outcome for trials on intraabdominal infection. Joint Working Party of SIS North America and Europe.

World J Surg 1990; 14(2): 148-58.

85. Oh TE, Hutchinson R, Short S, et al.:

Verification of the Acute Physiology and Chronic Health Evaluation scoring system in a Hong Kong intensive care unit.

Crit Care Med 1993; 21(5): 698-705.

86. Oswald IP, Gazzinelli RT, Sher A, et al.:

IL-10 synergizes with IL-4 and transforming growth factor-beta to inhibit macrophage cytotoxic activity.

J Immunol 1992; 148(11): 3578-82.

87. Piatier-Tonneau D:

CD4 Workshop Panel report.

Leucocyte Typing IV, Garland Publishing, Inc., 1997: 49-54.

88. Pilz G, Fraunberger P, Appel R, et al.:

Early prediction of outcome in score-identified, postcardiac surgical patients at high risk for sepsis, using soluble tumor necrosis factor receptor-p55 concentrations.

Crit Care Med 1996; 24(4): 596-600.

89. Pilz G, Kreuzer E, Kaab S, et al.:

Early sepsis treatment with immunoglobulins after cardiac surgery in score-identified high-risk patients.

Chest 1994; 105(1): 76-82.

-
- 90. Pilz G, Werdan K:**
Scores for multiple organ dysfunction and multiple organ failure.
Internist (Berl) 1998; 39(5): 502-8.
- 91. Raffael A:**
Grundlagen der analytischen Durchflußcytometrie.
GIT Labormedizin, 1988. 89-97.
- 92. Robb RJ:**
Interleukin-2: The molecule and its function.
Imm Today 1984; 5: 203-208.
- 93. Robbins PA, Evans EL, Ding AH, et al.:**
Monoclonal antibodies that distinguish between class II antigens (HLA-DP, DQ, and DR) in 14 haplotypes.
Hum Immunol 1987; 18(4): 301-13.
- 94. Rogers J, Fuller HD:**
Use of daily Acute Physiology and Chronic Health Evaluation (APACHE) II scores to predict individual patient survival rate.
Crit Care Med 1994; 22(9): 1402-5.
- 95. Rosenbloom AJ, Pinsky MR, Bryant JL, et al.:**
Leucocyte activation in the peripheral blood of patients with cirrhosis of the liver and SIRS: Correlation with serum interleukin-6 levels and organ dysfunction.
JAMA 1995; 274: 58-65.
- 96. Roth JA, Golub SH, Cuckingnan RA, et al.:**
Cell-mediated immunity is depressed following cardiopulmonary bypass.
Ann Thorac Surg 1981; 31(4): 350-6.
- 97. Rothenburger M, Markewitz A, Lenz T, et al.:**
Detection of acute phase response and infection. The role of procalcitonin and C-reactive protein.
Clin Chem Lab Med 1999; 37(3): 275-9.
- 98. Royston D:**
Systemic inflammatory responses to surgery with cardiopulmonary bypass.
Perfusion 1996; 11(3): 177-89.
- 99. Ryhanen P, Huttunen K, Ilonen J:**
Natural killer cell activity after open-heart surgery.
Acta Anaesthesiol Scand 1984; 28(5): 490-2.
- 100. Sablotzki A, Mann V, Menges T, et al.:**
Veränderungen der Lymphozyten-Subpopulationen nach unkomplizierten kardiochirurgischen Eingriffen.
J Lab Med 1998; 22(7/8): 442.
-

-
- 101. Sablotzki A, Mann V, Simm A, et al.:**
Veränderungen des Zytokin-Netzwerkes bei eskalierendem SIRS nach herzchirurgischen Operationen.
Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther 2001; 36: 552-559.
- 102. Saito T, Yamazaki T:**
CD3 Workshop Panel report.
Leucocyte Typing VI, Garland Publishing, Inc., 1997: 44-48.
- 103. Salzman GC, Crowell JM, Martin JC, et al.:**
Cell classification by laser light scattering: identification and separation of unstained leukocytes.
Acta Cytol 1975; 19(4): 374-7.
- 104. Sawa Y, Shimazaki Y, Kadoba K, et al.:**
Attenuation of cardiopulmonary bypass-derived inflammatory reactions reduces myocardial reperfusion injury in cardiac operations.
J Thorac Cardiovasc Surg 1996; 111(1): 29-35.
- 105. Schmitt E, Hoehn P, Huels C, et al.:**
T helper type 1 development of naive CD4+ T cells requires the coordinate action of interleukin-12 and interferon-gamma and is inhibited by transforming growth factor-beta.
Eur J Immunol 1994; 24(4): 793-8.
- 106. Schuster HP:**
Prognosestellung und Scoresysteme in der Intensivmedizin.
Intensivmed 1997; 34: 817-27.
- 107. Smith CW, Entman ML, Lance CL, et al.:**
Adherence of neutrophils to canine cardiac myocytes in vitro is dependent on intercellular adhesion molecule-1.
J Clin Invest 1991; 88(4): 1216-23.
- 108. Spits H, de Waal Malefyt R:**
Functional characterization of human IL-10.
Int Arch Allergy Immunol 1992; 99(1): 8-15.
- 109. Steinbach G, Grunert A:**
Procalcitonin-a new indicator for bacterial infections.
Exp Clin Endocrinol Diabetes 1998; 106(3): 164-7.
- 110. Steinberg JB, Kapelanski DP, Olson JD, et al.:**
Cytokine and complement levels in patients undergoing cardiopulmonary bypass.
J-Thorac-Cardiovasc-Surg 1993; 106(6): 1008-16.
- 111. Stevens J:**
Applied multivariate statistics for the social science.
Lawrence Erlbaum, New Jersey 1992., 1992
-

112. Stewart CC:

Multiparameter analysis of leukocytes by flow cytometry.
Methods Cell Biol 1990; 33(4): 427-50.

