

III. Medizinische Klinik der
Technischen Universität München
Klinikums rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Ch. Peschel)

**Auswirkungen perioperativer Hypothermie
auf die Migration neutrophiler Granulozyten und die
Ausschüttung pro- und antiinflammatorischer Zytokine**

Bettina Meirer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Ch. Peschel
2. Priv. Doz. Dr. H. Bernhard

Die Dissertation wurde am 28.04.2003 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 15.10.2003 angenommen.

Meiner Großmutter

Inhaltsverzeichnis

1. Theoretische Grundlagen	
1.1. Immunsystem	1
1.1.1. Komponenten des angeborenen, unspezifischen Immunsystems	2
1.1.2. Komponenten des erworbenen, spezifischen Immunsystems	3
1.2. Zytokine	6
1.2.1. Interleukin 6 (IL-6)	7
1.2.2. Interleukin 8 (IL-8)	9
1.2.3. Interleukin 10 (IL-10)	12
1.2.4. Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF α)	15
1.3. Neutrophile Granulozyten	17
1.3.1. Funktion	17
1.3.2. Granulopoese	18
1.3.3. Aufbau	18
1.3.3.1. Zellkern	18
1.3.3.2. Granula	19
1.3.3.3. Membranrezeptoren	20
1.4. Hypothermie	24
1.4.1. Akzidentielle Hypothermie	24
1.4.2. Hypothermie während extrakorporalem Bypass	24
1.4.3. Moderate Hypothermie als Therapiekonzept in der Behandlung der zerebralen Ischämie und des Schädel-Hirn-Traumas	24
1.4.4. Perioperative Hypothermie	25
1.4.5. Auswirkungen von Hypothermie auf Organfunktionen	27
2. Hypothesen und Aufgabenstellung	32
2.1. Hypothesen	32
2.2. Aufgabenstellung	32
3. Material und Methodik	33
3.1. Studiendesign	33
3.2. Granulozytenpräparation	34

3.3.	Chemotaxis	37
3.3.1.	Chemotaxiskammer, Versuchsansatz	37
3.3.2.	Fixieren und Färben des Nitrozellulosefilters	38
3.3.3.	Auswertung	39
3.4.	Bestimmung der Zytokin-Plasmaspiegel	40
3.4.1.	Grundprinzip eines Enzymimmunoassays	40
3.4.2.	Praktische Durchführung eines Enzymimmunoassays	41
4.	Ergebnisse	42
4.1.	Ergebnisse der Migration gegen Medium	42
4.2.	Ergebnisse der Migration gegen IL-8	43
4.3.	Ergebnisse der Zytokinspiegel-Messungen	45
4.4.	Interpretation der Ergebnisse	47
5.	Diskussion und Zusammenfassung	49
5.1.	Diskussion der Methodik	49
5.1.1.	Chemotaxis	49
5.1.2.	ELISA	50
5.2.	Diskussion der Ergebnisse	50
5.3.	Zusammenfassung und Schlussfolgerungen	53
	Literaturverzeichnis	55
	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	81

1. Theoretische Grundlagen

1.1. Immunsystem

Aufbau des Immunsystems

Das humane Abwehrsystem besteht aus zwei Komponenten: Das nichterregerspezifische entspricht dem angeborenen, das erregerspezifische dem erworbenen Immunsystem.

Humorale und zelluläre Elemente beider System bilden die Basis eines kooperierenden immunologischen Netzwerks. Seine Aufgabe ist der Erhalt der stofflichen Integrität des menschlichen Körpers. Humorale Abwehrstoffe sind ubiquitär in allen Körperflüssigkeiten zu finden, während mobile Immunzellen in Lymphbahnen und Blutkreislauf zirkulieren. Gemeinsam mit sessilen Zellen des Immunsystems sind sie am Aufbau von Lymphgewebe und -organen beteiligt.

Zu den wichtigsten Aufgaben der Lymphorgane gehören die Reproduktion und Differenzierung der Immunzellen, die Expansion Antigen (Ag)-spezifischer Zellen, die Induktion von Toleranz gegenüber körpereigenen Strukturen und der Informationsaustausch zwischen zirkulierenden und sessilen Zellen des Immunsystems.

Man unterscheidet primäre Lymphorgane, in denen T-(Thymus) und B-(Bone marrow) Lymphozyten zu immunkompetenten Zellen heranreifen, von sekundären Reaktions- bzw. Wachstationen des Immunsystems, die vorzugsweise an potentiellen Erregereintrittspforten lokalisiert sind. Dazu zählen Lymphozytenansammlungen in Haut und Schleimhäuten, Lymphfollikel in Ileum (Peyer Plaques) und Appendix vermiformis, Lymphknoten und die Tonsillen. Reife T- und B-Lymphozyten besiedeln diese sekundären Lymphorgane, vermehren sich dort und setzen bei Ag-Kontakt spezifische Immunreaktionen in Gang (Alam R, 1998).

1.1.2. Komponenten des angeborenen, unspezifischen Immunsystems

Zelluläre Komponenten

Phagozyten kommen als mobile (Granulozyten, Monozyten) und sessile Zellen (Makrophagen) im Blutkreislauf und in fast allen Geweben vor. Bereits aufgrund einfacher Erkennungsmerkmale können sie körperfremdes Material erkennen, aufnehmen und intrazellulär prozessieren. Die quantitative Verstärkung der Phagozytoseleistung durch humorale Faktoren (Akute-Phase-Proteine, Collectine, Komplement, Antikörper (AK)) wird als Opsonierung bezeichnet. Diese Faktoren binden das körperfremde Material und werden dadurch von den Phagozyten bevorzugt aufgenommen, die hierzu spezielle Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. Die Gesamtheit aller phagozytierenden Zellen nennt man Monozyten-Makrophagen-System.

Zu den inflammatorische Zellen zählt man weiters noch Mastzellen, basophile und eosinophile Granulozyten, Endothelzellen und Thrombozyten. Sie werden in die efferente Phase spezifischer Immunreaktionen eingebunden und dienen dabei der Verstärkung von Abwehrvorgängen (Gleich GJ, 1989).

Natürliche Killerzellen sind granuläre zytotoxische T-Lymphozyten, die wegen fehlender Ag-Spezifität auch zum unspezifischen Immunsystem gezählt werden. Ihre zytotoxische Effizienz wird durch Zytokine (z.B. $\text{IFN}\gamma$, IL-2) aus gleichzeitig aktivierten T-Lymphozyten des adaptiven Immunsystems potenziert (Kos FJ, 1998).

Humorale Komponenten

Monokine sind die Signalproteine der Zellen des unspezifischen Immunsystems. Sie wirken unter physiologischen Bedingungen auto- und parakrin und sind deshalb beim Gesunden im Serum nur in niedrigen Spiegeln nachzuweisen. Die wichtigsten Vertreter sind $\text{TNF}\alpha$, IL-1 und IL-6 und die Typ-1-Interferone.

