

Aus der Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie  
des Universitätsklinikums des Saarlandes  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. T. Volk

---

*Ex vivo / in vitro* Untersuchung  
zur Auswirkung unterschiedlicher Anästhesieverfahren  
auf die spontane und stimulierbare monozytäre Zytokinausschüttung  
und Oberflächenrezeptor-Expression  
im Rahmen knieendoprothetischer Eingriffe

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes

2012

vorgelegt von  
Friederike Ursula Behmenburg  
geboren am 22. Dezember 1983  
in Iserlohn

Für meine wundervolle Familie

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>3</b>
<b>2. EINLEITUNG.....</b>	<b>7</b>
2.1 KLINISCHE SIGNIFIKANZ DES VERSUCHVORHABENS .....	7
2.2 BESTANDTEILE DES IMMUNSYSTEMS – PHYSIOLOGIE UND PATHOPHYSIOLOGIE DER IMMUNANTWORT .....	8
2.2.1 UNSPEZIFISCHES IMMUNSYSTEM.....	9
2.2.2 ZYTOKINE, ZYTOKINREZEPTOREN UND BEEINFLUSSUNG DER ZYTOKINPRODUKTION.....	12
2.2.3 SPEZIFISCHE ABWEHR.....	15
2.3 EINFLUSS EINZELNER ANÄSTHESIE-RELEVANTER MEDIKAMENTE AUF DIE IMMUNFUNKTION.....	16
2.3.1 LOKALANÄSTHETIKA .....	16
2.3.2 INTRAVENÖSE ANÄSTHETIKA .....	17
2.3.3 VOLATILE ANÄSTHETIKA.....	18
2.3.4 OPIATE.....	19
2.3.5 NOVAMINSULFON .....	20
2.4 EINFLUSS DES OPERATIVEN TRAUMAS AUF DIE IMMUNFUNKTION .....	20
2.5 FRAGESTELLUNG .....	21
<b>3. METHODIK .....</b>	<b>22</b>
3.1. STUDIENDESIGN .....	22
3.1.1 PROBENENTNAHME UND PROBENAUFARBEITUNG.....	23
3.2 ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) .....	24
3.2.1 PROBENAUFARBEITUNG FÜR ELISA-ANSÄTZE .....	24
3.2.2 ZYTOKINBESTIMMUNG MITTELS ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) .....	24
3.3 DURCHFLUSSZYTOMETRIE (FACS).....	27
3.3.1 PROBENAUFARBEITUNG FÜR FACS-ANALYSE .....	29
3.3.2 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE MESSUNG .....	32
3.4 STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	32
3.5 LABORMATERIALIEN.....	32

<b>4. ERGEBNISSE</b> .....	<b>34</b>
4.1 PATIENTENDATEN.....	34
4.2 AUSWIRKUNGEN UNTERSCHIEDLICHER ANÄSTHESIEVERFAHREN AUF DIE SPONTANE UND ENDOTOXINSTIMULIERTE TNF- $\alpha$ -FREISETZUNG.....	35
4.3 AUSWIRKUNGEN UNTERSCHIEDLICHER ANÄSTHESIEVERFAHREN AUF DIE SPONTANE UND DIE ENDOTOXINSTIMULIERTE IL-10-FREISETZUNG.....	37
4.4 AUSWIRKUNGEN UNTERSCHIEDLICHER ANÄSTHESIEVERFAHREN AUF DIE SPONTANE UND DIE ENDOTOXINSTIMULIERTE IL-6-FREISETZUNG.....	39
4.5 AUSWIRKUNGEN UNTERSCHIEDLICHER ANÄSTHESIEVERFAHREN AUF DIE MONOZYTÄRE CD14 – EXPRESSION IM SPONTANVERLAUF.....	41
4.6 AUSWIRKUNGEN UNTERSCHIEDLICHER ANÄSTHESIEVERFAHREN AUF DIE MONOZYTÄRE CD14 – EXPRESSION NACH ENDOTOXINSTIMULATION.....	45
<b>5. DISKUSSION</b> .....	<b>49</b>
5.1 WERTUNG DER METHODIK.....	49
5.1.1 PATIENTENAUSWAHL .....	49
5.1.2 PROBENENTNAHME, -TRANSPORT UND –AUFARBEITUNG .....	50
5.1.3 VOLLBLUTANSATZ.....	50
5.1.4 LPS ALS TOXIN ZUR STIMULATION DER MONOZYTÄREN IMMUNFUNKTION .....	51
5.1.5 ZYTOKINE .....	51
5.1.6 ELISA-MESSUNG .....	51
5.1.7 FACS-ANALYSE .....	52
5.2 DISKUSSION DER ERGEBNISSE.....	53
5.3 FAZIT.....	59
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS UND ANHANG</b> .....	<b>60</b>
6.1 LITERATURVERZEICHNIS .....	60
6.2 ANHANG .....	71
6.2.1 VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN .....	71
6.2.2 VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN.....	73
6.2.3 VERZEICHNIS DER TABELLEN .....	74
<b>7. DANK</b> .....	<b>75</b>
<b>8. LEBENS LAUF</b> .....	<b>76</b>

## 1. Zusammenfassung

Das Immunsystem wird perioperativ von vielen verschiedenen Faktoren und Komponenten beeinflusst. In den letzten Jahren haben sich zahlreiche Studien mit diesem Thema beschäftigt und es scheint, dass neben operativem Trauma, Schmerz, endokriner Mediatorfreisetzung und der Transfusion von Blutprodukten auch die Wahl des Anästhetikums einen Einfluss auf die Immunantwort hat. Trotz intensiver Forschung auf diesem Gebiet ist noch nicht eindeutig geklärt, wie groß der Einfluss unterschiedlicher Anästhesieverfahren – Regionalanästhesie im Vergleich zur Allgemeinanästhesie – auf das Immunsystem wirklich ist und ob sich daraus eine klinische Relevanz ableiten lässt.

In der vorliegenden *ex vivo* / *in vitro* Studie wurde der Effekt unterschiedlicher anästhesiologischer Verfahren bei vergleichbarem operativen Trauma auf das Immunsystem von Patienten untersucht.

Das beobachtete Patientenkollektiv musste sich einem elektiven knieendoprothetischen Eingriff unterziehen. Bei dieser Operation kann die Anästhesie mittels unterschiedlicher Verfahren erfolgen: Entweder durch eine Regionalanästhesie (kombinierte Spinal-Epidural-Anästhesie, CSE) oder durch eine Allgemeinanästhesie (Intubationsnarkose, ITN).

Die venösen Blutentnahmen fanden zu sechs verschiedenen Zeitpunkten statt (T0: unmittelbar vor Narkoseeinleitung, T1: unmittelbar nach Narkoseeinleitung, T2: direkt nach der Operation im Aufwachraum, T3: 6 Stunden postoperativ, T4: 24 Stunden postoperativ, T5: 48 Stunden postoperativ). Die Blutproben wurden jeweils auf zwei Ansätze verteilt, ein Ansatz wurde mit Endotoxin stimuliert, der andere blieb unstimuliert. Anschließend wurden in den einzelnen Ansätzen sowohl die Zytokinausschüttung (TNF- $\alpha$ , IL-10 und IL-6) mittels enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) als auch die Expression des monozytären Oberflächenrezeptors CD14 mittels Durchflusszytometrie (fluorescence-activated cell sorting, FACS) bestimmt.

Wir konnten signifikante Unterschiede der Zytokinausschüttung zwischen den beiden Anästhesieverfahren zeigen.

Die spontane TNF- $\alpha$ -Ausschüttung war zu allen postoperativen Zeitpunkten in der CSE-Gruppe größer als im Vergleich zur ITN-Gruppe (ITN vs. CSE, T2:  $p=0,008$ , T3:  $p=0,027$ , T4:  $p=0,043$ , T5:  $p=0,017$ ). Es zeigte sich unmittelbar nach Anästhesieeinleitung eine signifikant höhere endotoxinstimulierte TNF- $\alpha$ -Ausschüttung in der CSE-Gruppe im Vergleich zur ITN-Gruppe (ITN vs. CSE, T1:  $p=0,001$ ). Im peri- und postoperativen Verlauf der ITN-Gruppe konnte zunächst eine statistisch relevante Abnahme der endotoxinstimulierten TNF- $\alpha$ -Ausschüttung zwischen dem Zeitpunkt unmittelbar nach

Narkoseeinleitung bis 6 Stunden postoperativ festgestellt werden (ITN, T1 vs. T3:  $p=0,022$ ). Im weiteren Verlauf zeigte sich wiederum ein signifikanter Anstieg der endotoxinstimulierten TNF- $\alpha$ -Ausschüttung bis 48 Stunden postoperativ (ITN, T3 vs. T5:  $p=0,022$ ).

Die endotoxinstimulierte IL-10-Ausschüttung zeigte ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen den beiden Studiengruppen. Nach Narkoseeinleitung und 6 Stunden postoperativ konnten wir jeweils in der CSE-Gruppe höhere Zytokinkonzentrationen messen als in der ITN-Gruppe (ITN vs. CSE, T1:  $p=0,037$ , T3:  $p=0,008$ ). Des Weiteren sank die endotoxinstimulierte IL-10-Ausschüttung innerhalb der ITN-Gruppe während des Operationstages statistisch signifikant ab (ITN, T0 vs. T3:  $p=0,029$ ).

Auch bei der spontanen IL-6-Ausschüttung konnten wir signifikante Unterschiede zwischen den Anästhesieverfahren feststellen. Unmittelbar nach Anästhesieeinleitung sowie 24 Stunden postoperativ war die spontane IL-6-Ausschüttung in der ITN-Gruppe höher als in der CSE-Gruppe (ITN vs. CSE, T1:  $p=0,032$ , T4:  $p=0,011$ ).

Die statistische Auswertung der monozytären CD14 – Expression zeigte ebenfalls signifikante Unterschiede.

Der Vergleich der beiden Anästhesieverfahren ergab einen signifikant höheren prozentualen Anteil der CD14<sup>++</sup> Monozyten in der CSE-Gruppe verglichen mit der ITN-Gruppe sowohl 24 als auch 48 Stunden postoperativ (CSE vs. ITN, T4:  $p=0,031$ , T5:  $p=0,010$ ).

Innerhalb der CSE-Gruppe zeigte sich sowohl mit als auch ohne Endotoxinstimulation eine Abnahme des Anteils der CD14<sup>neg</sup> und CD14<sup>+</sup> Monozyten sowohl 24 als auch 48 Stunden postoperativ verglichen mit dem Operationstag (CSE, T4 und T5 vs. T0, T1 und T2,  $p<0,05$ ). Gleichzeitig konnten wir eine signifikante Zunahme des Anteils der CD14<sup>++</sup> Monozyten an beiden postoperativen Tagen in der CSE-Gruppe feststellen (CSE, T4 und T5 vs. T0 und T1,  $p<0,05$ ). Nach Endotoxinstimulation war diese Zunahme nur am ersten postoperativen Tag signifikant (CSE, T4 vs. T0, T1 und T2,  $p<0,05$ ).

Es scheint sich somit ein Einfluss des Anästhesieverfahrens auf die monozytäre Immunantwort des Patienten abzuzeichnen. Möglicherweise beeinflusst eine Allgemeinanästhesie die Immunfunktion stärker als ein Regionalverfahren. Dieses könnte vor allem bei Risikopatienten von größerer Bedeutung sein als bisher angenommen. Hierdurch könnten sich eventuell Strategien zur Vermeidung postoperativer Komplikationen ableiten lassen.

---

## Summary

### ***Ex vivo / in vitro* study on the effect of different anaesthetic techniques on spontaneous and stimulated monocyte cytokine release and surface receptor expression after total knee replacement surgery**

A wide variety of factors affect the immunological response during surgery. In recent years numerous studies examined these various influences. It could be shown that alterations in the immune response might not only be caused by surgical trauma, pain, endocrine mediator release and transfusion of blood components but also by the anaesthetics used. Despite intensive research, the impact of different anaesthetic techniques – i.e. regional vs. general anaesthesia – on the immune system and its clinical relevance is not absolutely clear yet.

We designed this *ex vivo / in vitro* study to examine the effect of the anaesthetic choice on the immune response when surgical stress is comparable.

The observed patients undergoing elective total knee replacement surgery were randomly assigned to receive either general anaesthesia (ITN) or regional spinal/epidural anaesthesia (CSE).

Samples of venous blood were taken at six different time points: T0: immediately before induction of anaesthesia, T1: immediately after induction of anaesthesia, T2: after end of surgery at Post-anaesthesia care unit (PACU), T3: 6 hours after end of surgery, T4: 24 hours after end of surgery, T5: 48 hours after end of surgery.

Cytokine concentrations of TNF- $\alpha$ , IL-10 and IL-6 were measured via enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) in whole blood samples, which were either unstimulated or stimulated with endotoxin. Furthermore, the expression of the surface protein of monocytes, CD14, was measured via fluorescence-activated cell sorting (FACS).

The spontaneous TNF- $\alpha$  production was significantly higher in the ITN group compared to the CSE group at all postoperative time points (ITN vs. CSE, T2:  $p=0.008$ , T3:  $p=0.027$ , T4:  $p=0.043$ , T5:  $p=0.017$ ). Immediately after induction of anaesthesia, TNF- $\alpha$  production after stimulation with endotoxin was significantly higher in the CSE group in comparison with the ITN group (ITN vs. CSE, T1:  $p=0.001$ ). During the peri- and post-operative course of the ITN group, TNF- $\alpha$  production decreased significantly between induction of anaesthesia and 6 hours after surgery (ITN, T1 vs. T3:  $p=0.022$ ). Subsequently, we measured an increase of TNF- $\alpha$  production up to 48 hours postoperatively (ITN, T3 vs. T5:  $p=0.022$ ).

After endotoxin-stimulation, IL-10 production was also significantly different between the study groups. After induction of anaesthesia and 6 hours after surgery there was a higher IL-10 production in the CSE group than in the ITN group (ITN vs. CSE, T1:  $p=0.037$ , T3:

---

p=0.008). Furthermore, there was a significant decrease of IL-10 production after endotoxin stimulation in the ITN group during the day of surgery (ITN, T0 vs. T3: p=0.029).

The spontaneous IL-6 production also showed significant differences between the two anaesthetic techniques. Immediately after induction of anaesthesia as well as 24 hours after surgery there was a greater IL-6 release in the ITN group compared to the CSE group (ITN vs. CSE, T1: p=0.032, T4: p=0.011).

Statistical evaluation of CD14 surface receptor expression of monocytes also led to statistical relevant results.

The comparison of the two anaesthetic techniques showed a significant higher percentage of CD14<sup>++</sup> monocytes in the CSE group than in the ITN group 24 hours and 48 hours after surgery (CSE vs. ITN, T4: p=0.31, T5: p=0.010).

The percentage of CD14<sup>neg</sup> and CD14<sup>+</sup> monocytes decreased significantly 24 hours and 48 hours after surgery in the CSE group compared to the day of surgery without incubation as well as after stimulation with endotoxin (CSE, T4 and T5 vs. T0, T1 and T2, p<0.05). Simultaneously, there was a significant increase of CD14<sup>++</sup> monocytes on both postoperative days in the CSE group (CSE, T4 and T5 vs. T0 and T1, p<0.05). After stimulation with endotoxin this increase was only detectable 24 hours after surgery (CSE, T4 vs. T0, T1 and T2, p<0.05).

Thus, the anaesthetic choice seems to have an impact on the immune response of monocytes. Thereby, general anaesthesia might possibly cause a suppression of the immune system, which could be of major importance in high-risk patients in the clinical setting. These results provide insights into the role of anaesthetics in modulating the immune response, which might help to develop new strategies to prevent post-operative complications.



## 2. Einleitung

### 2.1 KLINISCHE SIGNIFIKANZ DES VERSUCHSVORHABENS

Nosokomiale Infektionen gehören zu den häufigsten Komplikationen eines Krankenhausaufenthalts. Sie stellen ein erhebliches Problem dar, da hieraus resultierende Folgen, wie beispielsweise postoperative Wundinfektionen, Atemwegsinfektionen und die Sepsis, eine große medizinische und ökonomische Bedeutung haben.

Zwischen 1995 und 1998 betrug die Inzidenz von Krankenhausinfektionen auf Intensivstationen und in chirurgischen Abteilungen 6,9% [GEFFERS 2002]. Im Jahr 2006 lag die Zahl der nosokomialen Infektionen zwischen 400.000 und 600.000. Bei 10.000 bis 15.000 Patienten waren sie wahrscheinlich die Todesursache [GASTMEIER 2008].

Die prädisponierenden Faktoren lassen sich laut Robert Koch-Institut in vier Kategorien unterteilen:

1. Patientenfaktoren (hohes Alter, schwere Grunderkrankung, genetische Faktoren),
2. Umweltfaktoren (Luft, Wasser und Oberflächen in der Umgebung des Patienten),
3. Mikrobiologische Faktoren (Erregervirulenz und Resistenzeigenschaften) und
4. Behandlungsfaktoren (z. B. Operationen, invasive Diagnostik) [GEFFERS 2002].

Studien in den letzten Jahren konnten eine deutlich veränderte Immunantwort der Patienten in der peri- und postoperativen Phase nachweisen [KLEINSCHMIDT 1998(a), KLEINSCHMIDT 1998(b), GRUNDMANN 2000, WILHELM 2002]. Während dieser Zeit ist der Patient einem enormen somatischen und psychischen Stress ausgesetzt, der sich in erhöhten Katecholamin- und Cortisolkonzentrationen im Plasma widerspiegelt. Es ist schon lange bekannt, dass diese „Stress-Hormone“ prinzipiell einen eher hemmenden Einfluss auf das Immunsystem haben [LEGUIT 1973, BERENBAUM 1976].

Eine Regionalanästhesie hemmt die neurohumorale Stressantwort und die damit verbundenen Effekte auf das Immunsystem. Möglicherweise lässt sich durch die Wahl der Anästhesietechnik somit indirekt das Immunsystem beeinflussen. Aber auch eine direkte Wirkung einiger Medikamente, die im Rahmen einer Anästhesie eingesetzt werden, auf das Immunsystem ist bereits bekannt [LARSEN 1998].

In einer retrospektiven Studie konnten Exadaktylos et al. zeigen, dass eine Regionalanästhesie den Verlauf der Erkrankung bei Brustkrebspatientinnen positiv beeinflussen kann. Bei Patientinnen mit Paravertebralblock zusätzlich zur Allgemeinanästhesie wurde ein erneutes Tumoraufreten seltener beobachtet und es entwickelten sich weniger Metastasen als bei

Patientinnen, die ausschließlich eine Allgemeinanästhesie erhielten [EXADAKTYLOS 2006]. Weitere Studien konnten zeigen, dass eine Epiduralanästhesie bei Patienten mit Prostata-Karzinom in den Jahren nach einer radikalen Prostatektomie den Anstieg des Prostataspezifischen Antigens hemmt [BIKI 2008] und das Überleben von Patienten mit Colon-Karzinom verlängert [CHRISTOPHERSON 2008].

Mit der Entwicklung der modernen Medizin wird das Patientenkollektiv stetig älter. Daher müssen immer mehr multimorbide und immunsupprimierte Patienten operiert werden. Somit ist es wichtig, einen möglichen Einfluss des Anästhesieverfahrens auf das Immunsystem und die damit verbundenen Konsequenzen für den Patienten genauer zu evaluieren.

## 2.2 BESTANDTEILE DES IMMUNSYSTEMS – PHYSIOLOGIE UND PATHOPHYSIOLOGIE DER IMMUNANTWORT

Innerhalb des Immunsystems wird grundsätzlich zwischen einem unspezifischen (angeborenen) und einem spezifischen (erworbenen) Anteil unterschieden. Beide Komponenten arbeiten sowohl auf humoraler als auch auf zellulärer Ebene, um ein wirksames Abwehrsystem für den Körper bereitzustellen. Tabelle 1 zeigt die einzelnen Bestandteile der Immunantwort.

### **Tabelle 1: Übersicht über die Bestandteile des Immunsystems.**

Monozyten und Makrophagen übernehmen eine Schlüsselrolle bei der Kommunikation zwischen dem unspezifischen und dem spezifischen Anteil des Immunsystems.

	Unspezifisches Immunsystem	Spezifisches Immunsystem
Humorale Komponenten	Komplement Zytokine Lysozym Akute-Phase-Proteine	Komplement Antikörper
Zelluläre Komponenten	Monozyten/ Makrophagen Granulozyten Natürliche Killerzellen (NKC)	T-Lymphozyten

### 2.2.1 UNSPEZIFISCHES IMMUNSYSTEM

Das unspezifische Immunsystem ist in der Lage, Fremdkörper und Krankheitserreger bereits beim ersten Kontakt unschädlich zu machen. Grenzflächen wie Haut und Schleimhäute bilden die erste Barriere der angeborenen Immunantwort gegen den Eintritt von Mikroorganismen.

Zu den humoralen Bestandteilen gehören das Enzym Lysozym, das Komplementsystem, eine Reihe von Akute-Phase-Proteinen wie z. B. das C-reaktive Protein (CRP) und Zytokine. Lysozym findet sich in vielen Sekreten und zerstört die Zelloberfläche von Bakterien durch Mureinspaltung. Der alternative Weg des Komplementsystems wird vor allem durch pathogene Oberflächen aktiviert und führt durch die Bildung des Membranangriffkomplexes (MAC) zur Lyse der Zielzelle. Die etwa 30 verschiedenen Akute-Phase-Proteine sind vor allem für die Lokalisierung der Entzündung, die Verhinderung der Infektausbreitung und die Unterstützung des Immunsystems bei der Sanierung des Entzündungsherdes zuständig. CRP beispielsweise bindet an Phosphorylcholin-Resten auf Bakterienoberflächen und wirkt so als Opsonin, um die Komplementaktivierung zu induzieren [LÖFFLER 2003].

Zu den zellulären Bestandteilen der unspezifischen Abwehr gehören Granulozyten, Natürliche Killerzellen (NKC), Monozyten und Makrophagen.

Die Neutrophilen Granulozyten beteiligen sich am Abbau von Fremdkörpern durch freie Sauerstoffradikale. NKC sind vor allem wichtige Bestandteile der angeborenen Immunantwort bei der Abwehr von viralen Infektionen [BIRON 1999].

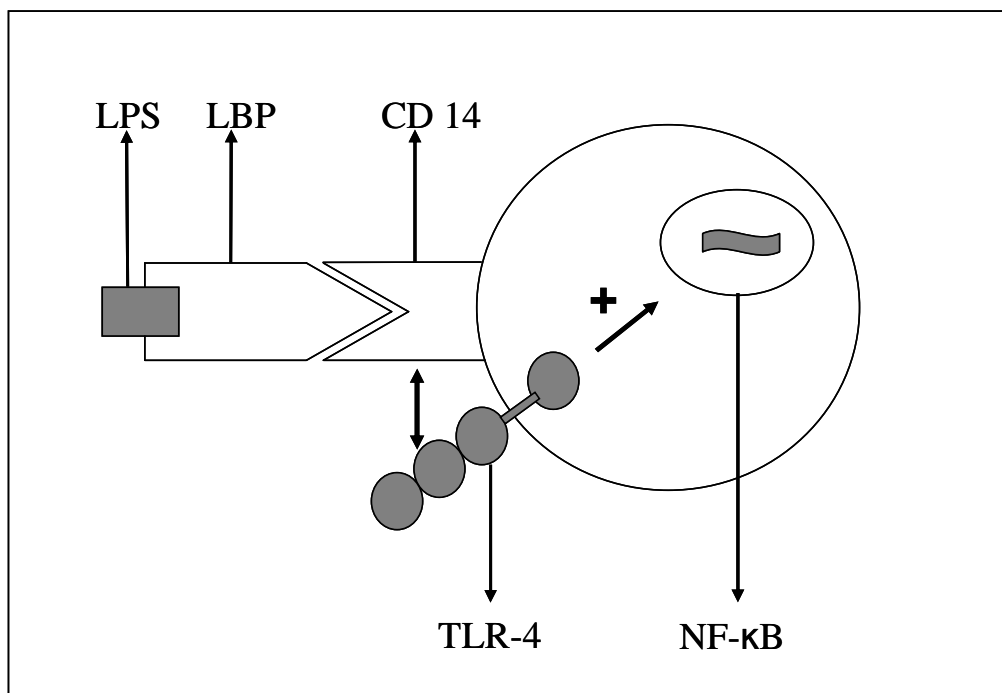
Monozyten entwickeln sich im Knochenmark aus den myeloiden Vorläuferzellen. Sie zirkulieren nach abgeschlossener Monozytopoese für ungefähr zwei bis drei Tage im Blut, um sich anschließend im Gewebe weiter zu Makrophagen zu differenzieren. Dabei wachsen sie auf das Fünf- bis Zehnfache ihrer ursprünglichen Größe an, wodurch ihre Phagozytosekapazität gesteigert wird und sich der Gehalt an hydrolytischen Enzymen im Lysosom erhöht. Abhängig von ihrem Zielgewebe werden die Makrophagen dann unterschiedlich benannt, z. B. Histiozyten in Haut, Muskeln und Bindegewebe, Kupfferzellen in der Leber, Mesangiumzellen in der Niere oder Mikrogliazellen im Gehirn [DETJEEN 2005]. Makrophagen verweilen Monate bis Jahre in ihrem Gewebe und bilden zusammen mit den Monozyten das mononukleäre Phagozytensystem (MPS).

Mikroorganismen tragen in der Regel bestimmte Strukturmerkmale auf ihrer Oberfläche, die von den Rezeptoren des MPS als fremd erkannt werden und die Phagozytose einleiten. Dieser intrazelluläre Abbau von Pathogenen durch lysosomale Proteasen und Sauerstoffradikale dient neben der Inaktivierung von schädlichen Keimen vor allem der Induktion der adaptiven

Immunantwort. Der bekannteste Reaktionsweg dieser Art führt über den Toll-like Rezeptor 4 (TLR-4). Dieser Rezeptor befindet sich hauptsächlich auf der Zellmembran von Monozyten. Mehrere Studien haben gezeigt, dass Mäuse, die genetisch bedingt keinen bzw. einen veränderten TLR-4 exprimieren, nicht adäquat auf Lipopolysaccharid (LPS) reagieren [HOSHINO 1999, QUERSHI 1999]. LPS ist ein Bestandteil der Zellwand von gram-negativen Bakterien und bindet im Plasma an das LPS-bindende Protein (LBP). Das Membranprotein CD14 auf der Oberfläche von Phagozyten lagert sich an den LPS/LBP-Komplex. Jetzt können CD14 und TLR-4 interagieren, was zu einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B) im Zellkern führt [JANEWAY 2002] (s. Abbildung 1).

NF- $\kappa$ B ist ein aus mehreren Untereinheiten bestehender Transkriptionsfaktor, der die Expression von Genen aktiviert, die für die entzündliche und immunmodulatorische Antwort zuständig sind. Seine Zielgene können grob in drei Klassen unterteilt werden:

1. Immunmodulierende Zytokine wie Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-6 (IL-6),  $\beta$ -Interferon und granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF),
2. Immunregulierende Zelloberflächen-Rezeptoren wie Major Histocompatibility Complex-I (MHC-1) und den IL-2 Rezeptor und
3. Akute-Phase-Proteine wie beispielsweise Fibrinogen. [SCHRECK 1991].



**Abbildung 1: Der Toll-like Rezeptor 4 – Reaktionsweg.**

Der LPS/LBP-Komplex verursacht über Interaktion mit CD14 und TLR-4 eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B.

CD14 ist ein 55 kDa großes Glykoprotein, welches über einen Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker mit der Zellmembran verbunden ist [HAZIOT 1988]. Es besteht aus 356 Aminosäuren und wird auf dem Chromosomenabschnitt 5q23-21 kodiert [SIMMONS 1989]. CD14 spielt als „Hauptrezeptor“ für LPS eine sehr wichtige Rolle bei der unspezifischen Immunantwort. Zusätzlich haben *in vitro* Untersuchungen gezeigt, dass CD14 auch bei der Phagozytose gramnegativer Bakterien [GRUNWALD 1996], der LPS-vermittelten Knochenresorption [AMANO 1997] und der Interaktion zwischen Monozyten und endothelialen Zellen beteiligt ist [BEEKHUIZEN 1991].