113. Stordeur P, Goldman M:

Interleukin-10 as a regulatory cytokine induced by cellular stress: molecular aspects.
Int Rev Immunol 1998; 16(5-6): 501-22.

114. Tabassian AR, Nylen ES, Linnoila RI, et al.:

Stimulation of hamster pulmonary neuroendocrine cells and associated peptides by repeated exposure to cigarette smoke.
Am Rev Respir Dis 1989; 140(2): 436-40.

115. Tajima K, Yamamoto F, Kawazoe K, et al.:

Cardiopulmonary bypass and cellular immunity: changes in lymphocyte subsets and natural killer cell activity.
Ann Thorac Surg 1993; 55(3): 625-30.

116. Teres D, Lemeshow S:

Why severity models should be used with caution.
Crit Care Clin 1994; 10(1): 93-110; discussion 111-5.

117. Testi R, Phillips JH, Lanier LL:

Constitutive expression of a phosphorylated activation antigen (Leu 23) by CD3 bright human thymocytes.
J Immunol 1988; 141(8): 2557-63.

118. Testi R, Phillips JH, Lanier LL:

Leu 23 induction as an early marker of functional CD3/T cell antigen receptor triggering. Requirement for receptor cross-linking, prolonged elevation of intracellular [Ca⁺⁺] and stimulation of protein kinase C.
J Immunol 1989; 142(6): 1854-60.

119. Tomasello E:

CD69 Workshop Panel report.
Leucocyte Typing VI, Garland Publishing, Inc., 1997: 277-79.

120. Tonnesen E, Brinklov MM, Christensen NJ, et al.:

Natural killer cell activity and lymphocyte function during and after coronary bypass grafting in relation to the endocrine stress response.
Anesthesiology 1987; 67(4): 526-33.

121. Wan S, LeClerc JL, Vincent JL:

Inflammatory response to cardiopulmonary bypass: mechanisms involved and possible therapeutic strategies.
Chest 1997; 112(3): 676-92.

122. Welters I, Menges T, Ballesteros M, et al.:

Acute phase and opsonin response in cardiac surgery patients: influence of underlying cardiac disease.
Perfusion 1998; 13(6): 447-54.

123. Westaby S:

Organ dysfunction after cardiopulmonary bypass. A systemic inflammatory reaction initiated by the extracorporeal circuit.

Intensive Care Med 1987; 13(2): **89-95.**

124. Whang KT, Vath SD, Nylen ES, et al.:

Procalcitonin and proinflammatory cytokine in interactions in sepsis.

Shock 1999; 12(4): **268-73.**

125. Wisner DH:

History and current status of scoring systems for critical care.

Arch Surg 1992; 127(3): **352-6.**

Anhang I Narkoseführung, Operation und verwendetes Material zur EKZ

I.I Narkose

Die Prämedikation am Vortag wurde mit Flunitrazepam (1 mg p.o.) durchgeführt. Am Operationstag verabreichte man den Patienten Morphin (30 mg p.o.) und Flunitrazepam (2 mg p.o.) ungefähr eine Stunde präoperativ. Die Einleitung und Aufrechterhaltung der Narkose für den Eingriff erfolgte bei allen Patienten mit gewichtsbezogenen Dosen von Sufentanil, Midazolam und Pancuronium. Die Patienten wurden maschinell bei einem FIO₂ von 1 volumenkontrolliert beatmet. Während der extrakorporalen Zirkulation wurden die Lungen mit Raumluft (FIO₂=0,21) unter Beibehaltung eines positiv endexpiratorischen Drucks (PEEP) von 5 cm H₂O statisch insuffliert. Es erfolgten engmaschige Blutgaskontrollen. Das intraoperative Herzmonitoring wurde über zentralvenös und pulmonalarteriell platzierte Katheter durchgeführt. Der Blutdruck wurde blutig über die A. radialis abgeleitet.

I.II Operationsablauf

Simultan zur Entnahme der autologen V. saphena magna in geeigneter Länge erfolgte die Freilegung des Herzens durch mediane Sternotomie und, wenn möglich, die uni- oder bilaterale Präparation der A. mammaria interna (anatomisch: A. thoracica interna).

Zur systemischen Antikoagulation wurden 300 I.E. Heparin/kgKG intravenös appliziert. Im Verlauf wurde die Gerinnung mittels Activated Clotting Time (ACT) überwacht und bei Bedarf (ACT<400 Sekunden während der extrakorporalen Zirkulation) wurden zusätzlich 150 I.E./kgKG Heparin gegeben.

Zum arteriellen Anschluss der Herz-Lungen-Maschine wurde die Aorta ascendens kanüliert. Die venöse Ableitung erfolgte über eine in den rechten Vorhof eingebrachte „Two-Stage“-Kanüle. Diese sammelt über eine ihrer Öffnungen, welche im Bereich der V. cava inferior platziert wird, hauptsächlich Blut der unteren Körperhälfte, während durch die andere Öffnung, die im rechten Vorhof zum Liegen kommt, das Blut v.a. aus der oberen Körperhälfte abgeleitet wird. Da bei diesem Prinzip Blut an der Kanüle vorbei in den Lungenkreislauf gelangen kann, wird es auch partieller Bypass genannt (s. Abb. 8). Nach sukzessiver Übernahme der Körperperfusion durch Steigerung des Maschinenflusses bis zum Wert von 2.4 l/min/m² KOF bei gleichzeitiger Körpertemperaturreduktion auf 33-34°C rektal (moderate Hypothermie) wurde die Aorta ascendens abgeklemmt. Mittels 1000 ml 4 °C kalter kardioplegischer Lösung-HTK nach Bretschneider(s.u.) wurde der hypotherme Herzstillstand induziert. Topisch wurde das Herz mit eiskalter Ringer-Lösung gekühlt. Je nach Dauer der

Ischämiezeit wurde bei nachlassender Myokardprotection weitere 200-800 ml kardioplege Lösung zugeführt.