Das Komplementsystem umfaßt mehr als 25 Proteine, die im Serum und an Zelloberflächen gebunden vorkommen und in einer kaskadenartigen Reaktion zur Lyse fremder Zellen, zur Opsonierung und damit zur Aktivierung von Phagozyten, Lymphozyten, Mastzellen und anderen inflammatorischen Zellen führen können. Es kann auf verschiedenen Wegen aktiviert werden: Beim klassischen Weg wird die Reaktionskette durch Ag-AK-Komplexe des IgG- oder IgM Isotyps ausgelöst (Beginn mit Aktivierung von C1q), beim alternativen Weg wird die Kaskade entweder allein durch Ag oder auch durch Ag-AK-Komplexe des IgA- und IgE-Isotyps aktiviert (Beginn mit Aktivierung von C3). Darüber hinaus sind proteolytische Enzyme aus inflammatorischen Zellen in der Lage Spaltprodukte des Komplementsystems (Anaphylatoxine) freizusetzen (Medzhitov R, Janeway CA Jr., 2000; Medzhitov R, Janeway CA Jr., 1997; Beutler BA, 1999; Carroll MC, 1998).

1.2.2. Komponenten des erworbenen, spezifischen Immunsystems

An der adaptiven Immunität wirken zelluläre und humorale Mechanismen mit, wobei nahezu jede spezifische immunologische Reaktion Elemente des unspezifischen Immunsystems einbezieht.

Zelluläre Reaktionen sind wichtig zur Abwehr von vorwiegend intrazellulär lokalisierten Erregern wie Viren, von Pilzen und Protozoen und von intrazellulär proliferierenden Bakterien (z.B. Listerien, Mykobakterien). Man unterscheidet die zytotoxische zelluläre Reaktion durch CD 8 (cluster of differentiation)-T- Suppressor-Lymphozyten von der zellulär vermittelten Spätreaktion durch CD4-DTH-Helfer-Lymphozyten.

Humorale Reaktionen dienen aber auch der Abwehr bzw. Neutralisation von extrazellulär lokalisierten Ag, v.a. von extrazellulär proliferierender Bakterien und Bakterientoxinen und Viren, bevor sie in Zielzellen eindringen können.

Das adaptive Immunsystem verfügt über eine spezifische Gedächtnisleistung, die gegenüber manchen Erregern schon nach einmaligem Kontakt lebenslangen Schutz verleiht. Sie wird besonders anschaulich, wenn man die primäre und sekundäre humorale Immunantwort vergleicht. Bei erstmaligem Kontakt mit einem fremden Ag bilden die B-Lymphozyten nach einer Sensibilisierungsphase von 8-10 Tagen spezifische IgM-AK (Primärantwort). Während dieser Zeit werden auch Ag-spezifische T-Helferzellen sensibilisiert. Sie unterstützen und verstärken die B-zelluläre Immunantwort und verändern sie qualitativ (Isotypenwechsel von IgM- auf IgG-Produktion), wenn das Ag persistiert oder zu einem späteren Zeitpunkt

(Wochen bis Jahre) erneut in den Organismus eindringt. Bedingt durch die Gedächtnisleistung der T-Lymphozyten ist die Latenz der sekundären humoralen Immunantwort deutlich kürzer (3-7 Tage) (Fearon DT, 1998; Medzhitov R, Janeway CA Jr., 1998).

Zelluläre Komponenten

Die Zellen des adaptiven Immunsystems sind die B- und T-Lymphozyten. Wie alle anderen Zellen des hämatopoetischen Systems entstammen sie der pluripotenten Knochenmarkszelle und gehören entwicklungs geschichtlich zum Mesoderm. Der Organismus des Erwachsenen verfügt über etwa 10^{12} Lymphozyten (ca. 1kg Zellmasse), die sich vorwiegend in den Lymphbahnen und Lymphorganen aufhalten. Nur etwa 2% aller Lymphozyten befinden sich im Blut. Davon sind etwa 75% T-Lymphozyten und 15% B-Lymphozyten.

B-Lymphozyten sind als Vorläufer der AK-sezernierenden Plasmazellen neben T-Lymphozyten die Träger der spezifischen humoralen Immunität. Ihre Aufgabe ist die Erkennung extrazellulär lokalisierter Ag und die daran anschließende Produktion und Sekretion spezifischer AK (Immunglobuline). Jede immunkompetente B-Zelle produziert AK-Kopien einer definierten Spezifität, die bereits bei der Reifung durch genetische Rekombination der Ig-Keimbahngene festgelegt wird. Zur Ag-Erkennung dient der B-Zell-Rezeptor, ein in der Zellmembran verankerter AK-Isotyp, der mit signalübermittelnden Proteinen in unmittelbarer Verbindung steht .

Ag-spezifische T-Lymphozyten haben als immunregulatorische Zellen zentrale Bedeutung im immunologischen Netzwerk. Zwei hauptsächlich exprimierte Oberflächenmoleküle dienen auch der Subtypisierung dieser heterogenen Zellpopulation. Das CD8-Molekül ist auf den zytotoxischen T-Lymphozyten und auf T-Suppressor-Zellen zu finden, während das CD4-Molekül T-Helferzellen und DTH-Lymphozyten kennzeichnet. Jeder Ag-spezifische T-Lymphozyt exprimiert einen zellspezifischen Ag-Rezeptor (T-Zell-Rezeptor), dessen Spezifität bei der Reifung durch Rekombination der T-Zell-Rezeptor-Keimbahngene festgelegt wird. Er steht in Verbindung mit den als CD3-Komplex bezeichneten Signalübertragungsmolekülen, die an der Aktivierung der T-Zelle beim Ag-Kontakt unmittelbar beteiligt sind und in allen Ag-spezifischen T-Zellen zu finden sind (Haynes BF, Denning SM, 1993; Herman A et al, 1991; Robey E, Allison JP, 1993).

Humorale Komponenten

Immunglobuline (AK) sind die humoralen Erkennungsproteine des adaptiven Immunsystems. Sie kommen als B-Zell-Rezeptoren auf der Oberfläche von B-Lymphozyten vor und werden von stimulierten, differenzierten B-Lymphozyten (Plasmazellen) in großen Mengen (ca.2000 Kopien/Sek.) als lösliche AK sezerniert. Folgende AK-Klassen werden unterschieden:

- 1.) IgA-AK kommen hauptsächlich in Körpersekreten vor, bilden Dimere und dienen der Inaktivierung körperfremder Ag, bevor diese in den Organismus eindringen können.
- 2.) IgM-AK sind die Ig der Primärantwort. Sie zeichnen sich durch eine hohe Bindungsstärke an Makromolekülen mit repetitiven Epitopen aus, da sie als Pentamere über zehn identische Ag-Bindungsstellen verfügen.
- 3.) IgG-AK machen etwa 75% der zirkulierenden Immunglobuline aus. Sie sind auch qualitativ die wichtigsten und langfristig schützenden AK. Es handelt sich um Immunglobuline der sekundären Immunantwort, d.h. sie werden bei wiederholter oder anhaltender Stimulation gebildet und sind dauerhaft im Serum nachzuweisen.
- 4.) IgE-AK haben pathologische Bedeutung im Rahmen der allergischen Sofortreaktion und sind bei atopisch veranlagten Individuen gelegentlich mehr als 10fach erhöht im Serum zu finden. Über spezifische IgE-Rezeptoren werden sie an die Zellmembran von Mastzellen und basophilen Leukozyten gebunden und aktivieren diese Zellen bei Ag-Kontakt.
- 5.) IgD-AK sind an Differenzierungsvorgängen von B-Lymphozyten beteiligt und der primär nachweisbare Isotyp des B-Zell-Rezeptors. Im Serum sind sie nur von untergeordneter Bedeutung.

