

Aus der Universitätsklinik für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie
Tübingen

**Frühe Marker des sterilen systemischen
Inflammationssyndroms (SIRS) nach Herzoperationen**

Inaugural-Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Veseli, Kujtim

2017

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter: Professor Dr. med. T. Walker
2. Berichterstatter: Professor Dr.med. M. Willmann

Tag der Disputation: 27.11.2017

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	VI
1. Einleitung	1
1.1 Das systemische inflammatorische Response-Syndrom: Definitionen und Begriffsbestimmung	1
1.2 Das SIRS im postoperativen Verlauf nach Herzoperationen	3
1.3 Probleme in der perioperativen SIRS Diagnostik	4
1.4 Hypothese und Fragestellung der vorliegenden Arbeit.....	5
1.5 In dieser Arbeit analysierte Plasma-Moleküle als potentielle Marker eines SIRS	6
2. Material und Methoden	14
2.1 Art der Studie, formale Aspekte und Zustimmung der Ethikkommission .	14
2.2 Patientenrekrutierung, Ein- und Ausschlusskriterien der Studie:.....	14
2.3 Perioperative Behandlung: chirurgische und anästhesiologische Verfahren	15
2.4 Probenaufnahme, Aufbereitung und Lagerung	19
2.5 Klinische Symptome, Untersuchung auf das Vorliegen eines SIRS und Allokation der Patienten zu einer Studiengruppe.....	21
2.6 Analytische Methoden	21
2.7 Multiplex bead-based Immunoassay zur Zytokinanalyse	22
2.8 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) zur Messung der Plasmakonzentrationen von sTREM-1, sCD163 und Endocan	24
2.9 PicoGreen Strategie zum Nachweis der cfDNA	27
2.10 Monozyten-Aktivierungs-Test (MAT)	28

2.11 Konzentrationsberechnungen der spektralphotometrisch analysierten Proben	30
2.12 Statistische Analysen.....	31
3. Ergebnisse	32
3.1 Demographie und Strukturgleichheit der Studiengruppen	32
3.2 Klinische Symptome und postoperativer Verlauf: Die SIRS definierenden Parameter Körpertemperatur, Tachykardie, Tachypnoe, Kohlendioxidpartialdruck und Leukozytenzahl.....	34
3.3 Postoperativer Konzentrationsverlauf etablierter Marker für Inflammation: C-reaktives Protein und Procalcitonin.....	39
3.4 Zytokine in der kein-SIRS und SIRS Gruppe: IL1 β , IL2, IL6, IL8, IL10 und TNF α und IFN γ	41
3.5 sCD163, TREM-1, Endocan (ESM-1) sowie cell-free DNA (cfDNA) in den Untersuchungsgruppen	49
3.6 Der Monozyten-Aktivierungs-Test (MAT)	56
4. Diskussion.....	60
4.1 Methodische Aspekte der Arbeit.....	60
4.2 Diskussion des SIRS Begriffes und seiner Definition vor dem Hintergrund der durchgeführten Analysen.....	61
4.3 Konzentrationsverläufe potentieller Marker eines SIRS im postoperativen Verlauf nach Herzoperationen	63
4.4 Parameter für die anhand der gewonnenen Daten keine Aussage über ihre Bedeutung im SIRS getroffen werden kann	64
4.5 Parameter die keine Differenzierung zwischen kein-SIRS und SIRS Patienten zulassen und die damit nicht diagnostisch nutzbar sind.....	65
4.5 Parameter die eine Differenzierung zwischen kein-SIRS und SIRS Patienten zulassen und damit diagnostisch genutzt werden könnten. ...	68
4.6 Konklusion und Ausblick:.....	73

5. Zusammenfassung:.....	75
6. Literatur	77
7. Wissenschaftliche Veröffentlichungen	84
8. Erklärung zum Eigenanteil an der wissenschaftlichen Arbeit	85
9. Danksagung	86
10. Lebenslauf	87

Abkürzungsverzeichnis

ACCP/SCCM	American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine
ACTH	Adrenocorticotrophes Hormon
BSA	Bovines Serum Albumin
cfDNA	Cell-Free Deoxyribonucleic acid
CRP	C-reaktives Protein
EKG	Elektrokardiogramm
EKZ	Extrakorporale Zirkulation
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ESM-1	Endothelial-cell specific molecule-1, synonym: Endocan
EU	Endotoxin Units (Endotoxin Einheiten)
HLM	Herz-Lungen-Maschine
HRP	Horseradish Peroxidase (Enzym)
IFN- γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysacharid
MAT	Monozyten-Aktivierungs-Test
MHC	Major histocompatibility complex
PaCO ₂	Arterieller Kohlendioxyd Partialdruck
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PCT	Procalcitonin
sCD163	Soluble cluster of differenciation 163; synonym: Macro 163
SIRS	Deutsch: systemisches inflammatorisches Response-Syndrom engl.: systemic inflammatory response syndrome
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
THG	Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
TREM-1	Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1
ZVD	Zentraler Venendruck

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Körpertemperatur in der kein-SIRS und SIRS Gruppe	35
Abbildung 2:	Herzfrequenz in der kein-SIRS und SIRS Gruppe.	36
Abbildung 3:	Atemfrequenz in der kein-SIRS und SIRS Gruppe.	37
Abbildung 4:	CO ₂ Partialdruck in der kein-SIRS und SIRS Gruppe.	38
Abbildung 5:	Leukozyten in der kein-SIRS und SIRS Gruppe.	39
Abbildung 6:	C-reaktives Protein in der kein-SIRS und SIRS Gruppe.	40
Abbildung 7:	Procalcitonin in der kein-SIRS und SIRS Gruppe.	41
Abbildung 8:	IL1 β Plasmakonzentrationen in der kein-SIRS und SIRS Gruppe.	42
Abbildung 9:	Normierte IL1 β Plasmakonzentrationen in der kein-SIRS und SIRS Gruppe.	44
Abbildung 10:	IL10 Plasmakonzentrationen in der kein-SIRS und SIRS Gruppe.	45
Abbildung 11:	Normierte IL10 Plasmakonzentrationen in der kein-SIRS und SIRS Gruppe.	46
Abbildung 12:	IL6 Plasmakonzentrationen in der kein-SIRS und SIRS Gruppe.	47
Abbildung 13:	IL8 Plasmakonzentrationen in der kein-SIRS und SIRS Gruppe.	48
Abbildung 14:	TNF α Plasmakonzentrationen in der kein-SIRS und SIRS Gruppe.	49
Abbildung 15:	sCD163 Plasmakonzentrationen in der kein-SIRS und SIRS Gruppe.	50
Abbildung 16:	Normierte sCD163 Plasmakonzentrationen in der kein-SIRS und SIRS Gruppe.	51
Abbildung 17:	Endocan (ESM-1) Plasmakonzentrationen in der kein-SIRS und SIRS Gruppe.	52
Abbildung 18:	Endocan (ESM-1) Konzentrationsänderungen in der kein-SIRS und SIRS Gruppe.	53

Abbildung 19:	cell-free DNA Plasmakonzentrationen in der kein-SIRS und der SIRS Gruppe.	54
Abbildung 20:	cell-free DNA Konzentrationsänderungen in der kein-SIRS und der SIRS Gruppe.	55
Abbildung 21:	sTREM-1 Plasmakonzentrationen in der kein-SIRS und der SIRS Gruppe.	56
Abbildung 22:	Monozyten-Aktivierungs-Test (MAT): IL1 β Ausschüttung in der kein-SIRS und der SIRS Gruppe nach Stimulierung mit 0,5 EU/ml Lipopolysaccharid (LPS).	58
Abbildung 23:	Monozyten-Aktivierungs-Test (MAT): normierte IL1 β Ausschüttung in der kein-SIRS und der SIRS Gruppe.	59
Abbildung 24:	Quotient der Plasmakonzentrationen von IL1 β /IL10 in der kein-SIRS und der SIRS Gruppe.	72

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	SIRS Kriterien	2
Tabelle 2:	Potentielle Marker eines SIRS	6
Tabelle 3:	Ein und Ausschlusskriterien	15
Tabelle 4:	Blutentnahme Zeitpunkte	20
Tabelle 1:	Demographische Daten der Gesamtkohorte	32
Tabelle 2:	Demographie und Komorbiditäten der kein-SIRS und SIRS Gruppe	33

1. Einleitung

1.1 Das systemische inflammatorische Response-Syndrom: Definitionen und Begriffsbestimmung

Das systemische inflammatorische Response-Syndrom (systemic inflammatory response syndrome), kurz SIRS (ICD-10 R65) ist ein klinischer Symptomenkomplex infolge einer Entzündungsreaktion des gesamten Körpers. Hierbei ist zunächst kein Rückschluss auf die auslösende Ursache möglich und nötig, es handelt sich um eine unspezifische Reaktion des Körpers und um eine rein symptomatische Diagnose [1]. Die Ursachen eines SIRS können vielfältig sein: Mechanische Gründe wie Traumen, große Wunden, Verbrennungen, aber auch chemische Auslöser, endogene Toxine wie bei einer akuten nekrotisierenden Pankreatitis oder exogene Toxine und Pyrogene die in den Kreislauf gelangen, immunologische Prozesse und vor allem auch große Operationen können ein SIRS auslösen [1]. Ein SIRS hervorgerufen durch eine Infektion wird als Sepsis bezeichnet.

Das Konzept des SIRS wurde erstmalig 1991 auf der American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference entworfen als Definition einer generalisierten Entzündungsreaktion [2, 3]. In den deutschen, fachübergreifenden S2-Leitlinien wurde das Konzept, der Begriff und die resultierenden Empfehlungen weitgehend übernommen [4, 5]. Ebenso übernommen wurde der Begriff in die *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems* (ICD-10 R65).

Die oben genannten Leitlinien nennen klinische Kriterien (Symptome) zur Diagnose eines SIRS diese sind in Tabelle 1 dargestellt. Ein SIRS kann diagnostiziert werden, wenn zeitgleich mindestens zwei der in der Tabelle genannten Symptome vorliegen.

Zur Diagnose einer Sepsis muss ein SIRS vorliegen, sowie der klinische oder mikrobiologische Nachweis eines Infektes erbracht sein. Wichtig in den genannten Leitlinien ist der Begriff der „akuten Organdysfunktion“, hierunter werden eine akute Enzephalopathie, eine Thrombozytopenie, eine Hypoxämie, eine renale Dysfunktion und eine metabolische Azidose subsummiert.

Tabelle 1: SIRS Kriterien [5]

Systemisches inflammatorisches Response-Syndrom SIRS (≥ 2 Kriterien)

Fieber ($\geq 38^\circ\text{C}$) oder Hypothermie ($\leq 36^\circ\text{C}$)

bestätigt durch eine rektale oder intravasale oder –vesikale Messung

Tachykardie: Herzfrequenz ≥ 90 /min

Tachypnoe (Frequenz ≥ 20 /min) o. Hyperventilation ($\text{PaCO}_2 \leq 4.3$ kPa / ≤ 33 mmHg)

Leukozytose ($\geq 12000/\text{mm}^3$) oder Leukopenie ($\leq 4000/\text{mm}^3$) oder $\geq 10\%$ unreife Neutrophile im Differentialblutbild

Der zusätzliche Nachweis einer dieser *akuten Organdysfunktionen* definiert sodann die schwere Sepsis. Der zusätzliche Nachweis eines systolischen arteriellen Blutdruckes von ≤ 90 mmHg oder eines Mitteldruckes ≤ 65 mmHg ohne Vasopressoren für mindestens eine Stunde definiert den septischen Schock.

Für die vorliegende Studie ist ausschließlich die in Tabelle 1 dargestellte SIRS Definition ausschlaggebend.

Jüngst nun wurde der Begriff des SIRS erneut diskutiert: Einerseits wurde auf die wesentliche prognoserelevante Bedeutung des posttraumatischen, sterilen SIRS hingewiesen [6, 7], andererseits wurde aber auch diskutiert, dass die Diagnosekriterien für klinische Belange zu sensitiv seien, da rund 90 % der schwer-traumatisierten auf einer Intensivstation SIRS Symptome aufweisen [8]. In diesem Zusammenhang wurden 2016 neue Kriterien für den Begriff „septischer Schock“ evaluiert und vorgeschlagen, die gänzlich auf den SIRS Begriff verzichten und das Augenmerk weg von klinischen Symptomen mehr auf hämodynamische Kriterien und die Laktatazidose verschieben [9]. Es ist davon auszugehen, dass also der SIRS und Sepsis- Begriff in nächster Zeit einer Revision unterliegen werden.

Sowohl in der wissenschaftlichen Diskussion als auch in der klinischen Dokumentation (ICD) und Kommunikation sind aktuell der oben erläuterte SIRS

Begriff gültig, entsprechend findet er auch in dieser Arbeit konsequent Anwendung.

1.2 Das SIRS im postoperativen Verlauf nach Herzoperationen

Die Entwicklung eines SIRS stellt einen wesentlichen Faktor der Mortalität und Morbidität nach Operationen an der Herz-Lungen-Maschine dar [10, 11]. In jüngeren Studien wird berichtet, dass rund 11 % der Patienten, die sich einer kardialen Operation unterziehen, ein SIRS entwickeln und diese Patienten zeigen eine deutlich erhöhte Mortalität gegenüber solchen die kein SIRS entwickeln [12, 13]. Einerseits stellt natürlich das chirurgische Trauma der kardialen Operation und die große Wundfläche einen Auslöser des SIRS dar [14], andererseits ist auch die extrakorporale Zirkulation (EKZ) der Herz-Lungen-Maschine ein signifikanter Auslöser eines SIRS: durch den Fremdoberflächenkontakt kommt es zu einer unspezifischen Aktivierung des Gerinnungs- und des Immunsystems. Es kommt zur Komplementaktivierung, zur unspezifischen Leukozytenaktivierung, zur verstärkten Expression von Adhäsionsmolekülen auf Leukozyten sowie zur Freisetzung von freien Sauerstoffradikalen, Arachnoidonsäuremetaboliten, Zytokinen, plättchenaktivierendem Faktor, Stickstoffmonoxyd aus zirkulierenden Zellen, aber auch das traumatisierte Myokard selbst ist eine Quelle proinflammatorischer Zytokine [11, 15-17]. Zuletzt ist auch eine Freisetzung von Toxinen aus den Fremdmaterialien der EKZ zu nennen [11, 16-18], auch wenn sie in der heutigen Praxis sicherlich weniger bedeutsam ist. Eine Reihe therapeutischer Implikationen wurden aus diesen Erkenntnissen abgeleitet [11, 19], jedoch ist es bislang nicht gelungen Tests zu etablieren, die ein SIRS vor Entwicklung der Klinik prognostizieren können. Insbesondere die Bedeutung der peri- oder intraoperativen Steroidgabe ist umstritten, in mehreren großen randomisierten placebokontrollierten Studien konnte weder die intraoperative Dexomethasongabe [20] noch die perioperative Methylprednisolongabe [21] die Inzidenz des postoperativen SIRS und die 30-Tage Mortalität reduzieren.

1.3 Probleme in der perioperativen SIRS Diagnostik

Die Prognose des SIRS ist analog der Sepsis abhängig von einer frühzeitigen und konsequenten Initiierung einer Therapie [22-24]. Somit kommt einer frühzeitigen und sicheren Diagnose eines SIRS eine grundlegende Bedeutung zu. Dies ist aber gerade im frühpostoperativen Verlauf nach einer Herzoperation problematisch. Praktisch alle SIRS definierenden Symptome sind zumindest potentiell durch die perioperative Situation, durch die eigentliche Herzoperation und vor allem durch prä- und perioperative Medikamentengaben maskiert und verfälscht: Thermoregulationsprobleme bestehen häufig in der Frühphase nach Herzoperationen, meist liegt eine relevante Hypothermie vor, wodurch Fieber maskiert werden kann. Hämodialyse und andere extrakorporale Verfahren sowie Antiphlogistika maskieren ebenso ein Fieber. Das Symptom einer Tachykardie ist in der frühpostoperativen Phase auch kaum nutzbar, einerseits sind die meisten herzkranken Patienten signifikant betablockiert, andererseits besteht oft eine Tachykardie aufgrund einer Hypovolämie. Drittens wird eine postoperative Herzfrequenz von 90/min als vorteilhaft angesehen [24] und daher häufig über externe Schrittmachertherapie erzeugt. Die Atemfrequenz und damit die Tachypnoe und auch der PaCO₂ als Parameter zur Diagnose eines SIRS ist generell erst nach Extubation und damit sehr verzögert zu verwerten. Die Leukozytose bleibt als einziges Symptom welches zunächst relativ unbeeinflusst erscheint, dennoch haben eine Mehrzahl der Patienten auch nach kleineren Operationen erfahrungsgemäß eine Leukozytose im Rahmen des Postaggressionsstoffwechsels, sodass auch dieser Parameter in der spezifischen Situation nach Herzoperationen als wenig zuverlässig gewertet werden muss.

Die klassischen Kriterien des SIRS sind auf die spezifische postoperative Situation nach Herzoperationen also nur schwer anwendbar. Dies findet auch darin Ausdruck, dass im praktisch- klinischen Alltag der Begriff SIRS häufig unpräzise verwendet wird, nämlich dann wenn ein Patient eine Vasoplegie und damit einen erhöhten Vasopressorenbedarf hat. Dies folgt aus der klinischen Erfahrung, dass eine unspezifische systemische Entzündungsreaktion der Vasoplegie zugrunde liegt.

Die bisherige SIRS Definition ist aus Sicht der perioperativen Medizin, insbesondere der Kardiochirurgie also suboptimal [25, 26]. In der Literatur finden sich entsprechend auch Vorschläge zur Revision der Kriterien [8, 9].

Aus dieser Situation heraus entsteht die Notwendigkeit zur Etablierung neuer, zuverlässiger-, und in der perioperativen Situation anwendbarer Marker eines SIRS die eine frühzeitige Diagnose und Therapie ermöglichen.

1.4 Hypothese und Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Aus dem, im vorangegangenen Kapitel Gesagten ist die Rationale und die Fragestellung für diese Studie direkt ableitbar: Es sollen Laborparameter identifiziert werden, die eine frühzeitige-, sichere und unverfälschte Diagnose eines SIRS abseits der klinischen Symptome im frühpostoperativen Verlauf zulassen und damit eine frühzeitige Therapie ermöglichen.

Die Hypothese der vorliegenden Arbeit lautet entsprechend:

Es gibt Laborparameter, die eine frühzeitige Diagnose eines systemischen Inflammationszustandes, eines SIRS, im Rahmen der postoperativen Intensivtherapie nach herzchirurgischen Eingriffen, und damit eine frühzeitige Therapie, ermöglichen.

Diese Hypothese lässt sich weiter spezifizieren hinsichtlich der untersuchten Parameter. Tabelle 2 zeigt die in dieser Arbeit untersuchten Laborparameter. Die Auswahl der gezeigten Parameter erfolgte anhand der Literatur bzw. infolge der Kenntnis, dass diese funktionell in einen inflammatorischen Prozess eingebunden sind. Ein weiteres, pragmatisches Kriterium für den Einschluss o.g. Parameter in die Arbeit war das Vorliegen eines etablierten, validierten und in unserem Labor praktikablen Messverfahrens für den jeweiligen Parameter.

Im Folgenden werden die einzelnen in diese Studien inkludierten Biomoleküle vorgestellt und die Rationalen zu ihrem Einschluss wird erläutert. Ebenso werden die grundsätzlichen Prinzipien zur Analyse erläutert.

Tabelle 2: Potentielle Marker eines SIRS

In dieser Studie untersuchte potentielle Marker eines SIRS	
CRP	C-reaktives Protein
PCT	Procalcitonin
IL1 β	Interleukin 1 beta
IL2	Interleukin 2
IL6	Interleukin 6
IL8	Interleukin 8
IL10	Interleukin 10
IFN- γ	Interferon gamma
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
TREM-1	Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 1
sCD163	Soluble cluster of differenciation 163
ESM-1, Endocan	Endothelial-cell specific molecule-1
cfDNA	Cell-Free Deoxyribonucleic acid
MAT	Stimulierbarkeit der Monozyten im Monozyten-Aktivierungs-Test (MAT)

1.5 In dieser Arbeit analysierte Plasma-Moleküle als potentielle Marker eines SIRS

Grundsätzlich wurden in der vorliegenden Arbeit die Konzentrationsverläufe verschiedener Plasmaproteine sowie der cell-free DNA im postoperativen Verlauf nach Herzoperationen bestimmt und hinsichtlich Ihrer Wertigkeit zur Diagnose eines SIRS beurteilt. Im Folgenden werden die neuen, in der Routinediagnostik bislang noch nicht genutzten Marker vorgestellt und ihre soweit bekannten Funktionen und ihre Assoziation zu SIRS und Sepsis erläutert.

Interleukine

Interleukine (IL) sind eine Untergruppe der Zytokine die der interzellulären Kommunikation des Immunsystems dienen [27]. Chemisch handelt es sich um Peptidhormone. Zwischenzeitlich sind über 30 verschiedene Interleukine bekannt deren Wirkung auf die verschiedenen Zellen des Immunsystems höchst unterschiedlich ist. Ihre Namensgebung durch numerische Bezeichnung

erfolgte in der Reihenfolge der Entdeckung und lässt keine Rückschlüsse auf die Funktion der einzelnen Interleukine zu.

Interleukin 1 β (IL1 β)

Interleukin 1 β ist ein hochwirksamer Botenstoff der Inflammation und nimmt eine zentrale Stellung in der proinflammatorischen Signalkaskade ein. Es wird hauptsächlich von Blutmonozyten ausgeschüttet und vermittelt unter anderem das „homing“ der Granulozyten an den Ort einer lokalisierten Entzündung. Zu den systemischen Wirkungen des Interleukin 1 β gehört die Auslösung von Fieber, die Auslösung einer Leukozytose, die Ausschüttung der Akute-Phase Proteine in der Leber sowie die IL6-Ausschüttung in anderen Leukozyten. Auch bewirkt es im Hypothalamus die Ausschüttung des Adrenocorticotropen Hormones (ACTH) und damit letztlich die Kortisolausschüttung in der Nebennierenrinde [28].

Interleukin 2 (IL2)

Interleukin 2 ist der wesentliche Botenstoff der T-Helferzellen. Es wird ausgeschüttet, wenn die T-Helferzelle auf einem MHC-II-Molekül ihr Antigen erkannt hat. Das IL2 wirkt als proliferationsstimulierender Faktor auf B-Lymphozyten und natürliche Killerzellen sowie auf die T-Helferzellen selbst [29]. Als eines der wenigen Interleukine die in ihrer rekombinanten Form als Arzneimittel zugelassen sind wird es als stimulierender Faktor der humoralen und zellulären spezifischen Immunität in der Immuntherapie des Nierenzellkarzinoms eingesetzt.

Interleukin 6 (IL6)

Interleukin 6 wird ähnlich dem Interleukin 1 β von Monozyten des peripheren Blutes sezerniert und ist ein starker Aktivator der Ausschüttung der Akute-Phase Proteine in der Leber aber auch der Lymphozytenproliferation [30]. Es vermittelt als Chemokin das „homing“ der T-Lyphozyten womit es eine wichtige Schnittstelle zwischen der unspezifischen und spezifischen Immunität darstellt [31].

Interleukin 8 (IL8)

Interleukin 8 ist der wesentliche Stimulationsfaktor der neutrophilen Granulozyten und induziert deren Proliferation, ihre Chemotaxis bzw. ihr „homing“ zum Ort der Entzündung und die Freisetzung von Sauerstoffradikalen durch die Selben [32]. Entsprechend wird IL8 lokal am Ort der Entzündung durch zirkulierende Monozyten aber auch durch Endothelzellen gebildet und sezerniert [33]. Neben der Hauptwirkung auf die Granulozyten ist IL8 auch als Faktor der Angiogenese bekannt.

Interleukin 10 (IL10)

Interleukin 10 ist ein wesentliches antiinflammatorisches Zytokin, hemmt also eine Vielzahl von Immunprozessen. So hemmt IL10 z.B. die Sekretion des proinflammatorischen IL1 β , wirkt hemmend auf T-Helfer-1 Lymphozyten [34], allerdings wirkt es stimulierend auf B-Lymphozyten und ihrer Differenzierung zur Plasmazelle, ist also ein Promotor der humoralen Immunität [35].

Interferon gamma (IFN- γ)

Interferon gamma wird sezerniert unter anderem von T-Helferzellen ist ein starker Aktivator der zytotoxischen T-Zell-Antwort, ebenso verstärkt es auf Makrophagen die Präsentation der MHC-II-Moleküle. Letztlich ist IFN γ somit ein starker Promotor der spezifischen Immunantwort [36, 37].

Tumornekrosefaktor alpha (TNF α)

TNF α wird hauptsächlich von Monozyten und Makrophagen sezerniert. Multiple lokale wie systemische Wirkungen des Proteo-Hormons sind bekannt: Systemisch löst es Fieber aus und wird traditionell als wesentlicher Vermittler der Kachexie bei chronisch konsumierenden Erkrankungen angesehen. Diese systemischen Wirkungen sind wesentlich vermittelt durch zerebrale Wirkungen von TNF α , so verstärkt es die Ausschüttung von ACTH und steigert damit den Kortisolspiegel, wirkt fiebererzeugend und appetitunterdrückend, außerdem führt es zu einer sekundären Insulinresistenz. Auch die Wirkungen auf die

Zellen des Immunsystems sind vielfältig: $\text{TNF}\alpha$ ist ein starker Aktivator der Makrophagen, der Phagozytose und der granulozytären-, insb. der neutrophilen Immunantwort. Nicht zuletzt löst $\text{TNF}\alpha$ in Zellen die Apoptose aus [38, 39]. In der Rheumatologie haben Antikörper gegen $\text{TNF}\alpha$ zwischenzeitlich einen festen Platz in der Therapie der rheumatoiden Arthritis und anderer Erkrankungen [40].

Soluble Human Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1 (sTREM-1)

Human Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 1 (TREM-1) wird auf der Zellmembran von Granulozyten und peripheren Monozyten exprimiert. Es steuert unter anderem die Degranulation von neutrophilen Granulozyten [41]. Die Aktivierung des membrangebundenen Rezeptors triggert darüber hinaus die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, ebenso wird die Transkription verschiedener proinflammatorischer Membranproteine verstärkt. Im Rahmen einer Sepsis-Reaktion kommt es zur Steigerung der Plasmakonzentration löslichen sTREM-1 (s für soluble). In mehreren Studien wurde gezeigt, dass durch erhöhte Plasmaspiegel von sTREM-1 einerseits Sepsispatienten frühzeitig identifiziert werden können, andererseits die Höhe des sTREM-1 Spiegels ein prognostischer Marker hinsichtlich des klinischen Verlaufes, also der Schwere der Sepsis ist [41-43]. In jüngeren Analysen konnte auch gezeigt werden, dass sTREM-1 den etablierten Parametern CRP (C-reaktives Protein) und PCT (Procalcitonin) in der Frühdiagnostik der Sepsis überlegen ist [42]. sTREM-1 Konzentrationen wurden bislang in einer Studie in SIRS Patienten untersucht, hier konnte gezeigt werden, dass die sTREM-1 Konzentrationen bei SIRS zwar erhöht sind, jedoch nicht in gleichem Maße wie bei der Sepsis. Allerdings korrelierte die sTREM-1 Konzentration auch im SIRS mit der klinischen Schwere der Erkrankung [44]. In einer einzelnen Studie korrelierte der sTREM-1 Spiegel auch mit postoperativen Komplikationen auf kardiochirurgischen Intensivstationen [45]. Bei den letztgenannten Studien handelt es sich allerdings um kleine, schlecht kontrollierte Serien, sodass die abschließende Beurteilung der Wertigkeit des sTREM-1 in der Diagnostik des

postoperativen SIRS noch nicht abgeschlossen, und vor allem dessen Beurteilung im Kontext der Herzchirurgie offen ist.

Soluble Cluster of Differentiation 163 (sCD163, Synonym: MACRO163)

Der Oberflächenrezeptor CD163 ist hauptsächlich auf Blutmonozyten und Makrophagen des peripheren Blutes exprimiert und gehört zur Scavenger-Rezeptor Superfamilie [46-49]. Eine besonders hohe Expression von CD163 findet sich auf „alternativ aktivierten“ Makrophagen [48, 50]. Neben der Beseitigung von Zelldetritus (Scavenger) und Aktivierung der spezifischen Immunantwort scheinen gerade letztere eine wichtige Rolle in der Dämpfung einer die Entzündungsreaktion zu spielen. CD163 fungiert als Rezeptor für Haptoglobin-Hämoglobin-Komplexe [47], ebenso ist CD163 an der Regulierung der Entzündungsreaktion beteiligt: In der Immunhistologie wird die Anwesenheit von CD163 mit einer postinfektiösen Erholungsphase und dem Rückgang der Entzündung in Verbindung gebracht [47].