75 bis 95% der Monozyten gesunder Patienten sind CD14-positive Zellen [BIRKENMAIER 1992]. Basierend auf der Expressionsstärke des CD14 Rezeptors lassen sich Monozyten bzw. Makrophagen in Subpopulationen einteilen. Zellen, die eine starke CD14-Rezeptorexpression aufweisen (sog. CD14 zweifach-positive Zellen – auch CD14<sup>++</sup>), sind die „klassischen“ Monozyten und stellen bis zu 90% der Monozyten dar. Sie produzieren sowohl das proinflammatorisch wirksame TNF- $\alpha$  als auch das antiinflammatorisch wirkende Interleukin-10 (IL-10). Eine andere Population mit einer schwächeren CD14-Expression (sog. CD14 einfach-positive Zellen – auch CD14<sup>+</sup>) sezerniert hingegen nur proinflammatorische Zytokine, wie z. B. TNF- $\alpha$  [FRANKENBERGER 1996]. Diese Monozytensubpopulation wurde erstmalig 1988 beschrieben [ZIEGLER-HEITBROCK 1988] und zeichnet sich neben einer vermehrten HLA-DR Expression [ROTHE 1996] auch durch eine größere Antigenpräsentierende Aktivität aus als die „klassischen“ Monozyten [THOMAS 1994]. Diese Monozytenklasse ist vor allem bei Patienten mit HIV-1 Infektion, AIDS-assoziiertes Demenz und Sepsis erhöht [FINGERLE 1993, BLUMENSTEIN 1997, PULLIAM 1997]. Des Weiteren können Monozyten CD14-Antigene im Rahmen einer LPS-Exposition von ihrer Oberfläche abstoßen, das sog. Shedding. Shedding ist ein Schutzmechanismus der Monozyten, um sich vor einer übermäßigen Zytokinantwort zu schützen [BAŽIL 1991].

Monozyten und Makrophagen tragen als Antigenpräsentierende Zellen (APZ) auch HLA-DR und CD86 als Membranproteine auf ihrer Oberfläche. Das HLA-DR-Molekül ist ein sehr vielfältiges und das meist exprimierte Antigen des MHC-II-Komplexes auf Monozyten [GONWA 1984]. Moleküle der MHC-Klasse-II präsentieren Antigene von Erregern, die sich extrazellulär vermehren (also überwiegend Bakterien) und nach Aufnahme in eine APZ im Endosom prozessiert wurden. Ist die Anzahl der HLA-DR-Moleküle auf der Zelloberfläche zu gering, kann das spezifische Immunsystem nicht ausreichend aktiviert werden. Ziegeler et al. konnten eine deutlich reduzierte HLA-DR-Expression nach kardiopulmonaler Bypass-Operation messen, die bis zu 24 Stunden postoperativ anhielt [ZIEGELER 2009]. Kawasaki

beobachtete sogar bis zum siebten postoperativen Tag eine signifikante Reduktion der HLA-DR-Moleküle auf der Monozytenoberfläche nach partieller Gastrektomie [KAWASAKI 2001]. Viele Studien konnten zeigen, dass eine verminderte HLA-DR-Expression auf Monozyten nach Trauma oder im Verlauf einer Sepsis zu einem schlechteren Krankheitsverlauf der Patienten führte. [POLK 1986, HERSCHMAN 1990, DÖCKE 1997]. CD86 findet sich sowohl auf den APZ, wie Monozyten, als auch auf dendritischen Zellen und aktivierten B-Zellen. Studien konnten zeigen, dass eine Stimulierung mit LPS, CD40, Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) oder Interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) zu einer erhöhten CD86-Expression führt [SANSOM 2000]. CD86 spielt zusammen mit CD80, das erst auf aktivierten Monozyten messbar ist, eine Schlüsselrolle bei der T-Zell-Aktivierung über den CD80/CD86 – CD28/CD152 Reaktionsweg. CD28 ist konstitutiv exprimiert auf T-Zellen, wohingegen die Expression von CD152 erst nach T-Zell-Aktivierung angeregt wird [SHARPE 2002].

### 2.2.2 ZYTOKINE, ZYTOKINREZEPTOREN UND BEEINFLUSSUNG DER ZYTOKINPRODUKTION

Unter dem Begriff „Zytokine“ wird eine strukturell heterogene Gruppe löslicher kleiner Proteine (10-30 kDa) zusammengefasst, die durch Bindung an spezifische Rezeptoren eine Reihe unterschiedlicher Reaktionen auslösen und somit zur Signalübermittlung zwischen den Zellen des Immunsystems dienen. Zytokine werden von vielen unterschiedlichen Zellarten produziert und freigesetzt und können dabei autokrin, parakrin und sogar – bei entsprechender Halbwertszeit und Kontakt zum Blutkreislauf – endokrin wirken. Durch die Vielzahl an Zytokinen, die sich teilweise gegenseitig stimulieren bzw. antagonisieren entsteht ein großes Netzwerk zwischen den Zellen, um möglichst adäquat auf einen äußeren Stimulus reagieren zu können. Innerhalb der Zytokinfamilie lässt sich zunächst eine grobe Einteilung bezüglich der vornehmlichen Immunreaktion in proinflammatorisch (z. B. TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1,  $\gamma$ -IFN, IL-8) und antiinflammatorisch wirksame Zytokine (z. B. IL-10, TGF- $\beta$ , IL-1ra, IL-4) vornehmen.

Eine genauere Einteilung in fünf Untergruppen wird durch strukturelle Ähnlichkeiten erzielt. Man unterscheidet zwischen Interleukinen (IL), Interferonen (IFN), Tumor-Nekrose-Faktoren (TNF), Wachstumsfaktoren (GF, growth factors) und Koloniestimulierenden Faktoren (CSF, colony stimulating factors).

**Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$ :** TNF- $\alpha$  ist eines der wichtigsten proinflammatorischen Zytokine. Es ist ein 175 Aminosäuren langes Protein mit einem Molekulargewicht von 17 kDa, das auf dem Chromosomenabschnitt 6p21.3 kodiert wird. Es wird vor allem von Monozyten und

Makrophagen, aber auch von Lymphozyten, Endothelzellen und Mastzellen gebildet, die z. B. durch LPS-tragende Pathogene stimuliert werden. TNF- $\alpha$  wird sehr früh gebildet, sodass bereits eine Stunde nach Antigenkontakt Serumspiegel von 1000 pg/ml gemessen werden können [LIN 1999]. Die Ausschüttung von TNF- $\alpha$  stimuliert die Expression weiterer proinflammatorischer Zytokine (z. B. IL-6, IL-1 und IL-8), die ihrerseits wieder über einen positiven „Feed-back“-Mechanismus die TNF- $\alpha$  Produktion verstärken. Die größten Gegenspieler bilden die beiden antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) sowie das Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). Sie verhindern eine überschießende Immunreaktion und führen somit zu einer lokalen Begrenzung des Entzündungsherd.

TNF- $\alpha$  hat vier wesentliche Funktionen:

1. Die lokale Gefäßpermeabilität wird gesteigert, damit Plasmaproteine wie z. B. Komplement verstärkt in das Gewebe eintreten können.
2. Die Adhäsionsmoleküle werden hochreguliert, um die Extravasation von Leukozyten zu erleichtern.
3. Die verstärkte Thrombozytenfunktion führt zu einer Aktivierung der Gerinnung in den kleinen Blutgefäßen, um die Ausbreitung von bakteriellen Erregern über den Blutstrom zu begrenzen.
4. Die dendritischen Zellen werden mobilisiert, sodass sie sich nach Aufnahme und Prozessierung von Antigenen aus dem Gewebeverband lösen und in die regionalen Lymphknoten fließen können.

Diese Maßnahmen helfen der Abwehr, lokale Entzündungen zu bekämpfen. Wenn jedoch eine systemische bakterielle Infektion mit einer generalisierten TNF- $\alpha$ -Ausschüttung vorliegt, führt TNF- $\alpha$  dagegen zu Blutdruckabfall und Verminderung des Herzzeitvolumens durch Vasodilatation, Gewebeödemen bei gesteigerter Gefäßpermeabilität, disseminierter intravasaler Gerinnung (DIC) und schließlich im Endstadium zur Entstehung eines Multiorganversagens.

Kawasaki et al. untersuchten die endotoxinstimulierte TNF- $\alpha$ -Produktion im Vollblutansatz nach partieller Gastrektomie in Allgemeinanästhesie mit Isofluran. Sie konnten eine deutlich reduzierte Zytokinfreisetzung zwei Stunden nach Operationsbeginn messen, die ihr Minimum am Operationsende erreichte. Am ersten postoperativen Tag erholte sich die Suppression wieder auf präoperative Ausgangswerte [KAWASAKI 2001].

**Interleukin-10:** IL-10 gehört neben TGF- $\beta$  zu den wichtigsten antiinflammatorisch wirksamen Zytokinen. Es wird auf dem Chromosomenabschnitt 1q31-32 kodiert, umfasst 178 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 18 kDa (Monomer). IL-10 wird von Monozyten, Makrophagen, B-Lymphozyten, T-Lymphozyten und Keratinozyten produziert und hemmt bereits auf Transkriptionsebene die Produktion von IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , GM-CSF und G-CSF in den APZ [DE WAAL MALEFYT 1991; FIORENTINO 1991(a); FIORENTINO 1991(b); D'ANDREA 1993]. Des Weiteren induziert IL-10 die Proliferation von Mastzellen [THOMPSON-SNIPES 1991] und Thymozyten [MAC NEIL 1990]. Außerdem wirkt es unterstützend bei der Umwandlung von B-Zellen in Plasmazellen, wobei andererseits eine Hemmung der IgE-Produktion in Anwesenheit von Monozyten beschrieben wird [GRÜTZ 2005].

IL-10 schützt den Organismus vor einer überschießenden Immunantwort. Tierexperimentell konnte gezeigt werden, dass Mäuse, denen dieses Zytokin fehlt, chronisch entzündliche Darmerkrankungen entwickeln und schon die Gabe einer kleinen Menge Endotoxin in diesen Knockout-Tieren einen septischen Schock auslösen kann [GRÜTZ 2005].

Ogata et al. zeigten einen signifikanten Anstieg der spontanen IL-10-Freisetzung während einer distalen partiellen Gastrektomie in Allgemeinanästhesie mit Isofluran und Lachgas. Bereits am ersten postoperativen Tag war die IL-10-Produktion wieder auf das präoperative Ausgangsniveau gesunken. Dieser IL-10-Anstieg könnte ein möglicher Grund für die verminderte perioperative TNF- $\alpha$ -Produktion sein [OGATA 2000].

**Interleukin-6:** IL-6 ist ein Vertreter der Zytokinfamilie, dem sowohl pro- als auch antiinflammatorische Eigenschaften zugesprochen werden [JONES 2005]. Es wird auf dem Chromosomenabschnitt 7p21 kodiert, besteht aus 184 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 26 kDa. Gebildet wird dieses Zytokin von Monozyten, Makrophagen, Kupfferzellen, Neutrophilen Granulozyten, Mastzellen, B-Zellen, T-Zellen, Endothelzellen, Fibroblasten, Osteoblasten und vaskulären glatten Muskelzellen. Einige Zytokine (z. B. TNF- $\alpha$ , IL-1, platelet-derived growth factor und IFN- $\beta$ ), aber auch LPS und virale Nukleinsäuren stimulieren die Expression von IL-6, dessen Serumspiegel innerhalb von zwei Stunden auf bis zu 1500 pg/ml ansteigen kann [LIN 2000].

IL-6 fungiert als Hauptmediator, der zusammen mit IL-1 die Hepatozyten zur Produktion und Sekretion von Akute-Phase-Proteinen anregt [GAULDIE 1987; CASTELL 1989]. Gleichzeitig fördert es die Reifung von Monozyten zu aktivierten Makrophagen, wodurch die Phagozytose und die Expression von MHC-I- und Adhäsionsmolekülen gesteigert wird.



IL-6 spielt außerdem eine große Rolle beim „immunological switch“, dem Übergang von der schnellen angeborenen Immunantwort zur erworbenen Abwehrreaktion und wirkt somit auch auf Lymphozyten. B-Lymphozyten produzieren vermehrt Immunglobuline und in T-Lymphozyten werden die IL-2-Produktion und die Differenzierung zu zytotoxischen Killerzellen induziert.

Im zentralen Nervensystem (ZNS) löst dieses pleiotrope Zytokin durch Induktion von PGE<sub>2</sub> Fieber aus und steigert gleichzeitig über das adrenocorticotrope Hormonsystem die Sekretion von Kortison, Somatotropin, Glucagon und Adrenalin [FISCHER 2006].

### 2.2.3 SPEZIFISCHE ABWEHR

Die erworbene Immunität ist in der Lage, für jedes Makromolekül eine spezielle und gezielte Antwort hervorzurufen. Für diese Aufgabe stehen einerseits die T-Lymphozyten auf der zellulären Ebene und andererseits auf der humoralen Ebene das Komplement und die Antikörper, die von aktivierten B-Lymphozyten produziert werden, zur Verfügung.

T-Lymphozyten werden im Knochenmark gebildet und anschließend im Thymus geprägt, um als naive T-Lymphozyten ins Blut zu gelangen. Am Ende dieser Reifung exprimiert ein T-Lymphozyt neben seinem T-Zell-Rezeptor (TCR) auch einen Korezeptor zur Antigenerkennung, entweder das CD8- oder das CD4- Molekül.

Die Hauptaufgabe von CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten (= Zytotoxische T-Zellen) ist die Zerstörung von Zellen, in deren Zytoplasma eine Vermehrung von Krankheitserregern stattfindet. Die Erkennung dieser Zellen läuft über Moleküle der MHC-Klasse I, die auf nahezu allen kernhaltigen Zellen exprimiert werden. Sie präsentieren Antigene von Erregern, die sich in der Zelle vermehren (alle Viren, einige Bakterien und Parasiten), aber auch von untypischen Proteinen, die von Tumorzellen produziert werden. Das CD8-Molekül übernimmt durch Interaktion mit dem Molekül der MHC-Klasse I eine stabilisierende Funktion bei der Bindung des TCR an das MHC-Molekül. Jetzt kann die Zytotoxische T-Zelle ihre Granula bestehend aus Perforinen und Granzymen ausschütten und so die Zielzelle zur Apoptose bewegen.

CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten (= T-Helferzellen) wiederum werden in die Subgruppen TH1- und TH2-Zellen unterteilt. T-Helferzellen erkennen ihre Zielzelle über Moleküle der MHC-Klasse II (z. B. HLA-DR), die sich vorwiegend auf APZ finden.

TH1-Zellen dienen im Wesentlichen als Regulatorzellen bei Entzündungsreaktionen, indem sie beispielsweise die gebundenen Makrophagen zur Synthese von Sauerstoffradikalen und Stickstoffmonoxid (NO) stimulieren. Gleichzeitig wird nach Hochregulierung von TNF- $\alpha$ -Rezeptoren auf den Makrophagen auch noch deren autokrine Versorgung mit TNF- $\alpha$  induziert. Zusätzlich sezernieren die von TH1-Zellen stimulierten Makrophagen auch IL-12,

welches die Weiterentwicklung noch nicht differenzierter CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten in Richtung TH1-Zelle vorantreibt.

TH2-Zellen dienen insbesondere als Differenzierungshilfe für B-Lymphozyten, indem sie durch Produktion von IL-4 den Isotypenwechsel von der IgM-Produktion hin zu IgG<sub>1</sub> und IgE induzieren und mithilfe von IL-5 die Synthese von IgA verstärken. Zusätzlich sezernieren TH2-Zellen noch die antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF-β.

Antikörper werden von aktivierten B-Lymphozyten, sogenannten Plasmazellen, produziert und können auf eine zellfreie Ausbreitung der Erreger im Blut reagieren. Das ist wichtig, da T-Lymphozyten Erregerfragmente nur im Kontext mit MHC-Molekülen erkennen können. Grundsätzlich werden fünf verschiedene Antikörperklassen bzw. Isotypen unterschieden (IgM, IgG, IgA, IgE und IgD), die sich hinsichtlich ihrer biologischen Eigenschaften, z. B. Gewebe- und Plazentagängigkeit, oder der Fähigkeit zur Komplementaktivierung, unterscheiden. Die Wirksamkeit von Antikörpern beruht im Wesentlichen auf drei Mechanismen:

1. Neutralisation durch Blockade von Antigenstrukturen, Behinderung der Virusreplikation oder Behinderung der Anhaftung von Bakterien,
2. Aktivierung des Komplementsystems über den klassischen Weg durch Antigen-Antikörper-Komplexe und
3. Bindung von Antikörpern an Fc-Rezeptoren auf Phagozyten, NK-Zellen und Granulozyten sowie anschließendem Transport ins Zellinnere.

## 2.3 EINFLUSS EINZELNER ANÄSTHESIE-RELEVANTER MEDIKAMENTE AUF DIE IMMUNFUNKTION

In vielen Studien wurden die immunmodulatorischen Effekte einzelner Medikamente, die im Rahmen einer Anästhesie eingesetzt werden, bereits beschrieben und kontrovers diskutiert.

### 2.3.1 LOKALANÄSTHETIKA

Lokalanästhetika konnte eine antibakterielle Wirkung zugeordnet werden, die sich vor allem im Bereich entzündlicher Lungenverletzungen durch eine gesteigerte mikrovaskuläre Permeabilität bemerkbar machte [ROSENBERG 1985, GRIMMOND 1986, HOLLMANN 2000]. Andere Arbeitsgruppen verwiesen auf die immunmodulierende Wirkung von Mepivacain, Bupivacain und Lidocain auf das unspezifische (angeborene) Immunsystem. So konnte einerseits eine deutliche Einschränkung der chemotaktischen und phagozytären Aktivität, sowie andererseits eine verminderte Produktion von Superoxid-Anionen durch Neutrophile Granulozyten nachgewiesen werden. Des Weiteren verhindern Lokalanästhetika

die Aktivierung der NK-Zellen und unterdrücken signifikant die monozytäre HLA-DR-Expression [OKUNO 1996, MIKAWA 1997, HYVÖNEN 1998, KAWASAKI 2004]. Auch Huang et al. konnten eine signifikante Abnahme der COX-2-Expression sowie der PGE<sub>2</sub>- und Zytokin-Produktion durch Bupivacain in endotoxinstimulierten murinen Makrophagen messen [HUANG 2008].

Diese antiinflammatorischen Effekte der Lokalanästhetika wurden bereits in einer Vielzahl von Studien weitergehend untersucht. So zeigte sich beispielsweise bei der Behandlung einer interstitiellen Zystitis mit täglichen Blasenspülungen mit 200 mg Lidocain über zwei Wochen eine lang anhaltende Verminderung von Ödemen, Ulzerationen und Mastzell-Infiltration der Blasenwand bei gleichzeitiger Verbesserung der klinischen Symptome [ASKLIN 1989]. Gallos et al. konnten ein vermehrtes Überleben bei Mäusen mit septischer Peritonitis nach subkutaner Applikation von Lidocain oder Bupivacain beobachten [GALLOS 2004].

### 2.3.2 INTRAVENÖSE ANÄSTHETIKA

Der Einfluss von i.v.-Anästhetika auf das Phagozytensystem und die Produktion freier Radikale ist weiterhin Gegenstand der aktuellen Forschung. In einer Studie von Davidson wurden Vollblutansätze von zehn gesunden Probanden für eine Stunde mit klinisch gebräuchlichen Konzentrationen und den 100fachen Konzentrationen von Propofol, Thiopental, Midazolam und Ketamin inkubiert. Anschließend wurden die Phagozytoseaktivität und die freie Radikalproduktion des MPS mittels Durchflusszytometrie gemessen. Es zeigten sich keine Veränderungen der Immunantwort für klinisch gebräuchliche Konzentrationen der i.v.-Anästhetika. Einzig Thiopental reduzierte die MPS-Aktivität in der 100fachen Konzentration [DAVIDSON 1995]. Andere Arbeitsgruppen konnten eine Suppression der Neutrophilen Granulozytenfunktion nachweisen. Dieses spiegelte sich vor allem in den Bereichen Chemotaxis und Phagozytose wider, aber auch in einer verminderten Bereitstellung von freien Radikalen in Anwesenheit von Thiopental, Midazolam und Ketamin [NISHINA 1998, MOUDGIL 1981]. Larsen et al. inkubierten Vollblutansätze mit Thiopental, Etomidat, Propofol, Ketamin und Midazolam mit 1fachen und 10fachen Konzentrationen, die im klinischen Alltag im Blut erreicht werden. Nach einer 24-stündigen Inkubation mit oder ohne Endotoxinstimulation wurden zum einen die Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-6 und IL-10 im Überstand mithilfe eines ELISA gemessen und zum anderen das Expressionsmuster der Oberflächenmoleküle CD14 und HLA-DR auf den Monozyten mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Ergebnisse zeigten nur minimalen Einfluss der i.v.-Anästhetika auf die spontane Zytokinausschüttung. Thiopental und Ketamin unterdrückten die endotoxinstimulierte TNF- $\alpha$ -Ausschüttung, während Propofol zu einer vermehrten

Zytokinausschüttung führte. Auch die IL-10 Konzentrationen konnten durch Inkubation mit Thiopental, Etomidat oder Propofol gesteigert werden [LARSEN 1998].

Song et al. inkubierten Makrophagen mit klinisch gebräuchlichen Propofolkonzentrationen, um anschließend eine mögliche Funktionseinschränkung oder eine Verminderung der Zellzahl zu untersuchen. Die Ergebnisse zeigten keine negativen Einflüsse des Propofols auf das MPS, sodass weder die zytotoxische Aktivität der Immunzellen vermindert, noch die Apoptoserate erhöht war, und Propofol als „immunologisch sicheres“ Medikament deklariert wurde [SONG 2004]. Eine weitere Arbeitsgruppe konnte ebenfalls keinen immunsuppressiven Effekt von Propofol feststellen. Es zeigte sich sogar eher eine Zunahme der T-Helferzellen, deren klinische Bedeutung jedoch erst noch weiter untersucht werden muss [PIRTTIKANGAS 1994].

Bei anderen Zelllinien, beispielsweise promyelotischen HL-60-positiven Zellen, zeigt sich ein anderes Bild. HL-60 Zellen besitzen ähnliche Eigenschaften wie Monozyten und Neutrophile Granulozyten und bieten sich daher als gut erforschte Zelllinie für *in vitro* Untersuchungen zur Apoptose an [YABUKI 2000, ISHII 2002]. Tsuchiya et al. konnten nachweisen, dass Propofol die Apoptose dieser Zellen *in vitro* direkt induziert und somit ein schädigender Einfluss auf Monozyten und Neutrophile Granulozyten *in vivo* nicht ausgeschlossen werden kann [TSUCHIYA 2002].

Eine andere Studie zeigte sowohl eine eingeschränkte *E. coli* – Clearance als auch eine verminderte Phagozytosekapazität von Neutrophilen Granulozyten und Monozyten im Vollblutansatz nach 1-stündiger Inkubation mit hohen Dosen Thiopental, Propofol, Ketamin oder Midazolam. Die Daten von Heller et al. weisen in dieser Studie darauf hin, dass auch klinisch gebräuchliche Konzentrationen dieser Anästhetika einen gewissen immunmodulatorischen Effekt besitzen [HELLER 1998].

### 2.3.3 VOLATILE ANÄSTHETIKA

Auch der Einfluss der volatilen Anästhetika auf das Immunsystem war in den letzten Jahren Gegenstand der immunologischen Forschung. Eine Arbeitsgruppe zeigte, dass Halothan und Lachgas (N<sub>2</sub>O) eine Lymphozytopenie bei Patientinnen verursachten, die sich einer elektiven Hysterektomie unterzogen [REM 1980]. Eine Sevofluran-Narkose wiederum steigerte die Lymphozytenzahl bei gleichzeitiger Abnahme der Neutrophilen Granulozyten. Die Anzahl der Monozyten sowie der Eosinophilen und Basophilen Granulozyten zeigte keine signifikante Veränderung [MORISAKI 1998]. Einige Jahre später beschrieb Loop einen apoptotischen Effekt durch Sevofluran und Isofluran auf T-Lymphozyten, den er auf eine gesteigerte mitochondriale Membranpermeabilität und eine Caspase-3-Aktivierung

zurückführte. Dieser pro-apoptotische Effekt konnte für Desfluran nicht nachgewiesen werden [LOOP 2005]. Bei Ziegeler et al. zeigte sich eine längere postoperative Immunsuppression nach einer balancierten Anästhesie mit Sevofluran oder Desfluran plus Sufentanil im Gegensatz zu einer totalen intravenösen Anästhesie (TIVA) mit Propofol und Sufentanil [ZIEGELER 2006]. Auch Inada et al. konnten einen immunmodulatorischen Effekt der volatilen Anästhetika nachweisen. Hierfür wurde die Anästhesie bei Kraniotomie entweder mit Propofol oder Isofluran aufrechterhalten und anschließend mittels Durchflusszytometrie das TH1/TH2-Verhältnis gemessen. Es zeigte sich eine Abnahme des TH1/TH2-Verhältnisses durch eine gesteigerte TH2-Zellzahl in der Isofluran-Gruppe bei gleichbleibenden Werten in der Propofol-Gruppe [INADA 2004].

Koksal et al. verglichen 2005 die Veränderungen der TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6-Ausschüttung bei Desfluran- und Sevofluran-Anästhesie bei Tympanoplastik. Sie konnten zeigen, dass beide volatilen Anästhetika die Zytokinausschüttung sowohl im Plasma als auch in der bronchoalveolären Lavage steigerten. Diese Ergebnisse waren für Desfluran ausgeprägter als für Sevofluran [KOKSAL 2005].

Boost et al. beschrieben ebenfalls einen immunmodulatorischen Effekt für Desfluran, der zu einer verminderten Ausschüttung von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  in endotoxämischen Ratten führte. Möglicherweise ist hierfür eine Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität durch Desfluran verantwortlich [BOOST 2006].

#### 2.3.4 OPIATE

Auch die mögliche Wirkung von Opiaten auf die Immunantwort wurde in zahlreichen Studien getestet. Hierbei schien sich zunächst ein immunsuppressiver Effekt dieser Substanzklasse abzuzeichnen [YEAGER 1992, YEAGER 1995, PROCOPIO 2001]. So beobachtete Tubaro bereits 1983 eine erhöhte Infektexazerbation bei Morphingabe, die er mit einer verminderten Phagozytenfunktion in Zusammenhang brachte [TUBARO 1983]. Beilin et al. zeigten eine Suppression der NKC-Zytotoxizität durch Fentanyl im perioperativen Verlauf, die sich nach hohen Dosen Fentanyl erst später erholte als nach niedrigen Opiatdosen [BEILIN 1996]. Eine andere Arbeitsgruppe konnte diese Beobachtungen nicht bestätigen. Sie konnte keine Unterschiede in den Konzentrationen von TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-8 und IL-10 abhängig von der Fentanyldosis bei kardiochirurgischen Eingriffen feststellen [BRIX-CHRISTENSEN 1998]. Auch Jacobs et al. konnten bei ihrer Studie an sieben gesunden Probanden keine Immunmodulation nach Fentanylgabe erkennen [JACOBS 1999].

Es gibt wenige Daten zur Immunmodulation durch Remifentanyl. Eine Arbeitsgruppe infundierte 0,02 - 0,04  $\mu$ g/kg KG/min Remifentanyl bei zehn gesunden Probanden über acht

Stunden und konnte anschließend weder eine Abnahme der Zellzahl noch eine verminderte Aktivität der Natürlichen Killerzellen messen [CRONIN 2003].

In einer weiteren Studie zeigte sich sogar eher ein protektiver Effekt von Remifentanyl bei septischen Mäusen. Durch eine kontinuierliche perioperative Gabe von Remifentanyl konnte sowohl der Konzentrationsanstieg von IL-6 und IL-10 als auch der Anstieg der Aktivität der proinflammatorischen Myeloperoxidase signifikant verringert werden [ZONGZE 2010].

Über den Einfluss von Piritramid auf die monozytäre Zytokinausschüttung sind bisher keine Studien veröffentlicht.

### 2.3.5 NOVAMINSULFON

Es gibt sehr wenige Studien, die sich mit dem Einfluss von Novaminsulfon auf die Monozytenfunktion beschäftigen. Krumholz inkubierte Monozyten mit der 0,1fachen, 1fachen und 10fachen Konzentration von Novaminsulfon, die nach einer klinisch wirksamen Bolusgabe im Plasma nachweisbar ist. Anschließend wurde die Monozyten-Chemotaxis bestimmt, wobei erst die 10fache Konzentration zu einer Stimulation der Chemotaxis führte [KRUMHOLZ 2002]. Möglicherweise beruht diese Stimulation auf dem Wirkmechanismus des Novaminsulfons als Cyclooxygenase-Inhibitor. Eine Hemmung dieses Enzyms und die damit verbundene verminderte Prostaglandinsynthese sollen die mikrobiziden Fähigkeiten der Monozyten verstärken [SOARES 2001].