Da bei der partiellen Bypasstechnik eine minimale Lungenkreislaufperfusion erhalten bleibt, muss das linke Herz durch einen Absaugkatheter (VENT) entlastet werden. Dieser wird über ein in die Aorta gestanztes Ostium transvalvulär eingebracht.

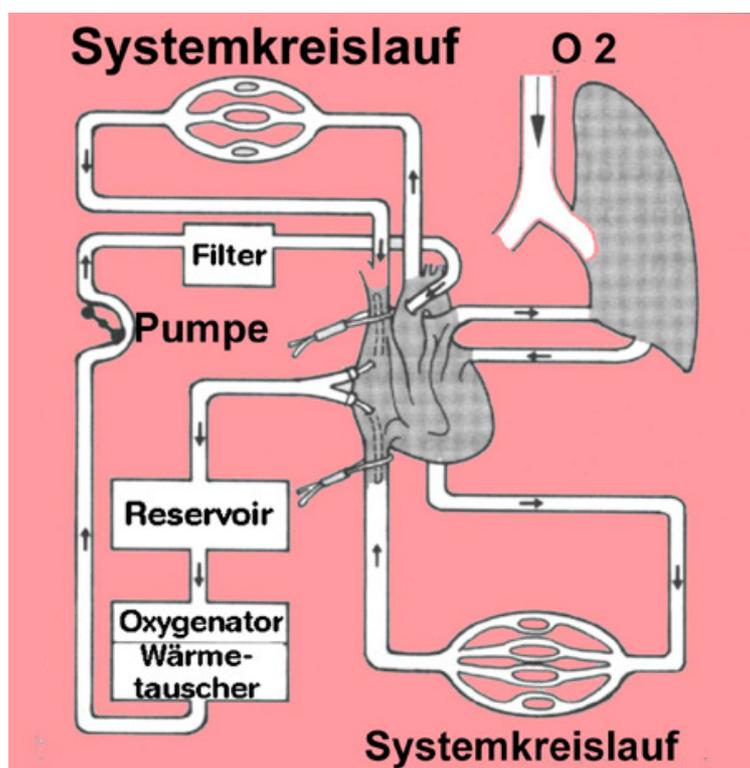


Abb. 8: Schema eines partiellen kardiopulmonalen Bypasses aus [63]

Nach Anlage der peripheren Anastomosen zwischen den Venentransplantaten und den betroffenen Koronararterien bzw. nach derer Anastomose mit der A. mammaria interna konnte die Myokardischämie durch Öffnen der Aortenklemme beendet werden. Dabei wurde das Herz sorgfältig entlüftet. Während der Reperfusionphase wurden die zentralen Anastomosen im Bereich der tangential ausgeklemmten Aorta ascendens angelegt. Der Patient wurde gleichzeitig wieder bis zur Normaltemperatur aufgewärmt. Nach Beendigung der extrakorporalen Zirkulation und Dekanülierung wurde das zirkulierende Heparin durch Protamingabe antagonisiert. Die Bluttrockenheit des Operationssitus wurde kontrolliert, Schrittmacherelektroden platziert, es folgte die Einlage der Drainagen, die Vereinigung des Brustbeins durch Drahtnähte, schichtweiser Wundverschluss und Verband.

I.III Materialien für die extrakorporale Zirkulation

Oxygenatoren: Es wurden bei den Patienten der Studie ausschließlich Hohlfasermembran-oxygenatoren verwendet. Es handelte sich um offene Systeme. Der Perfusionsdruck während des kardiopulmonalen Bypasses wurde zwischen 50 und 70 mmHg gehalten, bei einer moderaten Hypothermie von $33,8 \pm 1,0$ °C rektal. Zwei Fabrikate kamen bei den Patienten dieser Studie zur Anwendung:

Monolyth (Fa. Sorin Biomedica, Deutschland), Quadrox (Fa. Jostra, Deutschland)

Priminglösung:

2000 ml	Ringer-Lösung	(Fa. Fresenius, Bad Homburg)
50 ml	Natriumchlorid 10%	(Fa. Braun, Melsungen)
250 ml	Humanalbumin 5%	(Fa. Behring, Marburg)
20 ml	Kaliumchlorid 7,46%	(Fa. Braun, Melsungen)
100 ml	Natriumbikarbonat 8,4%	(Fa. Braun, Melsungen)
1250 I.E.	Heparin	(Fa. Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen)

Weitere Komponenten der Herzlungenmaschine:

Schlauchsysteme :	Perfusionsset (Fa. Stöckert)
Kardiotomiereservoir:	Gleicher Hersteller wie jeweiliger Oxygenator
Arterielle Filter:	<i>Sorin ABF 40 μm</i>
Arterielle Kanüle:	i.d.R. 6,5 mm, jedoch bzgl. KOF angepasst (Fa. Stöckert)
Venöse Kanüle:	„Two-Stage“-Kanüle, an KOF angepasst (Fa. Stöckert)
Hämofilter:	1. HF 80 (Fa. Fresenius), 2. Bellco Rapido (Fa. Sorin)
Kardioplegie:	Lösung-HTK nach Bretschneider, i.e. Custodiol® (Köhler Chemie, Alsbach)
Temperatursonde	„YSI“ (Yellow Springs Instr., USA)
Oxy-Sat-Meter:	Bentley SM-0100 (Bentley Laboratories)
Gasflowmeter:	Sechrist Gasblender (Sechrist Ind., USA)
Wärmetauscher:	„Normo-Hypothermiegerät“ (Fa Stöckert)
Pumpensystem:	Rollerpumpen-Prinzip (Fa Stöckert/Fa. Polystan, A.D. Krauth)

Anhang II Der Apache II Score im Überblick [57]