Die lösliche Form, sCD163 (s für soluble) wird durch proteolytische Abspaltung des extrazellulären Anteils von CD163 [51] nach Toll-like Receptor-Aktivierung generiert. In Folge dessen steigt der Plasmaspiegel von sCD163 bei entzündlichen Erkrankungen. sCD163 ist im Plasma und auch anderen Körperflüssigkeiten detektierbar [52] und gilt als klinischer Marker einer Aktivierung und Proliferation von Makrophagen in Entzündungszuständen [47, 48]. Erhöhte sCD163-Spiegel wurden auch im postoperativen Verlauf nach koronarer Bypass-Chirurgie gemessen und in den Kontext arteriosklerotischer Erkrankungen gestellt [53, 54]. Erhöhte sCD163-Werte wurden auch in der Sepsis gemessen und am Beispiel der Pneumokokken-Pneumonie konnte gezeigt werden, dass die Höhe des CD163 Spiegels prädiktiv für einen letalen Ausgang ist [50]. In der uns bekannten Literatur findet sich nur eine Studie, die sCD163-Plasmaspiegel in SIRS und Sepsis Patienten vergleichend analysiert. In dieser Arbeit wurden in SIRS Patienten zwar absolut erhöhte, aber verglichen mit der Sepsis doch deutlich geringere sCD163 Werte gemessen. Die Plasmakonzentrationen in den Sepsispatienten korrelierten mit der Schwere der Erkrankung [55]. Zusammenfassend gibt es also deutliche Evidenz für eine

diagnostische Wertigkeit der sCD163-Plasmakonzentration in der Sepsis, wobei die Bedeutung des Parameters im SIRS noch weitgehend ungeklärt erscheint.

Endothelial-cell specific molecule-1 (ESM-1, Synonym: Endocan)

Endocan, auch bekannt als Endothelzellen-spezifisches Molekül-1 (endothelial-cell specific molecule-1, ESM-1), wurde ursprünglich entdeckt in endothelialen Zellen der Lungengefäße [56]. Verschiedene Funktionen werden für Endocan beschrieben: Endocan bindet das CD11a / CD18 (LFA-1) -Integrin auf Leukozyten und hemmt seine Bindung an ICAM-1 [57]. Ebenso spielt ESM-1 eine Rolle in der Migration von Endothelzellen [58] und damit auch in der Tumorbildung und Tumorangiogenese [59]. Endocan wird von Endothelzellen auch konstant sezerniert und ins Blut abgegeben. Die Expression- und auch die Sekretion von Endocan kann durch die proinflammatorischen Zytokine $TNF\alpha$ und $IL1\beta$ [60] aber durch bakterielle Lipopolysaccharide [61] oder durch die angiogenen Faktoren FGF-2 oder VEGF [62] induziert und gesteigert werden. $IFN\gamma$ [60] und Angiopoetin-1 hingegen reduzieren die Transkription von Endocan [63]. Neben einigen Berichten die Endocan mit der Angiogenese in verschiedenen Tumorentitäten in Verbindung bringen gibt es vereinzelte Studien die Endocan Spiegel im Plasma von Pneumonie- und Sepsis-Patienten untersuchten [61, 64, 65]. In diesen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Endocan einerseits als Marker der Sepsis fungiert, die Spiegelhöhe andererseits mit der Schwere der Erkrankung korreliert. Arbeiten zu den Plasmaspiegeln von Endocan im SIRS gibt es unserer Kenntnis nach nicht.

Cell-Free DNA (cfDNA)

Desoxyribonukleinsäure (DNA) befindet sich bekanntermaßen im Zellkern eukaryoter Zellen. Allerdings lässt sich auch im Plasma DNA als freies Molekül nachweisen (cell-free DNA, cfDNA). Hierbei handelt es sich um Fragmente nukleärer DNA, die im Rahmen des Zellunterganges freigesetzt wird. Insbesondere im Rahmen eines programmierten Zelltods (Apoptose) findet eine Fragmentation der nukleären DNA und deren Sekretion statt, aber auch bei der

Nekrose kommt es zur Freisetzung von DNA. Entsprechend ist es plausibel, dass in allen Zuständen erhöhten Zellumsatzes, also insbesondere bei Tumorerkrankungen und Entzündungen, der Plasmaspiegel an cfDNA ansteigt. In mehreren Studien wurde die cfDNA auch hinsichtlich ihrer Sequenzierbarkeit und damit ihrer diagnostischen Nutzbarkeit in der Tumorbilogie und in der pränatalen Medizin untersucht. In der vorliegenden Studie allerdings wurde die cfDNA nicht sequenziert, sondern lediglich quantitativ bestimmt. Erhöhte Werte von cfDNA wurden in Patienten mit verschiedenen Tumorarten nachgewiesen [66], ebenso wurde die cfDNA als Marker der Sepsis evaluiert. Die Plasmaspiegel der cfDNA korrelierten mit der Schwere des inflammatorischen Krankheitsbildes, die höchsten Werte fanden sich entsprechend im septischen Schock [67]. Studien die sich mit dem cfDNA Plasmaspiegel im perioperativen Verlauf und speziell im postoperativen SIRS beschäftigen sind uns aktuell nicht bekannt.

Monozytäre Anergie und der Monozyten-Aktivierungs-Test (MAT)

Als Pyrogene bezeichnet man Agenzien, die bei parenteraler Verabreichung Fieber auslösen können, die also im weiteren Sinne eine Immunantwort hervorrufen können. Diese Eigenschaft kann auf eine Vielzahl von Stoffen zutreffen - auf Endotoxine gramnegativer Bakterien (Lipopolysaccharide, LPS), aber auch auf Bestandteile grampositiver Bakterien, Viren oder Pilze sowie auf anorganische Substanzen wie Gummiabrieb, Kunststoffe oder Metallverbindungen. In der Herstellung und Testung von vor allem intravenös zu verabreichenden Medikamenten spielt natürlich der Nachweis einer Pyrogenfreiheit eine große Rolle. Klassischerweise wurden Substanzen auf ihren Pyrogengehalt durch intravenöse Verabreichung in Kaninchen und folgende Körpertemperaturmessungen getestet. Seit einigen Jahren besteht nun der Monozyten-Aktivierungs-Test (MAT) als allgemein akzeptierte und in den USA und Europa für die Arzneimitteltestung zugelassener Test [68]. Grundsätzlich werden beim MAT Leukozyten des peripheren Blutes, vor allem Monozyten in ex-vivo Kultur mit bekannten Endotoxinkonzentrationen (z.B. *Escherichia coli* Lipopolysaccharid; LPS) stimuliert, in einer weiteren Probe wird das zu testende Analyt zugegeben. Nach einer entsprechenden Inkubation wird

letztlich IL1 β , IL6 oder TNF α im Überstand bestimmt. Die Konzentration der proinflammatorischen Zytokine im Überstand der zu beurteilenden Probe im Vergleich zu der im Endotoxinstandard erlaubt eine quantitative Aussage über den Endotoxingehalt der zu testenden Probe [69, 70]. In der vorliegenden Studie allerdings wurde der MAT in anderer Weise verwendet: es wurde nicht eine Substanz auf den Gehalt von Pyrogenen untersucht, sondern Ziel der Untersuchung war die Reaktionsfähigkeit der Patientenmonozyten in SIRS und kein-SIRS Patienten auf einen definierten Endotoxinreiz im Vergleich zueinander und im Vergleich zu standardisierten Blutproben. Es ist bekannt, dass in der Sepsis die Stimulierbarkeit der Monozyten herabgesetzt ist, dass gewissermaßen ein Zustand der Anergie besteht – das Verhalten der Monozyten im SIRS ist bislang unbekannt. Diese Anergie sollte letztlich durch den MAT beobachtet werden [71, 72].

2. Material und Methoden

2.1 Art der Studie, formale Aspekte und Zustimmung der Ethikkommission

Bei der vorliegenden Studie handelt es sich um eine prospektive Beobachtungsstudie. Die Patienten wurden nach entsprechender schriftlicher Aufklärung und Prüfung der Ein- und Ausschlusskriterien in die Studie eingeschlossen. Es wurden Blutproben zur wissenschaftlichen Analyse an verschiedenen Zeitpunkten des klinischen Aufenthaltes entnommen, asserviert und später analysiert. Mit Ausnahme der Blutentnahmen waren keine diagnostischen oder therapeutischen Prozeduren oder sonstige Interventionen am Menschen aufgrund der Studie vorgesehen. Auch wurden keine diagnostischen oder therapeutischen Entscheidungen durch die Studie beeinflusst. Die vorliegende Studie wurde von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Tübingen begutachtet und genehmigt (231/2013/BO2) und wurde in Übereinstimmung mit den Anforderungen der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Insgesamt 21 Patienten wurden entsprechend des Studienprotokolls eingeschlossen, alle gaben nach entsprechender Aufklärung ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme an der Studie. Es waren keine Prüfungen gemäß dem Arzneimittelgesetz (AMG) oder Medizinproduktegesetz (MPG) vorgesehen.

2.2 Patientenrekrutierung, Ein- und Ausschlusskriterien der Studie:

Die Patientenrekrutierung erfolgte in den Monaten August, September und Oktober 2013. Patienten die sich elektiv in der Klinik für Thorax-, Herz und Gefäßchirurgie Tübingen zur Durchführung einer Herzoperation vorstellten wurden hinsichtlich der unten genannten Ein- und Ausschlusskriterien (Tabelle 3) geprüft. Waren die genannten Kriterien erfüllt, so wurden die Patienten hinsichtlich der Studie aufgeklärt. Gaben sie ihr schriftliches Einverständnis, so wurden Sie eingeschlossen und erhielten die genannten Blutentnahmen. Folgende Ein- und Ausschlusskriterien wurden definiert um eine möglichst homogene Patientenpopulation mit interindividuell vergleichbarem Risiko zu generieren:

Tabelle 3: Ein und Ausschlusskriterien

Einschlusskriterien:
- Alter ≥ 18 Lebensjahre
- Herzoperation unter Einsatz der Herz- Lungen- Maschine
- Elektiver Eingriff
- Zustimmung zur Teilnahme an der Studie
Ausschlusskriterien:
- Alter < 18 Lebensjahre
- Notfalleingriff
- Kardiale- bzw. mediastinale Voroperationen, Resternotomie
- Vorliegen einer neoplastischen Erkrankung
- Bestehende Schwangerschaft
- Polytrauma
- Präoperativ akute Infektkonstellation
- Ablehnen einer möglichen Bluttransfusion

Die Ausschlusskriterien Vorhandensein einer neoplastischen Erkrankung, einer Infektkonstellation oder eines Polytraumas wurden angewandt, da diese Nebenerkrankungen wesentlichen Einfluss auf Immunprozesse und damit auf das Entstehen eines SIRS haben. Notfall- und Revisionseingriffe haben ein deutlich erhöhtes operatives Risiko. Es würde sich also bei den genannten Szenarien um konfundierende Variablen handeln.

2.3 Perioperative Behandlung: chirurgische und anästhesiologische Verfahren

Alle in diese Studie eingeschlossenen Patienten wurden elektiv zur Operation in die Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie der Universitätsklinik Tübingen vierundzwanzig Stunden vor der geplanten Operation aufgenommen. Durch die Teilnahme an der Studie wurden weder diagnostische noch therapeutische Entscheidungen und Prozeduren beeinflusst. Lediglich die Blutprobenentnahme für die wissenschaftlichen Untersuchungen unterschied die Behandlung der Studienpatienten von der Behandlung von nicht-Studienpatienten. Alle zum

Einsatz gekommenen medizinischen Verfahren entsprechen also dem Standard-Procedere für elektive Herzoperationen an der THG-Chirurgie Tübingen. Im Folgenden sei die intra- und perioperative standardmäßige Behandlung der Patienten übersichtsartig skizziert:

Am präoperativen Tag erfolgten die Aufklärung zur Operation sowie unabhängig hiervon die Aufklärung zur Teilnahme an der Studie. Ebenso erfolgten am präoperativen Tag noch ausstehende Untersuchungen: Eine Laborentnahme, ein 12-Kanal-EKG, ein Röntgenthorax, im Alter von >75 Jahren eine native computertomographische Untersuchung des Thorax zur Identifikation von aortalem Kalk, sowie eine Carotis-Duplex-Sonographie zum Ausschluss einer hochgradigen Stenose der Halsschlagader. Im Vorfeld hatten alle Patienten in der zuweisenden Kardiologie bereits eine Koronarangiographie sowie eine Echokardiographie erhalten.

Im Falle auftretender Kontraindikationen zur geplanten Operation, zum Beispiel einer laborchemischen oder klinischen Entzündungskonstellation, einer nicht adäquaten Gerinnung im Aufnahmelabor oder dem Vorhandensein einer Carotisstenose wurde die Operation neu terminiert.

Eine Woche vor der Operation pausiert wurde die Medikation mit Marcumar und neuen oralen Antikoagulationen. Acetylsalicylsäure wurde im Falle einer koronaren Herzerkrankung bis zur Operation weiter eingenommen. Wenn keine koronare Herzerkrankung vorlag wurde es möglichst fünf Tage vor der Operation abgesetzt. ACE-Hemmer („-Prile“) und AT₂-Blocker („-Sartane“) sowie Metformin wurden am präoperativen Tag nicht mehr eingenommen um eine komplikative medikamenteninduzierte Vasoplegie bzw. eine Laktatazidose zu vermeiden. Betablocker wurden bis zum Operationstag eingenommen. Am Vorabend der Operation wurde ein leichtes Abendessen eingenommen, ab 0:00 des Operationstages bestand strenge Nüchternheit.

Die Narkoseeinleitung und -führung entsprach in allen Fällen dem Standardprotokoll der Universitätsklinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin Tübingen. Kurz gesagt erfolgte die Einleitung mit Midazolam, die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte mit Sufentanil, Pancuronium und Sevoflurane. Das intraoperative hämodynamische Monitoring erfolgte

standardmäßig mit einem EKG, einer radialen arteriellen Blutdruckmessung einer Messung des zentralen Venendruckes (ZVD) über die V. jugularis interna sowie über eine intraoperativ durchgeführte transoesophageale Echokardiographie. Zum Hautschnitt der Operation sowie, bei längeren Operationen nach 4 Stunden wurde eine prophylaktische Antibiotikagabe (2 g Cefazolin i.v.) durchgeführt.

Die herzchirurgischen Operationen erfolgten alle nach den Standard-Protokollen der Klinik für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie am Universitätsklinikum Tübingen.

Kurz gesagt erfolgte eine mediane Sternotomie. Im Falle von Bypassoperationen wurde die linke A. thoracica interna in skelettierender Technik präpariert. Als weitere Bypassgrafts wurde entweder im Folgenden auch die rechte A. thoracica interna in gleicher Weise präpariert oder die V. saphena magna wurde vom Unterschenkel in Brückentechnik oder vom Oberschenkel in endoskopischer Technik entnommen.

Nach Entnahme der Bypassgefäße erfolgte die systemische Heparin-gabe zu einer Activated Clotting Time von >400 sec. Nach Eröffnung des Perikards und Hochnähen der Perikardränder erfolgte die Anlage einer doppelten Kanülierungsnaht im proximalen Aortenbogen sowie die Anlage einer einfachen Kanülierungsnaht am rechten Vorhof. Es erfolgte die standardmäßige Kanülierung der Aorta sowie die Kanülierung des rechten Vorhofes mit einer Zweistufen-Kanüle. Im Falle einer Mitralklappenoperation erfolgte die selektive Kanülierung der Vena cava superior und -inferior (bicavale Kanülierung). Auch erfolgte die Anlage eines retrograden Kardioplegiekatheters in den Sinus coronarius. Sodann erfolgte der Angang an die extrakorporale Zirkulation. Ergänzt wurde die Konfiguration durch Einbringen eines kombinierten antegraden Kardioplegie- und Ventkatheters in die Aorta ascendens. Am entlasteten Herzen erfolgte dann die Inspektion der Koronarien. Nach diesen Arbeitsschritten wurde an der heruntergefahrenen Herz-Lungen-Maschine die Aorta geklemmt. Bei Eingriffen an der Aortenklappe wurde in dieser Phase ein separater Ventkatheter über die rechte obere Lungenvene eingelegt, sodann erfolgte die Gabe von eiskalter Blutkardioplegie nach Buckberg, antegrad sowie

retrograd und die externe Kühlung des Herzens durch topische Anwendung von Eiswasser. Im Falle der Bypassprozeduren erfolgte dann die Präparation und Anastomosierung der koronaren Zielgefäße beginnend an der Hinterwand (R. interventrikularis posterior) über die Seitenwand (Äste des R. circumflexus) bis zur Vorderwand (R. interventrikularis anterior). Im Falle der Aortenklappeneingriffe wurde nach Kardioplegiegabe die Aorta ascendens horizontal eröffnet. Nach Exposition der Aortenklappe durch komissurale Hochnähte wurde die Aortenklappe exzidiert und der Aortenklappenring komplett entkalkt. Nach Größenbestimmung des Aortenklappenanulus durch entsprechende Messlehren erfolgte die Einnaht einer Aortenklappenprothese (in allen Fällen biologisch) in epianulärer Technik mit filzarmierten Einzelknopfnähten. Sodann erfolgte der Verschluss der Aortotomie mittels klassischer Blalock-Naht. Während der gesamten Aortenklemmzeit wurde alle 20 Minuten Kardioplegie gegeben. Nach Fertigstellung der eigentlichen kardialen Operation wurde das Herz durch Anstauen und Blähen der Lunge gründlich entlüftet. Dann wurde die Aortenklemme entfernt und damit der koronare Blutfluss wieder freigegeben. Nach Etablierung des Herzrhythmus wurde die folgende Reperfusionzeit zur Aufnahme von epimyokardialen Schrittmacherkabeln genutzt sowie zur Entfernung der Kardioplegie- und Ventkanülen. Sodann erfolgte der Abgang von der Herzlungenmaschine durch stetige Reduktion des Maschinenflusses und durch Befüllen der Kapazitätsgefäße mit Blutvolumen. Der Abgang von der Herzlungenmaschine wurde üblicherweise medikamentös durch niedrigdosierte Gabe von Inotropika (Dobutamin oder Milrinon) unterstützt. Nach Etablierung des selbstständigen Kreislaufes erfolgte zunächst die Entfernung der venösen Kanüle. Nach Rückführung des Blutvolumens aus der Herzlungenmaschine und Antagonisierung der Heparinwirkung durch Protamin wurde auch die arterielle Kanüle entfernt. Nach einer gründlichen Blutstillung und Einlage von Drainagen ins Mediastinum und die eröffneten Pleuren erfolgte der Verschluss des Sternums mit Drahtcerclagen und der schichtweise Wundverschluss. Postoperativ wurden die Patienten intubiert und beatmet auf die Intensivstation verlegt. Direkt nach Aufnahme dort erfolgte die laborchemische-, die

röntgenologische- und EKG-Diagnostik. Therapieziel in den ersten 12 Stunden der Intensivtherapie war die Beendigung der Katecholamintherapie und der invasiven Beatmung und damit die Extubation. Das hämodynamische Monitoring hierbei sowie die Volumen- und Katecholamintherapie erfolgten grundsätzlich nach den gültigen Leitlinien [24]. Kurz gesagt umfasste das hämodynamische Monitoring auf der Intensivstation in allen Fällen die invasive Blutdruckmessung und die Messung des ZVD. Im Falle hämodynamischer Instabilität wurde das Monitoring ergänzt durch einen Pulmonalarterienkatheter (Swan-Ganz) zur Messung der pulmonalarteriellen Drücke, des Herzzeitvolumens sowie der linksventrikulären Vorlast. Darüber hinaus erfolgte regelmäßig die transthorakale und vor allem transoesophageale Echokardiographie zur Beurteilung des Volumenstatus, der kardialen Kontraktilität und zum Ausschluss mediastinaler Hämatoeme. Regelmäßige, mindestens zweistündliche arterielle und gelegentliche gemischtvenöse Blutgasanalysen erfolgten zur Therapiesteuerung.

Nach Extubation erfolgte üblicherweise am ersten oder zweiten postoperativen Tag die Verlegung auf das kardiochirurgische Wachzimmer („Intermediate Care Station“) wo die weitere Überwachung mittels arterieller Blutdruckmessung, ZVD Messung und regelmäßiger Blutgasanalyse möglich war. Am zweiten bis dritten postoperativen Tag wurden die Patienten dann auf die Normalstation verlegt. Hier erfolgte die Überwachung durch regelmäßige klinische Visiten sowie durch Kontrolle der Laborparameter sowie Röntgen- und EKG Diagnostik alle zwei bis drei Tage. Nach Abschluss der akutklinischen Betreuung erfolgte die Verlegung in eine kardiale Rehabilitationsklinik üblicherweise zwischen dem 7-12 postoperativen Tag.

2.4 Probenahme, Aufbereitung und Lagerung.

Bei jedem Studienpatienten wurde an den festgelegten Zeitpunkten (Tabelle 4) Blutproben entnommen.

Jedes Mal wurden den Patienten Blutproben in zwei 5,5 ml K-EDTA (1,6 mg/ml) Monovetten und zwei 5,5 ml Lithium-Heparin (19 IU/ml) Monovetten (Sarstedt) entnommen.

Proben zur Bestimmung der Leukozytenzahl bzw. des Blutbildes (EDTA-Monovette) und zur Bestimmung des C-reaktiven Proteins (CRP) und Procalcitonins (PCT) (Li-Heparin Monovette) wurden dem Zentrallabor der Universitätsklinik Tübingen zugeführt. Diese Bestimmungen erfolgten also auf dem gleichen Weg wie die klinische Routinediagnostik. Die jeweils zweite EDTA- sowie Li-Heparin Monovette wurde im klinischen Forschungslabor der THG-Chirurgie Tübingen unter rein wissenschaftlicher Zielsetzung weiterverarbeitet.

Tabelle 4: Blutentnahme Zeitpunkte

	Blutentnahmezeit
Präoperativ	Aufnahmetag
Präoperativ	Hautschnitt
Postoperativ	Ende der Operation
1. Postoperativer Tag	06:00 Uhr
2. Postoperativer Tag	06:00 Uhr
3. Postoperativer Tag	06:00 Uhr
5. Postoperativer Tag	06:00 Uhr
ggf. 8. Postoperativer Tag	06:00 Uhr

Die Analytik im Forschungslabor der THG Chirurgie erfolgte nicht sogleich, sondern nach Akquise aller Proben, entsprechend war eine Kryokonservierung der Proben sowie deren Lagerung notwendig. Zur zellschonenden Kryokonservierung von Vollblut wurden 4,5 ml heparinisierendes Vollblut unter sterilen Bedingungen in ein 50 ml Falcon Röhrchen (BD, Heidelberg, Deutschland) abgefüllt und 15 min auf Eis akklimatisiert. Danach erfolgte unter stetigem Schwenken auf Eis die tropfenweise Zugabe von 450 µl Dimethylsulfoxid (DMSO; CryoSure-DMSO; Firma WAK-Chemie Medical GmbH) um eine Endkonzentration von 9,1 % DMSO im Blut zu erhalten. 2-ml-Aliquots, abgefüllt in Cryovials (Sarstedt, Deutschland), wurden in einem Propan-2-ol-befüllten Gefrierbehälter (Nalgene® Mr. Frosty Freezing Container, Thermo Fisher Scientific Deutschland) bei -80 °C über Nacht eingefroren. Durch

das Propan-2-ol ergibt sich eine Kühlrate von $-1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Am nächsten Tag wurden die Kryoblutproben in die Gasphase von flüssigem Stickstoff umgesetzt und dort bis zur Verwendung gelagert.

Das EDTA-antikoagulierte Blut wurde zur Plasmaanalyse aufbereitet. Hierbei wurde das Plasma aus den EDTA-K-Monovetten mittels Zentrifugation bei 2500 g für 20 Minuten bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gewonnen, anschließend aliquotiert in $200\text{ }\mu\text{l}$ Portionsgrößen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.5 Klinische Symptome, Untersuchung auf das Vorliegen eines SIRS und Allokation der Patienten zu einer Studiengruppe

Nach Abschluss der Operation wurden die Patienten hinsichtlich der Entwicklung von SIRS definierenden Symptomen beobachtet. Kriterien zur Diagnose eines SIRS waren die Folgenden [1, 2]: Körpertemperatur $>38\text{ }^{\circ}\text{C}$ oder $<36\text{ }^{\circ}\text{C}$, Herzfrequenz $>90/\text{min}$, Atemfrequenz $>20/\text{min}$, $\text{paCO}_2 <32\text{ mmHg}$, Blutleukozyten $>12.000/\text{mm}^3$ oder $<4000/\text{mm}^3$. Die Untersuchung hinsichtlich der genannten Symptome erfolgte direkt nach der Operation sowie an den postoperativen Tagen jeweils um 06:00 Uhr morgens, also zum Zeitpunkt der Blutentnahmen für diese Studie (Tabelle 4).

Nur fünf von 21 Patienten (23,8 %) entwickelten die klinischen Zeichen eines SIRS, entsprechend formierten sie die SIRS Gruppe. Um eine möglichst strukturgleiche Kontrollgruppe zu generieren wurden aus den verbleibenden 16 Patienten die kein SIRS entwickelt hatten fünf ausgewählt die hinsichtlich Alter, Geschlecht, Nebenerkrankungen und stattgehabter Operationen vergleichbar waren (matching). Diese Patienten formierten die kein-SIRS Gruppe.

2.6 Analytische Methoden

Bei allen Studienpatienten der SIRS bzw. kein-SIRS Gruppe erfolgte die Bestimmung der in Tabelle 2 genannten Parameter.

Die Konzentrationsbestimmung der verschiedenen proteinogenen Analyten erfolgte mittels immunologischer Methoden, im Falle der Analyse der Zytokine IL1 β , IL2, IL6, IL8, IL10, IFN- γ und TNF α erfolgte die Analyse mittels einem Luminex basierten Multiplex Immunoassay, im Falle der anderen Proteine

(sTREM-1, sCD163 und ESM-1) mit einem ELISA. Der Nachweis der cfDNA erfolgte mit der PicoGreen Strategie und die Reaktivität der Monozyten wurde mit dem Monozyten-Aktivierungs-Test (MAT) nachgewiesen welcher grundsätzlich aus der Pyrogen-Analytik stammt.

Im Folgenden werden jeweils zunächst die grundsätzlichen Prinzipien der analytischen Methoden erläutert und sodann der konkrete praktische Ablauf der jeweiligen Methode in dieser spezifischen Arbeit detailliert dargelegt.

2.7 Multiplex bead-based Immunoassay zur Zytokinanalyse

Multiplex-Mikropartikel basierte Immunoassays bieten die Möglichkeit in einer einzelnen Plasmaprobe die Konzentration einer ganzen Reihe von Proteinen gleichzeitig zu bestimmen [73]. Verschiedene Kits zur Bestimmung unterschiedlicher Plasmaproteingruppen werden von der Industrie angeboten, in dieser Arbeit wurden die Plasmakonzentrationen der Interleukine sowie von $\text{IFN}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$ auf diese Weise bestimmt. Das grundsätzlicher Prinzip der Bestimmung ist Folgendes [74]: Analyt-spezifische Antikörper sind auf die Oberfläche farbcodierter Polystyrol-Mikropartikel gebunden. Eine Standardreihe mit bekannten Konzentrationen der Antigene sowie die zu analysierende Probe wird mit den Antikörper-Mikropartikeln inkubiert. Durch Waschschrte werden nicht-antikörpergebundene Anteile der zu analysierenden Probe entfernt. Biotinylierte, sekundäre Antikörper, ebenso gegen die zu analysierenden Antigene gerichtet, werden sodann hinzugefügt. Durch erneute Waschschrte werden ungebundene Antikörper erneut entfernt sodass letztendlich nur Mikropartikel-Antikörper-Antigen-biotinylierte-Antikörper-Komplexe verbleiben. Nach Hinzugabe von Streptavidin-Phycoerythrin-Konjugaten erfolgt das Auslesen der Proben in einem Luminex-Analysegerät. Prinzip des Gerätes ist die Messung der Probe im Durchfluss, vergleichbar mit der Durchflusszytometrie. Jedes farbcodierte Mikropartikel kann letztlich einzeln erfasst werden. Das Analysegerät beinhaltet zwei Laser, einer entspricht der Wellenlänge der farbcodierten Mikropartikel, der andere dem Phycoerythrin Signal, welches in direkter Proportion zum gebundenen Analyt steht. Auf diese Weise können in einer Probe mehrere Proteine gleichzeitig (durch die

Farbcodierung der Mikropartikel) analysiert werden; das heißt jeder farbcodierte Mikropartikel wird einzeln gemessen. Bei dem Messverfahren handelt es sich um eine etablierte und validierte immunologische Methode [75].

