

Aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen

Abteilung II

(Schwerpunkte: Kinderkardiologie, Pulmologie, Intensivmedizin)

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Hofbeck

Monitoring pro- und antiinflammatorischer Mechanismen  
nach Operation angeborener Herzfehler und Beeinflussung  
durch NO

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Erwin Wilfried Glück  
aus  
Straubing

2008

Dekan: Professor Dr. I.B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. J. Breuer

2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Gawaz

Meinen Eltern

## Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>IV</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Stickstoffmonoxid.....	1
1.1.1	Allgemeines zu Stickstoffmonoxid.....	1
1.1.2	NO-Inhalationstherapie.....	2
1.2	Die Systemische Entzündungsreaktion als Folge herzchirurgischer Eingriffe unter Verwendung der extrakorporalen Zirkulation.....	4
1.2.1	Allgemeines zur systemischen Entzündungsreaktion.....	4
1.2.2	Die Rolle der Zytokine.....	6
1.2.3	Die Rolle der Leukozytenoberflächenantigene.....	7
1.2.4	Definition der Immunkompetenz.....	8
1.3	Zielsetzung.....	9
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>12</b>
2.1	Patienten.....	12
2.2	In vitro Untersuchung der NO-Wirkung auf Leukozyten.....	13
2.2.1	Probengewinnung.....	13
2.2.2	Versuchsaufbau NO-Inkubation.....	13
2.3	Untersuchung des Einflusses der HLM-Operation auf die Leukozytenfunktion.....	15
2.3.1	Probengewinnung.....	15
2.4	Stimulation mit Lipopolysaccharid.....	16
2.4.1	Stimulation der Proben nach NO-Inkubation.....	16
2.4.2	Stimulation der Proben der HLM-Patienten.....	17
2.4.3	Konservierung des Plasmas.....	17

2.5	Durchflußzytometrie.....	17
2.5.1	Arbeitsprinzip.....	18
2.6	Antikörper.....	20
2.7	Isolierung und Färbung der Leukozyten.....	22
2.7.1	Oberflächenfärbung.....	22
2.7.2	Zytokinfärbung.....	23
2.7.3	Epifluoreszenzmikroskopie.....	24
2.8	Messung und Auswertung der Antikörperfluoreszenz.....	27
2.9	Chemiluminiszenz-Immunoassay zur Bestimmung pro- und antiinflammatorischer Proteine.....	29
2.9.1	Festphasen-Chemiluminiszenz-Enzymimmunoassay.....	29
2.9.1.1	Das Arbeitsprinzip.....	30
2.9.1.2	Die Chemiluminiszenzreaktion.....	31
2.9.2	Procalcitoninbestimmung-Coated Tube System.....	32
2.10	Statistische Auswertung.....	33
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>35</b>
3.1	In vitro Untersuchung des Einflusses einer NO-Inkubation auf die Endotoxintoleranz.....	35
3.1.1	Patientendaten.....	35
3.1.2	Expression der Adhäsionsmoleküle.....	36
3.1.3	Expression der Zytokine.....	42
3.2	In vitro Untersuchung des Einflusses einer HLM-OP auf die Immunkompetenz.....	45
3.2.1	Patientendaten.....	45
3.2.2	Expression der Adhäsionsmoleküle im Beobachtungszeitraum....	48
3.2.3	Monitoring pro- und antiinflammatorischer Proteine.....	58
3.3	Einfluß der HLM und verschiedener Parameter auf Antigenexpression und pro- sowie antiinflammatorische Proteine	64
3.3.1	Vitium.....	64
3.3.2	HLM-Dauer.....	67

3.3.3	Tiefste Körpertemperatur während der HLM-OP.....	71
3.3.4	Körpergröße.....	75
3.3.5	Höchster postoperativer Lactatwert.....	78
3.3.6	Einfluß auf die Endotoxinstimulation.....	82
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>87</b>
4.1	Stickstoffmonoxid-Inhalation und Immunkompetenz.....	87
4.2	Herz-Lungen-Maschinen-OP, systemische Entzündungsreaktion und Immunkompetenz.....	88
4.2.1	Allgemeine Aspekte.....	88
4.2.2	Leukozytensubpopulationen.....	89
4.2.3	Antigenexpression.....	90
4.2.4	Pro- und antiinflammatorische Marker.....	92
4.2.5	Immunkompetenz.....	95
4.2.6	Einfluss verschiedener Parameter und der HLM auf Antigene sowie pro- und antiinflammatorische Marker.....	96
4.3	Schlußfolgerungen.....	98
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>101</b>
<b>6</b>	<b>Abbildungen und Tabellen.....</b>	<b>104</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>109</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>113</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>115</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ARDS	acute respiratory distress syndrome
BFA	Brefeldin A
BSA	Bovine Serum Albumin
C3a	Komplementfaktor 3a
C5a	Komplementfaktor 5a
CD	cluster of differentiation
CGMP	3':5'Guanosinmonophosphat
CRP	C-reaktives Protein
DAPI	4',6'-Diamino-2-phenylindol, Fluoreszenzfarbstoff zur Markierung der DNA
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDRF	endothelium-derived relaxing factor
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	fluorescence activated cell sorter
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL1	Fluoreszenz 1
FL2	Fluoreszenz 2
FSC	Vorwärtsstreuung (forward light scatter)
g	Fallbeschleunigung
HLA	human-leucocyte-antigen
HLM	Herz-Lungen-Maschine
ICAM-1	intercellular adhesion molecule
IFN	Interferon
IL-1	Interleukin-1
IL-1ra	Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
IL-10	Interleukin-10
IL-13	Interleukin-13
LBP	Lipopolysaccharid bindendes Protein
Li	Lithium
LFA-1	Leukozytenfunktionsantigen-1
Max.	Maximum
MHC	major histocompatibility complex
Min.	Minimum
MW	Mittelwert

MPO	Myeloperoxidase
n	Fallzahl
Na	Natrium
NADPH	Reduziertes Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
NK	Natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
OP	Operation
ppm	parts per milion
PAF	platelet activating factor
PAP	pulmonalarterieller Druck
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCT	Procalcitonin
PE	Phycoerythrin
PMN	polymorph mononuclear cells
PMT	Photomultiplier
PPHN	persistierende pulmonale Hypertonie des Neugeborenen
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SSC	Seitwärtsstreuung (side scatter)
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
Tab.	Tabelle
TNF-alpha	Tumornekrosefaktor alpha



## **1 Einleitung**

### **1.1 Stickstoffmonoxid**

#### **1.1.1 Allgemeines zu Stickstoffmonoxid**

Schon im 19. Jahrhundert fanden organische Nitrate zur Therapie pectanginöser Beschwerden Anwendung (Brunton, 1867). Die Wirksamkeit beruht auf der Fähigkeit von Endothelzellen, organische Nitrate in NO umzuwandeln (Feelisch und Kelm, 1991), welches wiederum über den second messenger cGMP (zyklisches 3':5'Guanosinmonophosphat) seine vasodilatatorische Wirkung entfaltet (Gruetter et al., 1979). Die Kalziumkonzentration in Gefäßmuskelzellen wird cGMP-vermittelt reduziert und die leichten Myosinketten werden dephosphoryliert. Diese Mechanismen bedingen eine Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur, schlussendlich stellt sich eine Vasodilatation ein (Rapoport und Murad, 1983; Rapoport et al., 1983). Versuche an der isolierten Kaninchenaorta durch FURCHGOTT und ZAWAZKI belegten, dass Acetylcholin nur in Gefäßsegmenten mit intaktem Endothel eine Relaxation hervorrief. Daraufhin wurde die Existenz eines „endothelium-derived relaxing factor“ (EDRF) postuliert (Furchgott und Zawazki, 1980). Den Beweis lieferte PALMER 1987, dass es sich bei EDRF um das freie Radikal NO handelt (Palmer et al., 1987). Durch die NADPH-abhängige konstitutive NO-Synthase, wird endogen NO von der terminalen Guanidinogruppe aus L-Arginin abgespalten und auf bestimmte Reize hin in den Extrazellularraum freigesetzt. Anschließend erreicht es die Gefäßmuskelzelle via Diffusion oder wird von Blutzellen aufgenommen (Palmer et al., 1988). Während NO in Gefäßmuskelzellen eine Relaxation hervorruft, werden Aggregation und Adhäsion der Thrombozyten reduziert (Radomski et al., 1987), u.a. über eine verminderte Expression verschiedener thrombozytärer Oberflächenrezeptoren (Leube, 1996).

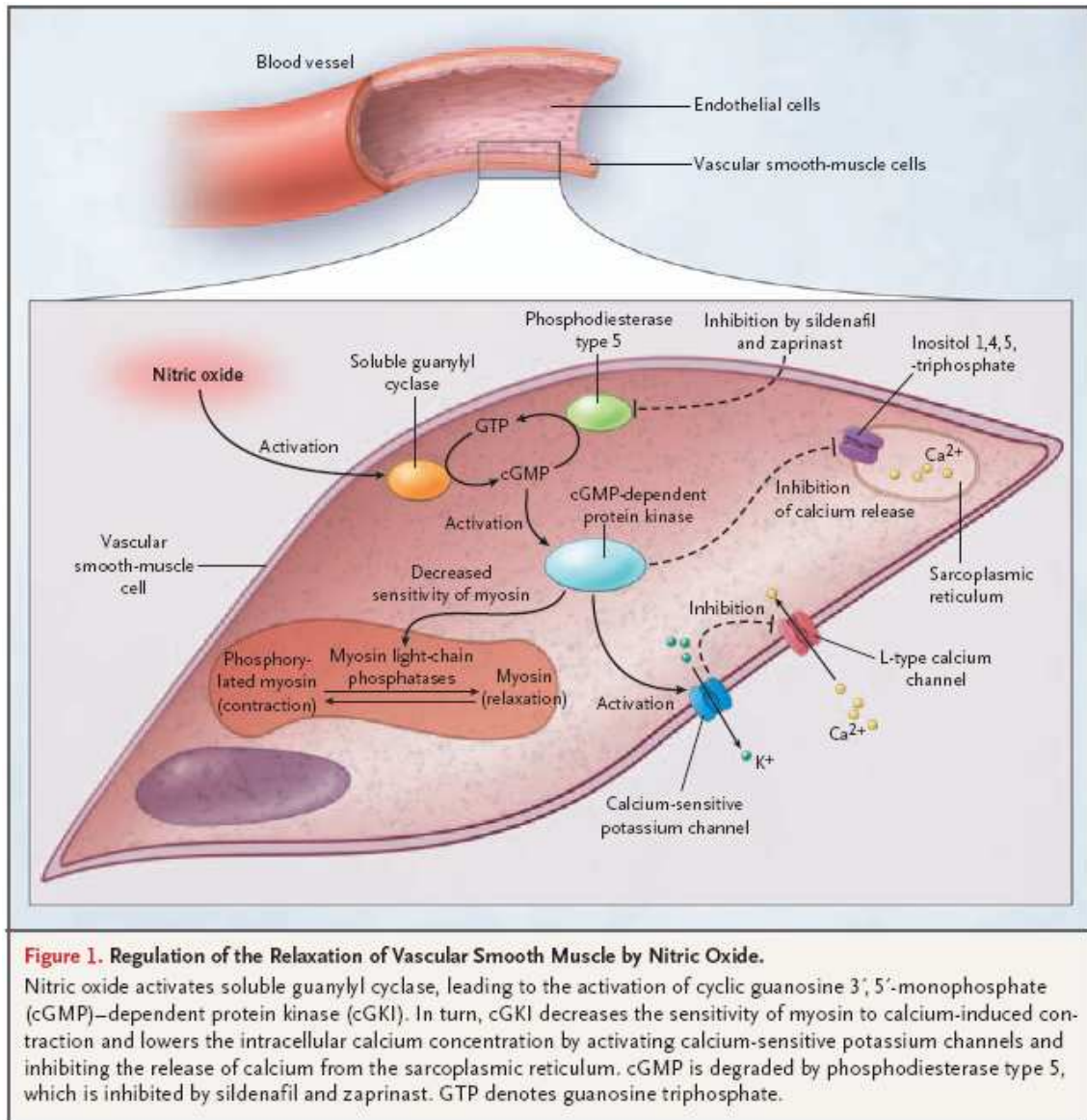


Abbildung 1: NO-Wirkung an der glatten Gefäßmuskelzelle (Griffiths und Evans, 2005)

### 1.1.2 NO-Inhalationstherapie

Nach herzchirurgischen Eingriffen unter Einsatz der Herz-Lungen-Maschine (HLM) stellt sich bei Säuglingen und Kindern häufig, im Rahmen der übersteigerten proinflammatorischen Antwort, eine endotheliale Dysfunktion ein, welche ursächlich ist für die reduzierte Freisetzung von NO aus dem Endothel, und die sich mitunter als pulmonale Hypertonie manifestiert (Wessel et al., 1993, Miller et al., 2000). Nicht selten kommt es nach Korrektur von angeborenen Herzfehlern mit links-rechts-Shunt zu einer pulmonalarteriellen –

hypertensiven Krise mit starkem Anstieg des pulmonalarteriellen Druckes (PAP) und reduzierter arterieller Sauerstoffsättigung, welche trotz aggressiver Therapie inklusive Hyperventilation, Hyperoxygenation, tiefer Analgosedierung, Muskelrelaxation und intravenöser Gabe von Vasodilatoren, eine lebensbedrohliche Situation darstellt (Hopkins et al., 1991). Aufgrund einer möglichen systemischen Hypotonie ist die Anwendung intravenöser Vasodilatoren begrenzt. Hyperventilation und Hyperoxygenation sind wegen der negativen Auswirkungen hoher Sauerstoffkonzentrationen auf die Lunge und niedriger Kohlendioxid-Konzentrationen auf die zerebrale Durchblutung nicht ohne Schwierigkeiten anzuwenden (Breuer et al., 1995b).

Vor diesem Hintergrund scheint eine hochselektive Senkung des PAP mittels inhalativen Stickstoffmonoxids, das „Mittel der Wahl“ darzustellen, zumal sich dessen Effizienz in zahlreichen Studien, u.a. bei „acute respiratory distress syndrome“ (ARDS) bei Erwachsenen, bei persistierender pulmonalen Hypertonie des Neugeborenen (PPHN) und bei postoperativer Behandlung bei kardiopulmonalen Fehlbildungen im Kindesalter beweisen ließ (Pepke-Zaba et al., 1991; Roberts et al., 1992; Haydar et al., 1992; Rossaint et al., 1993).

Der Vorteil von NO besteht in der lokalen Wirkung, da es nach Diffusion durch die Alveolarwand in der Blutbahn in den Erythrozyten an das Hämoglobin gebunden wird. Somit kommt es zu keiner signifikanten systemischen NO-Konzentration, weshalb der systemarterielle Blutdruck unverändert bleibt oder sogar leicht ansteigt (Breuer et al., 1995a). Über die Vasodilatation der Lungenstrombahn ergeben sich eine Nachlastsenkung des rechten Ventrikels und eine Vorlaststeigerung des linken Ventrikels mit konsekutiver Verbesserung des Herzzeitvolumens. Da ferner eine deutliche Verbesserung der arteriellen Sauerstoffsättigung ( $\text{SaO}_2$ ) und eine Reduktion des arteriellen Kohlendioxidpartialdrucks beobachtet werden kann, wird eine Normoventilation ermöglicht (Breuer et al., 1995b; Journois et al., 1994). Ursächlich für die Verbesserung des Gasaustauschs ist eine Normalisierung des postoperativ gestörten Ventilations-Perfusionsverhältnisses, da das inhalierte NO nur in ventilierte Lungenabschnitte gelangt, und somit nur die zugehörigen Pulmonalgefäße erweitert werden (Rossaint et al., 1992; Kinsella et al., 1992).

Kritisch hinterfragt und weiter untersucht werden müssen Effekte des Oxidationsproduktes Stickstoffdioxid, sowie Auswirkungen erhöhter Methämoglobin- und Nitratkonzentrationen im Blut, ebenso wie die mögliche Beeinflussung der Thrombo- und Leukozyten durch NO (Laguenie et al. 1993; Young et al., 1996; Radomski et al., 1987; Moilanen et al., 1993). Leukozytenoberflächenantigene zeigen unter klinisch angewandten NO-Inhalationsdosen keine signifikanten Veränderungen. Daher ist bei der therapeutischen Anwendung nicht von einer Beeinträchtigung der Leukozytenadhäsion auszugehen (Knies, 1999). Wenig Daten existieren über die Auswirkungen einer NO-Inhalationstherapie auf die Zytokinsekretion (Opdahl et al., 2000) und die Immunkompetenz.

## **1.2 Die Systemische Entzündungsreaktion als Folge herzchirurgischer Eingriffe unter Verwendung der extrakorporalen Zirkulation,**

### **1.2.1 Allgemeines zur Systemischen Entzündungsreaktion - Pro- und Antiinflammation**

Die operative Korrektur angeborener Herzfehler stellt in den Industrieländern heute nahezu ein Routineverfahren mit niedriger Mortalität (< 5%) dar (Stark et al., 2000). Trotzdem bedeutet sie weiterhin ein substantielles Trauma für das Immunsystem als Konsequenz aus mechanischem Gewebeschaden, Anästhesie, Medikation und individueller Prädisposition, welches in 1-2% der Fälle mit einer signifikanten Morbidität einhergeht, die in 50-70% der Fälle letal enden kann (Hall et al., 1997). Postoperativ haben die meisten Patienten Organfehlfunktionen geringeren Ausmaßes.

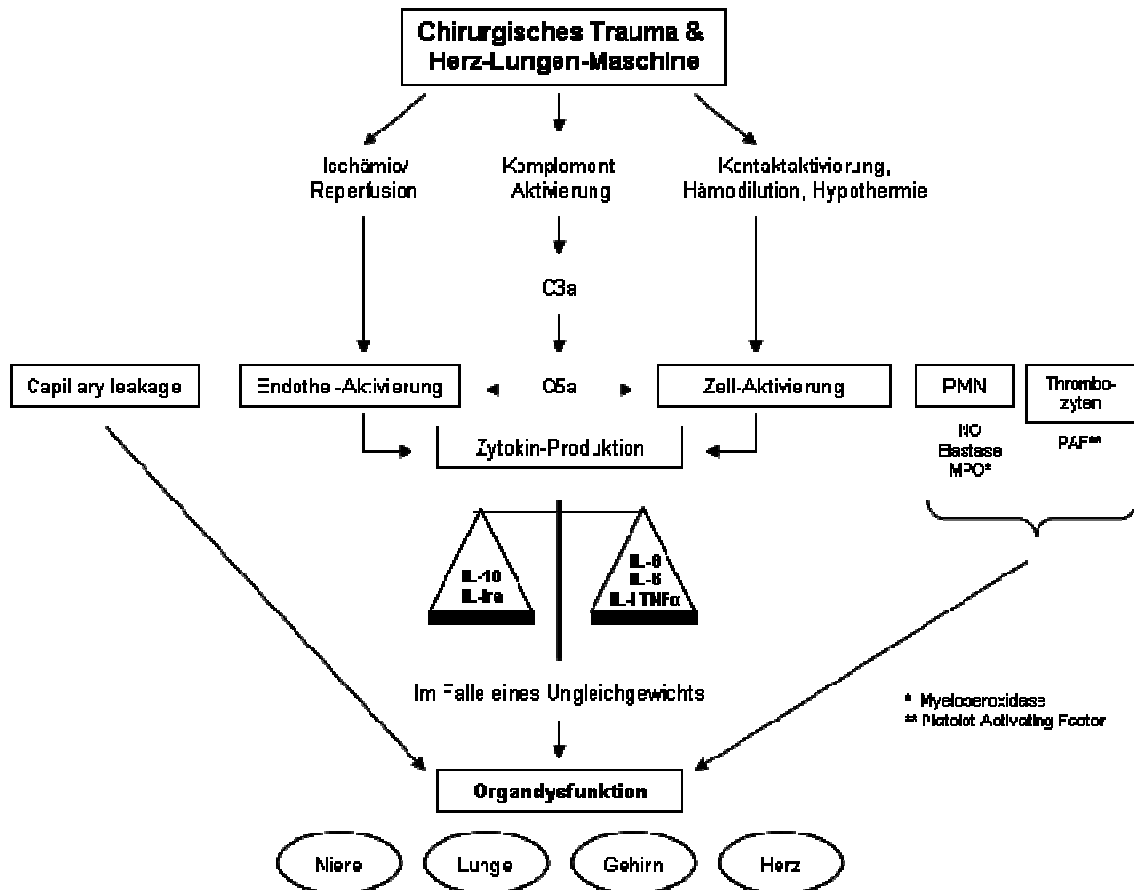
Herzchirurgische Operationen machen oft den Einsatz der Herz-Lungen-Maschine (HLM) zur Oxygenierung, Blutzirkulation, Körperkühlung und Wiedererwärmung notwendig, wobei es zum intensiven Kontakt des Blutes mit unphysiologischen Oberflächen des extrakorporalen Kreislaufes kommt.

Dadurch werden verschiedene Plasma-Protein-Systeme aktiviert, u.a. extrinsische und intrinsische Gerinnung, Fibrinolyse und das Komplementsystem (Edmunds, 1998), hier insbesondere der alternative Weg (Tarnok und Emmrich, 2003). Zusätzlich kommt es zur Aktivierung von Endothelzellen, Lymphozyten, Monozyten, neutrophiler Granulozyten sowie Thrombozyten, woraus die Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine TNF-alpha, IL-1, IL-6 und IL-8 resultiert (Wan et al., 1997).

Als Folge dieser Vorgänge wird im Organismus häufig ein sog. „systemic inflammatory response syndrome“ (SIRS) ausgelöst, welches sich klinisch durch Ergüsse in Perikard, Pleura und Abdomen sowie Splenomegalie bis hin zu generalisierten Ödemen, durch ein „acute respiratory distress syndrome“ (ARDS) und ein Multiorganversagen äußern kann (Bocsi et al., 2006).

Als weitere SIRS auslösende Mechanismen werden in Zusammenhang mit der HLM, die Entwicklung einer Ischämie, Reperfusionsschäden und das Vorhandensein einer Endotoxämie in der Literatur erwähnt (Hall et al., 1997).

Zytokine spielen dabei die Rolle der Botenstoffe des Entzündungsgeschehens. Den proinflammatorischen Zytokinen steht ein komplexes System an Inhibitoren gegenüber, bestehend u.a. aus antiinflammatorischen Zytokinen, welche die Dauer und Intensität der entzündlichen Antwort kontrollieren sollen und verhindern dass es zu einer überschießenden Entzündungsreaktion kommt. Hierbei spielen vor allem die antiinflammatorischen Zytokine IL-10, IL-13 und IL-1ra eine wesentliche Rolle (Brix-Christensen, 2001, Bellingan, 2000).



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung wichtiger Mediatoren der inflammatorischen Antwort auf ein chirurgisches Trauma und extrakorporale Zirkulation (HLM). Die verschiedenen Prozesse haben einen synergistischen Effekt, der zu Organdysfunktion führen kann. (Modifiziert nach Brix-Christensen, 2001.)

### 1.2.2 Die Rolle der Zytokine

Zytokine werden hauptsächlich in Monozyten, Makrophagen, Lymphozyten und Endothelzellen produziert und können sowohl schützend, als auch schädigend sein, abhängig von der Konzentration des Zytokins, dem Rezeptor, der Zielzelle und der Gegenwart anderer Zytokine. Viele Zytokine werden durch die Stimulation des Transkriptionsfaktors NF-kappaB produziert (Blackwell et al, 1996). Zytokine werden lokal produziert und sind im Falle einer überschießenden Produktion im peripheren Blut nachweisbar.

Die wichtigsten Zytokine in Zusammenhang mit der Herzchirurgie sind die proinflammatorischen Zytokine TNF-alpha, IL-6 und IL-8 sowie die antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und IL-1ra (Brix-Christensen, 2001).

TNF-alpha stimuliert u.a. indirekt die Leukozytenadhäsion über eine Erhöhung der ICAM-1-Expression (Hashimoto et al., 1994)

IL-6 erlaubt Aussagen zum Ausmaß einer Hypoxie und Gewebeschädigung, da es nicht nur von aktivierten Immunzellen, sondern auch von Fibroblasten und Endothelzellen, z.B. unter Sauerstoffmangel sezerniert wird. Postoperativ lassen sich häufig sehr hohe IL-6-Plasmaspiegel nachweisen. Finden sich daneben auch erhöhte TNF-alpha-Plasmaspiegel, ist davon auszugehen, dass ein Teil des IL-6 von aktivierten Makrophagen produziert wird, was als Hinweis auf eine akute systemische Entzündungsreaktion zu werten ist (Höflich und Volk, 2002). Im Plasma Gesunder ist es normalerweise nicht nachzuweisen, jedoch kann es bei Kindern mit angeborenem Herzfehler bereits präoperativ erhöht sein (Ozawa et al., 2000).

### **1.2.3 Die Rolle der Leukozytenoberflächenantigene**

Leukozyten sind u.a. essentiell für eine funktionierende Immunantwort, eine normale Wundheilung, die Tumorbekämpfung und das Gewebe-Remodelling. Sie werden über pro- und antiinflammatorische Zytokine aktiviert bzw. inhibiert. Auch ohne Infektion kann es zu einer generalisierten Entzündungsreaktion kommen, wenn, wie bereits oben beschrieben, durch einen Stimulus eine Aktivierung des Immunsystems erfolgt.

Der primäre Ort, an dem die Leukozyten ihre Wirkung entfalten, ist das Gewebe, weshalb inflammatorische Zellen befähigt sein müssen, dorthin einwandern zu können, um mit den Pathogenen in Kontakt zu treten. Dazu ist Chemotaxis und eine koordinierte Hochregulierung der Expression von endothelialen- und inflammatorischen-Zell-Adhäsions-Molekülen notwendig. Proinflammatorische Stimulanzen, wie z.B. Zytokine bedingen eine rasch erhöhte Expression von Selectinen, die ein sog. rolling der Leukozyten am

Endothel vermitteln. Durch Integrine (z.B. CD11a, CD11b, CD18) kommt es zur Adhäsion und über endotheliale Liganden (z.B. CD54, CD102, CD106) zur Transmigration (Ley, 1996; Albelda, 1991) ins Gewebe. Dort können, durch die Freisetzung einer Bandbreite an Proteasen, oder durch die NADPH-Oxidase-abhängigen Generierung von Sauerstoff-Radikalen aus den Entzündungszellen, Gewebeschädigungen hervorgerufen werden (Delves und Rosen, 2000; Mollinedo et al., 1999).

Die Sequestration der Leukozyten in den Lungen und im Herzmuskel, welche sich bei der Korrektur angeborener Herzfehler einstellt, ist ein bedeutender pathogenetischer Faktor für die Entwicklung eines SIRS und der zugehörigen Komplikationen (Bando et al., 1990). Hierbei spielen Adhäsionsmoleküle eine wichtige Rolle in zahlreichen Organen während der Herzchirurgie. Eine gesteigerte Expression der Adhäsionsmoleküle potenziert die Verbindung zwischen Leukozyten und Endothelzellen. Leukozyten können so durch die Gefäßwand migrieren, degranulieren und einen Gewebeschaden erzeugen (Patrick et al., 1999; Harlan et al., 2002).

In der Literatur wird vermutet, dass bei der Verwendung der HLM die Phagozyten, u.a. durch den Kontakt mit der Oxygenator-Oberfläche und den Schlauchleitungen, welche für den Bluttransport zum und vom Oxygenator verwendet werden, aktiviert werden (Butler et al., 1993). Diese Phänomene können durchflusszytometrisch gemessen werden, und drücken sich in einer perioperativ veränderten Expression der Oberflächen- und Adhäsionsmoleküle aus.

#### **1.2.4 Definition der Immunkompetenz**

Das antigen-präsentierende Glykoprotein HLA-DR ist Teil des Major histocompatibility complex–gene-class II (MHC II) (HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP) und findet sich hauptsächlich auf der Oberfläche von Monozyten. Die Expression des Antigens wird durch Interferon-gamma und granulocyte-macrophage-colony-stimulating-factor erhöht. In Gegenwart von



Glucocorticoiden oder IL-10 verringert sich die HLA-DR-Expression an der Oberfläche der Monozyten. Es wurde dargelegt, dass eine reduzierte HLA-DR-Expression, wie man sie bei schwerem Trauma oder großen Operationen bei Erwachsenen vorfindet, korreliert ist mit einer erhöhten Prävalenz bzw. Präsenz schwerer Infektionen (Gessler et al., 2005). Darüber hinaus wurde postuliert, dass eine erniedrigte HLA-DR-Expression als prädiktiver Parameter für das klinische Outcome bei Erwachsenen mit Sepsis (Saenz et al., 2001; Hynninen et al. 2003) und prognostischer Parameter bei Kindern nach Herzchirurgie, eingesetzt werden kann (Allen et al., 2002).

Eine Depression der HLA-DR-Expression geht einher mit einer reduzierten Antwort der Monozyten auf proinflammatorische Stimuli und wird als Immunparalyse bzw. Monozytendeaktivierung bezeichnet (Volk et al, 1991). Ferner ist eine reduzierte HLA-DR-Expression in den ersten postoperativen Tagen mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer Sepsis verbunden (Allen et al., 2002).

Die Bestimmung der Immunkompetenz ermöglicht ein besseres Abgrenzen proinflammatorischer Phasen gegen antiinflammatorische Gegenreaktionen, z.B. bei SIRS bzw. Sepsis. Neben der durchflusszytometrischen Bestimmung der monozytären HLA-DR-Expression, lassen sich über die ex-vivo Zytokinproduktion (z.B. TNF-alpha, IL-6 u.a.) nach LPS-Stimulation, Rückschlüsse auf die Immunkompetenz ziehen (Reinke et al., 1999).

### **1.3 Zielsetzung**

Der erste Themenbereich dieser Arbeit ist Teil einer Studie der Abteilung für Kinderkardiologie der Universitätskinderklinik Tübingen über die therapeutische Bedeutung und Nebenwirkungen von Stickstoffmonoxid bei Kindern mit pulmonaler Hypertonie.

Eine Inhalation mit NO ist zur Beherrschung pulmonal-hypertensiver Krisen im Anschluss an die extrakorporale Zirkulation, gerade bei Patienten mit großem Links/Rechts-Shunt oder persistierender pulmonaler Hypertonie, eine

weitverbreitete und erfolgreiche Therapie. Zahlreiche Untersuchungen fokussierten auf die toxischen Effekte von NO, wie die Methämoglobinbildung, Reaktion mit Sauerstoff zu Stickstoffdioxid und die Beeinträchtigung der Thrombozytenfunktion (Macrae et al., 2004).

Ebenso existieren Kenntnisse über dosisabhängige anti- und proinflammatorische sowie anti-thrombotische Wirkungen Stickstoffmonoxids, auf Leukozyten und Thrombozyten. In hoher Dosis (> 80 ppm), jenseits des klinischen Anwendungsbereiches, hat inhaliertes NO proinflammatorische und oxidierende Wirkungen, indem es zu einer erhöhten IL-1-Produktion der Makrophagen und Freisetzung reaktiver Oxidanzien führt (Wang et al., 1997; Weinberger et al., 1998). Bis 80 ppm reduziert es die Anzahl und die Aktivität pulmonaler Neutrophiler. Die Dosis von 50 ppm inhibiert die Migration der Neutrophilen aus dem vaskulären Kompartiment in die Luftwege und reduziert die Chemotaxis (Sato et al., 1999). Inhaliertes NO kann direkt die Adhäsion der Neutrophilen ans Endothel unterdrücken (Fioretto, 2003).

Aufgrund dieser Erkenntnisse war es ein Ziel dieser Arbeit u.a. die Beeinträchtigung der ex-vivo Zytokinsekretion und der Immunkompetenz durch Stickstoffmonoxid näher zu beleuchten.

Der Hauptteil der Arbeit befasst sich mit pro- und antiinflammatorischen Mechanismen nach herzchirurgische Eingriffen zur Korrektur angeborener Herzfehler unter Einsatz der Herz-Lungen-Maschine. Im Speziellen wurden Oberflächenantigene und Zytokinsekretion zum Monitoring der Leukozytenfunktion herangezogen.

Im Gegensatz zu Erwachsenen, bei denen die SIRS und das Freisetzungsmuster proinflammatorischer Zytokine im Gefolge einer HLM gut beschrieben und homogen ist (Brix-Christensen 1998), variieren die Plasmaspiegel proinflammatorischer Zytokine bei Kindern stark, die sich einem kardiochirurgischen Eingriff unterziehen, so dass sich hier die Situation weniger klar darstellt (Brix-Christensen, 2001).

Frühere Untersuchungen beschränkten sich auf proinflammatorische Zytokine bzw. einzelne Marker. Nach vorliegender Literatur scheint die Balance zwischen

pro- und antiinflammatorischer Antwort auf einen inflammatorischen Stimulus bedeutender zu sein, als das Ausmaß der proinflammatorischen Antwort alleine (Allen et al., 2002). Gerade vor diesem Hintergrund, war es die Idee dieser Untersuchung, pro- und antiinflammatorische Zytokine im perioperativen Verlauf zu bestimmen und gleichzeitig den Status der Leukozytenfunktion anhand der Oberflächenantigene zu dokumentieren,

Neben den Zytokinen wurde der Entzündungs- und Infektionsstatus durch die Bestimmung von Procalcitonin und LPS-bindendes Protein ergänzt. In dieser Untersuchung wurden die verschiedenen Entzündungsmarker bezüglich ihrer Kinetik und klinischen Aussagekraft verglichen.

Ziel der Arbeit war die Untersuchung folgender Fragestellungen:

- I. Hat die Inhalation von Stickstoffmonoxid einen relevanten Einfluss auf die Immunkompetenz bzw. Zytokinexpression nach Endotoxin-Stimulation?
- II. Welche Effekte hat eine Operation unter Einsatz der Herz-Lungen-Maschine auf die Funktion der Leukozyten und insbesondere auf die Leukozytenantigene? Wie wirkt sich diese auf pro- und antiinflammatorische Zytokine bzw. die Immunkompetenz aus? Bringen neue akute Phase Parameter relevante Erkenntnisse im perioperativen Verlauf?
- III. Haben Parameter, wie die tiefste Körpertemperatur während der HLM, die HLM-Dauer, die Körpergröße, der höchste postoperative Lactatwert sowie die Shuntrichtung des Vitiums, einen Einfluss auf die Expression der Leukozytenantigene bzw. die Sekretion pro- und antiinflammatorischer Zytokine?

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Patienten

Von Januar bis Juli 2001 wurden Blutproben von 40 Patienten untersucht, die wegen einer Herzoperation oder einer Herzkatheteruntersuchung in die Abteilung für Kinderkardiologie am Universitätsklinikum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin in Tübingen aufgenommen wurden. Die Herzkatheteruntersuchungen wurden von der Abteilung für Kinderkardiologie durchgeführt. Herzchirurgische Eingriffe unter Einsatz der HLM wurden von der Abteilung für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie in Zusammenarbeit mit der Anaesthesiologie vorgenommen und perioperativ von der Kinderkardiologie versorgt.

Die Patienten wurden in zwei Gruppen eingeteilt.

**Patientengruppe 1** bestand aus 20 Kindern (Alter  $7,8 \pm 1,38$  Jahre) mit einem angeborenen Herzfehler, bei denen eine diagnostische Herzkatheteruntersuchung durchgeführt wurde. Hier galt es, die Beeinflussung der Endotoxintoleranz der Leukozyten durch NO-Inkubation zu untersuchen. Hintergrund dieser Teilstudie ist die Fortführung der wissenschaftlichen Arbeiten der Abteilung für Kinderkardiologie bezüglich der Wirkung und Nebenwirkung einer NO-Inhalationstherapie bei pulmonaler Hypertonie. Eine Einverständniserklärung der Erziehungsberechtigten wurde eingeholt.

**Patientengruppe 2** wurde aus 20 Kindern ( $6,74 \pm 1,29$  Jahre) gebildet, die sich unter Einsatz der Herz-Lungen-Maschine, aufgrund ihrer Herzvitien einer Operation unterziehen mußten.

Hierfür wurden perioperative Blutproben zu verschiedenen Zeitpunkten gewonnen. Der Beobachtungszeitraum begann einen Tag vor der Operation und endete am dritten postoperativen Tag. Täglich fand eine Blutentnahme statt. Eine Einverständniserklärung der Erziehungsberechtigten wurde eingeholt.

## 2.2 In vitro Untersuchung der NO-Wirkung auf Leukozyten

In diese Untersuchung gingen die Blutproben der Patientengruppe 1 ein, die zur Herzkatheterdiagnostik stationär waren.

### 2.2.1 Probengewinnung

Während der Untersuchung wurden aus dem über die Arteria femoralis eingeführten, bereits liegenden Katheter, ca. 7 ml Blut entnommen. Die hierfür benutzten Monovetten der Fa. Sarstedt enthielten Li-Heparin, welches im Gegensatz zu EDTA nicht als Komplexbildner fungiert und somit kein Calcium bindet. Dies ist von entscheidender Bedeutung, da die Zellen für ein Ansprechen beim Endotoxintoleranztest Calcium benötigen.

Von jeder Probe wurde im hämatologischen Routinelabor der Kinderklinik ein Differentialblutbild mit dem Vollautomaten Advia der Firma Bayer, Leverkusen, bestimmt.

Alle Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei Raumtemperatur auf einem Rollenmischer (*Tab. 1*) aufbewahrt. Der Zeitraum zwischen Probengewinnung und Verarbeitung betrug nie mehr als 6 Stunden.

**Tabelle 1:** Materialliste Probengewinnung und Lagerung

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ort</b>
Monovette Li-Hep 4 ml mit Adapter	Sarstedt	Nürmbrecht, D
Rollenmischer	Sarstedt	Nürmbrecht, D
Advia 120	Bayer	Leverkusen, D

### 2.2.2 Versuchsaufbau NO-Inkubation

Jeweils mindestens 3ml der Li-Heparin-Blutprobe wurden in ein, zu einem Trachealsaugatz gehörendes, Röhrchen pipettiert. Der Röhrchenverschluss ist versehen mit einem zu- und einem abführenden Röhrensystem, das, aufgrund des luftdichten Abschlusses, die Verwendung des Saugatzes als

Inkubationskammer zuläßt. Über die zuführende Seite wurde das im folgenden beschriebene Gasmisch in das Röhrchen eingeleitet. Mit Hilfe einer gelben Eppendorf-Pipettenspitze trat das Gas etwas oberhalb des Blutspiegels in das Röhrchen ein.

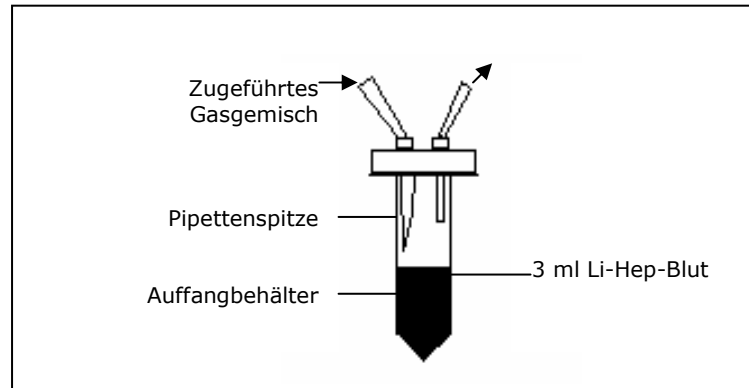


Abbildung 3: abgewandelter Trachealsaugatz

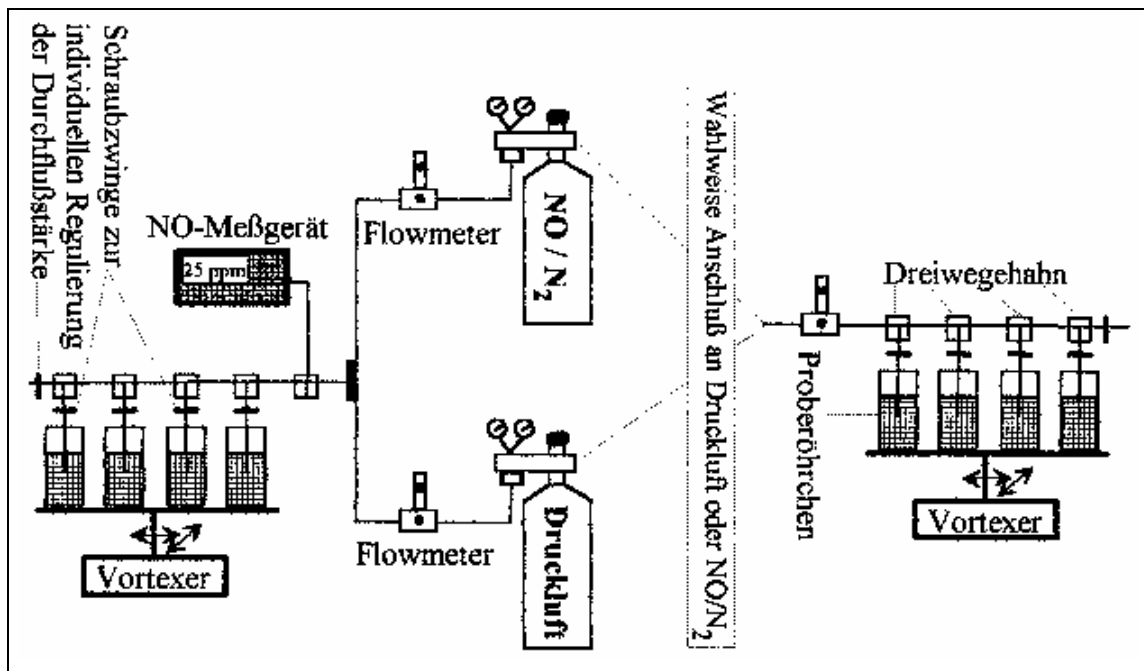


Abbildung 4: Versuchsaufbau NO-Inhalation

Nachdem bereits einige Untersuchungen zur Dosisabhängigkeit der NO-Konzentration im Gasmisch existieren, wählte man in diesem in vitro Versuch die Konzentrationen 0 ppm NO und 100 ppm NO. Die Konzentration von 100 ppm NO wurde mit Hilfe von zwei Flowmetern eingestellt, welche es möglich machten, die Gaszufuhr aus den Flaschen separat zu regulieren. Über ein

zwischengeschaltetes NO-Meßgerät konnte die Konzentration laufend kontrolliert werden. 0 ppm diente hierbei als Kontrolle, wofür die Inkubationskammer nur über einen Flowmeter mit der Druckluftflasche verbunden wurde. Eine Konzentration von 100 ppm NO ist ein Mehrfaches der im klinischen Anwendungsbereich gebräuchlichen Konzentrationen, die in etwa bei 25 ppm NO liegen.