Lymphokine sind interzelluläre Signalproteine und Wachstumsfaktoren des adaptiven Immunsystems. Die wichtigsten sind IL-2 und IL-4, Typ-2-Interferon (γ) und Transforming Growth factor β (TGFB). Sie werden vorwiegend von T-Lymphozyten sezerniert, haben immunregulatorische und sowohl pro- als auch antiinflammatorische Wirkungen. Sie werden auch unter den Zytokinen subsumiert.

1.2. Zytokine

Der Begriff Zytokine wird als generelle Bezeichnung für lösliche Proteine und Peptide verwendet, die als chemische Mediatoren Interaktionen zwischen einer Reihe unterschiedlicher Zellen regulieren und das diese Zellen umgebende Milieu kontrollieren. Sie sind bereits in nano-bis picomolaren Konzentrationen biologisch wirksam. Zu den von Zellen unter physiologischen Bedingungen freigesetzten Zytokinen gehören auch die von Leukozyten sezernierten Interleukine (IL), die von Lymphozyten sezernierten Lymphokine (lymphozytäre Zytokine), die von Monozyten sezernierte Monokine (monozytäre Zytokine), Interferone, koloniestimulierende Faktoren und eine Reihe anderer, nicht in diese Gruppe klassifizierbare Proteine. Wegen der nomenklatorischen Schwierigkeiten werden alle genannten Faktorgruppen auch ganz allgemein als regulatorische Peptidfaktoren bezeichnet.

Eine empirische Einteilung teilt die Zytokine in folgende Untergruppen:

1. Immunregulatorische Zytokine mit Einfluß auf Aktivierung, Wachstum und Differenzierung von Lymphozyten und Monozyten. Hierzu gehören z.B. Interleukin (IL)-2, IL-4 und Transforming growth factor (TGF)- β .
2. Proinflammatorische Zytokine, welche überwiegend nach Stimulation mononukleärer Phagozyten durch infektiöse Erreger gebildet werden: beispielsweise IL-1, Tumor Nekrose Faktor (TNF)- α , IL-6 und die Mitglieder der Chemokin-Familie proinflammatorischer Zytokine wie z.B. IL-8, die monozytären chemotaktischen Proteine (MCP)-1,-2,-3 und die inflammatorischen Makrophagenproteine (MIP)-1 α ,-1 β .
3. Zytokine, welche das Wachstum und die Differenzierung unreifer Leukozyten regulieren, z.B. IL-3, -7, Granulozyten-Makrophagen-stimulierender Faktor (GM-CSF).

Zytokine beeinflussen die Genaktivierung und über diesen Weg auch die Aktivierung von Zellen, das Zellwachstum, die Differenzierung, die Expression funktioneller Oberflächenmoleküle und die resultierende zelluläre Effektorfunktion. Es ergibt sich eine weitreichende Wirkung der Zytokine auf die Regulation der Immunantwort und die Pathogenese verschiedener Erkrankungen (Arai KI et al., 1990).

Im Folgenden soll auf die Interleukine (IL)-6, -8, und -10 und den Tumor Nekrose Faktor (TNF)- α im Speziellen eingegangen werden.

1.2.1. Interleukin 6 (IL-6)

Vorkommen:

IL-6 wird von verschiedenen Zelltypen produziert, die Hauptquellen in vivo sind jedoch stimulierte Monozyten, Fibroblasten und Endothelzellen. Makrophagen, T- und B-Lymphozyten, Mastzellen, Gliazellen und Keratinozyten sind nach entsprechender Stimulation ebenfalls in der Lage IL-6 zu exprimieren.

Physiologische Stimuli für die Synthese von IL-6 durch Monozyten sind IL-1, bakterielle Endotoxine sowie TNF α / β und Platelet Derived Growth Factor (PDGF). In Fibroblasten wird die Synthese von IL-6 durch IFN- β , TNF α , PDGF und durch Virusinfektionen stimuliert. IL-6 selbst stimuliert auch seine eigene Synthese. Gehemmt wird die Produktion hauptsächlich durch Glukokortikoide (Brach MA et al., 1992).

Wirkung:

IL-6 ist ein pleiotrop wirkendes Zytokin, das die antigenspezifische Immunantwort und die inflammatorischen Reaktionen beeinflusst und einen der Hauptmediatoren der Akute-Phase-Reaktion darstellt (Heinrich PC et al., 1990).

Neben seiner Eigenschaft als ein Thrombopoetin in vitro die Reifung von Megakaryozyten zu induzieren und in vivo die Plättchenzahl zu erhöhen, scheint es eine Schlüsselrolle in der Pathogenese des Schocks und der Sepsis zu spielen. Zu seinen Eigenschaften zählen weiters die Regulation der Expression anderer Zytokine, die Induktion der Differenzierung und Proliferation normaler und maligner Zellen und die Hemmung von Tumorwachstum in vivo unter experimentellen Bedingungen (Stravena JE et al., 1992; Lee F et al., 1989).

Wie IL-1, stimuliert auch IL-6 die ACTH-Synthese. Die als Antwort hierauf gebildeten Glukokortikoide inhibieren in vivo wiederum die Produktion von IL-6, IL-1 und TNF, so daß zwischen Immunsystem und neuroendokrinen Funktionsebene eine Art negativer Rückkopplung existiert (Helle M et al., 1988).

Desweiteren wirkt es sowohl in vitro als auch in vivo als Differenzierungsfaktor für B-Zellen und als Aktivierungsfaktor für T-Zellen, induziert IL-2-unabhängig die Natürliche Killer (NK)-Zellproliferation und erhöht die TNF- α und - β Ausschüttung. IL-6 kann nach vorausgegangener Aktivierung durch IL-4 die abschließende Reifung der B-Zellen zu Immunglobulin-sezernierende Plasmazellen in einem Ausmaß induzieren, daß eine 120-400fache Steigerung des Serum-IgG1-Spiegels beobachtet werden kann (Rabinowich H et al., 1993).

Klinische Relevanz:

Die Deregulation der Expression von IL-6 ist wahrscheinlich ein wesentlicher Faktor in der Pathogenese verschiedener Erkrankungen. IL-6 Plasma-Spiegel sind deutlich erhöht bei schwerwiegenden Krankheitsbildern, einschließlich des septischen Schocks, und korrelieren mit der Schwere der Krankheit (Presneill JJ et al., 2000).

Eine exzessive Überproduktion wird bei verschiedenen pathophysiologischen Zuständen beobachtet, u.a. bei rheumatoider Arthritis, multiplem Myelom, Lennert-Syndrom, Morbus-Castleman, kardialen Myxomen, Alkoholismus und dadurch bedingter Hepatitis und Leberzirrhose. Auch in der Pathogenese der chronischen Polyarthritis scheint IL-6 neben IL-1 und IL-8 eine Rolle zu spielen, da die Konzentration in der Synovialflüssigkeit exzessiv erhöht ist (Fujimoto M et al., 2000).