In der vorliegenden Arbeit wurden die Konzentrationen von IL1 β , IL2, IL6, IL8, IL10, IFN- γ und TNF α mit Hilfe eines kommerziell erworbenen Multiplex-bead-based Immunassay-Kits (Human High Sensitivity Cytokine Luminex Performance Assay, R&D Systems) entsprechend den Herstellerangaben bestimmt:

Nach Vornässen von 96-Well Platten mit Waschpuffer wurden 25 μ l/Well des 1:3 verdünnten Polystyrol-Micropartikel-Cocktails (enthält ein Gemisch von farbcodierten Styrol-Micropartikeln mit Antikörpern jeweils gegen alle zu analysierenden Antigene) pipettiert. Dazu wurden jeweils entweder 100 μ l der vorbereiteten kommerziell durch den Kit-Hersteller zur Verfügung gestellten Antigen-Standardreihe, oder die 1:2 mit Calibrator Diluent RD 6-40 verdünnten zu analysierenden Proben gegeben und mit einer Folie abgedeckt für 3 h bei Raumtemperatur (RT) auf einem Orbitalschüttler bei 500 Umdrehungen pro Minute (UpM) inkubiert. Die Inkubation auf dem Orbitalschüttler ist deswegen wichtig, da hierdurch die Mikropartikel aufgeschwemmt bleiben. Nach dieser Inkubation erfolgten drei Waschschrte der Wells mit 100 μ l Waschpuffer/Well über ein angelegtes Vakuum. Für die Visualisierung der einzelnen Zytokine erfolgten zwei weitere Inkubationen: zunächst mit 50 μ l Biotin-gekoppeltem Antikörper-Cocktail pro Well für 1 h bei sowie dann mit 50 μ l Streptavidin-PE Lösung pro Well für 30 min bei 500 UpM auf dem Orbitalschüttler. Nach jeder Inkubation erfolgten drei Waschschrte wie oben beschrieben. Am Ende wurden die gewaschenen Micropartikel in 100 μ l Waschpuffer pro Well aufgenommen und die Fluoreszenzintensitäten in einem Bio-Plex[®] 200 (Bio-Rad) nach dem genannten Prinzip der Durchflussanalyse gemessen. Die sieben Analyten konnten gleichzeitig mit folgenden Sensitivitätsgrenzen (Lower Limit of Quantification, LLOQ) getestet werden: IL1 β : 0,34 pg / ml; IL-2: 0,58 pg / ml; IL-6: 0,92 pg / ml; IL-8: 0,76 pg / ml; IL-10: 0,47 pg / ml; IFN γ : 0,30 pg / ml;

TNF: 0,78 pg / ml. Die Auswertung erfolgte über die Bio-Plex200 (Bio-Rad) Software.

2.8 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) zur Messung der Plasmakonzentrationen von sTREM-1, sCD163 und Endocan

Beim Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) handelt es sich um eine immunologische Methode zur quantitativen Bestimmung eines definierten Proteins. Ein monoklonaler Antikörper gegen das zu bestimmende Protein wird auf die Oberfläche einer 96-Well Mikrotiterplatte gebunden. Das zu analysierende Plasma sowie eine Verdünnungsreihe mit bekannten Konzentrationen des zu analysierenden Proteins wird in die Wells hinzugegeben. Jedes in der Probe vorhandene Zielprotein wird nun durch die gebundenen Antikörper fixiert. Nach dem Auswaschen jeglicher ungebundener Moleküle wird ein sekundärer biotinylierter monoklonaler Antikörper spezifisch gegen das zu analysierende Antigen hinzugegeben. Dieser bildet ein Sandwich mit dem gebundenen Antikörper-Antigen Komplex. Nach einem erneuten Waschschrift wird zunächst eine Enzymlösung, zunächst Streptavidin-Horseradish-Peroxydase, und nach einem weiteren Waschschrift schließlich die Substratlösung 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) hinzugegeben. Die Oxydation führt zu einer Farbreaktion die in ihrer Intensität letztlich mit der Antigenkonzentration korreliert und die spektralphotometrisch gemessen werden kann.

sTREM-1 ELISA

Die lösliche Form des membranständigen Rezeptors wurde aus Patientenplasma mit Hilfe des sTREM-1 ELISA Kits (Trillium Diagnostics, Maine, USA; vertrieben von IQ-Products, Groningen, Niederlande) entsprechend Herstellerangaben bestimmt: Die von der Firma bereits mit anti-TREM-1-Antikörper beschichteten Mikrotiterplatten wurden zunächst auf Raumtemperatur gebracht und dann mit 100 µl/Well 1:5 verdünnte Plasmaproben bzw. Proteinstandard-Verdünnungen (0; 0,16; 0,31; 0,63; 1,25; 2,5; 5; 10 ng/ml sTREM-1) in Doppelbestimmung befüllt und mit

Selbstklebefolie verschlossen. Nach einer Inkubation von 1 h bei RT auf einem Orbitalschüttler wurden die Wells dreimalig mit 200 µl Waschpuffer pro Well gespült, 100 µl/Well einer frisch präparierten biotinylierten anti-TREM-1 Antikörperlösung zugegeben und wiederum für 1 h bei RT auf einem Orbitalschüttler inkubiert. Diese Lösung wird durch dreimaliges Waschen entfernt und Streptavidin-gekoppelte Horseradish Peroxidase (100 µl /Well) für eine Stunde zugegeben. Zum Schluss wurde in die viermalig gewaschene Platte 100 µl/Well Substratlösung (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin; TMB) pipettiert. Die im Dunkeln entwickelte Substratreaktion wurde nach 30 min mit 100 µl/Well 0,2 M H₂SO₄ abgestoppt und die Absorption der Proben bei 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm gemessen. Nach Abzug der Referenzwellenlänge ($\Delta 450-620$ nm) erfolgte die Berechnung der Konzentrations-Wirkungskurve über die Gen5 Software (BioTek®, Bad Friedrichshall, Deutschland).

sCD163 ELISA

Die Bestimmung des Markers sCD163 in Patientenplasma erfolgte mit dem MACRO163-ELISA Kit der Firma IQ Products, Groningen, Niederlande. Dabei wurden die Proben zunächst in zwei Schritten mit Verdünnungspuffer auf eine Endverdünnung von 1:500 gebracht. Ebenso wurde eine sCD163-Proteinstandard-Verdünnungsreihe mit dem durch den Hersteller mitgelieferten rekombinanten sCD163 angefertigt (0; 0,40; 0,79; 1,58; 3,16; 6,33; 12,65; 25,30 ng/ml sCD163). Je 100 µl/Well der Standardkonzentrationen sowie der verdünnten Plasmaproben wurden in Doppelbestimmung auf die Anti-sCD163-beschichteten Mikrotiterplatten aufgetragen, diese mit Klebefolie versiegelt und für 1 h bei RT auf einem Orbitalschüttler inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Platte mit 250 µl Waschpuffer/Well erfolgte eine einstündige Inkubation mit 100 µl Biotin-gekoppeltem anti-sCD163-Detektionsantikörper pro Well. Diese Lösung wurde ebenso durch dreimaliges Waschen entfernt und die Streptavidin-gekoppelte Horseradish Peroxidase (100 µl / Well) für eine Stunde zugegeben. Vor Zugabe der TMB-Substratlösung (100 µl/Well) wurde die Platte gründlich (5 Mal) gewaschen, um etwaige Enzym-Reste zu entfernen. Die ca.

15-minütige Substratinkubation bei Raumtemperatur wurde mit 100 µl 0,2 M H₂SO₄ abgestoppt und bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge 620 nm) im Spektralphotometer ausgelesen. Nach Abzug der Referenzwellenlänge (Δ450-620 nm) erfolgte die Berechnung der Konzentration über die Gen5 Software (BioTek[®], Bad Friedrichshall, Deutschland).

Endocan ELISA

Die Bestimmung der Endocan Konzentrationen erfolgte mit dem Human ESM-1 ELISA (IQ Products, Groningen, Niederlande) entsprechend den Herstellerangaben. Aufgrund der erwarteten unterschiedlichen Endocan Proteinkonzentrationen bei SIRS und kein-SIRS, wurden die Proben der kein-SIRS Kontrollen 1:2 mit ELISA-Puffer verdünnt, die der SIRS Patienten hingegen 1:6. In Doppelbestimmungen wurden dann je 100 µl verdünnte Patientenprobe bzw. die durch den Hersteller zur Verfügung gestellte Endocan-Proteinstandardverdünnung (0; 0,156; 0,312; 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10 ng/ml Endocan) auf die akklimatisierte mit anti-ESM-1 vorbeschichtete 96-Well-ELISA-Platte aufgetragen. Nach einer dynamischen Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur und dreimaligem Waschen der Platte mit 250 µl Waschpuffer pro Well folgte eine einstündige dynamische Inkubation mit dem biotinylierten anti-ESM-1-Detektionsantikörper (100 µl/Well). Diese Lösung wurde durch dreimaliges Waschen von der Platte entfernt und die Visualisierung mittels Streptavidin-gekoppelter Horseradish-Peroxidase (HRP; 100 µl/Well) eingeleitet. Überschüssige Enzymlösung konnte wiederum nach 30 min durch dreimaliges Waschen der Platte entfernt werden und nach Zugabe der farblosen TMB-Substratlösung (100 µl/Well) startete die Farbentwicklung. Diese wurde nach ca. 10 Minuten mit 50 µl 1 M H₂SO₄ abgestoppt und die gelbliche Färbung bei 450 nm mit einer Referenzwellenlänge von 630 nm im Spektralphotometer ausgelesen. Nach Abzug der Referenzwellenlänge (Δ450-630 nm) erfolgte die Berechnung der Konzentration über die Gen5 Software (BioTek[®], Bad Friedrichshall, Deutschland).

2.9 PicoGreen Strategie zum Nachweis der cfDNA

PicoGreen® ist ein Cyanin-Fluoreszenzfarbstoff der in der Molekularbiologie zum Nachweis doppelsträngiger DNA genutzt wird [76]. Ähnliche Farbstoffe sind SYBR Green I (DNA) SYBR Green II (RNA) unter mehreren Anderen. PicoGreen bindet an doppelsträngige DNA. Der daraus resultierende Fluoreszenz-Farbstoff-DNA-Komplex absorbiert Licht bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und emittiert Licht mit einer Wellenlänge von 530 nm. Das Fluoreszenzsignal der Probe ist proportional zur Konzentration der doppelsträngigen DNA und kann mittels eines Fluoreszenz-Plattenlesegerät detektiert werden. Bei der Strategie handelt es sich um ein Standardverfahren zur Quantifizierung der cell free DNA [67].

Die Bestimmung der cfDNA in dieser Arbeit erfolgte nach der PicoGreen Strategie mit einem kommerziell verfügbaren cfDNA Quantifizierungs Kit (cfDNA-Quant Kit, Trillium Diagnostocs, Maine, USA), entsprechend den Herstellerangaben: Dazu wurden die Plasmaproben mit Verdünnungspuffer 1:5 verdünnt und 50 µl dieser Proben und der zuvor präparierten, vom Hersteller gelieferten cfDNA-Standardreihe (0; 15,28; 25,47; 42,45; 70,76; 117,9; 196,5; 327,6; 546,0 ng/ml) in Doppelbestimmungen in schwarze 96-Well-Mikrotiterplatten gegeben. Zu den Proben und Standards wurden 150 µl frisch angesetzte PicoGreen Detektionslösung gegeben, für 15 min im Dunkeln inkubiert und die Fluoreszenzintensität der Lösung mit einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 530 nm in einem Fluoreszenz-Plattenlesegerät (LB940, Mithras, Bad Wildbad, Deutschland) detektiert. Das Mitführen einer mit definierter cfDNA-Konzentration versetzten Plasma Probe garantierte die Genauigkeit des Testverfahrens. Die Auswertung der Daten und letztlich die Umrechnung der relativen Fluoreszenzen in cfDNA Plasmakonzentrationen erfolgte über die vom Hersteller mitgelieferte Auswertevorlage (cfDNA-Quant-Analysis Template).

2.10 Monozyten-Aktivierungs-Test (MAT)

Die Reaktivität des Patientenblutes auf inflammatorische bzw. pyrogene Stimuli wurde mit Hilfe des Monozyten-Aktivierungs-Tests (MAT) erfasst. Hierbei handelt es sich um einen etablierten und validierten Test, welcher die *ex-vivo* Stimulation vitaler weißer Blutzellen mit definierten Mengen Endotoxin und die folgende Bestimmung der Produktion des pro-inflammatorischen Zytokins Interleukin 1 β mittels ELISA vorsieht. Üblicherweise dient der Test zum Nachweis von Pyrogenen bzw. zum Nachweis der Pyrogenfreiheit von Flüssigkeiten zur i.v. Applikation. In dieser Studie wurde mittels des Tests jedoch die Reaktivität bzw. die Anergie der Patienten-Monozyten im Vergleich zu Standard-Blutproben getestet.

Zur Durchführung des Tests wurde das Kit PyroDetect System (Merck Millipore, Deutschland) verwendet. Als Kontrolle wurde bei jeder Analyse neben Patientenblut auch eine standardisierte kommerziell erworbene Blutprobe, PyroDetect Cryoblood (Merck Millipore, Deutschland) mit stimuliert, um eine valide und konsistente Testdurchführung gewährleisten zu können. Ebenso diente das Protokoll des PyroDetect Systems als Vorlage für die Versuchsdurchführung mit Patientenblut.

Das kryokonservierte Patientenblut wurde durch 90 Sekunden langes Schwenken in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut und direkt im Verhältnis 1:5 mit Zellkulturmedium (RPMI 1640, Biochrom AG, Berlin, Deutschland) verdünnt. Mit dem PyroDetect Cryoblood wurde in derselben Weise verfahren.

Die Endotoxinstimulation erfolgte mit definierten Konzentrationen von *Escherichia coli* 0113: H10: K-Endotoxin (WHO 3rd International Endotoxin Standard, Code 10/178, NIBSC, UK). Die Verdünnung des Endotoxinstandards erfolgte mit pyrogenfreiem Wasser (Charles River, Boston, USA) zunächst auf die Konzentrationen 1,25; 2,5; 5; 10; 20 Endotoxin Units (EU)/ml. Zwischen den Verdünnungsstufen wurden die Lösungen jeweils 1 min durchmischt (Vortex) um eine gleichmäßige Micellenverteilung und -größe zu gewährleisten. Eine weitere Verdünnung (1:10) der Endotoxinlösungen erfolgte mit

Zellkulturmedium (RPMI 1640) auf die Endkonzentrationen des Endotoxinstandards von 0; 0,125; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0 EU/ml. Final wurden die Endotoxinstandards 1:2 mit Medium verdünnt.

Jeweils 40 µl dieser Mischungen wurden in Doppelbestimmung auf 96-Well-Mikrotiterplatten (Cellstar® 96 Well Plates, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) aufgetragen. Jeweils 200 µl des vorbehandelten und verdünnten Patientenkryobluts wurden pro Well zu den einzelnen Endotoxinverdünnungen gegeben, durch Bewegung der Platte gemischt und anschließend für 8 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Nach dieser Stimulierungsphase wurden die Platten mit Klebefolie versiegelt und bis zur Analyse bei -20 °C eingefroren.

Die Bestimmung von IL1β im Rahmen des MAT erfolgte ebenso nach dem Prinzip des ELISA. Die stimulierten Kryoblutproben wurden nach dem Auftauen bei Raumtemperatur durch Pipettieren gut gemischt und je 100 µl auf eine vorbeschichtete (4 µg/ml anti-human IL1β MAB601, Bio-Techne, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) und geblockte (1 % bovines Serumalbumin in PBS) 96-Well-Mikrotiterplatte aufgetragen. Zur Quantifizierung des IL1β Levels wurde eine IL1β-Proteinstandardreihe (0; 7,813; 15,625; 31,25; 62,5; 125; 250; 500; 1000; 2000 pg/ml) auf den Platten mitgeführt. Nach einer zweistündigen statischen Inkubation bei RT und dreimaligem Waschen der Platten mit 250 µl/Well Waschpuffer (0,05 % Tween 20 in PBS) konnten 50 µl/Well des biotinylierten Detektionsantikörpers (200 ng/ml anti-human IL1β BAF201) zugegeben werden, der wiederum für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Nach erneutem Waschen wurden 100 µl/Well der Enzymlösung (Streptavidin-HRP) für 30 min zugegeben. Die Flüssigkeit wurde erneut verworfen und die Platte gewaschen. Anschließend wurden 100 µl/Well TMB-Substratlösung in die Platte pipettiert und bei Raumtemperatur im Dunkeln für 12 min inkubiert. Der blaue Farbstoff entsteht aufgrund der Spaltung des TMB-Substrates durch das Enzym HRP unter Verbrauch von Wasserstoffperoxid. Der blaue Farbstoff ist somit proportional zu der gebundenen Zytokinkonzentration. Das Abstoppen der TMB-Farbreaktion erfolgte mit 50 µl 1 M H₂SO₄. Die Intensität der nach dem

Abstoppen entstandenen Gelbfärbung konnte durch photometrische Messung bei 450 nm mit einer Referenzwellenlänge von 630 nm als Endpunkt Assay bestimmt werden. Nach Abzug der Referenzwellenlänge ($\Delta 450-630$ nm) erfolgte die Berechnung der Konzentrations-Wirkungskurve über die Gen5 Software (BioTek®, Bad Friedrichshall, Deutschland).

2.11 Konzentrationsberechnungen der spektralphotometrisch analysierten Proben

Die Auswertung aller nach dem Prinzip des Sandwich-ELISA durchgeführten Proteinbestimmungen in dieser Arbeit erfolgte letzten Endes nach der Strategie der 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin – Horseradishperoxydase – Reaktion, und mittels spektralphotometrischer Messung. Alle mit Hilfe des Spektralphotometers (Eon, BioTek) gemessenen Absorptionen wurden über eine 4-Parameterfunktion innerhalb der Gen5 Software (BioTek) in Proteinkonzentrationen umgerechnet. Dazu erfolgte zunächst der Abzug einer Nullwertprobe (Blank) von allen gemessenen Absorptionen. Nach Bildung der Differenz mit der Referenzwellenlänge, wurden die ermittelten Werte nun über mitgeführte Protein-Standardkurven auf die jeweiligen Proteinkonzentrationen umgerechnet.

4-Parameterformel:

$$y = \frac{a - d}{\left(1 + \left(\frac{x}{c}\right)^b\right)} + d$$

a = Absorption bei Konzentration = 0 (theoretisch)

b = Steigung der Kurve am Wendepunkt

c = Wert von x am Wendepunkt

d = Absorption bei Konzentration unendlich (theoretisch)

x = Proteinkonzentration in der zu analysierenden Probe

y = Absorption der zu analysierenden Probe

Die so ermittelte Proteinkonzentration der verschiedenen Analyten wurde abschließend mit dem Verdünnungsfaktor der Proben multipliziert um die Konzentration in der Ausgangsprobe zu erhalten.

Aufgrund von natürlichen biologischen Schwankungen der einzelnen Parameter wurde bei jedem Patienten der Ausgangswert am Aufnahmetag als Normierungswert verwendet (=1). So konnten die Konzentrationsänderungen (n-fach) zum Ausgangswert erfasst und miteinander verglichen werden. Die Konzentrationsänderungen wurden über die Formel:

$$n - \text{fache Konzentrationsänderung} = \frac{\text{Konzentration an Zeitpunkt } x}{\text{Konzentration am Aufnahmetag}}$$

berechnet.

2.12 Statistische Analysen

Die durch die zuvor erläuterten laborchemischen Untersuchungen gewonnenen Datensätze wurden mittels geeigneter Software (GraphPad Prism Software Version 5.01, GraphPad Software Inc., USA) statistisch aufbereitet und grafisch dargestellt. Als Lageparameter kam der arithmetische Mittelwert, als Streuungsparameter die Standardabweichung zum Einsatz. Die graphische Darstellung der Messwerte erfolgte mit Streudiagrammen (Dot-Plots) was aufgrund der kleinen Gruppengröße von 5 Patienten je Gruppe praktikabel war. Somit sind die primären Messwerte der einzelnen Probanden in den Grafiken abzulesen. Ebenso graphisch dargestellt sind der Mittelwert sowie der Standardfehler (standard error of the mean, SEM) der die Standardabweichung auf die Gruppengröße bezieht.

Aufgrund der kleinen Stichprobengröße von 5 Probanden pro Gruppe kamen als inferenzstatistische Methoden nicht-parametrische Tests zur Anwendung. Zunächst wurden alle Messwerte in beiden Gruppen (SIRS und kein-SIRS) zu allen Messzeitpunkten verglichen, dies geschah mittels des nicht-parametrischen Kruskal-Wallis Tests. Bei signifikanten Unterschieden im Datensatz kam im Rahmen einer Post-hoc Analyse für ausgewählte Datensätze Dunn's Multiple comparison post-hoc Test bzw. beim Vergleich zweier Verteilungen der Mann-Whitney U-Test zum Einsatz. In der statistischen Auswertung wurden Werte von $p \leq 0,05$ als signifikant und Werte von $p > 0,05$ äquivalent als nicht signifikant betrachtet.

3. Ergebnisse

3.1 Demographie und Strukturgleichheit der Studiengruppen

In der vorliegenden Studie wurden verschiedene Biomarker, für die eine Verbindung zu einem SIRS wahrscheinlich erscheint, in Patienten im perioperativen Verlauf um eine Herzoperation herum untersucht.

Eine Gesamtzahl von 21 Patienten wurde nach entsprechender Aufklärung prospektiv in die Studie eingeschlossen und evaluiert. Von allen 21 Patienten wurde der gesamte Satz an Proben an allen acht Messzeitpunkten asserviert.

Tabelle 5 zeigt die Demographie, die Körpermaße sowie OP- und Hospitalisationsdauer der Patienten. Das Patientenkollektiv stellt eine typische Stichprobe kardiochirurgischer Patienten mit einer deutlichen Mehrzahl männlicher Patienten und einem Durchschnittsalter von knapp 70 Jahren dar.

Von den genannten 21 Patienten entwickelten nur fünf im postoperativen Verlauf ein SIRS entsprechend den oben genannten Kriterien. Aus den verbleibenden 16 Patienten, die postoperativ kein SIRS entwickelten, wurden fünf Patienten ausgewählt die eine vergleichbare Verteilung der Demographie, der Nebenerkrankungen sowie der Operationsdauer aufwiesen. Diese bildeten die Kontrollgruppe die im Weiteren als kein-SIRS Gruppe bezeichnet wird.

Tabelle 3: Demographische Daten der Gesamtkohorte

Demographische Daten	
n=	21
Alter (Jahre)	69,8 ± 10,6
Geschlecht (männlich / weiblich)	19 / 2
Größe (cm)	172,2 ± 5,6
Gewicht (kg)	81,8 ± 14,3
Hospitalisationsdauer (Tage)	15,4 ± 10,7
Operationsdauer (min)	251,5 ± 55,3

Tabelle 4: Demographie und Komorbiditäten der kein-SIRS und SIRS Gruppe

	kein-SIRS	SIRS
Demographie		
n=	5	5 (4; ein Pat. verstarb an Tag 2)
Alter (Jahre)	69,8 ± 10,6	61,4 ± 15,9
Geschlecht (männlich / weiblich)	3 / 2	5 / 0
Größe (cm)	172,2 ± 5,6	172,2 ± 5,4
Gewicht (kg)	81,8 ± 14,3	96,0 ± 19,9
Hospitalisationsdauer (Tage)	10,0 ± 2,9	29,5 ± 7,8
Operationsdauer (min)	249,0 ± 75,1	284,6 ± 56,1
Komorbiditäten		
Adipositas BMI ≥25–<30	20 %	60 %
BMI ≥30–<35	20 %	20 %
BMI ≥35–<40	20 %	0 %
BMI ≥40	0 %	20 %
Diabetes mellitus Typ 1	0 %	20 %
Diabetes mellitus Typ 2	20 %	0 %
Arterielle Hypertension	40 %	60 %
Hyperlipidämie	20 %	60 %
Arterielle Verschlusskrankung	20 %	0 %
Chronisch obstructive	0 %	20 %
Lungenerkrankung		
Steatosis hepatis	0 %	20 %
Operationen		
Koronararterielle Bypassoperation	40 %	100 %
Aortenklappenersatz	20 %	0 %
Mitralklappenrekonstruktion	40 %	0 %

Tabelle 6 zeigt die Demographie, die Nebenerkrankungen und die stattgehabten Operationen der kein-SIRS und der SIRS Gruppe. Die Patienten der kein-SIRS Gruppe sind mit einem Alter von durchschnittlich 69,8 Jahren rund neun Jahre älter als die Patienten der SIRS Gruppe, die im Mittel 61,4 Jahre alt waren. Die SIRS Gruppe bestand nur aus Männern während die kein-SIRS Gruppe zwei Frauen enthielt. Das Körpergewicht lag in der kein-SIRS

Gruppe mit durchschnittlich 81,8 kg unter dem der SIRS Gruppe (96,0 kg), die Verteilung der Grad-Ausprägungen der Adipositas ist ebenso in Tabelle 6 gezeigt. Beide Gruppen enthielten eine vergleichbare Anzahl von Patienten die an einem Diabetes bzw. einem arteriellen Hypertonus litten. Die SIRS Gruppe bestand gänzlich aus Patienten die sich lediglich einer koronararteriellen Bypassoperation unterzogen wohingegen die Patienten der kein-SIRS Gruppe auch Klappenoperationen erhielten.

Trotz der genannten unvermeidbaren Differenzen der Gruppen bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, sodass Vergleichbarkeit angenommen werden kann.

Ein nennenswerter Unterschied zwischen den beiden Gruppen kein-SIRS und SIRS bestand in der Hospitalisationsdauer: während Patienten der kein-SIRS Gruppe im Mittelwert 10,0 Tage hospitalisiert waren so bleiben SIRS Patienten im Durchschnitt 29,5 Tage in stationärer Behandlung im Akutkrankenhaus. Dieser Unterschied war im Mann-Whitney-U Test signifikant ($p < 0,05$).

3.2 Klinische Symptome und postoperativer Verlauf: Die SIRS definierenden Parameter Körpertemperatur, Tachykardie, Tachypnoe, Kohlendioxidpartialdruck und Leukozytenzahl

Die Ausprägung der SIRS definierenden Symptome wurden in allen Patienten zu allen Kontrollzeitpunkten erhoben. Das Vorhandensein zweier oder mehr der SIRS Symptome triggerten die Zugehörigkeit eines prospektiv untersuchten Patienten zur SIRS Gruppe.

Abbildung 1 zeigt das Auftreten von **Körpertemperaturen** >38 °C in der kein-SIRS und SIRS Gruppe. In der kein-SIRS Gruppe traten Temperaturen >38 °C bei nur einem Individuum an nur einem Untersuchungstag (3. Postoperativer Tag) auf. In der SIRS Gruppe hingegen hatten zwei Individuen bereits am ersten postoperativen Tag Temperaturen >38 °C, auch an den weiteren postoperativen Tagen traten bei diesen Personen erhöhte Temperaturen auf. Die Verteilungen der Körpertemperatur zwischen der kein-SIRS und der SIRS Gruppe unterschieden sich am fünften postoperativen Tag signifikant.

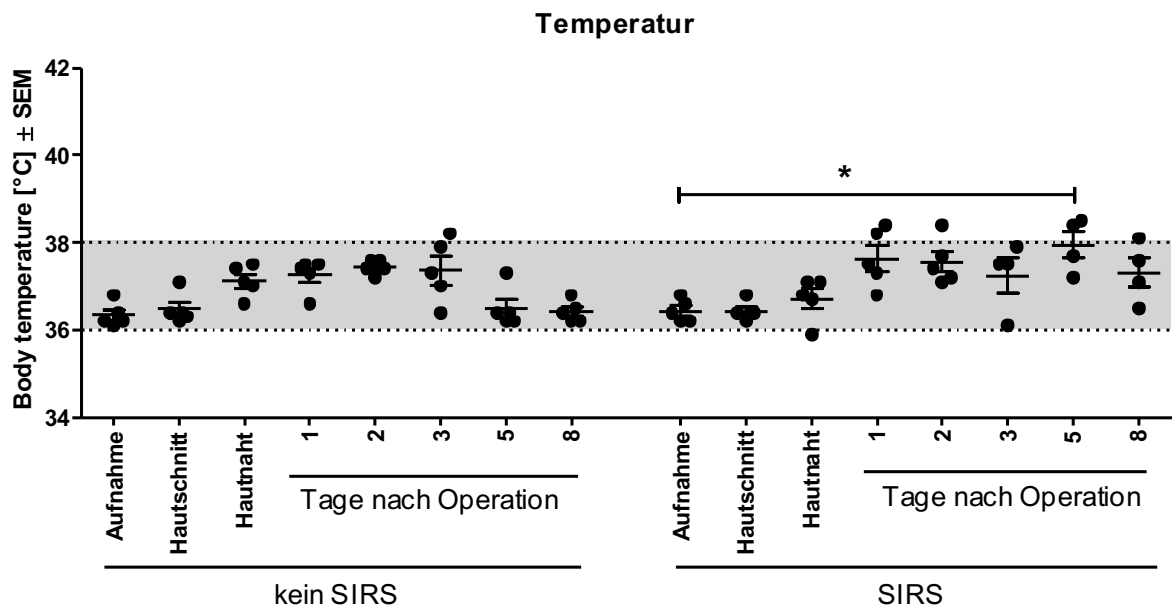


Abbildung 1: Körpertemperatur in der kein-SIRS und SIRS Gruppe. Gezeigt werden die einzelnen Temperaturwerte jedes Patienten, sowie Mittelwert und Standardfehler (standard error of the mean, SEM); * $p < 0,05$ im Kruskal-Wallis mit Dunn's Multiple Comparison post hoc Test; grau hinterlegt: Normbereich, der nicht für SIRS steht.

Neben Körpertemperaturen ≥ 38 °C gehört eine **Tachykardie** von $\geq 90/\text{min}$ zu den SIRS definierenden Symptomen. Tachykardie ist ein häufiges Symptom nach operativen Eingriffen am Herzen. In der kein-SIRS Gruppe traten bereits bei Ende des operativen Eingriffs bei 3 Patienten relevante Tachykardien auf – und auch an den postoperativen Tagen 2, 3, und 5 bestanden bei einem Patienten tachykarde Frequenzen (Abbildung 2). Signifikante Unterschiede in der Häufigkeit des Auftretens einer Tachykardie bestanden in der kein-SIRS Gruppe allerdings weder im Vergleich der Zeitpunkte präoperativ zu postoperativ noch zwischen den postoperativen Tagen.