## 2.4 EINFLUSS DES OPERATIVEN TRAUMAS AUF DIE IMMUNFUNKTION

Bereits das operative Trauma an sich führt zu einer Beeinträchtigung der Immunantwort. Studien konnten zeigen, dass Sepsispatienten einen schwereren Verlauf und eine schlechtere Prognose hatten, wenn dem Krankheitsbild ein elektiver operativer Eingriff vorausgegangen war [CHANDRA 2004, BRANAGAN 2005]. Aufgrund der klinischen Relevanz entwickelte Maier eine Klassifikation der abdominellen Sepsis, die zwischen der Typ A Sepsis („Spontaneously acquired abdominal sepsis“) und der Typ B Sepsis („Postoperatively acquired abdominal sepsis“) hinsichtlich Mortalität, Fokussanierung und vorbestehender Immunparalyse unterscheidet [MAIER 2005].

Auch das Ausmaß des operativen Traumas beeinflusst die Immunantwort. Tierexperimentell konnte gezeigt werden, dass sowohl bei Ratten als auch bei Schweinen die Immunfunktion nach laparoskopisch-assistierter Darmresektion besser erhalten war als nach einem offenchirurgischen Vorgehen [BESSLER 1994, ALLENDORF 1996].

Auch in klinischen Studien wurden die Veränderungen des Immunsystems in Abhängigkeit vom chirurgischen Trauma untersucht. Um die konventionelle Cholecystektomie mit dem

---

minimal-invasiven Vorgehen zu vergleichen, wurde in mehreren Untersuchungen IL-6 als Hauptmediator der Akuten-Phase-Reaktion bestimmt. Alle Ergebnisse zeigten postoperativ deutlich höhere IL-6-Serumspiegel nach offenem chirurgischen Vorgehen als nach Laparoskopie [JORIS 1992; CHO 1994; JAKEWAYS 1994; GLASER 1995; MARUSZYNSKI 1995]. Im Gegensatz hierzu konnten bei der laparoskopischen Herniotomie keine signifikanten Unterschiede der IL-6-Konzentrationen im Vergleich zur offenen Herniotomie gemessen werden [HILL 1995].

Andere Studien konnten eine besser erhaltene Zell-vermittelte Immunität nach Laparoskopie als nach Laparotomie beobachten [CAREY 1994]. Redmond et al. berichteten über eine vermehrte Produktion von Superoxid-Anionen durch Monozyten und Neutrophile Granulozyten nach offener Cholecystektomie als nach laparoskopisch-assistierter Operation. Diese Ergebnisse konnten sie in unmittelbarem Zusammenhang mit septischen Komplikationen in der Studiengruppe bringen [REDMOND 1994].

## 2.5 FRAGESTELLUNG

In vielen Studien sind bereits Veränderungen der Immunantwort im Hinblick auf das operative Trauma und die Verabreichung von Medikamenten, die im Rahmen einer Anästhesie eingesetzt werden, beschrieben worden. Unklar bleibt jedoch weiterhin, welchen Einfluss die Auswahl des Anästhesieverfahrens – Regionalanästhesie im Vergleich zur Allgemeinanästhesie – auf die perioperative Monozytenfunktion hat.

Ziel dieser *ex vivo* / *in vitro* Studie war es daher zu klären, ob es Unterschiede gibt zwischen:

1. der unstimulierten und stimulierten Monozytenaktivität bei Allgemeinanästhesie im Vergleich zu einer kombinierten Spinal-Epidural-Anästhesie,
2. der unstimulierten und stimulierten Monozytenaktivität zu unterschiedlichen Zeitpunkten vor, während und nach der Operation bei Allgemeinanästhesie und
3. der unstimulierten und stimulierten Monozytenaktivität zu unterschiedlichen Zeitpunkten vor, während und nach der Operation bei kombinierter Spinal-Epidural-Anästhesie.

### 3. Methodik

#### 3.1. STUDIENDESIGN

Die vorliegende Studie beruht auf der Untersuchung von Blutproben, die von 20 Patienten der Klinik für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie (Direktor: Prof. Dr. med. Dieter Kohn) des Universitätsklinikums des Saarlandes gespendet wurden. Das Forschungsvorhaben wurde von der Ethikkommission bei der Ärztekammer des Saarlandes genehmigt.

Einschlusskriterien waren ein knieendoprothetischer Eingriff in der Klinik für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie sowie eine ASA-Klassifizierung I-III, Volljährigkeit und die schriftliche Einwilligung in die Studienteilnahme. Zu den Ausschlusskriterien zählten chronisch entzündliche Erkrankungen, HLA-B27 assoziierte Erkrankungen, maligne Grunderkrankungen oder Chemotherapie, die präoperative Einnahme von Glukokortikoiden oder Histaminantagonisten, Alkohol-, Medikamenten- oder Drogenabhängigkeit, ASA-Klassifizierung IV, Alter unter 18 Jahren und Ablehnung durch den Patienten.

In dem Aufklärungsgespräch zwischen dem Patienten und dem Anästhesisten wurden beide Anästhesieverfahren sowie der Studienablauf ausführlich beschrieben und erklärt. Falls keine etwaigen Kontraindikationen für ein Regionalverfahren (z. B. Blutungsneigung, blutverdünnende Medikamente oder neurologische Erkrankungen) vorlagen, wurde das schriftliche Einverständnis für beide Anästhesieverfahren eingeholt. Am Operationstag wurde der Patient dann einer der beiden Anästhesiegruppen durch Randomisierung zugeteilt.

Im Einzelnen wurde wie folgt vorgegangen:

- Vorgehen bei Allgemeinanästhesie (ITN):
  - Vorbereitungen: Überwachung der Vitalfunktionen: EKG, nichtinvasive Blutdruckmessung, Pulsoxymetrie, Atemgasmonitoring
  - Anlage eines venösen Zugangs
  - Präoxygenierung
  - Narkoseeinleitung mit 2 µg/ kg KG Fentanyl i.v. und 2 mg/ kg KG Propofol i.v.
  - Muskelrelaxierung mit Succinylcholin 1,5 mg/ kg KG i.v.
  - Narkoseaufrechterhaltung als balancierte Anästhesie mit Desfluran (0,5 MAC) und Remifentanyl (0,25 µg/ kg KG/ min) unter maschineller Beatmung mit einem Sauerstoff/ Luft - Gemisch (FiO<sub>2</sub> 0,5)
  - Postoperative Schmerztherapie mit 0,05 mg/ kg KG Piritramid i.v. und 30 mg/ kg KG Novaminsulfon i.v. bei Hautnaht



- Bei OP-Ende: Frischgasfluss erhöhen ( $\text{FiO}_2$  1,0), Beenden der Narkosemittelzufuhr, Beatmung fortsetzen bis Eigenatmung einsetzt und der Patient erwacht.
- Vorgehen bei kombinierter Spinal-/ Epiduralanästhesie (CSE):
  - Vorbereitungen: Überwachung der Vitalfunktionen: EKG, nichtinvasive Blutdruckmessung, Pulsoxymetrie
  - Anlage eines venösen Zugangs
  - Sauerstoffgabe 3 l/ min über Nasensonde
  - Applikation von ca. 3,0 – 3,5 ml Bupivacain 0,5% isobar in den Subarachnoidalraum
  - Eventuell zusätzliche Applikation von Bupivacain 0,5% isobar über den Periduralkatheter bis eine Anästhesiehöhe von Th 5/6 erreicht ist
  - Postoperativ wird der Periduralkatheter nochmals mit Bupivacain 0,25% bis Th 5/6 zur Schmerztherapie aufgespritzt
- Die perioperative Volumentherapie erfolgte bei beiden Verfahren angepasst an den individuellen Bedarf des Patienten. Postoperativ wurden beide Gruppen auf der orthopädischen Wachstation weiter betreut.

### 3.1.1 PROBENENTNAHME UND PROBENAUFARBEITUNG

Den in die Studie eingeschlossenen Patienten wurde zu insgesamt 6 unterschiedlichen Zeitpunkten Blut aus dem liegenden venösen Zugang entnommen. Die Zeitpunkte waren wie folgt festgelegt:

- T0: direkt vor Narkoseeinleitung
- T1: direkt nach Narkoseeinleitung
- T2: unmittelbar nach der Operation im Aufwachraum
- T3: 6 Stunden nach der Operation
- T4: 24 Stunden nach der Operation
- T5: 48 Stunden nach der Operation

Die Blutentnahme erfolgte über einen venösen Zugang in kommerziell erhältliche Probenröhrchen (Lithium-Heparin-Monovetten, Sarstedt). Bei einem Gesamtvolumen von 4,7 ml enthielten die Probenröhrchen 25 I.E. Heparin / ml Blut. Nach der Entnahme wurden die Proben unmittelbar für den Transport auf Eis gelagert und ohne Unterbrechung bis zur Weiterverarbeitung im Anästhesiologischen Labor gekühlt.

### 3.2 ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

#### 3.2.1 PROBENAUFARBEITUNG FÜR ELISA-ANSÄTZE

Zur Bestimmung der Zytokine im Überstand wurde das entnommene Vollblut mit Rosswell Park Memorial Institute Zellkulturmedium (RPMI 1640 Ready Mix; PAA Laboratories GmbH) im Verhältnis 1:5 unter aseptischen Bedingungen verdünnt.

Das Vollblut-RPMI-Gemisch wurde in doppelten Ansätzen mit je 2 ml Volumen in handelsübliche 24-Well-Platten (Cellstar, Greiner Bio-One) pipettiert und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Zusatz inkubiert. Nach einer Stunde wurde in jeweils einen der Ansätze 2 µl Lipopolysaccharid (LPS) [1µg/ml] (*E. coli* O111:B4, Fa. Sigma Aldrich) zur Stimulation der immunkompetenten Zellen hinzugefügt. Daraufhin wurden die Ansätze für weitere 24 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde der Überstand in Reaktionsgefäße (1,5 ml, Sarstedt) überführt und bis zur Zytokinbestimmung mittels enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) bei -80°C eingefroren.

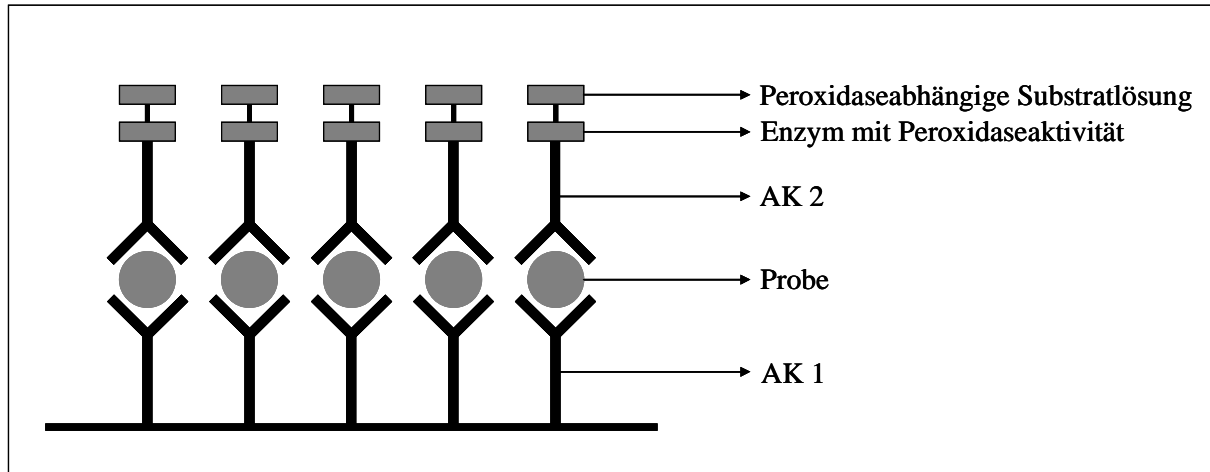
Als ELISA bezeichnet man ein immunologisches Nachweisverfahren, das auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. Mit Hilfe des ELISAs können Proteine, aber auch niedermolekulare Verbindungen wie Hormone oder Toxine in einer Probe quantitativ ermittelt werden.

#### 3.2.2 ZYTOKINBESTIMMUNG MITTELS ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

Die Bestimmung der Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-10 und IL-6 erfolgte mittels ELISA der Firma BD Bioscience (San Diego, Kalifornien, USA). Die Grundlage dieses Tests ist das sog. „Sandwich-Prinzip“. Hierfür wird eine 96-Well-Mikrotiterplatte (Nunc, Dänemark) mit einem dem Zytokin entsprechenden Biotin-gekoppelten Antikörper (AK 1, Coating-Antikörper) beschichtet. An diesen bindet ein Epitop des gesuchten Zytokins. Im Anschluss lagert sich ein Komplex aus einem zweiten Antikörper (AK 2, Detektions-Antikörper) und Enzym mit Peroxidaseaktivität an. Überschüssige Antikörper und unspezifische Bindungen werden nach entsprechenden Inkubationszeiten mithilfe eines standardisierten Waschvorgangs entfernt bzw. gelöst. Abbildung 2 zeigt schematisch das „Sandwich-Prinzip“ des ELISA.

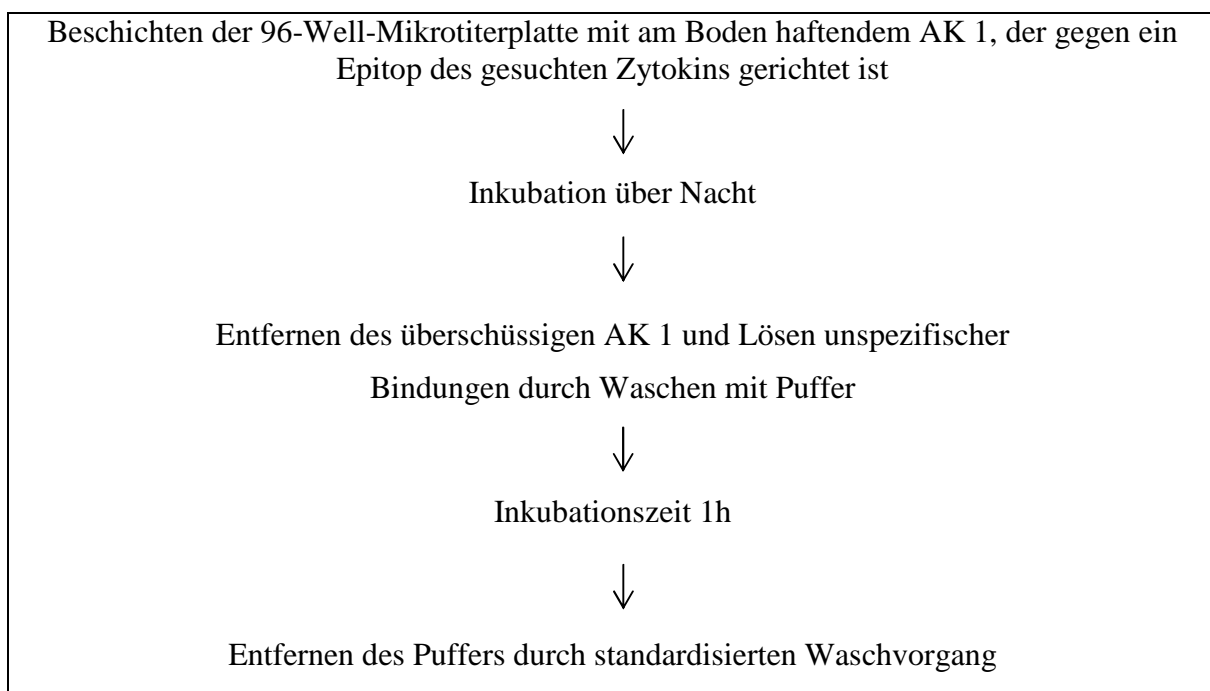
Eine Farbreaktion, die der Menge an Zytokin direkt proportional ist, entwickelt sich durch Zusatz einer peroxidaseabhängigen Substratlösung. Nach Verstreichen einer temperaturabhängigen Inkubationszeit (15-30 min) wird die Farbreaktion mittels Schwefelsäure (1M) gestoppt. Ein Photometer misst die Farbintensität, welche direkt

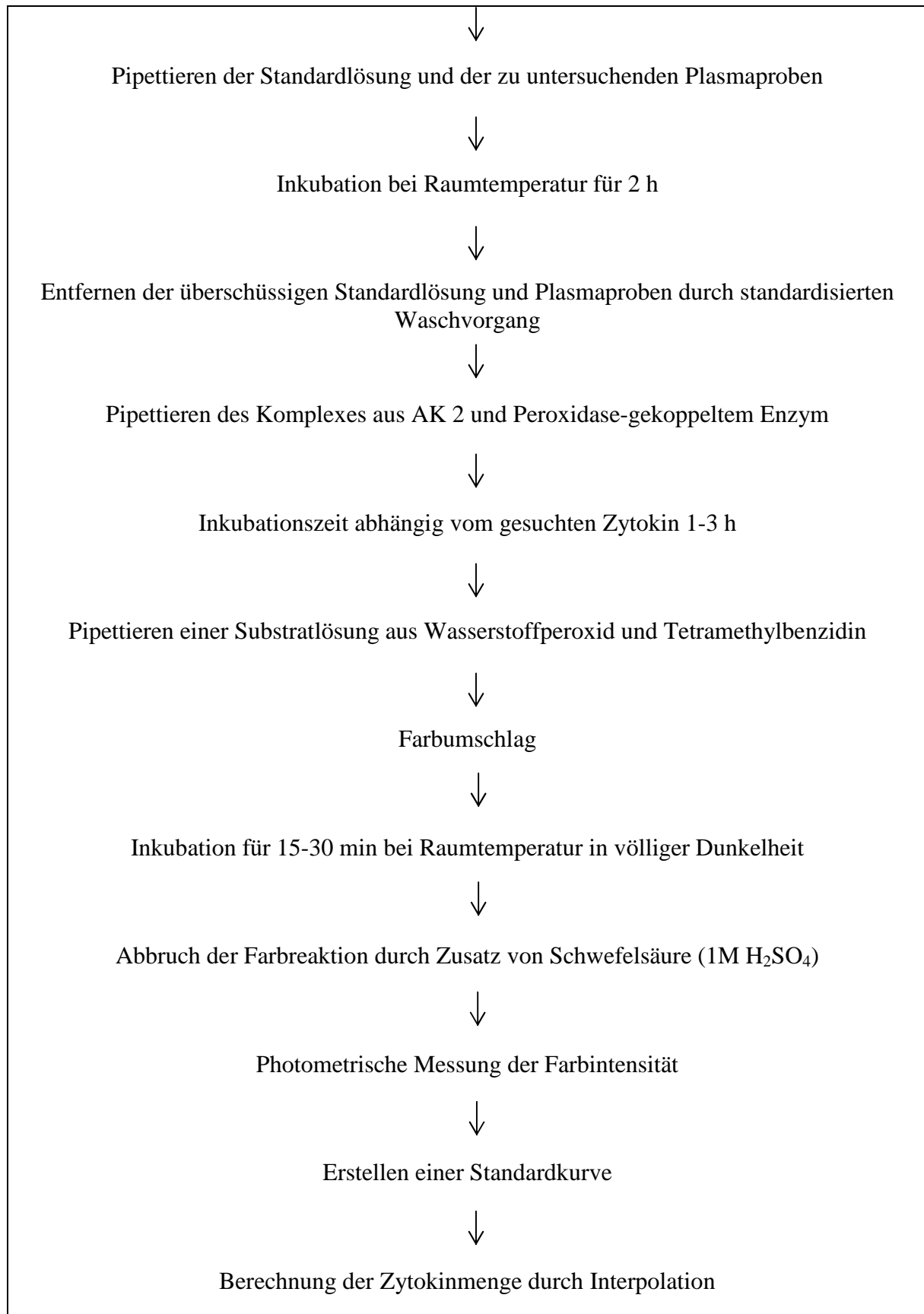
proportional zur enthaltenen Zytokinmenge ist. Durch einen Vergleich der optischen Dichte mit einer Standardkurve kann die Zytokinkonzentration jeder einzelnen Probe ermittelt werden. Abbildung 3 beschreibt detailliert die einzelnen Arbeitsschritte des ELISA.



**Abbildung 2: „Sandwich-Prinzip“ des enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).**

Aus früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe war bekannt, dass eine LPS-Stimulation zu einer Ausschüttung von TNF- $\alpha$  und IL-6 führt, die nicht mehr im linearen Bereich der Standardkurve liegt. Deshalb wurden alle stimulierten Proben für die Bestimmung der TNF- $\alpha$ -Konzentrationen im Verhältnis 1:5 und zur Bestimmung der IL-6-Konzentrationen im Verhältnis 1:1000 verdünnt. Der Verdünnungsfaktor wurde anschließend bei der Berechnung der Zytokinkonzentrationen berücksichtigt. In Tabelle 2 sind die wichtigsten Kenngrößen der verwendeten ELISA-Kits für die Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-10 und IL-6 zusammengefasst.





**Abbildung 3: Enzyme-linked immunosorbent assay.**

Darstellung der einzelnen Arbeitsschritte der Sandwich-ELISA-Technik für TNF- $\alpha$ , IL-10 und IL-6.

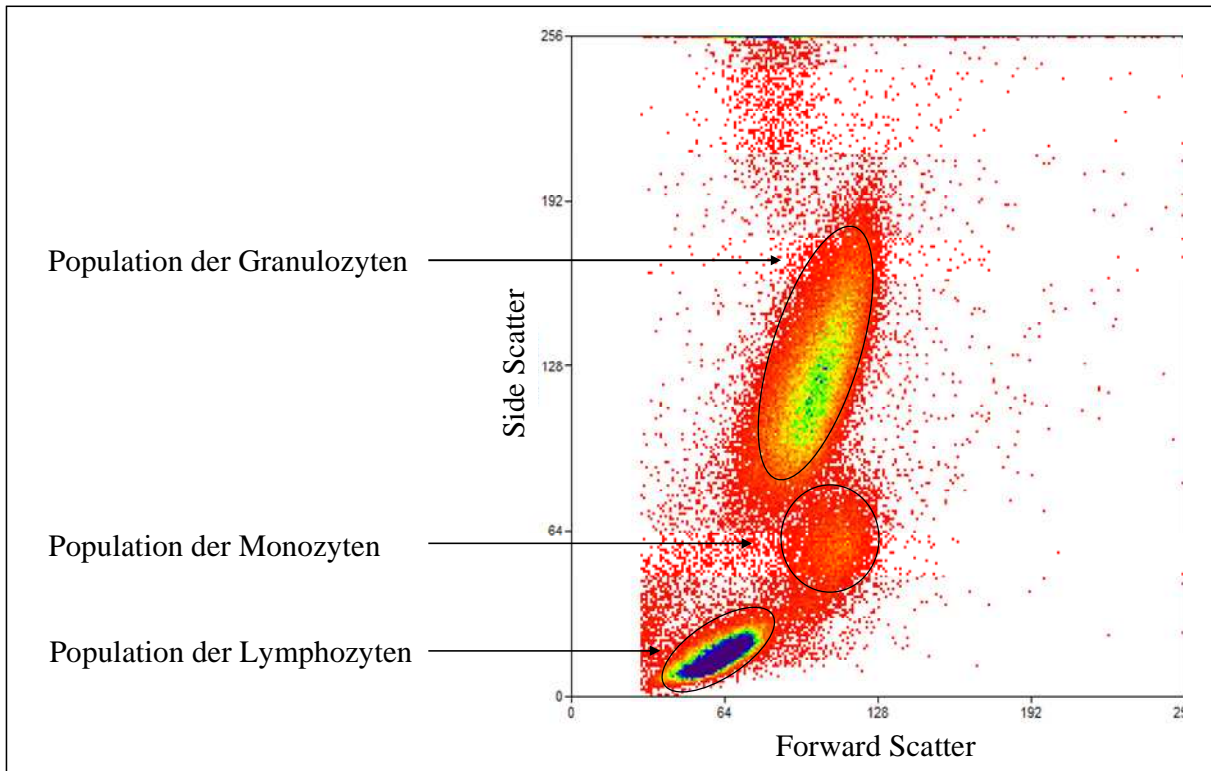
**Tabelle 2: Wichtige Kenngrößen der verwendeten ELISA-Kits [BD OptEIA<sup>TM</sup>].**

	h-TNF- $\alpha$ ELISA	h-IL-10 ELISA	h-IL-6 ELISA
Detektionsgrenze	$\geq 1,7$ pg/ml	$\geq 1,0$ pg/ml	$\geq 2,1$ pg/ml
Intra-Assay Varianz	$< 4,2\%$	$< 2,7\%$	$< 6,9\%$
Inter-Assay Varianz	$< 6,8\%$	$< 10,8\%$	$< 9,6\%$

### 3.3 DURCHFLUSSZYTOMETRIE (FACS)

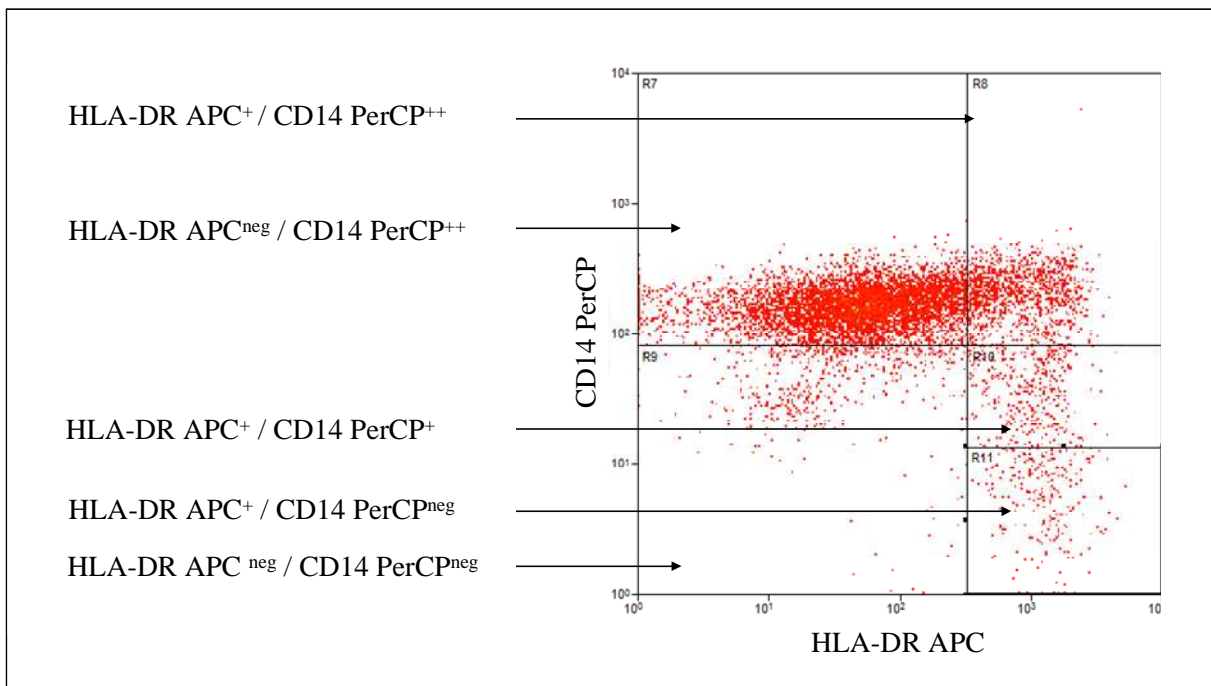
Mit Durchflusszytometrie (FACS = fluorescence-activated cell sorting) werden Zellen anhand ihrer Größe, Granularität und ihrer Oberflächenmoleküle identifiziert. Bei der Messung wird die Zellsuspension angesaugt, mit Überdruck durch eine Düse gespritzt und so eine Hintereinanderreihung von Einzelzellen erreicht. Die mittels des Flüssigkeitsstrahles perlschnurartig aufgereihten Zellen werden mit einer Geschwindigkeit von etwa 6m/s an einem optischen System vorbeigeführt. Zwei Argon-Laser erzeugen Licht mit Wellenlängen von 488 nm und 635 nm, welches rechtwinklig auf die vorbeiströmende Zellsuspension trifft und die markierten Zellen zur Fluoreszenz anregt. Hochsensitive Photomultiplier registrieren das entstehende Streulicht. Das Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC) ist ein Maß für die Beugung des Lichtes und somit für das Volumen einer Zelle. Das Seitwärtsstreulicht (side scatter, SSC) andererseits beschreibt die Brechung des Lichtes und korreliert so mit der Granularität und Topographie einer Zelle. Mittels Bandpass-Filtern für 530 nm (Fluorescein-Isothiocyanat, FITC), 585 nm (Phycocerythrin, PE), 661 nm (Allophycocyanin, APC) und  $>670$  nm (Peridin-Chlorophyll-Protein, PerCP) wird das von den angeregten Fluoreszenzfarbstoffen emittierte Licht gemessen. Ein Computer wertet die optischen Signale aus und stellt sie für die graphische Auswertung bereit. Die Intensität der emittierten Lichtimpulse in einem vorgegebenen Frequenzbereich (Kanal) wird als numerischer Wert wiedergegeben und in einem Histogramm gegen die Anzahl der Zellen mit dieser Fluoreszenzintensität aufgetragen. Die Korrelation zweier Parameter lässt sich durch Darstellung in einem Punktwolkenhistogramm (Dot Plot) zeigen. Beliebige Belegungen der Achsen durch die Streulichtparameter und Fluoreszenzen sind möglich.