IL-6 könnte auch dank seiner Wirkung auf hämatopoetische Zellen für die Behandlung bestimmter Anämie- und Thrombozytopeniearten geeignet sein. Nach einer Vorbehandlung mit IL-3 erhöht eine IL-6-Gabe die Plättchenzahl beträchtlich (Asano S et al., 1990). In Verbindung mit Zytokinen wie IL-2 könnte IL-6 in der Therapie einiger Tumorarten von Nutzen sein. Vorklinische Studien mit IL-6 zur Tumorbekämpfung wiesen seine Rolle als ein Vermittler sowohl der nicht-MHC beschränkten als auch der MHC-beschränkten Immuneffektorzellfunktion als Teil der antineoplastischen und antimikrobiellen Verteidigungsmechanismen nach. Außerdem scheint es eine direkte antiproliferative und differenzierende Wirkung auf einige Arten von Tumorzellen zu haben. Die positive hämatopoetische und thrombopoetische Wirkungen von IL-6 scheint sich in Patienten mit deutlicher Knochenmarkssuppression infolge Chemotherapie vorteilhaft zu erweisen (Martinez-Maza O and Berek J, 1991; Mule JJ et al., 1992).

Das Monitoring postoperativer IL-6-Serumspiegel könnte für die Beurteilung eines inflammatorischen Zustandes und der Früherkennung einer Akute-Phase-Reaktion hilfreicher

sein als die Überwachung der C-reaktive Protein-Spiegel (Ohzato et al., 1992; Blackwell TS, Christman JW, 1996). Beispielsweise antizipierten in 28 Lebertransplantation-Patienten bereits die intraoperativen IL-6 Serumspiegel von 800pg/ml oder mehr 75% der postoperativen bakteriellen oder viralen Infektionen (Fugger R et al., 1991). Ein IL-6-Spiegelanstieg scheint auch ein Warnsignal für bevorstehende Komplikationen von Organtransplantationen zu sein (Ohzato H et al., 1992).

Einen neuen Behandlungsansatz des M. Chron könnte die Blockade der IL-6-Transsignalisierung darstellen, die die T-Zell-Resistenz gegenüber Apoptose unterdrückt (Atreya R et al., 2000).

1.2.2. Interleukin 8 (IL8)

Vorkommen:

IL-8 wird von Makrophagen, Fibroblasten, Endothelzellen, Melanozyten, Hepatozyten, Chondrozyten, einer Reihe von Tumorzelllinien und stimulierten Monozyten produziert.

In vielen Zellarten wird die IL-8 Synthese stark durch IL-1 und TNF- α stimuliert (Mitsushima K and Oppenheim JJ, 1989). In humanen Hautfibroblasten wird die IL-8 Expression durch Leukoregulin gesteigert. IFN- γ kann als Kostimulator fungieren. Die IL-8 Synthese wird zudem durch Phytohämagglutinine, Concanavalin A, doppelsträngige RNA, Phorbolster, Natriumuratkristalle, Viren und bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) induziert. Die IL-8-Expression durch ruhende und stimulierte humane Blutmonozyten wird durch IL-7 hochreguliert. In Chondrozyten wird die IL-8-Synthese durch IL-1 β , TNF- α alpha und LPS, in humanen Astrozyten durch IL-1 und TNF- α stimuliert. In epithelialen, endothelialen- und fibroblastischen Zellen wird die IL-8 Sekretion durch IL-17 induziert. Glukokortikoide, IL-4, TGF- β , 5`Lipooxygenasehemmer und 1,25(OH) $_2$ Vitamin D3 hemmen die IL-8 Synthese.

IL-8 wird konstitutionell und unter allgemeinen Bedingungen in verschiedensten Tumorzelllinien produziert und seine Synthese scheint beispielsweise bei Patienten mit hepatozellulärem Karzinom in Relation zum Serumspiegelanstieg zu stehen (Sakamoto K et al., 1992).

Wirkungen:

Die Wirkung von IL-8 ist nicht speziesspezifisch. In seinen biologischen Eigenschaften ähnelt es einem anderen Protein, dem Neutrophilen Aktivierenden Peptid-2 (NAP-2). Diese spezifische Neutrophilenaktivierung unterscheidet es von allen anderen Zytokinen. Es induziert in eben diesen einen vorübergehenden Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration und die spezifische Freisetzung von Enzymen aus den Granula. IL-8 ist einer der stärksten chemotaktischen Faktoren für Neutrophile (Kunkel SL et al., 1991) und fördert die Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Zellmembran (Huber A et al., 1991). Der Metabolismus reaktiver Sauerstoff-Radikale in Neutrophilen wird ebenfalls gesteigert (Kuna P et al., 1991).

IL-8 scheint nicht nur chemotaktische Aktivität für alle derzeit identifizierten migratorischen Immunzellen zu besitzen und ein proinflammatorischer Vermittler zu sein, sondern weist in seiner intravaskulären, von aktivierten Endothelzellen sezernierten Form, eine vielmehr antiinflammatorische, nämlich hemmende Wirkung auf die Adhäsion polymorphkerniger Zellen an diese Monolayer auf (Hechtman DH et al., 1991). Ferner wirkt es mitogen auf Epidermiszellen. In vivo bindet IL-8 stark an Erythrozyten. Diese Adsorption scheint von physiologischer Bedeutung zu sein, da an Erythrozyten gebundenes IL-8 nicht mehr länger Neutrophile aktiviert. Von Makrophagen stammendes IL-8 unterstützt die Angiogenese und scheint in Angiogenese-abhängigen Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis, dem Tumorwachstum und der Wundheilung eine Rolle zu spielen (Koch AE et al., 1992).

Klinische Relevanz:

Allgemein scheint IL-8 ein Marker verschiedenster inflammatorischer Prozesse zu sein und deren Ausmaß vorhersagen zu können (Lin KJ et al., 2000).

Im Speziellen scheint es beispielsweise für Erkrankungen wie Psoriasis und rheumatoider Arthritis von klinischer Relevanz zu sein. Erhöhte Konzentrationen werden in psoriatischen Schuppen beobachtet, was die hohe Proliferationsrate dieser Zellen erklären könnte (Gillitzer R et al., 1991).

Neben IL-1 und IL-6 spielt vermutlich auch IL-8 eine Rolle in der Pathogenese der chronischen Polyarthritis, da exzessive Mengen dieses Faktors in der Synovialflüssigkeit

gefunden wurden. Die Aktivierung neutrophiler Granulozyten scheint die Migration von Zellen in die Kapillaren der Gelenke zu verstärken. Von diesen Zellen wird angenommen, daß sie die Kapillaren durchwandern und in das umliegende Gewebe eintreten, was zu einem konstanten Einstrom von Entzündungszellen in die Gelenksbereiche führt (Koch JE et al., 1991).

In einer Studie mit transgenen Mäusen, die IL-8 überexprimieren, wurde der Zusammenhang erhöhter IL-8 Spiegel mit der Zunahme zirkulierender Neutrophiler und der Abnahme der L-Selektin-Expression auf deren Oberfläche aufgezeigt. Veränderungen in der Expression von beta-2-Integrinen Mac-1 und LFA-1 auf Neutrophilen im peripheren Blut wurden nicht beobachtet. Die Expression von L-Selektin auf Knochenmarks- und Vorläuferneutrophilen war normal. Eine Ansammlung von Neutrophilen wurde in der Mikrozirkulation der Lunge, der Leber und der Milz beobachtet. Neutrophilenextravasation, Plasmaexsudation oder Gewebsschäden blieben jedoch aus. Die Neutrophilenmigration in das entzündete Peritoneum wurde stark gehemmt (Simonet WS et al., 2000).