The Apache II Severity of Disease Classification System									
1. Acute Physiology Score (APS)									
Physiologische Variable	hoch abnormaler Bereich					niedrig abnormaler Bereich			
	4	3	2	1	0	1	2	3	4
Körpertemperatur(°C)	>41	39-40,9		38,5-38,9	36-38,4	34-36	32-33,9	30-31,9	<29,9
art. Mitteldruck (mmHg)	>160	130-159	110-129		70-109		50-69		<49
Herzfrequenz (1/min)	>180	140-179	110-139		70-109		50-69	40-54	<39
Atemfrequenz (1/min)	>50	35-49		25-34	12-24	10-11	6-9		<5
FiO2>0,5 (AaDo2)	>500	350-499	200-349		>200				
FiO2<0,5 (Pao2)mmHg					>70	61-70		55-60	<55
art. pH	>7.7	7.6-7.69		7.5-7.59	7.33-7.49		7.25-7.32	7.15-7.24	<7.15
Serum-Natrium (mmol/l)	>180	160-179	155-159	150-154	130-149		120-129	111-119	<110
Serum-Kalium (mmol/l)	>7	6-6.9		5.5-5.9	3.5-5.4	3-3.4	2.5-2.9		<2,5
Serum-Kreatinin (mg/dl)	>3.5	2-3.4	1.5-1.9		0.6-1.4		<0.6		
Hämatokrit (%)	>60		50-59.9	46-59.9	39-45.9	30-39	20-29.9		<20
Leukozyten (1000/cmm)	>40		20-39.9	15-19.9	3-14.9		1-2,9		<1
Glasgow-Coma-Scale	Score = 15 minus Glasgow-Coma-Scale Punkte								
Summe Punkte (APS)									
2. Alterspunkte :									
<44 Jahre	0	Punkte							
42-54Jahre	2	Punkte							
55-64Jahre	3	Punkte							
65-74Jahre	5	Punkte							
>75 Jahre	6	Punkte							
3. chronische Gesundheitspunkte:									
Wenn der Patient eine Anamnese mit schwerer Organ-System-Insuffizienz hat oder immunsupprimiert ist, wird wie folgt									
bepunktet:									
2Punkte für elektive postoperative Patienten									
5Punkte für nichtoperative oder Notfall postoperative Patienten									
Definitionen:									
Organinsuffizienz oder immunsupprimierter Zustand muss vor der Krankenhauseinweisung evident gewesen sein und folgende Kriterien erfüllen:									
Leber:	Zirrhosebeweisende Biopsie und dokumentierte portale Hypertension								
	Episoden von stattgehabter oberer GI-Blutung aufgrund portaler Hypertension								
	Frühere Episoden von Leberinsuffizienz/-Enzephalopathie/-Koma								
Herz-Kreislaufsystem:	NYHA Klasse IV								
Atmung:	Chronische restriktive, obstruktive oder vaskuläre Lungenerkrankung mit schwerer Einschränkung der Belastbarkeit oder nachgewiesener chronischer Hypoxie, Hyperkapnie								
	sekundärer Polyzythämie, schwerer pulmonaler Hypertonie (>40mmHg) oder Respirator-abhängigkeit								
Niere:	terminale Niereninsuffizienz mit Dialysebehandlung								
Immunschwäche:	Immunsuppressive Therapie, z.B. Chemotherapie, Immunsuppressiva, Bestrahlung, Langzeit- oder kürzliche High-Dose Steroidtherapie, immunabwehrschwächende Grunderkrankung, wie Leukämie, Lymphom, AIDS, etc.								
APACHE II SCORE:									
Apache II-Score=Summe von APS + Alterspunkte + chronische Gesundheitspunkte									
Apache II Gesamtpunkte:									

Abb. 9: Der Apache II Score im Überblick

Anhang III In der Studie genutztes Labormaterial

Blutröhrchen:

Fa. KABE Labortechnik, Nümbrecht

Transferpipette:	Fa. Sarstedt, Nümbrecht
Aqua dest.:	Fa. Pharmacia+Upjohn AS, Halden, Norwegen
Messzylinder:	je nach gewünschtem Volumen, Fa. VIT LAB, Seeheim
Pipettierhilfe:	je nach gewünschtem Volumen von Fa. Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen:	Größe je nach Pipettierhilfe von Fa. Eppendorf, Hamburg
Dispenser:	Dispensette®, Fa. Brand, Wertheim
Feinwaage:	Typ L310, Fa. Sartorius, Göttingen
Magnetrührer:	IDL, Nidderau
Bechergläser:	Fa. Schott, Mainz
Polystyrol-Röhrchen:	Fa. Sarstedt, Nümbrecht
Falconröhrchen:	Fa. Becton Dickinson, San Jose, Californien(USA)
Zentrifuge:	Hettich Universal /K25 Typ 1302
Tiefkühltruhe:	Bosch 6S368T
Vortex-Mischer:	Heidolph Reax 2000, Fa. Heidolph, Kehlheim
Horizontalschüttler	Heidolph Rotamax 120T, Fa. Heidolph, Kehlheim
ELISA-Shaker:	Easy Shaker EAS 214, Fa. SLT Lab Instruments, Österreich
ELISA-Washer:	EAWII, Fa. SLT Lab Instruments, Österreich
ELISA-Reader:	Behring EL 311 Microplate Reader, Fa. Dade&Behring, Marburg
ELISA-Auswertesoftware:	Behring ELISA-Auswert Software V.2.0.2, Fa. Dade&Behring, Marburg
HEPES:	Fa. Carl Roth, Karlsruhe HEPES ist (C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S)-Puffer
Natriumhydroxid:	Fa. Merck, Darmstadt
Harnstoff:	Fa. Merck, Darmstadt
Essigsäure:	Fa. Merck, Darmstadt
LUMItest® Basiskit:	Fa. Brahms, Berlin
LUMItest® Washkit.	Fa. Brahms, Berlin
Luminometer:	Luminometer Typ LB 9501 N, Fa. EG&G Berthold, Wildbach
Wasserstrahlpumpe	