Abbildung 4 zeigt die Aufteilung verschiedener Zellpopulationen anhand Größe und Granularität mit Hilfe des forward und side scatter. Anschließend können die einzelnen Untergruppen anhand ihrer Oberflächenmoleküle genauer charakterisiert werden (s. Abbildung 5).



**Abbildung 4: Darstellung der Zellpopulationen mit Forward Scatter (FSC) und Side Scatter (SSC).**

Mit Hilfe des Vorwärts- und des Seitwärtsstreichlichts lassen sich die einzelnen Zellpopulationen anhand ihrer Größe und Granularität bestimmen.



**Abbildung 5: Charakterisierung einer Zellpopulation mittels FACS-Analyse.**

Eine Zellpopulation wird anhand ihrer Oberflächenmoleküle mit Hilfe eines Punktwolkehistogramms in Untergruppen eingeteilt.

### 3.3.1 PROBENAUFARBEITUNG FÜR FACS-ANALYSE

Frisches Patientenblut wurde hierfür zu den festgelegten Zeitpunkten T0, T1, T2, T4 und T5 in Lithium-Heparin-Monovetten (4,7 ml, Sarstedt) entnommen und direkt weiterverarbeitet. Unter aseptischen Bedingungen wurde zu jedem Zeitpunkt ein Vollblutansatz à 350 µl auf eine speziell beschichtete 24-Well-Platte (Costar, Corning Incorporated) pipettiert und zusätzlich direkt mit LPS [0,1 µg/ml] stimuliert.

Nach zweistündiger Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurde auf alle Ansätze Brefeldin A (BFA) [10 µg/ml] pipettiert. Nach BFA-Verabreichung zerfällt der Golgi-Apparat innerhalb weniger Minuten und führt somit zu einem Sekretionsstopp für Proteine. Anschließend wurden die Ansätze für weitere 4 Stunden unter denselben Bedingungen inkubiert. Nach abgeschlossener Inkubation erfolgte die Fixierung und Färbung der Zellen (siehe Abbildung 6).

Die Proben wurden zunächst zweimal mit Hilfe eines sog. FACS-Puffers gewaschen. Anschließend wurden die Monozyten mit folgenden Antikörpern gefärbt:

- Anti – CD14 – PerCp
- Anti – CD86 – PE
- Anti – HLA DR – APC.

Nach 20 min Inkubationszeit wurden die Erythrozyten durch die osmotisch wirksame „BD lysing solution“ und einem weiteren Waschvorgang aus den Ansätzen entfernt.

Zusätzlich zu den inkubierten Ansätzen wurde zu jedem Zeitpunkt ein Ansatz mit 350 µl ohne Inkubation direkt im Anschluss an die Blutentnahme fixiert und gefärbt.

Überführung der inkubierten Ansätze in 15 ml Zentrifugenröhrchen



4 ml FACS- Puffer zugeben



Vortex



6 min bei 1600 rpm zentrifugieren



Überstände abkippen



2 ml FACS- Puffer zugeben



Vortex



6 min bei 1600 rpm zentrifugieren



Überstände abkippen



AK- Gemisch ( je Ansatz: 6µl Anti-CD14-PerCP,  
6µl Anti-CD86-PE und  
2,5µl Anti-HLA DR-APC) hinzugeben



Vortex



20 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubieren



2 ml BD FACS lysing solution zugeben



Vortex (mindestens 10 sec)



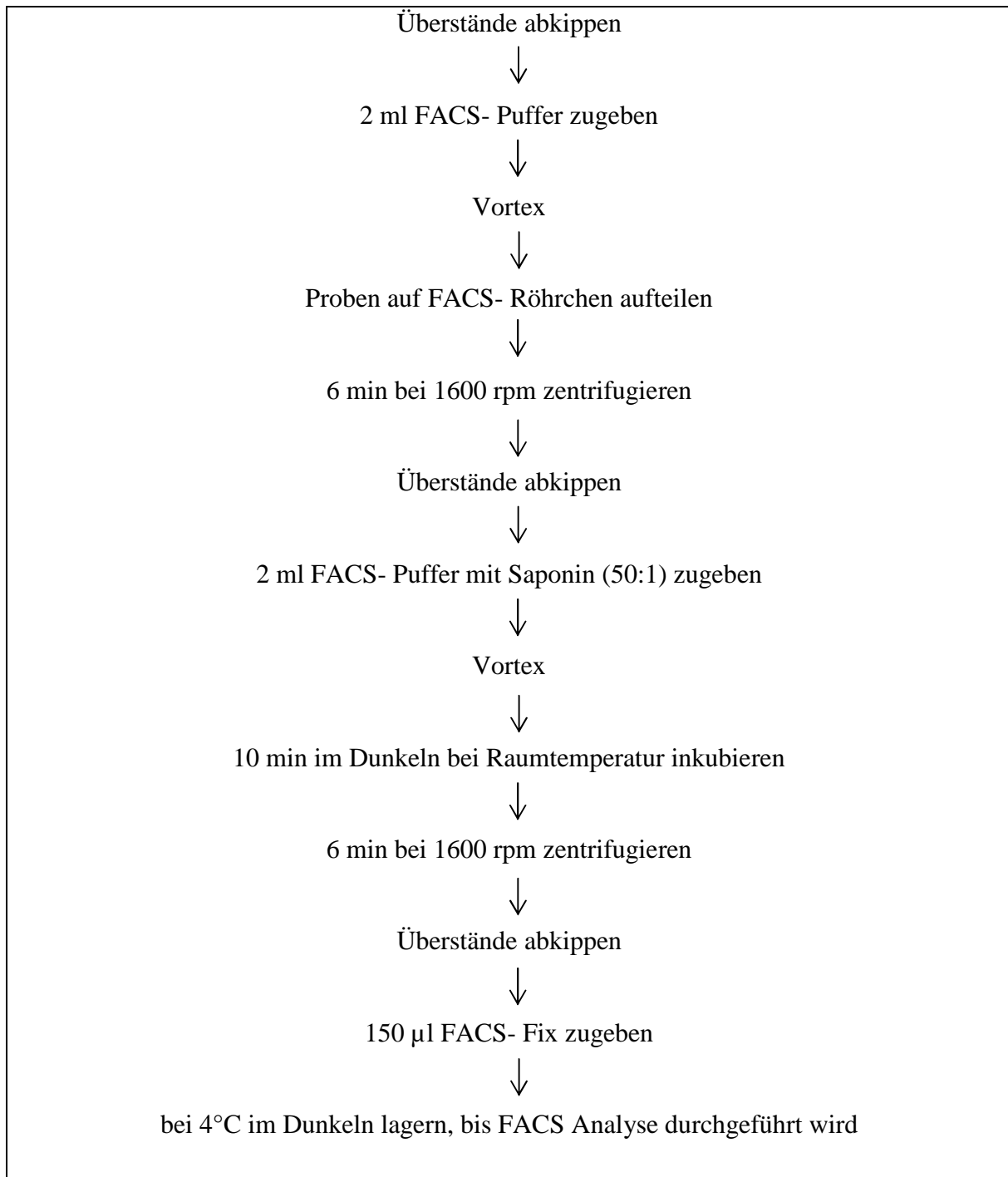
15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubieren



6 min bei 1600 rpm zentrifugieren







**Abbildung 6: Probenaufarbeitung für fluorescence-activated cell sorting.**

Darstellung der einzelnen Arbeitsschritte der Probenaufbereitung für die FACS-Analyse von Monozyten.

### 3.3.2 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE MESSUNG

Für jeden Ausgangswert T0-T2, T4 und T5 wurden 5000 Zellen ausgewertet. Zunächst wurde das Erwartungsfenster der Monozyten in der Punktwolke FCS versus SSC definiert. Anschließend wurden innerhalb dieser Zellpopulation alle CD86-positiven Zellen bestimmt, um ausschließlich Monozyten bzw. Makrophagen in der weiteren Messung berücksichtigen zu können. Die semiquantitative Analyse der CD14-Expressionsdichte erfolgte nach der von Frankenberger beschriebenen Methode [FRANKENBERGER 1996].

### 3.4 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die Auswertung der Ergebnisse zum Nachweis signifikanter Veränderungen erfolgte mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Statistikprogrammes (SigmaStat, Systat Software Inc, San Jose, CA, USA).

Die Daten wurden zunächst auf Normalverteilung geprüft. Waren die Kriterien für eine parametrische Verteilung nicht erfüllt, wurden die entsprechenden nicht-parametrischen Testverfahren (Kruskal-Wallis-Test bzw. Friedmann-Test) angewendet, gefolgt von einem Dunn's post-hoc Test. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0,05$  festgelegt.

Für die graphische Darstellung wurde das Zeichenprogramm SigmaPlot Version 9 verwendet (Systat Software Inc, San Jose, CA, USA). Die Daten wurden als Boxplots mit Median, 25%- und 75%-Quantile, sowie Minimum und Maximum präsentiert.

### 3.5 LABORMATERIALIEN

Die in den Untersuchungen verwendeten Chemikalien waren von der höchst erhältlichen Reinheit (high molecular grade) und sind in Tabelle 3 zusammen mit den verwendeten Materialien alphabetisch aufgelistet.

**Tabelle 3: Labormaterialien.**

24-Well-Platten (ELISA)	24 Well Cell Culture Plate, Cellstar sterile, with lid; Greiner, Bio-One, Frickenhausen
24-Well-Platten (FACS)	Costar, ultra low cluster plate, 24 well with lid flat bottom, ultra low attachment Corning Incorporated, New York, USA
96-Well-Platten	F96 Cert. Maxisorb, Nunc-Immuno Plate Nunc, Roskilde, Dänemark
Anti - CD14 PerCP	CD14 PerCP BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
Anti - CD86-PE	CD86-PE Beckman Coulter, Immunotech, Krefeld
Anti- HLA-DR-APC	HLA-DR-APC Beckman Coulter, Immunotech, Krefeld

BFA	Brefeldin A Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
BSA	Albumin Bovine Serum, Fraction V, $\geq 96\%$ Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Diluent	BD optEIA, Assay Diluent BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
ELISA-Kits	BD optEIA, h-IL-10 / h-TNF-alpha / h-IL-6 ELISA-Set BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
ELISA-Reader	EL800 Bio Tek Instruments, Bad Friedrichshall
ELISA-Software	Gen5 ELISA, Installation Version: 1.00.14 Bio Tek Instruments, Bad Friedrichshall
FACS-Analyzer	BD FACSCalibur flow cytometer BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
FACS fix	BD FACS™ FACS fix BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
FACS-Röhrchen	BD Falcon, 5 ml Polystyrene Round-Bottom Tube, 12x75 mm style BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
FACS-Software	BD CellQuest BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
FBS	Foetal Bovine Serum Gold PAA Laboratories, Rasching
Lithium-Heparin Monovetten	Lithium-Heparin-Gel Monovetten (4,7 ml) Inhalt: Gel/ Präparierungsträger, 25 I.E. Heparin/ ml Blut Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Lysing solution	BD FACS™ Lysing Solution BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
LPS	Aus <i>Escherichia coli</i> O111:B4 Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Natriumazid	NaN <sub>3</sub> Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Reagiergefäße	Eppendorfgefäße, 1,5 ml Sarstedt, Nümbrecht
RPMI	RPMI 1640 with L-Glutamine PAA Laboratories, Rasching
Saponin	Saponin from Quillaja bark Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Substratlösung	BD optEIA TMB Substrate Reagent Set BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
Zentrifugenröhrchen	Röhre 15ml, 120x17 mm PP Sarstedt, Nümbrecht

## 4. Ergebnisse

### 4.1 PATIENTENDATEN

**Tabelle 4: Charakterisierung der Patientengruppen.**

	ITN (n=10)	CSE (n=10)	Signifikanzniveau
Alter [Jahren] Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	70,75 $\pm$ 2,81 (51-85)	70,00 $\pm$ 2,91 (52-84)	Nicht signifikant
Geschlecht	58,3% weiblich 41,7% männlich	50% weiblich 50% männlich	Nicht signifikant
ASA-Klassifikation Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	2,5 $\pm$ 0,52	2,5 $\pm$ 0,52	Nicht signifikant

Während des Untersuchungszeitraums wurden insgesamt 20 Patienten in die Studie eingeschlossen; 10 Patienten pro Gruppe. Tabelle 4 zeigt die demographischen Daten und die ASA-Klassifikation der Patienten. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Studiengruppen hinsichtlich Alter, Geschlecht und ASA-Klassifikation.

#### 4.2 AUSWIRKUNGEN UNTERSCHIEDLICHER ANÄSTHESIEVERFAHREN AUF DIE SPONTANE UND ENDOTOXINSTIMULIERTE TNF- $\alpha$ -FREISETZUNG

Die spontane TNF- $\alpha$ -Ausschüttung erbrachte zu allen postoperativen Beobachtungszeitpunkten signifikant höhere TNF- $\alpha$ -Konzentrationen in der CSE-Gruppe im Vergleich zur ITN-Gruppe (T2, ITN vs. CSE:  $p=0,008$ ; T3, ITN vs. CSE:  $p=0,027$ ; T4, ITN vs. CSE:  $p=0,043$ ; T5, ITN vs. CSE:  $p=0,017$ ) (siehe Tabelle 5 und Abbildung 7).

Die Auswertung der LPS-stimulierten TNF- $\alpha$ -Ausschüttung zeigte relevante Unterschiede der Stimulierbarkeit unmittelbar nach Narkoseeinleitung zwischen den beiden Anästhesieverfahren (T1, ITN vs. CSE:  $p=0,001$ ). Außerdem konnte perioperativ zunächst eine signifikante Abnahme der Stimulierbarkeit (T1 vs. T3:  $p=0,022$ ), sowie eine anschließende postoperative Zunahme der LPS-vermittelten TNF- $\alpha$ -Ausschüttung in der ITN-Gruppe nachgewiesen werden (T3 vs. T5:  $p=0,022$ ) (siehe Tabelle 6 und Abbildung 7).

**Tabelle 5: Absolutwerte der spontanen TNF- $\alpha$ -Freisetzung.**

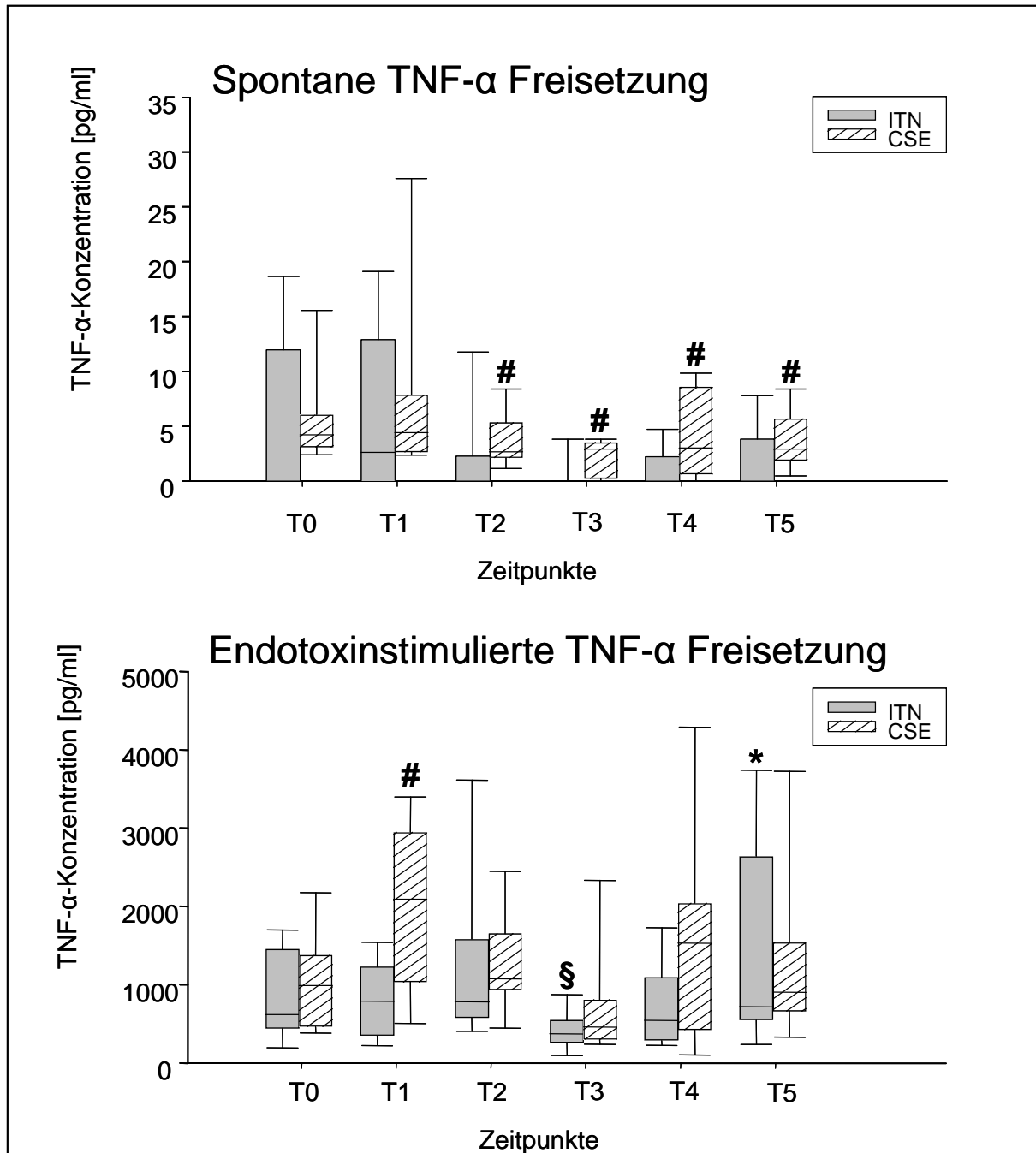
Angegeben sind Median (Med), 25%-Quantile (25%), 75%-Quantile (75%) und Range (R) in pg/ml.

Zeitpunkt	ITN				CSE			
	Med	25%	75%	R	Med	25%	75%	R
T0	0,0	0,0	10,3	20,5	4,2	3,1	5,8	13,2
T1	2,6	0,0	12,6	20,5	4,4	2,6	4,7	26,4
T2	0,0	0,0	2,3	16,5	2,6	2,1	4,6	7,3
T3	0,0	0,0	0,0	3,8	2,9	0,3	3,4	3,8
T4	0,0	0,0	1,4	5,3	3,0	0,8	8,4	9,9
T5	0,0	0,0	3,8	8,4	2,9	2,4	5,1	8,0

**Tabelle 6: Absolutwerte der endotoxinstimulierten TNF- $\alpha$ -Freisetzung.**

Angegeben sind Median (Med), 25%-Quantile (25%), 75%-Quantile (75%) und Range (R) in pg/ml.

Zeitpunkt	ITN				CSE			
	Med	25%	75%	R	Med	25%	75%	R
T0	618,6	448,1	1306,4	1553,2	989,5	489,8	1372,1	1883,2
T1	788,5	353,0	1169,7	1510,9	2090,5	1186,4	2839,2	2919,4
T2	781,1	604,4	1391,2	4347,8	1074,9	971,4	1561,1	2104,2
T3	372,2	262,1	521,7	954,9	458,3	304,6	689,9	2092,0
T4	540,5	299,5	930,6	1536,3	1533,9	528,6	1991,7	4421,5
T5	717,5	574,0	2306,7	3606,2	902,8	752,3	1377,4	3590,9



**Abbildung 7: Unstimulierte und endotoxinstimulierte TNF- $\alpha$ -Ausschüttung.**

Angegeben sind Median mit 25%- und 75%-Quantile der Zytokinkonzentration in pg/ml zu den jeweiligen Messzeitpunkten.

#  $p < 0,05$  vs. ITN; §  $p < 0,05$  vs. T1; \*  $p < 0,05$  vs. T3.

### 4.3 AUSWIRKUNGEN UNTERSCHIEDLICHER ANÄSTHESIEVERFAHREN AUF DIE SPONTANE UND DIE ENDOTOXINSTIMULIERTE IL-10-FREISETZUNG

Die statistische Auswertung der spontanen IL-10-Freisetzung erbrachte keine signifikanten Ergebnisse (siehe Tabelle 7 und Abbildung 8).

Die Untersuchung der IL-10-Konzentrationen in den LPS-stimulierten Proben zeigte sowohl zwischen den beiden Anästhesieverfahren als auch innerhalb der ITN-Gruppe statistisch signifikante Unterschiede:

So zeigte sich eine geringere IL-10-Ausschüttung in der ITN-Gruppe verglichen mit der CSE-Gruppe unmittelbar nach Narkoseeinleitung (T1, ITN vs. CSE:  $p=0,037$ ) sowie 6 Stunden postoperativ (T3, ITN vs. CSE:  $p=0,008$ ).

Des Weiteren konnte eine statistisch relevante Abnahme der endotoxinstimulierten IL-10-Ausschüttung innerhalb der ITN-Gruppe 6 Stunden nach dem operativen Eingriff ermittelt werden (T0 vs. T3:  $p=0,029$ ) (siehe Tabelle 8 und Abbildung 8).

#### **Tabelle 7: Absolutwerte der spontanen IL-10-Freisetzung.**

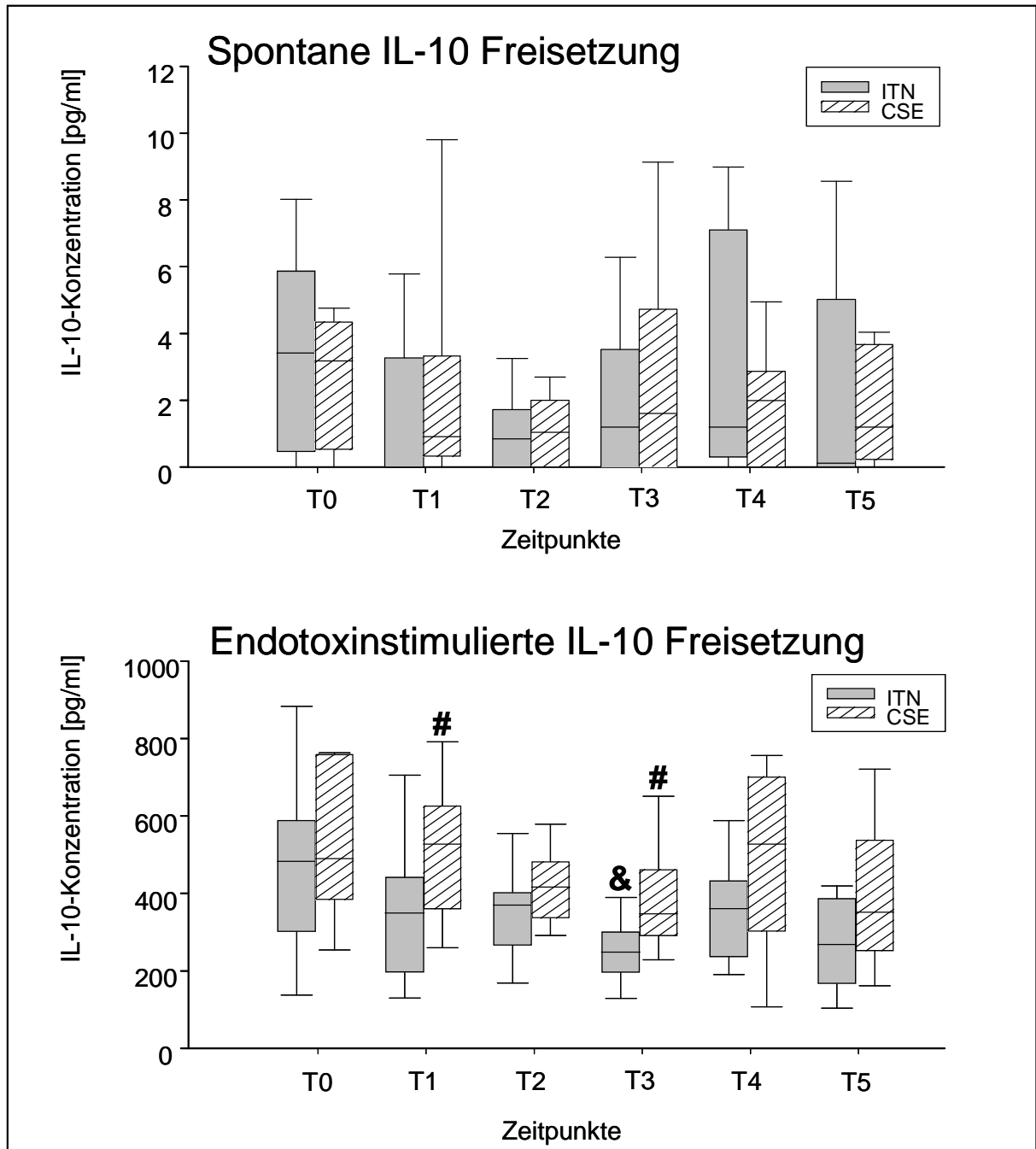
Angegeben sind Median (Med), 25%-Quantile (25%), 75%-Quantile (75%) und Range (R) in pg/ml.

Zeitpunkt	ITN				CSE			
	Med	25%	75%	R	Med	25%	75%	R
T0	3,4	0,7	5,7	8,1	3,2	0,7	4,2	4,8
T1	0,0	0,0	3,3	6,7	0,9	0,4	1,8	10,0
T2	0,8	0,0	1,5	3,3	1,0	0,0	1,9	2,7
T3	1,2	0,0	2,7	6,5	1,6	0,0	4,0	9,4
T4	1,2	0,4	6,6	9,5	2,0	0,0	2,7	5,1
T5	0,1	0,0	4,8	9,1	1,2	0,3	3,6	4,0

#### **Tabelle 8: Absolutwerte der endotoxinstimulierten IL-10-Freisetzung.**

Angegeben sind Median (Med), 25%-Quantile (25%), 75%-Quantile (75%) und Range (R) in pg/ml.

Zeitpunkt	ITN				CSE			
	Med	25%	75%	R	Med	25%	75%	R
T0	483,1	313,7	561,9	814,9	489,6	392,7	759,0	521,1
T1	349,3	210,9	407,5	699,2	526,8	376,9	612,9	551,2
T2	370,5	276,7	392,6	520,5	416,2	338,5	470,5	298,0
T3	248,4	201,0	292,9	307,5	347,9	296,4	440,0	441,0
T4	360,8	245,7	417,9	487,0	527,5	331,2	686,0	661,0
T5	268,1	174,2	386,3	342,9	351,7	263,9	533,1	584,4



**Abbildung 8: Unstimulierte und endotoxinstimulierte IL-10-Ausschüttung.**

Angegeben sind Median mit 25%- und 75%-Quantile der Zytokinkonzentration in pg/ml zu den jeweiligen Messzeitpunkten.

#  $p < 0,05$  vs. ITN; &  $p < 0,05$  vs. T0.



#### 4.4 AUSWIRKUNGEN UNTERSCHIEDLICHER ANÄSTHESIEVERFAHREN AUF DIE SPONTANE UND DIE ENDOTOXINSTIMULIERTE IL-6-FREISETZUNG

Die Bestimmung der spontanen IL-6-Ausschüttung führte zu signifikanten Ergebnissen:

Es zeigte sich bei nahezu identischen Zytokinkonzentrationen vor Einleitung (T0) in beiden Untersuchungsgruppen eine signifikant größere Zytokinausschüttung bei den Patienten mit Vollnarkose im Vergleich zum Regionalverfahren unmittelbar nach Narkoseeinleitung (T1, ITN vs. CSE:  $p=0,032$ ) sowie 24 Stunden postoperativ (T4, ITN vs. CSE:  $p=0,011$ ).