Nach Einstellen der Konzentrationen wurden die Proben für 45 min inkubiert. Für eine ausreichende Durchmischung sorgte ein bei niedriger Geschwindigkeit laufender Vortexer, auf dem die Proben befestigt wurden. Im Anschluß daran wurde ein Endotoxinstimulationstest mit den inkubierten Proben durchgeführt.

**Tabelle 2:** Materialliste NO-Inkubation

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ort</b>
Trachealsaugatz mit Auffangbehälter	Uno Plast AIS	Hundested, DK
Pipettenspitze gelb	Greiner	Frickenhausen, D
Pipettenspitze blau	Greiner	Frickenhausen, D
Dreiwegehahn	Braun AG	Melsungen, D
Stickstoffmonoxid 640 ppm in Stickstoff	Messer-Griesheim	Reutlingen, D
Druckluft	Messer-Griesheim	Reutlingen, D

**Tabelle 3:** Geräteliste NO-Inkubation

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ort</b>
Dräger Pac II NO	Dräger	Lübeck, D
Flowmeter	Felber	Langenfeld, D
Eppendorf-Varipette 10-100 µl	Eppendorf	Hamburg, D
Eppendorf-Varipette 101-1000 µl	Eppendorf	Hamburg, D
Vortexer-MS 1 Minishaker	Migge GmbH	Leonberg, D

## **2.3 Untersuchung des Einflusses der HLM-Operation auf die Leukozytenfunktion**

### **2.3.1 Probengewinnung**

Für diesen Teil der Arbeit wurden Blutproben der Patientengruppe 2 untersucht. Zu fünf Zeitpunkten, einen Tag vor der OP, unmittelbar nach dem OP-Ende sowie am ersten bis dritten postoperativen Tag, wurden den herzoperierten Kindern Blutproben (2,8 ml Li-Heparin-Blut) über bereits liegende Katheter entnommen. Die Lagerung bis zur Verarbeitung und das Erstellen des Blutbildes erfolgte wie unter 2.2.1 beschrieben. Auf eine Gasinkubation wurde in diesem Teil verzichtet.

## 2.4 Stimulation mit Lipopolysaccharid

### 2.4.1 Stimulation der Proben nach NO-Inkubation

Nach erfolgter Gasinkubation wurden beide Ansätze (100ppm NO und Kontrolle (0ppm NO)) aufgeteilt. Zu je einem 1 ml Vollblut aus beiden Reihen wurden 10µl LPS-Lösung (0,1mg LPS/ml, rekonstituiert in PBS) pipettiert. 1 ml Vollblut aus beiden Inkubationsreihen diente als Negativkontrolle und wurde unbehandelt dem Brutschrank zugeführt. Für die intrazelluläre Anfärbung von Zytokinen für die FACS-Analyse war der Zusatz von Brefeldin A (BFA) notwendig, welches den Transport der Zytokine aus der Zelle inhibiert. Um die enzymatische Zytokinbestimmung im Plasma nicht zu beeinträchtigen, wurden deshalb zwei weitere Ansätze aus je 10 µl BFA-Lösung (200 µg/ml, rekonstituiert in DMSO), je 200 µl Vollblut und 2µl LPS-Lösung o.g. Konzentration hergestellt. Die Negativkontrollen hierzu unterschieden sich darin, daß sie ohne LPS-Zugabe in den Brutschrank gestellt wurden. Nach Durchmischen der Ansätze mit dem Vortexer, erfolgte die Stimulation im Begasungsbrutschrank Hera Cell für 3 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

**Tabelle 4:** Materialliste Endotoxinstimulation

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ort</b>
Falcon-Polystyrolröhrchen 2058	BD Labware	Heidelberg, D
Pipettenspitze gelb	Greiner	Frickenhausen, D
Pipettenspitze blau	Greiner	Frickenhausen, D
Brefeldin A	Sigma Aldrich	München, D



DMSO	Sigma Aldrich	München, D
Lipopolysaccharid (Sigma Katalog-Nr. L2654)	Sigma Aldrich	München, D
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	Biochrom KG	Berlin, D

---

#### 2.4.2 Stimulation der Proben der HLM-Patienten

Die gewonnenen Blutproben wurden analog 2.4.1 behandelt. 1ml Vollblut wurde mit LPS versetzt, 1ml diente als Kontrolle. Diese Ansätze wurden im Anschluß an die Stimulation der Oberflächenfärbung der Leukozytenantigene zugeführt. Für die intrazelluläre Zytokinfärbung wurden wiederum separate Ansätze mit BFA hergestellt.

#### 2.4.3 Konservierung des Plasmas

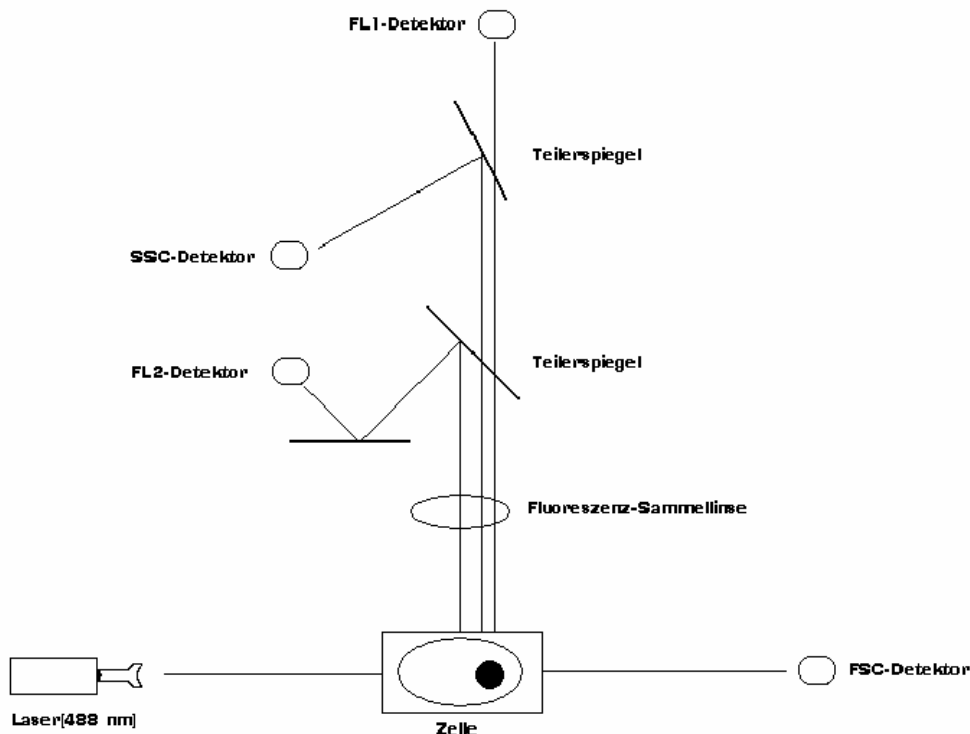
Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Falcon-Röhrchen aus dem Brutschrank geholt. Die Ansätze für die Oberflächenfärbung wurden bei 500 x g und 20°C für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und in Eppendorf-Tubes zur Lagerung im Tiefkühlschrank bei -70°C gegeben bis zur Messung der pro- und antiinflammatorischen Zytokine. Anschließend erfolgte ein Volumenersatz der Proben mit PBS-Lösung.

### 2.5 Durchflußzytometrie

Die Durchflußzytometrie stellt eine Methode zur Analyse und Charakterisierung von Zellen in Suspension auf der Grundlage von Fluoreszenz und Streulichteigenschaften dar. Sie ermöglicht die simultane Messung verschiedener Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften einer einzelnen Zelle. Diese registrierten Daten werden Computer-assistiert ausgewertet und in einem Schaubild graphisch verdeutlicht.

## 2.5.1 Arbeitsprinzip

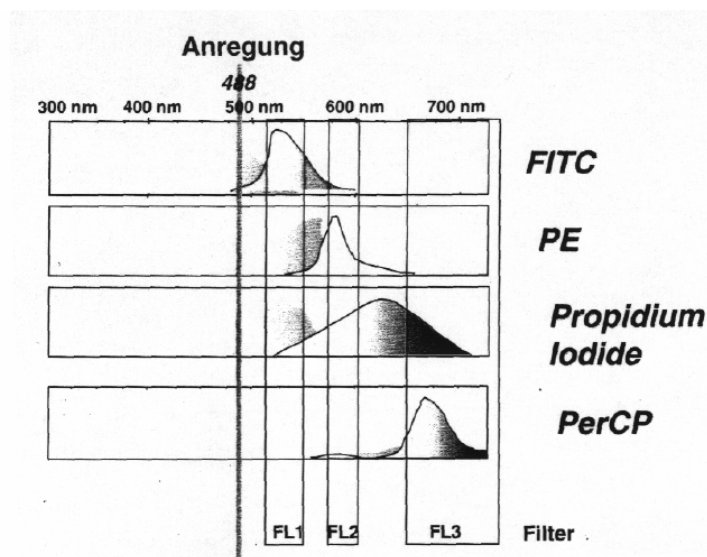
Die Zellsuspension im Probenröhrchen wird über eine Kapillare durch Überdruck in die Meßküvette befördert. Beim Eintreten in die Meßkammer werden die Zellen durch die zugeführte Trägerflüssigkeit stark beschleunigt. Dadurch lösen sich Zellaggregate auf und die Zellen erreichen wie Perlen einer Perlenkette aneinandergereiht den Analysepunkt. Dieser Vorgang wird als hydrodynamische Fokussierung bezeichnet. Dadurch passiert jede Zelle den Analysepunkt einzeln, an dem sie von einem Laserstrahl einer bestimmten Wellenlänge getroffen wird (siehe Abbildung 7). Dabei kommt es zur Lichtstreuung des Laserstrahls, einem physikalischen Vorgang, bei dem die Richtung, aber nicht die Wellenlänge des einfallenden Lichts verändert wird. Abhängig ist die Lichtstreuung u.a. von der Zellgröße, der Struktur und den intrazellulären Bestandteilen. Der Strahlengang des verwendeten Durchflußzytometers FACScalibur ist vereinfacht in Abbildung 5 dargestellt.



**Abbildung 5: Schematischer Aufbau des Strahlengangs des FACScalibur von Becton Dickinson (vereinfacht).** Beispielhaft ist hier der Strahlengang für FL1 und FL2 dargestellt, welche für die Detektion von FITC und PE verwendet werden.

In der Durchflußzytometrie unterscheidet man die Vorwärtsstreuung (FSC) von der Seitwärtsstreuung (SSC). Erstere ist ein Maß für die Zellgröße, letztere hängt hauptsächlich von der intrazellulären Granularität ab. Außer der Lichtstreuung kann auch noch die Fluoreszenz einer Zelle gemessen werden, sofern sie vorher mit einem fluoreszenz-markierten Antikörper gefärbt wurde. Fluoreszierende Verbindungen absorbieren Lichtenergie über ein für sie charakteristisches langwelligeres, und somit energieärmeres, Licht. Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE) sind zwei in der Durchflußzytometrie für die Immunfluoreszenz gebräuchliche Farbstoffe, da ihr Absorptionsspektrum im Bereich der Wellenlänge des verwendeten Argon-Ionenlasers (488nm) liegt.

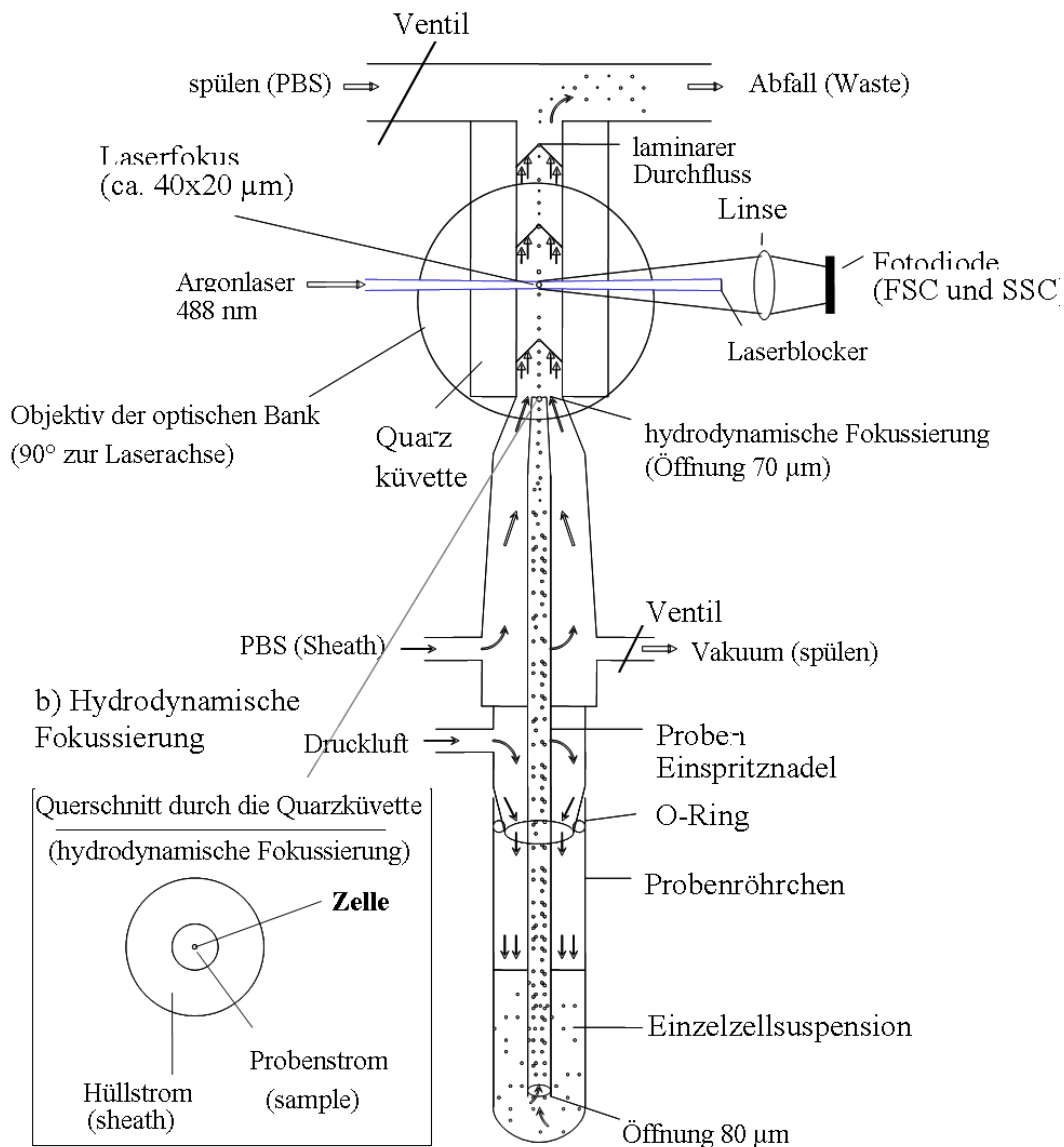
Einen Überblick über die Fluoreszenzspektren der am häufigsten verwendeten Fluorochrome gibt Abbildung 6.



**Abbildung 6: Fluoreszenzspektren der für die FACS-Analyse wichtigsten Fluorochrome.**

Dargestellt sind die Erregungsspektren sowie die Detektionsbereiche der verschiedenen Filter des FACSCalibur® (FL1-3). FITC = Fluorescein-Isothiocyanat; PE = Phycoerythrin;

PerCP = Peridinin Chlorophyll Protein. Aus Immunozytometrische Systeme, Becton-Dickinson.



**Abbildung 7: Schematischer Aufbau eines Durchflußzytometers**

Die Abbildung zeigt das Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung und gibt einen Überblick über die Konstruktion eines Durchflußzytometers. Aus FACS-Lab, Universität Mainz.

## 2.6 Antikörper

Zum Einsatz kamen ausschließlich FITC- und PE-markierte monoklonale Maus-Antikörper der Firma Becton Dickinson, Heidelberg (Tab. 5)

Simultest™ Control  $\gamma_1/\gamma_{2\alpha}$  ist ein Reagenz für die direkte Zweifarbenimmunfluoreszenz, welches als Negativkontrolle zur Immunphänotypisierung von Vollblut in der Durchflußzytometrie dient. Es

ermöglichte die Fluoreszenzquadrantenmarker bei der Messung so zu setzen, daß man zwischen negativ und positiv gefärbten Zellen unterscheiden und das Ausmaß unspezifischer Färbung durch Fc-Rezeptoren abschätzen konnte. Für die intrazelluläre Färbung wurde Platelet Control  $\gamma_1$ -PE als Negativkontrolle zum Antikörper gegen IL1-ra benutzt.

Simultest™ CD4/CD8 wurde als Positivkontrolle verwendet, mit dessen Hilfe die Einstellung der Kompensation am Durchflußzytometer erfolgte. Gleichzeitig diente es als Zweifarbenimmunfluoreszenzreagenz zur Bestimmung des prozentualen Anteils reifer humaner Helferzellen (CD4<sup>+</sup>) und zytotoxischer Lymphozyten (CD8<sup>+</sup>) aus Vollblut nach Erythrozytenlyse. Die Antikörper gegen CD11a, CD14, CD18, HLA-DR wurden zur Untersuchung der Expression der entsprechenden Adhäsionsmoleküle auf der Leukozytenoberfläche verwendet. Anti-Human IL-1ra ermöglichte die intrazelluläre Markierung von IL-1ra in Monozyten nach durchgeführter Oberflächenfärbung mit dem CD14-Antikörper.

**Tabelle 5:** Materialliste Durchflußzytometrie

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ort</b>
Durchflußzytometer FACScalibur	BD Bioscience	Heidelberg, D
Pipettenspitze gelb	Greiner	Frickenhausen, D
Pipettenspitze blau	Greiner	Frickenhausen, D
Eppendorf-Varipette 10-100 µl	Eppendorf	Hamburg, D
Eppendorf-Varipette 101-1000 µl	Eppendorf	Hamburg, D
Vortexer-MS 1 Minishaker	Migge GmbH	Leonberg, D
Simultest Control™ $\gamma_1/\gamma_{2\alpha}$ (IgG1 FITC/IgG <sub>2α</sub> PE)	BD Bioscience	Heidelberg, D
Platelet Control $\gamma_1$ -PE	BD Bioscience	Heidelberg, D
Simultest™CD4 (FITC)/CD8(PE)	BD Bioscience	Heidelberg, D
Anti-LFA-1 $\alpha$ -FITC (CD11a)	BD Bioscience	Heidelberg, D
Anti-LFA-1 $\beta$ -FITC(CD18)	BD Bioscience	Heidelberg, D
CD14-PE	BD Bioscience	Heidelberg, D
CD14-FITC	BD Bioscience	Heidelberg, D
HLA-DR-PE	BD Bioscience	Heidelberg, D
Anti-Human IL-1ra-PE	BD Bioscience	Heidelberg, D
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung	Biochrom KG	Berlin, D
BSA	Sigma Aldrich	München, D
p-Formaldehyd	Sigma Aldrich	München, D

Na-Azid	Sigma Aldrich	München, D
Brefeldin A (BFA)	Sigma Aldrich	München, D

---

## 2.7 Isolierung und Färbung der Leukozyten

Die Isolierung und Färbung der Leukozyten erfolgte nach der sog. "Vollblutmethode", basierend auf einem Protokoll der Herstellerfirma der Antikörper, Becton Dickinson. Dabei werden die Leukozyten mittels direkt fluorchromkonjugierter monoklonaler Antikörper immunologisch charakterisiert. Vorteile dieses Verfahrens finden sich in der Erfassung aller Leukozyten, der Reduktion unspezifischer Bindung über Fc-Rezeptoren und in der geringen Menge des benötigten Zellmaterials (Kleine et al, 1994).

### 2.7.1 Oberflächenfärbung

Erster Schritt der Oberflächenfärbung war das Bestücken der Falcon-Röhrchen mit den Antikörperlösungen (je 10µl). Der Einsatz von PE- und FITC-konjugierten Antikörpern erlaubte Doppelfärbungen, so daß pro Röhrchen zwei Antigen-Phänotypen markiert werden konnten. Nach Zugabe von 100 µl der vorbehandelten Proben, gasinkubiert und mit LPS-stimuliert (NO-Untersuchung) bzw nur LPS-stimuliert (HLM-Untersuchung) wurden die Ansätze mit Hilfe eines Vortexers vermischt und für 30 Minuten auf Eis und bei Dunkelheit inkubiert. Im Anschluß wurden die Färbeansätze durch Beigabe von 2ml *FACS Lysing Solution 1X* (Lösung wird als 10X geliefert und ist mit destilliertem Wasser auf 1X zu verdünnen.) der Erythrozytenlyse unterzogen. Die Proben wurden wiederum kurz durchmischt und für 10 min im Dunkeln bei Raumtemperatur aufbewahrt. Eine Lagerung auf Eis ist nicht empfehlenswert, da die Lyse dann unvollständig, und eine deutliche Unterscheidung der Leukozytensubpopulationen nicht mehr möglich ist.

Sofort nach der Lyse wurden die Proben für fünf Minuten bei 500 x g und 20°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Waschen aller Ansätze erfolgte mit 3 ml Pufferlösung (PBS mit 0,5% BSA und 0,1% Na-Azid). Nach dem

Zentrifugieren unter gleichen Bedingungen wurde der Überstand dekantiert und eine Fixierung der Färbung erreicht durch Resuspension in 0,5ml einer 1% p-Formaldehydlösung. Somit war eine Aufbewahrung bei 2-8°C im Dunkeln bis zu 24 Stunden laut Hersteller der Antikörper unbedenklich. Die Proben wurden mit dem *FACS-Calibur* im entsprechenden Intervall analysiert.

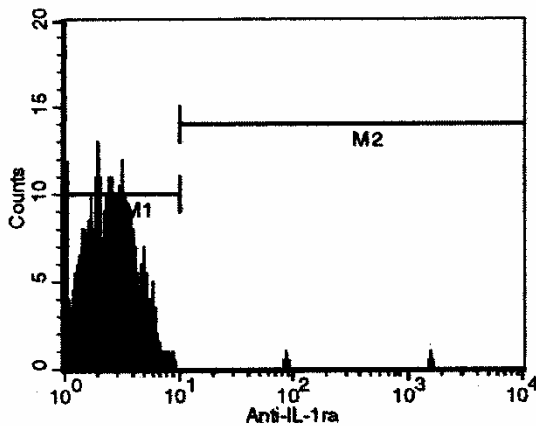
Um die Intensität der Fluoreszenz durch Ausbleichen der Farbstoffe nicht zu verringern, sollte der gesamte Vorgang der Färbung lichtgeschützt geschehen. Die Färbung auf Eis (ca. 4°C) wird von HED empfohlen, um einer Erhöhung der Expression der Oberflächenantigene bei Zimmertemperatur entgegenzuwirken (Hed et al., 1988). FORSYTH konnte keinen großen Unterschied in der Antigenexpression zwischen einer Zellpräparation bei 4°C und 37°C nachweisen. Erst bei einer Wiedererwärmung auf 37°C kam es zu einer vermehrten Antigenexpression durch Mobilisierung intrazellulärer Antigenstores (Forsyth und Levinsky, 1990). Dieser Effekt konnte in eigenen Vorversuchen bestätigt werden. Deshalb wurde für die Einstellung des FACScalibur-Gerätes eine zusätzliche Negativ- und Positivkontrolle angefertigt, um bei den Messungen für die Datenaufnahme eine möglichst kurze und konstante Wiedererwärmungszeit von wenigen Sekunden zu haben.

### 2.7.2 Zytokinfärbung

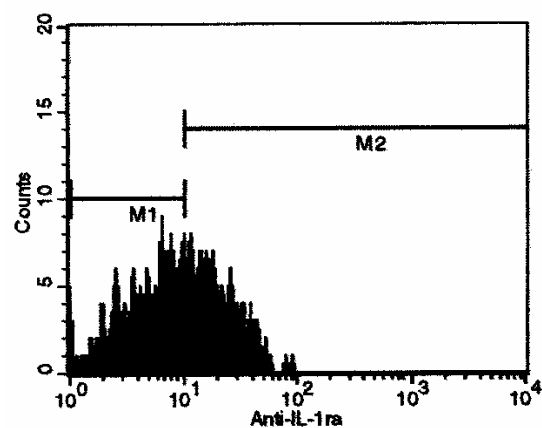
Die intrazelluläre Zytokinfärbung gestattet die Detektion von Zytokinen im Zytoplasma der Zelle anhand von fluoreszenzmarkierten Antikörpern durch das Durchflusszytometer. Zytokine fungieren als Zellbotenstoffe und werden von der Zelle sezerniert. Eine Detektion in der Zelle ist somit nur sinnvoll, wenn der Transport aus der Zelle unterbunden wird. Dies kann erreicht werden, indem zum Stimulationsansatz Brefeldin A (BFA) gegeben wird. BFA inhibiert den Transfer vom glatten endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat, so daß Zellprodukte wie z.B. Zytokine in der Zelle akkumulieren (siehe *Abb. 9*).

Hauptproduktionsstätte von IL-1ra ist der aktivierte Monozyt, der durch Oberflächenfärbung mit Antikörpern gegen CD14 markiert wurde (s.o.). Durch

Versetzen der Proben mit FACS-Permeabilizing-Solution erreichte man ein Eindringen der fluoreszenz-markierten Antikörper gegen IL-1ra bzw. der Negativkontrolle Platelet Control. Hierfür wurden 500µl dieser Lösung zugegeben, kurz vermischt und für 10 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgte ein Waschvorgang mit 3ml Pufferlösung. Nach Dekantieren der Überstände wurde zu den Proben der jeweilige Antikörper pipetiert. 20µl der IL-1ra-Antikörperlösung bzw 20µl der Negativkontrolle wurden nach Zugabe mit den Proben vermengt und 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Im weiteren schloß sich ein Waschvorgang mit der Pufferlösung an und zur Aufbewahrung bei 2-8°C wurden die Pellets wiederum in 1%p-Formaldehydlösung konserviert.



**Abbildung 8:**  
FACS-Analyse einer mit LPS stimulierten Zellsuspension nach Anfärbung mit Anti-IL-1ra ohne Vorbehandlung mit BFA.



**Abbildung 9:**  
FACS-Analyse einer mit LPS stimulierten und mit BFA vorbehandelten Zellsuspension nach Anfärbung mit Anti-IL-1ra.

### 2.7.3 Epifluoreszenzmikroskopie

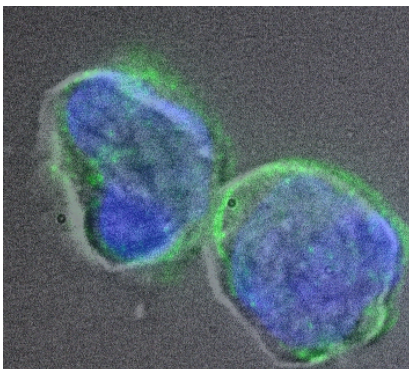
Zur optischen Veranschaulichung und Bestätigung der intrazellulären Zytokinfärbung wurde exemplarisch eine Epifluoreszenzmikroskopie einer, für die FACS-Analyse vorbereiteten, Patientenprobe durchgeführt. Hierfür wurden zwei Objektträger mit Hilfe einer speziellen Zentrifuge mit einem Teil der Zellsuspension der unstimulierten bzw. der stimulierten Patientenprobe versehen. Die Aufnahmen wurden mittels eines Olympus BX-60 Mikroskop angefertigt.



Abbildung 10 zeigt zwei Monozyten aus der unstimulierten Patientenprobe, welche mit Anti-IL-1ra-PE intrazellulär und Anti-CD14-FITC an der Oberfläche angefärbt wurden. Im Zytoplasma lassen sich keine PE-Fluoreszenzen ausmachen. In Abbildung 11 sind drei Leukozyten dargestellt, von denen zwei an der Zellmembran grüne Fluoreszenz aufweisen, entsprechend der FITC-konjugierten Antikörper gegen das CD14-Antigen. Im Inneren der Zelle erkennt man rot-fluoreszierende Partikel, welche PE-markierten-Antikörpern gegen IL-1ra gleichkommen.

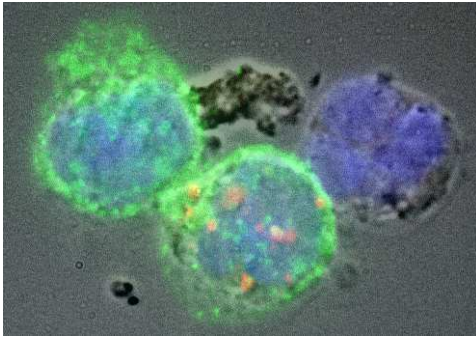
In beiden Abbildungen sind die Kernbereiche (DNA) durch eine DAPI-Färbung blau gekennzeichnet.

Mit Hilfe der AnlysisDoku<sup>®</sup>-Software wurde das Overlaybild in Abbildung 12 erstellt. Das Fluoreszenzspektrum, welches über die gelbe Linie aufgenommen wurde, zeigt mehrere Peaks. Das grüne Fluoreszenzprofil hat Spitzenausschläge, welche der Zellmembran zuzuordnen sind, d.h. dazwischen befindet sich der Intrazellularraum. Cytoplasma wird über die blaue Fluoreszenzintensitätslinie gekennzeichnet, deren Peak zwischen den beiden grünen liegt, was mit der Definition vereinbar ist. Die maximale Fluoreszenzintensität des roten Profils (Anti-IL-1ra-PE) findet sich ebenfalls intrazellulär.



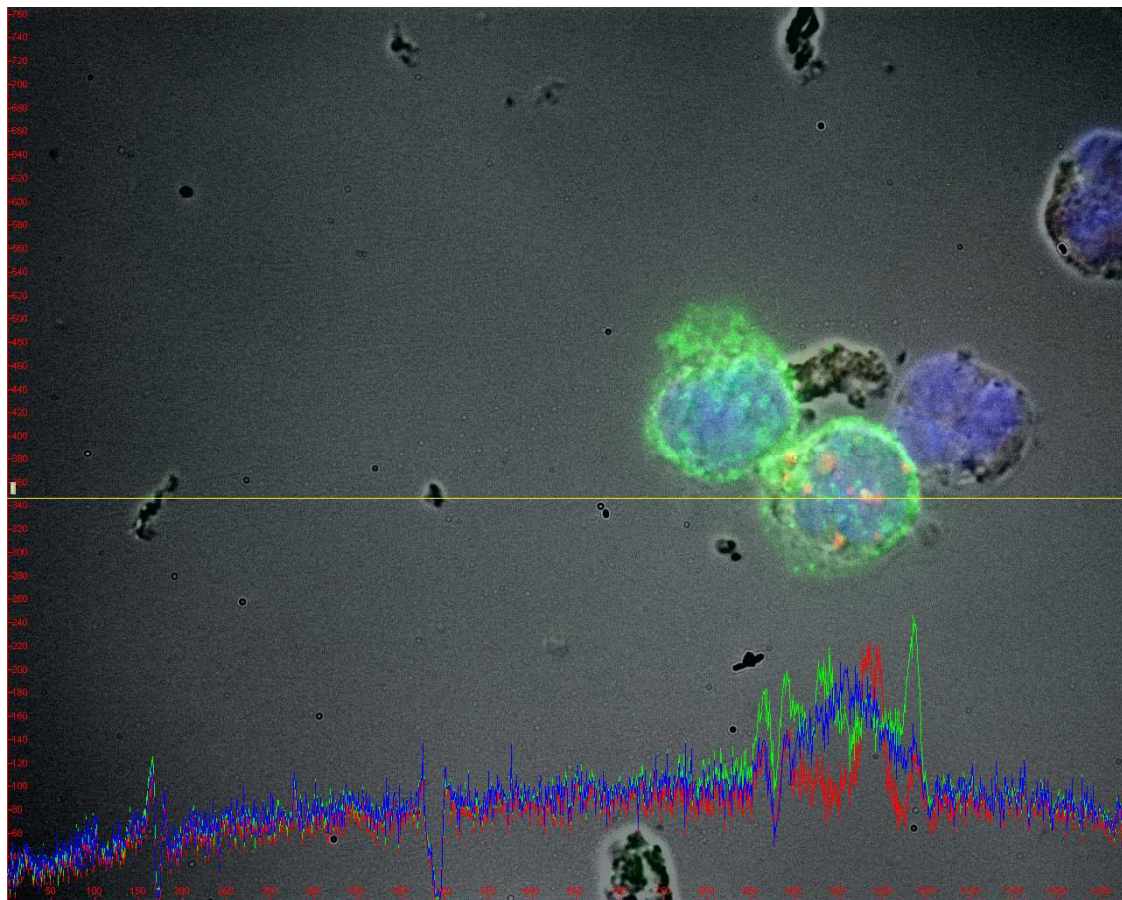
**Abbildung 10: Epifluoreszenzmikroskopische Aufnahme zweier Monozyten**

Die Abbildung zeigt zwei Monozyten welche der intrazellulären Zytokinfärbung unterzogen wurden. Die Zellen stammen aus einer Patientenprobe, die als Negativkontrolle fungierte, d.h. sie wurde ohne Endotoxinzugabe im Brutschrank inkubiert. Die grüne Fluoreszenz an der Zellmembran entsteht durch die Anlagerung der FITC-markierten Antikörper gegen CD14-Antigen, welches ein Monozytenmarker ist. Die blaue Fluoreszenz entspricht der Kernfärbung (DAPI-Färbung).



**Abbildung 11: Epifluoreszenzmikroskopische Aufnahme. LPS-stimulierte Patientenprobe.**

Dargestellt sind drei Leukozyten, von denen zwei an ihrer Oberfläche CD14 positiv sind (CD14-FITC-Ak). Im Zytoplasma der mittleren Zelle finden sich rot-fluoreszierende Makulae, welche PE-markierten Antikörpern gegen IL-1ra entsprechen. (Zellen stammen aus der gleichen Patientenprobe wie in Abbildung .)



**Abbildung 12: Epifluoreszenzmikroskopische Aufnahme endotoxinstimulierter Zellen. Overlaybild (erstellt mit Analysis Doku<sup>®</sup>)**

Dargestellt sind die Zellen aus Abbildung 11. Über die zytokinproduzierende Zelle wurde ein Fluoreszenzprofil gelegt, welches im unteren Teil der Abbildung sichtbar ist. Das grüne Profil, welches der FITC-Fluoreszenz entspricht, zeigt zwei Peaks, die durch die Zellmembran bedingt sind. Zwischen den Peaks befindet sich der intrazelluläre Raum. Darin lässt sich ein blauer und ein roter Fluoreszenz-Peak erkennen. Das blaue Profil ergibt sich durch die DAPI-Zellkern-Färbung. Fluoreszenz durch PE-markierte-Antikörper (Anti-IL1ra-PE) ist rot dargestellt und zeigt einen intrazellulären Peak, welcher als optischer Nachweis von IL-1ra zu interpretieren ist.

## 2.8 Messung und Auswertung der Antikörperfluoreszenz

Bei der Messung, die grundsätzlich am FACScalibur von Becton Dickinson durchgeführt wurde, werden von jeder einzelnen Zelle gleichzeitig FSC, SSC und Fluoreszenzeigenschaften registriert. Für die Datenerhebung und Auswertung wurde die Software CellQuest eingesetzt. Für jeden Parameter ist der Meßbereich in eine bestimmte Anzahl von Kanälen (Klassen) eingeteilt. Je mehr Kanäle vorhanden sind, desto größer ist die Auflösung. Der Wert eines gemessenen Zellsignals wird einem Zellkanal zugeordnet, er fällt gleichsam einer Kugel in ein Register. Die gemessenen Signale können logarithmisch oder linear verstärkt werden, wobei der Meßbereich, jedoch nicht die Kanalauflösung verändert wird. Um Zelltrümer (Debris) von den zu analysierenden Zellen zu trennen, besteht die Möglichkeit, für jeden Parameter eine Schwelle (Threshold) festzulegen.

Mit CellQuest lassen sich die Proben gleichzeitig messen und auswerten. Um Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten zu analysieren ist es notwendig, die Geräteparameter der jeweiligen Population anzupassen. Zur Geräteeinstellung wurde eine Negativprobe (Simultest-Control) und eine Positivprobe (CD4-FITC/CD8-PE) benutzt. Als erstes wurden die Lymphozyten mit einem "Aquisitionsgate" im sog. Dotplot eingegrenzt. Beim Dotplot wird auf der x-Achse die Vorwärts- (FSC) und auf der y-Achse die Seitwärtslichtstreuung (SSC) aufgetragen. Nach Einstellen der Verstärkung für die Lichtstreuung (linear) und der Spannung an den Fluoreszenzdetektoren (logarithmisch), wurde die Kompensationseinstellung optimiert, um eine Überlappung der Fluoreszenzspektren der eingesetzten Fluorochrome FITC (FL1) und PE (FL2) zu korrigieren. Durch die Einstellung des Threshold wurde ein Schwellenparameter für den FSC-Kanal bestimmt, welcher Zelltrümer von der Analyse ausschließt. In einem FL1/FL2-Dotplot wurde die Einstellung kontrolliert und so justiert, daß die Negativkontrolle im linken unteren Quadranten lag, welcher auf beiden Achsen durch die erste Dekade begrenzt wird (siehe *Abb. 13*). Fluoreszenzereignisse, die in Kanäle über der ersten

Dekade fielen, wurden als positiv gewertet: FL1 positiv, falls im rechten unteren Quadranten, FL2 positiv im linken oberen Quadranten und FL1 und FL2 positiv, falls im rechten oberen Quadranten liegend. Anhand der CD4/CD8-Färbung, welche positive Ereignisse im FL1-Bereich (CD4+T-Lymphozyten) bzw. FL2-Bereich (CD8+T-Lymphozyten) und negative Ereignisse für beide Bereiche (B-Lymphozyten) zeigt, ließ sich eine korrekte Einstellung überprüfen.

Zur Darstellung der Meßergebnisse und Auswertung wurde die Einparameterdarstellung, entsprechend einem Histogramm, für FL1 und FL2 gewählt.

Bei jeder Messung wurden 10000 Zellen analysiert.

Nach Analyse der Lymphozyten wurde die Geräteeinstellung für Monozyten und Granulozyten angepaßt und ein Aquisitionsgate für 1000 Monozyten gesetzt, so daß die Messung nach Analyse von 1000 Monozyten automatisch beendet wird. Als Positivkontrolle zur Einstellung diente hierbei die CD11a-FITC/CD14-PE-Probe. Es folgte die Analyse aller Proben für Monozyten und Granulozyten.

Für die intrazellulär angefärbten Proben war ein besonderes Vorgehen notwendig. Die Kompensation der Fluoreszenzspektren erforderte eine Anpassung. Hierbei wurde das Aquisitionsgate um CD14+-Monozyten gezogen, da diese Zellen der Hauptfokus bei der Analyse nach Stimulation mit Lipopolysaccharid sind.

Zur Darstellung diente hierfür ein FL1(CD14)/SSC-Diagramm, welches eine Abgrenzung CD14-negativer gegenüber CD14-positiver-Monozyten zuließ. Die Aquisition umfaßte 1000 CD14-positive-Monozyten, die hinsichtlich ihrer Fluoreszenzintensität für IL-1ra analysiert wurden. Als Negativkontrolle fungierte Platelet Control.

Die Einstellungsparameter für alle drei Meßreihen wurden beim gleichen Patienten konstant gehalten und während der gesamten Messungen möglichst wenig verändert.

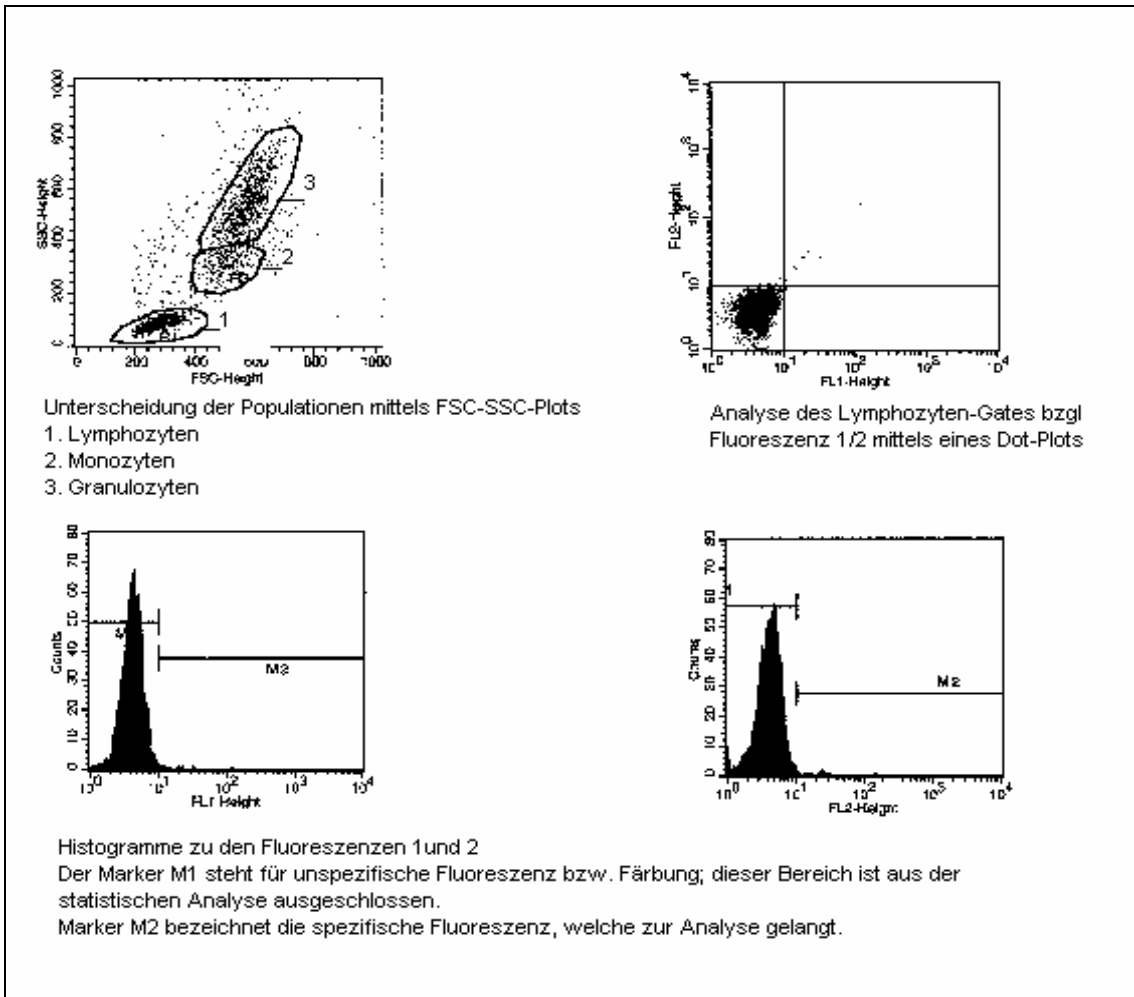


Abbildung 13: Darstellung der Zellanalyse mit der CELL-Quest-Software.