PBS-Puffer:	PBS-Puffer-Konzentrat, Fa. BAG, Lich Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (Dulbeccos,modifiziert, ph 7,2 ± 0,2; 0,01 mol/l PO ₄ ; 0,15 mol/l NaCL)
Natriumazid (NaN ₃):	Fa. Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd:	Fa. Merck, Darmstadt
Lyselösung für Durch- flußzytometrie:	FACS tm Lysingsolution 10fach-Konzentrat, Fa. Becton,Dickinson, San Jose,Californien(USA)
Kalibrierung des Durch- flußzytometers:	CaliBRITE tm Beads (unmarkierte oder fluoreszenzfarbstoffmar- kierte Polymethylmethacrylat-Mikropartikel), Fa. Becton,Dick- inson, San Jose, Californien (USA)
Trägerflüssigkeit für CaliBRITE tm Beads	FACSFlow TM sheath fluid, Fa. Becton Dickinson, San Jose, Californien(USA)
Verdünnung:	
Reagenzienkits Antikörper für Durchflußzytometrie:	Simultest tm IMK Plus und FastImmune TM Assay System , Fa. Becton Dickinson, San Jose,Californien(USA)
Durchflußzytometer :	FacsCalibur, Fa. Becton Dickinson, San Jose,Californien(USA)
Software:	Becton Dickinson Simultest IMK Plus-Software FACSComp tm -Software, Fa. Becton Dickinson
Datenverarbeitung:	FACStation, von Fa. Becton Dickinson auf den Zytometer- gebrauch angepasstes Datenmanagementsystem auf Macintosh- Ebene

Anhang IV Wertetabellen**IV.I Übersichtstabelle der Daten von SIRS- und Kontrollgruppe**

Tab. 7: Übersichtstabelle der Daten von SIRS- und Kontrollgruppe

Parameter	SIRS-Gruppe			Kontrollgruppe		
	N	Mittelwert	SD	N	Mittelwert	SD
CRP Tag 1 (mg/l)	10	73,95	39,95	15	70,01	29,95
CRP Tag 2 (mg/l)	10	149,56	48,53	15	129,71	33,07
CRP Tag 3 (mg/l)	9	160,31	68,19	13	132,34	31,69
CRP Tag 4 (mg/l)	9	148,70	82,67	6	112,20	38,89
IL-2 Tag 1 (IU/ml)	9	0,47	0,57	-	-	-
IL-2 Tag 2 (IU/ml)	9	0,42	0,23	-	-	-
IL-2 Tag 3 (IU/ml)	8	0,32	0,20	-	-	-
IL-2 Tag 4 (IU/ml)	7	0,24	0,21	-	-	-
IL-6 Tag 1 (pg/ml)	9	574,98	213,96	15	344,18	100,05
IL-6 Tag 2 (pg/ml)	10	487,27	300,33	15	177,30	51,66
IL-6 Tag 3 (pg/ml)	9	375,52	292,75	15	96,81	71,97
IL-6 Tag 4 (pg/ml)	8	210,90	192,71	15	61,27	32,57
IL-8 Tag 1 (pg/ml)	10	45,92	60,01	15	2,22	1,47
IL-8 Tag 2 (pg/ml)	10	18,50	15,55	15	1,57	2,01
IL-8 Tag 3 (pg/ml)	9	16,71	15,42	15	1,68	1,44
IL-8 Tag 4 (pg/ml)	8	13,46	10,34	15	2,36	2,08
IL-10 Tag 1 (pg/ml)	9	18,91	44,12	15	1,93	2,12
IL-10 Tag 2 (pg/ml)	10	16,96	34,64	15	0,57	0,89
IL-10 Tag 3 (pg/ml)	9	11,56	17,81	15	0,22	0,25
IL-10 Tag 4 (pg/ml)	8	6,54	7,77	15	0,17	0,66
sICAM-1 Tag 1 (ng/ml)	9	312,73	75,69	15	87,72	19,17
sICAM-1 Tag 2 (ng/ml)	10	355,91	108,36	15	93,11	17,73
sICAM-1 Tag 3 (ng/ml)	9	375,33	139,49	15	103,80	25,41
sICAM-1 Tag 4 (ng/ml)	8	421,82	134,80	15	114,73	23,08
TGF- β ₁ Tag 1 (pg/ml)	9	7373,33	3131,08	14	2628,71	1803,70
TGF- β ₁ Tag 2 (pg/ml)	10	5533,70	3016,44	14	2813,57	2309,84
TGF- β ₁ Tag 3 (pg/ml)	9	5582,89	3043,89	14	4365,79	3485,32
TGF- β ₁ Tag 4 (pg/ml)	8	6805,13	7150,62	14	4185,79	3027,20
PCT Tag 1 (ng/ml)	9	16,52	9,82	15	1,26	0,86
PCT Tag 2 (ng/ml)	10	15,92	12,55	15	1,05	0,58
PCT Tag 3 (ng/ml)	9	14,57	11,20	15	0,66	0,21
PCT Tag 4 (ng/ml)	8	8,50	7,04	15	0,49	0,21
CD3+ Tag 1 (%) ¹⁾	9	52,78	15,63	14	61,64	8,09
CD3+ Tag 2 (%) ¹⁾	10	57,20	11,47	14	63,50	6,79
CD3+ Tag 3 (%) ¹⁾	9	63,22	11,69	15	65,53	8,48
CD3+ Tag 4 (%) ¹⁾	8	61,50	9,64	15	70,47	7,37
CD3/HLA-DR+ Tag 1 (%) ¹⁾	9	7,22	2,17	14	11,29	5,40
CD3/HLA-DR+ Tag 2 (%) ¹⁾	10	6,60	2,46	14	7,71	4,53
CD3/HLA-DR+ Tag 3 (%) ¹⁾	9	7,56	3,09	15	7,53	4,60
CD3/HLA-DR+ Tag 4 (%) ¹⁾	8	7,38	2,45	15	9,00	4,99
CD4+ Tag 1 (%) ¹⁾	9	42,67	18,03	15	39,53	11,56