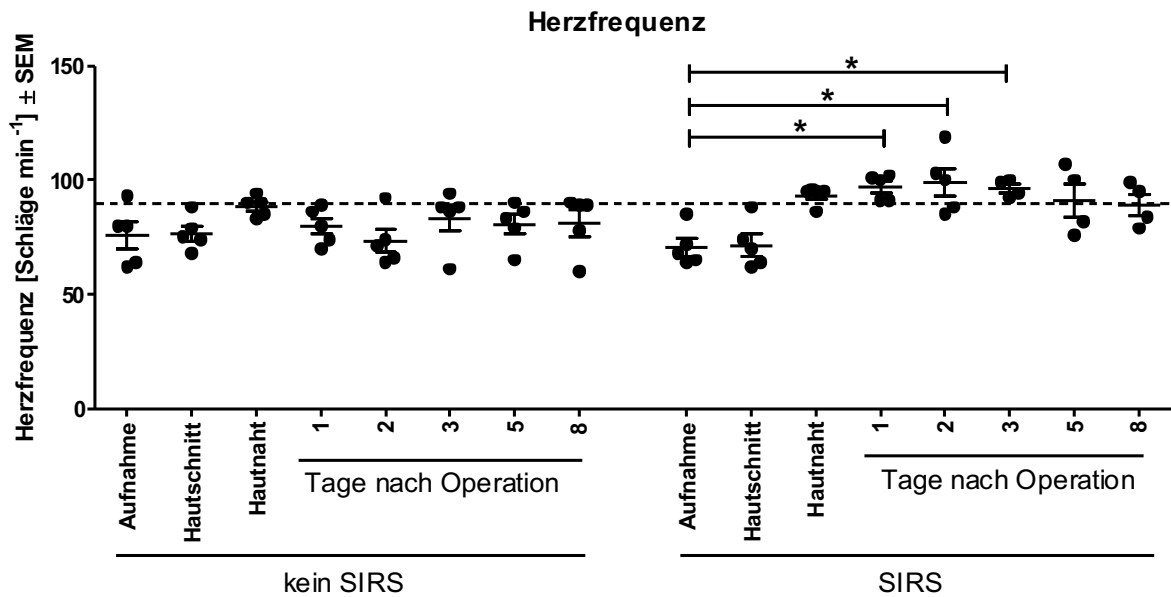


Abbildung 2: Herzfrequenz in der kein-SIRS und SIRS Gruppe. Gezeigt werden die einzelnen Werte jedes Patienten sowie Mittelwert und Standardfehler (standard error of the mean, SEM); * $p < 0,05$ im Kruskal-Wallis mit Dunn's Multiple Comparison post hoc Test; gestrichelte Linie: Grenzwert.

In der SIRS Gruppe war das Symptom Tachykardie deutlich stärker ausgeprägt: Bereits am Ende der Operation hatten 4 von 5 Patienten Herzfrequenzen von $\geq 90/\text{min}$, am ersten und dritten postoperativen Tag hatten sogar alle Patienten eine Herzfrequenz von $> 90/\text{min}$. Somit bestand ein signifikanter ($p < 0,05$) Unterschied zwischen der präoperativen Ausprägung des Merkmals Tachykardie und der entsprechenden Ausprägung an den postoperativen Tagen 1, 2 und 3. Die Tachykardie ist somit das Symptom mit der größten Konstanz zwischen den Patienten in unserer SIRS Gruppe.

Die **Tachypnoe** als weiterer klinischer Marker eines SIRS mit dem Grenzwert einer Atemfrequenz von $\geq 20/\text{min}$ (Abbildung 3) war in der kein-SIRS Gruppe zu keinem Zeitpunkt bei keinem Patienten auffällig, ein einziger Patient zeigte am postoperativen Tag 2 mit exakt $20/\text{min}$ eine grenzwertige Atemfrequenz. In der SIRS Gruppe hingegen fanden sich an den postoperativen Tagen 1, 2 und 8

mindestens zwei, am postoperativen Tag 5 ein Patient mit einer relevanten Tachypnoe.

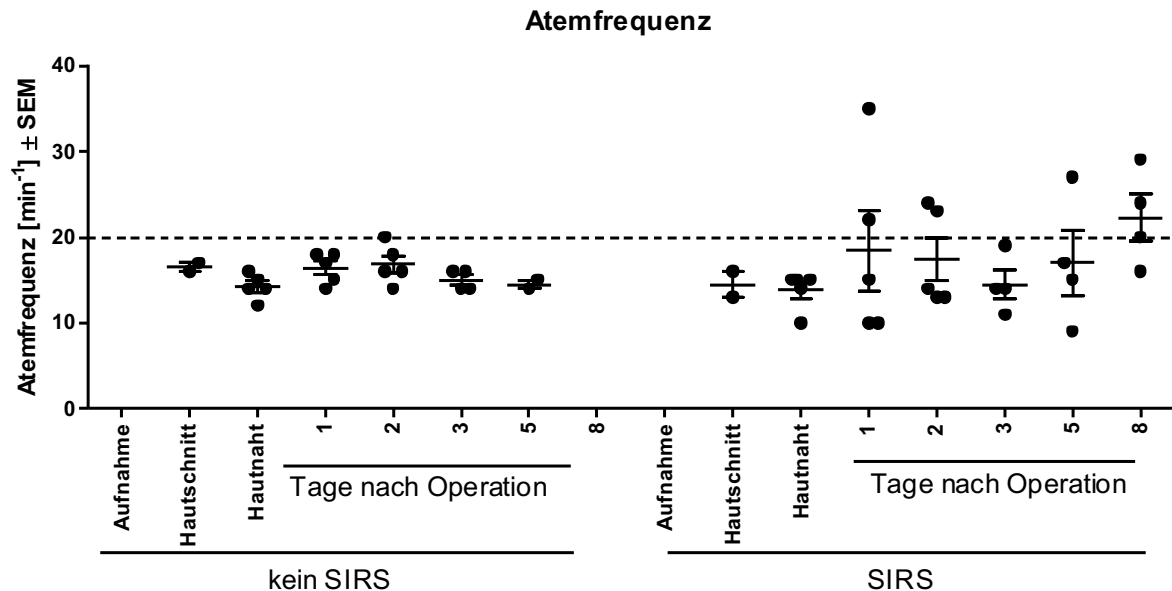


Abbildung 3: Atemfrequenz in der kein-SIRS und SIRS Gruppe. Gezeigt werden die Frequenzen jedes Patienten sowie der Mittelwert und Standardfehler (standard error of the mean, SEM) innerhalb der Gruppe; gestrichelte Linie: Grenzwert.

Zum Teil war die Tachypnoe mit Atemfrequenzen $>25/\text{min}$ sogar sehr deutlich ausgeprägt. Statistische Signifikanz erreichten die Unterschiede in den Atemfrequenzen zwischen den Testzeitpunkten innerhalb der SIRS Gruppe allerdings nicht.

Der **arterielle Kohlendioxyd Partialdruck** (PaCO_2) stellt einen Parameter dar, der physiologisch eng mit der Atemfrequenz bzw. mit dem Atemzeitvolumen in Zusammenhang steht (Abbildung 4), die Unterschreitung des Grenzwertes von $\leq 32 \text{ mmHg}$ stellt einen Parameter der Hyperventilation dar. In der kein-SIRS Gruppe war der Parameter zu jedem Zeitpunkt bei allen Patienten unauffällig, ein Patient zeigte durchgehend grenzwertig hohe PaCO_2 von rund 50 mmHg .

Auch in der SIRS Gruppe gab es keine signifikant auffälligen Werte: lediglich bei einem Patienten war der PaCO₂ Tag der Aufnahme sowie am postoperativen Tag 8 relevant erniedrigt.

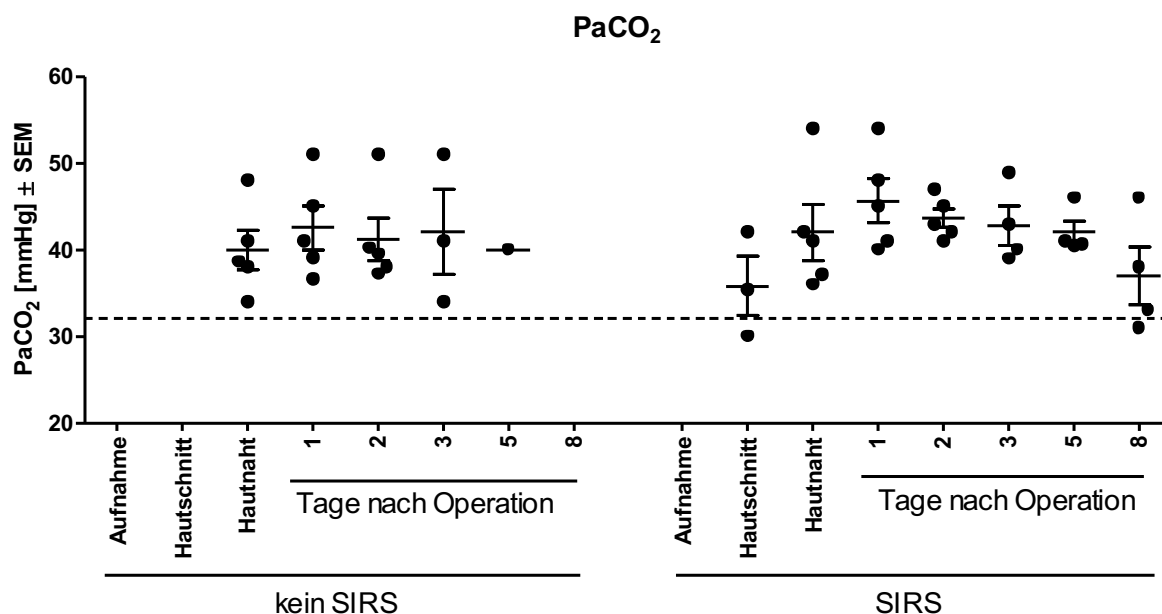


Abbildung 4: CO₂ Partialdruck in der kein-SIRS und SIRS Gruppe. Gezeigt werden die relevanten Werte nach Ende der Operation sowie Mittelwert und Standardfehler (standard error of the mean, SEM); gestrichelte Linie: Grenzwert.

Eine **Leukozytose** von $\geq 12.000/\text{ml}$ oder eine Leukopenie von $\leq 4.000/\text{ml}$ gehört einerseits zu den SIRS definierenden Kriterien, andererseits ist sie ein recht häufiges Symptom im Rahmen des Postaggressionsstoffwechsels nach Herzoperationen.

In der kein-SIRS Gruppe hatten bei Ende des chirurgischen Eingriffs zwei aus fünf – und an den postoperativen Tagen 1, 2, 3 und 8 immer mindestens einer aus fünf Patienten eine entsprechende Leukozytose. In der SIRS Gruppe hingegen zeigte die Mehrzahl der Patienten eine relevante Leukozytose > 12.000 , bei Ende des Eingriffs sowie an den postoperativen Tagen 1 und 2 jeweils drei aus fünf Patienten (Abbildung 5).

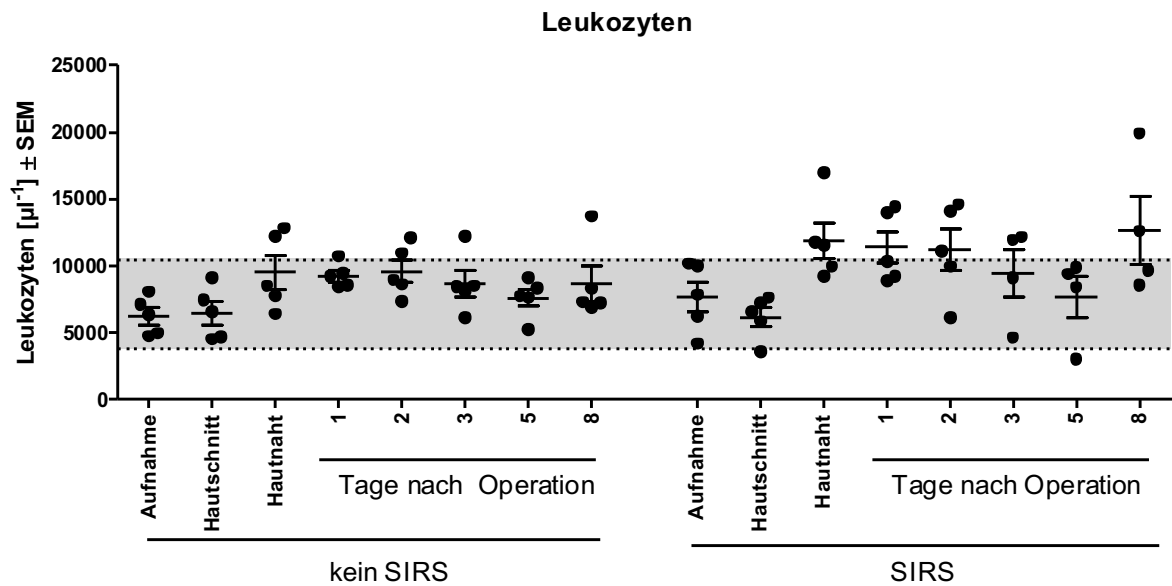


Abbildung 5: Leukozyten in der kein-SIRS und SIRS Gruppe. Gezeigt werden die Leukozytenwerte jedes inkludierten Patienten sowie Mittelwert und Standardfehler (standard error of the mean, SEM); grau hinterlegt: Normbereich.

3.3 Postoperativer Konzentrationsverlauf etablierter Marker für Inflammation: C-reaktives Protein und Procalcitonin.

Neben einer Leukozytose oder Leukopenie existieren weitere Entzündungsparameter die in der routinemäßigen klinischen Labordiagnostik etabliert sind. Die beiden wesentlichen Werte hier sind die Serumproteine **C-reaktives Protein** (CRP) und Procalcitonin (PRC). Zwar sind diese anders als die Leukozytenzahl nicht per definitionem mit einem SIRS korreliert, dennoch steigen die Werte bekanntermaßen in der Sepsis und auch in anderen Zuständen der Inflammation sowie im Postagressionsstoffwechsel an. Beide reagieren erfahrungsgemäß sehr sensitiv auf den unspezifischen Reiz der Operation.

Dementsprechend findet sich in der kein-SIRS Gruppe an allen postoperativen Tagen in allen Patienten eine deutliche Erhöhung des CRP (Abbildung 6).

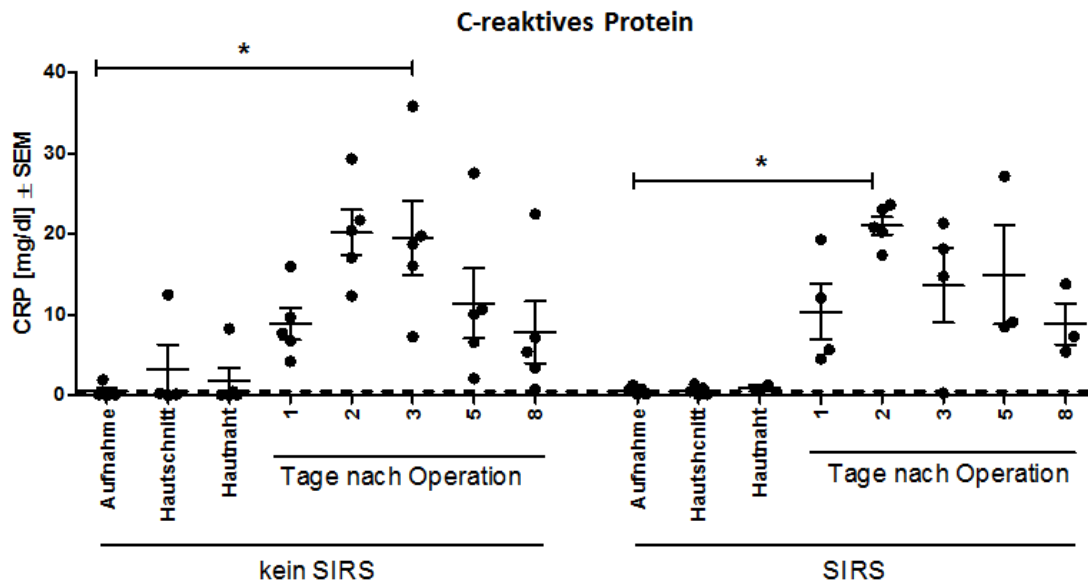


Abbildung 6: C-reaktives Protein in der kein-SIRS und SIRS Gruppe. Gezeigt werden die CRP Plasmakonzentrationen jedes Patienten sowie Mittelwert und Standardfehler (standard error of the mean, SEM); * $p < 0,05$ im Kruskal-Wallis mit Dunn's Multiple Comparison post hoc Test; gestrichelte Line: Grenzwert.

Dasselbe gilt für die SIRS Gruppe, bei allen Patienten wurden an allen postoperativen Tagen erhöhte Werte gemessen. Die postoperative CRP Erhöhung ist im Falle der kein-SIRS Gruppe am vierten postoperativen Tag, in der SIRS Gruppe am dritten postoperativen Tag signifikant ($p < 0,05$).

Qualitativ ähnlich wenn auch quantitativ weniger stark ausgeprägt verhielt sich der Konzentrationsverlauf im Falle des **Procalcitonins** (PCT): Insbesondere in den ersten 3 postoperativen Tagen war der Wert in allen Patienten sowohl der SIRS wie auch der kein-SIRS Gruppe erhöht (Abbildung 7). Im Vergleich zum präoperativen Wert ist am ersten postoperativen Tag sowohl in der SIRS als auch in der kein-SIRS Gruppe ein signifikant ($p < 0,05$) höherer Wert zu messen. In der SIRS Gruppe waren sowohl die Maximalwerte sowie auch die Mittelwerte der PRC Konzentrationen deutlich höher ausgeprägt, an den postoperativen

Tagen 1 und 2 waren die PRC Konzentrationen in der SIRS Gruppe im Mittel dreifach höher als in der kein-SIRS Gruppe. Sowohl beim CRP wie auch beim PCT fällt eine ausgesprochen große interindividuelle Streubreite der in beiden Gruppen auf.

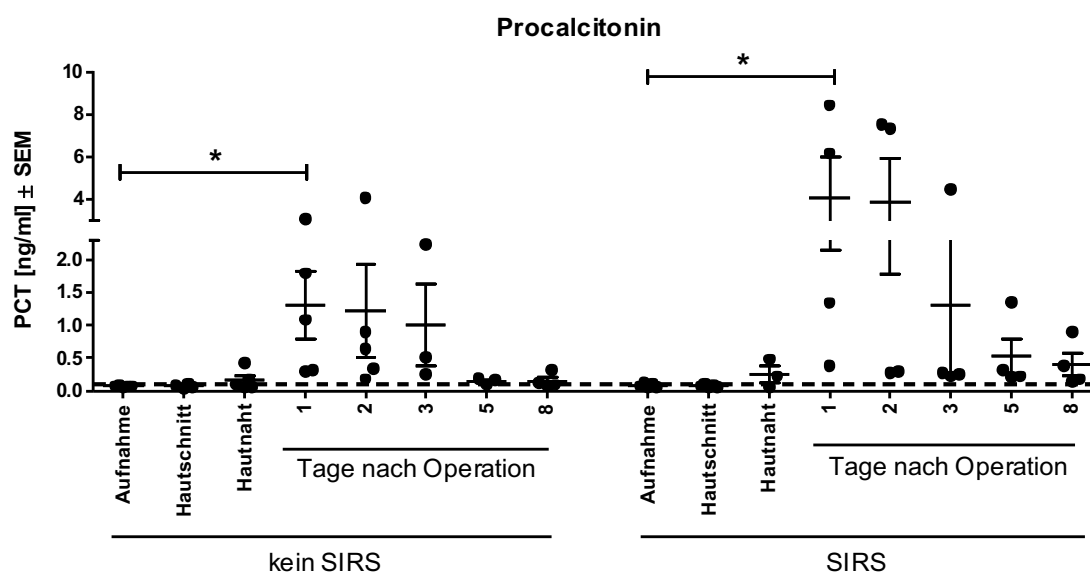


Abbildung 7: Procalcitonin in der kein-SIRS und SIRS Gruppe. Gezeigt werden die Procalcitonin Plasmakonzentrationen jedes inkludierten Patienten sowie Mittelwert und Standardfehler (standard error of the mean, SEM); * $p < 0,05$ im Kruskal-Wallis mit Dunn's Multiple Comparison post hoc Test; gestrichelte Linie: Grenzwert.

3.4 Zytokine in der kein-SIRS und SIRS Gruppe: IL1 β , IL2, IL6, IL8, IL10 und TNF α und IFN γ

In der vorliegenden Arbeit analysierten wir die Plasmakonzentrationen der Zytokine IL1 β , IL2, IL6, IL8, IL10, TNF α und IFN γ an allen Beobachtungszeitpunkten in der kein-SIRS und SIRS Gruppe.

Abbildung 8 zeigt den Verlauf der absoluten Konzentrationen von IL1 β in beiden Gruppen. Es zeigt sich insbesondere in der nonSIRS Gruppe schon präoperativ eine große interindividuelle Streubreite der IL1 β Konzentration welche sich über die postoperativen Tage fortsetzte: Ein Patient hatte

durchgehend relevant erhöhte Werte für IL1 β im Vergleich zu den anderen Patienten der kein-SIRS Gruppe.

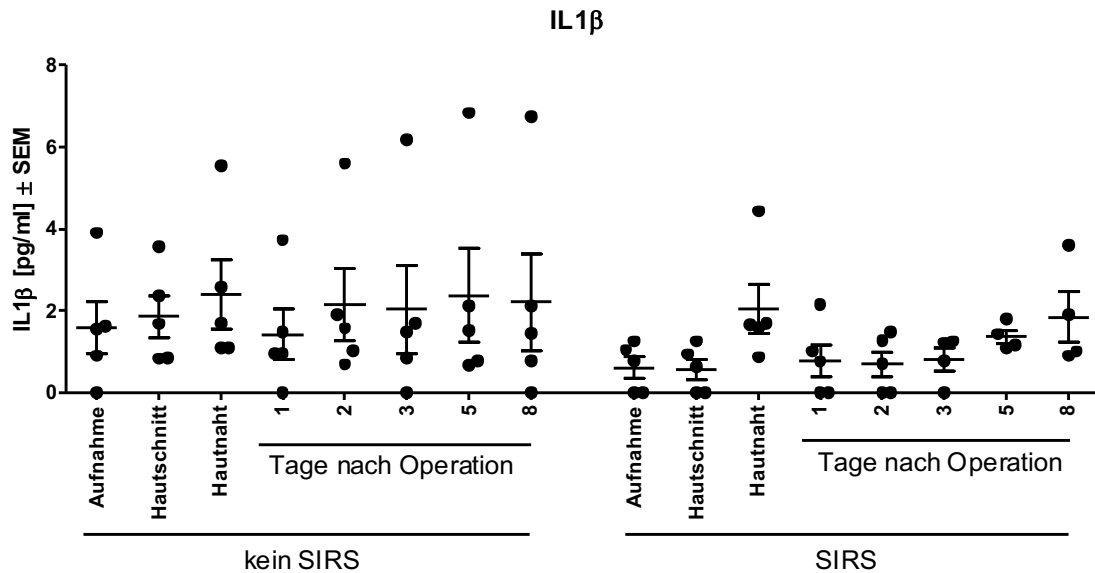


Abbildung 8: IL1 β Plasmakonzentrationen in der kein-SIRS und SIRS Gruppe. Gezeigt werden die Absolutwerte jedes Patienten sowie Mittelwert und Standardfehler (standard error of the mean, SEM).

Signifikante Unterschiede zwischen den Beobachtungszeitpunkten ergeben sich innerhalb der kein-SIRS Gruppe nicht.

Im Falle der SIRS Gruppe ergibt sich auch eine große Streubreite der Werte zwischen den Patienten bereits präoperativ – wenn auch nicht so groß wie in der Kontrollgruppe. Augenfällig ist eine deutliche Erhöhung der IL1 β Werte zum Messzeitpunkt „Operationsende“ in der kein-SIRS Gruppe, welche sich in der kein-SIRS Gruppe nicht findet.

Um die starke Streubreite der absoluten Konzentrationen in der präoperativen Probe auszugleichen und die relativen Konzentrationsänderungen im postoperativen Verlauf deutlich zu machen wurden die postoperativen Werte auf die Werte bei stationärer Aufnahme normiert, das heißt die individuellen IL1 β Konzentrationen eines jeden Patienten zu den Untersuchungszeitpunkten

wurde durch die IL1 β Plasmakonzentration des entsprechenden Patienten zum Zeitpunkt vor der Operation dividiert. So ergeben sich in der Darstellung der postoperativen Konzentrationen von IL1 β letztlich multiplikative Steigerungen um das Vielfache des Wertes bei stationärer Aufnahme, dies ist in Abbildung 9 dargestellt.

Es wird deutlich, dass sich die **relativen Konzentrationen von IL1 β** in der kein-SIRS Gruppe über die verschiedenen postoperativen Beobachtungszeitpunkte nicht nennenswert ändern.

In der SIRS Gruppe hingegen ist bei allen Patienten ein deutlicher Anstieg der IL1 β Konzentration bei OP Ende evident. Dieser Anstieg von IL1 β bei OP-Ende im Mittel um den Faktor 3,3 in der SIRS Gruppe ist sowohl signifikant ($p < 0,05$) unterschiedlich zum präoperativen Ausgangswert als auch im Vergleich zum entsprechenden Wert in der kein-SIRS Gruppe. An den postoperativen Tagen 1, 2 und 3 hingegen konnten auch in der SIRS Gruppe keine relevant erhöhten Werte für IL1 β festgestellt werden. Der selektiv bei Operationsende signifikant erhöhte IL1 β Wert in der SIRS Gruppe ist potentiell nutzbar als früher diagnostischer Parameter eines SIRS.

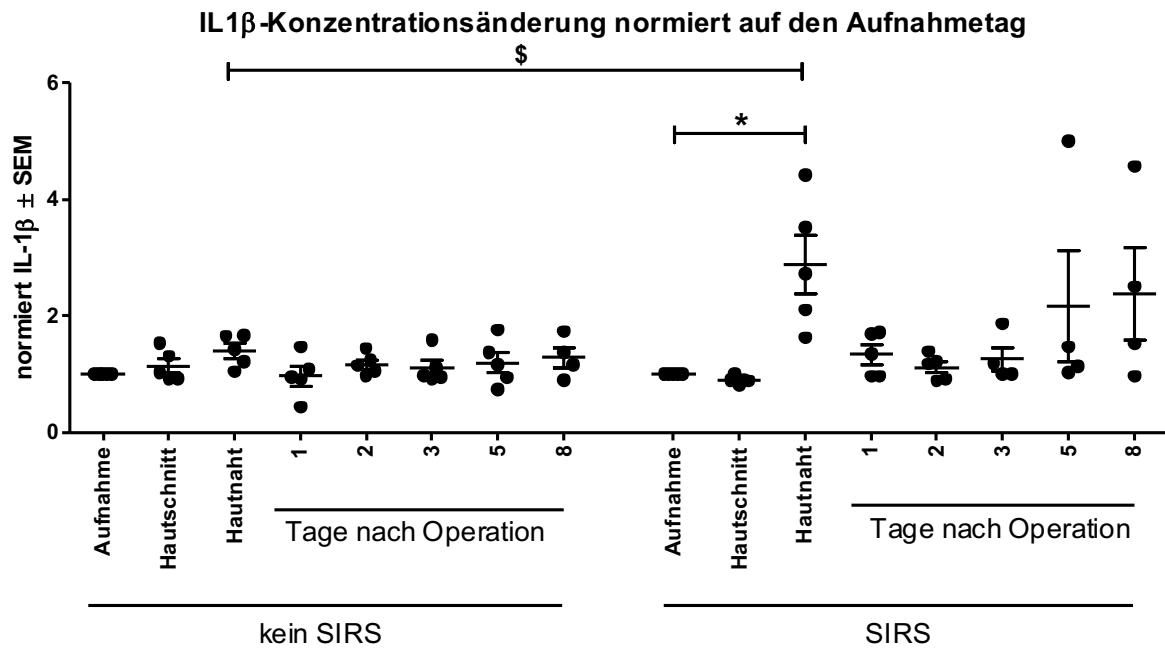


Abbildung 9: Normierte IL1 β Plasmakonzentrationen in der kein-SIRS und SIRS Gruppe. Gezeigt werden die Relativwerte jedes Patienten normiert zum Aufnahmetag sowie Mittelwert und Standardfehler (standard error of the mean, SEM); * $p < 0,05$ im Kruskal-Wallis mit Dunn's Multiple Comparison post hoc Test; Mann; \$ $p < 0,05$ im Whitney U-Test.

Ähnlich dem IL1 β bestand in den Plasmakonzentrationen des **IL10** am Aufnahmetag eine große interindividuelle Streubreite, und auch in diesem Falle zeigt sich sowohl in der kein-SIRS als auch in der SIRS Gruppe ein relevanter Anstieg der absoluten Konzentrationen am Ende der Operation (Abb. 10).