## 2.9 Chemiluminiszenz-Immunoassay zur Bestimmung pro- und antiinflammatorischer Proteine

Zur Analyse gelangte das nach Inkubation der Vollblutproben der Studienteilnehmer gewonnene Plasma, welches bei -70°C im Tiefkühlschrank bis zur Analyse aufbewahrt wurde.

### 2.9.1 Festphasen-Chemiluminiszenz-Enzymimmunoassay

IL-6 und TNF- $\alpha$  wurden als Vertreter der proinflammatorischen Zytokine, deren Produzenten hauptsächlich die Leukozyten (Aktivierte Makrophagen-

Monozyten-B-Zellen-T-Zellen) sind, in beiden Studien, mit und ohne Stimulation mit Endotoxin, bestimmt.

LBP hingegen, dessen Hauptproduktionsstätte die Leber ist, wurde nur in der HLM-Studie und nur bei unstimulierten Proben gemessen. Vorausgehende Messungen stimulierter Proben haben gezeigt, daß es im Vergleich zur unstimulierten Probe keine Unterschiede im Messwert gibt, da die Synthese in Leukozyten einer längeren Inkubationszeit als 3h bedarf.

Zur Verwendung gelangte ein Festphasen-Chemiluminiszenz-Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung der o.g. Parameter. Dies sind Assays der Firma DPC Biermann, die mit deren Immulite-Analyzer, einem Gerät zur automatischen Durchführung von Chemiluminiszenz-Immunoassays, anzuwenden sind.

#### 2.9.1.1 Das Arbeitsprinzip

Beim Immulite-System verwendet man parameterspezifische mit Antikörper oder Antigen beschichtete Kunststoffkugeln als Festphase, mit alkalischer Phosphatase markierte Reagenzien und ein chemiluminiszierendes Enzymsubstrat. Die Kugel befindet sich in einem speziellen Teströhrchen (siehe *Abb. 14*). Dieses dient als Reaktionsgefäß für Immunreaktion, Inkubation, Waschschriffe und Signal-entwicklung. Der Testablauf ist dabei automatisiert. Zunächst wird die Probe zusammen mit dem Reagenz inkubiert, an das alkalische Phosphatase gebunden ist. Nach Beendigung der Inkubationszeit wird das Röhrchen mit hoher Geschwindigkeit um die vertikale Achse gedreht, und es wird Wasser zugegeben, um die beschichtete Kugel zu waschen. Die gesamte enthaltene Flüssigkeit (Probe, überschüssiges Reagenz und Wasser) wird dabei in eine Abfallkammer im Teströhrchen überführt. Die Kugel ist jetzt frei von allen Rückständen, die eventuell ungebundene Marker enthalten könnten. Anschließend wird der gebundene Marker über ein lumineszierendes Dioxetansubstrat quantifiziert. Das emittierte Licht wird mit einem Photomultiplier (PMT) gemessen, und die Software ermittelt das jeweilige Probenergebnis.

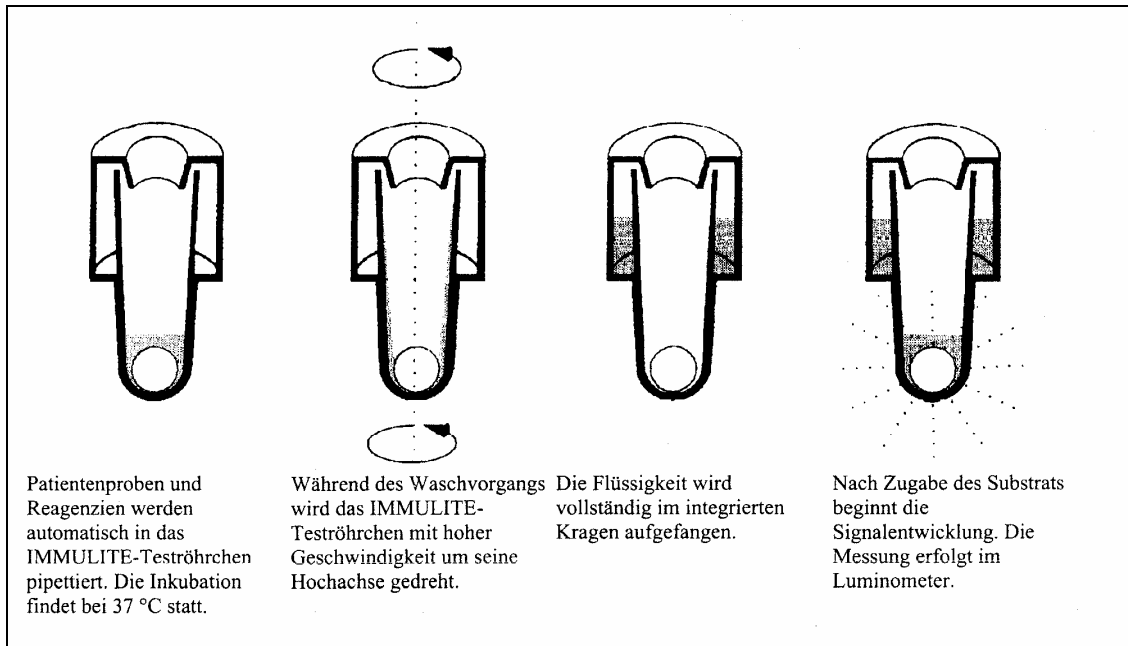


Abbildung 14: Teströhrchen und Testablauf Immulite-Analyzer (Immulite-Analyzer-Bedienungsanleitung)

### 2.9.1.2 Die Chemilumineszenzreaktion

Als erstes wird das Konjugat mit alkalischer Phosphatase (Reagenz) an die Testkugel gebunden, die sich im Teströhrchen befindet. Die Menge an gebundener alkalischer Phosphatase ist je nach Assaytyp der Analytkonzentration in der Patientenprobe proportional (Sandwichassay).

Nach dem Waschen des Teströhrchens wird ein luminogenes Substrat zugegeben, 10 min inkubiert und läuft bei diesem Verfahren automatisch in den Photomultiplier, der die Photonen (das Licht) misst, die durch die Luminiszenzreaktion erzeugt werden. Bei dieser Reaktion wird das Substrat (ein Adamantylidioxetanphosphat) von der alkalischen Phosphatase, die aufgrund der Immunreaktion an die Kugel gebunden ist, dephosphoryliert, und als Zwischenprodukt entsteht ein instabiles Anion, das bei seiner Zersetzung ein Photon emittiert. Daher ist die entstehende Lichtmenge der Menge alkalischer Phosphatase direkt proportional.

Tabelle 6: Materialliste Chemiluminiszenz-Immunoassay

Material	Hersteller	Ort
Immulite-Analyzer	DPC	Bad Nauheim, D
Interleukin-6-Testpackung	DPC	Bad Nauheim, D
Interleukin-6-Verdünnungspuffer	DPC	Bad Nauheim, D
Immulite Zytokin-Kontrolle (IL-6)	DPC	Bad Nauheim, D
TNF- $\alpha$ -Testpackung	DPC	Bad Nauheim, D
TNF- $\alpha$ -Verdünnungspuffer	DPC	Bad Nauheim, D
Immulite Zytokin-Kontrolle (TNF- $\alpha$ )	DPC	Bad Nauheim, D
LBP-Testpackung	DPC	Bad Nauheim, D
LBP-Verdünnungspuffer	DPC	Bad Nauheim, D
LBP-Kontrollmodul	DPC	Bad Nauheim, D
Chemiluminiszenz-Substratmodul	DPC	Bad Nauheim, D
Waschmodul	DPC	Bad Nauheim, D
Probenschalen	DPC	Bad Nauheim, D

### 2.9.2 Procalcitoninbestimmung – Coated Tube System

Zur Bestimmung von Procalcitonin, einem proinflammatorischen Protein, wurde der LUMItest®-PCT-Kit von Brahms Diagnostica eingesetzt. Es handelt sich um einen immunoluminometrischen Assay, der mit Humanserum und Plasma angewandt werden kann. Dabei werden zwei antigenspezifische monoklonale Antikörper, die das Procalcitonin (Antigen) an zwei verschiedenen Stellen – dem Calcitonin- und dem Katalcalcin-Anteil – binden, im Überschuß eingesetzt. Der Anti-Calcitonin-Antikörper ist luminiszenzmarkiert (Tracer) durch ein Akridin-Derivat, Anti-Katalcalcin ist auf der Innenseite der Röhrchen fixiert (Coated tube System).

Im Verlauf der Inkubation (2h) reagieren beide Antikörper mit den Procalcitonin-Molekülen der Probe zu sogenannten "Sandwich-Komplexen", wodurch der luminiszenzmarkierte Antikörper an die Röhrchenoberfläche gebunden wird. Nach dem Reaktionsende wird der verbleibende Tracerüberschuß durch sorgfältiges Waschen vollständig aus den Röhrchen entfernt und verworfen.

Der nach dem Waschen an der Röhrchenwand verbliebene Traceranteil wird durch die Messung des Luminiszenzsignals im Berthold Luminometer unter



Verwendung der LUMItest<sup>®</sup>-Basiskit-Reagenzien ermittelt. Dabei wird das an den Calcitonin-Antikörper gebundene Akridin, durch Zugabe von Natriumperoxid und Hydrogenperoxid, unter Lichtemission in Akridon umgewandelt. Die Größe des Lumineszenzsignals (RLU) ist der PCT-Konzentration der jeweiligen Probe direkt proportional.

**Tabelle 7:** Materialliste Procalcitoninbestimmung

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ort</b>
Luminometer LB 9507	Berthold	Berlin, D
LUMItest <sup>®</sup> PCT	Brahms Diagnostica	Berlin, D
Pipettenspitze gelb	Greiner	Frickenhausen, D
Pipettenspitze blau	Greiner	Frickenhausen, D
Eppendorf-Varipette 10-100 µl	Eppendorf	Hamburg, D
Eppendorf-Varipette 101-1000 µl	Eppendorf	Hamburg, D
Vortexer-MS 1 Minishaker	Migge GmbH	Leonberg, D

## 2.10 Statistische Auswertung

Unter Verwendung des Datenverarbeitungsprogramms "Excel" (*Microsoft Corporation Redmond, USA*) wurde je Patientengruppe eine Datenbank erstellt, in die alle erhobenen Daten eingetragen wurden. Die statistische Analyse erfolgte mittels der Software "JMP 4.0" (*SAS Institute, Cary, USA*).

Datendeskription: Innerhalb der verschiedenen Versuchsgruppen wurden folgende statistische Kenngrößen ermittelt: Fallzahl (n), Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Standardfehler des Mittelwerts (SEM), sowie kleinster (Min) und größter (Max) Wert. Wenn nicht anders beschrieben, wurden die Daten als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (MW  $\pm$  SEM) angegeben.

NO-Patientengruppe: Zum Vergleich der Expression verschiedener Leukozytenadhäsionsmoleküle und der pro- sowie antiinflammatorischen Zytokine, bei Druckluft- bzw. NO-Inkubation und den Auswirkungen der Endotoxinstimulation, wurden "2-way-ANOVA-Tests" und gepaarte t-Tests durchgeführt. Um der Bedingung einer normalverteilten Stichprobe mit gleichen

Varianzen möglichst gerecht zu werden, wurden anstatt der arithmetischen Werte der natürliche Logarithmus der Absolutwerte ausgewertet. Signifikante Unterschiede sind in den Abbildungen mit einem Stern (\*) versehen.

HLM-Patientengruppe: Zum Vergleich der erhobenen Parameter im perioperativen Verlauf wurden die beobachteten Werte logarithmiert und die Differenz zwischen den einzelnen Werten gebildet. Diese Differenzen wurden mit paarweisen t-Tests für abhängige Stichproben und Einwegvarianzanalysen für wiederholte Messungen ausgewertet.

Diagramme, die den perioperativen Verlauf unstimulierter und stimulierter Proben darstellen, wurden bezüglich ihres Kurvenverlaufs zur Y-Achse nach Hotelling-Spur analysiert. Ebenso wurden das lineare, quadratische und kubische Verhalten der Kurvenverläufe betrachtet und bei Signifikanz vermerkt.

Für die Vergleiche zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen bezüglich des Einflusses von Art des Vitiums, HLM-Dauer, tiefster Körpertemperatur während der HLM-OP, Körpergröße und höchster postoperativer Lactatwert auf die gemessenen Parameter wurden t-Tests zur Ermittlung signifikanter Unterschiede durchgeführt.

Es wurden folgende Signifikanzniveaus definiert:

**Tabelle 8:** Signifikanzniveau

<b>nicht signifikant</b>	<b>Signifikant</b>	<b>hochsignifikant</b>
$p > 0,05$	$0,01 \leq p \leq 0,05$	$p < 0,01$

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 In vitro Untersuchung des Einflusses einer NO-Inkubation auf die Endotoxintoleranz

##### 3.1.1 Patientendaten

Für die Inkubation von Vollblut mit 0 ppm (Druckluft) bzw. 100 ppm NO wurden die Proben der Patientengruppe 1 (Kinder mit angeborenem Herzfehler, welche stationär zur Herzkatheteruntersuchung waren) verwendet. Das durchschnittliche Alter der Patienten lag bei  $7,38 \pm 1,38$  Jahren.

**Tabelle 9:** Versuchsdaten NO-Inkubation

<b>Versuchsdaten</b>	
Anzahl n:	20 Patienten
Konzentrationen:	0 ppm und 100 ppm NO
Dauer der Begasung	45 Minuten

Im Anschluß wurde die Stimulation der inkubierten Proben mit Lipopolysaccharid (LPS) in der Konzentration 1 µg/ml durchgeführt.

**Tabelle 10:** Versuchsdaten LPS-Stimulation

<b>Versuchsdaten</b>	
Anzahl n:	20 Patienten
LPS-Konzentrationen:	0 µg/ml und 1 µg/ml
Dauer der Stimulation	3 Stunden
Temperatur:	37°C
CO <sub>2</sub> -Gehalt:	5%

##### **Leukozytenwerte**

Vor Versuchsbeginn wurde die Leukozytenzahl und die prozentuale Verteilung der Leukozytensubpopulationen mittels eines Differentialblutbildes bestimmt. Bei vier Patienten war die Leukozytenzahl geringfügig erhöht (max. 12,42

Tsd./ $\mu\text{l}$ ), die Verteilung jedoch nicht verändert und der routinemäßig bestimmte CRP-Wert lag unter 0,5 mg/dl.

**Tabelle 11:** Leukozytenwerte der Patientengruppe 1

	<b>Mittelwert</b>	<b>SEM</b>	<b>Normwerte*</b>
Leukozyten	$6,95 \times 10^3/\mu\text{l}$	0,30	$4,0 - 9,4 \times 10^3/\mu\text{l}$
Lymphozyten	31,92%	1,68	22,4 – 47,9%
Neutrophile	55,78%	1,75	41,2 – 70,1%
Monozyten:	5,93%	0,34	0,7 – 9,3%

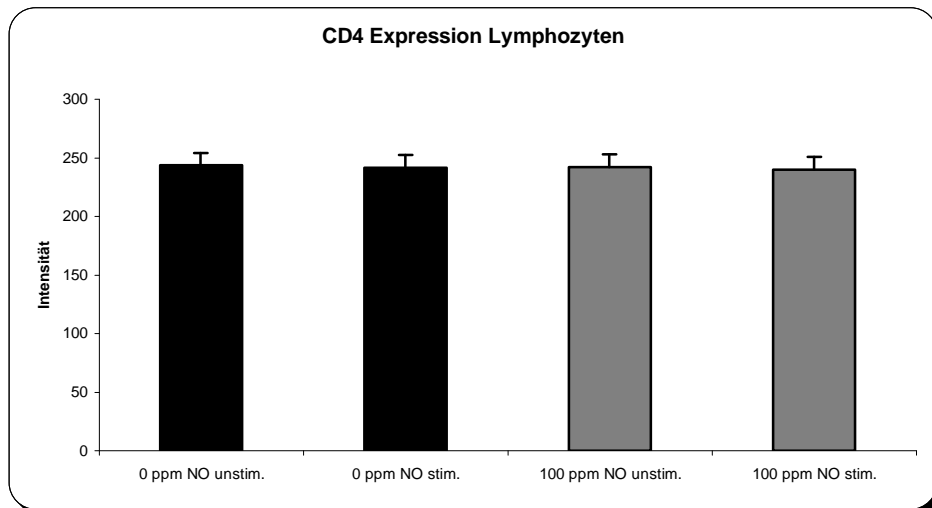
### 3.1.2 Expression der Adhäsionsmoleküle

Im folgenden sollen der Einfluß von NO auf die Expression mehrerer Leukozytenoberflächenantigene, die für die Adhäsion an das Gefäßendothel und die Immunabwehr verantwortlich sind, sowie die Endotoxintoleranz, dargestellt werden.

#### Oberflächenantigen CD4

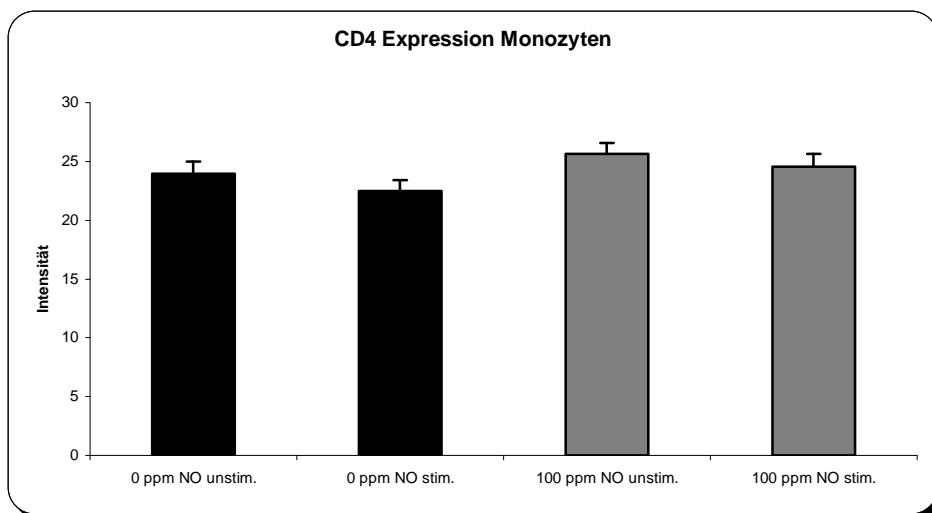
Das CD4-Molekül, welches auf Lymphozyten und Monozyten vorhanden ist, spielt zusammen mit den MHC-Molekülen der Klasse II eine wichtige Rolle bei der Erkennung fremder Antigene.

Im Hinblick auf die Fluoreszenzintensität ergaben sich bei Lymphozyten und Monozyten keine signifikanten Abweichungen, weder unter Gasinkubation noch unter LPS-Stimulation.



**Abbildung 15: CD4 Intensität Lymphozyten**

Darstellung der Mittelwerte unter Druckluft- bzw. NO-Inkubation mit bzw. ohne Endotoxinstimulation. (keine signifikanten Unterschiede zwischen den Werten)

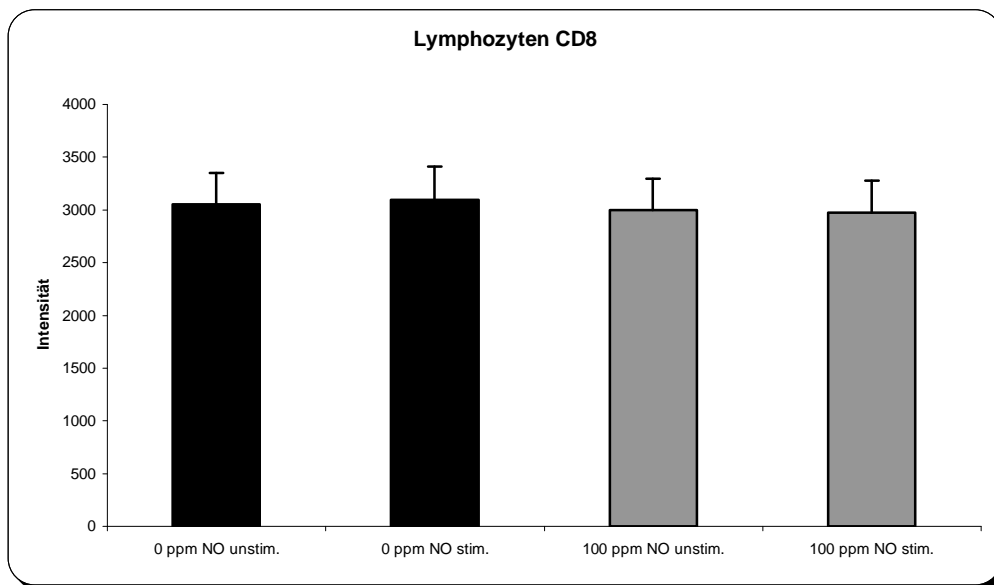


**Abbildung 16: CD4 Intensität Monozyten**

Darstellung der Mittelwerte unter Druckluft- bzw. NO-Inkubation mit bzw. ohne Endotoxinstimulation. (keine signifikanten Unterschiede zwischen den Werten;)

### Oberflächenantigen CD8

Das Antigen CD8, welches auf Lymphozyten als Co-Rezeptor für die MHC-Moleküle der Klasse II in der Antigenerkennung dient, zeigte keine Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsarmen.



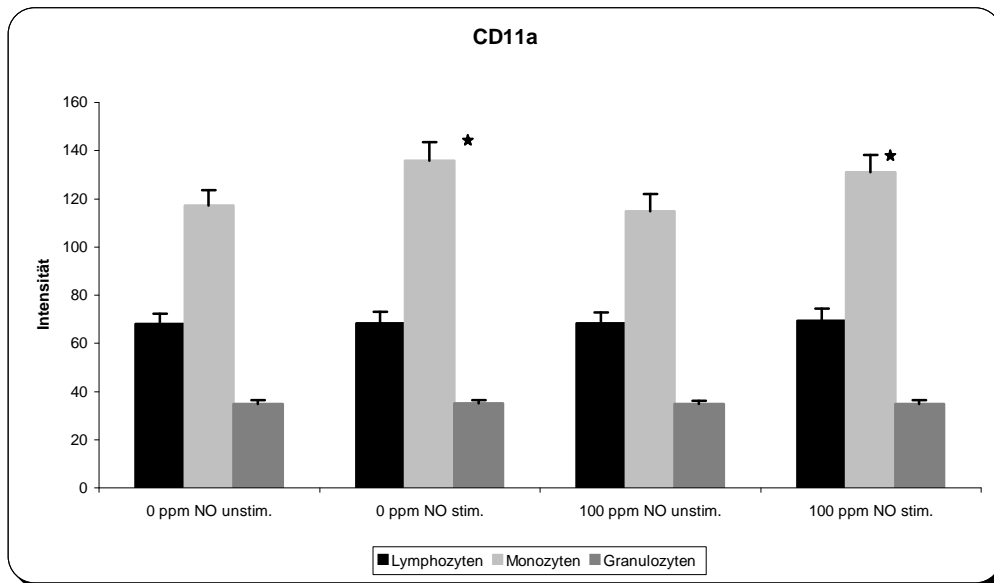
**Abbildung 17: CD8 Intensität Lymphozyten**

Darstellung der Mittelwerte unter Druckluft- bzw. NO-Inkubation mit bzw. ohne Endotoxinstimulation. (keine signifikanten Unterschiede zwischen den Werten)

### Oberflächenantigen CD11a

Der Rezeptor CD11a, welcher die  $\alpha$ -Kette des für die Leukozyten-Endothel-Adhäsion zuständigen Integrins CD11a/CD18 bildet, veränderte seine Expression auf Lymphozyten und Granulozyten unter den Versuchsbedingungen nicht.

Auf Monozyten hingegen resultierte durch die Endotoxinstimulation eine signifikante Intensitätserhöhung der Fluoreszenz. Zwischen den druckluftinkubierten und NO-inkubierten Proben bestand kein statistisch bedeutender Unterschied in der Durchflußzytometrie.



**Abbildung 18: CD11a Intensität**

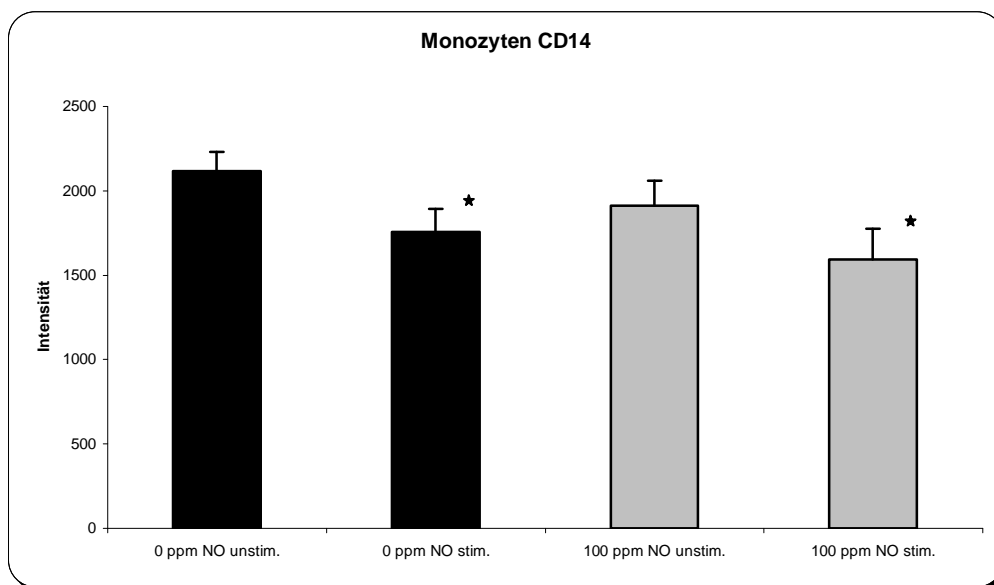
Darstellung der Mittelwerte unter Druckluft- bzw. NO-Inkubation mit bzw. ohne Endotoxinstimulation. (\* =  $p < 0,05$  gegenüber dem Wert ohne Endotoxinstimulation, keine Signifikanzen zwischen den Gasen)

### Oberflächenantigen CD14

Das CD14-Molekül wird auf reifen Monozyten und Makrophagen, sowie schwach, auf peripheren Granulozyten exprimiert. Es fungiert als Rezeptor für Lipopolysaccharide.

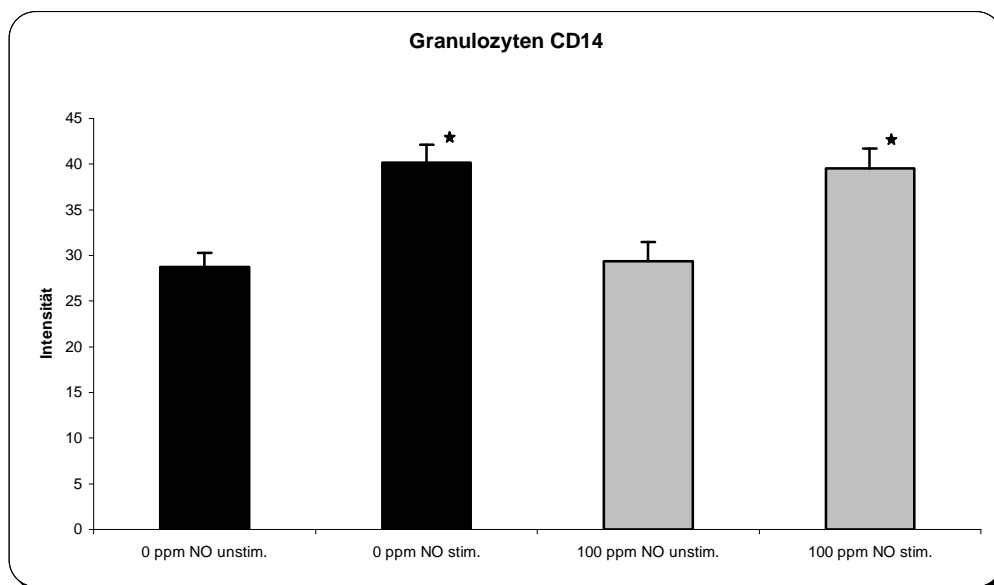
Durch Endotoxinstimulation ließ sich eine signifikante Reduktion der Fluoreszenzintensität für CD 14 auf Monozyten hervorrufen. Die Gasbehandlung ergab keine wesentlichen Differenzen.

Auf der Oberfläche der Granulozyten kam es durch LPS-Stimulation zu einer hochsignifikanten Zunahme der Expression des CD14-Antigens. Das Einwirken von NO auf die Proben beeinflusste das Ergebnis auch hier nicht grundsätzlich.



**Abbildung 19: CD14 Intensität Monozyten**

Darstellung der Mittelwerte unter Druckluft- bzw. NO-Inkubation mit bzw. ohne Endotoxinstimulation. (\* =  $p < 0,05$  gegenüber dem Wert ohne Endotoxinstimulation, keine Signifikanzen zwischen den Gasen;)



**Abbildung 20: CD14 Intensität Granulozyten**

Darstellung der Mittelwerte unter Druckluft- bzw. NO-Inkubation mit bzw. ohne Endotoxinstimulation. (\* =  $p < 0,0001$  gegenüber dem Wert ohne Endotoxinstimulation, keine Signifikanzen zwischen den Gasen;)

### Oberflächenantigen CD18

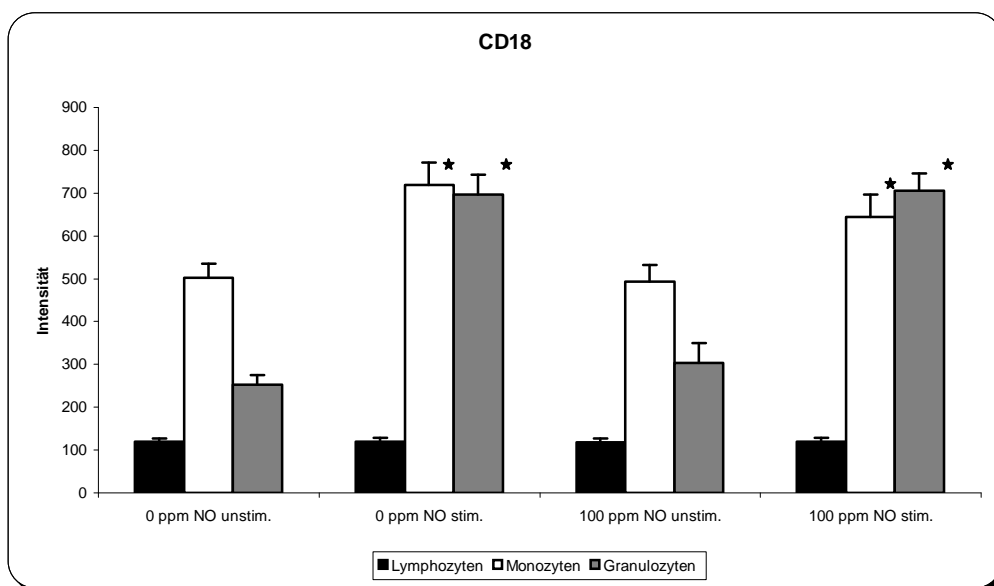
CD18 stellt die  $\beta$ -Kette des Leukozytenfunktionsantigens-1 (LFA-1) auf der Leukozytenoberfläche dar. LFA-1 gehört zu der Familie der



Leukozytenadhäsionsrezeptoren (Integrine) und bindet an interzelluläre Adhäsionsmoleküle (ICAM) auf Zielgeweben. Das CD-18-Antigen ist auf allen normalen peripheren Leukozyten exprimiert und ist essentiell für viele Immunantworten, die einen Zell-zu-Zell-Kontakt erfordern, wie z.B. Lymphozytenadhäsion, NK- und T-Lymphozyten-Zytolyse und T-Lymphozyten-Proliferation.

Eine hochsignifikante Abweichung gegenüber den unstimulierten Proben stellte sich bei den Monozyten und Granulozyten bezüglich der CD18-Fluoreszenzintensität ein. Unterschiede zwischen der NO- und Druckluftbehandlung waren statistisch nicht bedeutsam.

Eine Aktivierung der Lymphozyten durch LPS-Stimulation konnte nicht beobachtet werden, ebensowenig eine Veränderung der CD18 Expression durch NO-Inkubation.



**Abbildung 21: CD18 Intensität**

Darstellung der Mittelwerte unter Druckluft- bzw. NO-Inkubation mit bzw. ohne Endotoxinstimulation. (\* =  $p < 0,0001$  gegenüber dem Wert ohne Endotoxinstimulation, keine Signifikanzen zwischen den Gasen;)

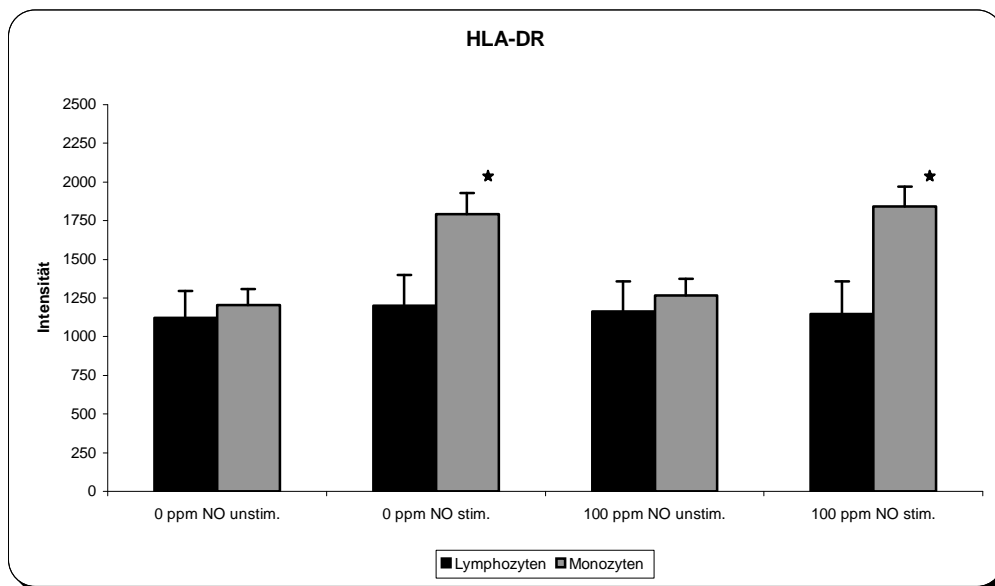
## Oberflächenantigen HLA-DR

Das Oberflächenantigen HLA-DR gehört zur Familie der MHC-Moleküle der Klasse II. Es handelt sich dabei um ein Transmembran-Glykoprotein, welches

aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Einheiten besteht und auf B-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen, aktivierten T-Lymphozyten, aktivierten NK-Lymphozyten und Progenitor-Zellen exprimiert wird.

Der relativ monozyten-spezifische Stimulus Lipopolysaccharid führte zu einer Erhöhung der HLA-DR-Expression auf Monozyten (hochsignifikant gegenüber der Negativprobe). Ein Unterschied zwischen der NO- bzw. Druckluft-Begasung stellte sich auch hier nicht ein.

Das Expressionsniveau der Lymphozytenpopulation veränderte sich weder unter Endotoxineinfluß noch unter NO-Einwirkung gegenüber den Negativkontrollen.



**Abbildung 22: HLA-DR Intensität**

Darstellung der Mittelwerte unter Druckluft- bzw. NO-Inkubation mit bzw. ohne Endotoxinstimulation. (\* =  $p < 0,0001$  gegenüber dem Wert ohne Endotoxinstimulation, keine Signifikanzen zwischen den Gasen;)

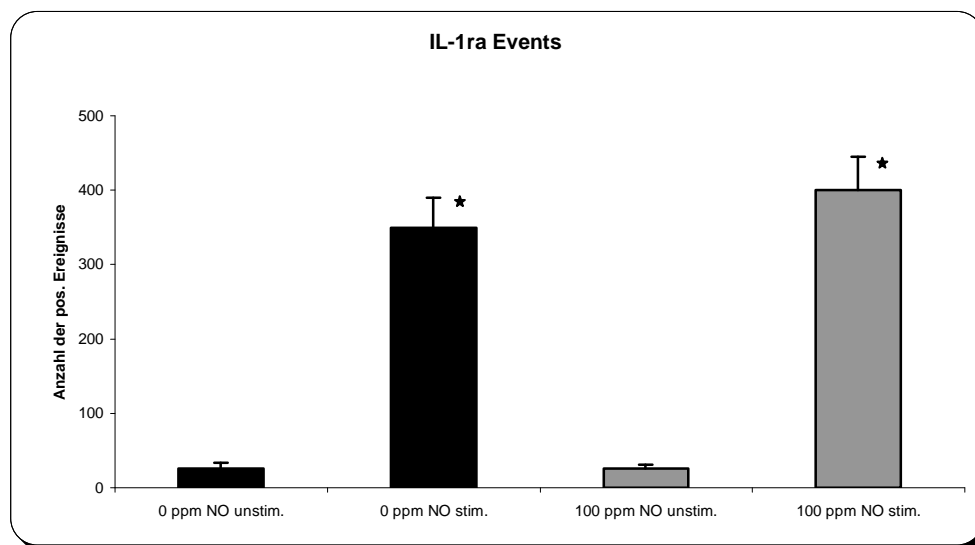
### 3.1.3 Expression der Zytokine

#### Interleukin-1 Rezeptor Antagonist (IL-1ra)

Die durchflußzytometrisch bestimmte Anzahl IL-1ra positiver Ereignisse bezieht sich auf 1000 Monozyten, welche durch ein Aquisitionsgate mit der CELLquest®-Software eingegrenzt wurden.

Interleukin-1 Rezeptor Antagonist ist ein Glykoprotein, welches die spezifische Bindung von Interleukin-1 an seinen Rezeptor verhindert. Seine Funktion besteht in erster Linie in einer Abschwächung der Entzündungsreaktion. Es wird in erster Linie in Monozyten synthetisiert.

Die Stimulation der Patientenproben resultierte in einer hochsignifikanten Zunahme der IL-1ra positiven Monozyten. NO-Inkubation zeigte keine Beeinträchtigung der Stimulierbarkeit der Zellen.



**Abbildung 23: Anzahl positiver Ereignisse für IL-1ra (in Monozyten)**

Darstellung der Mittelwerte unter Druckluft- bzw. NO-Inkubation mit bzw. ohne Endotoxinstimulation. (\* =  $p < 0,0001$  gegenüber dem Wert ohne Endotoxinstimulation, keine Signifikanzen zwischen den Gasen;)

## Interleukin-6 (IL-6)

Interleukin-6 ist ein wesentlicher Bestandteil des Zytokin-Netzwerks und physiologischer Hauptmediator der Akut-Phase-Reaktion. Seine Sekretion wird durch inflammatorische Prozesse aktiviert. IL-6 gilt als moderierendes Zytokin der zweiten Welle - nach  $TNF-\alpha$  und  $IL-1\beta$  - der inflammatorischen Kaskade der Sepsisreaktion. Die Wirkung findet sich in einer Stimulation von B-Zellen (Proliferation), NK-Zellen, Fibroblasten u.a. wieder, was zur Ausschüttung diverser Proteine der Akut-Phase-Reaktion führt. Produktionsstätten sind aktivierte Makrophagen/Monozyten, B-Zellen, T-Zellen, Fibroblasten, Endothelzellen u.a.

Die klinische Bedeutung eines IL-6-Monitorings besteht hauptsächlich in der frühzeitigen Erkennung inflammatorischer Krisen.

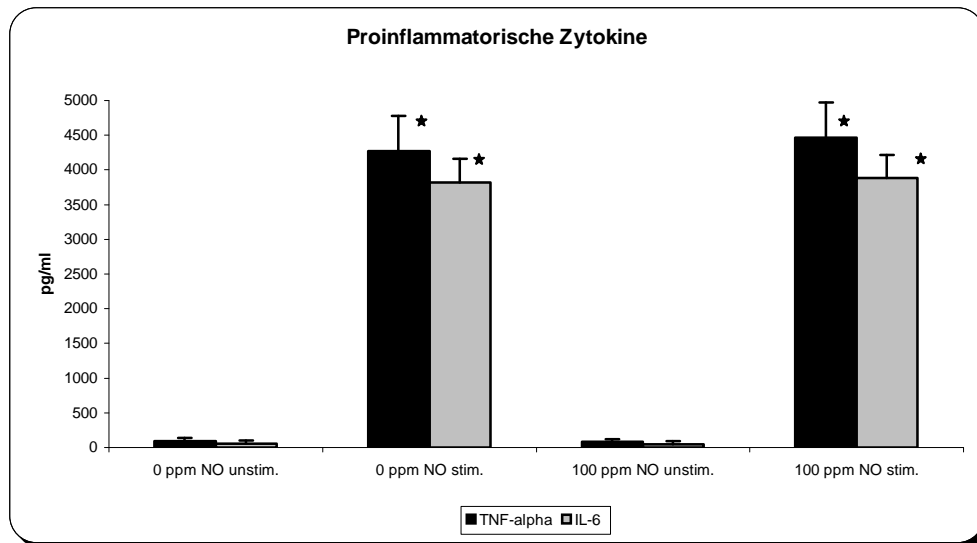
Mit Endotoxin behandelte Patientenproben führten zu einer massiven Zunahme der IL-6-Spiegel (hochsignifikant). Die Stickstoffmonoxid ausgesetzten Proben waren in ihrer Reaktion auf den LPS-Stimulus nicht verändert gegenüber den Druckluft inkubierten Proben.

### **Tumornekrosefaktor $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )**

Als erstes Protein der Kaskade der Akut-Phase-Reaktion auf Infektionen und septische Komplikationen steigt TNF- $\alpha$ , nur wenige Minuten nach Beginn des Infektions- und Sepsisgeschehens, dramatisch an und triggert die Produktion und Ausschüttung von IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8. Es führt also zu einer B- und T-Zell-Aktivierung. Produziert wird es in aktivierten Makrophagen/Monozyten, B-Zellen, T-Zellen, Fibroblasten, Endothelzellen u.a.

Die klinische Bedeutung von TNF- $\alpha$  ist aufgrund der sehr kurzen Halbwertszeit (wenige Minuten) eingeschränkt. Hauptanwendung der diagnostischen Bestimmung des TNF- $\alpha$  ist der Einsatz in der ex-vivo-Stimulation. Damit läßt sich die Fähigkeit der immunkompetenten Zellen, TNF- $\alpha$  zur Immunabwehr zu produzieren, testen und quantitativ erfassen.