Die erhöhte Produktion von IL-8, das für die Leukozytenadhäsion an Gefäßendothelien und die Migration neutrophiler Granulozyten in die Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) verantwortlich zu sein scheint, scheint die bei einer bakteriellen im Vergleich zu einer aseptischen Meningitis vorliegende schwerwiegendere Entzündung zu begründen (Seki T et al., 1993).

Eine bedeutende Rolle kommt IL-8 auch im Rahmen des Asthma bronchiale zu. Die hohen Spiegelwerte und die freie Neutrophilenelastaseaktivität, die im Sputum asthmatischer Patienten beobachtet werden, lassen vermuten, daß IL-8 die Neutrophilie der Atemwege und die Neutrophilenelastase-Hypersekretion im akuten Asthmaanfall bedingen (Norzila MZ et al., 2000).

Anhand einer Studie mit Ratten über Endotoxin-bedingte Pleuritis hat sich IL-8 als eine Hauptkomponente der chemotaktischen Aktivität bzgl. Neutrophilenrekrutierung dargestellt (Broaddus VC et al., 1994; Boylan AM et al., 1994).

Studienergebnisse wiesen im Tiermodell, in experimenteller Endotoxinämie und in Sepsispatienten darauf hin, daß IL-8 im Rahmen einer Sepsis in beträchtlichen Mengen synthetisiert und ausgeschüttet wird. Einige wenige Untersuchungen zeigten eine schwache Korrelation zwischen erhöhten IL-8 Spiegeln, dem Auftreten septischen Schocks und damit verbundener Letalität (Hack CE et al. 1997).

1.2.3. Interleukin 10 (IL10)

Vorkommen:

Im Menschen wird IL-10 von aktivierten CD8⁺ T-Zellen des peripheren Blutes, von Th0, Th1, und Th2-ähnlichen CD4⁺ T-Zellklonen sowohl nach Antigen-spezifischer als auch polyklonaler Aktivierung, von B-Zell-Lymphomen, und von LPS-aktivierten Monozyten und Mastzellen produziert (Yssel H et al., 1992).

B-Zelllinien von Patienten mit AIDS und Burkitt Lymphom sezernieren konstitutionell große Mengen an IL-10 (Benjamin D et al., 1992).

Gehemmt wird die IL-10-Synthese von Monozyten durch IL-4 und IL-10 selbst (Zlotnik A, Moore KW, 1991).

Wirkung:

IL-10 führt in Th1-Subpopulationen von T-Zellen zur Synthesehemmung bestimmter Zytokine wie beispielsweise IFN- γ und IL-2. Dies kann durch IL-4 antagonisiert werden. Der Hemmeffekt auf die IFN- γ Produktion erfolgt indirekt und scheint das Ergebnis einer Unterdrückung der IL-12 Synthese durch Begleitzellen zu sein (Zlotnik A and Moore KW, 1991). Im menschlichen Körper wird IL-10 von Th1- und Th2-Zellen produziert, wobei es deren Funktion (antigen-spezifische Proliferation und Zytokinproduktion) herunterregulieren kann (Del-Prete G et al., 1993). In von bakteriellem LPS stimulierten Makrophagen hemmt IL-10 die IL-1, IL-6 und TNF- α Synthese, indem es den Abbau der Zytokin mRNA steigert. Es führt außerdem zu einer Hemmung der Antigenpräsentation. In humanen Monozyten antagonisieren IFN- γ und IL-10 sich gegenseitig in Produktion und Funktion. IL-10 ist auch ein physiologischer Antagonist von IL-12 (Chomater P et al; 1993).

IL-10 hemmt auch die mitogen- oder CD3-induzierte Proliferation von T-Zellen in Gegenwart zusätzlicher Zellen und reduziert die Produktion von IFN- γ und IL-2. Exogenes IL-2 und IL-4 hemmt den Proliferationshemmeffekt, beeinflusst aber nicht die IFN- γ Produktion. In LPS-

stimulierten Makrophagen steigert $\text{IFN-}\gamma$ die IL-6 Synthese, indem es die IL-10 Produktion hemmt. IL-10 scheint für die meiste oder die gesamte Fähigkeit der Th2-Superfamilien, die Zytokinsynthese von Th1-Zellen zu hemmen, verantwortlich zu sein. Zudem hemmt es *in vivo* die Sekretion von $\text{TNF-}\alpha$ und schützt vor der Letalität eines durch Endotoxin ausgelösten septische Schocks in Mäusen. IL-5 induziert hemmt es die Immunglobulinabgabe von T-Zell-unabhängigen Antigenen (D'Andrea A et al., 1993).

IL-10 tritt jedoch auch als Kostimulator für die Proliferation von Mastzellen (in Gegenwart von IL-3 und/oder IL-4) und peripheren Lymphozyten auf. Während IL-10 allein keinen Effekt auf die Proliferation von Mastzellen und ihre Vorläuferzellen hat, hat eine Kombination aus IL-10 und IL-4 denselben wachstumsfördernden Effekt wie IL-3 alleine. Optimales Mastzellwachstum wird erreicht durch die Kombination von IL-3, IL-4 und IL-10. Entsprechend seiner Wirkung auf Mastzellen spielt IL-10 wahrscheinlich eine Rolle in der Entstehung einer Mastozytose, die häufig im Anschluß an parasitäre Infektionen beobachtet wird, indem es die Wirkungen von IL-3 und IL-4 potenziert (Thompson-Snipes LA et al., 1991).

IL-10 ist ebenfalls ein Kostimulator für das Wachstum reifer und unreifer Thymozyten (zusammen mit IL-2, IL-4 und IL-7) und funktioniert als ein zytotoxischer T-Zell-Differenzierungsfaktor, der einer größeren Anzahl an IL-2 aktivierten zytotoxischen T-Lymphozyten-Vorläuferzellen Vorschub leistet und zu zytotoxischen Effektorzellen differenziert. IL-10 hält die Lebensfähigkeit von B-Zellen *in vitro* aufrecht, stimuliert sie und fördert ihre Differenzierung. Es steigert die Expression von MHC Klasse II Antigenen auf B-Zellen während sie auf Monozyten gehemmt wird. In über ihren Antigenrezeptor oder CD40 aktivierten B-Zellen induziert IL-10 die Sekretion von IgG, IgA und IgM. Dieser Effekt ist synergisiert durch IL-4 während die durch IL-10 induzierte Immunglobulinsynthese durch TGF-beta antagonisiert wird. Die Makrophagenaktivierung kann durch IL-10 verhindert werden (Bogdan C et al., 1991).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, daß humanes IL-10 ein potenter und spezifisch für humane CD8^+ T-Lymphozyten chemotaktisch aktiver Faktor ist. Die Migration IL-8-induzierter CD4^+ T-Lymphozyten wird durch ihn jedoch gehemmt (Jinquan T et al., 1993).