Grundsätzlich ließ sich in beiden Gruppen eine Tendenz zu einer geringeren IL-6-Ausschüttung am operativen Tag beobachten, die in der CSE-Gruppe auch bis zum zweiten postoperativen Tag (T5) anhielt. In der ITN-Gruppe stieg die Zytokinausschüttung jedoch bereits 24 Stunden postoperativ wieder an (siehe Tabelle 9 und Abbildung 9).

Die Bestimmung der IL-6 Konzentrationen in den endotoxinstimulierten Proben führte zu keinen statistisch relevanten Unterschieden (siehe Tabelle 10 und Abbildung 9).

##### **Tabelle 9: Absolutwerte der spontanen IL-6-Freisetzung.**

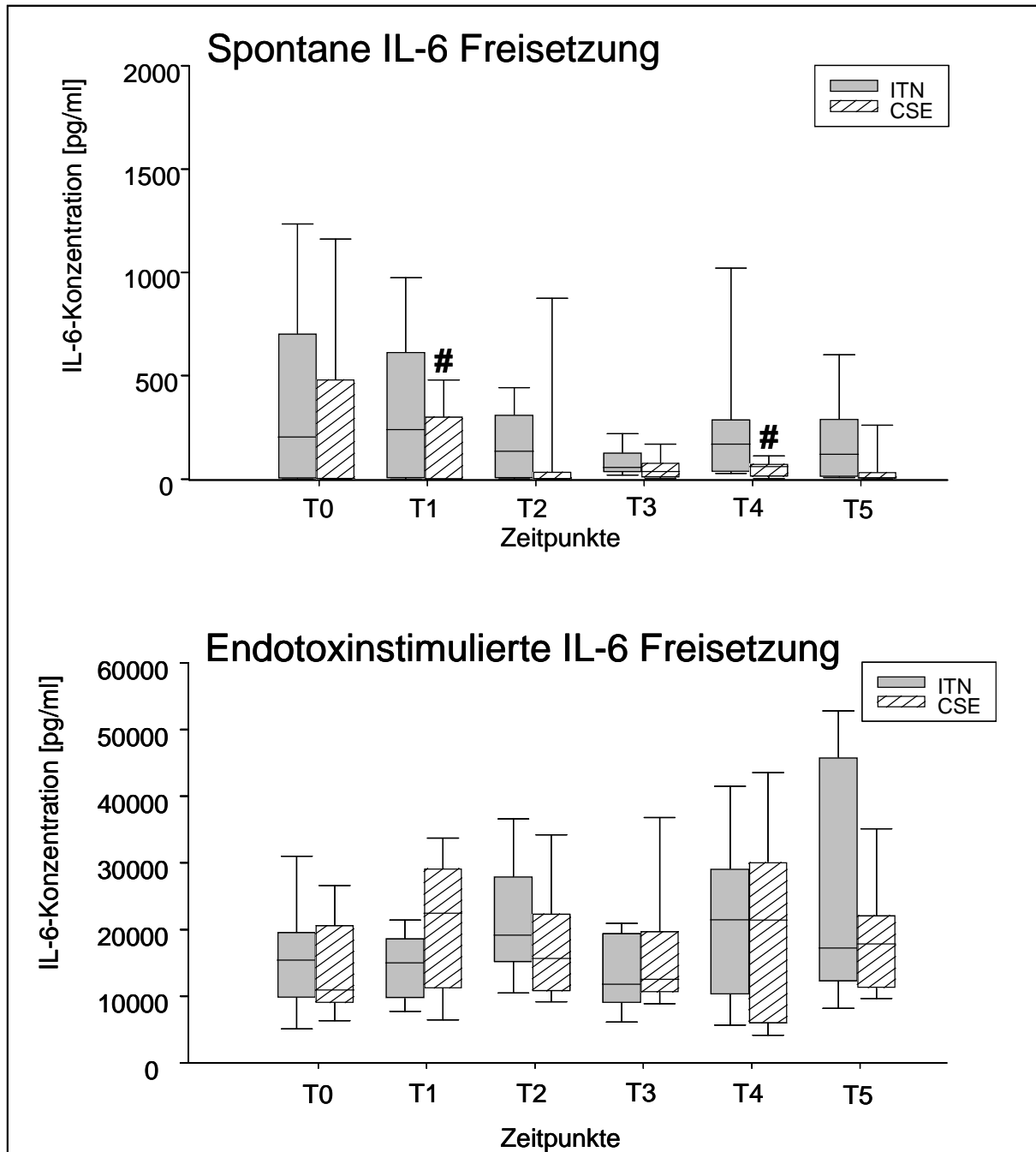
Angegeben sind Median (Med), 25%-Quantile (25%), 75%-Quantile (75%) und Range (R) in pg/ml.

Zeitpunkt	ITN				CSE			
	Med	25%	75%	R	Med	25%	75%	R
T0	203,9	4,4	680,8	1433,2	2,9	0,0	385,2	1248,2
T1	238,7	6,8	602,7	1110,5	0,0	0,0	225,4	500,0
T2	132,8	6,0	302,5	458,9	1,7	0,3	28,5	1042,0
T3	55,5	34,2	122,4	209,2	36,2	11,2	72,6	174,1
T4	168,6	37,2	277,8	1130,8	59,1	13,6	71,5	117,4
T5	119,1	11,4	287,3	719,9	5,7	3,8	27,8	285,0

##### **Tabelle 10: Absolutwerte der endotoxinstimulierten IL-6-Freisetzung.**

Angegeben sind Median (Med), 25%-Quantile (25%), 75%-Quantile (75%) und Range (R) in pg/ml.

Zeitpunkt	ITN				CSE			
	Med	25%	75%	R	Med	25%	75%	R
T0	15421,5	10560,0	19567,0	27959,0	10906,0	9283,0	19418,0	20781,0
T1	15029,0	9990,0	18212,5	15215,0	22452,0	12473,0	29055,0	27825,0
T2	19126,0	15826,3	27651,0	31322,0	15660,0	11058,0	20130,0	25708,0
T3	11780,0	9419,3	19346,5	15810,0	12512,5	10648,0	18102,0	29496,0
T4	21487,0	10712,8	28529,5	40782,0	21415,0	5961,0	27602,0	40293,0
T5	17227,0	12617,0	45621,0	48218,0	17855,5	11357,0	19845,0	26305,0



**Abbildung 9: Unstimulierte und endotoxinstimulierte IL-6-Ausschüttung.**

Angegeben sind Median mit 25%- und 75%-Quantile der Zytokinkonzentration in pg/ml zu den jeweiligen Messzeitpunkten.

#  $p < 0,05$  vs. ITN.

#### 4.5 AUSWIRKUNGEN UNTERSCHIEDLICHER ANÄSTHESIEVERFAHREN AUF DIE MONOZYTÄRE CD14 – EXPRESSION IM SPONTANVERLAUF

Bei der statistischen Auswertung zeigten sich signifikante Unterschiede der monozytären CD14 – Expression im Spontanverlauf.

Der prozentuale Anteil der CD14<sup>++</sup> Monozyten war sowohl 24 Stunden als auch 48 Stunden postoperativ in der CSE-Gruppe signifikant größer als in der ITN-Gruppe (CSE vs. ITN, T4: p=0,031, T5: p=0,010).

In der ITN-Gruppe ergaben sich keine signifikanten Unterschiede während des Beobachtungszeitraums für die Anzahl der CD14<sup>++</sup> Zellen.

In der CSE-Gruppe zeigte sich sowohl 24 Stunden als auch 48 Stunden postoperativ eine signifikante Zunahme der CD14<sup>++</sup> Monozyten im Vergleich zu unmittelbar vor und nach Narkoseeinleitung (CSE T4 und T5 vs. T0 und T1, p<0,05), die 48 Stunden postoperativ sogar signifikant größer war als die Zunahme unmittelbar nach der Operation im AWR (CSE T5 vs. T2, p<0,05) (siehe Tabelle 11 und Abbildung 10).

Die CD14<sup>+</sup>-Fraktion zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Anästhesieverfahren und keine relevanten Veränderungen in der ITN-Gruppe während des Beobachtungszeitraums.

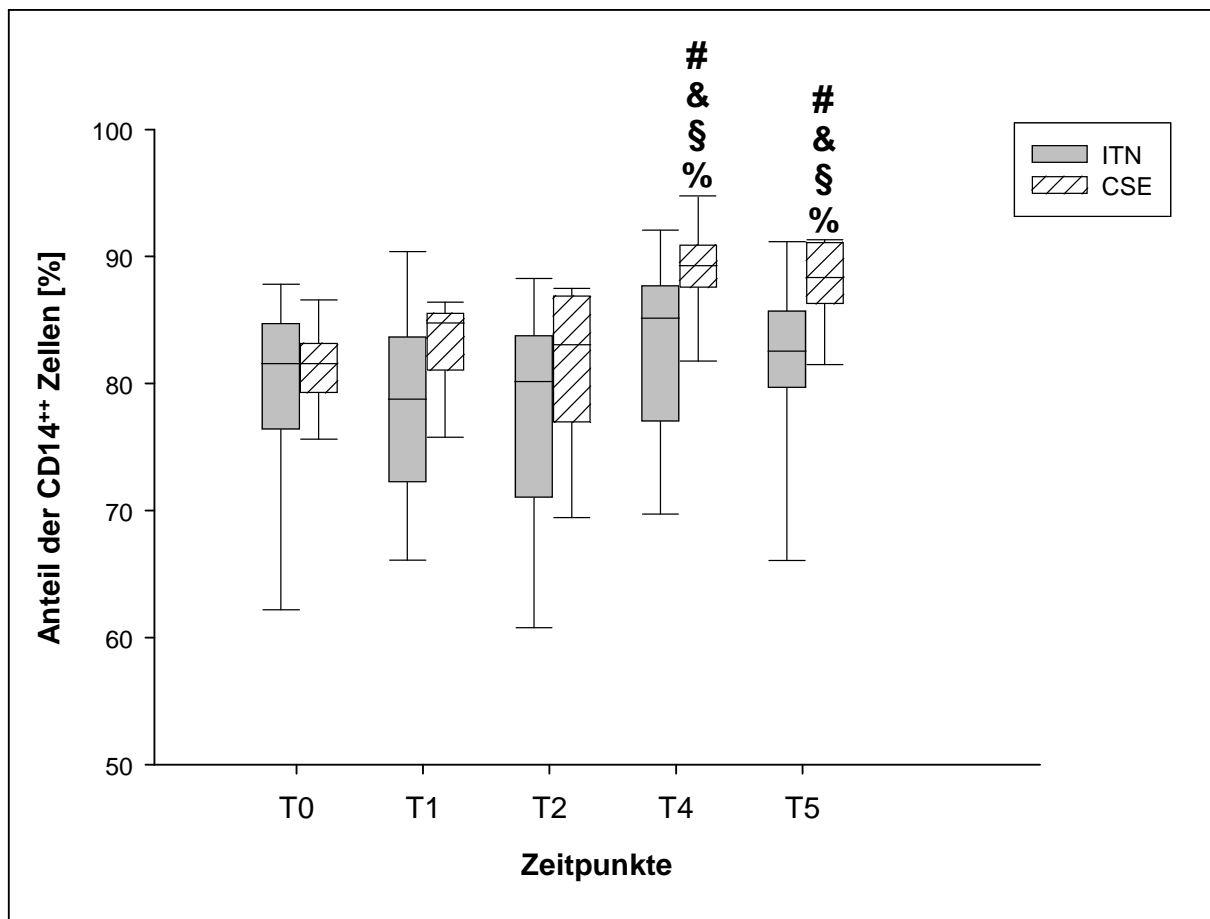
Während der Etablierung der Regionalanästhesie zeigte sich unmittelbar nach Anästhesiebeginn ein signifikanter Abfall der CD14<sup>+</sup> Zellen im Vergleich zu vor Einleitung (CSE T1 vs. T0, p<0,05). Im weiteren Verlauf verminderte sich der prozentuale Anteil dieser Zellen weiterhin am ersten und zweiten postoperativen Tag in dieser Population (CSE T4 und T5 vs. T0, T1 und T2, p<0,05) (siehe Tabelle 12 und Abbildung 11).

Die quantitative Auswertung der Anzahl der CD14<sup>neg</sup> Monozyten ergab beim Vergleich der beiden Anästhesieverfahren keine signifikanten Unterschiede.

Der prozentuale Anteil der CD14<sup>neg</sup> Zellen nahm sowohl in der ITN-Gruppe als auch in der CSE-Gruppe an den beiden postoperativen Tagen signifikant ab verglichen mit den Messwerten des operativen Tages (ITN und CSE T4 und T5 vs. T0, T1 und T2, p<0,05) (siehe Tabelle 13 und Abbildung 12).

**Tabelle 11: Prozentuale Verteilung der monozytären CD14<sup>++</sup> Zellen im Spontanverlauf.**  
 Angegeben sind Median (Med), 25%-Quantile (25%), 75%-Quantile (75%) und Range (R) in %.

Zeitpunkt	ITN				CSE			
	Med	25%	75%	R	Med	25%	75%	R
T0	81,6	76,9	84,8	28,2	81,6	79,5	82,8	11,5
T1	78,8	73,4	83,3	26,2	84,8	81,6	85,4	11,0
T2	80,2	72,9	83,7	29,2	83,0	77,6	86,8	18,7
T3	85,1	78,6	87,6	23,6	89,3	87,8	90,8	13,9
T4	82,6	79,8	85,7	28,6	88,3	86,3	91,1	10,4
T5	81,6	76,9	84,8	28,2	81,6	79,5	82,8	11,5



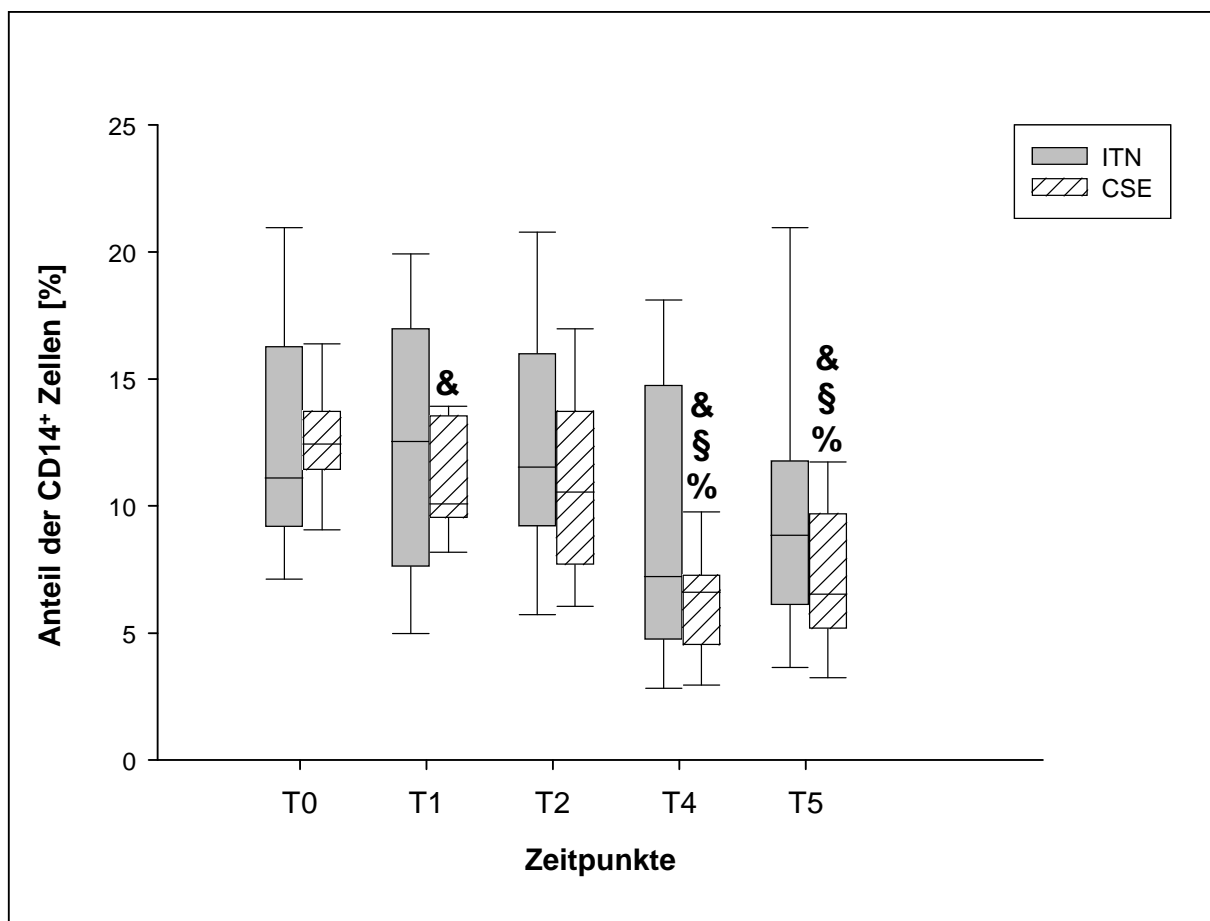
**Abbildung 10: Prozentuale Verteilung der monozytären CD14<sup>++</sup> Zellen im Spontanverlauf.**

Angegeben sind Median mit 25%- und 75%-Quantile des prozentualen Anteils der CD14<sup>++</sup> Subpopulation zu den jeweiligen Messzeitpunkten.

# p < 0,05 vs. ITN; & p < 0,05 vs. T0; § p < 0,05 vs. T1; % p < 0,05 vs. T2.

**Tabelle 12: Prozentuale Verteilung der monozytären CD14<sup>+</sup> Zellen im Spontanverlauf.**  
 Angegeben sind Median (Med), 25%-Quantile (25%), 75%-Quantile (75%) und Range (R) in %.

Zeitpunkt	ITN				CSE			
	Med	25%	75%	R	Med	25%	75%	R
T0	11,1	9,3	15,7	14,3	12,4	11,8	13,6	7,7
T1	12,5	8,5	16,7	15,4	10,1	9,6	13,5	5,9
T2	11,5	9,3	15,4	16,7	10,5	8,0	12,9	11,1
T3	7,2	5,1	13,4	15,9	6,6	4,6	7,2	7,2
T4	8,9	6,6	11,3	19,3	6,5	5,4	9,4	8,8
T5	11,1	9,3	15,7	14,3	12,4	11,8	13,6	7,7



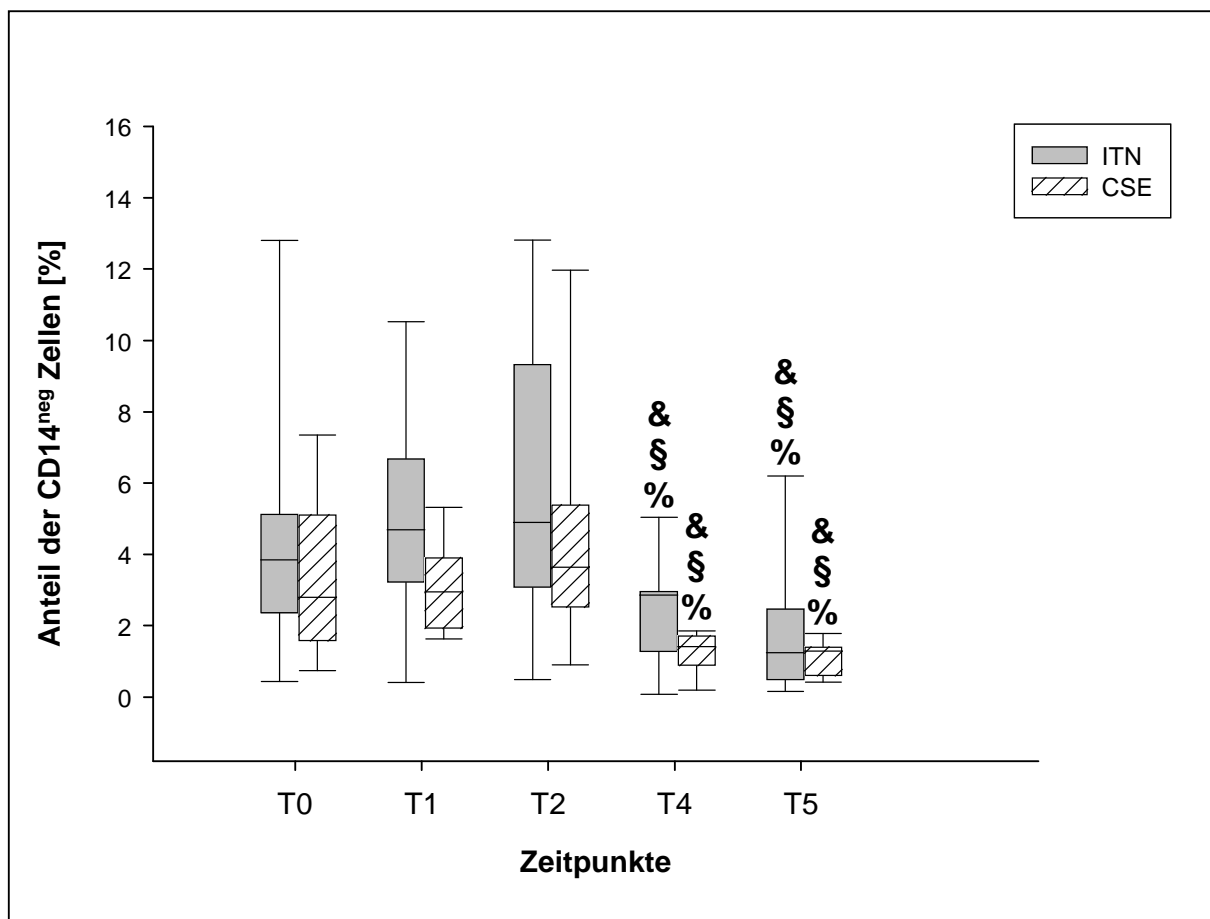
**Abbildung 11: Prozentuale Verteilung der monozytären CD14<sup>+</sup> Zellen im Spontanverlauf.**

Angegeben sind Median mit 25%- und 75%-Quantile des prozentualen Anteils der CD14<sup>+</sup> Subpopulation zu den jeweiligen Messzeitpunkten.

& p<0,05 vs. T0; § p<0,05 vs. T1; % p<0,05 vs. T2.

**Tabelle 13: Prozentuale Verteilung der monozytären CD14<sup>neg</sup> Zellen im Spontanverlauf.** Angegeben sind Median (Med), 25%-Quantile (25%), 75%-Quantile (75%) und Range (R) in %.

Zeitpunkt	ITN				CSE			
	Med	25%	75%	R	Med	25%	75%	R
T0	3,9	2,5	4,9	13,9	2,8	1,7	5,0	6,9
T1	4,7	3,3	6,4	11,0	3,0	2,0	3,5	3,7
T2	4,9	3,1	8,5	12,9	3,6	2,8	5,2	11,8
T3	2,9	1,4	3,0	5,0	1,4	1,1	1,7	1,7
T4	1,2	0,6	2,4	6,9	1,3	0,6	1,4	1,4
T5	3,9	2,5	4,9	13,9	2,8	1,7	5,0	6,9



**Abbildung 12: Prozentuale Verteilung der monozytären CD14<sup>neg</sup> Zellen im Spontanverlauf.**

Angegeben sind Median mit 25%- und 75%-Quantile des prozentualen Anteils der CD14<sup>neg</sup> Subpopulation zu den jeweiligen Messzeitpunkten.

& p<0,05 vs. T0; § p<0,05 vs. T1; % p<0,05 vs. T2.

#### 4.6 AUSWIRKUNGEN UNTERSCHIEDLICHER ANÄSTHESIEVERFAHREN AUF DIE MONOZYTÄRE CD14 – EXPRESSION NACH ENDOTOXINSTIMULATION

Die Auswertung der endotoxinstimulierten Werte für die monozytäre CD14-Rezeptor Expression erbrachte signifikante Ergebnisse.

Der prozentuale Anteil der CD14<sup>++</sup> Zellen unterschied sich nicht signifikant beim Vergleich der beiden Anästhesieverfahren, und er veränderte sich auch nicht signifikant in der ITN-Gruppe während des Beobachtungszeitraumes.

In der CSE-Gruppe nahm der Anteil der CD14<sup>++</sup> Zellen zum ersten postoperativen Tag signifikant zu verglichen mit allen vorherigen Zeitpunkten (CSE T4 vs T0, T1 und T2,  $p < 0,05$ ) (siehe Tabelle 14 und Abbildung 13).

Für die monozytäre CD14<sup>+</sup> Population ergaben sich keine Signifikanzen zwischen den Anästhesieverfahren oder den Zeitpunkten der ITN-Gruppe.

Für die CSE-Gruppe zeigte sich eine signifikante Abnahme der CD14<sup>+</sup> Population zu allen Zeitpunkten nach Etablierung der Regionalanästhesie verglichen mit dem Ausgangswert vor Anästhesiebeginn (CSE T1, T2, T4 und T5 vs. T0,  $p < 0,05$ ). Des Weiteren konnten wir eine signifikante Verringerung des prozentualen Anteils der CD14<sup>+</sup> Zellen 24 Stunden postoperativ im Vergleich zu nach Anästhesiebeginn und unmittelbar postoperativ feststellen (CSE T4 vs. T1 und T2,  $p < 0,05$ ). Diese Reduktion hielt auch bis 48 Stunden postoperativ an (CSE T5 vs. T2,  $p < 0,05$ ) (siehe Tabelle 15 und Abbildung 14).

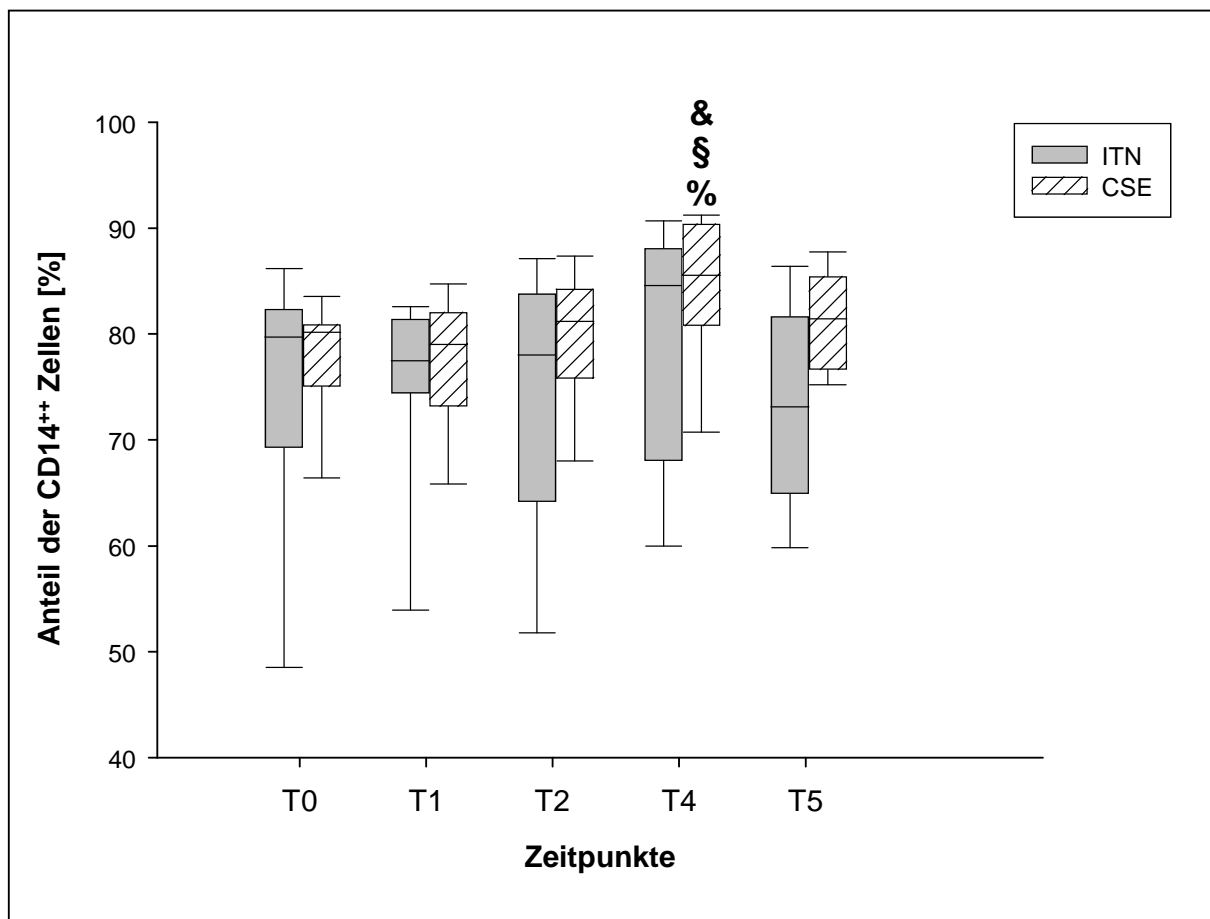
Die CD14<sup>neg</sup> Monozytenfraktion in der ITN-Gruppe zeigte einen signifikanten Abfall 24 Stunden postoperativ im Vergleich zu unmittelbar postoperativ (ITN T4 vs. T2,  $p = 0,024$ ). Im weiteren postoperativen Verlauf blieb der Anteil der CD14<sup>neg</sup> Monozyten innerhalb der ITN-Gruppe vermindert (ITN T5 vs. T0, T1 und T2,  $p < 0,05$ ).