Parameter	SIRS-Gruppe			Kontrollgruppe		
	N	Mittelwert	SD	N	Mittelwert	SD
CD4+ Tag 2 (%) ¹⁾	10	47,70	12,27	15	45,27	12,64
CD4+ Tag 3 (%) ¹⁾	9	51,00	9,07	15	45,20	8,29
CD4+ Tag 4 (%) ¹⁾	8	50,25	9,71	15	47,87	9,03
CD8+ Tag 1 (%) ¹⁾	9	34,78	12,95	15	45,53	13,56
CD8+ Tag 2 (%) ¹⁾	10	23,60	6,22	15	42,40	13,88
CD8+ Tag 3 (%) ¹⁾	9	24,44	7,06	15	37,13	8,88
CD8+ Tag 4 (%) ¹⁾	8	20,13	9,69	15	38,40	9,31
CD4/CD69 Tag 1 (%) ¹⁾	9	6,56	7,80	13	3,92	2,99
CD4/CD69 Tag 2 (%) ¹⁾	10	7,50	5,06	14	2,86	2,60
CD4/CD69 Tag 3 (%) ¹⁾	9	7,56	5,55	15	2,40	2,29
CD4/CD69 Tag 4 (%) ¹⁾	8	9,88	5,84	15	4,00	3,07
CD8/CD69 Tag 1 (%) ¹⁾	9	3,00	2,06	13	5,54	4,16
CD8/CD69 Tag 2 (%) ¹⁾	10	2,80	1,48	14	4,79	4,96
CD8/CD69 Tag 3 (%) ¹⁾	9	2,89	2,93	15	3,67	3,64
CD8/CD69 Tag 4 (%) ¹⁾	8	4,13	2,70	15	4,20	4,13
CD16/CD56 Tag 1 (%) ¹⁾	9	28,89	23,48	15	20,93	9,75
CD16/CD56 Tag 2 (%) ¹⁾	10	12,60	8,88	15	19,67	10,94
CD16/CD56 Tag 3 (%) ¹⁾	9	11,33	5,34	15	14,53	7,37
CD16/CD56 Tag 4 (%) ¹⁾	8	8,50	2,88	15	14,27	6,90
CD19+ Tag 1 (%) ¹⁾	9	17,00	6,56	15	15,13	7,02
CD19+ Tag 2 (%) ¹⁾	10	19,80	5,09	15	12,33	5,65
CD19+ Tag 3 (%) ¹⁾	9	21,11	6,19	15	13,40	5,04
CD19+ Tag 4 (%) ¹⁾	8	22,63	5,83	15	13,93	5,04

¹⁾ Bei den Lymphozytensubpopulationen wurde gemäß der Empfehlung von The National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) jeweils der Anteil der Zellen, welche den jeweiligen Marker tragen, an den Gesamtlymphozyten in Prozent angegeben und nicht die Anzahl aller Ereignisse im Gate als Grundmenge genutzt.

IV.II Vergleich der Daten Überlebender und Verstorbener innerhalb der SIRS-Gruppe

Tab. 8: Vergleich der Daten Überlebender und Verstorbener innerhalb der SIRS-Gruppe

Parameter	Überlebende			Verstorbene			Signifikanz
	Mittelwert	SD	N	Mittelwert	SD	N	
Alter (Jahre)	64,83	9,06	6	71,00	2,45	4	0,257 ¹⁾
Grösse (cm)	175,17	6,74	6	176,50	3,42	4	1,000 ¹⁾
Gewicht (kg)	87,67	5,39	6	81,25	7,68	4	0,257 ¹⁾
OP-Zeit (min)	280,50	45,65	6	352,00	69,49	4	0,171 ¹⁾
EKZ-Dauer (min)	137,50	34,29	6	170,25	65,60	4	0,476 ¹⁾
Ischämiezeit (min)	72,50	13,85	6	97,75	40,85	4	0,352 ¹⁾
Anastomosenanzahl	3,67	0,82	6	3,00	0,82	4	0,352 ¹⁾
Nachbeatmung (h)	77,67	33,57	6	126,50	81,44	4	0,257 ¹⁾
Intensivaufenthalt (d)	9,67	3,72	6	5,50	3,87	4	0,067 ¹⁾
APACHE-Score Tag 1	29,67	7,53	6	30,50	4,20	4	0,847 ²⁾
APACHE-Score Tag 2	23,33	3,78	6	30,00	6,06	4	0,062 ²⁾
APACHE-Score Tag 3	20,67	7,87	6	28,67	0,58	3	0,055 ²⁾