Folglich besitzt IL-10 eine Variation unterschiedlichster Aktivitäten, die nicht alle immunsuppressiv sind. So konnte beispielsweise eine verstärkte Transkription der FMLP-Rezeptor mRNA mit nachfolgend entsprechend erhöhter Rezeptorexpression auf der Zelloberfläche von Monozyten, die erhöhten IL-10 Konzentrationen ausgesetzt waren, nachgewiesen werden. Darüber hinaus zeigten IL-10 behandelte Monozyten eine signifikant erhöhte funktionale Reaktion gegenüber FMLP mit einer (drei- bis vierfach) gesteigerten Chemotaxis und zweifach erhöhter intrazellulärer Calciummobilisation. In polymorphkernigen Neutrophilen vermittelte IL-10 ebenfalls eine, wenn auch nur zweifach

erhöhte FMLP-Rezeptorexpression. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß IL-10 über Modulation der Chemotaxis-Rezeptor-Expression pro- und antiinflammatorische Aktionen in Zielzellen kombinieren kann. Im Rahmen einer Entzündungsreaktion könnte IL-10 also sowohl für einen Mechanismus für die Ansammlung mono- und polymorphkerniger Zellen im Entzündungsgebiet als auch einen Feedback-Mechanismus, um einer unkontrollierten Reaktion entgegenzuwirken, sorgen, indem es deren oxidativen Metabolismus und deren Produktion proinflammatorischer Zytokine kontrolliert (Thivierge M et al., 1999; Capsoni F et al., 1997).

Klinische Relevanz:

Bei Kindern mit septischem Schock scheinen die IL-10 und TNF-Spiegel mit der Schwere des Organversagens und der Sterblichkeit zu korrelieren. Ein Abfall der Spiegel innerhalb von 24 Stunden scheint begünstigende prognostische Bedeutung zu haben (Hatherill M et al., 2000).

Eine andere Studie zeigt, daß septische Schockpatienten im Vergleich zu reinen Sepsispatienten höhere IL-10 Spiegel aufweisen und diese den Versuch der Unterdrückung eines Schocksyndroms zu reflektieren scheinen (Kasai et al., 1997). Mehr Klärung konnten diesbezüglich Keel und Mitarbeiter liefern, die nachwies, daß IL-10 der durch proinflammatorische Zytokine induzierten Hemmung der Neutrophilenapoptose und damit der durch die exzessive Ausschüttung toxischer Granulakomponenten und reaktiver Sauerstoffmetaboliten bedingter Gewebsschädigung entgegenwirkt (Keel M. et al., 1997).

In einer Studie über die klinischen, hämatologischen und immunologischen Auswirkungen einer IL-10-Applikation beim Menschen zeigte 6 Stunden nach Injektion eine transiente Leukozytose (24-63% über den Basalwerten), die sich mit einem dosisabhängigen Rückgang (12-24%) der Sauerstoffradikalbildung in Neutrophilen deckte. Weiters wurde eine deutliche Hemmung (60-95%) der Endotoxin-induzierten IL-6- und IL-8-Produktion festgestellt. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, daß eine einmalige IL-10 Gabe ohne bedeutende Nebenwirkungen die in vivo Produktion von IL-6, IL-8 und IFN- γ herabsetzt (Fuchs AC et al., 1996).

Untersuchungen beweisen, daß zahlreiche Zytokine gemeinsam die für die Entzündungsantwort wichtige endotheliale Zytokinexpression unterschiedlich regulieren können. Diese Regulation könnte zur Verbesserung oder Lösung der Entzündungsantwort beitragen. Beispielsweise hemmt eine Vorbehandlung mit IL-10 die TNF- α - oder LPS-induzierte IL-6-Produktion von Gefäßendothelzellen (Chen CC, Manning AM, 1996).

In einer Studie mit IL-10 transgenen Mäusen konnte gezeigt werden, daß die Expression von IL-10 in den Langerhans-Inseln zu einer ausgeprägten Entzündung des Pankreas, ohne Entzündung der Langerhans-Inseln und ohne Diabetes, führt. Dieses Rekrutieren von Entzündungszellen in den Pankreas steht im deutlichen Gegensatz zu den biologischen in vitro Aktivitäten von IL-10, die nachweisen, daß IL-10 ein stark immunsuppressives Zytokin ist. Laut dieser Studie liefert IL-10 also in vivo ein potentes Rekrutierungssignal für die Leukozytenmigration und diese Wirkungen sind relevant für therapeutische in vivo Applikationen von IL-10 (Wogensen L et al., 1993).

In einer ähnlichen Studie wurde das IL-10 Gen inaktiviert, um die biologischen Aktivitäten dieses Interleukins zu untersuchen. Die Mäuse zeigten eine normale Entwicklung der Lymphozyten und der Immunantwort, waren aber wachstumsretardiert und litten unter chronischer Enterokolitis. Im Darm stellten sich eine extensive Mukosahyperplasie, Entzündungsreaktionen und veränderte MHC Klasse II Molekülexpression auf den Epithelien dar. Die Beobachtung, daß diese Tiere unter pathogenfreien Bedingungen nur eine lokale, auf den proximalen Darm begrenzte Entzündung aufwiesen, läßt vermuten, daß IL-10 ein wesentlicher Immunregulator des Intestinaltrakts ist und daß die generalisierte Darmentzündung in IL-10 defizienten Tieren auf durch Darmantigene ausgelöste unkontrollierte Immunantworten zurückzuführen ist (Kühn R et al., 1993).

1.2.4. Tumornekrosefaktor alpha (TNF α)

Vorkommen:

Unter physiologischen Bedingungen wird TNF- α von Makrophagen, T-Zellen und NK-Zellen nach Stimulation durch LPS zusammen mit IL-1 und anderen Monokinen sezerniert. Im Gegensatz zu CD8⁺-Zellen, die wenig oder kein TNF- α produzieren, stammt das von Lymphozyten produzierte TNF- α hauptsächlich aus T-Helfer-Zellen. Neben stimulierten peripheren (polymorphkernigen) Neutrophilen, können auch Endothelzellen, Astrozyten, glatte Muskelzellen und Fibroblasten TNF- α produzieren.

Die Synthese von TNF- α wird durch eine Vielzahl von Stimuli, wie Interferone, IL-2, GM-CSF, Substanz P, Bradykinin, Platelet Activating Factor (PAF), Immunkomplexe und Cyclooxygenase (COX)- Inhibitoren angeregt. Inhibiert wird die Synthese durch IL-6, TGF- β ,

Vitamin D3, Prostaglandin E2 (PGE2), Ciclosporin A und Antagonisten von PAF (Tracey KJ and Cerami A, 1993).

Wirkungen:

TNF- α zeigt ein breites Spektrum biologischer Aktivitäten und wirkt nicht speziesspezifisch. Er verursacht die Zytolyse oder Zytostase vieler Tumorzelllinien in vitro. Als bekannter „primer“ verstärkt TNF- α die Phagozytose und Zytotoxizität von polymorphkernigen Neutrophilen und moduliert die Expression vieler anderer Proteine, einschließlich IL-1 und IL-6. Über direkte chemotaktische Eigenschaften gibt es unterschiedliche Ansichten, jedoch gilt die stimulierende Wirkung auf die Migration Neutrophiler als gesichert (Bonavida B, 1991; Brouckaert P et al., 1993).