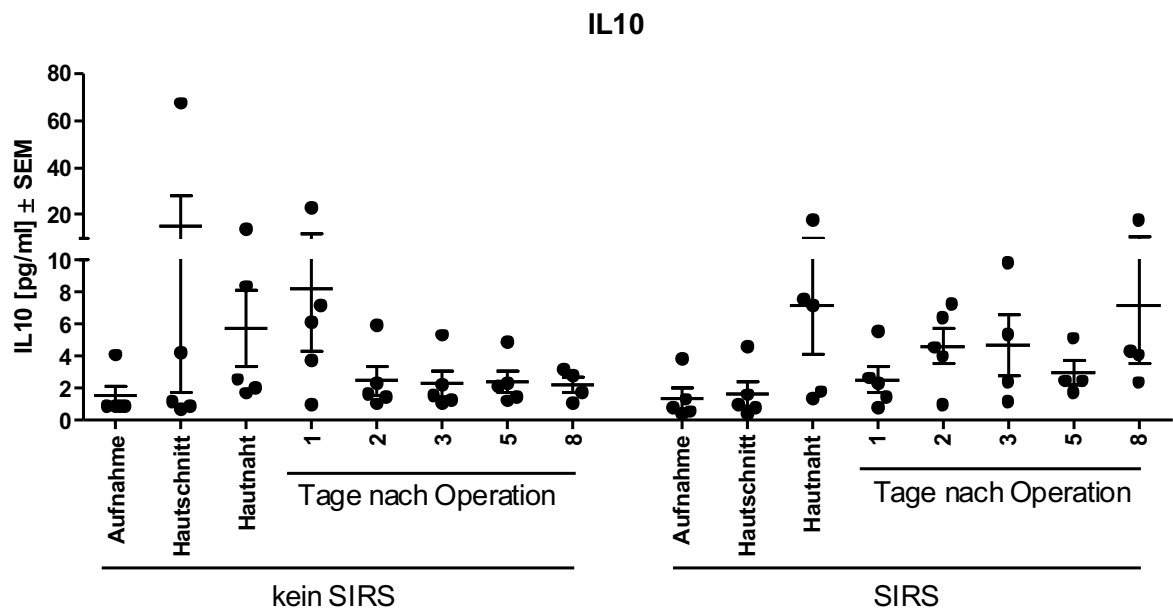


Abbildung 10: IL10 Plasmakonzentrationen in der kein-SIRS und SIRS Gruppe.. Gezeigt werden die Absolutwerte jedes Patienten sowie Mittelwert und Standardfehler (standard error of the mean, SEM).

Dieser Befund wird wesentlich deutlicher wenn man, wie schon beim IL1 β , die postoperativen Plasmakonzentrationen von **IL10 in Relation** zu den jeweils präoperativ bestehenden Konzentrationen betrachtet (Abbildung 11). In der kein-SIRS und der SIRS Gruppe findet sich am Ende der Operation ein im Mittel rund fünffacher Anstieg der Plasmakonzentrationen im Vergleich zum Aufnahmezeitpunkt, dieser Konzentrationsunterschied ist in beiden Gruppen signifikant ($p < 0,05$). Im Unterschied zur SIRS Gruppe jedoch setzt sich dieser Konzentrationsanstieg des IL10 in der kein-SIRS Gruppe im Weiteren am ersten postoperativen Tag noch fort, in der SIRS Gruppe dagegen kommt es zu einem Konzentrationsabfall. Dieser Plasmakonzentrationsanstieg des IL10 mag einerseits in einem direkten oder indirekten Zusammenhang mit der Entstehung eines SIRS stehen, andererseits könnte dieser Konzentrationsverlauf potentiell auch diagnostisch verwendet werden da er eine Differenzierung zwischen SIRS und kein-SIRS zu einem recht frühen Zeitpunkt, nämlich am ersten postoperativen Tag erlaubt.

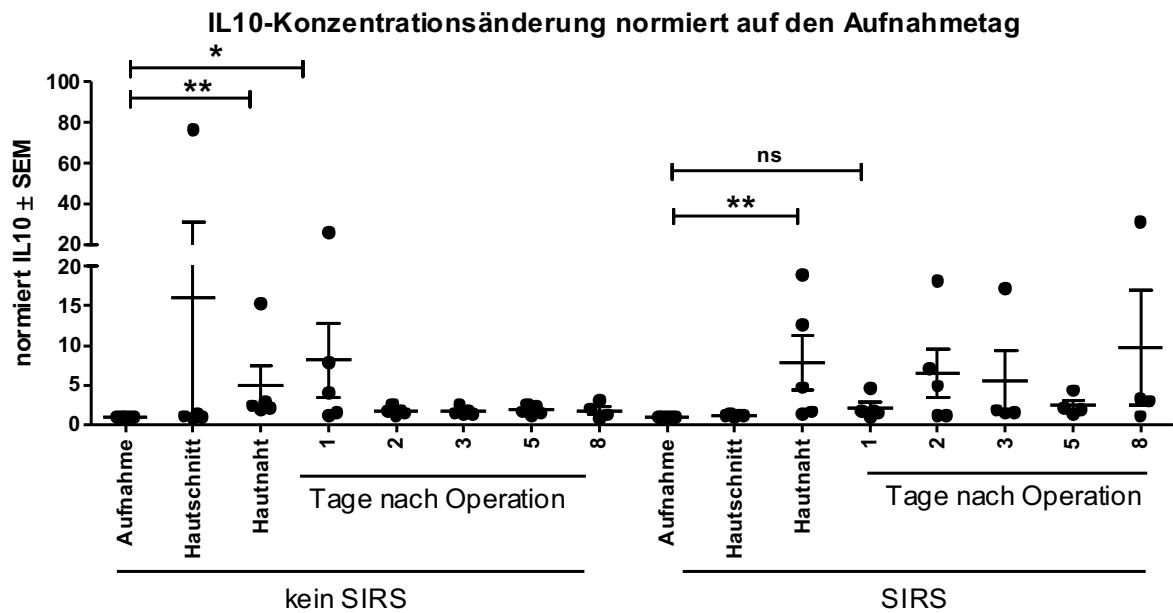


Abbildung 11: Normierte IL10 Plasmakonzentrationen in der kein-SIRS und SIRS Gruppe. Gezeigt werden die Relativwerte jedes Patienten normiert auf den Aufnahmetag sowie Mittelwert und Standardfehler (standard error of the mean, SEM); * $p < 0,05$ bzw. ** $p < 0,01$ im Kruskal-Wallis mit Dunn's Multiple Comparison post hoc Test.

Neben IL1 β und IL10 wurden auch die Konzentrationsverläufe von IL6 und IL8 analysiert.

IL6 und **IL8** zeigen am Messzeitpunkt Operationsende signifikant erhöhte Werte gegenüber dem Zeitpunkt stationäre Aufnahme (Abbildungen 12 und 13). Allerdings ist dieser Anstieg in beiden Gruppen, sowohl der kein-SIRS als auch der SIRS Gruppe zu verzeichnen. In beiden Fällen, beim IL6 und IL8, fällt die Plasmakonzentration in den ersten postoperativen Tagen rasch wieder auf die präoperativen Normalwerte ab, die mit großem Abstand höchsten Werte finden sich also jeweils am Operationsende was auf einen direkten Zusammenhang mit dem, in diesem Falle chirurgischen Trauma hinweist. Dadurch, dass die Plasmakonzentrationen von IL6 und IL8 in beiden untersuchten Gruppen am Operationsende signifikant erhöht sind ergeben sich hier keine Unterscheidungsmerkmale zwischen SIRS und kein-SIRS, bzw. keine Möglichkeit die Entwicklung eines SIRS frühzeitig zu diagnostizieren.

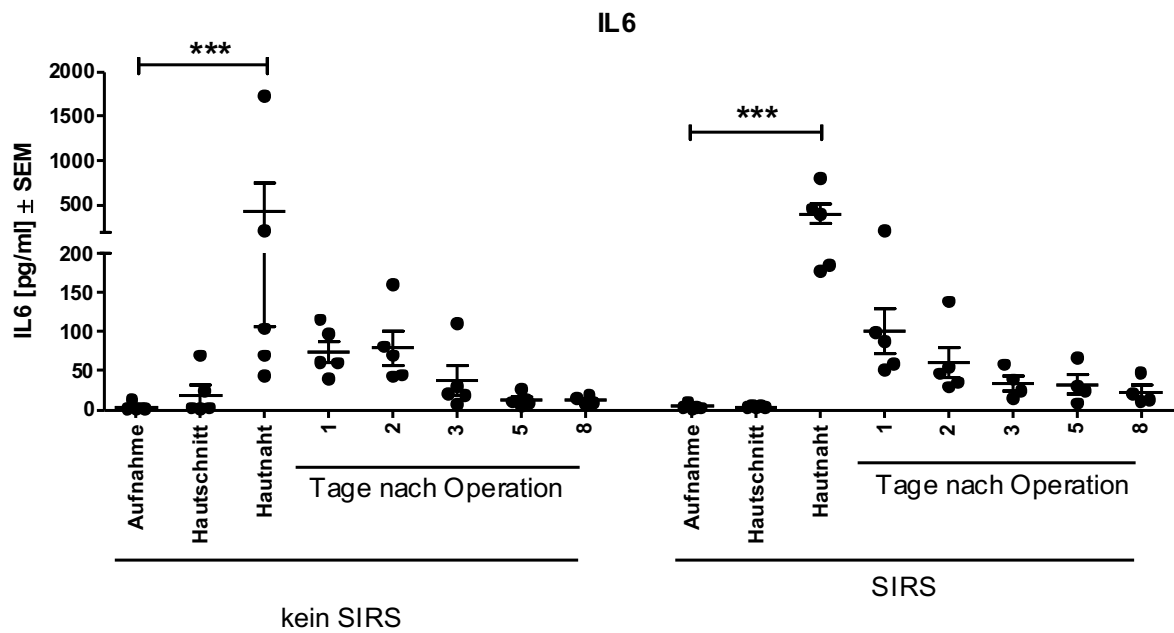


Abbildung 12: IL6 Plasmakonzentrationen in der kein-SIRS und SIRS Gruppe.. Gezeigt werden die IL6 Absolutwerte jedes Patienten sowie Mittelwert und Standardfehler (standard error of the mean, SEM); *** $p < 0,001$ im Kruskal-Wallis mit Dunn's Multiple Comparison post hoc Test.

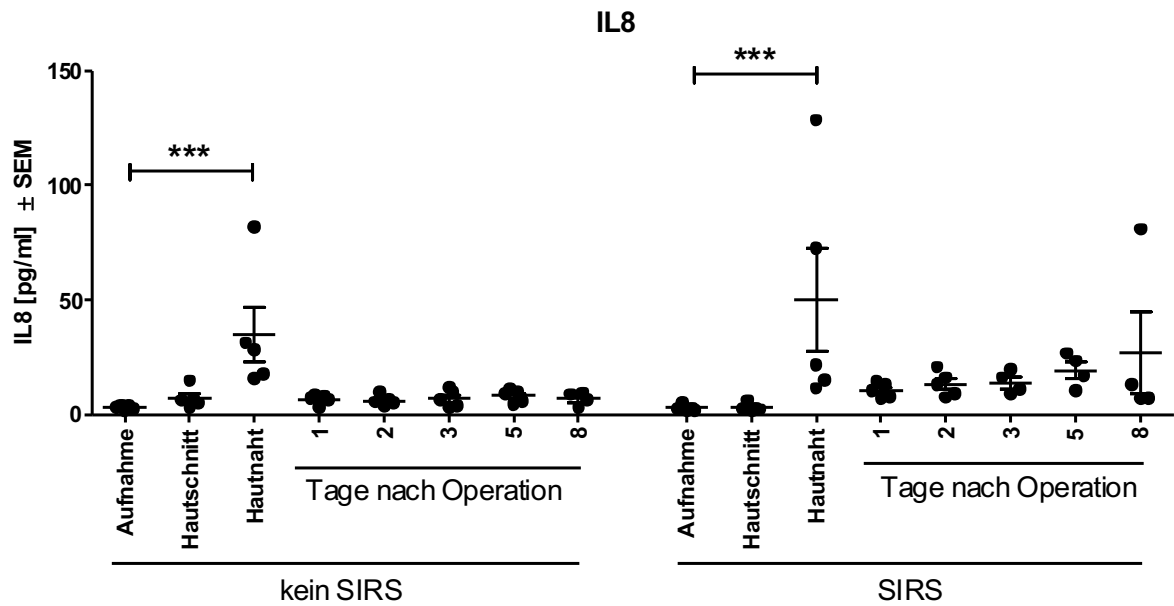


Abbildung 13: IL8 Plasmakonzentrationen in der kein-SIRS und SIRS Gruppe. Gezeigt werden die IL8 Absolutwerte jedes Patienten sowie Mittelwert und Standardfehler (standard error of the mean, SEM); *** $p < 0,001$ im Kruskal-Wallis mit Dunn's Multiple Comparison post hoc Test.

Einen ganz ähnlichen Konzentrationsverlauf zeigt das **TNF α** : zwar findet sich ein Konzentrationsanstieg zum Operationsende im Vergleich zum Aufnahmezeitpunkt in beiden Gruppen, der SIRS und der kein-SIRS Gruppe, jedoch erreichten diese Differenzen weder statistische Signifikanz noch erlauben sie die Differenzierung zwischen der kein-SIRS und der SIRS Gruppe (Abb. 14).

Darüberhinaus besteht über den gesamten Beobachtungszeitraum in beiden Gruppen eine große Streubreite der Plasmakonzentrationen für **TNF α** . Die **Normalisierung** der postoperativen **TNF α** Werte auf den präoperativen Wert erbrachte keine wegweisenden Befunde. Letztlich ist die **TNF α** Konzentration auf Grundlage der hier erhobenen Daten nicht zur Diagnose eines SIRS verwendbar.

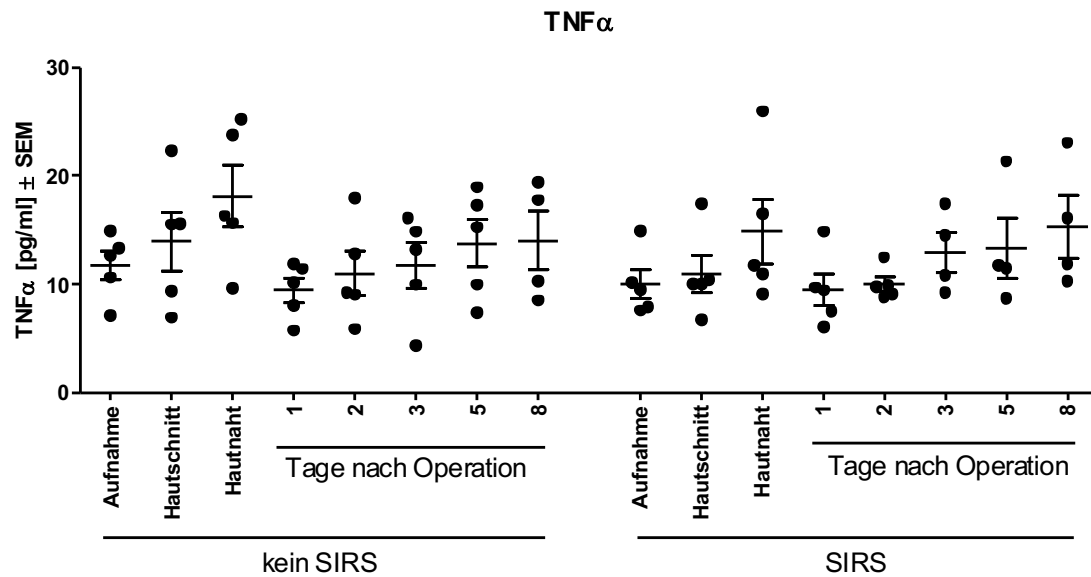


Abbildung 14: TNF α Plasmakonzentrationen in der kein-SIRS und SIRS Gruppe. Gezeigt werden die TNF α Absolutwerte jedes Patienten sowie Mittelwert und Standardfehler (standard error of the mean, SEM)

Die Plasmakonzentrationen von **IL2** und **IFN γ** wurden ebenso analysiert, waren jedoch bei praktisch allen Messungen in allen Patienten unterhalb der Nachweisgrenze. Bezüglich dieser Parameter konnten also keine verwertbaren Messungen und Konzentrationsverläufe gewonnen werden.

3.5 sCD163, TREM-1, Endocan (ESM-1) sowie cell-free DNA (cfDNA) in den Untersuchungsgruppen

Weitere lösliche Plasmaproteine die potentielle frühe Biomarker eines SIRS darstellen sind sCD163, TREM-1, Endocan (ESM-1) sowie cell-free DNA (cfDNA).

Das **sCD163** ist in verschiedenen Formen der Inflammation hochreguliert. In unserer Analyse zeigte sich die absolute Konzentration von sCD163 über die Messzeitpunkte in der kein-SIRS Gruppe ohne augenfällige Dynamik (Abbildung 15). In der SIRS Gruppe hingegen ergab sich einerseits eine deutlich größere Streubreite der einzelnen Werte, andererseits zeigte sich ein

nichtsignifikanter Trend zu erhöhten CD163 Werten zum Zeitpunkt Operationsende. Die große Streubreite der Werte ist bereits zum präoperativen Zeitpunkt vorhanden: ein SIRS Patient hatte mit einer Plasmakonzentration von 198 ng/ml einen deutlich niedrigeren Wert als die anderen Patienten, welche alle Werte zwischen 500 und 1000 ng/ml aufwiesen. In demselben Patienten setzten sich die niedrigen Werte für sCD163 postoperativ fort, an den postoperativen Tagen 1, 2, 3 und 5 bestanden kaum messbare Plasmakonzentrationen.

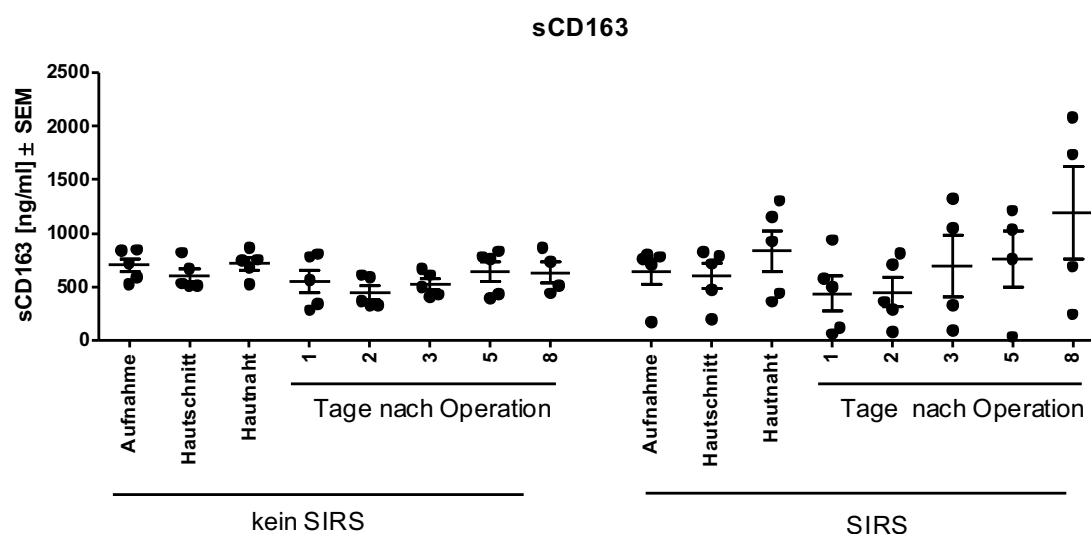


Abbildung 15: sCD163 Plasmakonzentrationen in der kein-SIRS und SIRS Gruppe. Gezeigt werden die sCD163 Absolutwerte jedes Patienten sowie Mittelwert und Standardfehler (standard error of the mean, SEM).

Bei einem weiteren Patienten der SIRS Gruppe kam es direkt nach der Operation zu einem leichten Konzentrationsabfall des sCD163 während die drei anderen mit einem Konzentrationsanstieg direkt nach der Operation gemessen wurden.

In der Darstellung der relativen Konzentrationsänderungen über den Messzeitraum im Vergleich zum Aufnahmezeitpunkt wird der Trend zu höheren Konzentrationen am Ende der Operation in der SIRS Gruppe deutlicher (Abbildung 16) wobei dieser Unterschied bei unseren Patientenzahlen keine

statistische Signifikanz erreicht. An den postoperativen Tagen 1 bis 5 ergaben sich im Vergleich zum präoperativen Zeitpunkt im Mittel allerdings tendenziell niedrigere Plasmakonzentrationen für sCD163 sowohl in der kein-SIRS als auch in der SIRS Gruppe. Zusammenfassend können die Konzentrationsverläufe von sCD163 nicht für eine frühzeitige Diagnose eines SIRS genutzt werden.

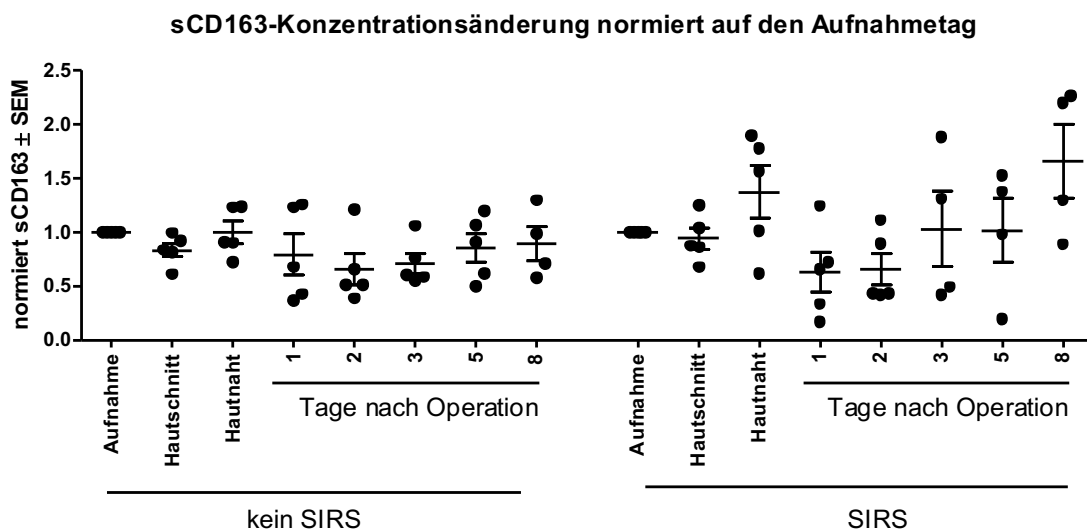


Abbildung 16: Normierte sCD163 Plasmakonzentrationen in der kein-SIRS und SIRS Gruppe. Gezeigt werden die Relativwerte jedes Patienten zum Aufnahmetag sowie Mittelwert und Standardfehler (standard error of the mean, SEM).

Das Protein **Endocan** (Endothelial cell-specific molecule 1, ESM1) war in den kein-SIRS Patienten am Ende der Operation signifikant höher exprimiert als vor der Operation (Abbildung 17). Die auf die präoperativ bestehenden Endocankonzentrationen normierten Daten (Abbildung 18) zeigen eine rund fünffach erhöhte Expression von Endocan zum Messzeitpunkt direkt postoperativ. Die Expressionssteigerung ließ sich ausnahmslos in jedem Patienten der kein-SIRS Gruppe nachweisen. Die erhöhte Expression setzte sich in den ersten postoperativen Tagen fort und ab dem dritten postoperativen Tag war wieder ein langsamer Abfall der Endocan Expression zu verzeichnen.

Der Anstieg der Endocan Expression in der SIRS Gruppe hingegen war zwar als Trend erkennbar aber numerisch deutlich geringer (2,2-fache Expression im Vergleich zum präoperativen Wert) und erreichte keine statistische Signifikanz. Dennoch war auch in der kein-SIRS Gruppe an den postoperativen Tagen 1 bis 8 eine erhöhte Endocan Expression messbar. Die Endocan Expression am Zeitpunkt Operationsende war in der kein-SIRS Gruppe signifikant höher ($p < 0,05$) als in der SIRS Gruppe.

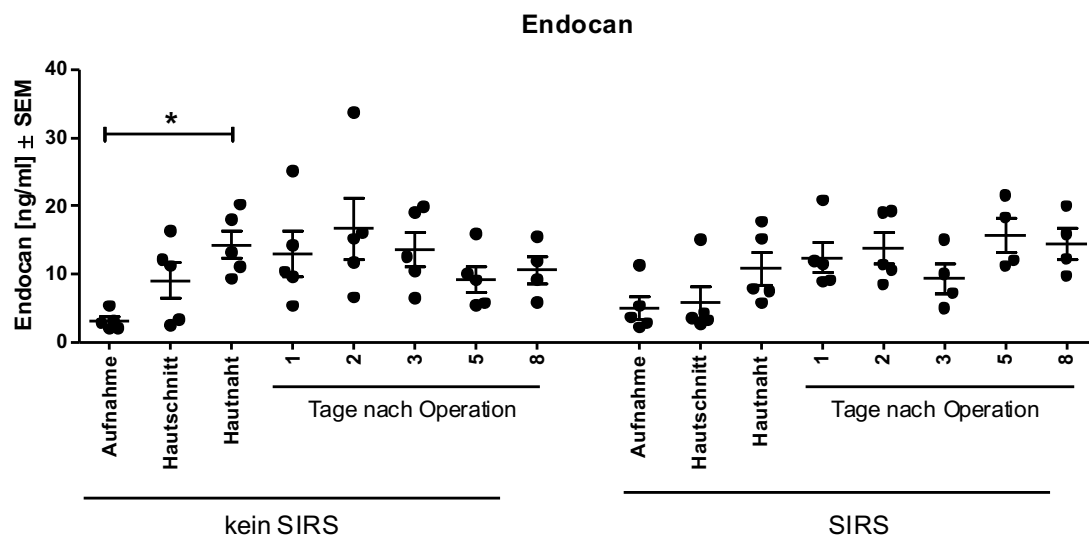


Abbildung 17: Endocan (ESM-1) Plasmakonzentrationen in der kein-SIRS und SIRS Gruppe. Gezeigt werden die Absolutwerte jedes Patienten sowie Mittelwert und Standardfehler (standard error of the mean, SEM); * $p < 0,05$ im Kruskal-Wallis mit Dunn's Multiple Comparison post hoc Test.

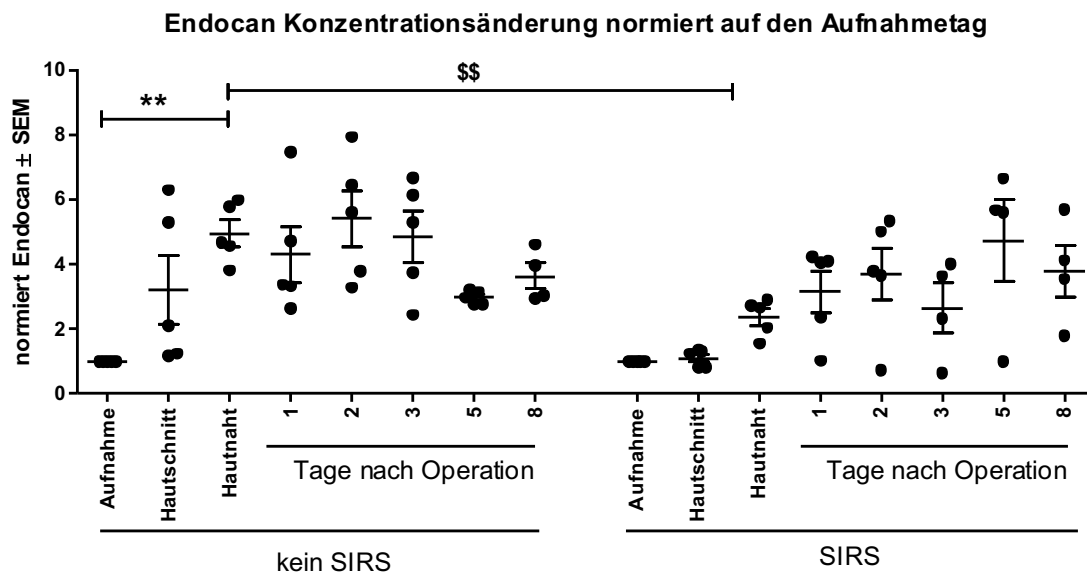


Abbildung 18: Endocan (ESM-1) Konzentrationsänderungen in der kein-SIRS und SIRS Gruppe. Gezeigt werden die Relativwerte jedes Patienten normiert auf den Tag der Aufnahme sowie Mittelwert und Standardfehler (standard error of the mean, SEM); ** $p < 0,01$ im Kruskal-Wallis mit Dunn's Multiple Comparison post hoc Test. \$\$ $p < 0,01$ im Whitney U-Test.

Die geringer ausgeprägte Expression von Endocan in der SIRS Gruppe könnte direkt oder indirekt pathogenetisch mit der klinischen Ausprägung eines SIRS in Verbindung stehen. Grundsätzlich wäre es denkbar den geringer ausgeprägten Anstieg der Endocan Expression in der SIRS Gruppe auch diagnostisch zu nutzen, da die Konzentrationsverläufe in der kein-SIRS und SIRS Gruppe aber qualitativ ähnlich sind ist die Trennschärfe und damit die diagnostische Nutzbarkeit des Parameters alleine gering.