Parameter	Überlebende			Verstorbene			Signifikanz
	Mittelwert	SD	N	Mittelwert	SD	N	
APACHE-Score Tag 4	17,00	11,80	6	32,00	0,00	3	p < 0,05 ²⁾
Temperatur Tag 1 (°C)	38,82	0,65	6	38,93	0,41	4	0,777 ²⁾
Temperatur Tag 2 (°C)	38,27	0,44	6	38,35	0,30	4	0,750 ²⁾
Temperatur Tag 3 (°C)	38,10	0,48	6	38,50	0,26	3	0,231 ²⁾
Temperatur Tag 4 (°C)	37,35	0,57	6	38,60	0,53	3	p < 0,05 ²⁾
Leukozyten/mm ³ Tag 1	15633,33	6028,49	6	16175,00	6563,22	4	0,896 ²⁾
Leukozyten/mm ³ Tag 2	18100,00	6063,00	6	20525,00	8830,02	4	0,617 ²⁾
Leukozyten/mm ³ Tag 3	13250,00	4625,47	6	24366,67	4188,48	3	p < 0,05 ²⁾
Leukozyten/mm ³ Tag 4	11300,00	3861,09	6	25566,67	5688,88	3	p < 0,05 ²⁾
CRP Tag 1 (mg/l)	84,53	43,70	6	58,08	32,32	4	0,333 ²⁾
CRP Tag 2 (mg/l)	159,72	35,02	6	134,33	67,12	4	0,450 ²⁾
CRP Tag 3 (mg/l)	159,13	55,10	6	162,67	104,85	3	0,947 ²⁾
CRP Tag 4 (mg/l)	143,07	63,10	6	159,97	130,76	3	0,794 ²⁾
IL-2 Tag 1 (IU/ml)	0,27	0,05	5	0,72	0,85	4	0,367 ²⁾
IL-2 Tag 2 (IU/ml)	0,29	0,07	5	0,58	0,28	4	0,128 ²⁾
IL-2 Tag 3 (IU/ml)	0,24	0,15	5	0,46	0,21	3	0,137 ²⁾
IL-2 Tag 4 (IU/ml)	0,17	0,08	5	0,41	0,40	2	0,563 ²⁾
IL-6 Tag 1 (pg/ml)	622,18	262,72	5	515,98	147,28	4	0,497 ²⁾
IL-6 Tag 2 (pg/ml)	404,42	259,8	6	611,55	351,9	4	0,312 ²⁾
IL-6 Tag 3 (pg/ml)	310,60	260,3	6	505,37	368,1	3	0,382 ²⁾
IL-6 Tag 4 (pg/ml)	222,38	215,1	6	176,45	159,5	2	0,795 ²⁾
IL-8 Tag 1 (pg/ml)	17,47	16,20	6	88,60	79,49	4	0,171 ²⁾
IL-8 Tag 2 (pg/ml)	13,03	13,44	6	26,70	16,59	4	0,188 ²⁾
IL-8 Tag 3 (pg/ml)	11,83	14,38	6	26,47	14,83	3	0,197 ²⁾
IL-8 Tag 4 (pg/ml)	13,57	12,19	6	13,15	2,33	2	0,965 ²⁾
IL-10 Tag 1 (pg/ml)	2,50	1,89	5	39,43	64,62	4	0,336 ²⁾
IL-10 Tag 2 (pg/ml)	0,86	0,25	6	41,10	48,01	4	0,192 ²⁾
IL-10 Tag 3 (pg/ml)	1,98	1,30	6	30,71	20,95	3	0,140 ²⁾
IL-10 Tag 4 (pg/ml)	4,23	4,90	6	13,45	13,22	2	0,500 ²⁾
sICAM-1 Tag 1 (ng/ml)	273,07	77,54	5	362,31	36,88	4	0,074 ²⁾
sCAM-1 Tag 2 (ng/ml)	329,95	110,87	6	394,85	106,64	4	0,384 ²⁾
sICAM-1 Tag 3 (ng/ml)	342,24	106,21	6	441,52	199,45	3	0,347 ²⁾
sICAM-1 Tag 4 (ng/ml)	401,31	81,25	6	483,35	289,98	2	0,758 ²⁾
TGF-β ₁ Tag 1 (pg/ml)	7295,0	4234,2	5	7471,3	1488,5	4	0,934 ²⁾
TGF-β ₁ Tag 2 (pg/ml)	4175,7	1802,4	6	7570,8	3558,2	4	0,152 ²⁾
TGF-β ₁ Tag 3 (pg/ml)	5052,0	3350,4	6	6644,7	2541,9	3	0,461 ²⁾
TGF-β ₁ Tag 4 (pg/ml)	4353,2	2000,9	6	14161,0	13914,5	2	0,500 ²⁾
PCT Tag 1 (ng/ml)	9,90	6,01	5	24,79	6,70	4	p < 0,05 ²⁾
PCT Tag 2 (ng/ml)	8,39	7,29	6	27,23	10,00	4	p < 0,05 ²⁾
PCT Tag 3 (ng/ml)	8,63	8,42	6	26,45	2,59	3	p < 0,05 ²⁾
PCT Tag 4 (ng/ml)	5,92	6,11	6	16,24	0,76	2	0,064 ²⁾
CD3+ Tag 1 (%) ³⁾	47,80	18,44	5	59,00	10,23	4	0,316 ²⁾
CD3+ Tag 2 (%) ³⁾	58,17	12,04	6	55,75	12,18	4	0,765 ²⁾
CD3+ Tag 3 (%) ³⁾	67,17	11,96	6	55,33	7,02	3	0,165 ²⁾
CD3+ Tag 4 (%) ³⁾	62,33	10,60	6	59,00	8,49	2	0,705 ²⁾
CD3/HLA-DR+ Tag 1 (%) ³⁾	5,80	1,48	5	9,00	1,41	4	p < 0,05 ²⁾