Im Versuch resultierte auf den LPS-Stimulus hin eine hochsignifikante TNF- $\alpha$ -Ausschüttung, die durch NO-Begasung nicht beeinflußt wurde.



**Abbildung 24: TNF-alpha und IL-6**

Darstellung der Mittelwerte unter Druckluft- bzw. NO-Inkubation mit bzw. ohne Endotoxinstimulation (\* =  $p < 0,0001$  gegenüber dem entsprechenden Wert ohne Endotoxinstimulation, kein signifikanter Unterschied zwischen der Druckluft- und der NO-Gruppe;)

### 3.2 In vitro Untersuchung des Einflusses einer HLM-OP auf die Immunkompetenz

#### 3.2.1 Patientendaten

In diesen Teil der Studie wurden die Patienten aus der Gruppe 2 eingeschlossen. Das mittlere Alter der Patienten betrug  $6,74 \pm 1,29$  Jahre. Bei drei Patienten mußte auf die Blutentnahme am fünften Versuchstag verzichtet werden, da entweder der zentrale Venenverweilkatheter bereits gezogen oder der periphere Katheter nicht mehr rückläufig war und eine erneute Venenpunktion aus Studienzwecken nicht zulässig war. Die Patientendaten sind also für die Versuchstage eins bis vier komplett ( $n=20$ ), für den fünften Beobachtungstag bestehen sie aus 17 Patienten ( $n=17$ ).

Unter den Diagnosen der operierten Kinder fanden sich ein Vorhofseptumdefekt ( $n = 5$ ), eine Fallot'sche Tetralogie ( $n = 4$ , davon zwei bereits voroperiert), ein Ventrikelseptumdefekt ( $n = 2$ ), eine Subaortenstenose ( $n = 2$ ), eine Aortenstenose ( $n = 1$ ), eine Trikuspidalatresie ( $n = 1$ ) und sonstige ( $n = 5$ , v.a. Klappenvitien).

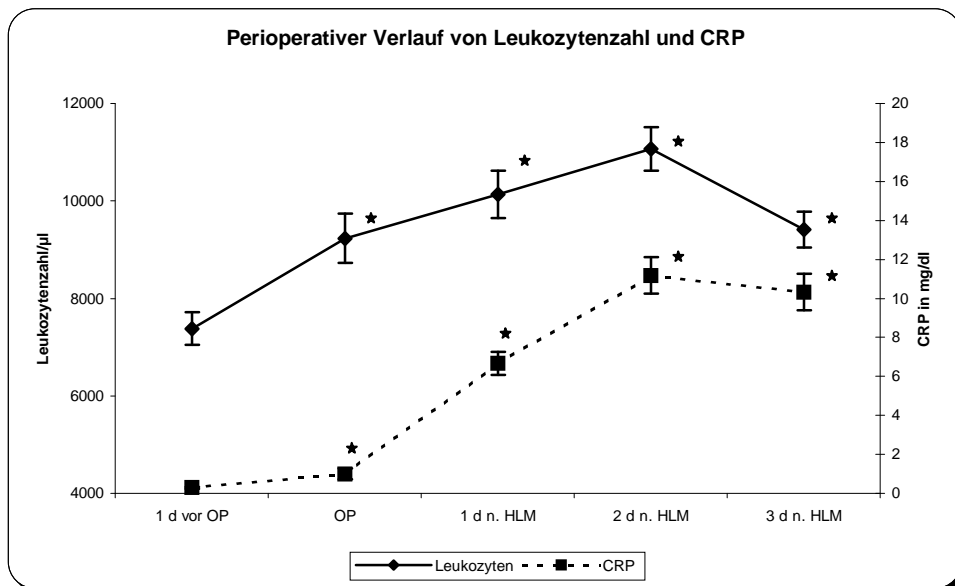
Postoperativ erhielten alle Kinder eine Antibiotikaphylaxe mit Cefazolin und drei Kinder, wegen Verdachts einer Infektion, ein zusätzliches Antibiotikum (Gentamicin).

**Tabelle 12:** Patientendaten (Operation, unter Einsatz der extrakorporalen Zirkulation)

Patientendaten	
Anzahl n:	20
Alter:	6,74 ± 1,29 Jahre
HLM-Dauer:	85,9 ± 48,5 min
Temperatur:	26,8 ± 6,9 °C

### Leukozytenwerte

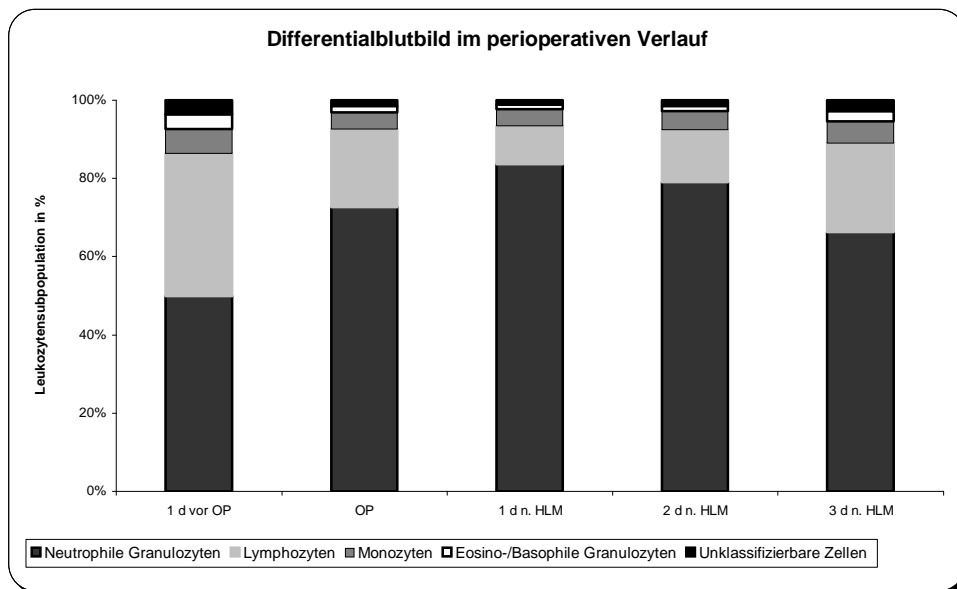
Nach einem herzchirurgischen Eingriff unter Einsatz der extrakorporalen Zirkulation kam es zu einem signifikanten Anstieg der Leukozytenzahl und des C-reaktiven Proteins (CRP), mit einem Maximum am zweiten postoperativen Tag. Eine rückläufige Tendenz beider Werte stellte sich am dritten postoperativen Tag ein.



**Abbildung 25: C-reaktives Protein und Leukozytenzahl**

Verlauf von C-reaktiven Protein und Leukozytenzahl unter Verwendung der Herz-Lungen-Maschine (HLM). (\* = p < 0,05 gegenüber dem Wert vor HLM).

Die Verteilung der verschiedenen Leukozytenarten im perioperativen Verlauf läßt eine erhebliche Aktivierung der neutrophilen Granulozyten bereits unmittelbar am Ende der HLM-Operation erkennen. Der Anteil der Neutrophilen erreichte mit  $83,7 \pm 1,7 \%$  am ersten postoperativen Tag sein Maximum, zeitgleich mit einem Minimum der Lymphozyten ( $9,6 \pm 1,2 \%$ ), eosino- und basophilen Granulozyten. Eine Abnahme der Neutrophilen mit gleichzeitiger Zunahme der Lymphozytenpopulation stellte sich im weiteren Beobachtungszeitraum ein, ohne jedoch am dritten postoperativen Tag die Ausgangsniveaus zu erreichen. Der Monozytenanteil (Ausgangswert:  $6,1 \pm 0,3 \%$ ) war am Operationstag am geringsten ( $4,2 \pm 0,4 \%$ ) und wurde am Ende der Beobachtung nur geringfügig unterboten ( $5,5 \pm 0,4 \%$ ).



**Abbildung 26: Leukozytensubpopulationen**

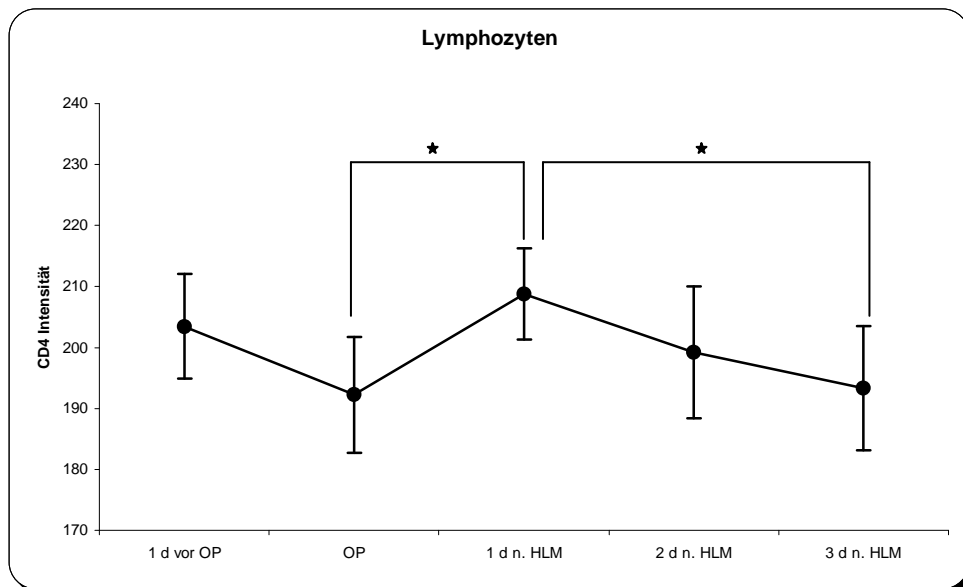
Verteilung der Leukozytensubpopulationen vor und nach einem herzchirurgischen Eingriff unter Verwendung der Herz-Lungen-Maschine.

Innerhalb der Lymphozytensubpopulationen konnten zusätzlich Verschiebungen beobachtet werden. Der Prozentsatz der CD4-positiven T-Helfer-Zellen sank von präoperativ  $43,6 \pm 1,4 \%$  auf minimal  $30,6 \pm 1,7 \%$  am ersten postoperativen Tag und erreichte am dritten postoperativen Tag  $38,8 \pm 1,7 \%$ . Die Veränderungen auf Seiten der zytotoxischen T-Lymphozyten (Ausgangswert:  $27,6 \pm 1,4 \%$ ) bestanden in einer postoperativen Abnahme mit einem Minimum von  $22,5 \pm 1,8 \%$  am dritten postoperativen Tag.

### 3.2.2 Expression der Adhäsionsmoleküle im Beobachtungszeitraum

#### Oberflächenantigen CD4

Das CD4-Antigen auf Lymphozyten veränderte seine Expression im perioperativen Verlauf nur geringfügig, ein statistischer Effekt war zwischen dem OP-Tag und dem ersten postoperativen Tag sowie zwischen ersten und dritten postoperativen Tag erkennbar.

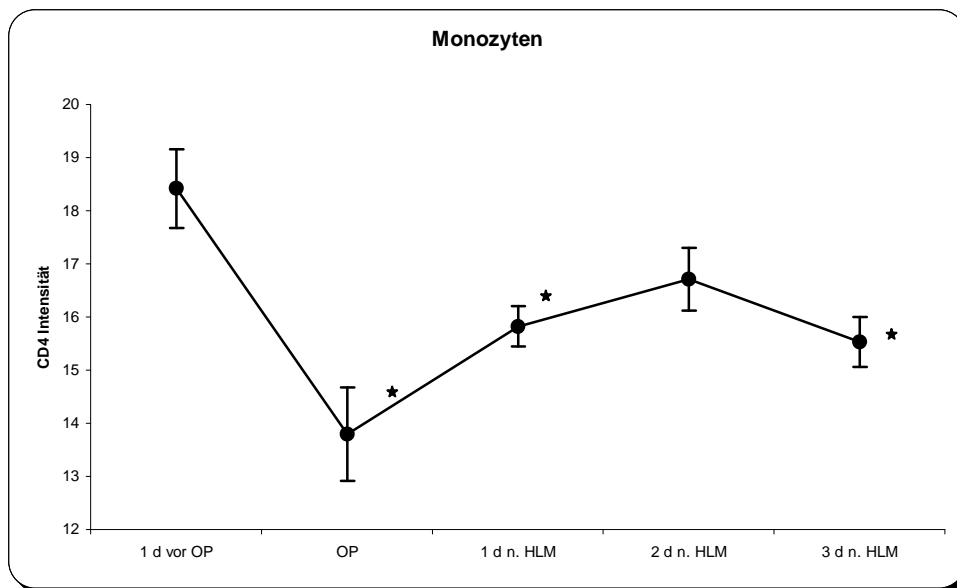


**Abbildung 27: CD4 Intensität Lymphozyten perioperativ**

Veränderung der Expression des Oberflächenantigens CD4 durch eine Operation unter Einsatz der HLM

Hingegen ergab sich bei den Monozyten eine signifikante Reduktion der CD4-Expression durch die HLM-Operation, die am dritten postoperativen Tag noch nachweisbar war.





**Abbildung 28: CD4 Intensität Monozyten perioperativ**

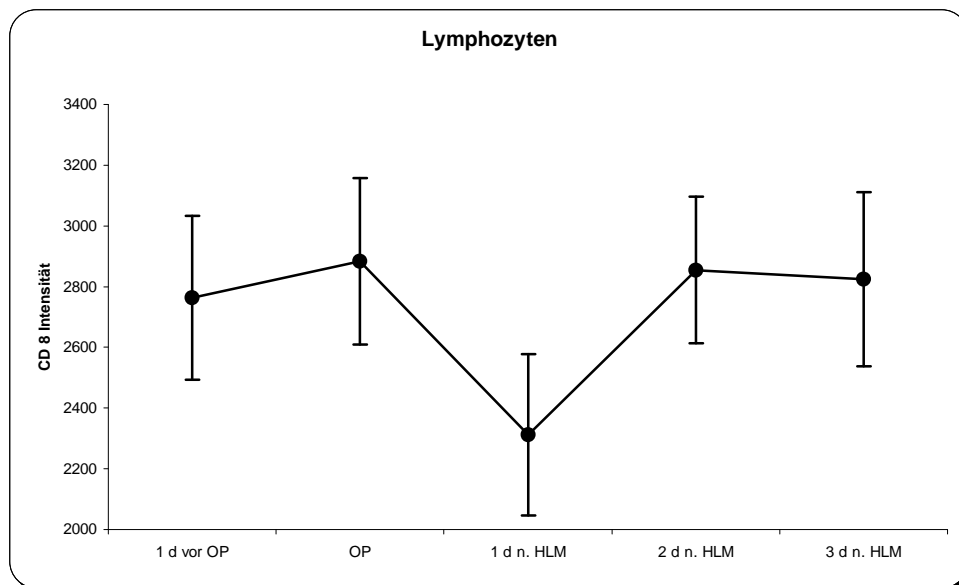
Veränderung der Expression des Oberflächenantigens CD4 durch eine Operation unter Einsatz der HLM (\* =  $p < 0,05$  gegenüber dem Wert vor OP)

### Oberflächenantigen CD8

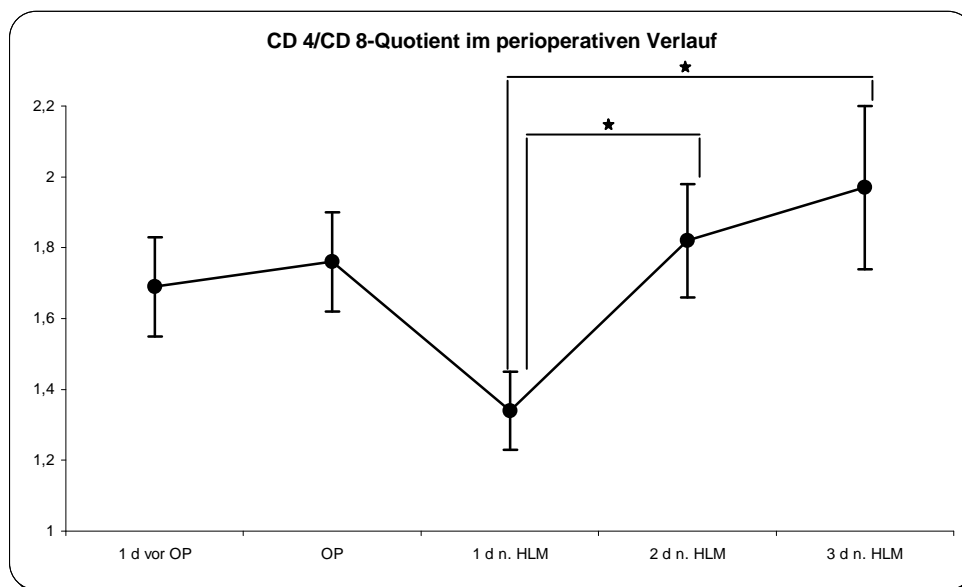
CD8, welches sich v.a. auf Lymphozyten findet, zeigt in seiner Expression keinen statistisch bedeutenden Effekt. Am ersten postoperativen Tag lässt sich eine vorübergehende Signalreduktion in der FACS-Analyse dokumentieren, welche jedoch nicht das Signifikanzniveau erreicht. Bereits am zweiten postoperativen Tag ist das Ausgangsniveau der Signalintensität wieder eingestellt.

### CD4/CD8-Quotient der T-Lymphozyten

Das Verhältnis CD4/CD8-positiver lymphozytärer Zellen verringerte sich von präoperativ  $1,68 \pm 0,14$  auf minimal  $1,34 \pm 0,11$  am ersten postoperativen Tag. Der Wert am dritten postoperativen Tag lag bei  $1,97 \pm 0,23$  und somit höher als präoperativ. Abbildung 30 stellt die Werte dar, die sich signifikant voneinander unterscheiden.



**Abbildung 29: CD8 Intensität Lymphozyten perioperativ**  
Veränderung der Expression des Oberflächenantigens CD8 durch eine Operation unter Einsatz der HLM.



**Abbildung 30: CD4/CD8-Quotient der T-Lymphozyten perioperativ**  
Veränderung der CD4/CD8-Ratio durch einen herzchirurgischen Eingriff unter Einsatz der HLM (\* =  $p < 0,05$ )

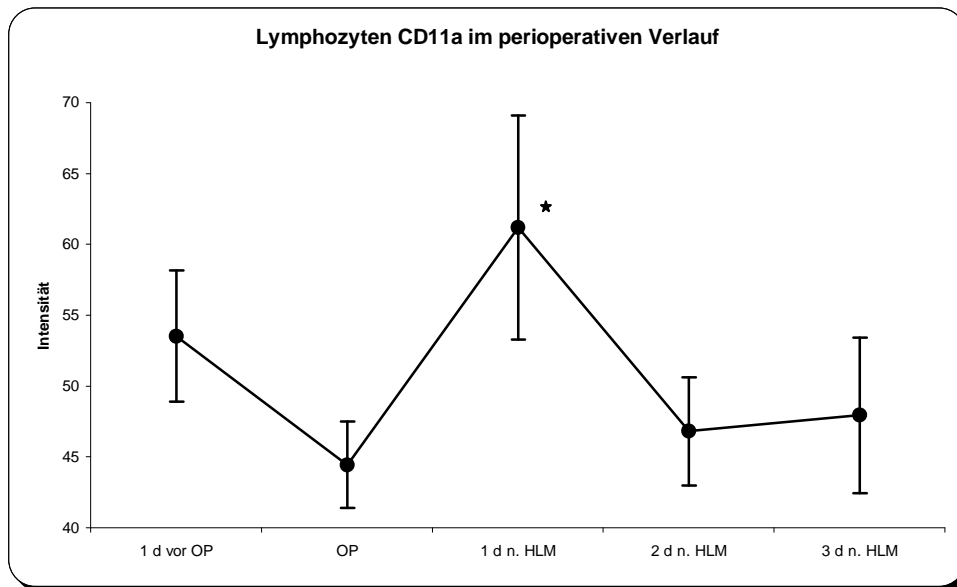
### Oberflächenantigen CD11a

Nach HLM-Operation kommt es vorübergehend zu einem signifikanten Anstieg (erster postoperativer Tag) der Expression des Antigenes CD11a auf

Lymphozyten. Am Ende der Beobachtung war das Niveau der Signalintensität im Durchflußzytometer, gegenüber dem Wert vor der Operation, geringfügig reduziert.

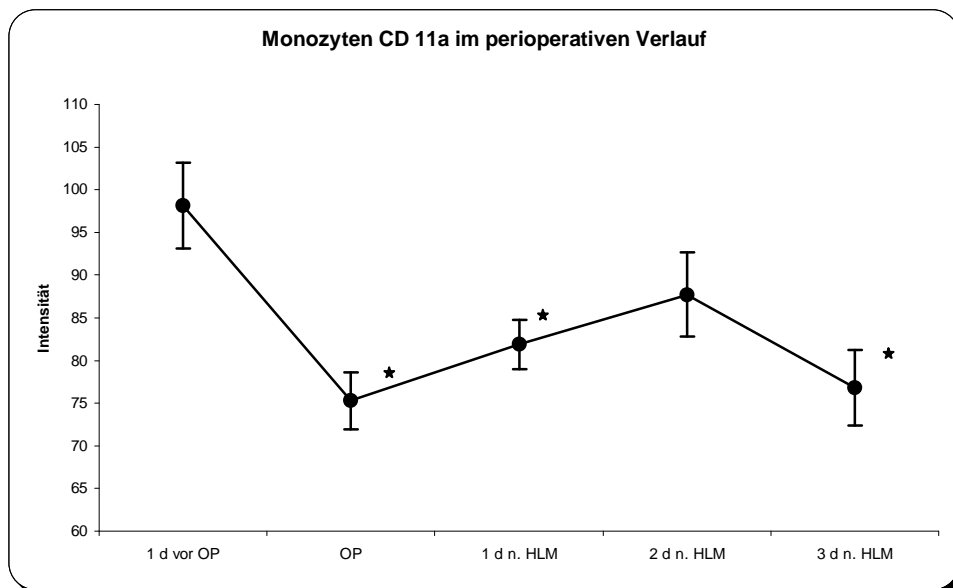
Die Monozyten exprimierten nach extrakorporaler Zirkulation signifikant weniger CD11a-Antigen auf ihrer Oberfläche mit einem Minimum am Operationstag. Eine wesentliche Erholung der Antigenexpression stellte sich bis zum dritten postoperativen Tag nicht ein.

Bei den Granulozyten fand sich ein signifikanter Abfall der CD11a-Expression am ersten Tag nach HLM-Operation mit einer nachfolgender Zunahme über das Ausgangsniveau.



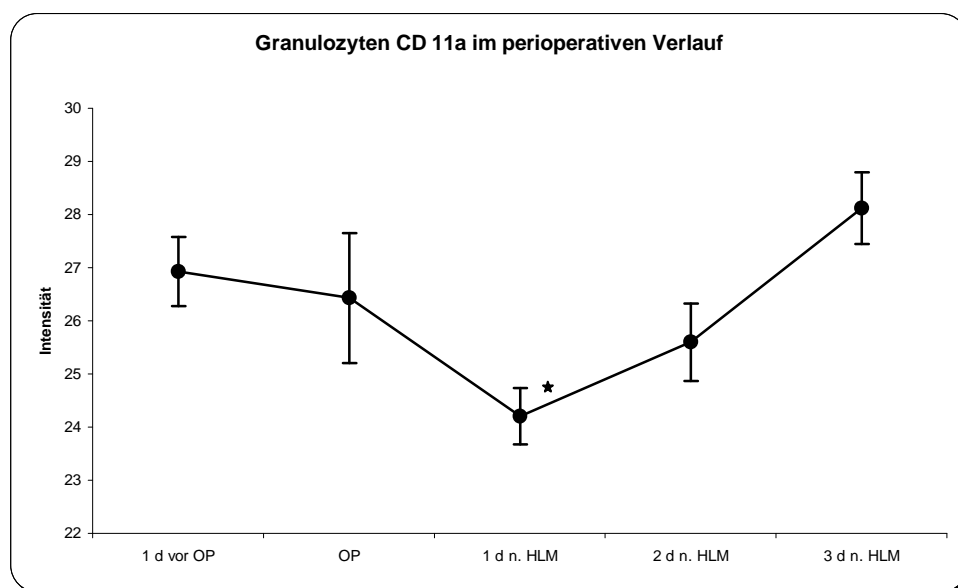
**Abbildung 31: CD11a Intensität Lymphozyten perioperativ**

Veränderung der Expression des Oberflächenantigens CD11a durch eine Operation unter Einsatz der HLM (\* =  $p < 0,05$  gegenüber OP-Wert)



**Abbildung 32: CD11a Intensität Monozyten perioperativ**

Veränderung der Expression des Oberflächenantigens CD11a durch eine Operation unter Einsatz der HLM (\* =  $p < 0,05$  gegenüber dem Wert vor HLM)



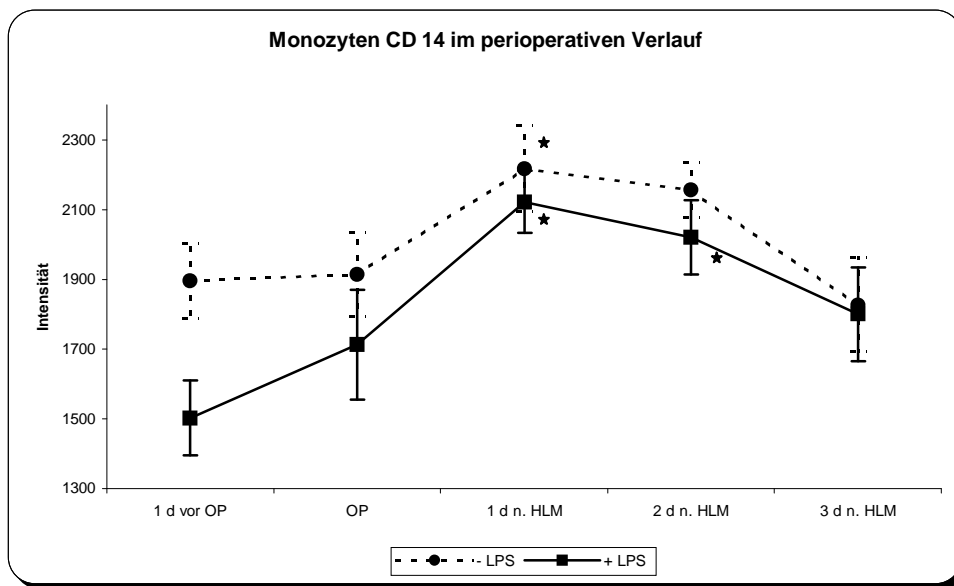
**Abbildung 33: CD11a Intensität Granulozyten perioperativ**

Veränderung der Expression des Oberflächenantigens CD11a durch eine Operation unter Einsatz der HLM (\* =  $p < 0,05$  gegenüber Wert vor HLM)

## Oberflächenantigen CD14

Im perioperativen Verlauf erhöht sich die Expression des Antigens CD14 auf Monozyten. Am ersten postoperativen Tag wird die höchste Signalintensität erreicht (signifikant gegenüber dem präoperativen Wert). Anschließend fällt die

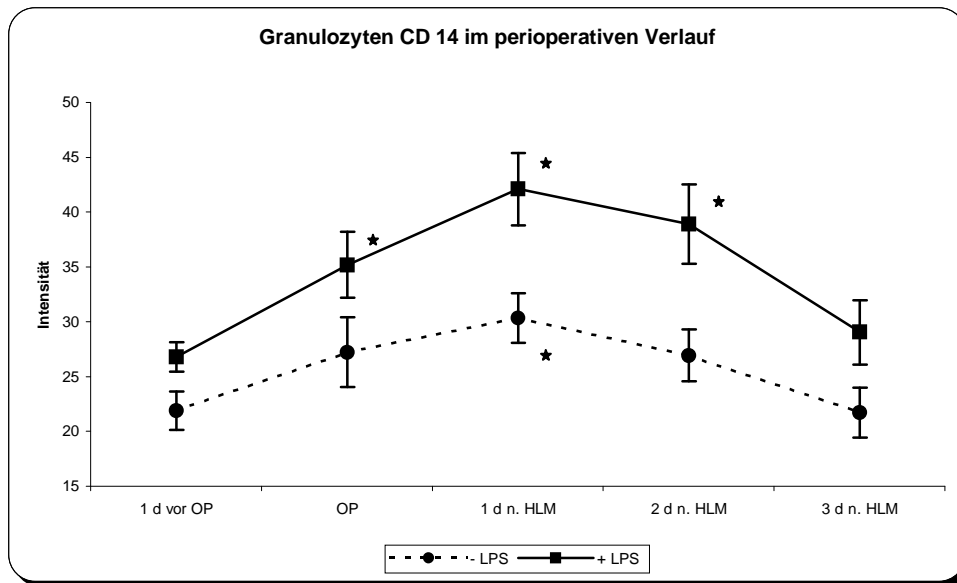
Expression auf Ausgangsniveau ab. Endotoxin-stimulierte Proben zeigen präoperativ eine deutlich reduzierte Fluoreszenzintensität gegenüber den unstimulierten Patientenproben. Der Stimulationseffekt lässt über die Zeit nach und am dritten postoperativen Tag ist kein wesentlicher Unterschied zwischen endotoxinstimulierten und unbehandelten Proben erkennbar. Im Vergleich der Kurvenverläufe stellt sich eine Signifikanz nach Hotelling-Spur ein.



**Abbildung 34: CD14 Intensität Monozyten perioperativ**

Veränderung der Expression des Oberflächenantigens CD14 durch eine Operation unter Einsatz der HLM (\* =  $p < 0,05$  gegenüber dem Wert vor HLM, oberer Stern für - LPS, untere Sterne + LPS). Hotelling-Spur: Signifikanz der LPS-Stimulation  $p < 0,05$ .

Die Expression von CD14 auf der Oberfläche von Granulozyten nahm unmittelbar postoperativ zu, erreichte ihr Maximum am ersten postoperativen Tag (Wert signifikant verschieden gegenüber präoperativen Wert) und fiel bis zum Ende des Beobachtungszeitraums wieder auf den Ausgangswert ab. LPS-Stimulation verursachte eine signifikante Zunahme der Fluoreszenz-intensität für das CD14-Antigen, wobei das Ansprechen der Zellen auf den Stimulus am ersten und zweiten postoperativen Tag am stärksten ausgeprägt war.



**Abbildung 35: CD14 Intensität Granulozyten perioperativ**

Veränderung der Expression des Oberflächenantigens CD14 durch eine Operation unter Einsatz der HLM (\* =  $p < 0,05$  gegenüber dem Wert vor HLM, oberer Stern für - LPS, untere Sterne + LPS)  
Hotelling-Spur: Signifikanz der LPS Stimulation  $p < 0,05$ .

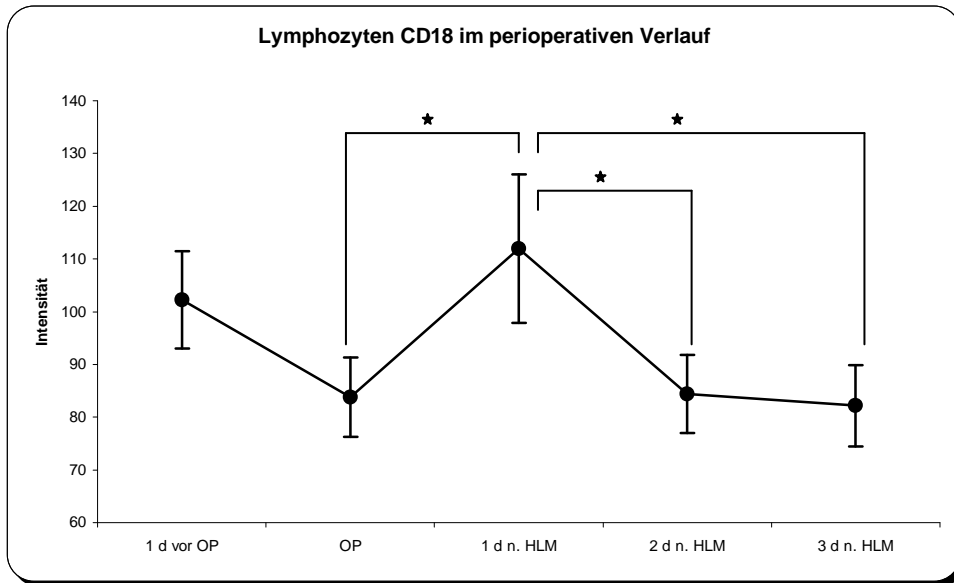
## Oberflächenantigen CD18

Die CD18-Fluoreszenzintensität auf Lymphozyten war unmittelbar nach extrakorporaler Zirkulation verringert exprimiert, stieg am ersten postoperativen maximal an, reduzierte sich bis zum dritten postoperativen Tag und blieb unterhalb des Ausgangsniveaus.

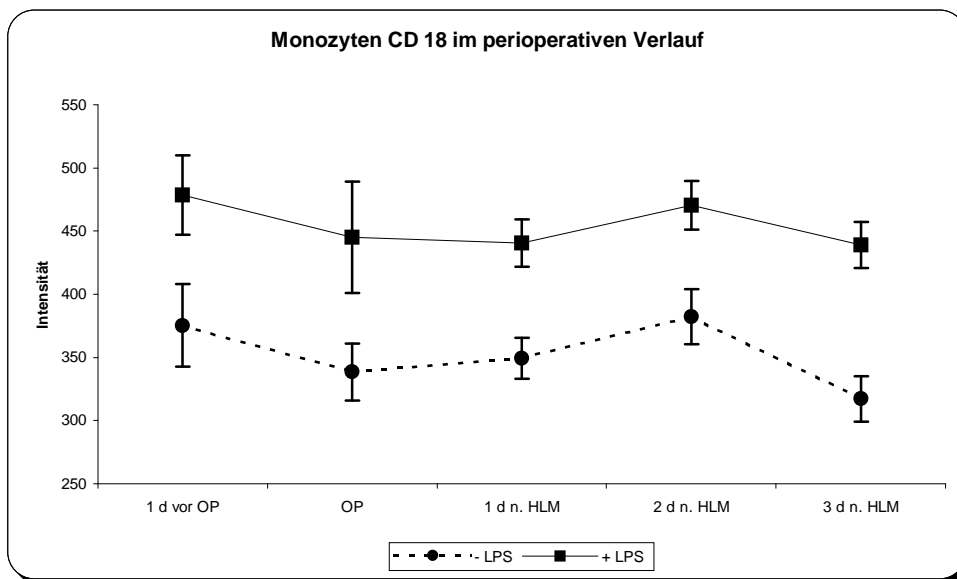
Auf der Oberfläche von Monozyten gab es während der Beobachtung bezüglich des CD18-Antigens keine wesentlichen Veränderungen. Der Wert am dritten postoperativen Tag war gegenüber dem präoperativen Wert vermindert, erreichte aber keine statistische Signifikanz. Die CD18-Kurve für die LPS-stimulierten Proben verlief annähernd parallel, nach oben verschoben, zu den unstimulierten Proben. Während der fünf Studientage ließ sich ein hochsignifikanter Effekt durch den Endotoxinstimulus hervorrufen.

Granulozyten entwickelten nach der HLM-OP einen signifikanten Abfall der CD18-Antigenität mit einem Minimum am ersten postoperativen Tag. Ab dem zweiten Tag nach Operation fand eine leichte Erholung statt, der Wert war jedoch gegenüber der präoperativen Probe am Ende der Beobachtung weiterhin statistisch signifikant reduziert. Der Endotoxinstimulus verursachte

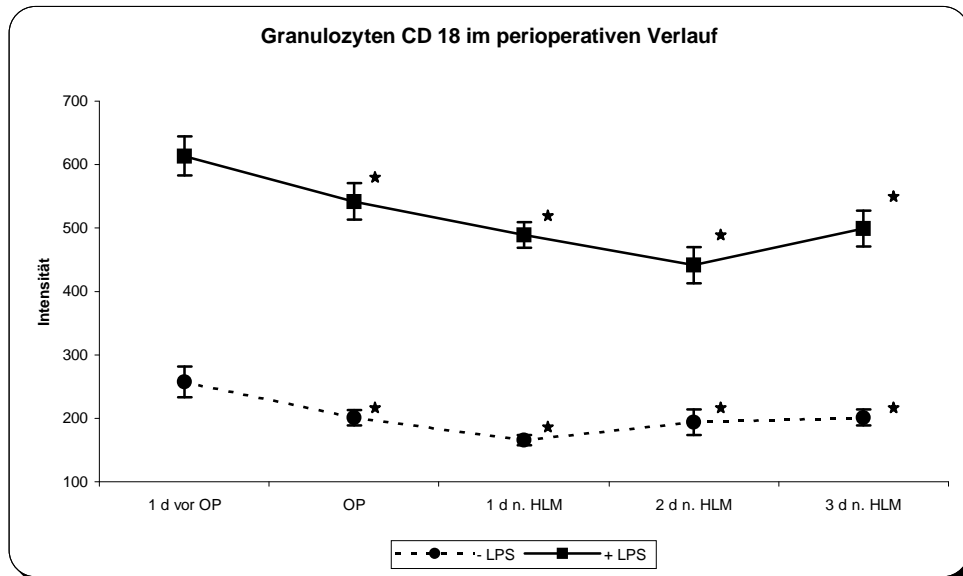
signifikant verschiedene Werte gegenüber den unstimulierten Proben. Nach HLM-Operation waren die Werte gegenüber dem präoperativen Wert statistisch signifikant. Am zweiten postoperativen Tag stellt sich in der Stimulationskurve ein Minimum dar. Hier war das Ergebnis der Stimulation abgeschwächt. Der Folgetag brachte einen Anstieg der Stimulierbarkeit.



**Abbildung 36: CD18 Intensität Lymphozyten perioperativ**  
Veränderung der Expression des Oberflächenantigens CD18 durch eine Operation unter Einsatz der HLM (\* =  $p < 0,05$ )



**Abbildung 37: CD18 Intensität Monozyten perioperativ**  
Veränderung der Expression des Oberflächenantigens CD18 durch eine Operation unter Einsatz der HLM. Hotelling-Spur: Signifikanz der LPS Stimulation  $p < 0,05$ .



**Abbildung 38: CD18 Intensität Granulozyten perioperativ**

Veränderung der Expression des Oberflächenantigens CD18 durch eine Operation unter Einsatz der HLM (\* =  $p < 0,05$  gegenüber Wert vor HLM)

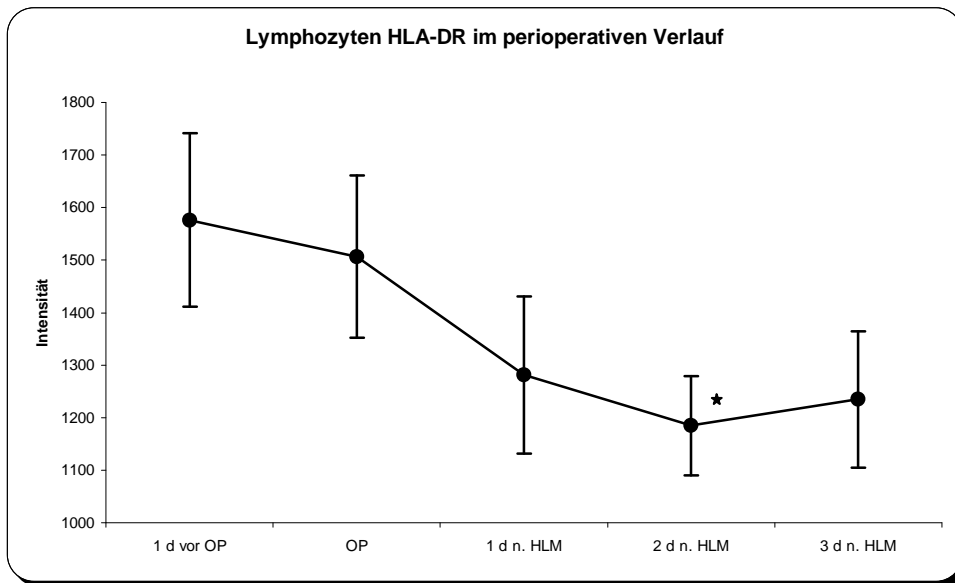
Hotelling-Spur: Signifikanz der LPS Stimulation  $p < 0,0001$ .

## Oberflächenantigen HLA-DR

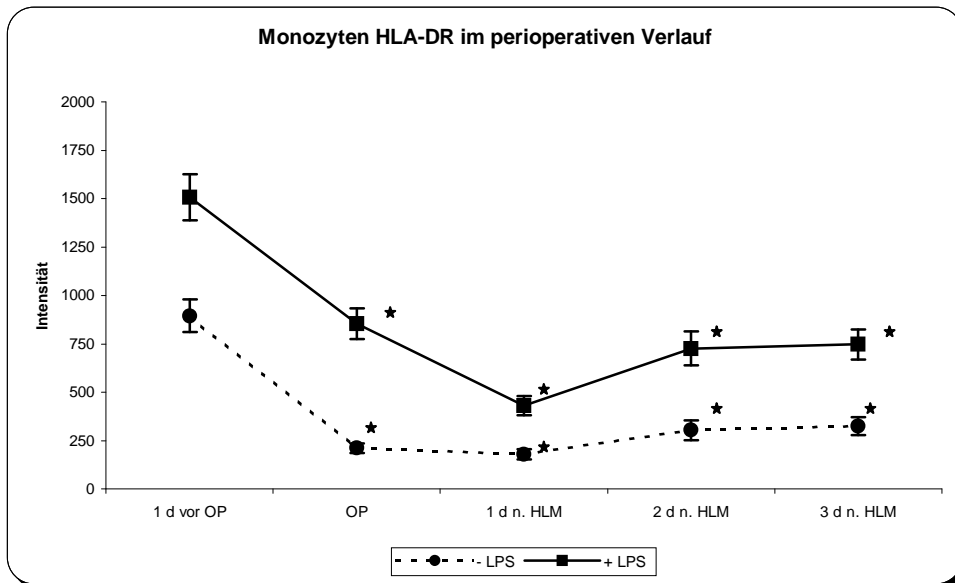
Nach HLM-OP sank die Expression des MHC Klasse II Moleküls auf der Oberfläche von Lymphozyten bis zum zweiten postoperativen Tag ab (statistisch signifikant gegenüber dem Wert vor HLM) und war auch am Ende der Untersuchung gegenüber dem Ausgangswert deutlich verringert.