Zellfreie DNA (cell-free DNA, cfDNA) kommt in der Zirkulation in geringen Konzentrationen letztlich als Folge von zellulären Abbauprozessen vor. Ähnlich wie beim Endocan kam es bei der cfDNA zu einem signifikanten ($p < 0,05$) Anstieg der Plasmakonzentration am Ende der Operation in der kein-SIRS Gruppe (Abbildung 19). In der in der SIRS Gruppe war dagegen ein

Konzentrationsanstieg zum selben Zeitpunkt nur als Tendenz nachweisbar, erreichte aber keine Signifikanz.

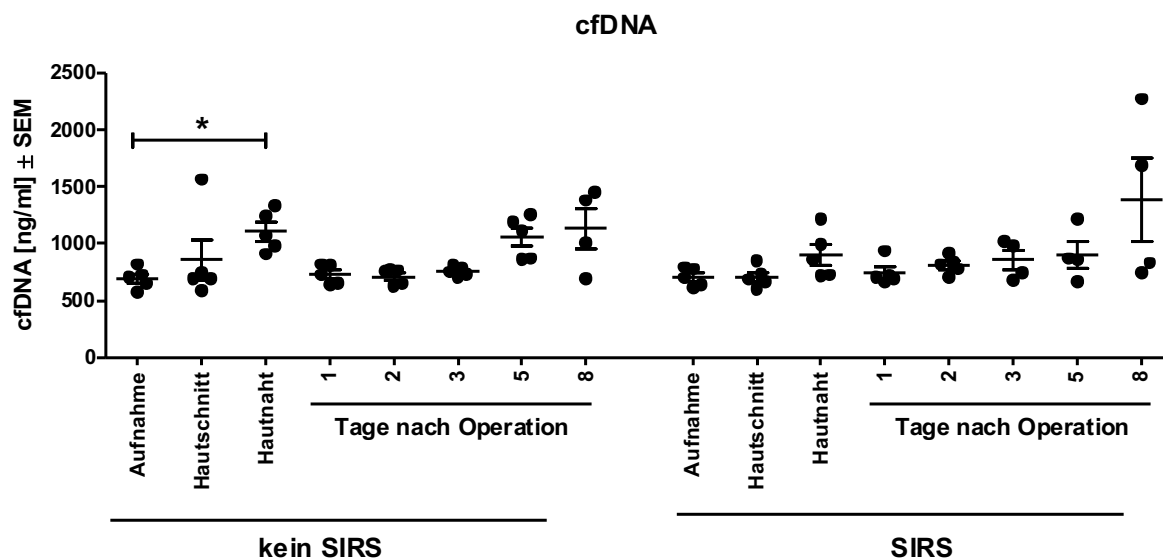


Abbildung 19: cell-free DNA Plasmakonzentrationen in der kein-SIRS und der SIRS Gruppe. Gezeigt werden die Absolutwerte jedes Patienten sowie Mittelwert und Standardfehler (standard error of the mean, SEM); * $p < 0,05$ im Kruskal-Wallis mit Dunn's Multiple Comparison post hoc Test.

Dieser Konzentrationsverlauf in beiden Gruppen wird in den Darstellungen der **relativen Konzentrationen** im Vergleich zum Aufnahmezeitpunkt (Abbildung 20) noch deutlicher: in der kein-SIRS Gruppe kommt es zu einem signifikanten ($p < 0,05$) Anstieg der relativen cfDNA Konzentration zum Operationsende um den Faktor 1,6, in der SIRS Gruppe beträgt zum gleichen Zeitpunkt der relative Konzentrationsanstieg nur 1,3, was nicht signifikant ist. Zum Zeitpunkt Operationsende unterscheiden sich die cfDNA Konzentrationen in der kein-SIRS und SIRS Gruppe nicht, und auch zu keinem anderen Zeitpunkt. Letztlich ist somit kein Hinweis auf eine diagnostische Verwendbarkeit der cfDNA im Bezug auf die Entwicklung eines SIRS gegeben.

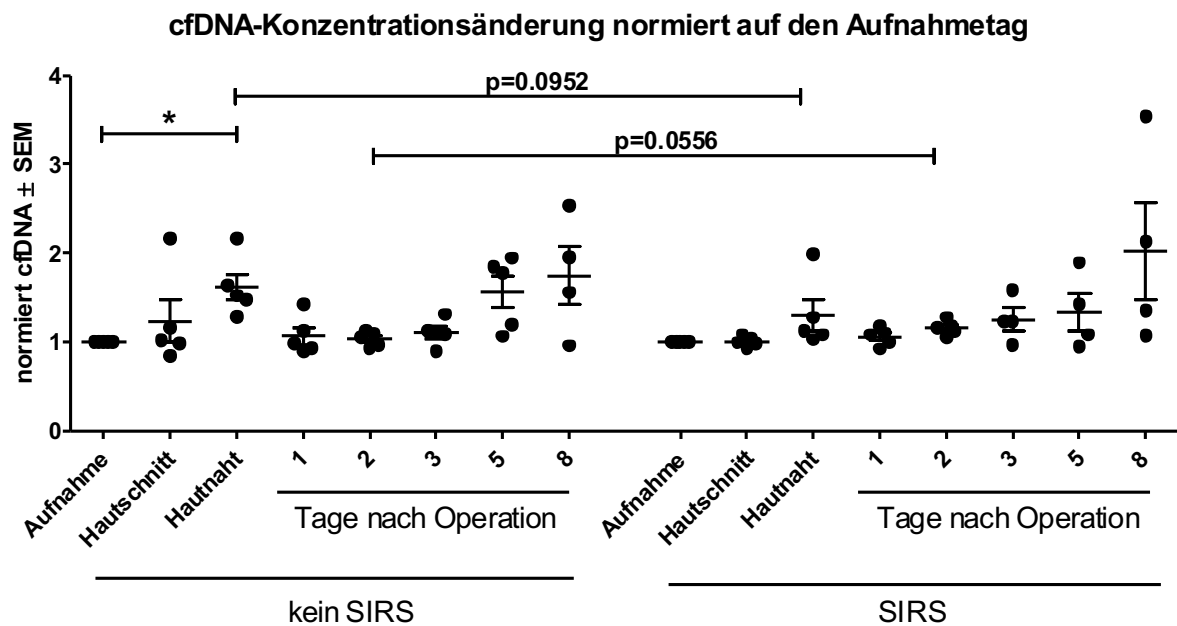


Abbildung 20: cell-free DNA Konzentrationsänderungen in der kein-SIRS und der SIRS Gruppe. Gezeigt werden die relative Plasmakonzentrationsänderung normiert auf den Tag der Aufnahme sowie Mittelwert und Standardfehler (standard error of the mean, SEM); * $p < 0,05$ im Kruskal-Wallis mit Dunn's Multiple Comparison post hoc Test.

Einen hinsichtlich der Diagnostik eines SIRS interessanten Konzentrationsverlauf in den Untersuchungsgruppen zeigte das **sTREM-1**. Die absoluten Plasmakonzentrationen von sTREM-1 waren in der SIRS Gruppe generell höher als in der kein-SIRS Gruppe (Abbildung 21): Während in allen Patienten der kein-SIRS Gruppe präoperativ, postoperativ sowie an den postoperativen Tagen 1 und 2 absolut kein sTREM-1 im Plasma nachweisbar war und erst zum Ende des Beobachtungszeitraumes, an den postoperativen Tagen 3, 5 und 8 es bei einzelnen Patienten zu einer messbaren sTREM-1 Konzentration kam, so bestanden in allen Patienten der SIRS Gruppe bereits präoperativ Plasmakonzentrationen zwischen 20 und 40 pg/ml. Zum Ende der Operation kam es in der SIRS Gruppe zu einem weiteren Konzentrationsanstieg, welcher mit einem $p=0,056$ gerade eben nicht signifikant zu nennen ist, so dennoch als deutlicher Trend bezeichnet werden

darf. Die erhöhten sTREM-1 Konzentrationen im Plasma setzten sich in der SIRS Gruppe über den gesamten Beobachtungszeitraum fort. Potentiell stellt sTREM-1 somit einen bereits präoperativ messbaren Marker für ein postoperativ auftretendes SIRS dar. Darüber besteht zum Zeitpunkt Operationsende in der SIRS Gruppe eine im Vergleich zum Aufnahmezeitpunkt nochmals erhöhte Plasmakonzentration die zudem signifikant höher ist als jene in der kein-SIRS Gruppe.

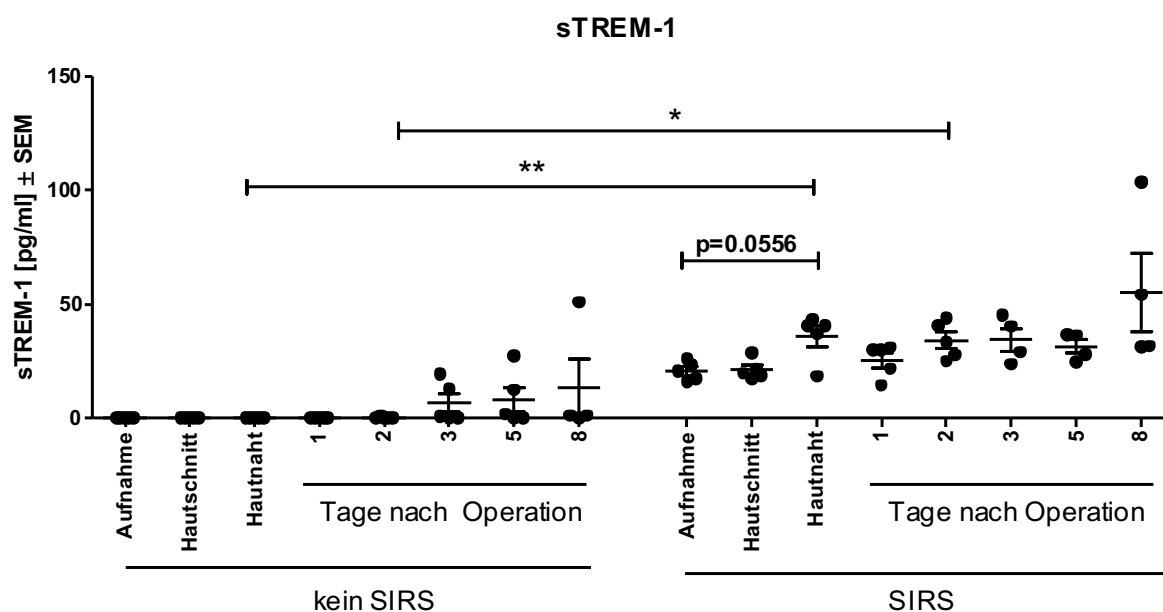


Abbildung 21: sTREM-1 Plasmakonzentrationen in der kein-SIRS und der SIRS Gruppe. Gezeigt werden die absoluten Konzentrationen jedes Patienten sowie Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes (SEM); * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$ im Kruskal-Wallis mit Dunn's Multiple Comparison post hoc Test.

3.6 Der Monozyten-Aktivierungs-Test (MAT)

In dieser Studie wurden Monozyten aus Vollblut der jeweiligen Studienpatienten *ex vivo* mit Endotoxin stimuliert um anerge nicht responsive Monozyten zu identifizieren. Die Stimulation mit ansteigenden Endotoxinkonzentrationen (Lipopolysaccharide, LPS) resultierte in sigmoidalen IL1 β -Konzentrationskurven.

Die Monozyten aller Patienten in der Studie konnten stimuliert werden, allerdings variierte die Stärke der Antwort interindividuell sehr ausgeprägt.

Sowohl in der kein-SIRS als auch in der SIRS Gruppe nahm die Stärke der monozytären IL1 β -Produktion auf einen definierten Endotoxinreiz am Ende der Operation deutlich ab gegenüber dem präoperativen Zustand (Abbildung 22 und 23). Diese abnehmende Monozytenantwort zum Ende der OP findet sich in beiden Gruppen gleichsinnig, ist aber in der SIRS Gruppe ausgeprägter und erreicht auch nur in dieser Signifikanz ($p < 0,05$).

In den Abbildungen 22 und 23 sind exemplarisch die Daten bei einer zur Stimulation verwendeten Endotoxinkonzentration von 0,5 EU/ml gezeigt. Dies entspricht dem in der Pharmapöe (European Pharmacopoeia 8.0; European Directorate for the Quality of Medicines, EDQM [77]) angegebenen Grenzwert für parenteral zu verabreichende Medikamente.

Vergleicht man die Stärke der Abnahme der Reaktivität im MAT zwischen kein-SIRS und SIRS Gruppe (Abbildung 23) so wird ein deutlicher Trend zu einer geringeren Reaktivität in der SIRS Gruppe offenbar. Zwar finden sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Ausprägung der Reaktion im MAT zwischen der kein-SIRS und SIRS Gruppe zu den entsprechenden Messzeitpunkten doch ist insbesondere zum Ende der Operation die Reaktivität des MAT in der SIRS Gruppe absolut- und auch relativ zur kein-SIRS Gruppe deutlich vermindert. Dieser Trend muss vor einer abschließenden Beurteilung mit größeren Patientenzahlen weiter untersucht werden.

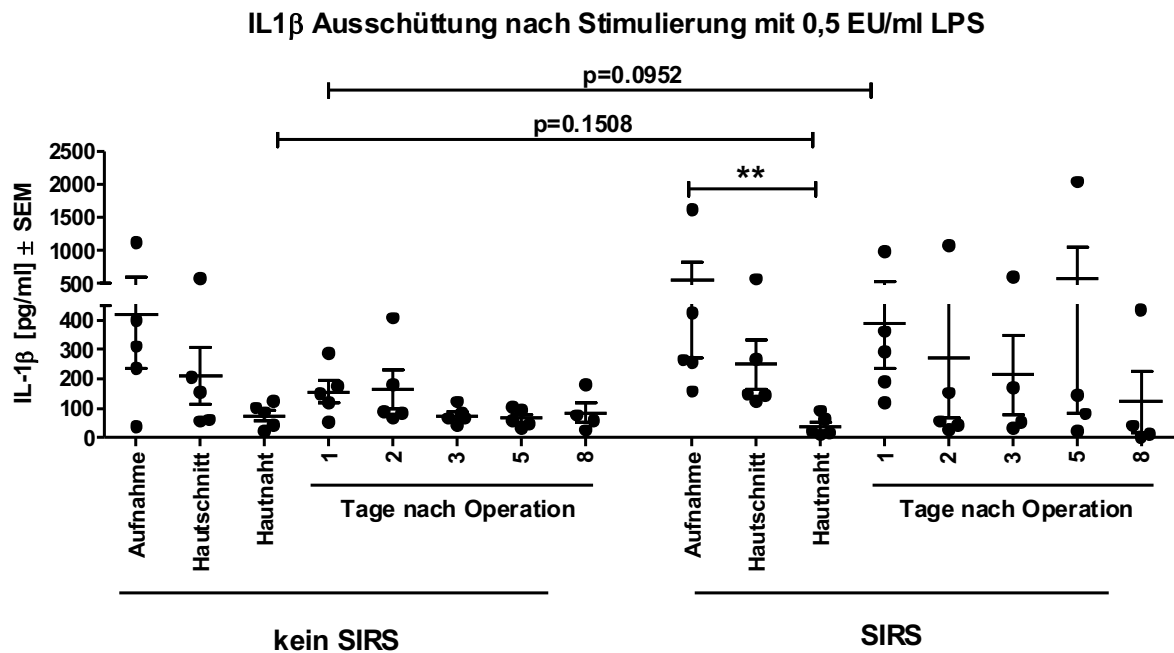


Abbildung 22: Monozyten-Aktivierungs-Test (MAT): IL1 β Ausschüttung in der kein-SIRS und der SIRS Gruppe nach Stimulierung mit 0,5 EU/ml Lipopolysaccharid (LPS). Gezeigt werden die Absolutwerte jedes Patienten sowie Mittelwerte \pm SEM; ** $p < 0,01$ im Kruskal-Wallis mit Dunn's Multiple Comparison post hoc Test.

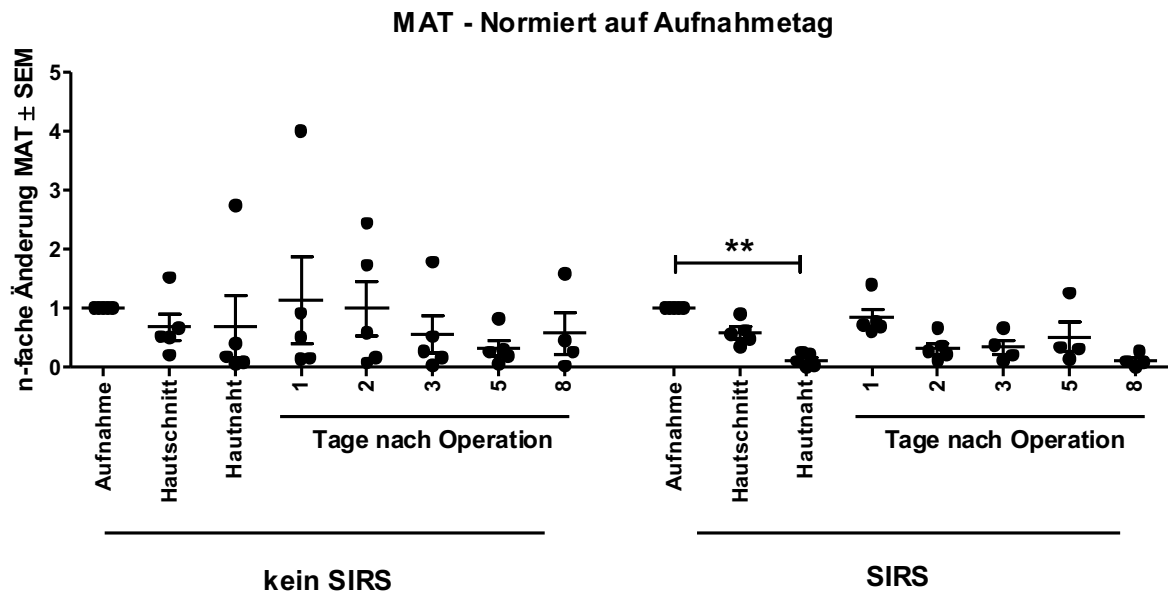


Abbildung 23: Monozyten-Aktivierungs-Test (MAT): normierte IL1 β Ausschüttung in der kein-SIRS und der SIRS Gruppe. Gezeigt werden die Relativwerte zum Tag der Aufnahme sowie Mittelwert \pm SEM; ** $p < 0,01$ im Kruskal-Wallis mit Dunn's Multiple Comparison post hoc Test.

4. Diskussion

4.1 Methodische Aspekte der Arbeit

Ziel der vorliegenden Studie war es neue Laborparameter zur frühzeitigen Vorhersage eines sich im postoperativen Verlauf nach Herzoperationen entwickelnden SIRS zu identifizieren. Die Studie wurde entsprechend als prospektive Beobachtungsstudie konzipiert. Da Marker gesucht wurden, die das Erstellen einer SIRS Diagnose vor Entwicklung der klinischen Symptomatik ermöglichen sollten, musste die Probenentnahme auch vor Entwicklung eben dieser Symptomatik erfolgen. Damit war das prospektive Design praktisch durch die Fragestellung vorgegeben. Ein weiteres Argument für ein prospektives Design war die angestrebte Strukturgleichheit der kein-SIRS und SIRS Gruppen – durch die Unkenntnis der Gruppenzugehörigkeit zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses war das Risiko einer Verfälschung der Ergebnisse durch eine bekannte oder unbekannte, unkontrollierte konfundierende Variable (Stichprobenverzerrung, selection-bias) auch seitens der Durchführenden der Studie (Investigator-bias) minimiert [78]. Das Risiko der systematischen Verzerrung (Bias) durch die Tatsache, dass Patienten vor Studieneinschluss schriftlich aufgeklärt wurden und abhängig vom persönlichen Hintergrund und sozialen Faktoren eher zustimmten, oder eben nicht, darf bei der vorliegenden Studie als wenig relevant betrachtet werden [79].

Nachteilig bei dem gewählten Studiendesign hingegen war die zwangsläufig resultierende ungleiche Gruppengröße der kein-SIRS und SIRS Gruppen, da ja nur eine Minderheit der Patienten nach kardialen Operationen ein SIRS entwickelt. Alle evaluierten und aufgeklärten Patienten zu analysieren hätte bedeutet sechzehn Kontrollgruppenpatienten vollumfänglich zu messen was hinsichtlich der materiellen, und damit auch finanziellen Ressourcen sehr aufwendig gewesen wäre. Entsprechend wurden aus den sechzehn Kontrollgruppenpatienten nach Akquise der Proben und unter Kenntnis der Gruppenzugehörigkeit fünf Patienten im Sinne eines „matchings“ ausgewählt und als kein-SIRS Gruppe analysiert. Beim „matching“, also der gezielten Auswahl von Kontrollgruppenpatienten anhand demographischer Kriterien,

Risikofaktoren und Nebenerkrankungen handelt es sich um ein zwar nicht optimales, aber praktikables und akzeptiertes Verfahren zur Kontrolle konfundierender Variablen (Bias) in Beobachtungsstudien [80, 81].

Bei den eingesetzten analytischen Methoden (immunologische und biochemische Verfahren) handelt es sich ausnahmslos um etablierte und validierte Testverfahren. Es wurden keine Modifikation an den standardisierten Protokollen der Hersteller vorgenommen. Hierdurch wurde eine methodische Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit für zukünftige Untersuchungen geschaffen. Für alle durchgeführten Messungen bestehen naturgemäß Nachweisgrenzen (Sensitivität) der Analyten im Plasma, diese sind im Methodenteil dieser Arbeit jeweils angegeben (siehe dort). Im Falle der Analyten IL2 und IFN γ wurden die methodenbedingten Nachweisgrenzen in einer Mehrzahl der Proben unterschritten, d.h. es wurden keine verwertbaren Plasmakonzentrationen gemessen. Entsprechend wurde auf die weitere Auswertung und Interpretation der Daten dieser beiden Analyten verzichtet.

Eine wesentliche methodische Herausforderung stellte die große interindividuelle Streubreite der einzelnen Plasmakonzentrationen insbesondere bei den Interleukinen dar. Es ist durchaus bekannt, dass es bei diesen Messwerten große (um den Faktor drei) interindividuelle Differenzen gibt [82-85], entsprechend schwierig ist auch die Definition von Normwerten und die Interpretation einzelner Messwerte. Wir begegneten diesem Problem indem wir die Messwerte an den postoperativen Tagen auf den jeweils patientenindividuellen Messwert zum präoperativen Zeitpunkt normierten.

4.2 Diskussion des SIRS Begriffes und seiner Definition vor dem Hintergrund der durchgeführten Analysen

Ein grundsätzliches methodisches Problem in der Erforschung prädiktiver biochemischer Marker eines SIRS stellt die problematische Definition des Krankheitsbildes entsprechend der ACCP/SCCM-Konsensuskonferenz [2, 3], insbesondere aus kardiochirurgisch-postoperativer Sicht dar (Siehe auch Kapitel 1.3). Wie bereits in der Einleitung dargestellt sind die Parameter Atemfrequenz, PaCO₂ und Herzfrequenz früh-postoperativ schlecht zu

verwerten da viele Patienten zu diesem Zeitpunkt noch intubiert sind bzw. unter bradykardisierender Medikation, unter Umständen sogar unter Herzschrittmachertherapie stehen. Die Leukozytose als definierender Parameter ist hingegen in der postoperativen Phase (Postaggressionsstoffwechsel) sehr unspezifisch und damit auch eingeschränkt zu verwerten. Dieses definitorische Problem erschwert natürlich auch die Interpretation unserer Daten. Insbesondere mit Blick auf die spezifischen Anforderungen einer robusteren SIRS Diagnose im Bereich der posttraumatischen und postoperativen Intensivmedizin [8, 9, 86] wurden Vorschläge gemacht die Diagnose eines SIRS viel mehr an intensivmedizinische Parameter wie Katecholaminbedarf und Laktatazidose zu binden was ja auch der gelebten, alltäglichen klinischen Praxis entspricht. Aus ähnlichen Überlegungen heraus wurde vorgeschlagen die SIRS Kriterien nur dann als solche zu werten wenn sie länger als sechs Stunden bestehen [26], was aber dem Gebot zur raschen Therapie gewissermaßen widerspricht [22, 23]. Ein anderes aktuell diskutiertes Konzept zur klinischen Erfassung und Stratifizierung akuter systemischer Erkrankungen infolge von Infekten und anderen Auslösern ist PIRO (predisposition, insult/infection, response, organ dysfunction) [87, 88]. Dieses Modell erfasst erstmals auch prädisponierende Risikofaktoren für das Entstehen einer akuten Kreislaufdekompensation infolge eines Akutereignisses, jedoch wurde auch PIRO bereits hinsichtlich mangelnder prognostischer Nutzbarkeit kritisiert [89].

Zusammenfassend ist davon auszugehen das es weitere Diskussionen und definitorische Revisionen des SIRS- und Sepsis Begriffes geben wird [9]. Entsprechend werden neuere biologische Marker und Laborwerte des SIRS auch erneut an diesen revidierten Definitionen evaluiert werden müssen [88]. In dieser Studie bezogen wir uns unter Kenntnis der Vor- und Nachteile konsequent und ausschließlich auf die aktuell klinisch wie wissenschaftlich geltende Definition der ACCP / SCCM-Konsensuskonferenz [2, 3] (siehe auch Kapitel 1.1).

Mit Blick auf das Thema klinischer Risikofaktoren für ein SIRS erscheint bemerkenswert, dass die fünf Patienten die ein postoperatives SIRS entwickelten nicht älter waren als das Durchschnittsalter aller 21 prospektiv evaluierten Patienten. Im Gegenteil, die SIRS Patienten waren mit einem Durchschnittsalter von 61,4 Jahren jünger als die Gesamtkohorte mit 69 Jahren (nicht signifikant). Dies ist insofern bemerkenswert als das für die meisten postoperativen Komplikationen nach Herzoperationen eine Korrelation zu erhöhtem Lebensalter besteht, was aber beim SIRS nicht der Fall zu sein scheint.

Bemerkenswert war allerdings ein mit im Mittel mit 96 kg deutlich höheres Körpergewicht der SIRS Patienten – und einem deutlich höheren Anteil an Adipositas Patienten in der SIRS Gruppe im Vergleich zum Gesamtkollektiv. Auch in der Literatur ist beschrieben, dass adipöse Menschen mit kritischen Erkrankungen und in Intensivtherapie deutlich zu einem SIRS neigen [90]. Sicherlich können aus unseren Patientenzahlen diesbezüglich keine endgültigen Schlüsse gezogen werden, dennoch wäre es sinnvoll weiter zu untersuchen inwiefern eine Adipositas das Risiko für die Entwicklung eines postoperativen SIRS begünstigt, beziehungsweise inwieweit die bekanntermaßen schlechtere Prognose stark adipöser Patienten nach kardialen Operationen durch den Pathomechanismus eines SIRS vermittelt ist.

Ebenso nicht Zielkriterium dieser Studie aber dennoch erwähnenswert ist die gegenüber den kein-SIRS Patienten massiv verlängerte Hospitalisationsdauer der SIRS Patienten. Neben dem evidenten medizinischen- und prognostischen Problem welches durch das unvorhergesehene Auftreten eines postoperativen SIRS entsteht weist dies auch auf eine relevante medizinökonomische Bedeutung hin.

4.3 Konzentrationsverläufe potentieller Marker eines SIRS im postoperativen Verlauf nach Herzoperationen

In der vorliegenden Studie untersuchten wir den diagnostischen Wert einer Reihe von Plasmamolekülen hinsichtlich der Vorhersage eines sich entwickelnden SIRS in der spezifischen postoperativen Situation nach einem

kardiochirurgischen Eingriff. Einerseits wurden mit CRP und PCT bekannte, in der klinischen Diagnostik etablierte Parameter untersucht. Andererseits wurden solche Plasmamarker in dieser Studie analysiert für die aus der Literatur eine Assoziation mit dem Krankheitsbild der Sepsis bekannt ist oder für die aus pathophysiologischen Überlegungen heraus eine Rolle im SIRS plausibel erscheint. In der Einleitung dieser Arbeit wurden die einzelnen untersuchten Plasmamoleküle hinsichtlich ihres pathophysiologischen Hintergrundes und Funktion besprochen (Kapitel 1.5).

Grundsätzlich lassen sich die gefundenen Konzentrationsverläufe der untersuchten Plasmaparameter in drei Gruppen einteilen:

- 1) Parameter für die anhand der gewonnenen Daten keine Aussage über ihre Bedeutung im SIRS getroffen werden kann (Indifferente Ergebnisse).
- 2) Parameter die keine Differenzierung zwischen kein-SIRS und SIRS Patienten zulassen und die damit nicht diagnostisch nutzbar sind.
- 3) Parameter die eine Differenzierung zwischen kein-SIRS und SIRS Patienten zulassen und die damit diagnostisch genutzt werden könnten.

Diese drei Gruppen werden im Folgenden jeweils separat besprochen.