Parameter	Überlebende			Verstorbene			Signifikanz
	Mittelwert	SD	N	Mittelwert	SD	N	
CD3/HLA-DR+ Tag 2 (%) ³⁾	6,17	2,48	6	7,25	2,63	4	0,527 ²⁾
CD3/HLA-DR+ Tag 3 (%) ³⁾	7,83	3,19	6	7,00	3,46	3	0,729 ²⁾
CD3/HLA-DR+ Tag 4 (%) ³⁾	6,83	2,32	6	9,00	2,83	2	0,313 ²⁾
CD4+ Tag 1 (%) ³⁾	41,00	16,85	5	44,75	21,85	4	0,788 ²⁾
CD4+ Tag 2 (%) ³⁾	49,50	9,20	6	45,00	17,15	4	0,655 ²⁾
CD4+ Tag 3 (%) ³⁾	56,33	3,83	6	40,33	6,03	3	p < 0,05 ²⁾
CD4+ Tag 4 (%) ³⁾	52,33	8,43	6	44,00	14,14	2	0,330 ²⁾
CD8+ Tag 1 (%) ³⁾	31,80	6,87	5	38,50	18,73	4	0,478 ²⁾
CD8+ Tag 2 (%) ³⁾	25,33	7,45	6	21,00	2,94	4	0,307 ²⁾
CD8+ Tag 3 (%) ³⁾	24,67	8,33	6	24,00	5,00	3	0,904 ²⁾
CD8+ Tag 4 (%) ³⁾	17,83	6,21	6	27,00	18,38	2	0,608 ²⁾
CD4/69+ Tag 1 (%) ³⁾	7,40	7,64	5	5,50	9,04	4	0,742 ²⁾
CD4/69+ Tag 2 (%) ³⁾	7,83	4,54	6	7,00	6,48	4	0,815 ²⁾
CD4/69+ Tag 3 (%) ³⁾	9,83	5,27	6	3,00	2,65	3	0,077 ²⁾
CD4/69+ Tag 4 (%) ³⁾	10,83	6,46	6	7,00	2,83	2	0,465 ²⁾
CD8/69+ Tag 1 (%) ³⁾	3,40	2,41	5	2,50	1,73	4	0,551 ²⁾
CD8/69+ Tag 2 (%) ³⁾	2,67	1,03	6	3,00	2,16	4	0,748 ²⁾
CD8/69+ Tag 3 (%) ³⁾	3,67	3,39	6	1,33	0,58	3	0,289 ²⁾
CD8/69+ Tag 4 (%) ³⁾	3,67	2,07	6	5,50	4,95	2	0,448 ²⁾
CD16/56+ Tag 1 (%) ³⁾	26,00	22,15	5	32,50	28,02	4	0,708 ²⁾
CD16/56+ Tag 2 (%) ³⁾	15,83	10,23	6	7,75	3,20	4	0,171 ²⁾
CD16/56+ Tag 3 (%) ³⁾	12,50	5,96	6	9,00	3,61	3	0,389 ²⁾
CD16/56+ Tag 4 (%) ³⁾	7,50	1,38	6	11,50	4,95	2	0,454 ²⁾
CD19+ Tag 1 (%) ³⁾	17,20	6,69	5	16,75	7,41	4	0,928 ²⁾
CD19+ Tag 2 (%) ³⁾	19,83	5,04	6	19,75	5,97	4	0,982 ²⁾
CD19+ Tag 3 (%) ³⁾	22,00	6,07	6	19,33	7,37	3	0,578 ²⁾
CD19+ Tag 4 (%) ³⁾	20,67	5,32	6	28,50	2,12	2	0,100 ²⁾

¹⁾ Exakte Signifikanz nach Mann-Whitney

²⁾ Signifikanz nach dem t-Test der Varianzanalyse

³⁾ Bei den Lymphozytensubpopulationen wurde gemäß der Empfehlung von The National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) jeweils der Anteil der Zellen, welche den jeweiligen Marker tragen an den Gesamtlymphozyten in Prozent angegeben und nicht die Anzahl aller Ereignisse im Gate als Grundmenge genutzt.

Danksagung

Mein Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. G. Hempelmann, Direktor der Abteilung Anaesthesiologie, Operative Intensivmedizin und Schmerztherapie des Universitätsklinikums Gießen für die Ermöglichung dieser Dissertation.

Herrn PD. Dr. A. Sablotzki für die Überlassung des Themas und die Betreuung bei der Verwirklichung dieser Arbeit.

Herrn PD. Dr. G. Görlach und seinen ärztlichen und pflegerischen Kollegen von der Abteilung für Kardiovaskulär- und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Gießen für die Unterstützung bei der Rekrutierung und Untersuchung der Patienten auf den Intensiv- und Normalstationen der Abteilung.

Herrn Dr. J. Engel und seinem Doktorand, A.Beck, sowie Frau PD. I. Welters für die freundliche Unterstützung bei allen Fragen zur Durchflusszytometrie.

Frau Dr. E. Seidelmayer-Grimm für ihre stetige Hilfsbereitschaft und kompetente Kritik bei den schriftlichen Ausführungen zu dieser Arbeit.

Allen Mitarbeitern der Laboratorien der Abteilung Anaesthesiologie, Operative Intensivmedizin und Schmerztherapie des Universitätsklinikums Gießen, stellvertretend seien Frau Weber und Frau Mayer genannt, für ihre freundliche Unterstützung und Ermutigung bei den sich häufig bis in die Nacht erstreckenden Analysesitzungen.

Allen Patienten, die sich bereiterklärt haben, an dieser Studie teilzunehmen, und sie so realisierbar gemacht haben.

Meinen lieben Freunden und meiner Freundin für die richtige Mischung aus Ansporn und Kritik.

Insbesondere danke ich meiner Mutter für ihren fortwährenden und uneingeschränkten Beistand und ihre geduldige Hilfe bei dieser Arbeit wie auch bei allem anderen, was mich ausmacht, sowie meinem Bruder, der mich stets sowohl menschlich als auch sachverständig unterstützt hat.

Lebenslauf

Name:	Mann	
Vorname	Valesco Wladimir	
Geburtsdatum/-ort	04.09.1973, Gießen	
Eltern:	Waldemar Mann und Rosemarie Mann, geb. Groh	
Geschwister:	Sandra Hackel, geb. Mann und Sacha Mann	
Schulbildung:	1979-1983	Grundschule Pohlheim
	1983-1992	Landgraf-Ludwig-Gymnasium Gießen
Ersatzdienst:	1992-1993	Rettungsdienst des DRK, KV Gießen
Berufsausbildung:	1992-1995	Rettungsassistentenschule DRK/JUH
Hochschulbildung:	1995-2001	Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Giessen
Berufl. Tätigkeit	1993-1995	Rettungsdienst DRK/JUH, KV Gießen
	2001-2002	Arzt auf der Notfallstation des Departments für Chirurgie des Kantonsspitals Luzern
	seit 08.2002	AIP in der Abteilung für Anaesthesiologie, operative Intensivmedizin und Schmerztherapie, der JLU-Giessen
Weitere Auslandsaufenthalte:	08/09 1999	Praktikum im Department of Anesthesiology und im Emergency Department der University Hospitals of Cleveland (Ohio)
	2000	Unterassistent in Department für Chirurgie des Kantonsspitals Luzern