Die HLA-DR-Expression auf Monozyten reduzierte sich nach der extrakorporalen Zirkulation auf weniger als ein Drittel der Ausgangsintensität und erholte sich bis zum dritten Tag nur marginal. Auch am dritten postoperativen Tag unterschieden sich die Werte von den präoperativen statistisch signifikant. Einen Test für die Immunkompetenz der Monozyten stellt die Stimulation mit Lipopolysaccharid dar. Dieser ergab eine erschöpfte Stimulierbarkeit v.a. am ersten postoperativen Tag, welche sich ab dem Folgetag besserte. Zu jeder Zeit rief die Stimulation jedoch einen statistisch hochsignifikanten Effekt hervor.





**Abbildung 39: HLA-DR Intensität Lymphozyten perioperativ**  
 Veränderung der Expression des Oberflächenantigens HLA-DR durch eine Operation unter Einsatz der HLM (\* =  $p < 0,05$  gegenüber Wert vor HLM).



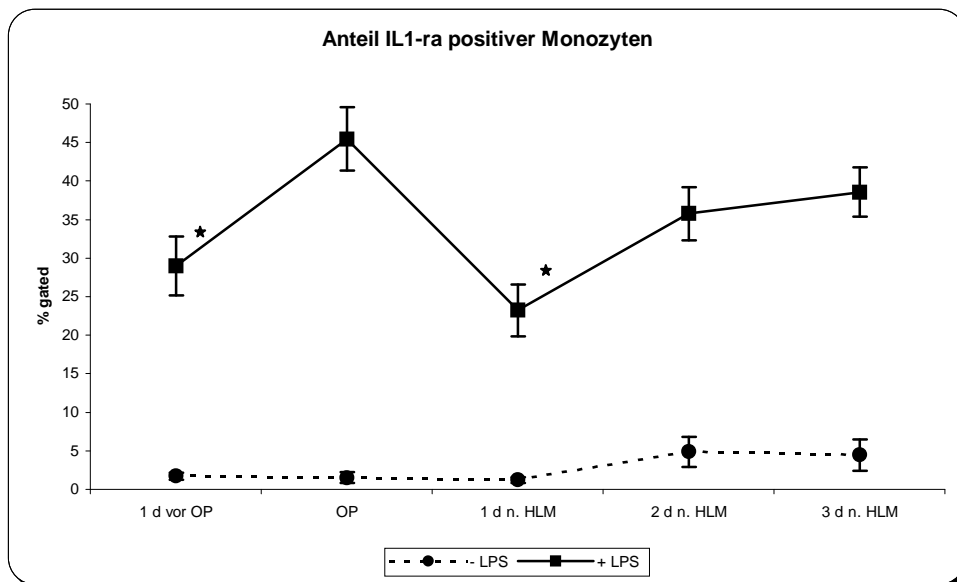
**Abbildung 40: HLA-DR Intensität Monozyten perioperativ**  
 Veränderung der Expression des Oberflächenantigens HLA-DR durch eine Operation unter Einsatz der HLM (\* =  $p < 0,05$  gegenüber Wert vor HLM)  
 Hotelling-Spur: Signifikanz der LPS Stimulation  $p < 0,05$ .

### 3.2.3 Monitoring pro- und antiinflammatorischer Proteine

#### Antiinflammatorisches Zytokin Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist

In der durchflußzytometrischen Analyse der Monozyten bezüglich ihrer Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist-Produktion resultierten keine signifikanten Veränderungen der unstimulierten Proben im Untersuchungszeitraum. Dabei ist zu berücksichtigen, daß die Zytokindetektion ohne vorausgehende Stimulation nur bei entsprechender Halbwertszeit des Zytokins aussagekräftig ist.

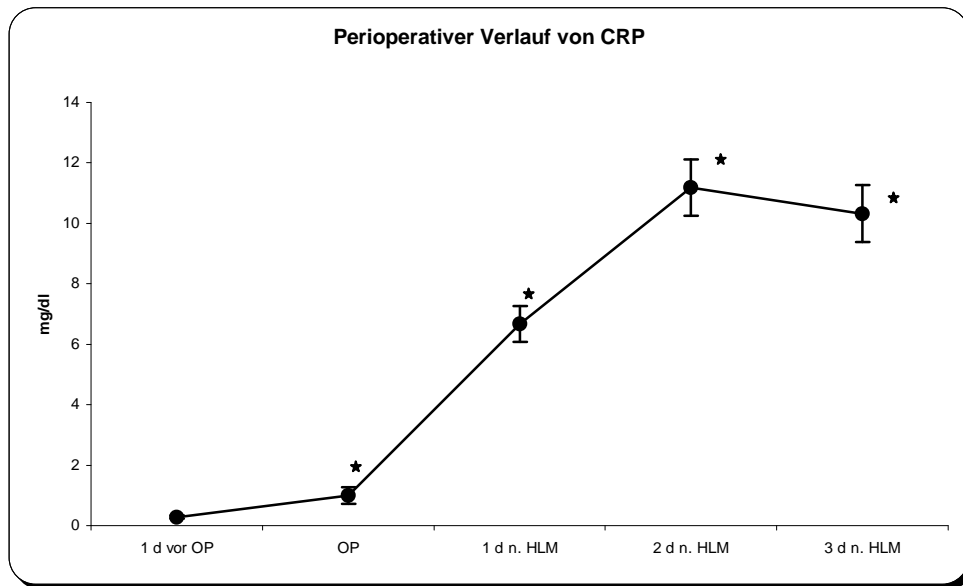
Direkt nach HLM-Operation exprimierten stimulierte Monozyten die größte Menge an antiinflammatorischen Zytokin IL-1ra. Gegenüber dem präoperativen Wert kam es zu einer signifikanten Zunahme. Bereits am ersten postoperativen Tag verringerte sich der Anteil IL-1ra positiver-Monozyten etwas unter den Ausgangswert. Bis zum Untersuchungsende erhöhte sich der Prozentsatz positiver Monozyten wieder deutlich, ohne jedoch ein Signifikanzniveau zu erreichen.



**Abbildung 41: Anteil IL-1ra positiver Ereignisse in Monozyten perioperativ**

Prozentsatz positiver Ereignisse für intrazellulär angefärbtes IL-1ra in Monozyten an den sich im Gate befindenden Monozyten im perioperativen Verlauf. (\* =  $p < 0,05$  gegenüber OP-Wert).

Hotelling-Spur: Signifikanz der LPS Stimulation  $p < 0,0001$ , Signifikanz im kubischen Kurvenverlauf  $p < 0,05$



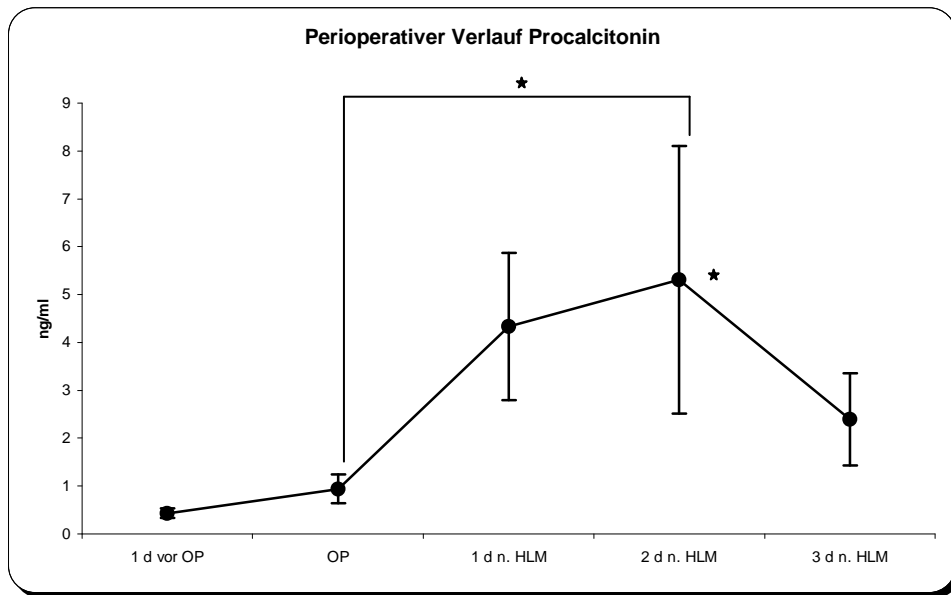
**Abbildung 42: CRP perioperativ**

Veränderung des C-reaktiven Proteins durch HLM-OP. (\*= P < 0,05 gegenüber dem Wert vor HLM)

### C-reaktives Protein

Als Ausdruck einer Aktivierung des Immunsystems weisen erhöhte CRP-Werte (Referenzwert < 0,5 mg/dl) auf ein Entzündungsgeschehen hin. Eine Differenzierung der Ätiologie, z.B. bakteriell oder viral ist jedoch nur eingeschränkt möglich. Hierfür sind andere Parameter wie z.B. Procalcitonin oder Lipopolysaccharid-bindendes-Protein besser geeignet.

Das Patientenkollektiv der operierten Kinder zeigte bereits nach dem chirurgischen Eingriff dezent gestiegene CRP-Werte. Eine deutliche Zunahme, mit einer statistischen Signifikanz, ergab sich am ersten postoperativen Tag bei einem Mittelwert von  $6,67 \pm 0,59$  mg/dl. Das maximale Mittel stellte sich zwei Tage nach der Operation ein. Zum dritten postoperativen Tag hin reduzierte sich die Kurve etwas, wobei sich die Werte weiterhin signifikant von den Präoperativen unterschieden. Bei allen 20 Patienten wurden pathologische CRP-Werte gemessen, 15 davon hatten Werte > 10 mg/dl.



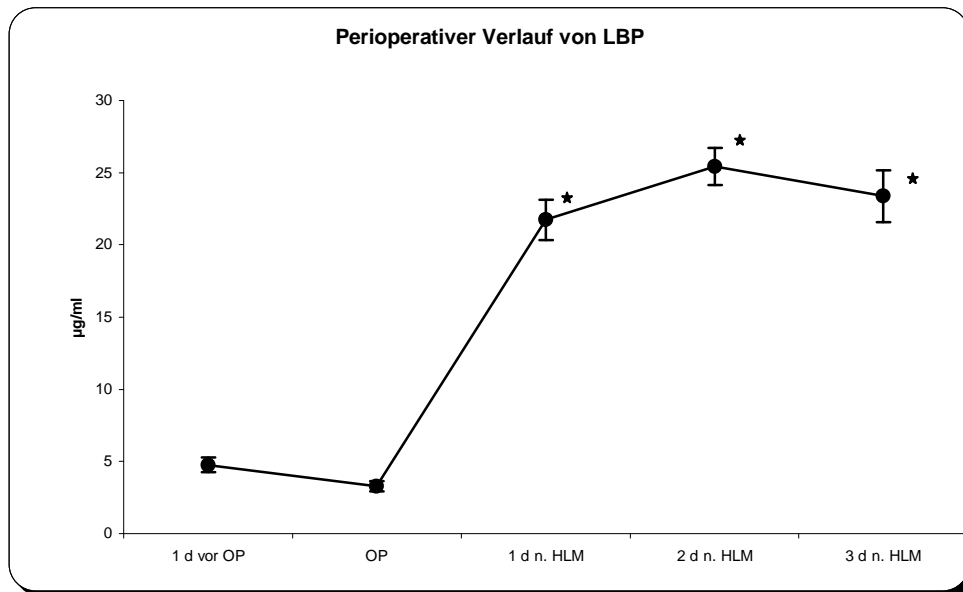
**Abbildung 43: Procalcitonin perioperativ**

Verlauf von Procalcitonin im perioperativen Zeitraum. (\* =  $p < 0,05$ , ohne Verbindungslinie gegenüber Wert vor HLM))

## Procalcitonin

Die Kurve der Patientengruppe für Procalcitonin, zeigt ähnlich der CRP-Kurve einen dezenten Anstieg unmittelbar nach dem chirurgischen Eingriff, das Maximum (signifikant gegenüber prä-OP-Wert und Wert nach HLM) ebenfalls am zweiten postoperativen Tag, aber einen wesentlich schnelleren Abfall am dritten Tag nach OP. Bei neun der 20 Patienten konnten PCT-Werte  $> 1$  ng/ml gemessen werden. Weitere vier Patienten hatten PCT-Werte  $> 10$  ng/ml, drei davon erhielten bei klinischen Zeichen einer bakteriellen Infektion ein zweites Antibiotikum.

Die schnelle Kinetik des Procalcitonins lässt sich anhand der Mittelwerte des Patientenkollektivs in der Darstellung schlecht erkennen, mitunter auch weil bei manchen Patienten bereits am ersten postoperativen Tag und bei anderen erst am zweiten postoperativen Tag das Maximum der PCT-Konzentration erreicht wurde.



**Abbildung 44: LPS-bindendes-Protein (LBP) perioperativ**  
 Perioperativer Verlauf von LPS-bindenden-Protein (LBP). (\* =  $p < 0,05$  gegenüber Wert vor HLM)

### Lipopolysaccharid-bindendes-Protein (LBP)

Das LBP ist ein Akut-Phase-Protein, das die Bindung des Endotoxins an die Oberflächen der Effektorzellen an den CD14-Rezeptor fördert. Der Referenzwert für LBP liegt zwischen 2 – 15 µg/ml. Erhöhte LBP-Werte weisen auf das Vorhandensein bakterieller Zellwandbestandteile hin und können Indiz für eine bakteriell verursachte Sepsis sein. Im Gegensatz zu Procalcitonin steigt LBP auch bei lokal begrenzten bakteriellen Infektion an, so daß es systemisch nachweisbar wird. Zusammen mit anderen proinflammatorischen Proteinen kann zwischen systemischen, septischen und schweren lokalen Infektionen differenziert werden. Erhöhte Plasmaspiegel für das LBP wurden z.B. in Patienten mit Sepsis, abdominalen Infektionen, SIRS oder mit kardiopulmonalem Bypass gefunden. (Franke et al., 2005)

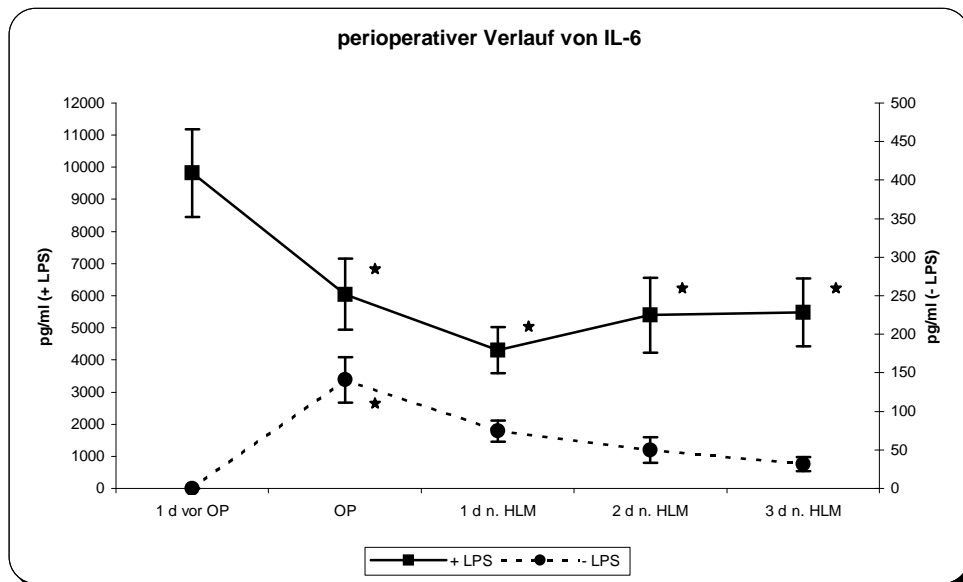
Im untersuchten Patientenkollektiv fanden sich nach HLM-OP bei allen 20 Patienten deutlich erhöhte LBP-Spiegel. Am ersten postoperativen Tag ließ sich ein starker Anstieg von LBP gegenüber dem Vortag dokumentieren. Der zweite Tag nach OP erbrachte das Maximum und zum letzten Tag im Beobachtungszeitraum hin zeigten die Werte im Mittel rückläufige Tendenz.

Tag eins bis drei nach dem chirurgischen Eingriff waren statistisch signifikant verschieden gegenüber dem präoperativen Wert.

### Interleukin-6

Abbildung 45 stellt unstimulierte und endotoxinbehandelte Patientenproben im perioperativen Verlauf dar. Gemäß seiner bekannten Rolle in der Induktion entzündlicher Reaktionen hatte die IL-6 Sekretion ein frühes Maximum gleich nach der HLM-Operation ( $p < 0,05$ ). Im weiteren Verlauf waren die IL-6-Plasmaspiegel abnehmend, jedoch bis zum dritten Tag nach OP im pathologischen Bereich.

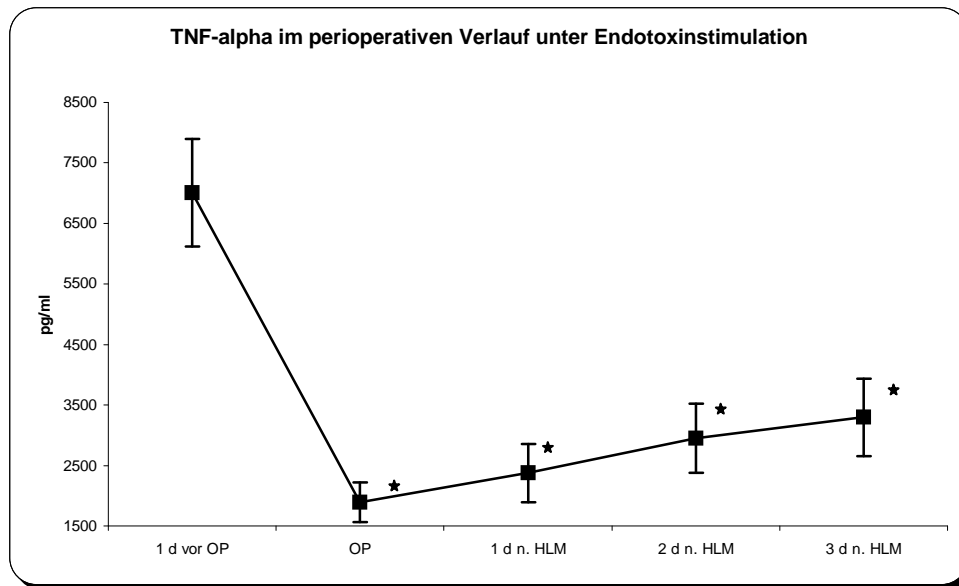
Die Stimulationsfähigkeit der Zellen für IL-6 hatte ihr Maximum vor der HLM-OP und reduzierte sich durch diese signifikant. Nach einem Minimum am ersten postoperativen Tag, erholten sich die Zellen nur langsam bis zum dritten Tag. Das Ausgangsniveau konnte dabei nicht wiedererreicht werden. Während der Untersuchung war der Effekt der Endotoxinstimulation auf die Proben stets hochsignifikant ( $p < 0,0001$ ).



**Abbildung 45: IL-6 perioperativ**

Darstellung des perioperativen Verlaufs von Interleukin-6 ohne bzw. mit Endotoxineinwirkung. (\* =  $p < 0,05$  gegenüber Wert vor HLM).

Hotelling-Spur: Signifikanz der LPS Stimulation  $p < 0,0001$ , Signifikanz im linearen Verlauf  $p < 0,05$



**Abbildung 46: TNF-alpha perioperativ**

Perioperativer TNF-alpha-Spiegel nach Stimulation mit LPS. (\* =  $p < 0,05$  gegenüber Wert vor HLM)

## TNF-alpha

Aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit im Bereich von wenigen Minuten, ist TNF-alpha nur unter den Bedingungen des Endotoxinstimulationstests dargestellt. Präoperativ reagierten die Proben der Patienten am ausgeprägtesten auf den Stimulus mit einer hohen TNF-alpha-Produktion. Unmittelbar nach Beendigung der HLM-OP entnommene Blutproben waren in ihrer Fähigkeit auf den Endotoxinstimulus zu antworten deutlich eingeschränkt. Ihr Mittelwert stellte das Minimum im Beobachtungszeitraum dar. Im weiteren Verlauf erfolgte eine langsame, kontinuierliche Erholung der TNF-alpha-Produktion der stimulierten Proben. Dabei wurde in etwa die Hälfte des Ausgangsniveaus am dritten postoperativen Tag erreicht. Vom OP-Tag bis zum dritten postoperativen Tag waren die Mittelwerte gegenüber dem präoperativen Mittelwert signifikant reduziert.

### **3.3 Einfluß der HLM und verschiedener Parameter auf Antigenexpression und pro- sowie antiinflammatorische Proteine**

Mit Hilfe einer Subanalyse der Daten der Patientengruppe 2 wurde der Einfluß des Vitiums, der Dauer des HLM-Anschluß, der tiefsten Körpertemperatur während dieser Zeit, der Körpergröße und des am höchsten postoperativ gemessenen Lactat-Wertes auf die Antigenexpression, das Blutbild sowie auf pro- und antiinflammatorische Proteine untersucht. Hierfür wurden für die dargestellten Parameter die prozentuale Veränderung der Werte der postoperativen Probe gegenüber der präoperativen Probe errechnet. In den Diagrammen findet sich die mittlere prozentuale Veränderung für die jeweilige Subgruppe bezüglich eines betrachteten Merkmals, sowie der dazugehörige SEM.

#### **3.3.1 Vitium**

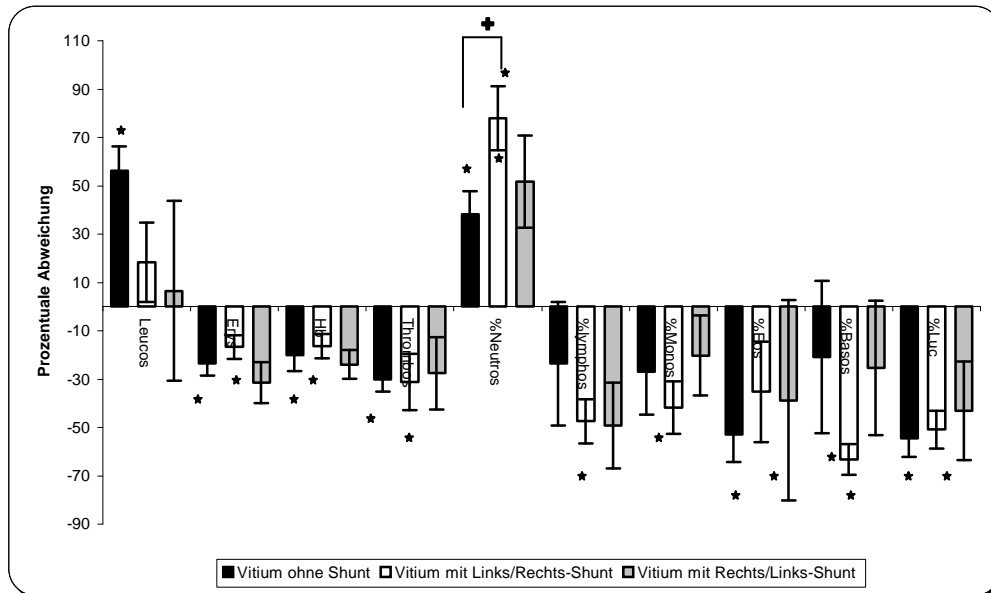
Unter den 20 betrachteten Patienten wurde eine Einteilung nach der Shuntrichtung ihres Herzfehlers in 3 Gruppen vorgenommen. Gruppe 1 wies keinen Shunt auf (n=8), in Gruppe 2 (n=9) war der Shunt von links nach rechts gerichtet und die Gruppe 3 (n=3) einte ein Rechts/Links-Shunt.

In Anbetracht der geringen Fallzahl der Gruppe 3 wurde diese aus den statistischen Testverfahren ausgeschlossen, zudem von einer Normalverteilung nicht ausgegangen werden konnte und somit ein Testkriterium nicht erfüllt wurde. Die Darstellung dient dem Aufzeigen eines Trends, der sich so bereits in verschiedenen Vorarbeiten fand.

In allen drei Patientengruppen kam es zu deutlichen Veränderungen im Differentialblutbild mit Zunahme der Gesamtzahl der Leukozyten und des Anteils der neutrophilen Granulozyten, sowie fast durchwegs signifikante Abnahmen der übrigen Leukozytensubpopulationen. Erythrozyten, Hb und Thrombozyten wiesen ebenfalls statistisch bedeutsame Verminderungen auf.



Signifikante Differenzen zwischen der Patientengruppe ohne Shunt und der mit Links-/Rechts-Shunt ergaben sich für die Population der Neutrophilen (Abb. 47)



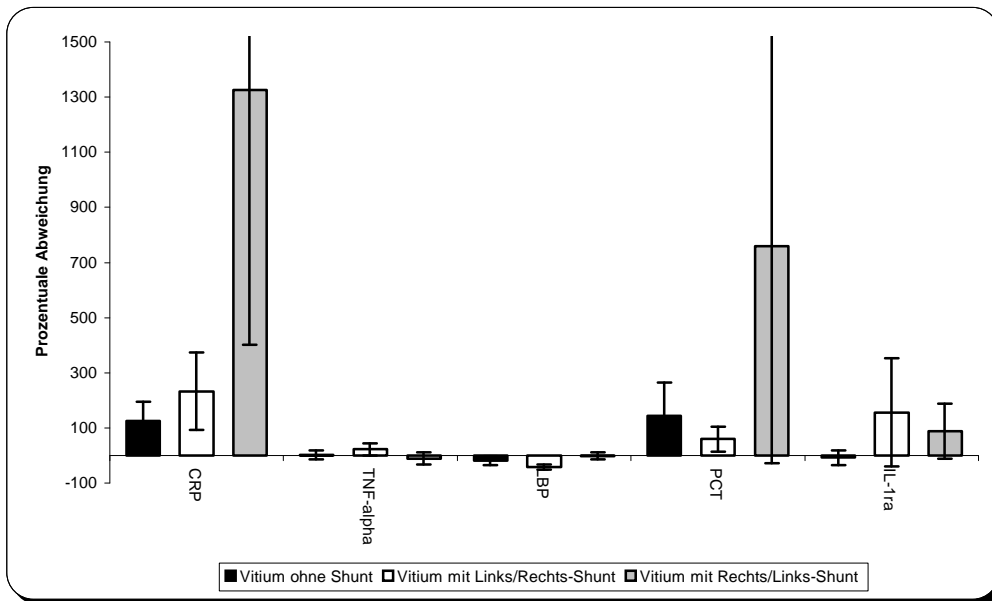
**Abbildung 47: Differential-Blutbild (Vitium)**

Prozentuale Veränderung der Leukozyten und der leukozytären Subpopulationen und des roten Blutbilds sowie der Thrombozyten nach Beendigung der HLM-OP gegenüber dem präoperativen Wert in Abhängigkeit von der Shuntrichtung des Vitiums (n=20).

(\* =  $p < 0,05$  gegenüber dem präoperativen Wert, + =  $p < 0,05$  gegenüber der anderen Patientengruppe)

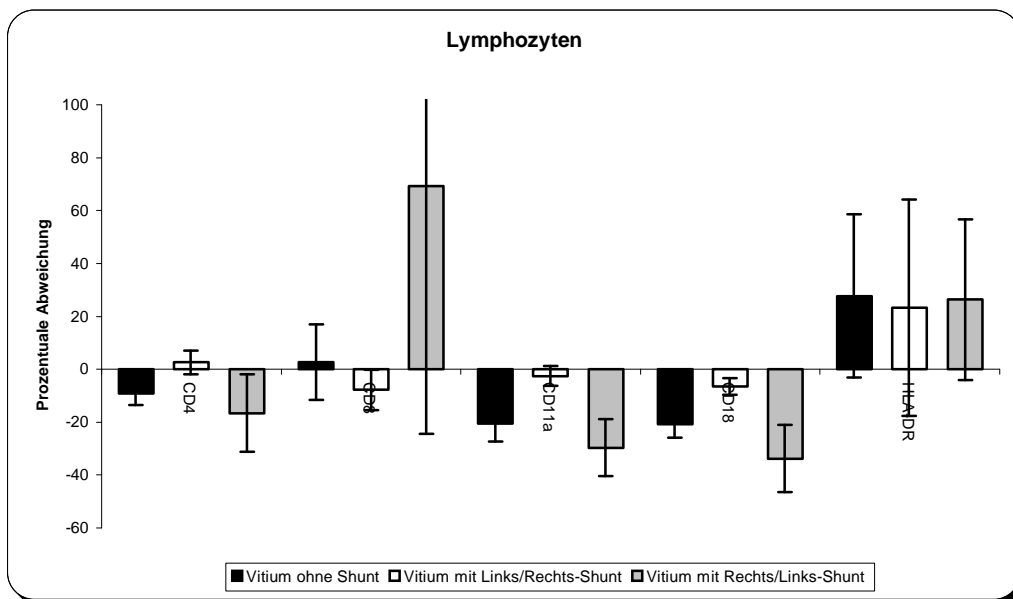
Bei den pro- und antiinflammatorischen Proteinen zeigten CRP, PCT und IL-1ra eine postoperative Zunahme gegenüber den Ausgangswerten, wobei aber keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patienten mit unterschiedlichen Vitien bestanden (Abb. 48). Es ergab sich allenfalls ein Trend zu einem stärkeren Anstieg von CRP und PCT bei Rechts-/Links-Shunt.

Bezüglich der Antigenexpression ergaben sich beim betrachteten Merkmal Vitium keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen. Auf der Monozytenoberfläche stellte sich unabhängig von der Shuntrichtung eine deutliche Reduktion der HLA-DR-Expression ein. Demgegenüber fand sich eine gleichgerichtete Expressionszunahme für HLA-DR auf der Zellmembran von Lymphozyten in den 3 Gruppen. Ähnlich verhielt es sich mit dem Antigen CD 14 auf Granulozyten.



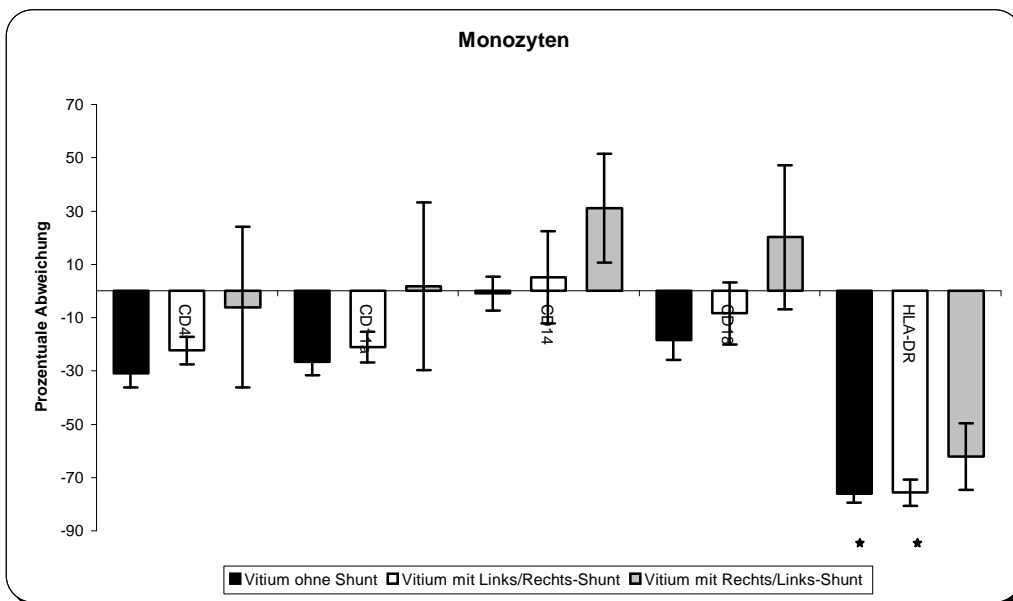
**Abbildung 48: Pro- und antiinflammatorische Proteine (Vitium)**

Prozentuale Veränderung der pro- und antiinflammatorischen Proteine nach Beendigung der HLM-OP gegenüber dem präoperativen Wert in Abhängigkeit von der Shuntrichtung des Vitiums (n=20). (\* = p < 0,05 gegenüber dem präoperativen Wert)



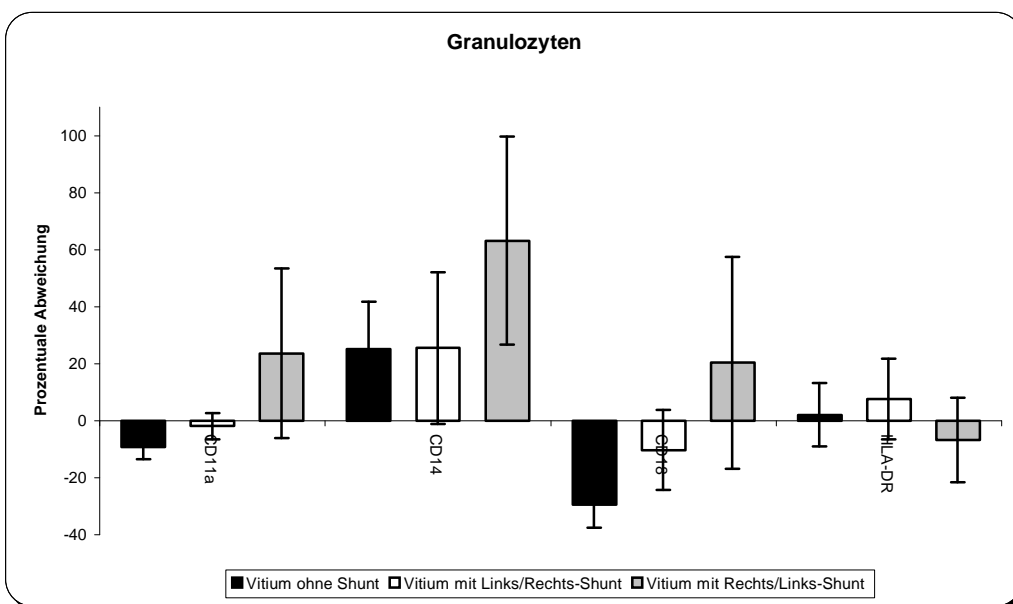
**Abbildung 49: Antigenexpression auf der Lymphozytenoberfläche (Vitium)**

Prozentuale Veränderung der lymphozytären Oberflächenantigene nach Beendigung der HLM-OP gegenüber dem präoperativen Wert in Abhängigkeit von der Shuntrichtung des Vitiums (n=20). (\* = p < 0,05 gegenüber dem präoperativen Wert)



**Abbildung 50: Antigenexpression auf der Monozytenoberfläche (Vitium)**

Prozentuale Veränderung der monozytären Oberflächenantigene nach Beendigung der HLM-OP gegenüber dem präoperativen Wert in Abhängigkeit von der Shuntrichtung des Vitiums (n=20). (\* =  $p < 0,05$  gegenüber dem präoperativen Wert)



**Abbildung 51: Antigenexpression auf der Granulozytenoberfläche (Vitium)**

Prozentuale Veränderung der granulozytären Oberflächenantigene nach Beendigung der HLM-OP gegenüber dem präoperativen Wert in Abhängigkeit von der Shuntrichtung des Vitiums (n=20). (\* =  $p < 0,05$  gegenüber dem präoperativen Wert)

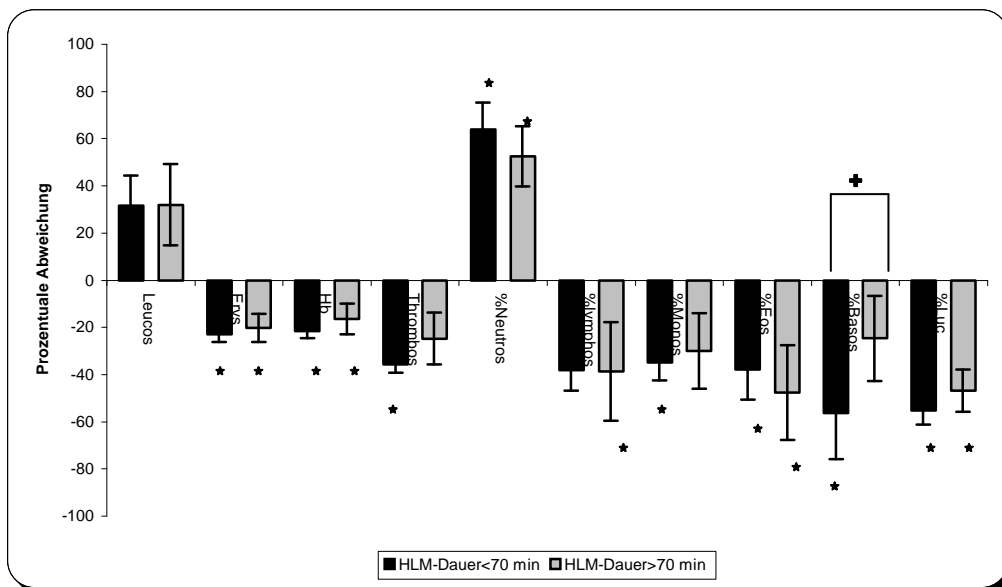
### 3.3.2 HLM-Dauer

Eine weitere Unterteilung in zwei Gruppen wurde nach der Dauer der extrakorporalen Zirkulation vorgenommen. Hierbei wurde bei 70 Minuten diskriminiert, so daß sich 8 Patienten in der Gruppe, die kürzer und 10

Patienten in der Gruppe, die länger angeschlossen waren, wiederfanden. Zwei Patienten ließen sich aufgrund fehlender Daten nicht zuordnen.

Außer bei der Leukozytenzahl ergaben sich in beiden Gruppen, bei fast allen Differential-Blutbild-Parametern, signifikante Veränderungen direkt postoperativ gegenüber den präoperativen Werten. Lediglich für die Subpopulation der Basophilen stellte sich ein signifikanter Unterschied in Abhängigkeit von der Dauer der extrakorporalen Zirkulation ein (Abb. 52).

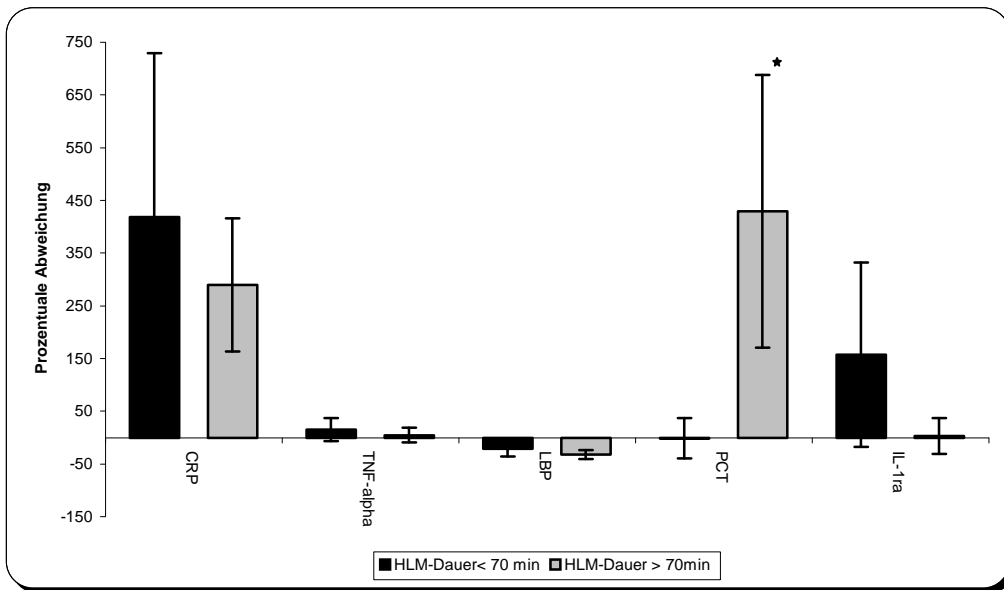
Bei der Betrachtung der pro- und antiinflammatorischen Proteine zeigten sich deutlich Zunahmen für CRP in beiden Gruppen, für PCT in der Gruppe mit über 70 Minuten Anschlußzeit (statistisch signifikant) und für IL-1ra in der Gruppe mit kürzerer HLM-Dauer. Eine statistische Signifikanz zwischen beiden Gruppen ließ sich für keines der Proteine nachweisen (Abb. 53).



**Abbildung 52: Differential-Blutbild (HLM-Dauer)**

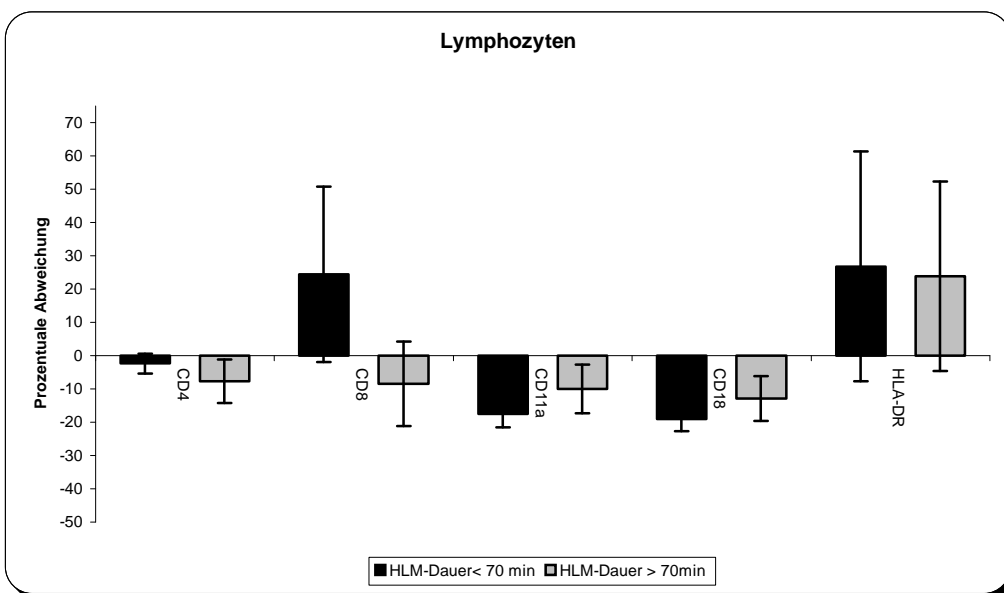
Prozentuale Veränderung der Leukozyten und der leukozytären Subpopulationen und des roten Blutbilds sowie der Thrombozyten nach Beendigung der HLM-OP gegenüber dem präoperativen Wert in Abhängigkeit von der HLM-Dauer (n=18).