Innerhalb der CSE-Gruppe konnten wir eine signifikante Abnahme der CD14<sup>neg</sup> Population an beiden postoperativen Tagen feststellen (CSE T4 und T5 vs. T0, T1 und T2,  $p < 0,05$ ) (siehe Tabelle 16 und Abbildung 15).

**Tabelle 14: Prozentuale Verteilung der monozytären CD14<sup>++</sup> Zellen nach Endotoxinstimulation.**

Angegeben sind Median (Med), 25%-Quantile (25%), 75%-Quantile (75%) und Range (R) in %.

Zeitpunkt	ITN				CSE			
	Med	25%	75%	R	Med	25%	75%	R
T0	79,7	70,0	82,3	40,2	80,2	77,2	80,8	17,6
T1	77,5	74,4	81,1	30,6	79,0	73,7	81,4	19,6
T2	78,1	64,7	83,4	36,3	81,2	77,6	84,1	19,9
T3	84,6	68,1	88,0	31,7	85,6	83,8	90,3	20,6
T4	73,1	66,0	81,6	27,5	81,4	76,8	85,2	12,8
T5	79,7	70,0	82,3	40,2	80,2	77,2	80,8	17,6



**Abbildung 13: Prozentuale Verteilung der monozytären CD14<sup>++</sup> Zellen nach Endotoxinstimulation.**

Angegeben sind Median mit 25%- und 75%-Quantile des prozentualen Anteils der CD14<sup>++</sup> Subpopulation zu den jeweiligen Messzeitpunkten.

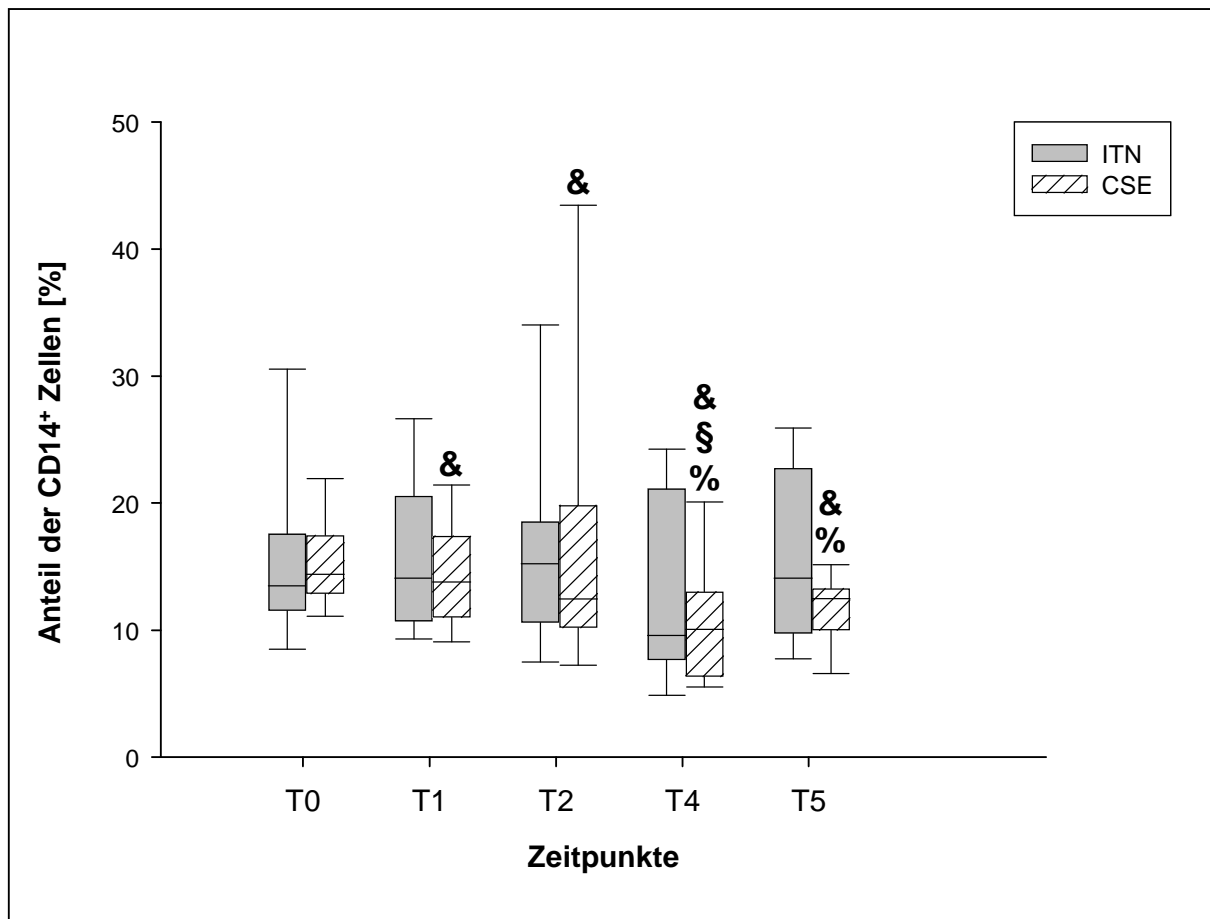
&  $p < 0,05$  vs. T0; §  $p < 0,05$  vs. T1; %  $p < 0,05$  vs. T2.



**Tabelle 15: Prozentuale Verteilung der monozytären CD14<sup>+</sup> Zellen nach Endotoxinstimulation.**

Angegeben sind Median (Med), 25%-Quantile (25%), 75%-Quantile (75%) und Range (R) in %.

Zeitpunkt	ITN				CSE			
	Med	25%	75%	R	Med	25%	75%	R
T0	13,5	11,7	17,0	23,9	14,4	13,1	17,4	11,4
T1	14,1	10,8	19,7	18,4	13,8	11,0	17,3	13,0
T2	15,2	10,6	18,1	28,9	12,5	10,4	19,7	39,0
T3	9,6	7,7	20,5	20,4	10,1	6,5	11,2	14,8
T4	14,1	10,2	21,1	18,9	12,5	10,2	13,3	9,1
T5	13,5	11,7	17,0	23,9	14,4	13,1	17,4	11,4



**Abbildung 14: Prozentuale Verteilung der monozytären CD14<sup>+</sup> Zellen nach Endotoxinstimulation.**

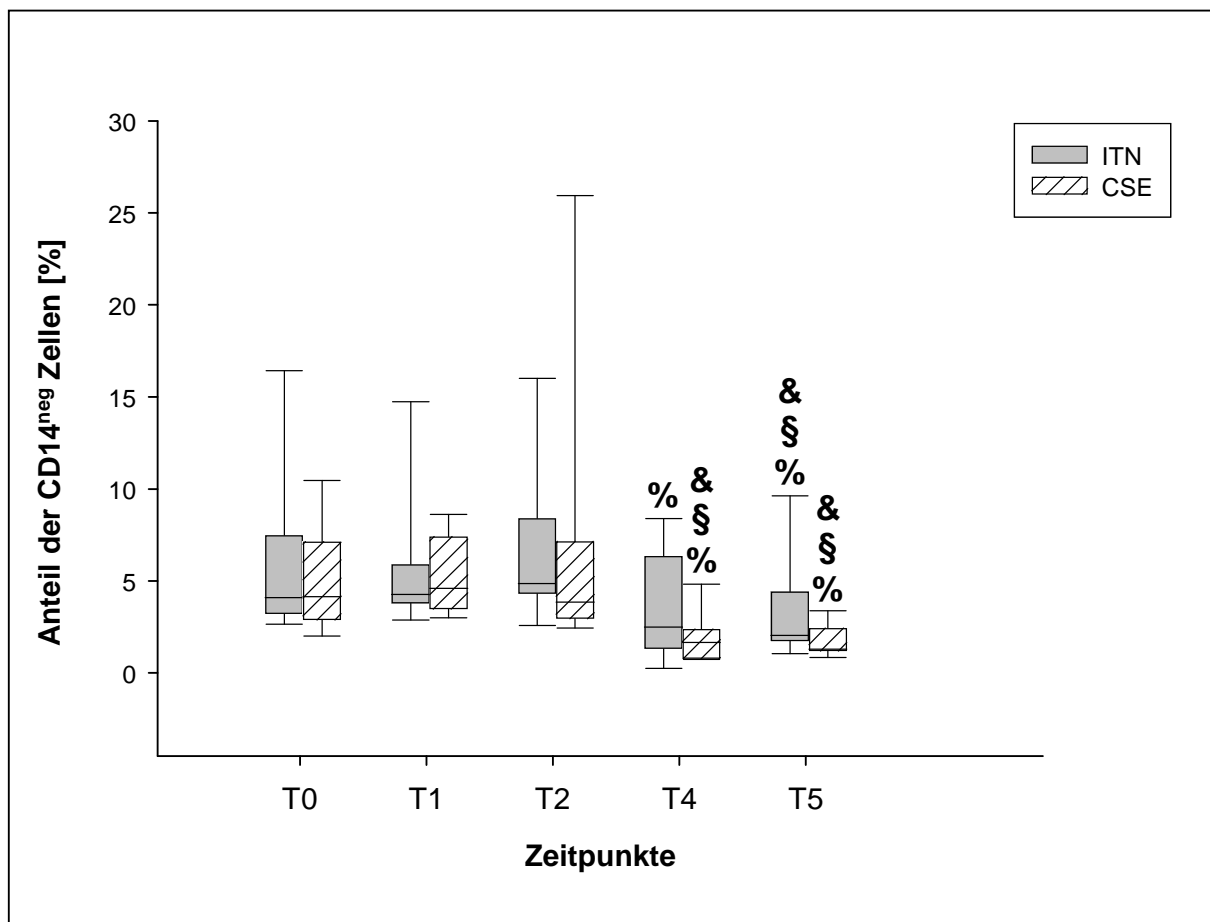
Angegeben sind Median mit 25%- und 75%-Quantile des prozentualen Anteils der CD14<sup>+</sup> Subpopulation zu den jeweiligen Messzeitpunkten.

&  $p < 0,05$  vs. T0; §  $p < 0,05$  vs. T1; %  $p < 0,05$  vs. T2.

**Tabelle 16: Prozentuale Verteilung der monozytären CD14<sup>neg</sup> Zellen nach Endotoxinstimulation.**

Angegeben sind Median (Med), 25%-Quantile (25%), 75%-Quantile (75%) und Range (R) in %.

Zeitpunkt	ITN				CSE			
	Med	25%	75%	R	Med	25%	75%	R
T0	4,1	3,3	7,3	15,6	4,1	3,0	6,4	8,6
T1	4,3	3,8	5,9	13,4	4,6	3,5	7,3	5,7
T2	4,9	4,4	8,0	14,5	3,9	3,0	6,8	25,5
T3	2,5	1,4	6,2	8,4	1,7	0,8	2,2	4,3
T4	2,0	1,8	4,0	9,6	1,3	1,2	2,4	2,7
T5	4,1	3,3	7,3	15,6	4,1	3,0	6,4	8,6



**Abbildung 15: Prozentuale Verteilung der monozytären CD14<sup>neg</sup> Zellen nach Endotoxinstimulation.**

Angegeben sind Median mit 25%- und 75%-Quantile des prozentualen Anteils der CD14<sup>neg</sup> Subpopulation zu den jeweiligen Messzeitpunkten.

& p < 0,05 vs. T0; § p < 0,05 vs. T1; % p < 0,05 vs. T2.

## 5. Diskussion

Gegenstand der vorliegenden Untersuchung war der Vergleich zweier unterschiedlicher Anästhesieverfahren bei knieendoprothetischen Eingriffen. Hierfür wurde die Anästhesie bei einer Patientengruppe durch eine Vollnarkose (Intubationsnarkose, ITN) und bei der zweiten Patientengruppe durch ein Regionalverfahren (kombinierte Spinal-Epidural-Anästhesie, CSE) durchgeführt.

Im Einzelnen sollte der Stellenwert der Auswahl des Narkoseverfahrens bei vergleichbarem operativem Trauma auf die peri- und postoperative monozytäre Zytokinausschüttung und CD14-Oberflächenrezeptor-Expression im Vollblutansatz untersucht werden.

### 5.1 WERTUNG DER METHODIK

#### 5.1.1 PATIENTENAUSWAHL

Die Patientenauswahl für unsere Studie erfolgte nach dem Prinzip der Minimierung eventueller Einflussfaktoren, die die Immunantwort modulieren können und damit möglicherweise zu einer direkten Beeinflussung unserer Ergebnisse geführt hätten. Für diese Studie wurden nur Patienten ausgewählt, die sich einem elektiven knieendoprothetischen Ersatz in der Klinik für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes unterzogen.

Um eine bereits präoperativ bestehende individuelle Veränderung der Immunantwort auszuschließen, wurden Patienten, die eines der folgenden Kriterien erfüllten, nicht in die Studie aufgenommen:

- präoperative Einnahme von Glukokortikoiden oder Histaminantagonisten
- chronisch entzündliche Erkrankungen
- HLA-B27 assoziierte Erkrankungen
- maligne Grunderkrankung, Chemotherapie
- Alkohol-, Medikamenten- oder Drogenabhängigkeit
- ASA Klassifizierung IV.

Die Patienten wurden durch Randomisierung nach Ausschluss etwaiger Kontraindikationen für ein Regionalverfahren (z. B. Blutungsneigung, blutverdünnende Medikamente, neurologische Vorerkrankungen) in eine der beiden Studiengruppen eingeordnet. Die Einleitung der Allgemein- oder Regionalanästhesie erfolgte nach den üblichen Standards der

Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie des Universitätsklinikums des Saarlandes und wurde immer durch den gleichen Anästhesisten durchgeführt.

Beide Patientengruppen waren vergleichbar hinsichtlich der Alters- und Geschlechtsverteilung sowie der ASA-Klassifikation. Alle Patienten erhielten vor Hautschnitt 1,5g Cefuroxim i.v. als einmalige Antibiotikagabe. Bei keinem Patienten war die Substitution von Blutprodukten notwendig.

#### 5.1.2 PROBENENTNAHME, -TRANSPORT UND –AUFARBEITUNG

Die Aufarbeitung der Proben war vergleichbar mit dem Vorgehen früherer Arbeiten [KLEINSCHMIDT 1998(a), KLEINSCHMIDT 1998(b), LARSEN 1998, ZIEGENFUSS 1999, GRUNDMANN 2000, WILHELM 2002]. Die venösen Blutproben wurden direkt nach der Entnahme für den Transport in das Anästhesiologische Labor auf Eis gelagert, anschließend unmittelbar steril weiterverarbeitet und unter physiologischen Bedingungen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Zusatz inkubiert.

#### 5.1.3 VOLLBLUTANSATZ

Die Untersuchungen zur Bestimmung der Zytokinantwort und der CD14-Expression erfolgten in der Vollblutkultur. Dieses Verfahren wurde ursprünglich von Wilson et al. [WILSON 1991] beschrieben und ist inzwischen in einer Vielzahl von Studien zu Funktionsuntersuchungen bei mononukleären Zellen eingesetzt worden [KLEINSCHMIDT 1998(a), KLEINSCHMIDT 1998(b), LARSEN 1998, ZIEGENFUSS 1999, GRUNDMANN 2000, WILHELM 2002]. Die Entwicklung von Vollblutkulturen beruhte initial auf der Beobachtung, dass mononukleäre Zellen nach Verdünnung von Vollblut mit Zellkulturmedium über mindestens 72 Stunden lebensfähig sind und funktionstüchtig bleiben. Die Überlebensrate der Zellen betrug nach 24 Stunden über 95% [ERTEL 1995] und nach 72 Stunden noch über 82% [DE GROOTE 1992]. Im Gegensatz zu isolierten Zellen ist im Vollblutansatz die Beurteilbarkeit der Funktion und Interaktion aller immunkompetenten Zellen im Blut, von Monozyten und auch Lymphozyten, möglich. Zudem befinden sich die immunkompetenten Zellen in ihrem physiologischen Milieu. Das Verhältnis der verschiedenen Blutzellen untereinander wird nicht verändert und auch die Regulationsmechanismen bleiben erhalten. Eventuelle Aktivierungsphänomene, die durch die Zellisolation auftreten können, sind bei einer Vollblutkultur ausgeschlossen [HASKILL 1988, DE GROOTE 1992]. Zell-Zell-Interaktionen mit der Gefäßwand können bei diesem Verfahren allerdings nicht erfasst werden.

#### 5.1.4 LPS ALS TOXIN ZUR STIMULATION DER MONOZYTÄREN IMMUNFUNKTION

Die Stimulation der Monozyten erfolgte mit Lipopolysaccharid (LPS) aus *Escherichia coli* O111:B4. Die Dosierung erfolgte entsprechend der von Mitov et al. publizierten Ergebnisse [MITOV 1997] sowie einer von uns in vorangehenden Untersuchungen erstellten Dosis-Wirkungskurve, die auch der Dosierung anderer Arbeitsgruppen entspricht [ERTEL 1995, KREUTZ 1997]. Hierbei führt der Zusatz von 1 µg/ml LPS zu einer maximalen Stimulation der monozytären Zytokinausschüttung. Obwohl das verwendete Bakterientoxin von der höchsten erhältlichen Reinheit war („high molecular grade“), kann eine Verunreinigung mit anderen Bakterienprodukten nicht vollkommen ausgeschlossen werden [REDL 2001].

Hirschfeld et al. konnten nachweisen, dass LPS zu einer Kreuzreaktion mit dem TLR-2 Rezeptortyp führen kann [HIRSCHFELD 2000], der eigentlich für grampositive Bakterienbestandteile spezifisch ist. Diese Möglichkeit kann bei unseren Ergebnissen auch nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

#### 5.1.5 ZYTOKINE

In der vorliegenden Studie wurden als prototypische Vertreter der pro- und antiinflammatorischen monozytären Immunantwort die Zytokine IL-6, TNF- $\alpha$  und IL-10 untersucht. In den letzten Jahren haben sich bereits viele Arbeitsgruppen mit der perioperativen Zytokinausschüttung beschäftigt und die Veränderungen der Zytokinexpression als Marker für die Immunfunktion verwendet. Ogata und Kawasaki haben beispielsweise die Veränderungen der TNF- $\alpha$ - und IL-10-Ausschüttung während einer partiellen Gastrektomie beschrieben [OGATA 2000; KAWASAKI 2001]. Andere Arbeitsgruppen nutzten die IL-6-Konzentrationen, um die Induktion der Akuten-Phase-Reaktion im perioperativen Verlauf zu beobachten [JORIS 1992; CHO 1994; JAKEWAYS 1994; GLASER 1995; MARUSZYNSKI 1995].

#### 5.1.6 ELISA-MESSUNG

Die zu untersuchenden Zytokine wurden in den Überständen der Vollblutkulturansätze mittels kommerziell erhältlicher enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) bestimmt. Der verwendete ELISA beruht auf dem sogenannten „Sandwich-Prinzip“. Das Zytokin wird hierbei zwischen zwei Antikörper eingebettet, die gegen jeweils unterschiedliche Epitope gerichtet sind. An einem Antikörper befindet sich zusätzlich ein Enzym mit Peroxidaseaktivität. Nach Zusatz einer Lösung kommt es zum Farbumschlag, dessen

---

Intensität quantitative Aussagen über die Menge des enthaltenen Zytokins zulässt. Gegenüber biologischen Zytokinmessverfahren besteht eine erheblich höhere Spezifität. Die Rate an Kreuzreaktionen wird mit unter 0,01% angegeben [ROCHE DIAGNOSTICS GMBH]. Nachteilig an diesem Verfahren ist jedoch, dass eine biologische Wertigkeit der Zytokine nicht möglich ist. Zudem können interindividuelle Schwankungen der Zytokinkonzentrationen durch Allelpolymorphismen für die Promotorregion der einzelnen Zytokine bedingt sein, die zu Unterschieden in den Transkriptionsraten führen [MØLVIG 1988, HAN 1991, TRACEY 1993]. Auch in der vorliegenden Untersuchung war eine erhebliche interindividuelle Variabilität zu beobachten.

#### 5.1.7 FACS-ANALYSE

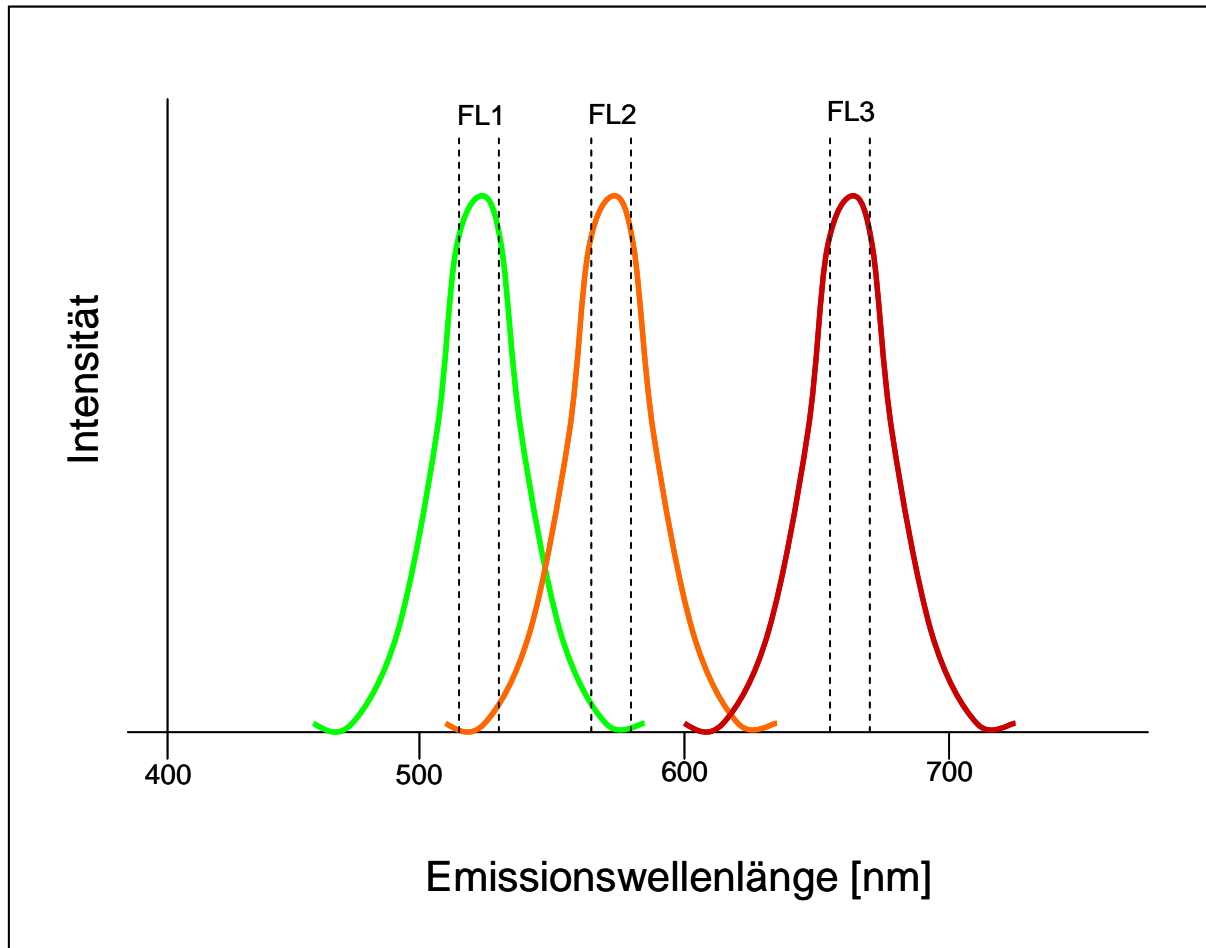
Die Durchflusszytometrie ist ein gut etabliertes Verfahren zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen. Es wird schon seit einiger Zeit nicht nur in der Forschung sondern auch routinemäßig im klinischen Alltag beispielsweise zur immunologischen Charakterisierung von Lymphomen und Leukämien oder zur quantitativen Messung von Lymphozytensubpopulationen im peripheren Blut von HIV-Patienten eingesetzt. Bereits 1972 beschrieb Bonner die Grundzüge des „fluorescence activated cell sorting“, mit dessen Hilfe eine große Anzahl von Zellen in kürzester Zeit in funktionelle Gruppen unterteilt werden konnte [BONNER 1972].

Das Prinzip der FACS-Analyse beruht zum einen auf den individuellen Eigenschaften einer Zelle, das Licht zu streuen, und zum anderen auf der Bindung zwischen Oberflächenmolekülen oder Zellbestandteilen und monoklonalen Antikörpern (mAbs), die mit Fluorochromen konjugiert sind und somit Licht in einer bestimmten Wellenlänge emittieren.

Die Genauigkeit der absoluten Zellzahlmessungen auf Einzelzellebene wird für Lymphozyten mit 97 - 99% angegeben [BD BIOSCIENCES 2007].

Für gewöhnlich emittiert ein Fluorochrom ein Lichtspektrum, das innerhalb eines begrenzten Bereichs am intensivsten ist und bei dieser Wellenlänge auch mit dem entsprechenden Erfassungsbereich des Fluoreszenzkanals übereinstimmt. Trotzdem emittieren Fluorochrome auch zu einem geringeren Ausmaß in Spektralbereiche, die außerhalb der für sie charakteristischen Wellenlänge liegen. Wenn diese schwächeren Emissionen sich nun mit dem Spektralbereich anderer Fluorochrome überschneiden, werden Zellen, die eigentlich nur mit einem Fluorochrom gekennzeichnet sind, in zwei Kanälen gemessen. Dieses Phänomen wird „spectral overlap“ genannt und ist vor allem bei Analysen mit Mehrfachfärbung problematisch (siehe Abbildung 16) [JAROSZESKI 1999]. Durch die Auswahl unserer

Fluorochrome sowie möglichst exakte Voreinstellungen und enges Gating versuchten wir, das Auftreten von „spectral overlap“ so weit wie möglich zu reduzieren, können das Auftreten von falsch-positiven Ergebnissen aber nicht vollständig ausschließen.



**Abbildung 16: „Spectral overlap“ bei Mehrfachfärbung.**

Die Spektralbereiche von Fluorochromen (FL) können sich überschneiden, sodass ein Fluorochrom in zwei Kanälen gemessen wird [modifiziert nach JAROSZESKI 1999].

## 5.2 DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Ziel dieser Untersuchung war es, den spezifischen Einfluss unterschiedlicher Anästhesieverfahren auf die monozytäre Immunfunktion bei möglichst identischem operativen Trauma genauer zu charakterisieren.

Wir konnten signifikante Unterschiede der Zytokinausschüttung zwischen den beiden Anästhesieverfahren zeigen.

Die spontane TNF- $\alpha$ -Ausschüttung war zu allen postoperativen Zeitpunkten in der CSE-Gruppe größer verglichen mit der ITN-Gruppe (ITN vs. CSE, T2:  $p=0,008$ , T3:  $p=0,027$ , T4:  $p=0,043$ , T5:  $p=0,017$ ).

Es zeigte sich eine signifikant höhere endotoxinstimulierte TNF- $\alpha$ -Ausschüttung in der CSE-Gruppe als in der ITN-Gruppe unmittelbar nach Narkoseeinleitung (ITN vs. CSE, T1:  $p=0,001$ ). Im peri- und postoperativen Verlauf der ITN-Gruppe erfolgte zunächst eine statistisch relevante Abnahme der endotoxinstimulierten TNF- $\alpha$ -Ausschüttung zwischen dem Zeitpunkt unmittelbar nach Narkoseeinleitung bis 6 Stunden postoperativ (ITN, T1 vs. T3:  $p=0,022$ ). Im weiteren Verlauf zeigte sich wiederum ein signifikanter Anstieg der endotoxinstimulierten TNF- $\alpha$ -Ausschüttung bis 48 Stunden postoperativ (T3 vs. T5:  $p=0,022$ ).