TNF-alpha ist zusammen mit IL-1 in vivo für vielfältige Veränderungen im Endothel verantwortlich. Es dämpft antikoagulatorische Mechanismen und begünstigt thrombotische Ereignisse und spielt somit in pathologischen Prozessen wie Venenthrombose, Arteriosklerose, Vaskulitis und disseminierter intravasaler Gerinnung eine wichtige Rolle. Diese Effekte sind nicht zuletzt durch die durch TNF α verstärkte Adhärenz von Neutrophilen an Endothelzellen begünstigt. Obwohl es in vitro das Wachstum von Endothelzellen sehr stark hemmt, ist es in vivo ein starker Angiogenesefaktor (Fater-Schröder M., 1987).

Als Wachstumsfaktor für normale humane Fibroblasten, unterstützt es deren Synthese von Collagenase und PGE 2. Dies wurde auch für Makrophagen beschrieben. In diesen stimuliert TNF-alpha die Phagozytosefähigkeit und die Synthese von Superoxiddismutase, sowie die Expression von den Stimulationsparametern HLA-Ag der Klasse 1 und 2. Auf den Zellmembranen aller Leukozyten werden durch TNF- α Differenzierungsantigene verstärkt ausgebildet. Ebenfalls stimulierend wirkt es auf die Produktion von IL-1, koloniestimulierender Faktoren, IFN- γ , den Arachidonsäurestoffwechsel und die Biosynthese von Kollagenase in Endothel- und Synovialzellen, wohingegen die TNF induzierte Synthese von IL-1 und die Endotoxin-induzierte Synthese von TNF selbst durch IL-6 supprimiert wird (Nacy CA et al., 1991).

Klinische Relevanz:

Obwohl TNF- α für die normale Immunantwort notwendig ist, führt eine Überexpression zu pathogenen Effekten. So ist es Hauptmediator für die bei Tumor- und AIDS-Patienten beobachteten Kachexie und mitverantwortlich für die Toxizität bei Gram-negativer Sepsis.

Zahlreiche vorklinische Studien weisen einen direkten zytostatischen und zytotoxischen Effekt auf Lymphknotenmetastasen von Mäusen sowie zahlreiche immunmodulatorische Effekte auf verschiedenste Immuneffektorzellen, einschließlich Neutrophiler, Makrophagen und T-Zellen nach (Beutler B 1999). Versuchen zur klinischen Anwendung zeigten die bislang besten Therapieergebnisse bei bestimmten Krebspatienten in der kombinierten Anwendung von TNF und zytotoxischen oder immunmodulatorischen Faktoren, speziell IFN- γ und möglicherweise IL-2 (Gnant M et al., 2000). TNF kann auch zur Verstärkung der Lymphokin-aktivierten Killerzell- (LAK)- Aktivität eingesetzt werden.

Vielversprechend erscheint zur Zeit die Anwendung von TNF-Hemmern bei rheumatoider Arthritis, entzündlichen Darmerkrankungen und Erkrankungen im Rahmen von Abstoßungsreaktionen, nicht aber bei Sepsis (Dinarello CA et al., 2000). Ein Fall von schwerem therapieresistentem M. Chron wurde beispielsweise mit monoklonalen Antikörpern gegen TNF- α behandelt, was eine Vollremission für einen Zeitraum von drei Monaten bewirkte (Derckx B et al., 1993). Was die Pathogenese der rheumatoiden Arthritis betrifft, scheint TNF- α eine gesteigerte Synovialzellproliferation und die Ausschüttung sekundärer Mediatoren, die Entzündungszellen anlocken und an der Neoangiogenese und dem Prozeß der Gelenkszerstörung beteiligt sind, auszulösen (Beutler BA, 1999).

1.3. Neutrophile Granulozyten

1.3.1. Funktion

Neutrophile Granulozyten haben einen Durchmesser von ca.12 μm , machen 55-68 % der Leukozyten des Blutes aus und haben eine kurze Lebensdauer. Ihre Halbwertszeit im peripheren Blut liegt bei etwa 7,5 Stunden.

Neutrophile spielen eine entscheidende Rolle bei der initialen Immunantwort. Sie werden über die Zirkulation im gesamten Organismus verteilt und sind sozusagen immer rasch zur Stelle. Im Knochenmark sind in etwa 100 Billionen Granulozyten enthalten, die bei Bedarf in die Zirkulation ausgeschüttet werden können. Sie sind nicht nur für die Beseitigung von Bakterien zuständig, die sie phagozytieren, abtöten und mit Hilfe der verschiedenen Enzyme ihrer Granula verdauen, sondern sie sind auch zentrale Effektorzellen, die auf Mediatoren in ihrer Umgebung reagieren und Zytokine produzieren können. Diese Rolle scheint sowohl für die Anlockung weiterer Neutrophiler als auch für den Ablauf konventioneller Immunreaktionen an Entzündungsherden wichtig zu sein (Strieter RM et al., 1992).

1.3.2. Granulopoese

Der neutrophile Granulozyt entwickelt sich im Knochenmark ausgehend von der hämatopoetischen Stammzelle. Seine Ausreifung zur Endzelle dauert 10-14 Tage und läuft über folgende Vorstufen ab:

- Myeloblast (keine oder wenige Granula)
- Promyelozyt (Auftreten primärer Granula)
- Myelozyt (spezifische Granula)
- Metamyelocyt (Jugendlicher, nicht mehr teilungsfähig)
- stabkerniger Neutrophiler (nicht segmentiert)
- segmentkerniger Neutrophiler

Die Mediatoren der Stammzellendifferenzierung sind noch nicht vollständig bekannt, es wird jedoch angenommen, daß Stammzellfaktor (SCF), IL-1, IL-6 und IL-11 beteiligt sind. Durch Kolonie-Stimulierende-Faktoren (CSF) erfolgt die Differenzierung in der myeloischen Reihe. (Ruscetti FW et al., 1999)

1.3.3. Aufbau

1.3.3.1. Zellkern

Der Kern des reifen Neutrophilen besteht aus 2-5 (meist 3) Segmenten, die untereinander durch feine Chromatinfäden verbunden sind. Jugendformen, die etwa 2% der Neutrophilen des zirkulierenden Blutes ausmachen, haben einen stabförmigen Kern. Neutrophile, die mehr

als 5 Segmente aufweisen, bezeichnet man als hypersegmentiert. Dies sind in der Regel überalterte Zellen, da eine Reifung der Neutrophilen mit einer Zunahme der Zahl der Kernsegmente einhergeht.

1.3.3.2. Granula

Im Zytoplasma der Neutrophilen finden sich pro Zelle 50-200 Granula. Diese sind von einer Membran umgeben, haben 3-5 μm Abstand zum Plasmalemm und fehlen in den Pseudopodien. Zu unterscheiden sind primäre, sekundäre und tertiäre Granula anhand ihrer unterschiedlichen Speichersubstanzen.