4.4 Parameter für die anhand der gewonnenen Daten keine Aussage über ihre Bedeutung im SIRS getroffen werden kann

Interferon γ und **IL2** lagen in ihren Konzentrationen in praktisch allen Proben unter der Nachweisgrenze des Multiplex-bead-based-Immunoassays. Über ihre Konzentrationsverläufe kann also letztlich aufgrund unserer Daten keine Aussage getroffen werden. Es ergeben sich jedoch keine Hinweise, dass IFN γ oder IL2 in der Diagnostik eines SIRS nutzbar wären.

Aus immunologischer Sicht ist es nicht wesentlich erstaunlich, dass IL2 und IFN γ nicht in den ersten Tagen einer akuten Immunreaktion ansteigen da es sich um die klassischen Aktivatoren der spezifischen, lymphozytären Immunität handelt. Der klassische Auslöser der IL2 und IFN γ Ausschüttung ist die Aktivierung von T-Helferzellen durch das MHC-II-Molekül der

antigenpräsentierenden Zellen – ein Prozess der mehrere Tage in Anspruch nimmt [29, 36, 37].

Für die Bewertung der Bedeutung von $\text{IFN}\gamma$ und IL2 im SIRS sind weitere Studien notwendig.

4.5 Parameter die keine Differenzierung zwischen kein-SIRS und SIRS Patienten zulassen und die damit nicht diagnostisch nutzbar sind

Die zweite Gruppe von Parametern umfasst Solche, die in beiden Untersuchungsgruppen, also der kein-SIRS und der SIRS Gruppe gleichsinnig verändert waren. Die Konzentrationsänderungen sind am ehesten eine Reaktion auf den Reiz der Operation, sind aber hinsichtlich der Differenzierung der kein-SIRS und SIRS Gruppe nicht hilfreich. In diese Gruppe fallen die klassischen etablierten Entzündungsparameter **Procalcitonin** und **C-reaktives Protein**, obwohl sie zumindest bei der Sepsis als frühe- [91] und prognostische Verlaufparameter [92-94] gelten. Ebenso in diese Gruppe fallen **IL6**, **IL8** und **TNF α** . All diese Parameter zeigten in der Frühphase nach der Operation in allen Patienten einen steilen Konzentrationsanstieg allerdings ohne dass ein relevanter Unterschied zwischen kein-SIRS und SIRS Gruppe bestand. IL6 und IL8, die beide als sensitive Sepsis-Marker gelten, zeigten auch in Arbeiten anderer Untersucher deutlich geringere Plasmaspiegel im SIRS [95].

Auch die **cfDNA** fällt in diese Gruppe: zwar findet sich ein postoperativer Konzentrationsanstieg in beiden Studiengruppen, in der kein-SIRS Gruppe als Trend sogar etwas stärker ausgeprägt als in der SIRS Gruppe. Allerdings ergab sich hieraus keine Differenzierungsmöglichkeit. Zwar existieren Berichte, dass die cfDNA in Sepsis-Patienten erhöht ist und auch mit der Schwere der Erkrankung korreliert [66, 67], dies konnten wir jedoch für das Szenario des postoperativen SIRS in unserer kleinen Kohorte nicht nachweisen.

Bei allen vorgenannten Molekülen muss postuliert werden, dass die postoperative Konzentrationssteigerung unspezifische Folge des Postaggressionsstoffwechsels ist, eine Assoziation mit einem entstehenden SIRS kann aufgrund unserer Daten nicht postuliert werden.

Weniger eindeutig fällt die Interpretation der Konzentrationsverläufe der Proteine sCD163 und Endocan aus:

Das **sCD163** zeigte eine deutliche Tendenz zu erhöhten relativen Plasmakonzentrationen in der SIRS im Vergleich zur kein-SIRS Gruppe. Statistische Signifikanz wurde jedoch aufgrund der großen Streubreite der Werte nicht erreicht: Zwei Patienten zeigten kaum eine Erhöhung der Konzentrationen wohingegen drei Patienten deutliche Konzentrationssteigerungen um den Faktor 1,5 bis 2 zeigten. Eine heterogene Pathophysiologie und Klinik des SIRS vorausgesetzt, rechtfertigt dies aus unserer Sicht mindestens die weitere klinische Evaluation dieses Parameters mit größeren Patientenzahlen, zumal aus anderen inflammatorischen Krankheitsbildern sCD163-Erhöhungen bekannt sind [45-50]. Jedoch können wir aufgrund der bislang vorliegenden Daten keine diagnostische Nutzbarkeit des sCD163 konstatieren.

Genau andersherum verhielt es sich beim **Endocan**: Für diesen Parameter konnte zwar auch in beiden Gruppen ein Konzentrationsanstieg zum Zeitpunkt Operationsende gemessen werden, jedoch fiel dieser in der kein-SIRS Gruppe deutlich stärker aus und erreichte statistische Signifikanz, wohingegen in der SIRS Gruppe kein statistisch signifikanter Konzentrationsanstieg zu sehen war. Da die Konzentrationsverläufe in der kein-SIRS und SIRS Gruppe sich zwar quantitativ aber nicht qualitativ unterschieden und die Größe unserer Patientengruppen zu klein war um derart geringe Unterschiede sicher zu detektieren, können wir Endocan bislang nicht als Prädiktor eines SIRS bestätigen. Jedoch wäre auch für Endocan die Untersuchung in einer größeren Studie sinnvoll. Die tendenziell höheren Endocan-Werte in der kein-SIRS Gruppe würden allerdings eher einen protektiven Effekt des Endocan hinsichtlich der Ausbildung eines SIRS nahelegen, was nicht mit der Literatur korrespondiert. Endocan wird von klassischen proinflammatorischen Zytokinen IL1 β und TNF α hochreguliert [60, 62]. In den hier erhobenen Daten korrespondierten die Konzentrationsverläufe von IL1 β (Konzentrationsanstieg in der SIRS-Gruppe), TNF α (kein Unterschied in den Konzentrationsverläufen zwischen kein-SIRS und SIRS-Gruppe) und Endocan (Konzentrationsanstieg in

der kein-SIRS Gruppe) allerdings nicht. Klinisch ist Endocan als Marker der Sepsis beschrieben [61, 64, 65] und seine Spiegelhöhe war prädiktiv für eine negative Prognose [96, 97]. Die aufgeführten Arbeiten haben jedoch keine Kontrollgruppe, sondern beziehen sich lediglich auf Längsschnittverläufe von Sepsis Patienten. Aus unserer Sicht sollten weitere Untersuchungen die exakte Bedeutung des Endocan im postoperativen Verlauf nach kardiochirurgischen Operation untersuchen.

Auch der **Monozyten-Aktivations-Test** (MAT) [68-70] lässt in seinem Ergebnis keine eindeutige Differenzierung zwischen der kein-SIRS und der SIRS Gruppe zu. Dennoch ist seine Interpretation insbesondere mit Blick auf die Pathogenese des SIRS interessant. In beiden Untersuchungsgruppen nimmt interessanterweise die Reaktivität der Monozyten zum Ende der Operation hin ab, d.h. die monozytäre IL1 β Ausschüttung nach Stimulation erreicht ein Minimum – und dies zu einem Zeitpunkt an dem der IL1 β Plasmaspiegel der Patienten jeweils am höchsten war. Für diese Diskrepanz aus hohen bestehenden IL1 β Plasmaspiegeln und niedriger Monozytenreaktivität gibt es zunächst keine uns bekannte Erklärung, uns sind keine Arbeiten zu diesem Thema bekannt. Möglich wäre aber ein Erschöpfungseffekt der Monozyten zum Zeitpunkt des Operationsendes nach massiver intraoperativer Aktivierung der IL1 β Produktion. Dies würde die fehlende Stimulierbarkeit und die zeitgleich hohen Plasmaspiegel erklären. Eine postoperative klinisch relevante Immunsuppression ist ein bekanntes Phänomen [98]. Jüngere Studien widmen sich gezielt der Analyse der zellulären und molekularen Mechanismen dieser postoperativen Immunsuppression [99-101], allerdings sind uns keine Studien bekannt die die Anergie bzw. die Reaktivität der Monozyten postoperativ untersucht haben [102, 103]. In der SIRS Gruppe ist die Anergie der Monozyten zum Zeitpunkt Operationsende relativ noch stärker ausgeprägt als in der kein-SIRS Gruppe. Gegensinnig verhält sich der IL1 β Spiegel, dieser ist in der SIRS Gruppe zum gleichen Zeitpunkt relativ gesehen signifikant höher (Abbildungen 9 und 23). In den folgenden Tagen besteht eine Tendenz zu einer rascheren Erholung oder Wiederzunahme der Reaktivität der Monozyten in der SIRS Gruppe. Die Physiologie der Monozyten und anderer Immunzellen im

postoperativen Verlauf sollte weiter spezifisch studiert werden um zu einem besseren Verständnis der zellulären und molekularen Abläufe im postoperativen SIRS und der Sepsis zu kommen und um damit letztlich neue therapeutische Angriffspunkte zu definieren.

4.5 Parameter die eine Differenzierung zwischen kein-SIRS und SIRS Patienten zulassen und damit diagnostisch genutzt werden könnten.

In die dritte Gruppe fallen die Parameter die eine Differenzierung zwischen kein-SIRS und SIRS Gruppe zulassen. Dieses waren die Proteine sTREM-1, IL1 β und IL10.

Der Parameter **sTREM-1** zeigte einen sehr bemerkenswerten Konzentrationsverlauf: In Patienten der kein-SIRS Gruppe, also in solchen die im späteren postoperativen Verlauf kein SIRS entwickelten, war der Parameter präoperativ sowie in den Messungen am Ende der Operation sowie am ersten postoperativen Tag gar nicht nachweisbar. In den Patienten der SIRS Gruppe hingegen war der Parameter sTREM-1 bereits präoperativ in deutlich höherer Konzentration nachweisbar und zeigte nach der Operation nochmals eine signifikante Konzentrationssteigerung. Damit zeigt sich sTREM-1 in unseren Daten als Parameter zur Unterscheidung von kein-SIRS und SIRS Patienten. Der präoperative Nachweis von sTREM-1 war ein deutlicher Prädiktor der postoperativen Ausbildung eines SIRS. Dies ist bislang nicht vorbeschrieben. Grundsätzlich sind unsere Ergebnisse damit kongruent mit Arbeiten anderer Autoren [39-41] die den sTREM-1 Spiegel als Marker der Krankheitsschwere in der Sepsis und als Prädiktor von Komplikationen nach kardialen Operationen sahen. sTREM-1 ist somit ein vielversprechender frühpostoperativer Marker eines sich entwickelnden SIRS. Bereits präoperativ nachweislich erhöhten sTREM-1 Werte würden abseits sonstiger klinischer Marker erstmals auch eine präoperative Stratifizierung hinsichtlich des Risikos eines postoperativen SIRS ermöglichen. Dies sollte- und wird in einer größer konzipierten prospektiven Studie spezifisch untersucht werden. Anders als bei den folgend diskutierten Parametern IL1 β und IL10 kann für sTREM-1 zukünftig möglicherweise sogar ein absoluter Grenzwert definiert werden.

Unterschiedliche Konzentrationsverläufe in der kein-SIRS und SIRS Gruppe und damit diagnostische Verwendbarkeit zeigten die Interleukine IL1 β und IL10. Die Absolutwerte der **IL1 β -Plasmakonzentrationen** sind in ihrer Interpretation zunächst problematisch: Einerseits besteht bekanntermaßen eine große interindividuelle Streubreite des Parameters [104], dies zeigte sich auch in unseren Messungen (siehe Abbildung 8). Andererseits bestanden zu keinem Zeitpunkt in unseren Daten eindeutig pathologische Absolutwerte: In der Literatur werden sehr unterschiedliche Werte [85] als Referenz für einen IL1 β Normwert genannt, in der sicherlich zuverlässigsten Arbeit diesbezüglich finden sich Normwerte in der Größenordnung 0,2 bis 0,6 pg/mL, maximal jedoch bis 1,0 pg/ml [84, 105], in einer anderen Arbeit bis höchstens 5,0 pg/ml [83]. Gemessen an diesen Referenzwerten kam es in unserer Studie zu keinem Zeitpunkt zur Ausbildung eindeutig pathologischer Werte, die gemessenen Werte bewegten sich in praktisch allen Fällen zwischen 0,5 und 2 pg/ml (Siehe Abbildung 8). Die höchsten gemittelten Konzentrationen wurden in beiden Gruppen mit 2,41 pg/ml und 2,05 pg/ml zum Zeitpunkt Operationsende gemessen.

Aussagekräftiger als die absoluten Plasmakonzentrationen und damit klinisch verwendbar erscheinen jedoch **intraindividuelle Konzentrationsverläufe** des **IL1 β** . Im postoperativen Konzentrationsverlauf des IL1 β kommt es zum Zeitpunkt Operationsende in der SIRS Gruppe zu einem signifikanten Konzentrationsanstieg um das Dreifache des präoperativen Ausgangswertes. Dieser Anstieg ist in der kein-SIRS Gruppe nicht zu verzeichnen und wäre zumindest potentiell diagnostisch nutzbar. Dieser Konzentrationsverlauf ist unter Kenntnis der zentralen Funktion des IL1 β als Botenstoff einer akuten Inflammation [28] auch gänzlich plausibel. Zur praktisch klinischen Nutzung müsste allerdings ein präoperativer Ausgangswert erhoben werden und letztlich ein IL1 β Konzentrationsprofil erstellt werden. Auch für die Sepsis wurde schon auf die prognostische Bedeutung von IL1 β Profilen hingewiesen [106]. Zum Zeitpunkt Operationsende war die IL1 β Konzentration im Plasma der SIRS Patienten um den Faktor 3,3 höher als bei Aufnahme, bei den kein-SIRS

Patienten lediglich um den Faktor 1,5. Eine intraindividuelle Steigerung des IL1 β Wertes am Ende der Operation um den Faktor ≥ 2 weist vor dem Hintergrund der hier präsentierten Daten auf die spätere Entwicklung eines SIRS hin. Es sind weitere detailliertere und größer angelegte Studien notwendig um diese Hypothese zu untermauern.

Auch einen unterschiedlichen Konzentrationsverlauf zwischen kein-SIRS und SIRS Gruppe fand sich beim **IL10**. Die absoluten IL10 Konzentrationen sind ähnlich wie schon beim vorangehend besprochenen IL1 β nur eingeschränkt zu werten: in wesentlichen Arbeiten wird die obere Grenze eines normalen IL10 Spiegels mit 3 pg/ml angegeben [107, 108], die MAYO-Klinik in Rochester, Minnesota legt die IL10 Normalwertobergrenze bei 2 pg/ml fest, andere, ebenso große Arbeiten berichten Normalwerte in der Größenordnung bis 15 pg/ml [82]. Diese Werte vorausgesetzt ergaben sich in den präoperativen Blutabnahmen beider Gruppen jeweils physiologische Werte in der Größenordnung von < 2 pg/ml, ab dem Zeitpunkt Operationsende bestanden in beiden Gruppen, kein-SIRS und SIRS jeweils pathologische Werte > 5 pg/ml. Diese Absolutwerte sind also zur Vorhersage eines sich entwickelnden SIRS zunächst einmal nicht geeignet. Allerdings setzte sich der Konzentrationsanstieg des IL10 in der kein-SIRS Gruppe am ersten postoperativen Tag weiter fort wohingegen er in der SIRS Gruppe wieder abfiel. Dieser IL10 Konzentrationsverlauf ist im Einzelfall sicherlich sehr schwierig diagnostisch nutzbar, da hierfür einerseits die Erstellung eines individuellen IL10 Profils notwendig wäre, andererseits eine Entscheidung auf Basis des IL10 erst frühestens am zweiten postoperativen Tag getroffen werden könnte was verglichen mit dem TREM-1 und dem IL1 β spät wäre. Der Befund ist allerdings von pathogenetischem Interesse da ja IL10 zu den wesentlichen antiinflammatorischen Interleukinen zählt [34]. Die überschießende Produktion von IL1 β als proinflammatorisches Zytokin und die verminderte Produktion von IL10 wäre ein Erklärungsansatz für die überschießende Reaktion des Immunsystems. Bei näherer Betrachtung ist jedoch problematisch, dass an den postoperativen Tagen die absoluten Konzentrationen von IL10 in unserer kein-SIRS Gruppe tendenziell wieder

geringer waren als in unserer SIRS Gruppe, sodass die vorgenannte Hypothese nicht problemlos bestätigt werden kann.

Es ist aus der Literatur bekannt dass in der Sepsis [109] und auch im SIRS [110] hohe IL10 Spiegel bestehen. Die Tatsache, dass IL10 als wesentliches antiinflammatorisches Zytokin in der Sepsis gleichzeitig mit proinflammatorischen Zytokinen wie IL1 β und IL6 hochreguliert ist, weist darauf hin, dass vom ersten Moment der SIRS/Sepsis nicht einfach eine überschießende Stimulation des Immunsystems sondern vielmehr eine komplexe Dysregulation der einzelnen Botenstoffe vorliegt [110]. „Gas und Bremse“ werden gewissermaßen gleichzeitig aktiviert.

Das Verhältnis der verschiedenen Zytokine zueinander mag eine wesentliche Rolle in der komplexen Regulation der Immunantwort spielen. Abbildung 24 zeigt den Quotienten aus den absoluten Plasmakonzentrationen von IL1 β und IL10 an den verschiedenen Messzeitpunkten in den beiden Gruppen. Es wird deutlich, dass sich in der kein-SIRS Gruppe die Konzentrationen von IL1 β und IL10 an den meisten Messzeitpunkten, nämlich präoperativ sowie an den postoperativen Tagen 2-8 praktisch die Waage halten. Der Quotient ist praktisch 1,0, die Plasmakonzentrationen von IL1 β und IL10 sind also gleich. Eine Ausnahme hierbei stellen die Messzeitpunkte Hautnaht und postoperativer Tag 1 dar, hier liegt ein geringer relativer IL1 β Überschuss auch in der kein-SIRS Gruppe vor, der Quotient liegt bei <1. In der SIRS Gruppe hingegen lag der Quotient von IL1 β zu IL10 zu jedem Zeitpunkt der Studie bei rund 0,5, teilweise noch deutlich darunter.

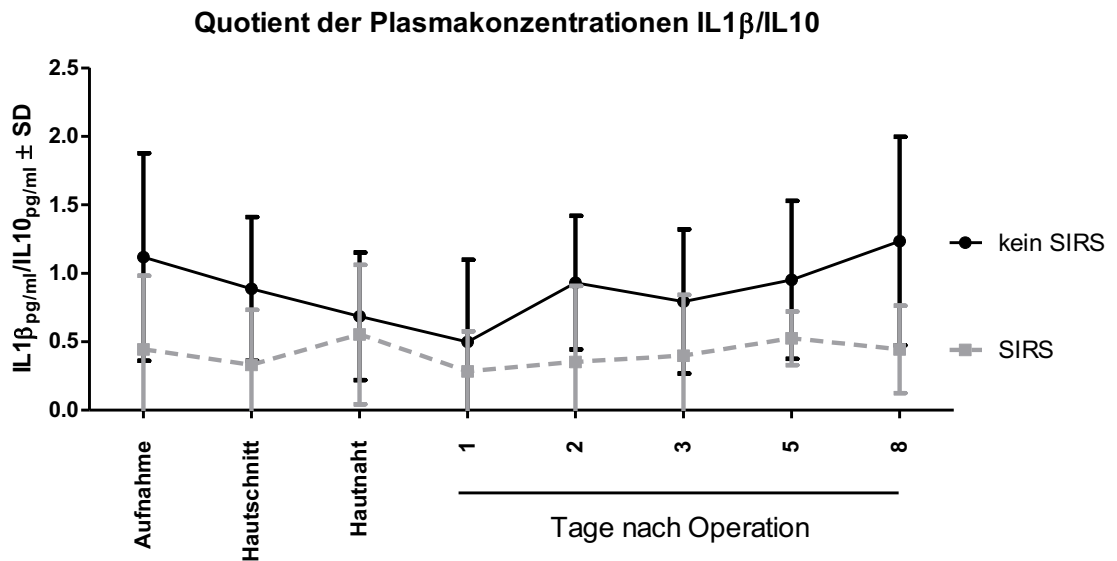


Abbildung 24: Quotient der Plasmakonzentrationen von IL1 β /IL10 in der kein-SIRS und der SIRS Gruppe. Gezeigt werden Mittelwerte der beiden Gruppen \pm SD. Differenzen im Kruskal-Wallis mit Dunn's Multiple Comparison post hoc Test nicht signifikant.

Es bestand also zu jedem Zeitpunkt ein relativer Überschuss an IL1 β . In unseren vergleichsweise kleinen Kohorten erreichten die Differenzen allerdings keine Signifikanz.

Bei dieser Gegenüberstellung zweier Zytokine handelt es sich zwar nur um eine Kombination aus vielen Möglichen, es bestehen ja allein über 30 Interleukine und die Gruppe der Zytokine umfasst noch sehr viel mehr Botenstoffe. Dennoch ist die Analyse derartiger Interaktionen und Konzentrationsverhältnisse einerseits sicherlich zielführend für das weitere Verständnis der Physiologie und Pathophysiologie des Immunsystems, andererseits sind sie potentiell auch diagnostisch nutzbar, eine entsprechende Infrastruktur zur Erstellung von patientenindividuellen Zytokinprofilen vorausgesetzt. Zukünftige Studien werden sich mit den Interaktionen und den Konzentrationsverhältnissen der Zytokine im Allgemeinen – und mit der Bedeutung des IL1 β /IL10 Quotienten im speziellen befassen.

Die intra- und frühpostoperativen Konzentrationsverläufe von IL1 β , IL10 und sTREM-1 weisen darauf hin, dass im Szenario einer Herzoperation bereits zum intraoperativen Zeitpunkt, zumindest aber zum Operationsende eine Imbalance pro- und antiinflammatorischer Faktoren bestehen kann die pathogenetisch sehr wahrscheinlich in das spätere Entstehen des klinischen Symptomenkomplexes SIRS involviert ist. Die genannten Parameter und ihr Verhältnis zueinander stellen eine neue diagnostische und prognostische Möglichkeit des postoperativen SIRS nach herzchirurgischen Operationen dar.

4.6 Konklusion und Ausblick:

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die Spiegel der Plasmaproteine sTREM-1 und IL1 β zu einer früheren Identifizierung von Patienten mit hohem Risiko für ein postoperatives SIRS nach herzchirurgischen Operationen beitragen können. Hierbei handelt es sich um eine neue, bisher nicht vorbeschriebene Erkenntnis. Die in der Einleitung dieser Arbeit entsprechend formulierte Hypothese (Kapitel 1.4) konnte also bestätigt werden. In Folge dieser Arbeit werden entsprechende größer angelegte Studien zur Verifikation dieses Befundes durchgeführt werden.

Weiter wurden in dieser Studie Daten gewonnen die eine Rolle der Monozytenaktivität, des IL10 Spiegelverlaufes und des Quotienten aus IL1 β und IL10 in der Pathogenese des SIRS nahelegen. Es wurden folgende experimentell begründete Hypothesen generiert: a) In der Frühphase eines sich entwickelnden postoperativen SIRS besteht eine profunde Anergie der Monozyten die sich in der Folge wieder, eventuell auch überschießend, erholt. b) In SIRS Patienten liegen deutlich niedrigere IL1 β /IL10 Quotienten vor. Diese Hypothesen müssen und werden in Folgestudien untersucht werden.

Das SIRS ist keine einheitliche Pathologie im Sinne einer klassischen Krankheit, es handelt sich vielmehr um einen Symptomenkomplex der zustande kommt durch eine in ihrer Endstrecke gleichförmige überschießende Reaktion

des Immunsystems auf einen exogenen Reiz der nicht immer bekannt sein muss. Es ist zum jetzigen Kenntnisstand durchaus denkbar, dass sich unter dem Begriff SIRS mehrere in ihrer Pathogenese unterschiedliche Krankheitsabläufe verbergen.

Die große interindividuelle Streubreite der Interleukinspiegel einerseits und die zumindest potentiell interindividuell durchaus heterogene Pathogenese des Symptomenkomplex SIRS andererseits lassen es möglich erscheinen, dass die zukünftige laborbasierte Diagnose eines SIRS sich ebenso nicht an einem Wert festmachen lässt, sondern vielmehr ein „Profiling“ mehrerer Parameter, inclusive der Berücksichtigung ihres Verhältnisses zueinander umfasst. So wäre es denkbar, einen Score zu evaluieren, welcher IL1 β , IL10, den Quotienten aus beiden Werten sowie das sTREM-1 und eventuell noch weitere Werte umfasst.

Bestünde die Möglichkeit die Entstehung eines SIRS zu prognostizieren, so würde sich die Frage nach einer Therapie bzw. medikamentösen Prophylaxe anschließen. Inwieweit die Applikation von bekannten steroidal- und nichtsteroidal-antiinflammatorischen Medikamenten im prophylaktischen Szenario sinnvoll ist, muss sodann in zukünftigen Studien untersucht und bewertet werden. Sicherlich wäre die zuverlässige Prognostizierbarkeit eines postoperativen SIRS auch ein wesentlicher Stimulus für die pathophysiologische Forschung und für die konsequente Entwicklung neuer, zielgerichteter Pharmaka.

5. Zusammenfassung:

Das systemische inflammatorische Response-Syndrom (systemic inflammatory response syndrome), kurz SIRS (ICD-10 R65) ist ein klinischer Symptomenkomplex infolge einer Entzündungsreaktion des gesamten Körpers. Verschiedene Stimuli, unter anderem kardiale Operationen, können ein SIRS auslösen. Die Entwicklung eines SIRS stellt einen wesentlichen Faktor der Mortalität und Morbidität nach Operationen an der Herz-Lungen-Maschine dar, die frühzeitige Diagnosestellung ist aber durch mangelnde Verwendbarkeit der SIRS-definierenden Symptome im postoperativen Szenario erschwert. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Laborparameter zu identifizieren, die eine frühzeitige SIRS Diagnose abseits der klinischen Parameter ermöglichen.

Der Konzentrationsverlauf folgender Parameter wurde im perioperativen Verlauf um eine Herzoperation herum in dieser Arbeit untersucht: IL1 β , IL2, IL6, IL8, IL10, IFN- γ und TNF α , sTREM-1, sCD163 und Endocan sowie cfDNA und die Reaktivität der Monozyten. Der Patienteneinschluss in die Studie sowie die Probenentnahme erfolgten prospektiv, insgesamt wurden 21 Patienten in die Studie eingeschlossen. Fünf Patienten entwickelten ein SIRS, die Konzentrationsverläufe o.g. Parameter dieser Patienten wurden mit denen von fünf ausgewählten (matching) Patienten, die kein SIRS entwickelten (kein-SIRS Gruppe), verglichen. Blutproben, präoperativ sowie von mehreren Postoperativen Zeitpunkten wurden mittels multiplex-bead-based Immunoassay, ELISA, PicoGreen-DNA-Nachweis und Monozytenaktivierungstest (MAT) untersucht.

Die Zytokine IL2 und IFN- γ konnten in beiden Studiengruppen aufgrund zu geringer Plasmakonzentrationen praktisch nicht bestimmt werden, über sie kann keine Aussage getroffen werden. Die Parameter IL2, IL6, IL8, TNF α , sCD163, Endocan sowie cfDNA zeigten analysierbare Konzentrationsverläufe in beiden Gruppen, zumeist kam es postoperativ zu deutlichen Konzentrationsanstiegen, zum Teil auch zu Konzentrationsabfällen. Jedoch waren die Konzentrationsänderungen in beiden Untersuchungsgruppen qualitativ gleichsinnig und die quantitativen Unterschiede gering, sodass

genannte Parameter nicht zur Differenzierung zwischen kein-SIRS und SIRS Patienten geeignet sind.

Die Reaktivität der Monozyten im Monozyten-Aktivierungs-Test war in beiden Studiengruppen zum Operationsende deutlich herabgesetzt, die Anergie war in der SIRS Gruppe jedoch profunder. Dieser Befund kann zwar auch nicht zur Differenzierung der Gruppen dienen, ist aber von pathogenetischem Interesse. Der Parameter sTREM-1 war in der SIRS Gruppe zu jedem Zeitpunkt, präoperativ- und früh postoperativ höher exprimiert als in der kein-SIRS Gruppe, zudem ergab sich in der SIRS Gruppe eine nochmalige Konzentrationserhöhung am Operationsende. sTREM-1 ermöglicht also eine Differenzierung zwischen kein-SIRS und SIRS-Gruppe und ist zumindest potentiell diagnostisch und prognostisch nutzbar.

Die Interleukine IL1 β und IL10 zeigten zwar keine eindeutig pathologischen und damit diagnostisch verwertbaren absoluten Konzentrationen, jedoch waren die Konzentrationsverläufe über den Untersuchungszeitraum zwischen der kein-SIRS und SIRS Gruppe deutlich unterschiedlich. IL1 β als zentrales proinflammatorisches Zytokin zeigte zum Zeitpunkt Operationsende einen signifikanten Konzentrationsanstieg in der SIRS Gruppe der in der kein-SIRS Gruppe in dieser Weise nicht nachweisbar war. Auch das anti-inflammatorische Zytokin IL10 zeigte zum Operationsende einen Konzentrationsanstieg der sich im Weiteren in der kein-SIRS Gruppe noch fortsetzte während es in der SIRS Gruppe zu einem Abfall der Konzentrationen kam. Der Quotient aus IL1 β und IL10 war über den gesamten Untersuchungszeitraum zwischen der kein-SIRS Gruppe (ca. 1,0) und der SIRS Gruppe ($\leq 0,5$) unterschiedlich.