(\* =  $p < 0,05$  gegenüber dem präoperativen Wert, + =  $p < 0,05$  gegenüber der anderen Patientengruppe)



**Abbildung 53: Pro- und antiinflammatorische Proteine (HLM-Dauer)**

Prozentuale Veränderung der pro- und antiinflammatorischen Proteine nach Beendigung der HLM-OP gegenüber dem präoperativen Wert in Abhängigkeit von der HLM-Dauer (n=18). (\* = p < 0,05 gegenüber dem präoperativen Wert)



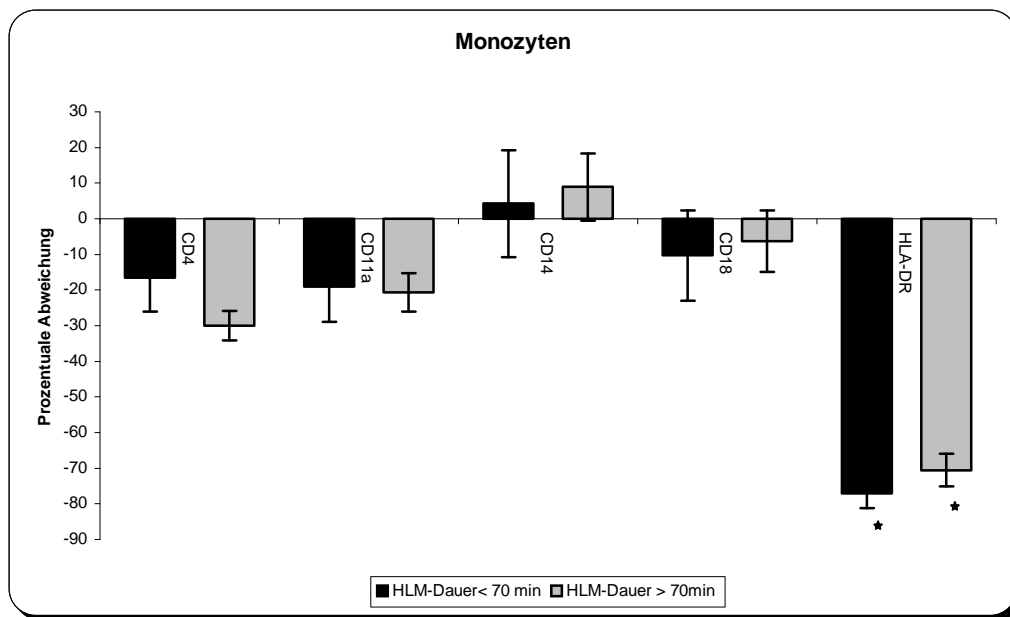
**Abbildung 54: Antigenexpression auf der Lymphozytenoberfläche (HLM-Dauer)**

Prozentuale Veränderung der lymphozytären Oberflächenantigene nach Beendigung der HLM-OP gegenüber dem präoperativen Wert in Abhängigkeit von der HLM-Dauer (n=18). (\* = p < 0,05 gegenüber dem präoperativen Wert)

Ein tendenzieller Unterschied der Expression des Antigens CD8 auf Lymphozyten zeichnete sich in Abhängigkeit von der Dauer der extrakorporalen Zirkulation ab, der jedoch nicht das Signifikanzniveau erreicht hat. Während es bei den <70 Min angeschlossenen Kindern zu einer Zunahme der Expression kam, verringerte sich diese bei den Patienten mit längerer Anschlußdauer (Abb.

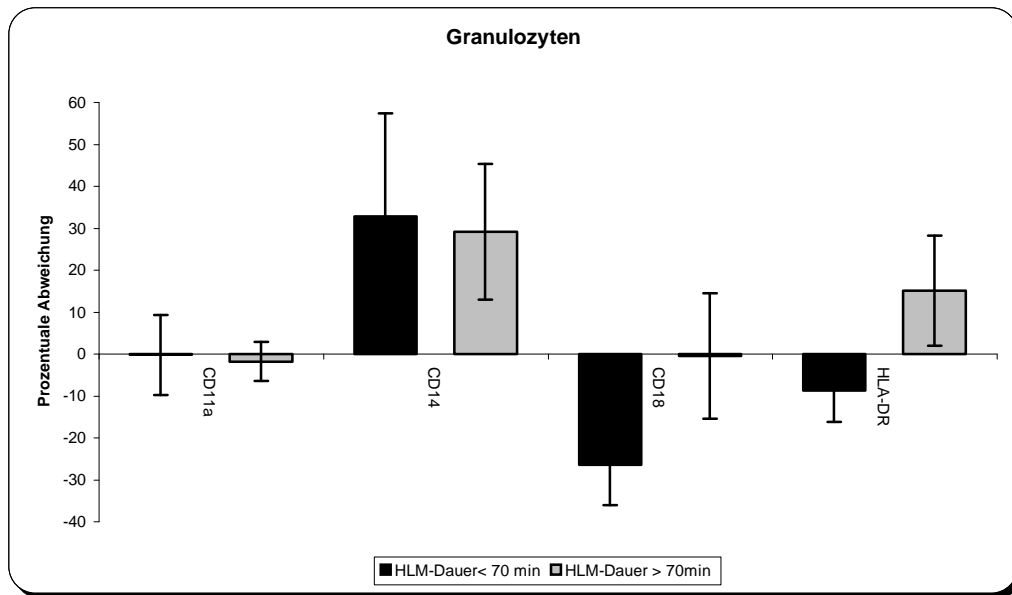
54). Gegenläufig war der Trend bei den Antigenen CD18 und HLA-DR auf der Oberfläche von Granulozyten (Abb. 56).

Innerhalb der Gruppen stellte sich lediglich für das Antigen HLA-DR auf Monozyten im Vergleich zum Ausgangswert ein statistisch signifikanter Unterschied ein (Abb. 55). In Abhängigkeit von der Dauer der extrakorporalen Zirkulation ließ sich keine Signifikanz nachweisen.



**Abbildung 55: Antigenexpression auf der Monozytenoberfläche (HLM-Dauer)**

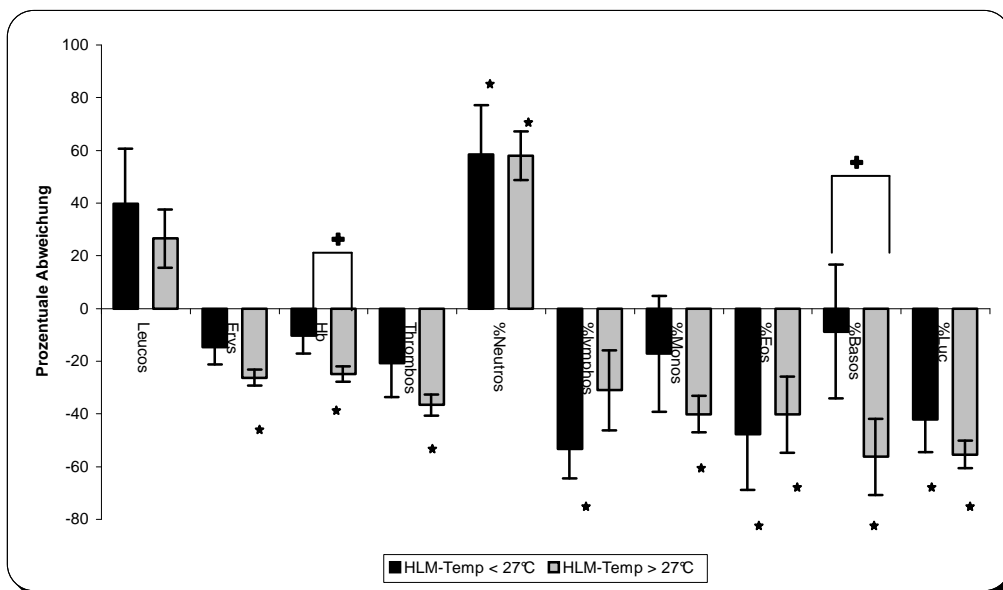
Prozentuale Veränderung der monozytären Oberflächenantigene nach Beendigung der HLM-OP gegenüber dem präoperativen Wert in Abhängigkeit von der HLM-Dauer (n=18). (\* =  $p < 0,05$  gegenüber dem präoperativen Wert)



**Abbildung 56: Antigenexpression auf der Granulozytenoberfläche (HLM-Dauer)**

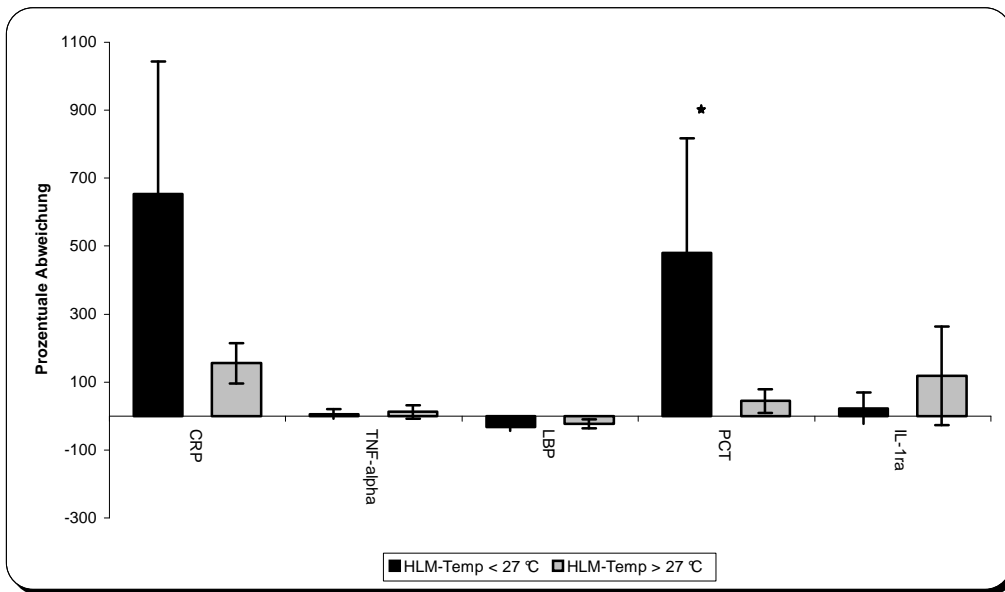
Prozentuale Veränderung der granulozytären Oberflächenantigene nach Beendigung der HLM-OP gegenüber dem präoperativen Wert in Abhängigkeit von der Dauer der HLM (n=18).

### 3.3.3 Tiefste Körpertemperatur während der HLM-OP



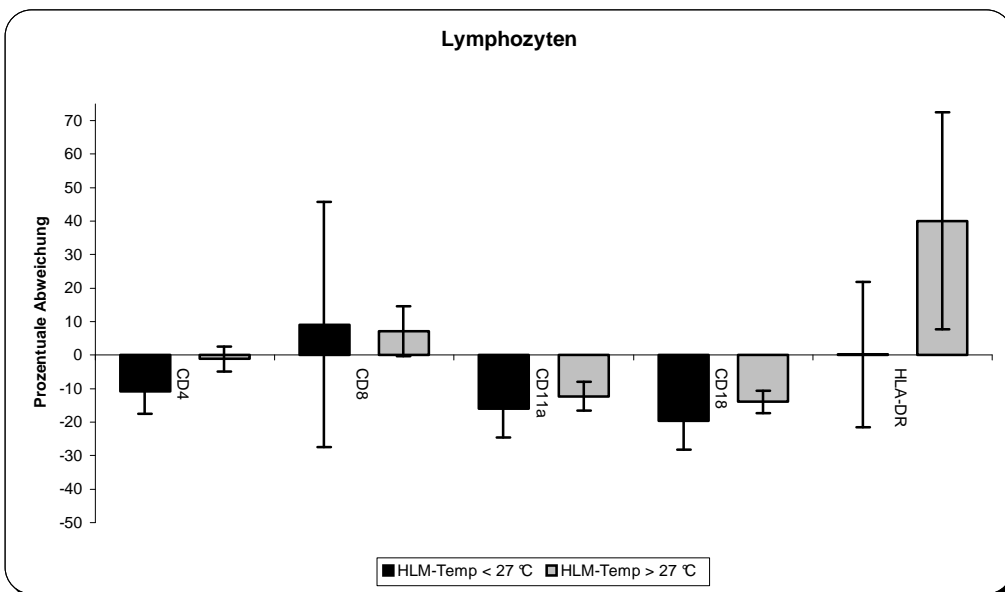
**Abbildung 57: Differential-Blutbild (HLM-Temperatur)**

Prozentuale Veränderung der Leukozyten und der leukozytären Subpopulationen und des roten Blutbilds sowie der Thrombozyten nach Beendigung der HLM-OP gegenüber dem präoperativen Wert in Abhängigkeit von der tiefsten Körpertemperatur während der extrakorporalen Zirkulation (n=18). (\* =  $p < 0,05$  gegenüber dem präoperativen Wert, + =  $p < 0,05$  gegenüber der anderen Patientengruppe)



**Abbildung 58: Pro- und antiinflammatorische Proteine (HLM-Temperatur)**

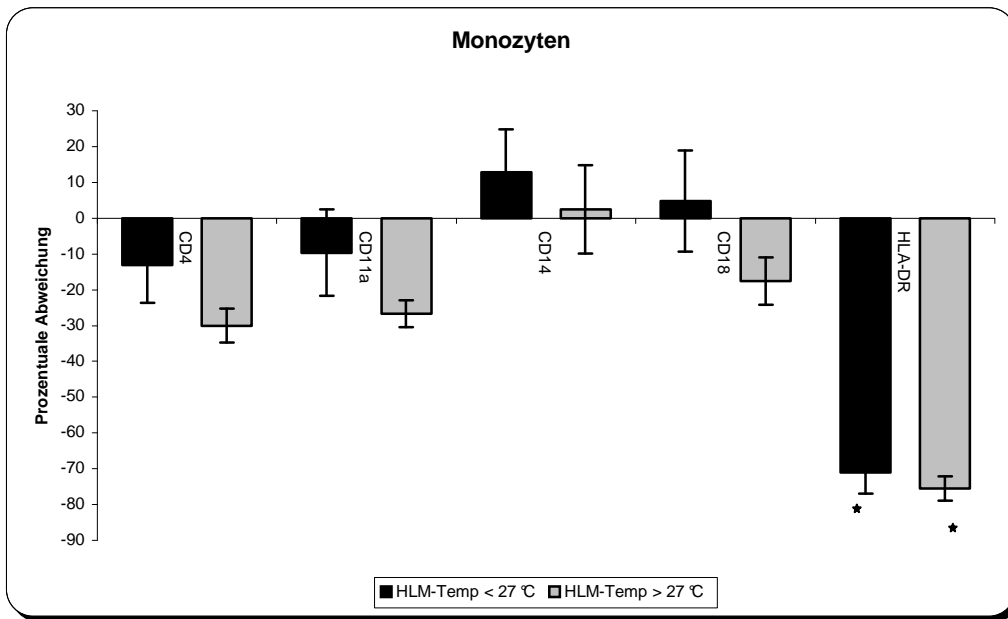
Prozentuale Veränderung der pro- und antiinflammatorischen Proteine nach Beendigung der HLM-OP gegenüber dem präoperativen Wert in Abhängigkeit von der tiefsten Körpertemperatur während der extrakorporalen Zirkulation (n=18). (\* = p < 0,05 gegenüber dem präoperativen Wert)



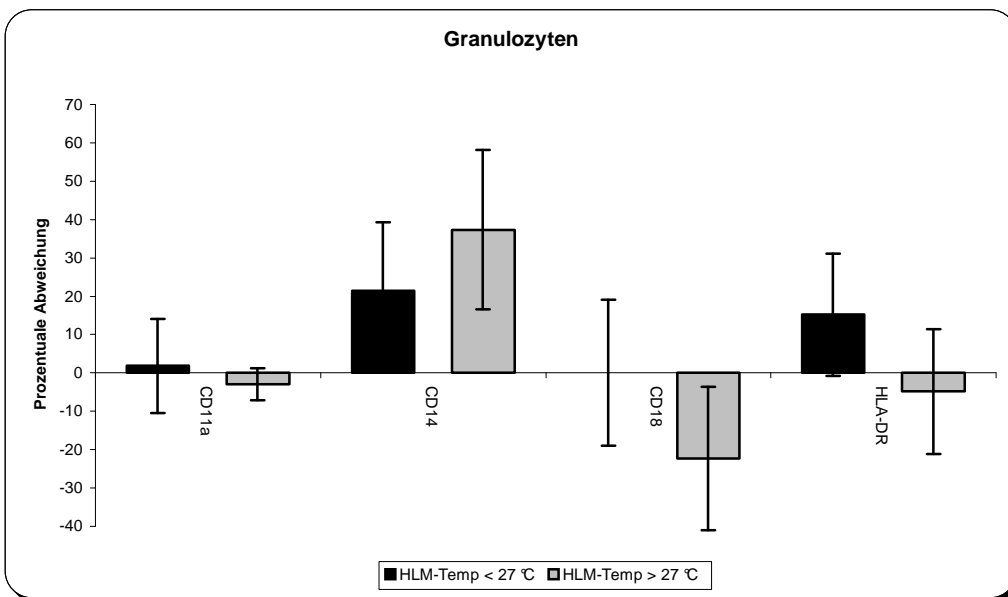
**Abbildung 59: Antigenexpression auf der Lymphozytenoberfläche (HLM-Temperatur)**

Prozentuale Veränderung der lymphozytären Oberflächenantigene nach Beendigung der HLM-OP gegenüber dem präoperativen Wert in Abhängigkeit von der tiefsten Körpertemperatur während der extrakorporalen Zirkulation (n=18). (\* = p < 0,05 gegenüber dem präoperativen Wert)





**Abbildung 60: Antigenexpression auf der Monozytenoberfläche (HLM-Temperatur)**  
 Prozentuale Veränderung der monozytären Oberflächenantigene nach Beendigung der HLM-OP gegenüber dem präoperativen Wert in Abhängigkeit von der tiefsten Körpertemperatur während der extrakorporalen Zirkulation (n=18). (\* = p < 0,05 gegenüber dem präoperativen Wert)



**Abbildung 61: Antigenexpression auf der Granulozytenoberfläche (HLM-Temperatur)**  
 Prozentuale Veränderung der granulozytären Oberflächenantigene nach Beendigung der HLM-OP gegenüber dem präoperativen Wert in Abhängigkeit von der tiefsten Körpertemperatur während der extrakorporalen Zirkulation (n=18). (\* = p < 0,05 gegenüber dem präoperativen Wert)

Um den Einfluß der tiefsten Körpertemperatur während der extrakorporalen Zirkulation zu beurteilen, wurden zwei Patientengruppen gebildet. Die 1.

Gruppe bestand aus Patienten, deren tiefste Körpertemperatur geringer als 27°C war (n=6), die 2. Gruppe setzte sich aus Kindern zusammen, deren Körpertemperatur während des HLM-Anschlusses immer über 27°C lag (n=12).

Zwischen den beiden Gruppen konnten signifikante Differenzen bezüglich der Hb-Abnahme und der prozentualen Verteilung der Basophilen beobachtet werden. Innerhalb der jeweiligen Gruppe stellten sich zahlreiche Signifikanzen im Vergleich zu den präoperativen Werten ein (*Abb. 57*).

Zu starken Anstiegen unmittelbar postoperativ kam es bei den Laborparametern CRP und PCT und dies in beiden Gruppen, wobei statistisch gesehen nur die PCT-Veränderung in der Gruppe < 27°C signifikant war.

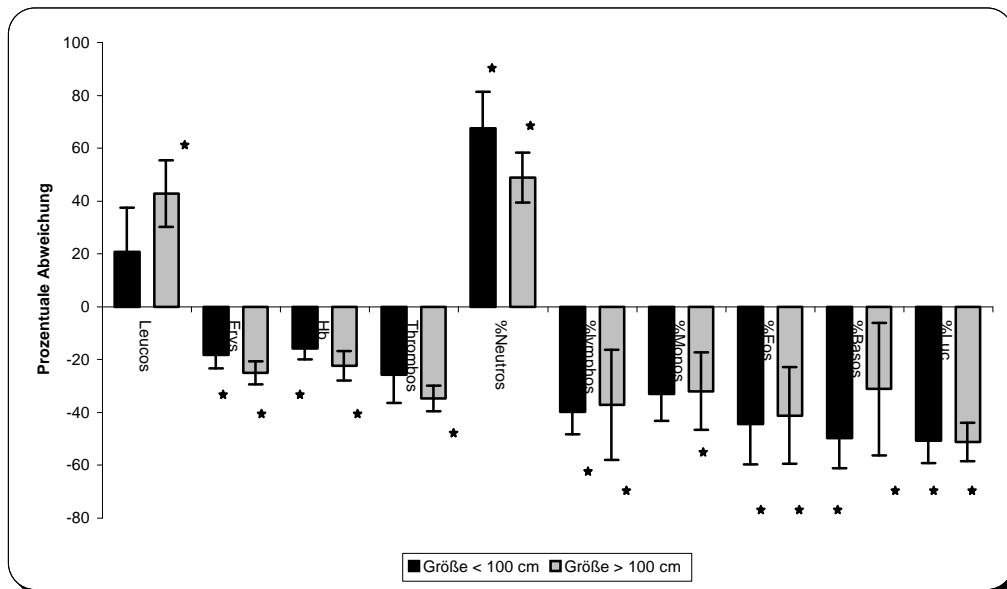
Hier macht sich bemerkbar, daß Patienten mit dem größeren und komplexerem Eingriff tiefer abgekühlt werden, während sie an die Herz-Lungen-Maschine angeschlossen sind und eine längere Maschinendauer haben.

Während es in der Gruppe mit HLM-Temperaturen über 27°C eher zu einer Expressionssteigerung für das Oberflächenantigen HLA-DR auf Lymphozyten kommt, scheinen niedrigere Temperaturen die HLA-DR-Expression zu beeinträchtigen. Jedoch ließ sich dieser Effekt bei den Monozyten nicht nachvollziehen, die sich diesem Antigen gegenüber, zwischen den Gruppen, sehr indifferent verhalten und nahezu im Mittel den gleichen Rückgang der Expressionsintensität aufzeigten (statistisch signifikant gegenüber dem präoperativen Wert). Ferner sind die Verhältnisse bei den Granulozyten zu diesem Merkmal wiederum umgekehrt, die Expression der Gruppe < 27°C nimmt zu, während die der anderen Gruppe abnimmt. Zwischen den Gruppen stellte sich kein statistisch signifikanter Effekt ein, was die Oberflächenantigene auf Leukozyten anbelangt (*Abb. 59-61*).

### 3.3.4 Körpergröße

Anhand der Einteilung der Patienten nach der Körpergröße, kleiner 100 cm (n=10) bzw. größer 100 cm (n=10), konnten keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Studienparameter festgestellt werden.

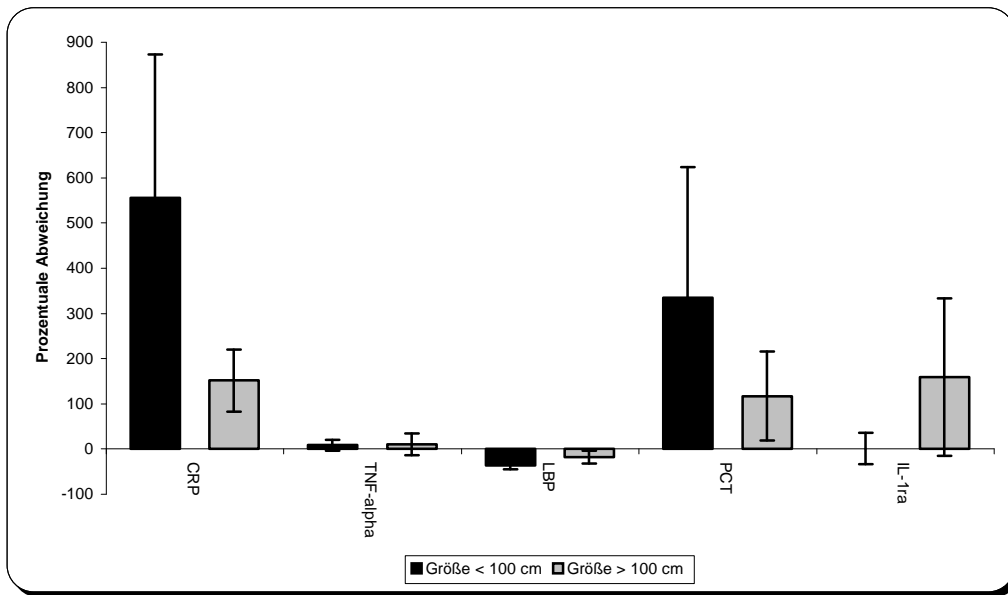
Während die Leukozytenzahl tendenziell bei den größeren Patienten stärker zugenommen hat, stellte sich bei der Subpopulation der Neutrophilen eine größere Zunahme auf Seiten der kleineren Patienten ein. Dies entspricht jedoch nur einer Beobachtung ohne statistischer Signifikanz. Eine deutlichere Reduktion erfuhren auch die Basophilen der Patientengruppe > 100 cm.



**Abbildung 62: Differential-Blutbild (GröÙe)**

Prozentuale Veränderung der Leukozyten und der leukozytären Subpopulationen und des roten Blutbilds sowie der Thrombozyten nach Beendigung der HLM-OP gegenüber dem präoperativen Wert in Abhängigkeit von der Körpergröße (n=20). (\* =  $p < 0,05$  gegenüber dem präoperativen Wert, + =  $p < 0,05$  gegenüber der anderen Patientengruppe)

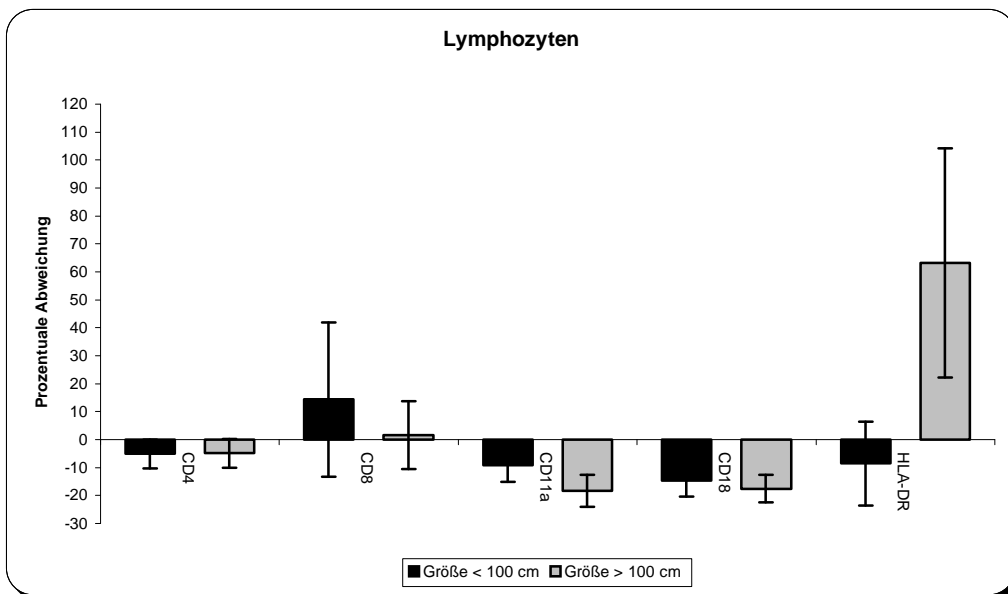
Bei den proinflammatorischen Parametern CRP und PCT kam es in der Gruppe der kleineren Patienten zu einer ausgeprägteren prozentualen Zunahme, jedoch ließ sich auch hier keine statistische Signifikanz nachweisen. Die Synthese von IL-1ra war bei den größeren Kindern stärker erhöht als in der Gruppe < 100 cm. Aufgrund der großen Varianz zeigte sich bei den Zytokinen und Akut-Phase-Proteinen kein statistischer Effekt (Abb. 63).



**Abbildung 63: Pro- und antiinflammatorische Proteine (GröÙe)**

Prozentuale Veränderung der pro- und antiinflammatorischen Proteine nach Beendigung der HLM-OP gegenüber dem präoperativen Wert in Abhängigkeit von der KörpergröÙe (n=20).

(\* = p < 0,05 gegenüber dem präoperativen Wert)

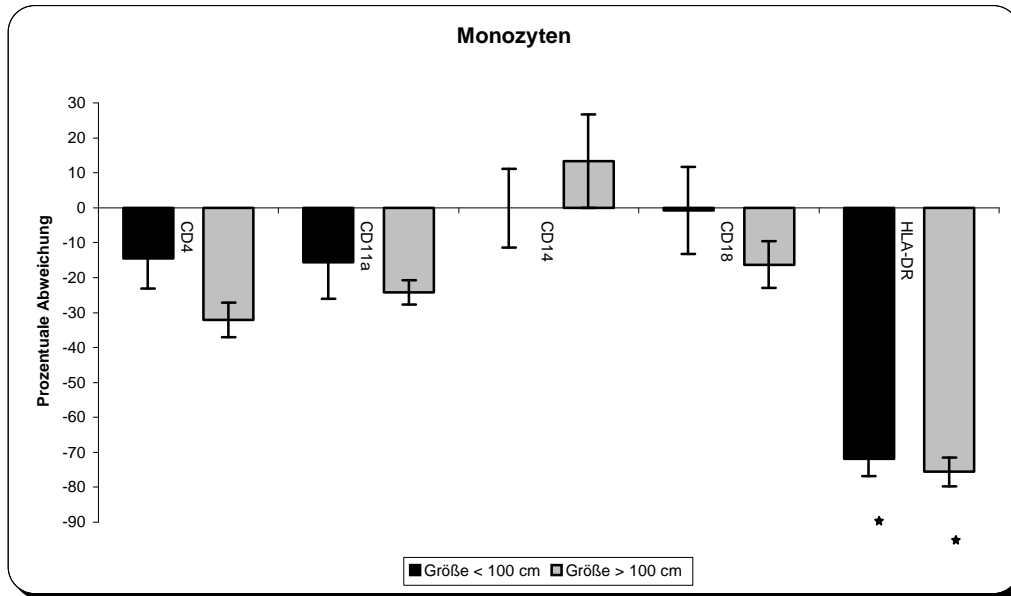


**Abbildung 64: Antigenexpression auf der Lymphozytenoberfläche (GröÙe)**

Prozentuale Veränderung der lymphozytären Oberflächenantigene nach Beendigung der HLM-OP gegenüber dem präoperativen Wert in Abhängigkeit von der KörpergröÙe (n=20). (\* = p < 0,05 gegenüber dem präoperativen Wert)

Signifikanzen ergaben sich auch nicht bei der Betrachtung der Oberflächenantigene auf Lymphozyten, weder innerhalb der Gruppen noch dazwischen. Graphisch auffällig stellte sich die Veränderung des HLA-DR-

Antigens dar. Hierbei kam es im Mittel bei den größeren Kindern zu einer deutlichen Zunahme, während die Gruppe < 100 cm eher eine Abnahme aufwies (Abb. 64).

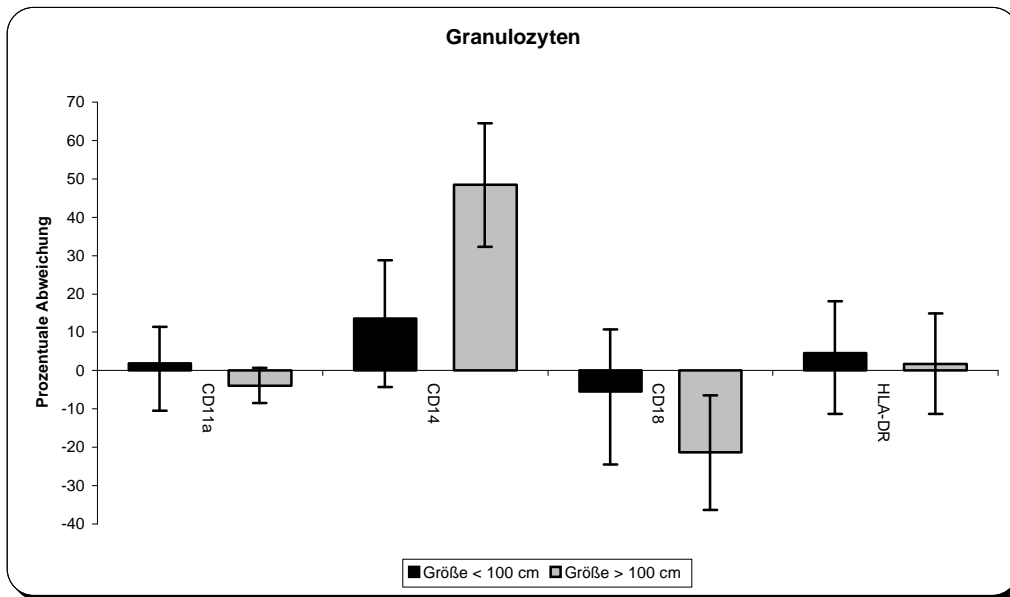


**Abbildung 65: Antigenexpression auf der Monozytenoberfläche (Größe)**

Prozentuale Veränderung der monozytären Oberflächenantigene nach Beendigung der HLM-OP gegenüber dem präoperativen Wert in Abhängigkeit von der Körpergröße (n=20). (\* =  $p < 0,05$  gegenüber dem präoperativen Wert)

Ein sehr einheitliches Bild boten die beiden Gruppen bezüglich der Reduktion der Intensität der HLA-DR-Expression auf Monozyten, die in sich aufgrund des kleinen SEM sehr homogen war und somit innerhalb der Gruppen eine statistisch signifikante Veränderung gegenüber dem präoperativen Wert erreichte wurde.

Die extrakorporale Zirkulation bewirkte auf der Oberfläche der Granulozyten eine Zunahme der Expressionsintensität des Antigens CD14, dies im stärkeren Ausmaße auf Seiten der Gruppe > 100 cm. Umgekehrt verhält es sich mit dem Antigen CD18, welches tendenziell geringer reduziert exprimiert wird bei den kleineren Patienten.



**Abbildung 66: Antigenexpression auf der Granulozytenoberfläche (Größe)**

Prozentuale Veränderung der granulozytären Oberflächenantigene nach Beendigung der HLM-OP gegenüber dem präoperativen Wert in Abhängigkeit von der Körpergröße (n=20). (\* =  $p < 0,05$  gegenüber dem präoperativen Wert)

### 3.3.5 Höchster postoperativer Lactatwert

Ferner wurden die 20 Patienten, die sich einer HLM-OP unterzogen hatten, nach ihrem höchsten postoperativen Lactatwert unterschieden. Es wurden zwei Gruppen gebildet: 1. Patienten mit einem maximalem postoperativen Lactat  $< 3$  mmol/l (n=13) und 2. Patienten, bei denen nach der OP ein Lactatwert von  $> 3$  mmol/l gemessen wurde (n=7).

Bezüglich der Veränderungen in der Subpopulation der Basophilen ergab sich zwischen den beiden Gruppen ein statistisch signifikanter Unterschied. Weiterhin fanden sich postoperativ signifikante Ab- und Zunahmen in beiden Patientengruppen bei der Verteilung der Leukozytensubpopulationen sowie bei den Erythrozyten und den Thrombozyten (Abb. 67).

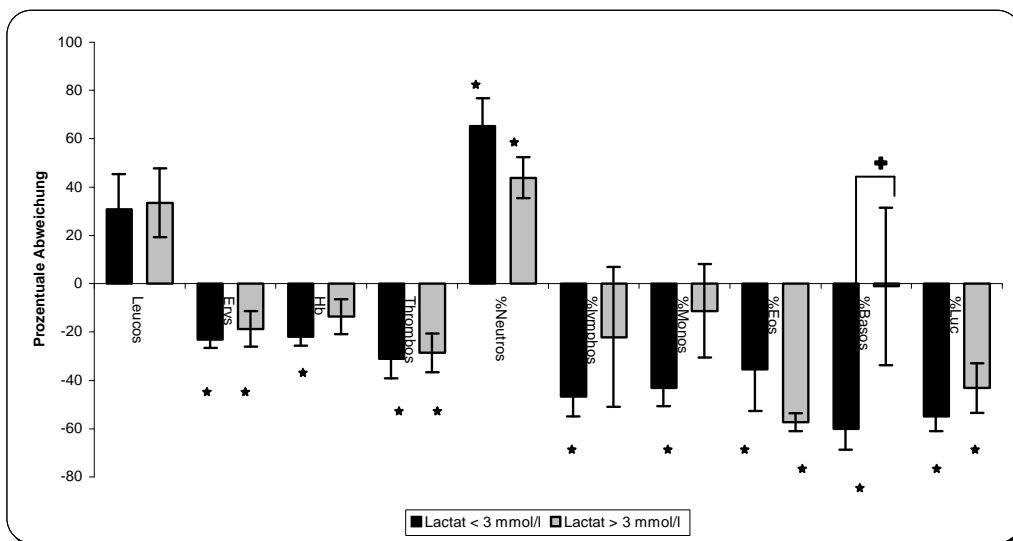
Eine statistische Signifikanz stellte sich bei der Veränderung der PCT-Werte zwischen den Gruppen ein. Während Patienten, die weniger Lactat nach der OP entwickelten, auch nur geringfügige Veränderungen PCT betreffend aufzeigten, hatten jene, die ein Lactat  $> 3$  mmol/l boten, immense PCT-Zunahmen. Auch scheint in der Lactat  $> 3$  mmol/l-Gruppe die Zunahme der

Expression des antiinflammatorisch wirkenden Interleukin-1-Rezeptor-Antagonisten auszubleiben (Abb. 68).

In der Patientengruppe mit den höheren Lactatwerten reduzierte sich die CD4-Antigen-Expression auf der Oberfläche von Lymphozyten statistisch signifikant gegenüber den präoperativen Werten, während es bei der anderen Gruppe kaum zu Veränderungen der Expressionsintensität kam, so daß zwischen den beiden Gruppen ein statistisch signifikanter Unterschied bestand (Abb. 69).

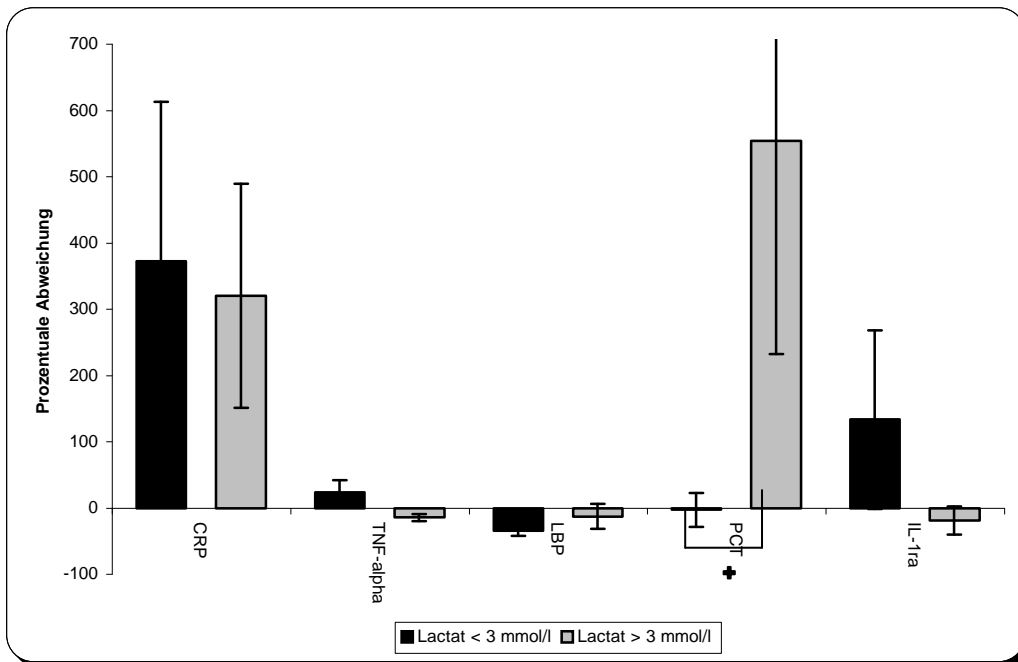
Auch bei den Monozyten fand sich eine statistisch signifikante Abnahme der CD4-Expression für die Patienten mit einem Lactat > 3 mmol/l, hier verhielt sich jedoch die andere Gruppe gleichgerichtet. Ebenso bewirkte die extrakorporale Zirkulation eine deutliche Reduktion der HLA-DR-Antigenexpression auf Monozyten, die in beiden Gruppen das Signifikanzniveau erreichte (Abb. 70).

Die Veränderungen in der Oberflächen-Antigen-Expression der Granulozyten waren nur bezüglich CD 14 gleichgerichtet, ansonsten waren sie zwischen den beiden Patientengruppen gegenläufig, jedoch statistisch nicht signifikant (Abb. 71).



**Abbildung 67: Differential-Blutbild (Lactat)**

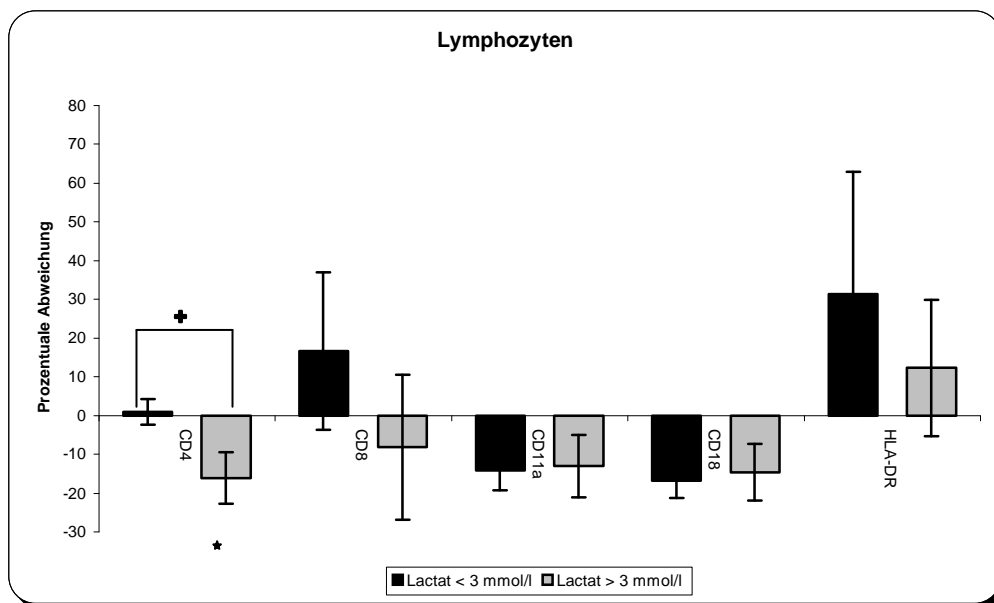
Prozentuale Veränderung der Leukozyten und der leukozytären Subpopulationen und des roten Blutbilds sowie der Thrombozyten nach Beendigung der HLM-OP gegenüber dem präoperativen Wert in Abhängigkeit vom höchsten postoperativen Lactatwert (n=20). (\* =  $p < 0,05$  gegenüber dem präoperativen Wert, + =  $p < 0,05$  gegenüber der anderen Patientengruppe)



**Abbildung 68: Pro- und antiinflammatorische Proteine (Lactat)**

Prozentuale Veränderung der pro- und antiinflammatorischen Proteine nach Beendigung der HLM-OP gegenüber dem präoperativen Wert in Abhängigkeit vom höchsten postoperativen Lactatwert (n=20).