Die endotoxinstimulierte IL-10-Ausschüttung zeigte ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen den beiden Studiengruppen. Nach Narkoseeinleitung und 6 Stunden postoperativ konnten wir jeweils in der CSE-Gruppe höhere Zytokinkonzentrationen messen als in der ITN-Gruppe (ITN vs. CSE, T1:  $p=0,037$ , T3:  $p=0,008$ ). Des Weiteren sank die endotoxinstimulierte IL-10-Ausschüttung innerhalb der ITN-Gruppe statistisch signifikant während des Operationstags ab (ITN, T0 vs. T3:  $p=0,029$ ).

Zudem ergaben sich bei der spontanen IL-6-Ausschüttung signifikante Unterschiede zwischen den Anästhesieverfahren. Unmittelbar nach Narkoseeinleitung sowie 24 Stunden postoperativ war die spontane IL-6-Ausschüttung in der ITN-Gruppe signifikant höher als in der CSE-Gruppe (ITN vs CSE, T1:  $p=0,032$ , T4:  $p=0,011$ ).

Auch die Expression des monozytären Oberflächenrezeptors CD14 zeigte signifikante Unterschiede hinsichtlich des Anästhesieverfahrens und der Beobachtungszeitpunkte.

Der unmittelbare Vergleich der beiden Anästhesieverfahren ergab an den beiden postoperativen Tagen (T4 und T5) einen signifikant höheren prozentualen Anteil der CD14<sup>++</sup> Monozyten in der CSE-Gruppe als in der ITN-Gruppe (ITN vs. CSE, T4:  $p=0,031$ , T5:  $p=0,010$ ).

Innerhalb der ITN-Gruppe verminderte sich der prozentuale Anteil der CD14<sup>neg</sup> Zellen 24 und 48 Stunden postoperativ signifikant zu den Werten des operativen Tages (T0, T1 und T2 vs. T4 und T5:  $p<0,005$ ).

Für die spontane CD14-Expression zeigten sich in der CSE-Gruppe ebenfalls signifikante Unterschiede. Unmittelbar nach der Etablierung der Regionalanästhesie nahm der prozentuale Anteil der CD14<sup>+</sup> Zellen im Vergleich zu vor Narkoseeinleitung signifikant ab (T0 vs. T1:  $p<0,05$ ). Des Weiteren konnten wir für alle monozytären Subpopulationen signifikante Veränderungen 24 und 48 Stunden postoperativ im Vergleich zu unmittelbar vor und nach Narkoseeinleitung sowie postoperativ im AWR beobachten: Der prozentuale Anteil der



CD14<sup>neg</sup> und CD14<sup>+</sup> Zellen nahm signifikant ab, bei gleichzeitiger Zunahme der CD14<sup>++</sup> Monozyten (T0, T1 und T2 vs. T4 und T5:  $p < 0,05$ ).

Nach Endotoxinstimulation konnten wir ebenfalls signifikante Veränderungen der monozytären CD14-Expression feststellen.

Innerhalb der ITN-Gruppe zeigte sich 48 Stunden postoperativ eine signifikante Abnahme des prozentualen Anteils der CD14<sup>neg</sup> Zellen im Vergleich zu vor und nach Narkoseeinleitung sowie unmittelbar postoperativ (T0 vs. T5:  $p = 0,026$ , T1 vs. T5:  $p = 0,022$  und T2 vs. T5:  $p = 0,007$ ).

Bei der CSE-Gruppe verminderte sich der prozentuale Anteil der CD14<sup>neg</sup> Monozyten an beiden postoperativen Tagen signifikant zu den Werten am operativen Tag (T0, T1 und T2 vs. T4 und T5:  $p < 0,05$ ). Auch der Anteil der CD14<sup>+</sup> Zellen zeigte eine signifikante Abnahme 24 und 48 Stunden postoperativ im Vergleich zu vor Einleitung und unmittelbar postoperativ (T0 und T2 vs. T4 und T5:  $p < 0,05$ ) in der CSE-Gruppe. Im Gegensatz dazu lag der prozentuale Anteil der CD14<sup>++</sup> Monozyten 24 Stunden postoperativ in der CSE-Gruppe signifikant höher als vor und nach Etablierung der Regionalanästhesie so wie auch unmittelbar postoperativ im AWR (T0, T1 und T2 vs. T4:  $p < 0,05$ ).

Die Möglichkeit, dass Anästhesie die Immunfunktion verändern könnte, wurde erstmalig 1903 diskutiert, als Snel berichtete, dass Äther, Chloroform und Chloralhydrat die Sterblichkeit an Anthrax bei Meerschweinchen vervielfachte [SNEL 1903].

Die Pathogenese perioperativer Infektionen ist sehr vielfältig und es ist schwierig, den Einfluss der Anästhesie von anderen Faktoren wie dem operativen Trauma, Schmerzen und individuellem Stress abzugrenzen. Daher war es in der vorliegenden Untersuchung wichtig, den knieendoprothetischen Eingriff bei allen Patienten in derselben Klinik durchführen zu lassen, so dass Operationsdauer, Schnittführung, Naht- und Prothesenmaterialien sowie die postoperative Betreuung der Standardvorgehensweise der Klinik für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes entsprachen.

Andere Arbeitsgruppen untersuchten den alleinigen Einfluss der Anästhesie, indem sie eine Allgemeinanästhesie bzw. Epiduralanästhesie ohne operative Intervention durchführten. Bei Procopio et al. konnten so 2001 weder Unterschiede in der Immunantwort zwischen den beiden Narkoseformen noch zur Kontrollgruppe festgestellt werden. Dies könnte bei ihrem Studiendesign sowohl mit der sehr kurzen Anästhesiedauer von 60 min, als auch mit der Abwesenheit von Opiaten in allen Versuchsgruppen zu erklären sein [PROCOPIO 2001].

Weitere Studien konnten zeigen, dass eine anästhesiologische Behandlung ohne weitere Intervention den Verlauf einer Infektion maßgeblich verändern kann. Eine Halothan-basierte Anästhesie konnte beispielsweise die Mortalität bei Mäusen an einer Salmonelleninfektion steigern [BRUCE 1967] oder an einer kotigen Peritonitis sogar verdoppeln [MOUDGIL 1973].

Um Veränderungen der Immunantwort bestimmten Ereignissen (z. B. Narkoseeinleitung, Narkoseaufrechterhaltung oder postoperative Schmerztherapie) unmittelbar zuordnen zu können, wählten wir ein Studiendesign, das uns mit vier Probeentnahmen bereits am operativen Tag (T0 – T3) eine sehr engmaschige Kontrolle erlaubte. Der erste Zeitpunkt (T0) unmittelbar vor Narkoseeinleitung diente als Ausgangswert, da sowohl die präoperativen Vorbereitungen als auch die Prämedikation für alle Probanden identisch waren. Des Weiteren war ein möglichst langer Beobachtungszeitraum – bis zu 48 Stunden postoperativ (T5) – sinnvoll, um auch mögliche Unterschiede während der Regenerationsphase vollständig erfassen zu können. Eine Studie in 2006 konnte keine statistisch relevanten Unterschiede der IL-6-, TNF- $\alpha$ -, CRP-, Cortisol- und Leptin-Konzentrationen zwischen einer Spinalanästhesie (SPA) und einer Allgemeinanästhesie (ITN) bei Hämorrhoidalektomie feststellen [BUYUKKOCAK 2006]. Die Beobachtungszeitpunkte beschränkten sich in diesem Fall auf unmittelbar vor Narkoseeinleitung und 24 Stunden postoperativ, so dass etwaige Schwankungen im perioperativen Verlauf nicht sichtbar werden konnten.

Um die Unterschiede zwischen den beiden Anästhesieverfahren besonders zu verdeutlichen, sollte nicht nur die Art der Medikamentenapplikation unterschiedlich sein – intravenös und inhalativ in der ITN-Gruppe im Gegensatz zu spinal und epidural in der CSE-Gruppe – sondern es sollten auch keine Überschneidungen der Substanzklassen zwischen den Studiengruppen geben. Im Jahr 2000 untersuchte Høgevoid mit seinen Kollegen an der Universität Oslo die Veränderungen der TNF- $\alpha$ -, IL-6- und IL-1 $\beta$ -Plasmakonzentrationen bei hüftendoprothetischen Eingriffen in ITN bzw. in CSE. Die Ergebnisse zeigten keine signifikanten Unterschiede der TNF- $\alpha$ - und IL-6-Konzentrationen zwischen den beiden Anästhesieverfahren. Als postoperative Schmerztherapie wurde in der CSE-Gruppe der Periduralkatheter neben Bupivacain 0,25% zusätzlich mit Fentanyl 0,05 mg/ml aufgespritzt. Auch die ITN-Gruppe erhielt Fentanyl als Analgetikum i.v., sodass in dieser Studie möglicherweise die Opiatgabe in beiden Gruppen statistisch relevante Unterschiede der Zytokinausschüttungen zwischen den Studiengruppen verhindert hat [HØGEVOLD 2000].

Simeonova et al. beschrieben sowohl für die Allgemein- als auch für die Epiduralanästhesie einen proapoptischen Effekt auf das monozytäre Phagozytensystem. Hierfür untersuchten

sie Blutproben von 22 Hunden vor, während und nach entweder einer Allgemeinanästhesie mit Halothan oder einer Epiduralanästhesie mit Lidocain. Unabhängig vom Anästhesieverfahren zeigte sich eine vermehrte Apoptoserate der immunkompetenten Zellen verglichen mit einer Kontrollgruppe ohne anästhesiologische Behandlung. Interessanterweise konnten sie keine Veränderungen der Zytokinausschüttung durch die Anästhesie feststellen und bereits am folgenden Tag hatte sich die Apoptoserate wieder normalisiert [SIMEONOVA 2008]. Simeonova et al. konnten somit einen immunmodulatorischen Effekt durch Anästhesie per se zeigen, jedoch keinen Unterschied zwischen einem Allgemein- und einem Regionalverfahren. Die Hunde der ITN-Gruppe erhielten ausschließlich Halothan zur Narkoseführung. Möglicherweise lassen sich die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen unserer Studie und der von Simeonova dadurch erklären, dass wir eine sog. balancierte Allgemeinanästhesie (Anästhetikum plus Analgetikum) und keine Monoanästhesie angewendet haben. Fraglich bleibt sicherlich auch die Übertragbarkeit dieser Ergebnisse vom Hundemodell auf den Menschen.

Im Jahre 1996 veröffentlichte Koltun eine Studie zur NK-Zytotoxizität, Adrenalin-, Noradrenalin- und Cortisol-Plasmaspiegel sowie Cortisolspiegel im 24h-Urin bei Patienten mit offener Kolektomie, die entweder eine Allgemeinanästhesie oder eine wache Epiduralanästhesie erhielten. Prä- und postoperativ waren keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen zu sehen. Allerdings zeigte sich perioperativ eine signifikante Reduktion der NK-Zytotoxizität in der ITN-Gruppe, die sich bei der Gruppe mit Epiduralanästhesie nicht nachweisen ließ. Des Weiteren konnten Koltun et al. perioperativ erhöhte Noradrenalin- und Cortisol-Plasmaspiegel und eine vermehrte Cortisol-Ausscheidung im 24h-Urin in der ITN-Gruppe messen. Sie erklärten sich diese Ergebnisse durch eine Unterdrückung der sympathischen Stressantwort durch die Epiduralanästhesie und einem damit verbundenen Erhalt der NK-Zytotoxizität [KOLTUN 1996].

Auch Tønnesen konnte eine Abnahme der NK-Zellaktivität bis zu drei Tage nach einer Allgemeinanästhesie zur Hysterektomie messen, die in der Patientengruppe mit Epiduralanästhesie nicht nachweisbar war [TØNNESEN 1988].

Beide Untersuchungen zeigten somit – vergleichbar mit unseren Ergebnissen – eine mögliche Beeinträchtigung der Immunantwort durch die Allgemeinanästhesie. Ob bei diesen beiden Studien auch eine Veränderung der monozytären Immunantwort stattgefunden hat, ist nicht untersucht worden.

Welchen immunmodulierenden Einfluss die postoperative Schmerztherapie hat, wurde 2004 von Volk et al. untersucht. Hierfür wurde die postoperative Analgesie bei 54 Patienten nach

---

Wirbelsäulen-Operation entweder durch konventionelle Patienten-kontrollierte Schmerzpumpen (PCIA; Morphin 3mg/15min i.v.) oder durch Patienten-kontrollierte epidurale Analgesie (PCEA; 0,125% Ropivacain plus Sufentanil 1µg/ml, Basalrate und Bolusapplikation) ermöglicht. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen PCIA und PCEA im Hinblick auf die Monozytenfunktion, allerdings fand sich eine Reduktion der NK-Zellen bei gleichbleibenden B-Zell- und T-Helferzell- Populationen in der PCEA-Gruppe. Hieraus schlossen Volk et al., dass die postoperative epidurale Schmerztherapie eher einen Einfluss auf den erworbenen als auf den angeborenen Anteil des Immunsystems hat [VOLK 2004].

Unsere Ergebnisse weisen auf eine Veränderung der monozytären Immunantwort in Abhängigkeit vom Anästhesieverfahren hin.

Insbesondere die eingeschränkte Stimulierbarkeit der IL-10-Produktion unmittelbar postoperativ in der ITN-Gruppe könnte einen immunmodulierenden Effekt der Allgemeinanästhesie vermuten lassen. Auch die verminderte spontane TNF- $\alpha$ -Ausschüttung zu allen postoperativen Zeitpunkten in der ITN-Gruppe scheint auf eine eventuelle Beeinflussung der Immunantwort durch die Allgemeinanästhesie hinzudeuten. Eine mögliche Erklärung für diese Ergebnisse könnte die durch Boost et al. beschriebene Hemmung von NF- $\kappa$ B durch Desfluran sein [BOOST 2006].

Auch im zeitlichen Verlauf zeigten sich in der ITN-Gruppe signifikante Schwankungen der Zytokinkonzentrationen. Die endotoxinstimulierte TNF- $\alpha$ -Ausschüttung war 6 Stunden postoperativ signifikant geringer als unmittelbar nach Narkoseeinleitung. Eine signifikante Steigerung ließ sich anschließend wieder im Vergleich zu T5 (48 Stunden postoperativ) messen. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit den Daten anderer Studien, bei denen die endotoxinstimulierte TNF- $\alpha$ -Ausschüttung im peri- und postoperativen Verlauf einer Gastrektomie unter Isofluran-Narkose bestimmt wurde [OGATA 2000; KAWASAKI 2001]. Die endotoxinstimulierte IL-10-Ausschüttung zeigte eine signifikante Reduktion 6 Stunden postoperativ im Vergleich zu vor Narkoseeinleitung. Diese peri- und auch postoperativ anhaltende Abnahme der stimulierbaren Zytokinausschüttung wurde auch von Ziegeler et al. beobachtet [ZIEGELER 2006]. Fuentes et al. nutzten diesen Effekt der verzögerten Zytokinfreisetzung durch volatile Anästhetika, um ein vermehrtes Überleben von Mäusen mit endotoxämischem Schock zu erreichen. Sie konnten zeigen, dass die Überlebensrate nach intraperitonealer LPS-Injektion durch Isofluran-Anästhesie von 23% auf 85% gesteigert werden konnte. Als ursächlichen Reaktionsweg konnten sie, ähnlich wie Boost et al., eine verzögerte Aktivierung von NF- $\kappa$ B feststellen [FUENTES 2006].

Innerhalb der CSE-Gruppe konnten wir keine signifikanten Unterschiede der Zytokinausschüttung im zeitlichen Verlauf beobachten. Hier zeigten sich jedoch während des Beobachtungszeitraums – im Gegensatz zur ITN-Gruppe – starke Veränderungen der monozytären CD14-Expression. Sowohl ohne als auch nach Endotoxinstimulation konnten wir eine Abnahme der CD14<sup>neg</sup> und CD14<sup>+</sup> Monozyten und eine Zunahme der CD14<sup>++</sup> Zellen an beiden postoperativen Tagen im Vergleich zum operativen Tag messen. Nach Frankenberger verschieben sich somit die Monozytensubpopulationen an den postoperativen Tagen zum sog. „klassischen“ Monozyt. Dieser produziert sowohl pro- als auch antiinflammatorisch wirksame Zytokine und kann somit einer möglichen Entzündungsreaktion entgegenwirken [FRANKENBERGER 1996]. Die immunmodulierenden Eigenschaften von Bupivacain wurden 2006 in einem Übersichtsartikel von Cassuto ausführlich beschrieben und es hat sich gezeigt, dass der Einsatz von Lokalanästhetika bei einigen Entzündungssituationen, wie beispielsweise Lungenentzündung, Sepsis und myokardiale Ischämie/Reperfusionsschaden, im klinischen Einsatz einen protektiven Effekt aufweist [CASSUTO 2006]. Im Gegensatz zur ITN-Gruppe scheint die CSE-Gruppe somit sowohl spontan als auch nach Endotoxinstimulation in der Lage zu sein, auf den operativen Reiz durch eine gesteigerte Monozytenrekutierung adäquat zu reagieren.

### 5.3 FAZIT

Die Ergebnisse dieser Studie weisen auf einen möglichen Einfluss des Anästhesieverfahrens auf die peri- und postoperative Immunfunktion hin. Eine Vollnarkose scheint das Immunsystem stärker zu supprimieren als eine kombinierte Spinal-/Epiduralanästhesie und zwar bis mindestens zum zweiten postoperativen Tag. Eventuell ist das Infektionsrisiko während dieser Zeitspanne besonders hoch. Dies könnte unter Umständen vor allem für nosokomiale Infektionen wichtig sein, die bei immunkompetenten Patienten möglicherweise nicht zu einer Erkrankung und den damit verbundenen Komplikationen geführt hätten.

Die klinische Bedeutung muss in umfangreichen Studien weiter erforscht werden. Die bisher vorliegenden Befunde weisen allerdings darauf hin, dass die Auswahl des Narkoseverfahrens für Risikopatienten vielleicht bedeutender sein könnte als bisher angenommen.

## 6. Literaturverzeichnis und Anhang

### 6.1 LITERATURVERZEICHNIS

- Allendorf JD, Bessler M, Whelan RL, Trokel M, Laird DA, Terry MB, Treat MR. Better Preservation of Immune Function After Laparoscopic-Assisted vs. Open Bowel Resection in a Murine Model. *Dis Colon Rectum*. 1996; 39, 67-72
- Amano S, Kawakami K, Iwahashi H, Kitano S, Hanazawa S. Functional role of endogenous CD14 in lipopolysaccharide-stimulated bone resorption. *J Cell Physiol*. 1997; 173: 301-309
- Asklin B, Cassuto J. Intravesical lidocaine in severe interstitial cystitis. Case report. *Scand J Urol Nephrol*. 1989; 23: 311-312
- Bažil V, Strominger JL. Shedding as a mechanism of down-modulation of CD14 on stimulated human monocytes. *J Immunol*. 1991; 147: 1567-1574
- BD Biosciences, San Jose, CA 95131-1807, USA. BD FACSCalibur Instructions for Use. 2007
- Beekhuizen H, Blokland I, Corsel-van Tilburg A, Koning F, van Furth R. CD14 contributes to the adherence of human monocytes to cytokine-stimulated endothelial cells. *J Immunol*. 1991; 147: 3761-3767
- Beilin B, Shavit Y, Hart J, Mordashov B, Cohn S, Notti I, Bessler H. Effects of Anesthesia Based on Large Versus Small Doses of Fentanyl on Natural Killer Cell Cytotoxicity in the Perioperative Period. *Anesth Analg*. 1996; 82: 492-497
- Berenbaum MC, Cope WA, Bundick RV. Synergistic effect of cortisol and prostaglandin E<sub>2</sub> on the PHA response. Relation to immunosuppression induced by trauma. *Clin Exp Immunol*. 1976; 26: 534-541
- Bessler M, Whelan RL, Halverson A, Treat MR, Nowygrod R. Is immune function better preserved after laparoscopic versus open colon resection? *Surg Endosc*. 1994; 8, 881-883
- Biki B, Mascha E, Moriarty DC, Fitzpatrick JM, Sessler DI, Buggy DJ. Anesthetic Technique for Radical Prostatectomy Surgery Affects Cancer Recurrence. A Retrospective Analysis. *Anesthesiology*. 2008; 109: 180-187
- Birkenmaier C, Hong YS, Horn JK. Modulation of the endotoxin receptor (CD14) in septic patients. *The Journal of Trauma*. 1992; 32: 473-479
- Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP. Natural Killer Cells in Antiviral Defense: Function and Regulation by Innate Cytokines. *Annual Review of Immunology*. 1999; 17: 189-220
- Blumenstein M, Boekstegers P, Fraunberger P, Andreesen R, Ziegler-Heitbrock HWL, Fingerle-Rowson G. Cytokine production precedes the expansion of CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>

- monocytes in human sepsis: a case report of a patient with self-induced septicemia. *Shock*. 1997; 8: 73-75
- Bonner WA, Hulett HR, Sweet RG, Herzenberg LA. Fluorescence Activated Cell Sorting. *Review of Scientific Instruments*. 1972; 43: 404-409
- Boost KA, Hofstetter C, Flondor M, Betz C, Homann M, Pfeilschifter J, Muehl H, Zwissler B. Desflurane differentially affects the release of proinflammatory cytokines in plasma and bronchoalveolar fluid of endotoxemic rats. *International Journal of Molecular Medicine*. 2006; 17: 1139-1144
- Branagan G, Finnis D. Prognosis after anastomotic leakage in colorectal surgery. *Dis Colon Rectum*. 2005; 48: 1021-1026
- Brix-Christensen V, Tønnesen E, Sørensen IJ, Bilfinger TV, Sanches RG, Stefan GB. 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*. 1998, 42: 63-70
- Bruce DL. Effect of halothane anesthesia on experimental salmonella peritonitis in mice. *J Surg Res*. 1967; 7: 180-185
- Buyukkocak U, Caglayan O, Daphan C, Aydinuraz K, Saygun O, Kaya T, Agalar F. Similar Effects of General and Spinal Anaesthesia on Perioperative Stress response in Patients undergoing Haemorrhoidectomy. *Mediators of Inflammation*. 2006; 2006: 1-5
- Carey PD, Wakefield CH, Thayeb A, Monson JR, Darzi A, Guillou PJ. Effects of minimally invasive surgery on hypochlorous acid production by neutrophils. *Br J Surg*. 1994; 81: 557-560
- Cassuto J, Sinclair R, Bonderovic M. Anti-inflammatory properties of local anesthetics and their present and potential clinical implications. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2006; 50: 265-282
- Castell JV, Gómez-Lechón MJ, David M, Andus T, Geiger T, Trullenque R, Fabra R, Heinrich PC. Interleukin-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human hepatocytes. *FEBS Lett*. 1989; 242(2): 237-239
- Chandra V, Nelson H, Larson DR, Harrington JR. Impact of primary resection on the outcome of patients with perforated diverticulitis. *Arch Surg*. 2004; 139: 1221-1224
- Cho JM, LaPorta AJ, Clark JR, Schofield MJ, Hammond SL, Mallory PL 2<sup>nd</sup>. Response of serum cytokines in patients undergoing laparoscopic cholecystectomy. *Surg Endosc*. 1994; 8: 1380-1384
- Christopherson R, James KE, Tableman M, Marshall P, Johnson FE. Long-Term Survival After Colon Cancer Surgery: A Variation Associated with Choice of Anesthesia. *Anesth Analg*. 2008; 107: 325-332
- Cronin AJ, Aucutt-Walter NM, Budinetz T, Bonafide CP, DiVittore NA, Gordin V, Schuler HG, Bonneau RH. Low-dose remifentanyl infusion does not impair natural killer cell function in healthy volunteers. *Br J Anaesth*. 2003; 91(6): 805-809

- D'Andrea A, Aste-Amezaga M, Valiante NM, Ma X, Kubin M, Trinchieri G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J Exp Med.* 1993; 178: 1041-1048
- Davidson JAH, Boom SJ, Pearsall FJ, Zhang P, Ramsay G. Comparison of the effects of four i.v. anaesthetic agents on polymorphonuclear leucocyte function. *Br J Anaesth.* 1995; 74: 315-318
- De Groote D, Zangerle PF, Gevaert Y, Fassotte MF, Beguin Y, Noizat-Pirenne F, Pirenne J, Gathy R, Lopez M, Dehart I, Igot D, Baudrihaye M, Delacroix D, Franchimont P. Direct stimulation of cytokines (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-2, IFN- $\gamma$  and GM-CSF) in whole blood. I. Comparison with isolated PBMC stimulation. *Cytokine.* 1992; 4: 239-248
- De Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10 (IL-10) Inhibits Cytokine Synthesis by Human Monocytes: An Autoregulatory Role of IL-10 Produced by Monocytes. *J Exp Med.* 1991; 174: 1209-1220
- Detjeen P, Speckmann EJ, Hescheler J. *Physiologie.* 4. Auflage, Urban & Fischer Verlag, München, Jena. 2005
- Döcke WD, Randow F, Syrbe U, Krausch D, Asadullah K, Reinke P, Volk HD, Kox W. Monocyte deactivation in septic patients: Restoration by IFN- $\gamma$  treatment. *Nat Med.* 1997; 3: 678-681
- Ertel W, Kremer JP, Kenney J, Steckholzer U, Jarrar D, Trentz O, Schildberg FW. Down regulation of proinflammatory cytokine release in whole blood from septic patients. *Blood.* 1995; 85: 1341-1347
- Exadaktylos AK, Buggy DJ, Moriarty DC, Mascha E, Sessler DI. Can Anesthetic Technique for Primary Breast Cancer Surgery Affect Recurrence or Metastasis? *Anesthesiology.* 2006; 105: 660-664
- Fingerle G, Pforte A, Passlick B, Blumenstein M, Ströbel M, Ziegler-Heitbrock HWL. The novel subset of CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> blood monocytes is expanded in sepsis patients. *Blood.* 1993; 82: 3170-3176
- Fiorentino DF(a), Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol.* 1991; 147: 3815-3822
- Fiorentino DF(b), Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, Moore KW, O'Garra A. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol.* 1991; 146: 3444-3451
- Fischer CP. Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance? *Exerc Immunol Rev.* 2006; 12: 6-33



- 
- Frankenberger M, Sternsdorf T, Pechumer H, Pforte A, Ziegler-Heitbrock HW. Differential cytokine expression in human blood monocyte subpopulations: a polymerase chain reaction analysis. *Blood*. 1996; 87: 373-377
- Fuentes JM, Talamini MA, Fulton WB, Hanly EJ, Aurora AR, De Maio A. General Anesthesia Delays the Inflammatory Response and Increases Survival for Mice with Endotoxic Shock. *Clin Vaccine Immunol*. 2006; 13: 281-288
- Gallos G, Jones DR, Nasr SH, Emala CW, Lee HT. Local anesthetics reduce mortality and protect against renal and hepatic dysfunction in murine septic peritonitis. *Anesthesiology*. 2004; 101(4): 902-911
- Gastmeier P, Geffers C. Nosokomiale Infektionen in Deutschland: Wie viele gibt es wirklich? Eine Schätzung für das Jahr 2006. *Dtsch med Wochenschr*. 2008; 133: 1111-1115
- Gauldie J, Richards C, Harnish D, Lansdorp P, Baumann H. Interferon  $\beta$ 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1987; 84: 7251-7255
- Geffers C, Gastmeier P, Rüden H. Gesundheitsberichtserstattung des Bundes, Heft 8, Nosokomiale Infektionen. Robert Koch Institut. 2002
- Glaser F, Sannwald GA, Buhr HJ, Kuntz C, Mayer H, Klee F, Herfarth C. General stress response to conventional and laparoscopic cholecystectomy. *Ann Surg*. 1995; 221: 372-380
- Gonwa TA, Stobo JD. Differential expression of Ia molecules by human monocytes. *J Clin Invest*. 1984; 14: 859-866
- Grimmond TR, Brownridge P. Antimicrobial activity of bupivacaine and pethidine. *Anaesth. Intensive Care*. 1986; 14: 418-20
- Grütz G. New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. *J Leukoc Biol*. 2005; 77: 3-15; published online before print as doi:10.1189/jlb.0904484
- Grundmann U, Rensing H, Adams HA, Falk S, Wendler O, Ebinger N, Bauer M. Endotoxin desensitization of human mononuclear cells after cardiopulmonary bypass: role of humoral factors. *Anesthesiology*. 2000; 93: 359-369
- Grunwald U, Fan XL, Jack RS, Workalemahu G, Kallies A, Stelter F, Schütt C. Monocytes can phagocytose gram-negative bacteria by a CD14-dependent mechanism. *J Immunol*. 1996; 157: 4119-4125
- Han H, Okamoto M, Honjo T, Shimizu A. Regulated expression of immunoglobulin trans-mRNA consisting of the variable region of a transgenic chain and constant regions of endogenous isotypes. *Int Immunol*. 1991; 3: 1197-1206