Zukünftige Studien werden die diagnostische Wertigkeit der in dieser Arbeit identifizierten Parameter sTREM-1 und IL1 β , sowie die Möglichkeiten der Erstellung individueller Konzentrationsprofile und der daraus resultierenden diagnostischen Möglichkeiten zur Früherkennung eines SIRS überprüfen. Zudem sollte die pathogenetische Bedeutung der tiefen Monozytenanergie und der auffälligen IL1 β /IL10-Quotienten weiter untersucht werden um ein tieferes Verständnis der molekularen Pathogene des SIRS zu gewinnen.

6. Literatur

- [1] Reinhart K, Brunkhorst FM, Bone HG, Bardutzky J, Dempfle CE, Forst H *et al.* *Prevention, diagnosis, therapy and follow-up care of sepsis: 1st revision of S-2k guidelines of the German Sepsis Society (Deutsche Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG)) and the German Interdisciplinary Association of Intensive Care and Emergency Medicine (Deutsche Interdisziplinäre Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI)).* Ger Med Sci 2010;**8**:Doc14.
- [2] Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA *et al.* *Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine.* Chest 1992;**101**:1644-55.
- [3] Bone RC, Sibbald WJ, Sprung CL. *The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure.* Chest 1992;**101**:1481-3.
- [4] Reinhart K, Brunkhorst FM, Bone HG, Bardutzky J, Dempfle CE, Forst H *et al.* *[Prevention, diagnosis, treatment, and follow-up care of sepsis. First revision of the S2k Guidelines of the German Sepsis Society (DSG) and the German Interdisciplinary Association for Intensive and Emergency Care Medicine (DIVI)].* Anaesthesist 2010;**59**:347-70.
- [5] Reinhart K, Brunkhorst F, Bone H, Gerlach H, Grundling M, Kreymann G *et al.* *[Diagnosis and therapy of sepsis. Guidelines of the German Sepsis Society Inc. and the German Interdisciplinary Society for Intensive and Emergency Medicine].* Internist (Berl) 2006;**47**:356, 58-60, 62-8, passim.
- [6] Pugin J. *How tissue injury alarms the immune system and causes a systemic inflammatory response syndrome.* Ann Intensive Care 2012;**2**:27.
- [7] Comstedt P, Storgaard M, Lassen AT. *The Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) in acutely hospitalised medical patients: a cohort study.* Scand J Trauma Resusc Emerg Med 2009;**17**:67.
- [8] Lord JM, Midwinter MJ, Chen YF, Belli A, Brohi K, Kovacs EJ *et al.* *The systemic immune response to trauma: an overview of pathophysiology and treatment.* Lancet 2014;**384**:1455-65.
- [9] Shankar-Hari M, Phillips GS, Levy ML, Seymour CW, Liu VX, Deutschman CS *et al.* *Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3).* Jama 2016;**315**:775-87.
- [10] Warren OJ, Watret AL, de Wit KL, Alexiou C, Vincent C, Darzi AW *et al.* *The inflammatory response to cardiopulmonary bypass: part 2--anti-inflammatory therapeutic strategies.* J Cardiothorac Vasc Anesth 2009;**23**:384-93.
- [11] Warren OJ, Smith AJ, Alexiou C, Rogers PL, Jawad N, Vincent C *et al.* *The inflammatory response to cardiopulmonary bypass: part 1--mechanisms of pathogenesis.* J Cardiothorac Vasc Anesth 2009;**23**:223-31.
- [12] Lindman BR, Goldstein JS, Nassif ME, Zajarias A, Novak E, Tibrewala A *et al.* *Systemic inflammatory response syndrome after transcatheter or surgical aortic valve replacement.* Heart 2015;**101**:537-45.
- [13] Guvener M, Korun O, Demirturk OS. *Risk factors for systemic inflammatory response after congenital cardiac surgery.* J Card Surg 2015;**30**:92-6.
- [14] Rangel-Frausto MS, Pittet D, Costigan M, Hwang T, Davis CS, Wenzel RP. *The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study.* Jama 1995;**273**:117-23.

- [15] Wan S, DeSmet JM, Barvais L, Goldstein M, Vincent JL, LeClerc JL. *Myocardium is a major source of proinflammatory cytokines in patients undergoing cardiopulmonary bypass*. The Journal of thoracic and cardiovascular surgery 1996;**112**:806-11.
- [16] Wan S, LeClerc JL, Vincent JL. *Inflammatory response to cardiopulmonary bypass: mechanisms involved and possible therapeutic strategies*. Chest 1997;**112**:676-92.
- [17] Day JR, Taylor KM. *The systemic inflammatory response syndrome and cardiopulmonary bypass*. Int J Surg 2005;**3**:129-40.
- [18] Stang K, Krajewski S, Neumann B, Kurz J, Post M, Stoppelkamp S et al. *Hemocompatibility testing according to ISO 10993-4: discrimination between pyrogen- and device-induced hemostatic activation*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl 2014;**42**:422-8.
- [19] Laffey JG, Boylan JF, Cheng DC. *The systemic inflammatory response to cardiac surgery: implications for the anesthesiologist*. Anesthesiology 2002;**97**:215-52.
- [20] Dieleman JM, Nierich AP, Rosseel PM, van der Maaten JM, Hofland J, Diephuis JC et al. *Intraoperative high-dose dexamethasone for cardiac surgery: a randomized controlled trial*. Jama 2012;**308**:1761-7.
- [21] Whitlock RP, Devereaux PJ, Teoh KH, Lamy A, Vincent J, Pogue J et al. *Methylprednisolone in patients undergoing cardiopulmonary bypass (SIRS): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial*. Lancet 2015;**386**:1243-53.
- [22] Rivers E, Nguyen B, Havstad S, Ressler J, Muzzin A, Knoblich B et al. *Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock*. N Engl J Med 2001;**345**:1368-77.
- [23] Daniels R. *Surviving the first hours in sepsis: getting the basics right (an intensivist's perspective)*. J Antimicrob Chemother 2011;**66 Suppl 2**:ii11-23.
- [24] Carl M, Alms A, Braun J, Dongas A, Erb J, Goetz A et al. *S3 guidelines for intensive care in cardiac surgery patients: hemodynamic monitoring and cardiocirculatory system*. Ger Med Sci 2010;**8**:Doc12.
- [25] Landis RC. *20 Years On: Is It Time to Redefine the Systemic Inflammatory Response to Cardiothoracic Surgery?* J Extra Corpor Technol 2015;**47**:5-9.
- [26] MacCallum NS, Finney SJ, Gordon SE, Quinlan GJ, Evans TW. *Modified criteria for the systemic inflammatory response syndrome improves their utility following cardiac surgery*. Chest 2014;**145**:1197-203.
- [27] Sigal LH. *Basic science for the clinician 33: interleukins of current clinical relevance (part I)*. J Clin Rheumatol 2004;**10**:353-9.
- [28] Dinarello CA. *Blocking IL-1 in systemic inflammation*. J Exp Med 2005;**201**:1355-9.
- [29] Olejniczak K, Kasprzak A. *Biological properties of interleukin 2 and its role in pathogenesis of selected diseases--a review*. Med Sci Monit 2008;**14**:RA179-89.
- [30] Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Schaper F. *Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation*. Biochem J 2003;**374**:1-20.
- [31] Jones SA. *Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6*. J Immunol 2005;**175**:3463-8.
- [32] Baggiolini M, Moser B, Clark-Lewis I. *Interleukin-8 and related chemotactic cytokines. The Giles Filley Lecture*. Chest 1994;**105**:95S-98S.
- [33] Rajarathnam K, Sykes BD, Kay CM, Dewald B, Geiser T, Baggiolini M et al. *Neutrophil activation by monomeric interleukin-8*. Science 1994;**264**:90-2.
- [34] Grutz G. *New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression*. J Leukoc Biol 2005;**77**:3-15.
- [35] Ng TH, Britton GJ, Hill EV, Verhagen J, Burton BR, Wraith DC. *Regulation of adaptive immunity; the role of interleukin-10*. Front Immunol 2013;**4**:129.

- [36] Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. *Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions*. J Leukoc Biol 2004;**75**:163-89.
- [37] Schoenborn JR, Wilson CB. *Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses*. Adv Immunol 2007;**96**:41-101.
- [38] Hehlhans T, Pfeffer K. *The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games*. Immunology 2005;**115**:1-20.
- [39] Bouwmeester T, Bauch A, Ruffner H, Angrand PO, Bergamini G, Crougton K et al. *A physical and functional map of the human TNF-alpha/NF-kappa B signal transduction pathway*. Nat Cell Biol 2004;**6**:97-105.
- [40] Clark IA. *How TNF was recognized as a key mechanism of disease*. Cytokine Growth Factor Rev 2007;**18**:335-43.
- [41] Sandquist M, Wong HR. *Biomarkers of sepsis and their potential value in diagnosis, prognosis and treatment*. Expert Rev Clin Immunol 2014;**10**:1349-56.
- [42] Brenner T, Uhle F, Fleming T, Wieland M, Schmoch T, Schmitt F et al. *Soluble TREM-1 as a diagnostic and prognostic biomarker in patients with septic shock: an observational clinical study*. Biomarkers 2016:1-7.
- [43] Jeong SJ, Song YG, Kim CO, Kim HW, Ku NS, Han SH et al. *Measurement of plasma sTREM-1 in patients with severe sepsis receiving early goal-directed therapy and evaluation of its usefulness*. Shock 2012;**37**:574-8.
- [44] Oku R, Oda S, Nakada TA, Sadahiro T, Nakamura M, Hirayama Y et al. *Differential pattern of cell-surface and soluble TREM-1 between sepsis and SIRS*. Cytokine 2013;**61**:112-7.
- [45] Golovkin AS, Matveeva VG, Grigoriev EV, Shukevich DL, Bayrakova YV, Barbarash LS. *sTREM-1 as a Prognostic Marker of Postoperative Complications in Cardiac Surgery*. ISRN Inflamm 2012;**2012**:382862.
- [46] Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, Sonne O, Hoffman HJ, Law SK et al. *Identification of the haemoglobin scavenger receptor*. Nature 2001;**409**:198-201.
- [47] Moller HJ, Peterslund NA, Graversen JH, Moestrup SK. *Identification of the hemoglobin scavenger receptor/CD163 as a natural soluble protein in plasma*. Blood 2002;**99**:378-80.
- [48] Moller HJ, Aerts H, Gronbaek H, Peterslund NA, Hyltoft Petersen P, Hornung N et al. *Soluble CD163: a marker molecule for monocyte/macrophage activity in disease*. Scand J Clin Lab Invest Suppl 2002;**237**:29-33.
- [49] Fabriek BO, Dijkstra CD, van den Berg TK. *The macrophage scavenger receptor CD163*. Immunobiology 2005;**210**:153-60.
- [50] Weiss M, Schneider EM. *Soluble CD163: An age-dependent, anti-inflammatory biomarker predicting outcome in sepsis*. Crit Care Med 2006;**34**:2682-3.
- [51] Droste A, Sorg C, Hogger P. *Shedding of CD163, a novel regulatory mechanism for a member of the scavenger receptor cysteine-rich family*. Biochem Biophys Res Commun 1999;**256**:110-3.
- [52] Sulahian TH, Hintz KA, Wardwell K, Guyre PM. *Development of an ELISA to measure soluble CD163 in biological fluids*. J Immunol Methods 2001;**252**:25-31.
- [53] Goldstein JI, Goldstein KA, Wardwell K, Fahrner SL, Goonan KE, Cheney MD et al. *Increase in plasma and surface CD163 levels in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery*. Atherosclerosis 2003;**170**:325-32.
- [54] Aristoteli LP, Moller HJ, Bailey B, Moestrup SK, Kritharides L. *The monocytic lineage specific soluble CD163 is a plasma marker of coronary atherosclerosis*. Atherosclerosis 2006;**184**:342-7.

- [55] Feng L, Zhou X, Su LX, Feng D, Jia YH, Xie LX. *Clinical significance of soluble hemoglobin scavenger receptor CD163 (sCD163) in sepsis, a prospective study.* PLoS One 2012;**7**:e38400.
- [56] Lassalle P, Molet S, Janin A, Heyden JV, Tavernier J, Fiers W et al. *ESM-1 is a novel human endothelial cell-specific molecule expressed in lung and regulated by cytokines.* J Biol Chem 1996;**271**:20458-64.
- [57] Bechard D, Scherpereel A, Hammad H, Gentina T, Tscopoulos A, Aumercier M et al. *Human endothelial-cell specific molecule-1 binds directly to the integrin CD11a/CD18 (LFA-1) and blocks binding to intercellular adhesion molecule-1.* J Immunol 2001;**167**:3099-106.
- [58] Shin JW, Huggenberger R, Detmar M. *Transcriptional profiling of VEGF-A and VEGF-C target genes in lymphatic endothelium reveals endothelial-specific molecule-1 as a novel mediator of lymphangiogenesis.* Blood 2008;**112**:2318-26.
- [59] Scherpereel A, Gentina T, Grigoriu B, Senechal S, Janin A, Tscopoulos A et al. *Overexpression of endocan induces tumor formation.* Cancer Res 2003;**63**:6084-9.
- [60] Bechard D, Meignin V, Scherpereel A, Oudin S, Kervoaze G, Bertheau P et al. *Characterization of the secreted form of endothelial-cell-specific molecule 1 by specific monoclonal antibodies.* J Vasc Res 2000;**37**:417-25.
- [61] Scherpereel A, Depontieu F, Grigoriu B, Cavestri B, Tscopoulos A, Gentina T et al. *Endocan, a new endothelial marker in human sepsis.* Crit Care Med 2006;**34**:532-7.
- [62] Grigoriu BD, Depontieu F, Scherpereel A, Gourcerol D, Devos P, Ouatas T et al. *Endocan expression and relationship with survival in human non-small cell lung cancer.* Clin Cancer Res 2006;**12**:4575-82.
- [63] Daly C, Pasnikowski E, Burova E, Wong V, Aldrich TH, Griffiths J et al. *Angiopoietin-2 functions as an autocrine protective factor in stressed endothelial cells.* Proc Natl Acad Sci U S A 2006;**103**:15491-6.
- [64] Kao SJ, Chuang CY, Tang CH, Lin CH, Bien MY, Yu MC et al. *Plasma endothelial cell-specific molecule-1 (ESM-1) in management of community-acquired pneumonia.* Clin Chem Lab Med 2014;**52**:445-51.
- [65] Pauly D, Hamed S, Behnes M, Lepiorz D, Lang S, Akin I et al. *Endothelial cell-specific molecule-1/endocan: Diagnostic and prognostic value in patients suffering from severe sepsis and septic shock.* J Crit Care 2016;**31**:68-75.
- [66] Wu TL, Zhang D, Chia JH, Tsao K, Sun CF, Wu JT. *Cell-free DNA: measurement in various carcinomas and establishment of normal reference range.* Clin Chim Acta 2002;**321**:77-87.
- [67] Frank MO. *Circulating Cell-Free DNA Differentiates Severity of Inflammation.* Biol Res Nurs 2016;**18**:477-88.
- [68] Fennrich S, Hennig U, Toliashvili L, Schlensak C, Wendel HP, Stoppelkamp S. *More than 70 years of pyrogen detection: Current state and future perspectives.* Altern Lab Anim 2016;**44**:239-53.
- [69] Stang K, Fennrich S, Krajewski S, Stoppelkamp S, Burgener IA, Wendel HP et al. *Highly sensitive pyrogen detection on medical devices by the monocyte activation test.* J Mater Sci Mater Med 2014;**25**:1065-75.
- [70] Stoppelkamp S, Wurschum N, Stang K, Loder J, Avci-Adali M, Toliashvili L et al. *Speeding up pyrogenicity testing: Identification of suitable cell components and readout parameters for an accelerated monocyte activation test (MAT).* Drug Test Anal 2016.
- [71] Seatter SC, Li MH, Bubrick MP, West MA. *Endotoxin pretreatment of human monocytes alters subsequent endotoxin-triggered release of inflammatory mediators.* Shock 1995;**3**:252-8.

- [72] Williams MA, Withington S, Newland AC, Kelsey SM. *Monocyte anergy in septic shock is associated with a predilection to apoptosis and is reversed by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor ex vivo*. J Infect Dis 1998;**178**:1421-33.
- [73] Rausch TK, Schillert A, Ziegler A, Luking A, Zucht HD, Schulz-Knappe P. *Comparison of pre-processing methods for multiplex bead-based immunoassays*. BMC Genomics 2016;**17**:601.
- [74] Dupuy AM, Kuster N, Lizard G, Ragot K, Lehmann S, Gallix B *et al*. *Performance evaluation of human cytokines profiles obtained by various multiplexed-based technologies underlines a need for standardization*. Clin Chem Lab Med 2013;**51**:1385-93.
- [75] Chowdhury F, Williams A, Johnson P. *Validation and comparison of two multiplex technologies, Luminex and Mesoscale Discovery, for human cytokine profiling*. J Immunol Methods 2009;**340**:55-64.
- [76] Bruijns BB, Tiggelaar RM, Gardeniers JG. *Fluorescent cyanine dyes for the quantification of low amounts of dsDNA*. Anal Biochem 2016;**511**:74-9.
- [77] Findlay L, Desai T, Heath A, Poole S, Crivellone M, Hauck W *et al*. *Collaborative study for the establishment of the WHO 3(rd) International Standard for Endotoxin, the Ph. Eur. endotoxin biological reference preparation batch 5 and the USP Reference Standard for Endotoxin Lot HOK354*. Pharmeur Bio Sci Notes 2015;**2015**:73-98.
- [78] Hill EM, Turner EL, Martin RM, Donovan JL. *"Let's get the best quality research we can": public awareness and acceptance of consent to use existing data in health research: a systematic review and qualitative study*. BMC Med Res Methodol 2013;**13**:72.
- [79] Kho ME, Duffett M, Willison DJ, Cook DJ, Brouwers MC. *Written informed consent and selection bias in observational studies using medical records: systematic review*. BMJ 2009;**338**:b866.
- [80] Hickey GL, Dunning J, Seifert B, Sodeck G, Carr MJ, Burger HU *et al*. *Statistical and data reporting guidelines for the European Journal of Cardio-Thoracic Surgery and the Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery*. European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery 2015;**48**:180-93.
- [81] Grimes DA, Schulz KF. *Bias and causal associations in observational research*. Lancet 2002;**359**:248-52.
- [82] Kleiner G, Marcuzzi A, Zanin V, Monasta L, Zauli G. *Cytokine levels in the serum of healthy subjects*. Mediators Inflamm 2013;**2013**:434010.
- [83] Alecu M, Geleriu L, Coman G, Galatescu L. *The interleukin-1, interleukin-2, interleukin-6 and tumour necrosis factor alpha serological levels in localised and systemic sclerosis*. Rom J Intern Med 1998;**36**:251-9.
- [84] Gonzalez C, Cava F, Ayllon A, Guevara P, Navajo JA, Gonzalez-Buitrago JM. *Biological variation of interleukin-1beta, interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in serum of healthy individuals*. Clin Chem Lab Med 2001;**39**:836-41.
- [85] Sekiyama KD, Yoshiba M, Thomson AW. *Circulating proinflammatory cytokines (IL-1 beta, TNF-alpha, and IL-6) and IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) in fulminant hepatic failure and acute hepatitis*. Clin Exp Immunol 1994;**98**:71-7.
- [86] Kaukonen KM, Bailey M, Pilcher D, Cooper DJ, Bellomo R. *Systemic inflammatory response syndrome criteria in defining severe sepsis*. N Engl J Med 2015;**372**:1629-38.
- [87] Cardoso T, Teixeira-Pinto A, Rodrigues PP, Aragao I, Costa-Pereira A, Sarmiento AE. *Predisposition, insult/infection, response and organ dysfunction (PIRO): a pilot clinical staging system for hospital mortality in patients with infection*. PLoS One 2013;**8**:e70806.
- [88] Prucha M, Bellingan G, Zazula R. *Sepsis biomarkers*. Clin Chim Acta 2015;**440**:97-103.

- [89] Marshall JC. *The PIRO (predisposition, insult, response, organ dysfunction) model: toward a staging system for acute illness*. Virulence 2014;**5**:27-35.
- [90] Cave MC, Hurt RT, Frazier TH, Matheson PJ, Garrison RN, McClain CJ *et al*. *Obesity, inflammation, and the potential application of pharmaconutrition*. Nutr Clin Pract 2008;**23**:16-34.
- [91] Gewurz H, Mold C, Siegel J, Fiedel B. *C-reactive protein and the acute phase response*. Adv Intern Med 1982;**27**:345-72.
- [92] Nargis W, Ibrahim M, Ahamed BU. *Procalcitonin versus C-reactive protein: Usefulness as biomarker of sepsis in ICU patient*. Int J Crit Illn Inj Sci 2014;**4**:195-9.
- [93] Wacker C, Prkno A, Brunkhorst FM, Schlattmann P. *Procalcitonin as a diagnostic marker for sepsis: a systematic review and meta-analysis*. Lancet Infect Dis 2013;**13**:426-35.
- [94] Luzzani A, Polati E, Dorizzi R, Rungatscher A, Pavan R, Merlini A. *Comparison of procalcitonin and C-reactive protein as markers of sepsis*. Crit Care Med 2003;**31**:1737-41.
- [95] Rodriguez-Gaspar M, Santolaria F, Jarque-Lopez A, Gonzalez-Reimers E, Milena A, de la Vega MJ *et al*. *Prognostic value of cytokines in SIRS general medical patients*. Cytokine 2001;**15**:232-6.
- [96] Tang L, Zhao Y, Wang D, Deng W, Li C, Li Q *et al*. *Endocan levels in peripheral blood predict outcomes of acute respiratory distress syndrome*. Mediators Inflamm 2014;**2014**:625180.
- [97] Mihajlovic DM, Lendak DF, Brkic SV, Draskovic BG, Mitic GP, Novakov Mikic AS *et al*. *Endocan is useful biomarker of survival and severity in sepsis*. Microvasc Res 2014;**93**:92-7.
- [98] Cheadle WG, Mercer-Jones M, Heinzelmann M, Polk HC, Jr. *Sepsis and septic complications in the surgical patient: who is at risk?* Shock 1996;**6 Suppl 1**:S6-9.
- [99] Kimura F, Shimizu H, Yoshidome H, Ohtsuka M, Miyazaki M. *Immunosuppression following surgical and traumatic injury*. Surg Today 2010;**40**:793-808.
- [100] Tschoeke SK, Ertel W. *Immunoparalysis after multiple trauma*. Injury 2007;**38**:1346-57.
- [101] Faist E, Schinkel C, Zimmer S. *Update on the mechanisms of immune suppression of injury and immune modulation*. World J Surg 1996;**20**:454-9.
- [102] Ivanova EA, Orekhov AN. *Monocyte Activation in Immunopathology: Cellular Test for Development of Diagnostics and Therapy*. J Immunol Res 2016;**2016**:4789279.
- [103] Evans BJ, Haskard DO, Finch JR, Hambleton IR, Landis RC, Taylor KM. *The inflammatory effect of cardiopulmonary bypass on leukocyte extravasation in vivo*. The Journal of thoracic and cardiovascular surgery 2008;**135**:999-1006.
- [104] Wurfel MM, Park WY, Radella F, Ruzinski J, Sandstrom A, Strout J *et al*. *Identification of high and low responders to lipopolysaccharide in normal subjects: an unbiased approach to identify modulators of innate immunity*. J Immunol 2005;**175**:2570-8.
- [105] Di Iorio A, Ferrucci L, Sparvieri E, Cherubini A, Volpato S, Corsi A *et al*. *Serum IL-1beta levels in health and disease: a population-based study. 'The InCHIANTI study'*. Cytokine 2003;**22**:198-205.
- [106] Bozza FA, Salluh JJ, Japiassu AM, Soares M, Assis EF, Gomes RN *et al*. *Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis*. Crit Care 2007;**11**:R49.
- [107] Nemunaitis J, Fong T, Shabe P, Martineau D, Ando D. *Comparison of serum interleukin-10 (IL-10) levels between normal volunteers and patients with advanced melanoma*. Cancer Invest 2001;**19**:239-47.
- [108] Berdat PA, Wehrle TJ, Kung A, Achermann F, Sutter M, Carrel TP *et al*. *Age-specific analysis of normal cytokine levels in healthy infants*. Clin Chem Lab Med 2003;**41**:1335-9.

- [109] Friedman G, Jankowski S, Marchant A, Goldman M, Kahn RJ, Vincent JL. *Blood interleukin 10 levels parallel the severity of septic shock*. J Crit Care 1997;**12**:183-7.
- [110] Tamayo E, Fernandez A, Almansa R, Carrasco E, Heredia M, Lajo C *et al*. *Pro- and anti-inflammatory responses are regulated simultaneously from the first moments of septic shock*. Eur Cytokine Netw 2011;**22**:82-7.
- [111] Stoppelkamp S, Veseli K, Stang K, Schlensak C, Wendel HP, Walker T. *Identification of Predictive Early Biomarkers for Sterile-SIRS after Cardiovascular Surgery*. PLoS One 2015;**10**:e0135527.

7. Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Die folgende Originalarbeit entstand aus dem in dieser Arbeit präsentierten wissenschaftlichen Projekt. Der Verfasser dieser Promotionsarbeit war ursächlich und umfangreich an der Erstellung dieser Publikation beteiligt:

[111] Stoppelkamp S, Veseli K, Stang K, Schlensak C, Wendel HP, Walker T. *Identification of Predictive Early Biomarkers for Sterile-SIRS after Cardiovascular Surgery*. PLoS One 2015;10

8. Erklärung zum Eigenanteil an der wissenschaftlichen Arbeit

Die Idee zu der vorliegenden Studie hatten Herr Prof. Dr. Wendel und Herr Prof. Dr. Walker, durch sie erfolgte auch die wissenschaftliche Betreuung des Gesamtprojektes und der vorliegenden Dissertationsschrift.

Frau Dr. Stoppelkamp und K. Veseli konzipierten und planten die Studie, hierbei entfallen relevante Anteile der konkreten Planung des Studienablaufs auf Herrn K. Veseli.

Die gesamte klinische Evaluation, die Patientenrekrutierung, Aufklärung und alle Probenentnahmen erfolgten durch Herrn K. Veseli.

Die Durchführung der Analysen (biochemische und immunologische Analytik) erfolgte durch Frau Dr. Stoppelkamp und Herrn K. Veseli.

Die statistische Auswertung der Arbeit wurde konzipiert von Frau Dr. Stoppelkamp und durchgeführt von Frau Dr. Stoppelkamp und Herrn K. Veseli.

Die Publikation *Identification of Predictive Early Biomarkers for Sterile-SIRS after Cardiovascular Surgery [111]* wurde geschrieben von Frau Dr. Stoppelkamp unter Mithilfe von Herrn K. Veseli; hierbei entfallen relevante Anteile des Textes auf Herrn K. Veseli.

Die vorliegende Dissertation wurde ausschließlich angefertigt von Herrn K. Veseli.

Die Literaturrecherche zu vorliegender Dissertation wurde angefertigt von Herrn K. Veseli.

Die Abbildungen dieser Arbeit wurden entweder für diese Arbeit individuell durch Herrn Dr. K. Veseli oder, für die zugehörige Publikation [111] durch Frau Dr. Stoppelkamp und Herrn K. Veseli erstellt.

gez. K. Veseli

9. Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Ch. Schlensak, Ärztlicher Direktor der Klinik für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie und Ordinarius für Herzchirurgie an der Universitätsklinik Tübingen, bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat diese Arbeit durchzuführen.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof Dr. Wendel und Herrn Prof. Dr. Walker für die Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung der Arbeit sowie ihre ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Weiterer besonderer Dank gilt Frau Dr. Stoppelkamp, mit welcher diese Studie gemeinsam durchgeführt wurde. Ohne Ihre profunde Kompetenz in der biochemischen und immunologischen Analytik wäre diese Arbeit niemals möglich gewesen. Die freundschaftliche Zusammenarbeit mit Ihr war ausgesprochen lehrreich und fruchtbar.

Insbesondere möchte ich meiner Familie danken, der diese Doktorarbeit gewidmet ist und die mich fortlaufend ermuntert und motiviert hat, meine Dissertation zu vollenden.

10. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Veseli
Vorname: Kujtim
Geburtsdatum: 17.12.1981
Geburtsort: Gjakova
Staatsangehörigkeit: Kosovarisch
Familienstand: verheiratet, 2 Kinder

Berufliche Tätigkeit

09/2010 – heute Universität Tübingen, Klinik für Thorax, Herz- und Gefäßchirurgie, Arzt.

Studium

11/2012 Erteilung der ärztlichen Approbation
Regierungspräsidium Stuttgart

03.03.2011 Kenntnisprüfung / Gleichwertigkeitsprüfung
Universität Freiburg

20.11.2008 Approbation als Doktor der Medizin, Universität
Prishtina, Kosovo.

2000-2008 Studium der Humanmedizin, Universität Prishtina,
Kosovo. Abschluss mit Diplom

Schule

09/1996 – 06/2000

Hochschule für Medizin „Hysni Zajmi“, Gjakova, Kosovo
Abschluss mit Diplom

09/1988 – 06/1996

Grundschule „Jahe Salihu“ Molliq – Gjakova, Kosovo
Abschluss mit Abitur