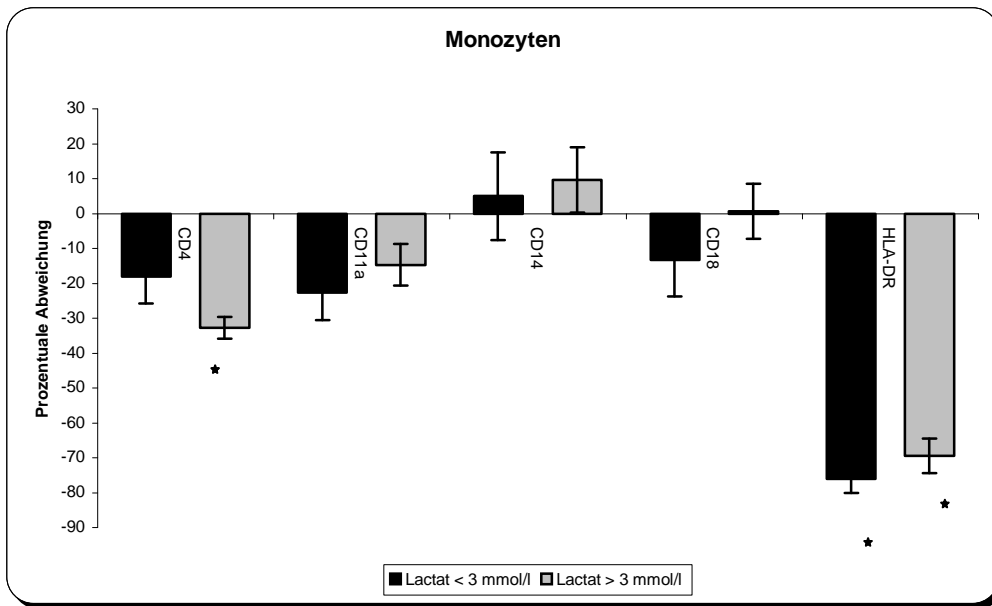
(\* =  $p < 0,05$  gegenüber dem präoperativen Wert, + =  $p < 0,05$  gegenüber der anderen Patientengruppe)



**Abbildung 69: Antigenexpression auf der Lymphozytenoberfläche (Lactat)**

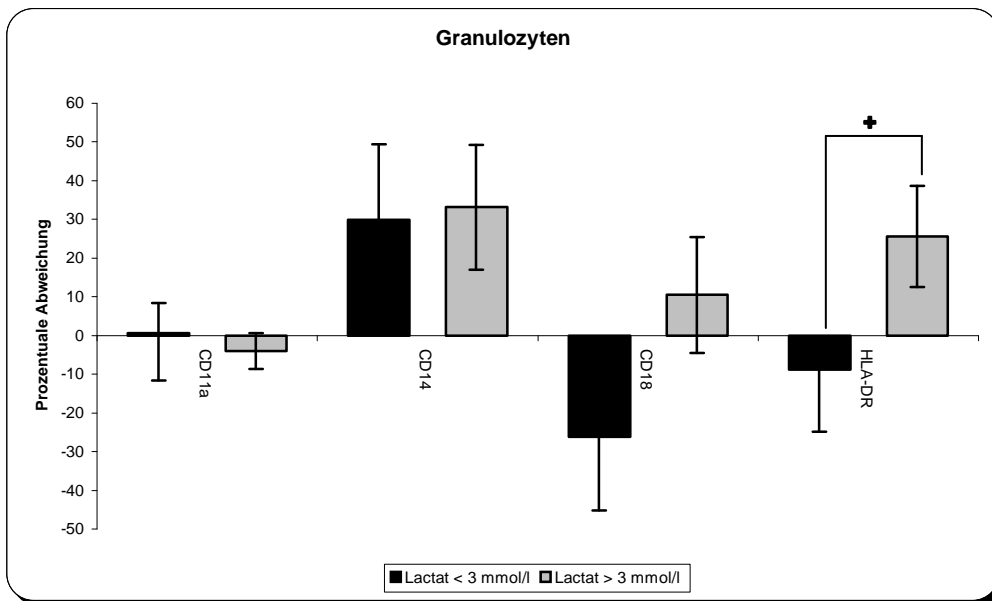
Prozentuale Veränderung der lymphozytären Oberflächenantigene nach Beendigung der HLM-OP gegenüber dem präoperativen Wert in Abhängigkeit vom höchsten postoperativen Lactatwert (n=20). (\* =  $p < 0,05$  gegenüber dem präoperativen Wert, + =  $p < 0,05$  gegenüber der anderen Patientengruppe)





**Abbildung 70: Antigenexpression auf der Monozytenoberfläche (Lactat)**

Prozentuale Veränderung der monozytären Oberflächenantigene nach Beendigung der HLM-OP gegenüber dem präoperativen Wert in Abhängigkeit vom größten postoperativen Lactatwert (n=20). (\* = p < 0,05 gegenüber dem präoperativen Wert)



**Abbildung 71: Antigenexpression auf der Granulozytenoberfläche (Lactat)**

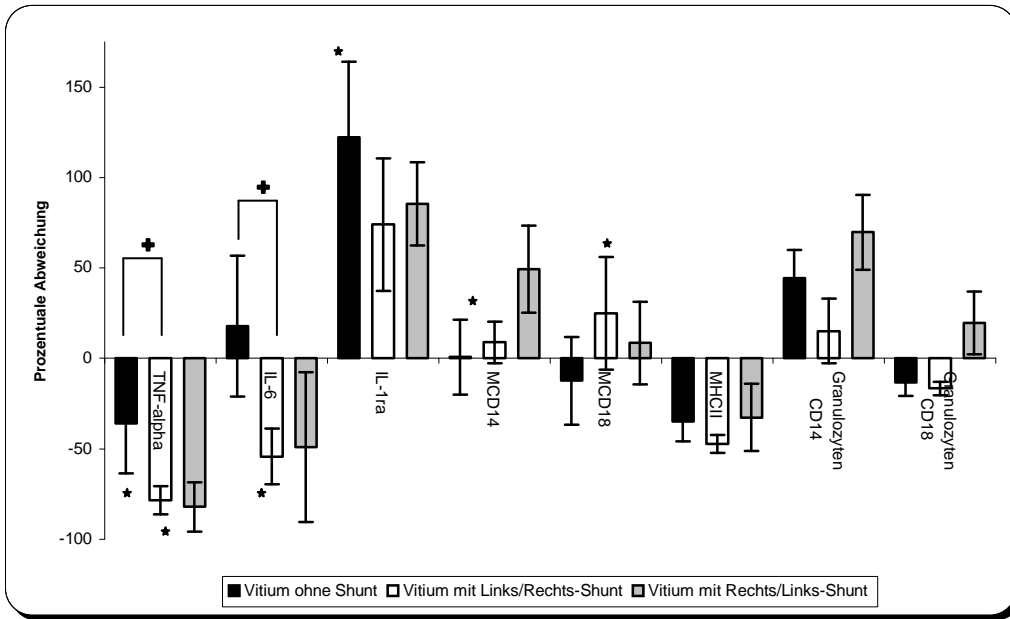
Prozentuale Veränderung der granulozytären Oberflächenantigene nach Beendigung der HLM-OP gegenüber dem präoperativen Wert in Abhängigkeit vom höchsten postoperativen Lactatwert (n=20). (\* = p < 0,05 gegenüber dem präoperativen Wert, + = p < 0,05 gegenüber der anderen Patientengruppe)

### 3.3.6 Einfluß auf die Endotoxinstimulation

In der nachfolgenden Analyse soll dargestellt werden, inwiefern die bereits in den vorangegangenen Abschnitten behandelten Merkmale wie Körpergröße, HLM-Dauer, tiefste Körpertemperatur während der HLM, höchster postoperativer Lactatwert und die Art des Vitium einen Einfluß auf die Reaktion durch den Stimulus Endotoxin bewirken. Die Auswertung erfolgte wie unter 3.3 beschrieben. Die Darstellung schließt alle Laborparameter ein, die in dieser Arbeit untersucht wurden und bei der Zellantwort auf Lipopolysaccharid beteiligt sind.

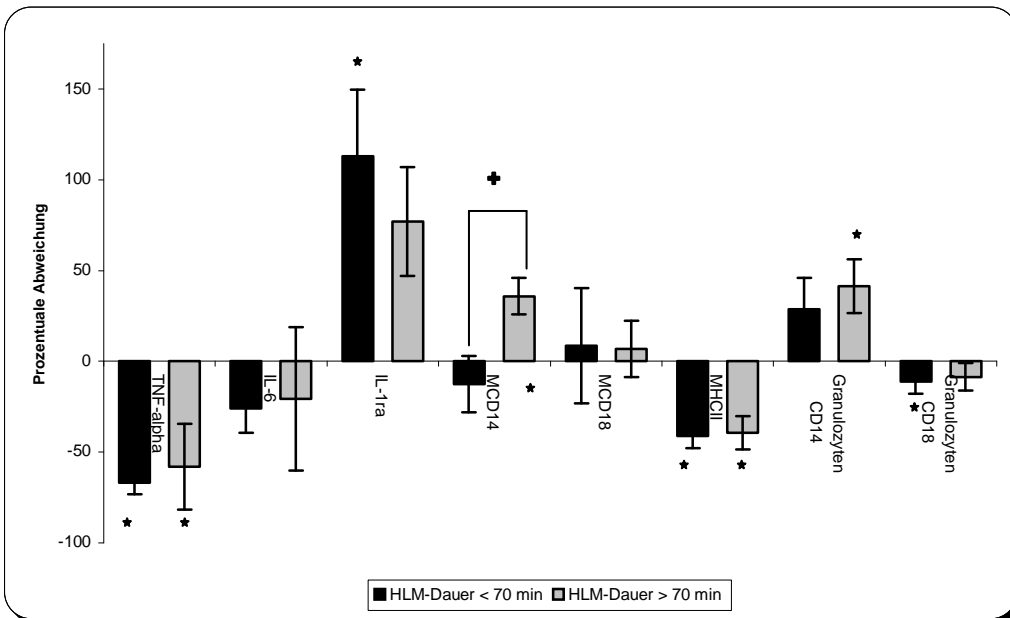
#### **Vitium**

Die Blutproben der Patienten mit einem Links/Rechts-Shunt, sowie solche mit einem Rechts/Links-Shunt wiesen nach Stimulation mit LPS eine starke Abnahme der Synthese von Interleukin-6 auf, während es bei Blutproben von Patienten ohne Shunt zu einer Zunahme gegenüber den präoperativen Werten kam. Das Signifikanzniveau wurde, wiederum wegen der kleinen Fallzahl der Patienten mit Rechts/Links-Shunt, nur zwischen der Gruppe ohne Shunt und der mit Links/Rechts-Shunt erreicht. Eine signifikante Differenz ergab sich für TNF- $\alpha$  zwischen den Patientengruppen ohne Shunt und jener mit Links/Rechts-Shunt. Die Reduktion des Stimulationsergebnisses nach der extrakorporalen Zirkulation war bei den Patienten ohne Shunt im Vergleich zu den anderen Kollektiven weniger ausgeprägt (*Abb. 72*).



**Abbildung 72: Darstellung der Reaktion auf Endotoxin (Vitium)**  
 Prozentuale Veränderung verschiedener Laborparameter nach Beendigung der HLM-OP gegenüber dem präoperativen Wert in Abhängigkeit von der Shuntrichtung des Vitiums (n=20). (\* = p < 0,05 gegenüber dem präoperativen Wert, + = p < 0,05 gegenüber der anderen Patientengruppe)

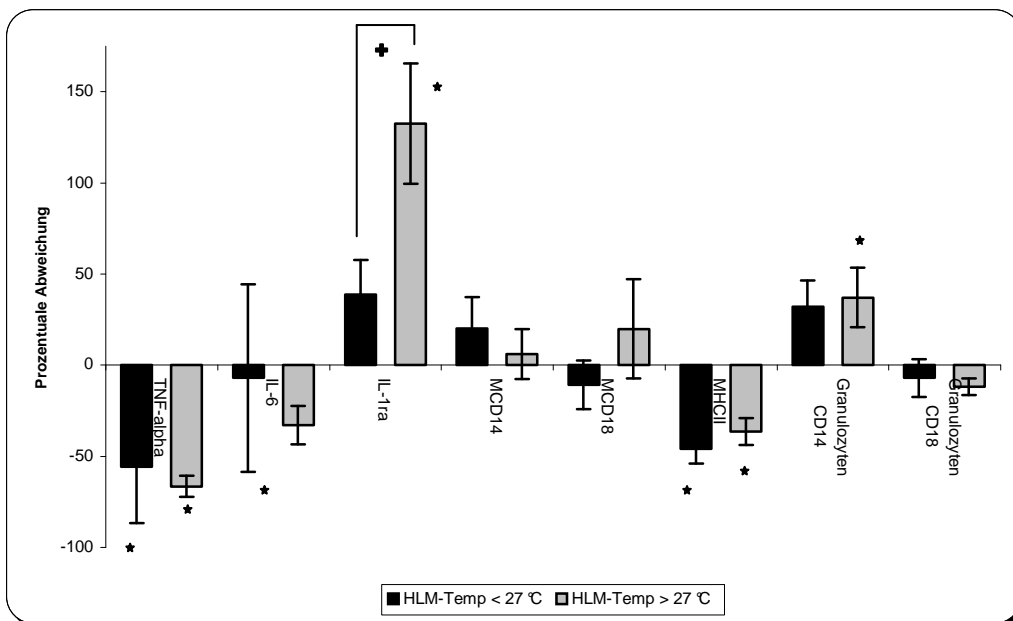
**HLM-Dauer**



**Abbildung 73: Darstellung der Reaktion auf Endotoxin (HLM-Dauer)**  
 Prozentuale Veränderung verschiedener Laborparameter nach Beendigung der HLM-OP gegenüber dem präoperativen Wert in Abhängigkeit von der HLM-Dauer (n=18). (\* = p < 0,05 gegenüber dem präoperativen Wert, + = p < 0,05 gegenüber der anderen Patientengruppe)

Bei Patienten mit kürzerer Anschlußdauer an die extrakorporale Zirkulation führte die Inkubation mit LPS zu einer reduzierten Expressionsintensität des CD14-Antigens auf der Oberfläche von Monozyten gegenüber den präoperativen Messungen. Hingegen stellte sich bei der Gruppe mit der längeren HLM-Dauer eine signifikante Zunahme ein, wodurch sich ein ebenfalls signifikanter Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen bezüglich des Oberflächenantigens CD14 ergab. Tendenziell scheinen die Blutproben, aus dem Kollektiv der kürzer an die HLM angeschlossenen Patienten, in der Lage zu sein, auf einen Endotoxinstimulus hin, stärker Interleukin-1-ra zu exprimieren als jene aus der Gruppe mit längerer Anschlußzeit. Bei den unter Laborbedingungen behandelten Blutproben der letzteren Patienten kam es im Vergleich der stimulierten Proben vor und unmittelbar nach der Operation zu einer signifikanten Zunahme der Expressionsintensität für CD14 bei Granulozyten, welche bei den unstimulierten Proben unterhalb des Signifikanzniveaus blieb. Auch die Abnahme der CD18-Intensität war im Vergleich der stimulierten Proben für die Gruppe < 70 min signifikant.

### Tiefste Körpertemperatur



**Abbildung 74: Darstellung der Reaktion auf Endotoxin (HLM-Temperatur)**

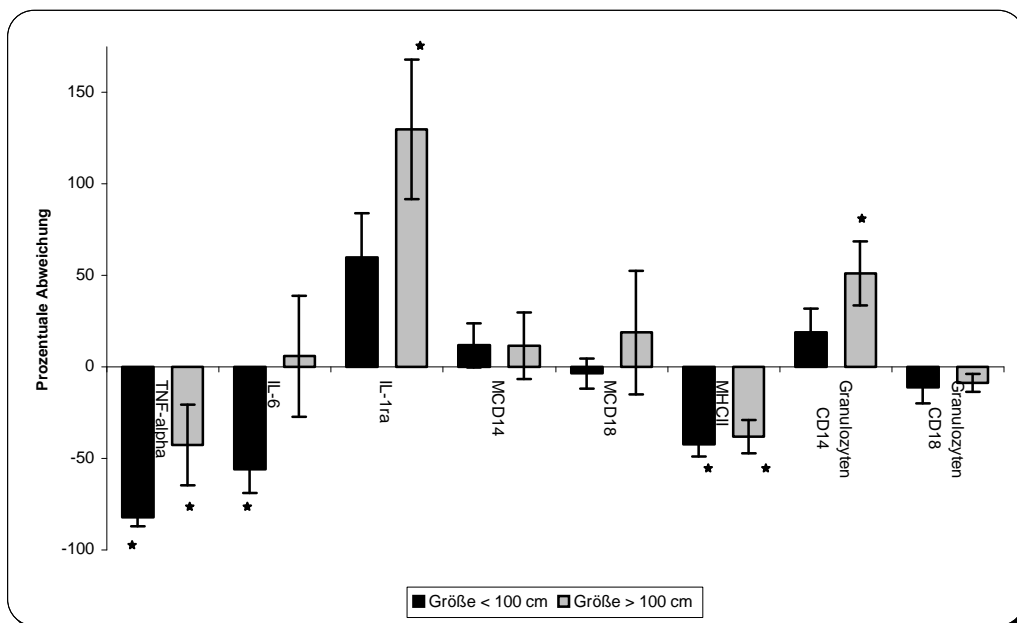
Prozentuale Veränderung verschiedener Laborparameter nach Beendigung der HLM-OP gegenüber dem präoperativen Wert in Abhängigkeit von der tiefsten Körpertemperatur während der extrakorporalen Zirkulation (n=18). (\* = p < 0,05 gegenüber dem präoperativen Wert, + = p < 0,05 gegenüber der anderen Patientengruppe)

Die Blutproben der Patienten, welche während der HLM-OP eine Körpertemperatur von 27°C unterschritten haben, reagierten abgeschwächt auf den Endotoxinstimulus bezüglich der Synthese von Interleukin-1ra im Vergleich zu der Gruppe > 27°C. Dies läßt sich mit der Beobachtung aus Abbildung 73 in Einklang bringen. Patienten die länger an die HLM angeschlossen waren, wurden gleichzeitig auf tiefere Temperaturen herunter gekühlt, um den Eingriff besser zu tolerieren.

### Körpergröße

Abbildung 75 zeigt auf, daß sich für die Patientengruppen, die nach der Körpergröße gebildet wurden, keine Signifikanz zwischen den Gruppen einstellte.

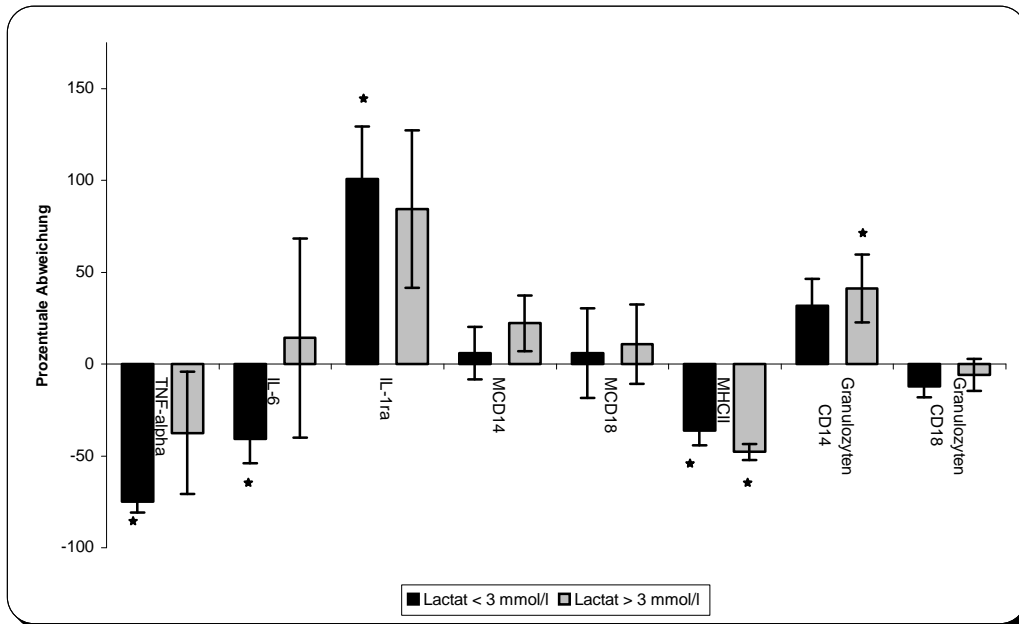
Bei kleineren Patienten führte der Endotoxinstimulus nach extrakorporaler Zirkulation zu einer deutlich reduzierten Reaktion, so daß sich die Synthese der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und Interleukin-6 deutlich verminderte. Die Expressionszunahme von Interleukin-1ra in der Gruppe < 100 cm Körpergröße war geringer als bei den größeren Patienten.



**Abbildung 75: Darstellung der Reaktion auf Endotoxin (Größe)**

Prozentuale Veränderung verschiedener Laborparameter nach Beendigung der HLM-OP gegenüber dem präoperativen Wert in Abhängigkeit von der Körpergröße (n=20). (\* = p < 0,05 gegenüber dem präoperativen Wert, + = p < 0,05 gegenüber der anderen Patientengruppe)

## Höchster Lactatwert



**Abbildung 76: Darstellung der Reaktion auf Endotoxin (Lactat)**

Prozentuale Veränderung verschiedener Laborparameter nach Beendigung der HLM-OP gegenüber dem präoperativen Wert in Abhängigkeit vom höchsten postoperativen Lactatwert ( $n=20$ ). (\* =  $p < 0,05$  gegenüber dem präoperativen Wert, + =  $p < 0,05$  gegenüber der anderen Patientengruppe)

Für die Unterscheidung im Merkmal höchster postoperativer Lactatwert ergaben sich keine Signifikanzen zwischen den Gruppen. Auch graphisch zeigten sich keine auffälligen, richtungsweisenden Tendenzen.

## 4 Diskussion

### 4.1 Stickstoffmonoxid-Inhalation und Immunkompetenz

Es wurden 20 Blutproben von Kindern mit angeborenen Herzfehlern, welche einer elektiven Herzkatheter-Untersuchung unterzogen wurden mit zwei verschiedenen NO-Konzentrationen (0 und 100 ppm) für 45 Minuten inkubiert und anschließend mit 0 bzw. 1 µg/ml LPS stimuliert. Die Inkubation mit 100 ppm NO ergab weder einen relevanten Einfluss auf die Oberflächentigene (CD 4, CD 8, CD 11a, CD14, CD 18, HLA-DR) der Leukozyten, noch zeigte sie eine veränderte Zytokinexpression nach Endotoxinstimulation gegenüber den mit 0 ppm NO inkubierten Proben. Einschränkend ist zu erwähnen, dass die Inkubationsdauer wesentlich kürzer war als bei klinischer Anwendung üblich, welche z.B. in der Abteilung für Kinderkardiologie der Universität Tübingen, bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie 4,3 +/- 0,4 Tage beträgt (Breuer, 1998). KUBES wies jedoch bereits bei einer Inkubationsdauer von 30 min Veränderungen der Leukozyten nach (Kubes et al., 1991). Andererseits wurde die Dosis wesentlich höher gewählt, da in-vitro Untersuchungen signifikante Alterationen der Leukozytenantigene CD 4, CD 11a, CD 11b und CD 18 erst ab einer NO-Konzentration von 100 ppm nachweisen konnten (Knies, 1999).

Die von KNIES beschriebenen signifikanten Veränderungen konnten nicht bestätigt werden, jedoch sind die Resultate konform mit den Ergebnissen von OPDAHL. Nach Inhalation von 40 ppm NO für 35 min und ex-vivo-Stimulation der Blutproben mit LPS, stellten sich keine NO-bedingten Abweichungen in der Expression der Adhäsionsmoleküle CD 11a, CD 11b und CD11c der neutrophilen Granulozyten und Monozyten ein. Auch die CD14- und HLA-DR-Expression blieb unverändert. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit wurde von OPDAHL eine gesteigerte TNF-alpha-Produktion nach NO-Inhalation beschrieben (Opdahl, 2000).

Anhand dieser Ergebnisse finden sich keine Hinweise auf eine wesentliche Beeinträchtigung der Immunkompetenz der Leukozyten durch NO, da es weder zu einer reduzierten Expression Antigen-präsentierender Oberflächenrezeptoren, noch zu einer Veränderung der Zytokinsynthese gekommen ist. Ebenso ist festzustellen, dass die Migrationsfähigkeit der Leukozyten, aufgrund der gleichgebliebenen alpha- (CD 11a) und beta (CD 18)-Untereinheiten des Integrinkomplexes, funktionell nicht beeinträchtigt zu sein scheint. Eine Limitierung der Untersuchung ergibt sich auch aus der Tatsache, dass die Versuche mit einem in-vitro-Modell durchgeführt wurden, welches die komplexe Interaktion im Organismus nicht vollständig abbilden kann.

## **4.2 Herz-Lungen-Maschinen-OP, systemische Entzündungsreaktion und Immunkompetenz**

### **4.2.1 Allgemeine Aspekte**

Zahlreiche Untersuchungen befassen sich mit den inflammatorischen Vorgängen nach herzchirurgischen Eingriffen und versuchen mitunter zwischen den Auswirkungen des chirurgischen Traumas und der extrakorporalen Zirkulation zu unterscheiden. Anhand eines Tiermodells untersuchte BRIX-CHRISTENSEN, die Zytokinexpression, CRP- und Zytokin-Plasmaspiegel, Leukozyten-Chemotaxis und CD18-Expression bei kleinen Schweinen die entweder an die HLM angeschlossen wurden ohne gleichzeitige Herzchirurgie oder nur einer Sternotomie zugeführt wurden. Es stellte sich heraus, dass alleine durch den Anschluss an die HLM, die Zytokinspiegel für IL 8 und IL-10 erhöht waren, sowie eine reduzierte Leukozyten-Chemotaxis vorlag (Brix-Christensen et al., 2001).

DEHOUX beschreibt eine frühe und transiente, reduzierte ex-vivo Zytokinproduktion auf einen LPS-Stimulus hin, nach Operationen unter Einsatz



der HLM, welche in einem extrakorporalen Kreislaufmodell imitiert werden konnte (Dehoux et al., 2000)

Andere Veröffentlichungen widersprechen diesen Ergebnissen und sehen das chirurgische Trauma und den Reperfusionsschaden, und weniger die HLM, als dominierende Faktoren der immunologischen Antwort und der akuten Phase-Reaktionen an (Franke et al., 2005). TARNOK konnte keine Unterschiede in den Serumkonzentrationen der Zytokine IL-6 und IL-8 bei pädiatrischen Patienten herausarbeiten, welche mit oder ohne Verwendung der HLM am Herzen operiert wurden (Tarnok et al., 1999).

Ein exaktes Verständnis der pro- und anti-inflammatorischen Vorgänge, assoziiert mit der Korrektur angeborener Herzfehler, ist die Grundvoraussetzung für die Entwicklung effektiver therapeutischer Maßnahmen bei schweren Fällen von SIRS mit MODS oder Sepsis.

#### **4.2.2 Leukozytensubpopulationen**

Als Ausdruck einer unspezifischen Aktivierung des Immunsystems durch den herzchirurgischen Eingriff, waren unmittelbar postoperativ Leukozytenzahl und CRP signifikant erhöht. Deutliche Veränderungen in der Verteilung der Leukozytensubpopulationen stellten sich postoperativ ein, mit ausgeprägter Zunahme der Neutrophilen bis zum 1.postoperativen Tag und gleichzeitiger Abnahme der übrigen Subpopulationen, v.a. der Monozyten. In der Literatur sind ähnliche Leukozytenverteilungen beschrieben (Tarnok et al., 1997)

Ursächlich für diese Veränderungen dürfte das Abwandern aktivierter Lymphozyten und Monozyten ins lymphatische oder subendotheliale Gewebe sein, sowie das Anhaften an künstlichen Oberflächen in der HLM bzw. dem Membranoxygenator, mit konsekutivem Verlust im peripheren Blut. Auch tragen erhöhte Plasmazytokinspiegel, wie z.B. von IL-8, welches die Chemotaxis steigert, zur Sequestration der Leukozyten bei (Brancaccio et al., 2005).

Als Hinweis auf eine transiente Immunsuppression ist der am 1. postoperativen Tag reduzierte CD4/CD8-Quotient zu werten, welcher am 3. postoperativen Wert nahezu den Ausgangswert wiedererlangte. Hierzu finden sich in der Literatur konforme Ergebnisse mit ebenfalls minimaler CD4/CD8-Ratio 24h postoperativ (Habermehl et al., 2003, Tarnok et al., 1997). Darüber hinaus stellte die Arbeitsgruppe um BOCSI eine Dysbalance der T-Helferzellen (TH1/TH2) nach Verwendung der HLM fest, mit Überwiegen der TH2-Subpopulation und erhöhten anti-inflammatorischen IL-10-Plasmaspiegeln, als typisches Sekretionsprodukt der TH2-Lymphozyten. Dagegen fand sich in der FACS-Analyse eine reduzierte IFN-gamma-Expression in den TH1-Lymphozyten. Bei den Patienten, deren Herzfehler ohne Einsatz der HLM korrigiert werden konnte, traten diese Veränderungen der TH1/TH2-Subpopulationen nicht auf, so dass von einem, für die extrakorporale Zirkulation, typischem Effekt ausgegangen werden kann (Bocsi et al., 2006). Erniedrigte IFN-gamma- und erhöhte IL-10-Spiegel führen zu einer Abnahme der HLA-DR-Expression und einem Überwiegen der Antiinflammation mit konsekutiv geschwächter Immunkompetenz. Damit einhergehend ist eine erhöhte Gefahr für das Auftreten opportunistischer Infektionen und ein höheres Risiko für postoperative Komplikationen (Gessler et al., 2005).

#### **4.2.3 Antigenexpression**

Grundsätzlich waren alle untersuchten Leukozytenoberflächenantigene des Patientenkollektivs, nach herzchirurgischem Eingriff unter Einsatz der HLM, verändert.

Während die Fluoreszenzintensität für CD11a/CD18 der Lymphozyten unmittelbar postoperativ reduziert war, kam es am 1. postoperativen Tag zu einer vorübergehenden Intensitätszunahme über das präoperative Niveau hinaus. Bereits am 2. postoperativen Tag entsprachen die Intensitäten wieder den unmittelbar postoperativen Werten. Die HLA-DR-Expression der

Lymphozyten nahm bis zum 2. postoperativen Tag kontinuierlich ab und erholte sich bis zum 3. postoperativen Tag nur geringfügig.

Der Verlauf der perioperativen Fluoreszenzintensitätskurve des Oberflächenantigens CD11a für Monozyten entsprach weitestgehend, der des Antigens CD18, jedoch verringerte sich die Fluoreszenz für CD 11a deutlicher, mit einem Minimum, ebenso wie bei den Lymphozyten, unmittelbar postoperativ. Gegenläufig verhielten sich die Kurven der CD 14- und HLA-DR-Expression auf Monozyten. So lag das Maximum der HLA-DR-Expression präoperativ vor, gerade zum Zeitpunkt der geringsten CD 14-Intensität. Diese wiederum war am 1. postoperativen Tag am höchsten, während die HLA-DR-Expression maximal supprimiert war. Generell sind wenig Daten zur HLA-DR-Expression nach herzchirurgischen Eingriffen unter Einsatz der HLM bei Kindern verfügbar. Ähnlich den vorliegenden Daten berichte ALLEN über eine minimale postoperative HLA-DR-Expression 24-72 Stunden nach Beendigung der extrakorporalen Zirkulation, wobei die Patienten welche länger als fünf Tage intensivmedizinische Behandlung benötigten, eine signifikant niedrigere HLA-DR-Expression aufwiesen. Eine erniedrigte HLA-DR-Expression (< 60% HLA-DR+ Monozyten) wurde als unabhängiger Prädiktor für die Entwicklung einer SIRS bzw. einer Sepsis beschrieben, wobei interessanterweise präoperativ kein Unterschied in der Anzahl der HLA-DR+ Monozyten bestand zwischen den Patienten mit langem und kurzem Aufenthalt auf der Intensivstation, jedoch bereits die Patienten mit unkompliziertem postoperativen Verlauf eine signifikant höhere Fluoreszenzintensität für HLA-DR aufwiesen (Allen et al., 2002). Bei zwei von den vier Patienten dieser Arbeit, welche ein zweites Antibiotikum benötigten, konnte man bereits präoperativ, eine im Vergleich zu den anderen Patienten geringere HLA-DR-Fluoreszenzintensität messen. Einschränkend ist hinzuzufügen, daß es sich hierbei um eine Beobachtung handelt ohne statistische Signifikanz.

Dabei könnte die HLA-DR-Expression eine Folge lokaler Zytokinkonzentrationen, und indirekt ein Marker für das Vorherrschen pro- (IFN-gamma und TNF-alpha erhöhen die HLA-DR-Expression) bzw. anti-inflammatorischer Zytokine (IL-10) sein (Zhou et al., 1997; Koppelman et al.,

1997). IL-10 inhibiert den letzten Schritt der Exozytose von HLA-DR und des Recyclings bestehender Oberflächen HLA-DR. Kongruente Kurvenverläufe der CD11a/CD18- Expression fanden sich auch für Granulozyten mit der jeweils geringsten Fluoreszenzintensität am 1. post-operativen Tag. Zur reduzierten CD11a/CD18 Fluoreszenzintensität unmittelbar postoperativ, tragen u.a. Faktoren, wie das Anheften der aktivierten Zellen an die Oberflächen des extrakorporalen Kreislaufes, sowie die Transmigration ins Gewebe bei. Auch hierzu finden sich in der Literatur widersprüchliche Aussagen von gleichbleibender bis gesteigerter Expression nach HLM (Brix-Christensen, 2001a; Gessler et al., 2002). Erklärungen hierfür liegen in den unterschiedlichen Zeitpunkten der Probengewinnung, der angewandten Technik der Durchflusszytometrie und der zur Auswertung herangezogenen Parameter, die je nach Untersuchung zwischen mittlerer Fluoreszenzintensität, Median der Fluoreszenzintensität und Prozentsatz der Zellen, welche ein spezielles Oberflächenantigen exprimieren, variieren, so dass keine absolute Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Studien gegeben ist.

#### **4.2.4 Pro- und antiinflammatorische Marker**

Neben den bereits in Abschnitt 4.2.2 erwähnten Zeichen einer unspezifischen Aktivierung des Immunsystems, war es Ziel dieser Arbeit, genauere Information über das Sekretionsmuster pro- und anti-inflammatorischer Zytokine, nach Korrektur angeborener Herzfehler unter Einsatz der HLM, zu gewinnen. Ferner wurde die perioperative Kinetik neuerer inflammatorischer Marker wie Procalcitonin (PCT) und Lipopolysaccharid-bindendes-Protein (LBP) mit herkömmlichen Parametern verglichen, vor dem Hintergrund einer genaueren Differenzierung einer HLM-bedingten SIRS von einer Sepsis..

Die durchflusszytometrische Analyse der Endotoxin-stimulierten Monozyten, hinsichtlich ihrer Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist-Synthese, ergab ein unmittelbar postoperatives Maximum für das Kollektiv. Bereits einen Tag später war der Anteil IL-1ra positiver Monozyten niedriger als präoperativ, erreichte

damit sein Minimum und stieg zum Ende der Untersuchung hin wieder deutlich an. Untermauern lassen sich diese Ergebnisse mit neueren Untersuchungen, die von einem Vorherrschen der Antiinflammation postoperativ ausgehen (Bocsi et al., 2006). Auch die hier bereits erwähnte postoperativ beeinträchtigte HLA-DR-Expression lässt sich mit dieser Hypothese in Einklang bringen.

Das Zytokin Interleukin-6 (IL-6) ist bei Gesunden im Blut nicht nachweisbar. Kommt es zu einer systemischen Inflammation steigt seine Konzentration im Blut sehr schnell an, so dass es z.B. bei herzchirurgischen Eingriffen bereits kurz nach Beendigung, seine höchste Konzentration erreicht (Antonelli et al., 1999; Dehoux et al., 2000). Das bestätigte sich auch in dieser Untersuchung, deren Patientenkollektiv in den unmittelbar postoperativen Blutentnahmen die maximalen Werte des Beobachtungszeitraumes für IL-6 aufwies. Möglicherweise trägt das Myokard, das häufiger in der Literatur als Ursprung proinflammatorischer Zytokine angeführt wird, zum sehr schnellen Anstieg bei (Wan et al., 1997).

Ebenfalls untersucht wurde das proinflammatorische Zytokin TNF-alpha, welches jedoch nur in den Endotoxin-stimulierten Patientenproben bestimmt wurde, da es als klinischer Routineparameter aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit nicht geeignet ist, und sich in der Literatur sehr inkonsistente Ergebnisse zu TNF-alpha nach Herzchirurgie finden (Brix-Christensen, 2001a; Dehoux, 2000). Es wird daher im Abschnitt 4.2.5 abgehandelt.

Beide Zytokine zusammen, IL-6 wie TNF-alpha, triggern die Synthese und Freisetzung von CRP aus Hepatozyten, wodurch sich auch die hier beschriebene, im Vergleich zu IL-6, deutlich verzögerte Kinetik erklärt.

Bei der Betrachtung der Akut-Phase-Proteine CRP, LBP und PCT fiel zunächst eine sehr ähnliche Kinetik der Mittelwerte der Kohorte mit Erreichen des jeweiligen Maximums am 2. postoperativen Tag auf. Während CRP und PCT sofort postoperativ ansteigen, war LBP zunächst leicht fallend. Hierfür könnte die Tatsache ursächlich sein, dass LBP ein Co-Faktor für die Bindung von LPS

an monozytäre CD 14-Rezeptoren ist (Fenton und Golenbock, 1998). Einen identischen Verlauf für LBP nach herzchirurgischen Eingriffen an Kindern stellte die Arbeitsgruppe um LEQUIER fest mit Nachweis einer Endotoxämie bei 96% der Studienpatienten und Anstieg des LBP über den Referenzwert (Lequier et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit war LBP bei allen 20 Patienten weit über die Norm erhöht. Ursächlich für die Endotoxämie und konsekutiv erhöhte LBP-Plasmaspiegel könnten sein u.a. das Vorhandensein von Endotoxin im extrakorporalen Kreislauf, sowie die Translokation von Endotoxin aus dem Darmlumen während der extrakorporalen Zirkulation aufgrund einer Darmminderperfusion (Riddington et al., 1996; Wan et al., 1997). Die Bestimmung von LBP lässt somit keine relevanten klinischen Vorteile gegenüber CRP erkennen, bei Patienten nach operativer Korrektur ihres angeborenen Herzfehlers.

Auffallend war ferner ein schnelleres Absinken von PCT zum 3. postoperativen Tag hin, gegenüber CRP und LBP. 13 der Patienten erreichten im Beobachtungszeitraum PCT-Werte über der Norm, davon hatten vier Patienten deutlich erhöhte Werte  $> 10$  ng/ml. Wiederum drei der vier Patienten erhielten wegen des V.a. eine bakterielle Infektion ein zweites Antibiotikum. Interessanterweise wies bei jenen Patienten PCT bereits 24 Stunden vor Intensivierung der Antibiose, im Verlauf einen deutlichen Anstieg auf, der sich bei CRP und LBP erst 24 h später einstellte. PCT könnte sich daher als wertvoller Marker für die Differenzierung einer SIRS von einer Sepsis erweisen, weil es im Gegensatz zu CRP und LBP postoperativ scheinbar nur dann deutlich ansteigt, wenn eine bakterielle Infektion vorliegt. Daraus ließen sich wichtige therapeutische Vorteile ableiten, da frühzeitiger eine beginnende Sepsis erkannt würde.

Da sich aber auch bei Patienten nach operativer Korrektur eines angeborenen Herzfehlers, PCT-Werte ergeben, die sonst mit bakteriellen Infektionen verbunden werden, ohne dass aufgrund klinischer und sonstiger laborchemischer Parameter davon ausgegangen werden kann, dass eine solche vorliegt (Michalik et al. 2006), ist der bisherige Referenzbereich nicht geeignet zur Unterscheidung einer SIRS von einer Sepsis. Die Schwierigkeit

liegt nun darin abzugrenzen, bis zu welchem PCT-Level eine Erhöhung als HLM-assoziiert zu werten ist und ab welchen Werten von einer Sepsis ausgegangen werden muss. Dies belegt auch eine Studie von MICHALIK, in der zu ähnlichen Zeitpunkten wie in dieser Arbeit, Procalcitonin bei Kindern bestimmt wurde. Dabei wurde bei 52% der Patienten  $PCT > 2,0$  ng/ml bestimmt, also in einem Bereich, der bei vielen Untersuchungen mit bakteriellen Infektionen verknüpft wird. Bei diesen Patienten bestanden jedoch weder klinische, noch sonstige laborchemische Hinweise auf eine Infektion (Michalik et al., 2006).

#### **4.2.5 Immunkompetenz**

Durch Stimulation der Vollblutproben mit Endotoxin, war bei allen untersuchten Parametern ein signifikanter Unterschied zwischen stimulierten und unstimulierten Werten über den gesamten Beobachtungszeitraum feststellbar.

Der Endotoxinstimulation liegt ein angeborener Mechanismus der Immunantwort auf LPS zu Grunde. LPS bildet einen Komplex mit zirkulierendem LBP und bindet dann an den CD14-Rezeptor wodurch eine Aktivierung inflammatorischer Zellen eingeleitet wird (Wright et al., 1991).

Damit erklärt sich auch die Tatsache, dass das Oberflächenantigen CD 14, welches als Rezeptor für Endotoxine fungiert, nach Endotoxinstimulation in seiner Expression auf Monozyten reduziert war. Hingegen löste die Stimulation eine Erhöhung der HLA-DR-Expression auf Monozyten aus. Für beide Antigene war der Effekt der Stimulation am 1. postoperativen Tag am geringsten, während die Zunahme der Expression des Antigens CD 18 nach Stimulation über den Beobachtungszeitraum sich nicht erschöpfte.