- 
- Haskill S, Johnson C, Eierman D, Becker S, Warren K. Adherence induces selective mRNA expression of monocyte mediators and protooncogenes. *J Immunol.* 1988; 140: 1690-1694
- Haziot A, Chen S, Ferrero E, Low MG, Silber R, Goyert SM. The monocyte differentiation antigen, CD14, is anchored to the cell membrane by a phosphatidylinositol linkage. *J Immunol.* 1988; 141: 547-52.
- Heller A, Heller S, Blecken S, Urbaschek R, Koch T. Effects of intravenous anesthetics on bacterial elimination in human blood in vitro. *Acta Anaesthesiol Scand.* 1998; 42: 518-526
- Hershman MH, Cheadle WG, Wellhausen SR, Davidson PF, Polk HC Jr. Monocyte HLA-DR antigen expression characterizes clinical outcome in the trauma patient. *Br J Surg.* 1990; 77: 204-207
- Hill AD, Banwell PE, Darzi A, Menzies-Gow N, Monson JR, Guillou PJ. Inflammatory markers following laparoscopic and open hernia repair. *Surg Endosc.* 1995; 9: 695-698
- Hirschfeld M, Ma Y, Weis JH, Vogel SN, Weis JJ. Cutting edge: repurification of lipopolysaccharide eliminates signaling through both human and murine toll-like receptor 2. *J Immunol.* 2000; 165: 618-622
- Høgevoid HE, Lyberg T, Kähler H, Haug E, Reikeras O. Changes in Plasma IL-1beta, TNF-alpha and IL-6 after Total Hip Replacement Surgery in General or Regional Anaesthesia. *Cytokine.* 2000; 12: 1156-1159
- Hollmann MW, Durieux ME. Local anesthetics and the inflammatory response. A new therapeutic indication? *Anesthesiology.* 2000; 93: 858-875
- Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S. Cutting Edge: Toll-Like Receptor 4 (TLR4)-Deficient Mice Are Hyporesponsive to Lipopolysaccharide: Evidence for TLR4 as the Lps Gene Product. *J Immunol.* 1999; 162: 3749-3752
- Huang YH, Tsai PS, Huang CJ. Bupivacaine inhibits COX-2 expression, PGE2, and cytokine production in endotoxin-activated macrophages. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2008; 52: 530-535
- Hyvönen PM, Kowolik MJ. Dose-dependent suppression of the neutrophil respiratory burst by lidocaine. *Acta Anaesthesiol Scand.* 1998; 42: 565-569
- Inada T, Yamanouchi Y, Jomura S, Sakamoto S, Takahashi M, Kambara T, Shingu K. Effect of propofol and isoflurane anaesthesia on the immune response to surgery. *Anaesthesia.* 2004; 59: 954-959
- Ishii Y, Hori Y, Sakai S, Honma Y. Control of differentiation and apoptosis of human myeloid leukemia cells by cytokinins and cytokinin nucleosides, plant redifferentiation-inducing hormones. *Cell Growth Differ.* 2002; 13: 19-26

- 
- Jacobs R, Karst M, Scheinichen D, Bevilacqua C, Schneider U, Heine J, Schedlowski M, Schmidt RE. Effects of fentanyl on cellular immune functions in man. *Int J Immunopharmacol.* 1999; 21: 445-454
- Jakeways MS, Mitchell V, Hashim IA, Chadwick SJ, Shenkin A, Green CJ, Carli F. Metabolic and inflammatory responses after open or laparoscopic cholecystectomy. *Br J Surg.* 1994; 81: 127-131
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. *Immunologie.* 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, 2002
- Jarozeski MJ, Radciff G. Fundamentals of Flow Cytometry. *Mol Biotechnol.* 1999; 11: 37-53
- Jones, SA. Directing Transition from Innate to Acquired Immunity: Defining a Role for IL-6. *J Immunol.* 2005; 175: 3463-3468
- Joris J, Cigarini I, Legrand M, Jacquet N, De Groote D, Franchimont P, Lamy M. Metabolic and respiratory changes after cholecystectomy performed via laparotomy or laparoscopy. *Br J Anaesth.* 1992; 69: 341-345
- Kawasaki T, Kawasaki C, Ogata M, Shigematsu A. The Effect of Local Anesthetics on Monocyte mCD14 and Human Leukocyte Antigen-DR Expression. *Anesth Analg.* 2004; 98: 1024-1029
- Kawasaki T, Ogata M, Kawasaki C, Tomihisa T, Okamoto K, Shigematsu A. Surgical Stress Induces Endotoxin Hyporesponsiveness and an Early Decrease of Monocyte mCD14 and HLA-DR Expression During Surgery. *Anesth Analg.* 2001; 92: 1322-6
- Kleinschmidt S(a), Bauer M, Wanner G, Bußmann D, Ziegenfuß T, Menger MD, Larsen R. Einfluss von Gammahydroxybuttersäure (GHB) auf die proinflammatorische Zytokin-Genexpression bei koronarchirurgischen Eingriffen. *Anaesthesist.* 1998; 47: 651-662
- Kleinschmidt S(b), Wanner GA, Bussmann D, Kremer JP, Ziegenfuß T, Menger MD, Bauer M. Proinflammatory cytokine gene expression in whole blood from patients undergoing coronary artery bypass surgery and its modulation by pentoxifylline. *Shock.* 1998; 9: 12-20
- Koksal GM, Sayilgan C, Gungor G, Oz H, Sen O, Uzun H, Aydin S. Effects of sevoflurane and desflurane on cytokine response during tympanoplasty surgery. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2005; 49: 835-839
- Koltun WA, Bloomer MM, Tilber AF, Seaton JF, Ilahi O, Rung G, Gifford RM, Kauffman GL. Awake Epidural Anesthesia Is Associated With Improved Natural Killer Cell Cytotoxicity and a Reduced Stress Response. *Am J Surg.* 1996; 171: 68-73
- Kreutz M, Ackermann U, Hauschildt S, Krause SW, Riedel D, Bessler W, Andreesen R. A comparative analysis of cytokine production and tolerance induction by bacterial lipopeptides, lipopolysaccharides and *Staphylococcus aureus* in human monocytes. *Immunology.* 1997; 92: 396-401

- 
- Krumholz W, Stubbe K, Szalay G. Der Einfluss verschiedener in der Intensivmedizin adjuvant eingesetzter Medikamente auf die Monozyten-Chemotaxis. *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther.* 2002; 37(8): 463-467
- Larsen B, Hoff G, Wilhelm W, Buchinger H, Wanner GA, Bauer M. Effect of intravenous anesthetics on spontaneous and endotoxin-stimulated cytokine response in cultured human whole blood. *Anesthesiology.* 1998; 89: 1218-1227
- Leguit P, Meinesz A, Zeijlemaker WP, Sellekens PTA, Eijvoogel VP. Immunological studies in burn patients: I. Lymphocyte transformation in vitro. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1973; 44: 101-121
- Lin E, Calvano SE, Lowry SF. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. *Surgery* 2000; 127(2): 117-126
- Lin E, Lowry SF. Inflammatory cytokines in major surgery: a functional perspective. *Intensive Care Med.* 1999; 25: 255-257
- Löffler G, Petrides PE. *Biochemie und Pathobiochemie.* 7. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 2003
- Loop T, Dovi-Akue D, Frick M, Roesslein M, Egger L, Humar M, Hoetzel A, Schmidt R, Borner C, Pahl HL, Geiger KK, Pannen BHJ. Volatile Anesthetics Induce Caspase-dependent, Mitochondria-mediated Apoptosis in Human T Lymphocytes In Vitro. *Anesthesiology.* 2005; 102: 1147-57
- MacNeil IA, Suda T, Moore KW, Mosmann TR, Zlotnik A. IL-10, a novel growth cofactor for mature and immature T cells. *J Immunol.* 1990; 145: 4167-4173
- Maier S, Traeger T, Westerholt A, Heidecke CD. Besonderheiten der abdominalen Sepsis. *Der Chirurg.* 2005; 76: 829-836
- Maruszynski M, Pojda Z. Interleukin 6 (IL-6) levels in the monitoring of surgical trauma. A comparison of serum IL-6 concentrations in patients treated by cholecystectomy via laparotomy or laparoscopy. *Surg Endosc.* 1995; 9: 882-885
- Mikawa K, Akamatsu H, Nishina K, Shiga M, Maekawa M, Obara H, Niwa Y. Inhibitory effect of local anesthetics on reactive oxygen species production by human neutrophils. *Acta Anaesthesiol Scand.* 1997; 41: 524-528
- Mitov IG, Kropec A, Benzing A, Just H, Garotta G, Galanos C, Freudenberg M. Differential cytokine production in stimulated blood cultures from intensive care patients with bacterial infections. *Infection.* 1997; 25: 206-212
- Mølviq J, Baek L, Christensen P, Manogue KR, Vlassara H, Platz P, Nielsen LS, Svejgaard A, Nerup J. Endotoxin-stimulated human monocyte secretion of interleukin 1, tumour necrosis factor alpha, and prostaglandin E2 shows stable interindividual differences. *Scand J Immunol.* 1988; 27: 705-716

- 
- Morisaki H, Aoyama Y, Shimada M, Ochiai R, Takeda J. Leucocyte distribution during sevoflurane anaesthesia. *Br J Anaesth.* 1998; 80: 502-503
- Moudgil GC. Effect of premedicants, intravenous anaesthetic agents and local anaesthetics on phagocytosis in vitro. *Can. Anaesth. Soc. J.* 1981; 28: 597-602
- Moudgil GC. Influence of halothane on mortality from murine hepatitis virus (MHV3). *Br J Anesth.* 1973; 45: 1236
- Nishina K, Akamatsu H, Mikawa K, Shiga M, Maekawa N, Obara H, Niwa Y. The inhibitory effects of Thiopental, Midazolam and Ketamine on human neutrophil functions. *Anesth Analg.* 1998; 86: 159-165
- Ogata M, Okamoto K, Kohriyama K, Kawasaki T, Itoh H, Shigematsu A. Role of interleukin-10 on hyporesponsiveness of endotoxin during surgery. *Crit Care Med.* 2000; 28: 3166-3170
- Okuno S, Noda H, Kugimiya T, Salonji K. The influence of local anesthetics on human leukocyte functions studied by micro whole blood collection and flowcytometry. *Masui.* 1996; 45: 317-325
- Pirttikangas CO, Perttilä J, Salo M, Vainio O, Liukko-Sipi S. Propofol infusion anaesthesia and immune response in minor surgery. *Anaesthesia.* 1994; 49: 13-16
- Polk HC, Wellhausen SR, Regan MP, George CD, Cost K, Borzotta AP, Davidson PR. A systematic study of host defense processes in badly injured patients. *Ann Surg.* 1986; 204: 282-299
- Procopio MA, Rassias AJ, DeLeo JA, Pahl J, Hildebrandt L, Yeager MP. The *In Vivo* Effects of General and Epidural Anesthesia on Human Immune Function. *Anesth Analg.* 2001; 93: 460-465
- Pulliam L, Gascon R, Stubblebine M, McGuire D, McGrath MS. Unique monocyte subset in patients with AIDS dementia. *Lancet.* 1997; 349: 692-695
- Qureshi ST, Larivière L, Leveque G, Clermont S, Moore KJ, Gros P, Malo D. Endotoxin-tolerant Mice Have Mutations in Toll-like Receptor 4 (Tlr4). *J Exp Med.* 1999; 189: 615-625
- Redl HR, Aderem A, Beutler BA, Calandra T, Mira JP, Ulevitch R. Clinical expert round table discussion (session 1) at the Margaux Conference on Critical Illness: innate immunity: host recognition of and sensitivity to bacterial components. *Crit Care Med.* 2001; 29: 19-20
- Redmond HP, Watson RW, Houghton T, Condron C, Watson RG, Bouchier-Hayes D. Immune function in patients undergoing open vs laparoscopic cholecystectomy. *Arch Surg.* 1994; 129: 1240-1246
- Rem J, Brandt MR, Kehlet H. Prevention of postoperative Lymphopenia and granulocytosis by epidural analgesia. *Lancet.* 1980; 1: 283-284

- 
- Roche Diagnostics GmbH. Instruction Manual h-Interleukin-10 ELISA. 1999
- Roche Diagnostics GmbH. Instruction Manual h-Interleukin-6 ELISA. 1999
- Roche Diagnostics GmbH. Instruction Manual h-Tumor Necrosis Factor-alpha ELISA. Version 2, June 1999
- Rosenberg PH, Renkonen OV. Antimicrobial activity of bupivacaine and morphine. *Anesthesiology*. 1985; 62: 178-179
- Rothe G, Gabriel H, Kovacs F, Klucken J, Stöhr J, Kindermann W, Schmitz G. Peripheral blood mononuclear phagocyte subpopulations as cellular markers in hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996; 16: 1437-1447
- Sansom DM. CD28, CTLA-4 and their ligands: who does what and to whom? *Immunology*. 2000; 101: 169-177
- Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *The EBMO J*. 1991; 10: 2247-2258
- Sharpe AH, Freeman GJ. The B7-CD28 Superfamily. *Nat Rev Immunol*. 2002; 2: 116-126
- Simeonova GP, Slavov E, Usunov R, Halacheva K, Dinev DN. Increased apoptosis of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) during general and epidural anaesthesia in dogs. *Vet Res Commun*. 2008; 32: 619-626
- Simmons DL, Tan S, Tenen DG, Nicholson-Weller A, Seed B. Monocyte Antigen CD14 Is a Phospholipid Anchored Membrane Protein. *Blood*. 1989; 73: 284-289
- Snel JJ. Immunität und Narkose. *Berliner Klinische Wochenschrift*. 1903; 63: 245-61
- Soares AMVC, Calvi SA, Peraçoli MTS, Fernandez AC, Dias LA, Dos Anjos AR. Modulatory effect of prostaglandins on human monocyte activation for killing of high- and low-virulence strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Immunology*. 2001; 102: 480-485
- Song H, Jeong DC. The Effect of Propofol on Cytotoxicity and Apoptosis of Lipopolysaccharide-Treated Mononuclear Cells and Lymphocytes. *Anesth Analg*. 2004; 98: 1724-1728
- Thomas R, Lipsky PE. Human peripheral blood dendritic cell subsets: isolation and characterization of precursor and mature antigen-presenting cells. *J Immunol*. 1994; 153: 4016-4028
- Thompson-Snipes L, Dhar V, Bond MW, Mosmann TR, Moore KW, Rennick DM. Interleukin 10: A Novel Stimulatory Factor for Mast Cells and Their Progenitors. *J Exp Med*. 1991; 173: 507-510

- 
- Tønnesen E, Wahlgreen C. Influence of extradural and general anaesthesia on natural killer cell activity and lymphocyte subpopulations in patients undergoing hysterectomy. *Br J Anaesth.* 1988; 60: 500-507
- Tracey KJ, Cerami A. Tumor necrosis factor: an updated review of its biology. *Crit Care Med* 1993; 21: 415-422
- Tsuchiya M, Asada A, Arita K, Utsumi T, Yoshida T, Sato EF, Utsumi K, Inoue M. Induction and mechanism of apoptotic cell death by propofol in HL-60 cells. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2002; 46: 1068-1074
- Tubaro E, Borelli G, Croce C, Cavallo G, Santangeli C. Effect of Morphine on Resistance to Infection. *J Infect Dis.* 1983; 148: 656-666
- Volk T, Schenk M, Voigt K, Tohtz S, Putzier M, Kox WJ. Postoperative Epidural Anesthesia Preserves Lymphocyte, but not Monocyte, Immune Function After Major Spine Surgery. *Anesth Analg.* 2004; 98: 1086-1092
- Wilhelm W, Grundmann U, Rensing H, Werth M, Langemeyer J, Stracke C, Dhingra D, Bauer M. Monocyte deactivation in severe human sepsis or following cardiopulmonary bypass. *Shock.* 2002; 17: 354-360
- Wilson BMG, Severn A, Rapson NT, Chana J, Hopkins P. A convenient human whole blood culture system for studying the regulation of tumor necrosis factor release by bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol Methods.* 1991; 139: 233-240
- Yabuki M, Tsutsui K, Horton AA, Yoshioka T, Utsumi K. Caspase activation and cytochrome c release during HL-60 cell apoptosis induced by a nitric oxide donor. *Free Radic Res.* 2000; 32: 507-514
- Yeager MF, Colacchio TA, Yu CT, Hildebrandt L, Howell AL, Weiss J, Guyre PM. Morphine Inhibits Spontaneous and Cytokine-enhanced Natural Killer Cell Cytotoxicity in Volunteers. *Anesthesiology.* 1995; 83: 500-508
- Yeager MF, Yu CT, Campbell AS, Moschella M, Guyre PM. Effect of morphine and  $\beta$ -endorphin on human Fc receptor dependent and natural killer cell functions. *Clin Immunol Immunopathol.* 1992; 62: 336-343
- Ziegeler S, Buchinger H, Fink T, Stoll S, Christmann T, Rensing H, Larsen R. Recovery of immune function after cardiopulmonary bypass is faster with total intravenous as compared to inhalational general anesthesia. *European Journal of Anaesthesiology.* 2006; 23: 59
- Ziegeler S, Raddatz A, Schneider SO, Sandmann I, Sasse H, Bauer I, Kubulus D, Mathes A, Lausberg HF, Rensing H. Effects of Haemofiltration and mannitol Treatment on Cardiopulmonary-Bypass Induced Immunosuppression. *Scand J Immunology.* 2009; 69: 234-241
- Ziegenfuß T, Wanner GA, Grass C, Bauer I, Schüder G, Kleinschmidt S, Menger MD, Bauer M. Mixed agonistic-antagonistic cytokine response in whole blood from patients undergoing abdominal aortic aneurysm repair. *Intensive Care Med.* 1999; 25: 279-287

Ziegler-Heitbrock HWI, Passlick B, Flieger D. The monoclonal antimonocyte antibody My4 stains B lymphocytes and two distinct monocyte subsets in human peripheral blood. *Hybridoma*. 1988; 7: 521-527

Zongze Z, Jia Z, Chang C, Kai C, Yanlin W. Protective effects of remifentanil on septic mice. *Mol Biol Rep*. 2010; 37: 2803–2808



---

## 6.2 ANHANG

### 6.2.1 VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

µg	Mikrogramm
Abb	Abbildung
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
ASA	American Society of Anesthesiologists – Klassifikation
BFA	Brefeldin A
BSA	bovines Serumalbumin
CD	cluster of differentiation
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CRP	C-reaktives Protein
CSE	kombinierte Spinal-Epidural-Anästhesie
CSF	Koloniestimulierender Faktor
DIC	disseminierte intravasale Gerinnung
E.coli	Escherichia coli
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
et al.	et alii, und andere
Fa.	Firma
FACS	fluorescence activated cell sorting
FBS	fetales Kälberserum
FiO <sub>2</sub>	inspiratorische Sauerstoffkonzentration
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FL	Fluorochrom
FSC	forward scatter
GF	Wachstumsfaktor, growth-factor
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HL	human leukemia
HLA	human leucocyte antigen
I.E.	Internationale Einheiten
i.v.	intravenös
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ITN	Intubationsnarkose
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
l	Liter
LBP	LPS-bindendes Protein
LPS	Lipopolysaccharid
m	Meter

---

M	Molmasse
MAC	Membranangriffkomplex
MAC	minimale alveoläre Konzentration
mAb	monoklonaler Antikörper
mg	Milligramm
MHC	major histocompatibility complex
min	Minute
ml	Milliliter
MPS	mononukleäres Phagozytensystem
n	nano
N <sub>2</sub> O	Distickstoffmonoxid, Lachgas
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid
NF	Nekrose-Faktor
NF-κB	nuclear factor κB
NKC	Natürliche Killerzellen
NO	Stickoxid
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OH	Hydroxyl-Radikal
PBS	phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Salzlösung
PCEA	Patienten-kontrollierte epidurale Analgesie
PCIA	Patienten-kontrollierte Schmerzpumpen
PDK	Peridural-Katheter
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridin-Chlorophyll-Protein
pg	Pikogramm
PGE	Prostaglandin
rpm	revolutions per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Zellkulturmedium
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SPA	Spinalanästhesie
SSC	side scatter
Tab	Tabelle
TCR	T-Zell-Rezeptor
TEP	Totalendoprothese
TGF	transforming growth factor
Th	Thorakalwirbel
TIVA	Total intravenöse Anästhesie
TLR	toll-like receptor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
z. B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

## 6.2.2 VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN

- Abb. 1 Der Toll-like Rezeptor 4 – Reaktionsweg.
- Abb. 2 „Sandwich-Prinzip“ des enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).
- Abb. 3 Enzyme-linked immunosorbent assay.
- Abb. 4 Darstellung der Zellpopulationen mit Forward Scatter (FSC) und Side Scatter (SSC).
- Abb. 5 Charakterisierung einer Zellpopulation mittels FACS-Analyse.
- Abb. 6 Probenaufarbeitung für fluorescence-activated cell sorting.
- Abb. 7 Unstimulierte und endotoxinstimulierte TNF-  $\alpha$ -Ausschüttung.
- Abb. 8 Unstimulierte und endotoxinstimulierte IL-10-Ausschüttung.
- Abb. 9 Unstimulierte und endotoxinstimulierte IL-6-Ausschüttung.
- Abb. 10 Prozentuale Verteilung der monozytären CD14<sup>++</sup> Zellen im Spontanverlauf.
- Abb. 11 Prozentuale Verteilung der monozytären CD14<sup>+</sup> Zellen im Spontanverlauf.
- Abb. 12 Prozentuale Verteilung der monozytären CD14<sup>neg</sup> Zellen im Spontanverlauf.
- Abb. 13 Prozentuale Verteilung der monozytären CD14<sup>++</sup> Zellen nach Endotoxin-stimulation.
- Abb. 14 Prozentuale Verteilung der monozytären CD14<sup>+</sup> Zellen nach Endotoxin-stimulation.
- Abb. 15 Prozentuale Verteilung der monozytären CD14<sup>neg</sup> Zellen nach Endotoxin-stimulation.
- Abb. 16 „Spectral overlap“ bei Mehrfachfärbung.

---

### 6.2.3 VERZEICHNIS DER TABELLEN

Tab. 1	Übersicht über die Bestandteile des Immunsystems.
Tab. 2	Wichtige Kenngrößen der verwendeten ELISA-Kits [BD OptEIA <sup>TM</sup> ].
Tab. 3	Labormaterialien.
Tab. 4	Chrakterisierung der Patientengruppen.
Tab. 5	Absolutwerte der spontanen TNF- $\alpha$ -Freisetzung.
Tab. 6	Absolutwerte der endotoxinstimulierten TNF- $\alpha$ -Freisetzung.
Tab. 7	Absolutwerte der spontanen IL-10-Freisetzung.
Tab. 8	Absolutwerte der endotoxinstimulierten IL-10-Freisetzung.
Tab. 9	Absolutwerte der spontanen IL-6-Freisetzung.
Tab. 10	Absolutwerte der endotoxinstimulierten IL-6-Freisetzung.
Tab. 11	Prozentuale Verteilung der monozytären CD14 <sup>++</sup> Zellen im Spontanverlauf.
Tab. 12	Prozentuale Verteilung der monozytären CD14 <sup>+</sup> Zellen im Spontanverlauf.
Tab. 13	Prozentuale Verteilung der monozytären CD14 <sup>neg</sup> Zellen im Spontanverlauf.
Tab. 14	Prozentuale Verteilung der monozytären CD14 <sup>++</sup> Zellen nach Endotoxin-stimulation.
Tab. 15	Prozentuale Verteilung der monozytären CD14 <sup>+</sup> Zellen nach Endotoxin-stimulation.
Tab. 16	Prozentuale Verteilung der monozytären CD14 <sup>neg</sup> Zellen nach Endotoxin-stimulation.

## 7. Dank

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, ohne deren Hilfe und Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Namentlich bedanken möchte ich mich bei:

Frau Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Inge Bauer für ihre großartige Unterstützung und ausgezeichnete Beratung, das große Vertrauen, das sie mir entgegengebracht hat, und für die Möglichkeit und den Freiraum eigenverantwortlich arbeiten zu können. Ganz besonders freue ich mich darüber, dass Du, liebe Inge, auch weiterhin bei künftigen Forschungsvorhaben an meiner Seite bist.

Herrn Dr. med. Sven Schneider für die wunderbare Betreuung in den vergangenen Jahren und die Förderung zu eigenen kritischen Denkansätzen. Dein wissenschaftlicher Enthusiasmus, lieber Sven, war ansteckend und hat mich nachhaltig für das experimentelle Arbeiten begeistert.

Meinen „Mit-Doktorandinnen“ Frau Lisa Hartmann und Frau Rita Nkansah für eine tolle Zeit. Ich danke Euch für die gemeinsamen Nächte und Wochenenden im Labor. Mit Euch war es die perfekte Balance zwischen Arbeit und Entspannung.

Ein besonderes Dankeschön auch an Frau Beate Wolf, die uns bei der praktischen Durchführung der Versuche immer eine große Hilfe war.

Außerdem danke ich Herrn Professor Dr. med. Hauke Rensing, Herrn Professor Dr. med. Reinhard Larsen und Herrn Professor Dr. med. Thomas Volk für die Überlassung des Dissertationsthemas und die Möglichkeit im Anästhesiologischen Labor der Universitätsklinik des Saarlandes zu forschen.

## 8. Lebenslauf

### Daten zur Person

---

Name: Friederike Ursula Behmenburg  
Geburtsdatum: 22.12.1983  
Geburtsort: Iserlohn  
Adresse: Christophstr. 81  
40225 Düsseldorf  
  
Telefon: 0170 / 232 77 56  
E-Mail: friederike.behmenburg@med.uni-duesseldorf.de

### Schullaufbahn

---

08/1990 – 06/1994 Grundschule an der Waisenhausstraße, Iserlohn  
08/1994 – 06/2003 Gymnasium An der Stenner, Iserlohn, Abitur  
09/2000 – 06/2001 Miss Porter's School in Farmington, Connecticut, USA

### Hochschulausbildung

---

2003 – 2009 Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes  
09/2005 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
11/2009 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### Beruflicher Werdegang

---

Seit 01/2010 Ärztin in Weiterbildung in der Klinik für Anästhesiologie des  
Universitätsklinikums Düsseldorf

---

## Publikationen

---

### Originalarbeiten

Schneider SO, Biedler AE, Behmenburg F, Volk T, Rensing H. Impact of shed blood products on stimulated cytokine release in an in vitro model of transfusion. Acta Anaesthesiol Scand. 2012 May 9. doi: 10.1111/j.1399-6576.2012.02704.x. [Epub ahead of print].

### Abstracts

Bauer I, Behmenburg F, Hollmann MW, Heinen A, Huhn R. Cardioprotection by PKA activation is mediated by mKCa-channels. Euroanesthesia 2012, Paris.

Behmenburg F, Huhn R, Bauer I, Hollmann MW, Heinen A. Der kardioprotektive Effekt einer Proteinkinase A-Aktivierung wird über mitochondriale Ca<sup>2+</sup>-sensitive Kaliumkanäle vermittelt. Deutscher Anästhesiecongress 2012, Leipzig.

Heinen A, Behmenburg F, Bauer I, Hollmann MW, Huhn R. Kardioprotektion im Alter durch Aktivierung mitochondrialer Ca<sup>2+</sup>-sensitiver Kaliumkanäle. Deutscher Anästhesiecongress 2012, Leipzig.

Huhn R, Behmenburg F, Bauer I, Hollmann MW, Heinen A. Kardioprotektion im Alter durch Aktivierung von mKCa-Kanälen in der Ratte in vivo. Wissenschaftliche Arbeitstage der Deutschen Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin 2012, Würzburg.

Schneider S, Biedler A, Behmenburg F, Rensing H, Mathes A. Einfluss des Anästhesieverfahrens auf die Zytokinfreisetzung bei knieendoprothetischen Eingriffen. Deutscher Anästhesiecongress 2010, Nürnberg.