Kam es bei Monozyten durch den Lipopolysaccharid-Stimulus zu einer reduzierten Fluoreszenzintensität für CD14, führte jener bei Granulozyten zu einer gesteigerten Expression. Der größte Stimulationseffekt stellte sich dabei gerade am 1. postoperativen Tag ein, an dem die Expressionsabnahme für

CD14 für Monozyten nach Endotoxinstimulus am geringsten war. Für CD 18 auf der Granulozytenoberfläche war das Stimulationsergebnis ziemlich konstant.

Die Fähigkeit zur ex-vivo Produktion der Zytokine TNF-alpha und IL-6 nach LPS-Stimulation reduzierte sich unmittelbar postoperativ und erholte sich bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes, ohne jedoch das Ausgangsniveau wieder zu erreichen. Dabei ähneln sich die Kurvenverläufe der stimulierten Proben von IL-6 und HLA-DR, d.h. zum Zeitpunkt der schwächsten HLA-DR-Expression ist auch die IL-6 Synthese am stärksten beeinträchtigt.

Das Minimum der TNF-alpha-Synthese war unmittelbar postoperativ. Diese Ergebnisse sind konsistent mit der Untersuchung von DEHOUX, in der ein rascher Rückgang des Ansprechens auf LPS bei ex-vivo-Stimulation nach HLM beschrieben wurde. Ferner wurde ein Einhergehen der Immunparalyse mit ansteigendem IL-10 beobachtet (Dehoux et al., 2000). Die vorliegende Arbeit kann diese Aussage indirekt mittels des Verlaufes der HLA-DR-Expression und der entsprechenden ex-vivo-Zytokin-Synthese bestätigen. Bei „Immunparalyse“, diagnostiziert anhand einer monozytären HLA-DR-Expression < 30%, konnte von DÖCKE eine Normalisierung der monozytären HLA-DR-Expression und der TNF-alpha-Sekretionskapazität, und eine damit einhergehende zeitweilige Erholung von einem septischen Krankheitsbild, durch immunstimulatorischer Therapie mit Interferon-gamma herbeigeführt werden (Döcke et al., 1997). Adäquate immunomodulatorische Therapieansätze, d.h. die Durchbrechung einer anhaltenden Hyper- oder Antiinflammation bei Patienten mit Sepsis, z.B. mittels systemischer Zytokintherapie, bedürfen einer genauen Beurteilung der immunologischen Situation und sind derzeit nur im Rahmen von Studien sinnvoll. Eine praktikable, wenn auch zeitintensive Methode zur Beurteilung des Immunstatus, stellt die direkte Stimulation von Vollblutproben durch LPS mit anschließender Analyse der Zytokinsekretion dar. Andererseits ermöglicht die durchflusszytometrische Bestimmung der HLA-DR-Expression allein bereits eine sehr exakte Abbildung des Immunstatus. Wie bereits oben erwähnt, waren die Kurvenverläufe von HLA-DR, IL-6 und TNF-alpha (Zytokine nach LPS-Stimulation) relativ kongruent, d.h. bei erniedrigter HLA-DR-Expression, kann



eine reduzierte ex-vivo-Synthese proinflammatorischer Zytokine sehr wahrscheinlich angenommen werden. Es stellt sich somit die Frage, ob nicht die Bestimmung der HLA-DR-Expression, welche wesentlich weniger Aufwand bedeutet, und damit eher in die klinische Routine Einzug erhalten könnte, ausreichend ist, zur Beurteilung des Immunstatus.

#### **4.2.6 Einfluss verschiedener Parameter und der Herz-Lungen-Maschine auf Antigene sowie pro- und antiinflammatorische Marker**

Die Art des Vitiums ergab in dieser Untersuchung lediglich bzgl. der Neutrophilenzunahme eine statistische Signifikanz. Auffallend war der tendenziell stärkere Anstieg der Entzündungsmarker CRP und PCT in der Patientengruppe mit Rechts/Links-Shunt. Für diese Shuntart fand sich auch die stärkste Abnahme der Fluoreszenzintensität für CD 4, CD 11a/CD 18 respektive Zunahme für CD 8 der Lymphozyten. Bei den Monozyten war für diese Patientengruppe die CD 14- und CD 18-Expression erhöht, ähnlich den Granulozyten bei denen zusätzlich CD 11a gegenüber den anderen Patientengruppen erhöht war. Rechts/Links-Shunt-Vitien scheinen auch einen Einfluss auf die ex-vivo Stimulation auszuüben indem Patienten mit diesen Herzfehlern tendenziell weniger TNF-alpha und IL-6 postoperativ zu produzieren vermögen als jene mit anderen Herzfehlern.

Die HLM-Dauer übt keinen relevanten Einfluss auf die Expression der Leukozytenantigene aus. Auffällig war hierbei ein ähnliches Maß des CRP-Anstiegs, währenddessen die Gruppe mit der HLM-Dauer >70 min einen deutlichen Anstieg des Akut-Phase-Proteins PCT erfuhr, jedoch ohne Signifikanz. Einen signifikanten Unterschied bezüglich der HLM-Anschlußdauer nach Endotoxin-Stimulus gab es nur beim CD 14-Antigen auf Monozyten. Postoperativ war in der Patientengruppe mit der HLM-Dauer >70 min die Expression des CD 14-Antigens nach LPS-Stimulation weniger stark reduziert

ANTONELLI konnte ebenfalls keine Korrelation zwischen IL-6 und Bypasszeit belegen (Antonelli et al., 1999).

Im wesentlichen ist zur tiefsten Temperatur während der HLM zu erwähnen, dass erneut CRP und PCT in der Patientengruppe  $< 27^{\circ}\text{C}$  postoperativ tendenziell stärker anstiegen. Hinsichtlich des anti-inflammatorischen Zytokins IL-1ra war eine Signifikanz zwischen den Gruppen gegeben mit einer deutlich größeren ex-vivo-Synthese-Kapazität der Blutproben der Patientengruppe mit einer tiefsten Temperatur während der HLM  $> 27^{\circ}\text{C}$ .

Die Unterscheidung nach der Körpergröße ergab keine Signifikanz für die untersuchten Parameter. Ein Trend zeichnete sich ab für eine größere CRP- und PCT-Zunahme in der Patientengruppe  $< 100\text{ cm}$ . Nach Stimulation mit LPS war die ex-vivo-Produktion der Zytokine bei dieser Patientengruppe eher abgeschwächt im Vergleich zu den größeren Patienten.

Bei der vergleichenden Betrachtung abhängig vom höchsten postoperativen Lactatwert ( $< 3\text{ mmol/l}$  bzw.  $> 3\text{ mmol/l}$ ) war kein Unterschied in der Veränderung des C-reaktiven-Proteins auszumachen. Interessanterweise differierten beide Gruppen bezüglich PCT statistisch signifikant mit einer deutlichen Zunahme bei den Patienten  $> 3\text{ mmol/l}$ , während das anti-inflammatorische Zytokin IL-1ra abnahm. PCT und IL-1ra verhalten sich bei dieser Patientenunterscheidung gegensätzlich. Hingegen sind PCT und Lactat scheinbar konkordant. Patienten mit einem höheren Lactatwert hatten eine signifikant höhere HLA-DR-Expression auf der Oberfläche der Granulozyten.

### **4.3 Schlussfolgerungen**

Anhand der *in vitro* Versuche zur Untersuchung der Auswirkungen einer NO-Inhalationstherapie ergeben sich keine Hinweise für eine relevante Beeinträchtigung der Leukozytenfunktion. Die Immunkompetenz sowie die

Zytokinexpression nach Endotoxinstimulation waren nach NO-Inhalation im Vergleich zur Druckluftinhalation nicht verändert. Nachdem im klinischen Einsatz die Konzentration für eine NO-Inhalationstherapie wesentlich geringer ist als im vorliegenden *in vitro* Modell, ist nicht zu erwarten, dass hierdurch über Hyperinflammation oder Immunparalyse, konsekutiv die postoperative Entwicklung einer SIRS oder Sepsis begünstigt wird.

In der Folge einer HLM-Operation kommt es zur unspezifischen Aktivierung des Immunsystems mit Zunahme der Neutrophilen bei gleichzeitiger Abnahme der Fluoreszenzintensität der Leukozytenfunktionsantigene CD 11a/CD 18. Auch Monozyten und Lymphozyten werden aktiviert und wandern ins Gewebe ab. Dies ist u.a. bei den Lymphozyten an einer gesteigerten Expression von CD 11a/CD 18 und an einer sinkenden Zellzahl zu erkennen. Daneben stellt sich eine temporäre zelluläre Immunsuppression ein, mit abnehmendem CD 4/CD 8-Quotienten der T-Zellen und reduzierter HLA-DR-Expression auf Monozyten.

Während unmittelbar postoperativ eine Balance zwischen den untersuchten pro- und antiinflammatorischen Zytokinen bestand, ergab sich in den darauf folgenden Tagen ein Überwiegen der Antiinflammation. Eine Bestätigung hierfür lieferten auch die *ex-vivo* Stimulationen, die an den postoperativen Tagen eine deutliche Erschöpfung der zellulären Fähigkeit zur Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF-alpha nachwiesen. Darüber hinaus erscheint die Messung der HLA-DR-Expression nach LPS-Stimulation eine gute Methode zur Beurteilung des Immunstatus zu sein, da sie indirekt die Kapazität zur Zytokinsynthese der Leukozyten abbildet.

Bei allen Patienten waren nach HLM-OP im postoperativen Verlauf, in der Folge einer Endotoxämie, die Werte für LBP weit über die Norm erhöht. Eine wesentliche Bedeutung ließ sich hieraus jedoch nicht ableiten, da dieser Parameter unabhängig vom klinischen Zustand der Patienten enorm erhöht war. Eine schnellere Kinetik und eine bessere Diskriminierung erlaubt PCT. Hier ergab sich bei den Patienten mit deutlich erhöhten Werten eine Korrelation zur

Klinik, während bei unkompliziertem Verlauf nur geringe Konzentrationen für PCT gemessen wurden.

Als wesentliche Limitierungen dieser Arbeit sind die insgesamt geringe Fallzahl, sowie die Heterogenität der Studienpatienten im Hinblick auf Alter und Herzfehler zu erwähnen. Nahezu alle in der Literatur veröffentlichten und vergleichbaren Studien unterliegen jedoch ähnlichen Einschränkungen.

Die Messung der Immunkompetenz könnte, neben anderer Parameter zum Immunomonitoring, in Zukunft wesentlich dazu beitragen, den aktuellen Immunstatus des Patienten genauer zu definieren und so eine effektive immunomodulatorische Intensivtherapie zu ermöglichen.

## 5 Zusammenfassung

In der Folge einer HLM-OP können sich pulmonalarterielle hypertensive Krisen entwickeln. Eine NO-Inhalationstherapie stellt hierfür eine etablierte und effektive Behandlungsmethode dar. Ein Ziel dieser Arbeit war es die Auswirkungen einer NO-Inkubation auf die Immunkompetenz, gemessen anhand der ex-vivo Zytokinsekretion (IL-1ra, IL-6, TNF-alpha) und der HLA-DR-Expression nach LPS-Stimulation, zu untersuchen. Hierfür wurde Blut von 20 Herzkatheterpatienten mit zwei verschiedenen NO-Konzentrationen (0 bzw. 100 ppm) inkubiert und anschließend mit 1 µg/ml LPS stimuliert.

Ein weiterer Fokus richtete sich auf die pro- und antiinflammatorischen Vorgänge, die typischerweise während und nach einer HLM-OP ablaufen und zu einer SIRS führen können. Diese wurden mit verschiedenen Parametern, welche durchflußzytometrisch (CD 4/CD 8, CD 11a/CD 18, CD 14, HLA-DR, IL-1ra) oder mittels Festphasen-Chemiluminiszenz-Enzymimmunoassay (IL-6, TNF-alpha) gemessen wurden, abgebildet. Dazu erfolgten serielle Bestimmungen bei 20 Kindern im Rahmen eines herzchirurgischen Eingriffs unter Einsatz der HLM an fünf aufeinanderfolgenden Tagen (ein Tag vor der OP bis drei Tage postoperativ). Dabei wurden mittels LPS-Stimulationstest die Auswirkungen der HLM-OP auf die Immunkompetenz perioperativ erfasst. Im Weiteren verglich man neue Entzündungsmarker wie LBP und PCT hinsichtlich Kinetik und klinischer Aussagekraft. Inwieweit Unterscheidungsmerkmale des Patientenkollektivs, wie tiefste Körpertemperatur während der HLM, HLM-Dauer, höchster Lactatwert, Körpergröße und Shuntrichtung Einfluß auf die oben genannten Parameter haben, galt es ebenso zu analysieren.

Durch NO-Inhalationen mit einer deutlich über dem therapeutischen Bereich liegenden Konzentration (100 ppm) ergaben sich keine Differenzen in der Expression der Leukozytenoberflächenantigene (CD 4, CD 8, CD 11a, CD 14, CD 18, HLA-DR) gegenüber den Negativkontrollen (0 ppm). Ebenso war die ex-vivo Zytokin- und HLA-DR-Expression nach Stimulation mit LPS durch NO nicht beeinträchtigt. Mit einer Begünstigung inflammatorischer Komplikationen unter

therapeutischen Anwendungen mit deutlich niedrigerer NO-Konzentration ist nicht zu rechnen.

Die Ergebnisse zeigten weiterhin, daß es nach HLM-OP zur unspezifischen Aktivierung des Immunsystems kommt, mit Zunahme der Leukozytenzahl, insbesondere des Neutrophilenanteils und Veränderung nahezu aller bestimmten Oberflächenantigene, v.a. einer Abnahme der Adhäsionsmoleküle CD 11a und CD 18. Dies spiegelt sich auch im Verbrauch der antigenpräsentierenden HLA-DR-Rezeptoren der Lymphozyten und Monozyten, sowie in einer Zunahme des Oberflächenantigens CD 14 der Monozyten wieder. Außerdem stellt sich eine temporäre zelluläre Immunsuppression in einem abnehmenden CD 4/CD 8-Quotienten und einer verminderten Kapazität zur ex-vivo-Synthese v.a. proinflammatorischer Zytokine und HLA-DR-Expression nach Stimulation mit LPS dar. Aufgrund der Daten, könnte daher postuliert werden, dass es während der weiteren postoperativen Tage tendenziell zu einem Überwiegen der Antiinflammation kommt. Die Bestimmung der HLA-DR-Expression nach LPS-Stimulation demonstriert indirekt die Fähigkeit der Leukozyten zur Zytokinsynthese und lässt Rückschlüsse auf den inflammatorischen Status zu.

Der Entzündungsparameter LBP erbrachte gegenüber CRP keinen zusätzlichen Informationsgewinn, da er gemäß CRP unspezifisch erhöht war. Hingegen läßt sich bei pathologischen PCT-Werten eine klinische Korrelation vermuten.

Die Analyse nach Merkmalen wie Vitium, HLM-Dauer, HLM-Temperatur und Körpergröße zeigte bezüglich der betrachteten Leukozytenoberflächenantigene, sowie der pro- und antiinflammatorischen Marker unmittelbar postoperativ gegenüber präoperativ keine signifikanten Unterschiede im unstimulierten Zustand. Im Gegensatz dazu hatten Patienten mit den höheren max. Lactatwerten (> 3 mmol/l) einen signifikant stärkeren Anstieg des PCT, eine signifikant deutlichere Abnahme für CD 4 der Lymphozyten und eine signifikant gesteigerte HLA-DR-Expression der Granulozyten, möglicherweise aufgrund der anaeroben Stoffwechsellage.

Interessanterweise war nun nach Stimulation mit LPS die Fähigkeit IL-6 und TNF-alpha zu sezernieren jedoch bei Patienten ohne Shunt signifikant weniger

beeinträchtigt als bei Patienten mit Links/Rechts-Shunt. Ebenso ging eine längere HLM-Dauer (> 70 min) mit einem signifikant größeren Anstieg der CD 14 Expression der Monozyten einher und tiefere Körpertemperaturen bedingten eine signifikant stärkere Zunahme von IL-1ra.

Zusammenfassend könnte die Messung der Immunkompetenz, neben anderer Parameter des Immunmonitorings, in Zukunft wesentlich dazu beitragen, den aktuellen Immunstatus des Patienten exakter zu definieren und eine immunomodulatorische Therapie zu etablieren. Möglicherweise lassen sich präoperativ kritische Immunsituationen anhand der HLA-DR-Expression und der ex-vivo-Zytokinsekretion erkennen. Vor allem bei zu erwartenden längeren HLM-Anschlußzeiten und tieferen Temperaturen während der HLM, sollte die Immunkompetenz des Patienten in die präoperative Risikostratifizierung miteinbezogen werden, um postoperative Komplikationen besser vorbeugen zu können. Dies gilt gerade bei komplexen angeborenen Herzfehlern.

**Abbildungsverzeichnis**

	Seite
Abbildung 1:	NO-Wirkung an der glatten Gefäßmuskelzelle 2
Abbildung 2:	Schematische Darstellung wichtiger Mediatoren der inflammatorischen Antwort 6
Abbildung 3:	Abgewandelter Trachealsaugatz 14
Abbildung 4:	Versuchsaufbau NO-Inhalation 14
Abbildung 5:	Schematischer Aufbau des Strahlengangs des FACScalibur von Becton Dickinson 18
Abbildung 6:	Fluoreszenzspektren der für die FACS-Analyse wichtigsten Fluorochrome 19
Abbildung 7:	Schematischer Aufbau eines Durchflußzytometers 20
Abbildung 8:	FACS-Analyse einer mit LPS stimulierten Zellsuspension nach Anfärbung mit Anti-IL-1ra ohne Vorbehandlung mit BFA 24
Abbildung 9:	FACS-Analyse einer mit LPS stimulierten und mit BFA vorbehandelten Zellsuspension nach Anfärbung mit Anti-IL-1ra 24
Abbildung 10:	Epifluoreszenzmikroskopische Aufnahme zweier Monozyten 25
Abbildung 11:	Epifluoreszenzmikroskopische Aufnahme. LPS-stimulierte Patientenprobe. 25
Abbildung 12:	Epifluoreszenzmikroskopische Aufnahme endotoxin- stimulierter Zellen. Overlaybild 26
Abbildung 13:	Darstellung der Zellanalyse mit der CELL-Quest-Software 29
Abbildung 14:	Teströhrchen und Testablauf Immulite-Analyzer 31
Abbildung 15:	CD4 Intensität Lymphozyten 37
Abbildung 16:	CD4 Intensität Monozyten 37
Abbildung 17:	CD8 Intensität Lymphozyten 38
Abbildung 18:	CD11a Intensität 39



Abbildung 19:	CD14 Intensität Monozyten	40
Abbildung 20:	CD14 Intensität Granulozyten	40
Abbildung 21:	CD18 Intensität	41
Abbildung 22:	HLA-DR Intensität	42
Abbildung 23:	Anzahl positiver Ereignisse für IL-1ra	43
Abbildung 24:	TNF-alpha und IL-6	45
Abbildung 25:	C-reaktives Protein und Leukozytenzahl	46
Abbildung 26:	Leukozytensubpopulationen	47
Abbildung 27:	CD4 Intensität Lymphozyten perioperativ	48
Abbildung 28:	CD4 Intensität Monozyten perioperativ	49
Abbildung 29:	CD8 Intensität Lymphozyten perioperativ	50
Abbildung 30:	CD4/CD8-Quotient der T-Lymphozyten perioperativ	50
Abbildung 31:	CD11a Intensität Lymphozyten perioperativ	51
Abbildung 32:	CD11a Intensität Monozyten perioperativ	52
Abbildung 33:	CD11a Intensität Granulozyten perioperativ	52
Abbildung 34:	CD14 Intensität Monozyten perioperativ	53
Abbildung 35:	CD14 Intensität Granulozyten perioperativ	54
Abbildung 36:	CD18 Intensität Lymphozyten perioperativ	55
Abbildung 37:	CD18 Intensität Monozyten perioperativ	55
Abbildung 38:	CD18 Intensität Granulozyten perioperativ	56
Abbildung 39:	HLA-DR Intensität Lymphozyten perioperativ	57
Abbildung 40:	HLA-DR Intensität Monozyten perioperativ	57
Abbildung 41:	Anteil IL-1ra positiver Ereignisse in Monozyten perioperativ	58
Abbildung 42:	CRP perioperativ	59
Abbildung 43:	Procalcitonin perioperativ	60
Abbildung 44:	LPS-bindendes-Protein (LBP) perioperativ	61
Abbildung 45:	IL-6 perioperativ	62
Abbildung 46:	TNF-alpha perioperativ	63
Abbildung 47:	Differential-Blutbild (Vitium)	65
Abbildung 48:	Pro- und antiinflammatorische Proteine (Vitium)	66

Abbildung 49:	Antigenexpression auf der Lymphozytenoberfläche (Vitium)	66
Abbildung 50:	Antigenexpression auf der Monozytenoberfläche (Vitium)	67
Abbildung 51:	Antigenexpression auf der Granulozytenoberfläche (Vitium)	67
Abbildung 52:	Differential-Blutbild (HLM-Dauer)	68
Abbildung 53:	Pro- und antiinflammatorische Proteine (HLM-Dauer)	69
Abbildung 54:	Antigenexpression auf der Lymphozytenoberfläche (HLM-Dauer)	69
Abbildung 55:	Antigenexpression auf der Monozytenoberfläche (HLM-Dauer)	70
Abbildung 56:	Antigenexpression auf der Granulozytenoberfläche (HLM-Dauer)	71
Abbildung 57:	Differential-Blutbild (HLM-Temperatur)	71
Abbildung 58:	Pro- und antiinflammatorische Proteine (HLM-Temperatur)	72
Abbildung 59:	Antigenexpression auf der Lymphozytenoberfläche (HLM-Temperatur)	72
Abbildung 60:	Antigenexpression auf der Monozytenoberfläche (HLM-Temperatur)	73
Abbildung 61:	Antigenexpression auf der Granulozytenoberfläche (HLM-Temperatur)	73
Abbildung 62:	Differential-Blutbild (Größe)	75
Abbildung 63:	Pro- und antiinflammatorische Proteine (Größe)	76
Abbildung 64:	Antigenexpression auf der Lymphozytenoberfläche (Größe)	76
Abbildung 65:	Antigenexpression auf der Monozytenoberfläche (Größe)	77
Abbildung 66:	Antigenexpression auf der Granulozytenoberfläche (Größe)	78
Abbildung 67:	Differential-Blutbild (Lactat)	79

Abbildung 68:	Pro- und antiinflammatorische Proteine (Lactat)	80
Abbildung 69:	Antigenexpression auf der Lymphozytenoberfläche (Lactat)	80
Abbildung 70:	Antigenexpression auf der Monozytenoberfläche (Lactat)	81
Abbildung 71:	Antigenexpression auf der Granulozytenoberfläche (Lactat)	81
Abbildung 72:	Darstellung der Reaktion auf Endotoxin (Vitium)	83
Abbildung 73:	Darstellung der Reaktion auf Endotoxin (HLM-Dauer)	83
Abbildung 74:	Darstellung der Reaktion auf Endotoxin (HLM-Temperatur)	84
Abbildung 75:	Darstellung der Reaktion auf Endotoxin (Größe)	85
Abbildung 76:	Darstellung der Reaktion auf Endotoxin (Lactat)	86

## Tabellenverzeichnis

	Seite
Tabelle 1: Materialliste Probengewinnung und Lagerung	13
Tabelle 2: Materialliste NO-Inkubation	15
Tabelle 3: Geräteliste NO-Inkubation	15
Tabelle 4: Materialliste Endotoxinstimulation	16
Tabelle 5: Materialliste Durchflußzytometrie	21
Tabelle 6: Materialliste Chemiluminiszenz-Immunoassay	31
Tabelle 7: Materialliste Procalcitoninbestimmung	33
Tabelle 8: Signifikanzniveau	34
Tabelle 9: Versuchsdaten NO-Inkubation	35
Tabelle 10: Versuchsdaten LPS-Stimulation	35
Tabelle 11: Leukozytenwerte der Patientengruppe 1	36
Tabelle 12: Patientendaten	46

**7 Literaturverzeichnis**

- Allen ML, Peters MH, Goldman A, Elliot M, James L, Callard et al.** (2002) Early postoperative monocyte deactivation predicts systemic inflammation and prolonged stay in pediatric cardiac intensive care. *Crit Care Med* **30**: 1140-1145
- Albelda SM** (1991) Endothelial and epithelial cell adhesion molecules. *Am J Respir Cell Mol Biol* **4**: 95-203
- Antonelli M, Testa G, Tritapepe L, Dérrico RR, Costa D, Giovannelli L, Riccioni L, Gasparetto A, Catena G** (1999) IL-8, IL-6 and ICAM-1 in serum of paediatric patients undergoing cardiopulmonary bypass with and without cardiocirculatory arrest.
- Bando K., Pillai R., Cameron D.E. et al.** (1990) Leukocyte depletion ameliorates free radical-mediated lung injury after cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg*, **99**: 873-877
- Bellingan G** (2000) Leucocytes: friend or foe. *Intensive Care Med* **26**: 111-118
- Blackwell TS, Blackwell TR, Holden EP, Christman BW, Christman JW** (1996) In vivo antioxidant treatment suppresses nuclear factor-kappa B activation and neutrophilic lung inflammation. *J Immunol* **157**: 1603-1637
- Bocsi J, Richter M, Hamsch J, Barten M, Dahnert I, Schneider P, Tarnok A** (2006) Transient TH1/TH2 disbalance indicates postoperative effusions and edema after cardiopulmonary bypass in children. *Cytometry Part A* **69A**: 165-168
- Brancaccio G, Villa E, Girolami E, Michielon G, Feltri C, Mazzera E, Costa D, Isacchi G, Iannace E, Amodeo A, Di Donato RM** (2005) Inflammatory Cytokines in pediatric cardiac surgery and variable effect of the hemofiltration process. *Perfusion* **20**: 263-268
- Breuer J, von Brenndorff CI, Baden W, Sieverding L, Steil E, Häberle L, Fenchel G, Apitz J** (1995a) Verbesserung der perioperativen Hämodynamik und des Gasaustausches durch Inhalation mit Stickstoffmonoxid bei Kindern mit angeborenen kardiopulmonalen Fehlbildungen. *Z Kardiologie* **84**: 1009-1017
- Breuer J, Sieverding L, Apitz J** (1995b) Postoperative therapy with low-dose nitric oxide inhalation in an infant with cardiogenic pulmonary hypertension. *Appl cardiopulm Pathophys* **5**: 147-151
- Breuer J** (1998) Selektive Beeinflussung des Pulmonalkreislaufes durch Inhalation mit Stickstoffmonoxid (NO) bei Kindern mit angeborenen Herzfehlern: Hämodynamik, Gasaustausch und toxikologische Aspekte. *Med. Habilitationsschrift. Universität Tübingen*
- Brix-Christensen V, Tonnesen E, Sorensen IJ, Bifinger TV, Sanchez RG, Stefano GB** (1998) Effects of anaesthesia based on high versus low doses of opioids on the cytokine and acute phase protein responses in patients undergoing cardiac surgery. *Acta Anaesthesiol Scand* **63**: 269-276
- Brix-Christensen V** (2001a) The systemic inflammatory response after cardiac surgery with cardiopulmonary bypass in children. *Acta Anaesthesiol Scand* **45**: 671-679
- Brix-Christensen V, Petersen TK, Ravn HB, Hjortdal VE, Andersen NT, Tonnesen E** (2001b) Cardiopulmonary bypass elicits a pro- and antiinflammatory cytokine response and impaired neutrophil chemotaxis in neonatal pigs. *Acta Anaesthesiol Scand* **45**: 407-413
- Brunton TL** (1867) On the use of nitrite of amyl in angina pectoris. *Lancet* **II**: 97-98
- Butler J, Pillai R, Rucker GM et al.** (1993) Effect of cardiopulmonary bypass on systemic release of neutrophil elastase and tumor necrosis factor. *J Thorac Cardiovasc Surg* **105**: 25-30
- Dehoux MS, Hernot S, Asehnoune K, Boutten A, Paquin S, Lecon-Malas V, Toueg ML, Desmots JM, Durand G, Philip I** (2000) Cardiopulmonary bypass decreases cytokine production in lipopolysaccharide-stimulated whole blood cells: Roles of interleukin-10 and the extracorporeal circuit. *Crit Care Med* **28** (6): 1721-1727
- Delves PJ, Rosen FS** (2000) The immune system. *N Engl J Med* **343**: 37-49
- Docke WD, Randow F, Syrbe U et al.** (1997) Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment. *Nature Medicine* **3**: 678-681
- Edmunds LH** (1998) Inflammatory response to cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* **66**: 12-16
- Feelisch M, Kelm M** (1991) Biotransformation of organic nitrates to nitric oxide by vascular smooth muscle and endothelial cells. *Biochem Biophys Res Comm* **180**: 286-293

- Fenton MJ, Golenbock DT** (1998) LPS-binding proteins and receptors. *J Leukoc Biol* **64**: 25-32
- Forsyth KD, Levinsky RJ** (1990) Preparative procedures of cooling and re-warming increase leukocyte integrin expression and function on neutrophils, *J Immunol Methods* **128**: 159-163
- Franke A, Lante W, Fackeldey V, Becker HP, Kurig E, Zöller LG, Weinhold C, Markewitz A** (2005) Pro-inflammatory cytokines after different kinds of cardio-thoracic surgical procedures: is what we see what we know? *Eur J Cardiothoracic surg* **28**: 569-575
- Furchgott RF, Zawadzki JV** (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**: 373-376
- Gessler P, Pfenniger J, Pfammatter JP, Carrel T, Dahinden C** (2002) Inflammatory response of neutrophil granulocytes and monocytes after cardiopulmonary bypass in pediatric cardiac surgery. *Intensive Care Med* **28**: 1786-1791
- Gessler P, Pretre B, Bürki C et al.** (2005) Monocyte function-associated antigen expression during and after pediatric cardiac surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg* **130**: 54-60
- Griffiths MJD, Evans TW** (2005) Inhaled nitric oxide therapy in adults. *N Engl J Med* **353**: 2683-2695
- Gruetter CA, Barry BK, McNamara DB, Gruetter DY, Kadowitz PJ, Ignarro LJ** (1979) Relaxation of bovine coronary artery and activation of coronary arterial guanylate cyclase by nitric oxide, nitroprusside and a carcinogenic nitrosamine. *J Cyclic Nucleotide Res* **5**: 211-224
- Habermehl P, Knuf M, Kampmann C, Mannhardt W, Schranz D, Kuroczynski W, Wippermann CF, Zepp F** (2003) Changes in lymphocyte subsets after cardiac surgery in children. *Eur J Pediatr* **162**: 15-21
- Hall RI, Smith MS, Rucker G** (1997) The systemic inflammatory response to cardiopulmonary bypass: pathophysiological, therapeutic, and pharmacological considerations. *Anesth Analg* **85**: 766-782
- Harlan JM, Winn RK** (2002) Leukocyte-endothelial interactions: clinical trials of anti-adhesion therapy. *Crit Care Med* **30** (suppl. 1): 214-219
- Hashimoto M, Shingu M, Ezaki I et al.** (1994) Production of soluble ICAM-1 from endothelial cells induced to IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . *Inflammation* **18**(2): 162-173
- Haydar A, Mauriat P, Pouard P, Lefèbvre D, Malhere T, Journois D, Denis N, Safran D, Vouhé P** (1992) Inhaled nitric oxide for postoperative pulmonary hypertension in patients with congenital heart defects. *Lancet* **340**: 1545
- Hed J, Berg O, Forslid J, Halldén G, Lärka-Rafner G** (1988) The Expression of CR1 and CR3 on non-modulated and modulated granulocytes of healthy blood donors as measured by flow cytometry. *Scand J Immunol* **28**: 339-344
- Hoeflich C, Volk HD** (2002) Immunomodulation in der Sepsis. *Der Chirurg* **73**: 1100-1104
- Hopkins RA, Bull C, Haworth SG, de Leval MR, Stark J** (1991) Pulmonary hypertensive crisis following surgery for congenital heart defects in young children. *Eur J Cardio-thorac Surg* **5**: 628-634
- Hynninen M, Pettila V, Takkunen O et al.** (2003) Predictive value of monocyte histocompatibility leukocyte antigen-DR-expression and plasma interleukin-4 and -10 levels in critically ill patients with sepsis. *Shock* **20**: 1-4
- Journois D, Pouard P, Mauriat P, Malhère T, Vouhé P, Safran D** (1994) Inhaled nitric oxide as a therapy for pulmonary hypertension after operations for congenital heart defects. *J Thorac Cardiovasc Surg* **107**: 1129-1135
- Kinsella JP, Neish SR, Shaffer E, Abman SH** (1992) Low-dose inhaled nitric oxide in persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Lancet* **340**: 819-820
- Kleine TO, Hackler R, Raffael A** (1994) Differenzierung von Leukozytenuntergruppen mittels der direkten Zweifarbenfluoreszenz im lysierten Vollblut, 217-218. In: Schmitz G, Rothe G: Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik; 2. Aufl., Schattauer, Stuttgart, New York
- Koppelman B, Neefjes JJ, de Vries JE, et al.** (1997) Interleukin-10 down-regulates MHC class II alpha beta peptide complexes at the plasma membrane of monocytes by affecting arrival and recycling. *Immunity* **7**: 861-871
- Kubes P, Suzuki M, Granger DN** (1991) Nitric oxide: An endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 4651-4655
- Laguenie G, Berg A, Saint Maurice JP, Dinh-Xuan AT** (1993) Measurement of nitrogen dioxide formation from nitric oxide by chemiluminescence in ventilated children. *Lancet* **341**: 969

- Lequier LL, Nikaidoh H, Leonard SR, Bokovoy JL, White ML, Scannon PJ, Giroir BP** (2000) Preoperative and postoperative endotoxemia in children with congenital heart disease. *Chest* 117: 1706-1712
- Leube G** (1996) Untersuchungen über thrombozytäre Oberflächenmarker bei herzkranken Kindern mit und ohne NO-Inhalationstherapie. *Med Dissertation Universität Tübingen*
- Ley K** (1996) Molecular mechanisms of leucocyte recruitment in the inflammatory process. *Cardiovasc Res* 32: 733-742
- Macrae DJ, Field D, Mercier JC et al.** (2004) Inhaled nitric oxide therapy in neonates and children: reaching an european consensus. *Intensive Care Med* 30: 372-380
- Miller OI, Tang SF, Keech A, Pigott NB, Beller E, Celermajer DS** (2000) Inhaled nitric oxide and prevention of pulmonary hypertension after congenital heart surgery. A randomized double-blind study. *Lancet* 356: 1464-1469
- Moilanen E, Vuorinen P, Kankaanranta H, Metsa-Ketela T, Vapaatalo H** (1993) Inhibition by nitric oxide-donors of human polymorphonuclear leucocyte functions. *Br J Pharmacol* 109: 852-858
- Mollinedo F, Borregaard N, Boxer LA** (1999) Novel trends in neutrophil structure, function and development. *Immunol Today* 20: 535-537
- Opdahl H, Haugen T, Hagberg IA, Aspelin T, Lyberg T** (2000) Effects of short-term nitrogen monoxide inhalation on leukocyte adhesion molecules, generation of reactive oxygen species, and cytokine release in human blood. *Nitric Oxide* 4(2):112-22
- Ozawa T, Yoshihara K, Koyama N, Watanabe Y, Shiono N, Takanashi Y** (2000) Clinical efficacy of heparin-bonded bypass circuits related to cytokine responses in children. *Ann Thorac Surg* 69: 584-590
- Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S** (1988) Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333: 664-666
- Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S** (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526
- Patrick D.A., Moore E.E., Fullerton D.A. et al.** (1999) Cardiopulmonary bypass renders patients at risk for multiple organ failure via early neutrophil priming and late disability. *J Surg Res* 86: 42-49
- Pepe-Zaba j, Higenbottam TW, Dinh-Zuan AT, Stone D, Wallwork J** (1991) Inhaled nitric oxide as a cause of selective pulmonary vasodilatation in pulmonary hypertension. *Lancet* 338: 1173-1174
- Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S** (1987) Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets. *Br J Pharmacol* 92: 181-187
- Rapoport RM, Murad F** (1983) Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. *Circ Res* 52: 352-357
- Rapoport RM, Draznin MB, Murad F** (1983) Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Nature* 306: 174-176
- Reinhart K, Karzai W, Meisner M** (2000) Procalcitonin as a marker of the systemic inflammatory response to infection. *Intensive Care Med* 26: 1193-2000
- Reinke P, Döcke WD, Kox W et al.,** (1999) Neue Entwicklungen in der Immundiagnostik intensivmedizinischer Patienten. *Dtsch Med Wochenschr* 124: 1527-1529
- Riddington DW, Venkatesh B, Boivin CM, et al.** (1996) Intestinal permeability, gastric intramucosal pH, and systemic endotoxemia in patients undergoing cardiopulmonary bypass, *JAMA* 275: 1007-1012
- Roberts JD, Polaner DM, Lang P, Zapol WM** (1992) inhaled nitric oxide in persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Lancet* 340: 818-819
- Rossaint R, Falke KJ, López F, Slama K, Pison U, Zapol WM** (1993) Inhaled nitric oxide for the adult respiratory distress syndrom. *N Engl J Med* 328: 399-405
- Saenz JJ, Izura JJ, Manrique A et al.** (2001) Early prognosis in severe sepsis via analyzing the monocyte immunophenotype. *Intensive Care Med* 27: 970-977
- Sato Y, Walley KR, Klut ME, English D, Dýachkova Y, Hogg JC, et al.** (1999) Nitric oxide reduces the sequestration of polymorphonuclear leukocytes in lung by changing deformability and CD 18 expression. *Am J Respir Crit Care Med* 159: 1469-1476
- Seghaye MC, Grabitz RG, Duchateau J et al.** (1996) Inflammatory reaction and capillary leak syndrome related to cardiopulmonary bypass in neonates undergoing cardiac operations. *J Thorac Cardiovasc Surg* 112: 687-697

- Stark J, Gallivan S, Lovegrove J, et al.** (2000) Mortality rates after surgery for congenital heart defects in children and surgeons' performance. *Lancet* **355**: 1004-1007
- Tarnok A, Hamsch J, Borte M, Schneider P** (1997) Cardiac and vascular surgery induced immunological changes: influence of the cardio-pulmonary bypass, 129-133. In: E. Faist (Ed.): Proceedings of the 4th international congress on the immune consequences of trauma, shock and sepsis; Monduzzi Editore Bologna, Italy
- Tarnok A, Hamsch J, Emmrich F, Sack U, van Son J, Bellinghausen W, Borte M, Schneider P** (1999) Complement activation, cytokines, and adhesion molecules in children undergoing cardiac surgery with or without cardiopulmonary bypass. *Pediatr Cardiol* **20**: 113-125
- Tarnok A, Emmrich F** (2003) Immune consequences of pediatric and adult cardiovascular surgery: report of 7<sup>th</sup> Leipzig workshop. *Cytometry Part B* **54B**: 54-57
- Vigushin DM, Pepys MB, Hawkins PN** (1993) Metabolic and scintigraphic studies of radioiodinated human C-reactive protein in health and disease. *J Clin Invest* **91**: 1351-1357
- Volk HD, Thieme M, Heym S, et al.** (1991) Alterations in function and phenotype of monocytes from patients with septic disease- Predictive value and new therapeutic strategies. *Behring Inst Mitt* **88**: 208-215
- Wang S, Yan L, Wesley RA, Danner RL** (1997) Nitric oxide increases tumor necrosis factor production in differentiated U937 cells by decreasing cyclic AMP. *J Biol Chem* **272**: 5959-5965
- Wan S, LeClerc JL, Vincent JL** (1997a) Inflammatory response to cardiopulmonary bypass. Mechanisms involved and possible therapeutic strategies. *Chest* **112**: 676-692
- Wan S, LeClerc JL, Schmartz D, Barvais L, Huynh CH, Deviere J, DeSmet JM, Vincent JL** (1997b) Hepatic release of IL-10 during cardiopulmonary bypass in steroid-pretreated patients. *Am Heart J* **133**: 335-339
- Weinberger B, Fakhrazadeh L, Heck DE, Laskin JD, Gardner CR, Laskin DL** (1998) Inhaled nitric oxide primes lung macrophages to produce oxygen and nitrogen intermediates. *Am J Respir Crit Care Med* **158**: 931-938
- Wessel DL, Adatia I, Giglia TM, Thompson JE, Kulik TJ** (1993) Use of inhaled nitric oxide and acetylcholine in the evaluation of pulmonary hypertension and endothelial function after cardiopulmonary bypass. *Circulation* **88**: 2128-2138
- Wright SD, Ramos RA, Hermanowski-Vosatka A, Rockwell P, Detmers PA** (1991) Activation of the adhesive capacity of CR3 on neutrophils by endotoxin: dependence on lipopolysaccharide binding protein and CD14. *J Exp Med* **173**: 1281-1286
- Young JD, Sear JW, Valvini EM** (1996) Kinetics of methaemoglobin and serum nitrogen oxide production during inhalation of nitric oxide in volunteers. *Br J Anaesth* **76**: 652-656
- Zhou H, Su HS, Zhang X, et al.** (1997) CIITA-dependent and -independent class II MHC expression revealed by a dominant negative mutant. *J Immunol* **158**: 4741-4749



## **Danksagung:**

Für die Vergabe der Arbeit, die Betreuung und die Geduld möchte ich mich herzlich bei Herrn Privatdozent Dr. Johannes Breuer bedanken, ebenso bei Herrn Doktor Ralf Knies für die Unterstützung bei der Laborarbeit.

All jenen, die mir auf unterschiedliche Art und Weise bei der Erstellung der vorliegenden Arbeit behilflich waren, gebührt an dieser Stelle mein herzlicher Dank.

# Lebenslauf

Erwin Wilfried Glück

geboren am 07.05.1976

in Straubing

## Ausbildungszeit

1982-1995	Schulzeit, 1995 Abitur am Gymnasium Landau a.d. Isar
1995-1996	Zivildienst am Klinikum St. Elisabeth in Straubing
04/1997	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
03/1999	Ärztliche Vorprüfung
03/2000	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09/2002	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2002-9/2003	Praktisches Jahr an der University of Cape Town (UCT) und am Klinikum Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität in München
13.10.2003	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

## Berufliche Tätigkeit

02/2004-9/2004	Arzt im Praktikum am Klinikum Bogenhausen in München in der Abteilung für Kardiologie und Pneumologie
10/2004-6/2005	Assistenzarzt am Klinikum Bogenhausen in München in der Abteilung für Kardiologie und Pneumologie
seit 7/2005	Assistenzarzt am Klinikum Harlaching in München in der Klinik für Kardiologie

## Promotion

2001-2007	Medizinische Dissertation in der Abteilung II der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universität Tübingen über das Thema <i>Monitoring pro- und antiinflammatorischer Mechanismen nach Operation angeborener Herzfehler und Beeinflussung durch NO</i>
-----------	--