Primäre Granula	Sekundäre Granula	Tertiäre Granula
Myeloperoxidase	Lysozym	Gelatinase
Kathepsin B/D	Kollagenase	Membrangeb. Rezeptoren
β -Glucosaminidase	Lactoferrin	– Laminin Rezeptor
β -Glucuronidase	Vit.B ₁₂ -bindendes Protein	– C3bi-Rezeptor
α -Mannosidase	Plasminogenaktivator	
	Cytochrom b	
Kathepsin G	Membrangeb. Rezeptoren	Cytocrom b
Elastase	– FMLP-Rezeptor	β 2-Mikrotubulin
	– C3bi-Rezeptor	Diaminoxidase
		H ⁺ ATPase
		DAG-Lipase
Defensin	– Laminin-Rezeptor	
Baktericides Protein (BPI)		
Lysozym	Alkalische Phosphatase	
Azurocidin		
Proteinase 3	Gelatinase	
α -Fucosidase		
alkalische Phosphatase		
Phospholipase A2, C, D		

(nach Edwards SW, 1994)

1.3.3.3. Membranrezeptoren

Neutrophile Granulozyten exprimieren an ihrer Zellmembran eine Reihe von Rezeptoren, die der Adhäsion an Endothelzellen, der Phagozytose von Bakterien und anderen Mikroorganismen und der Erkennung von Vorgängen in der Umgebung dienen (Allen R.C., Stevens D.L., 1992). Man unterscheidet Rezeptoren für gebundene Liganden, das sind die Adhärenzproteine und Rezeptoren für die Fc-Domäne des IgG, von Rezeptoren für soluble Liganden, die unter anderem der Chemotaxis dienen.

Rezeptoren für gebundene Liganden

Rezeptor	Ligand	Funktion
CD11b/CD18 (CR3, MAC-1)	ICAM-1, C3bi, Fibrin, mikrobielle Oberflächen	Diapedese Phagozytose
CD11a/CD18 (LFA-1)	ICAM-1, ICAM-2 am Endothel	Diapedese
CD11c/CD18 (p 150-95)	Fibrin, mikrobielle Oberflächen, ICAM-1	Diapedese Phagozytose
PECAM (CD31)	PECAM am Endothel	Diapedese
CR1 (CD35)	C3b	Komplementregulation, Phagozytose
L-Selectin	Endotheliale Liganden	Diapedese
Fc γ R I/II/III (CD 16/32/64)	IgG	Phagozytose
CD14, Toll – Rezeptoren	Lipopolysaccharid	Bakterienerkennung

Die Adhäsionsproteine dienen der Interaktion zwischen neutrophilen Granulozyten und Endothelzellen. Sie werden in 2 Gruppen unterteilt.

β_2 -Integrine

β_2 -Integrine werden in 3 Subtypen unterteilt, die eine gemeinsame β -Untereinheit, das CD18-Antigen, und unterschiedliche α -Untereinheiten, CD11a, 11b, 11c, haben (Larson R.S. et Springer T.A., 1990).

- LFA-1 (lymphocyte function associated antigen 1), CD11a/CD18
- MAC-1 (macrophage 1), CD11b/CD18

- P150-95, CD11c/CD18

An Endothelzellen binden alle 3 Subtypen über ICAM-1. An ICAM-2 kann nur LFA-1 binden. Normalerweise sind die β 2-Integrine der Plasmamembran in einem funktionell „inaktiven“ Status. Bei Einwirkung eines geeigneten Stimulus erfolgt die Konversion in den aktiven Zustand, die wahrscheinlich durch Konformationsänderung mit Phosphorylierung der β -Untereinheit erfolgt.

L-Selectin

L-Selectin ist ein transmembranöses Glykoprotein, das an kohlenhydrathaltige Liganden der Endothelzellen bindet. Es hat große Bedeutung im initialen Stadium der Adhäsion und in weiterer Folge bei der transendothelialen Migration.

Toll-Rezeptoren

Vor wenigen Jahren wurden dem *Drosophila* Toll-Rezeptoren in Säugetieren entdeckt und als Toll-like Rezeptoren bezeichnet (Medzhitov R et al., 1997; Rock FL et al., 1998).

Der erste charakterisierte humane Toll-Rezeptor (TLR4) induziert die Aktivierung des NF- κ B Signalweges. Über diesen Signalweg induziert die Aktivierung des TLR4 die Expression einer Vielzahl an Zytokinen und kostimulierender Moleküle, die für die erworbenen Immunantworten entscheidend sind (Medzhitov R et al., 1997). Der erste Hinweis auf eine Verbindung zwischen TLR4 und dem angeborenen Immunsystem war der Nachweis, daß er der Rezeptor für Lipopolysaccharide (LPS). Dies trifft derzeit für zumindest zwei Mitglieder der Toll-Familie, dem TLR4 und dem TLR 2, zu (Schuster JM, Nelson PS, 2000).

Aber TLR4 ist nicht das einzige Protein, das an der LPS-Erkennung beteiligt ist. LPS interagieren zunächst mit einem Serumprotein, das LPS-binding Protein genannt wird, das LPS zum CD14 (Wright SD et al., 1990; Haziot A et al., 1996; Haziot A et al, 2001), einem Glykoprotein, der als Glykosyl-Phosphatidylinositol Oberflächenmolekül/Rezeptor auf Monozyten, Makrophagen, B-Zellen und Granulozyten exprimiert wird (Haziot A et al., 1988; Haziot A et al., 1993), transferiert (Wright SD et al., 1990). Ein anderes Protein, das MD-2, wird für die TLR4-vermittelte LPS Erkennung benötigt, was dazu führt, daß der LPS Erkennungskomplex mindestens aus drei Komponenten, dem CD14, dem TLR4 und dem MD-2 besteht. TLR4 und MD-2 sind konstitutionell miteinander verbunden, wohingegen CD14 vermutlich nach LPS Bindung hinzugefügt wird.

Rezeptoren für soluble Liganden

Rezeptor	Ligand	Funktion
IL-8 Rezeptor	IL-8	Chemotaxis
fMLP Rezeptor	fMLP	Chemotaxis
C5a Rezeptor	C5a	Chemotaxis
PAF Rezeptor	PAF	Chemotaxis
LTB ₄ Rezeptor	LTB ₄	Chemotaxis

Als wichtigste Chemotaxis-vermittelnde Rezeptoren sollen der IL-8- und der fMLP-Rezeptor kurz vorgestellt werden:

IL-8-Rezeptor:

1991 wurden zwei IL-8-Rezeptoren, der CXC chemokine receptor 1 (CXCR1) oder IL-8 Rezeptor A (IL-8RA) und der CXCR2 oder IL-8RB, identifiziert (Holmes WE et al., 1991; Murphy PM & Tiffany HL, 1991). Beide Rezeptoren gehören zur Familie der G-Protein gekoppelten, sieben transmembranären Rezeptoren und sind zu 77 % homolog in ihrer Aminosäuresequenz. Die Expression dieser Rezeptoren in Säugetierzellen zeigte, daß CXCR2 hohe Bindungsaffinität zu IL-8, GRO α,β,γ , neutrophil-activating protein-2 (NAP-2) und epithelial-cell-derived neutrophil attractant-78 (ENA-78) hat/aufweist, wohingegen CXCR1 nur IL-8 mit hoher und die anderen Chemokine mit niedriger Affinität bindet (Ahuja SK & Murphy PM, 1996; Bozic CR et al., 1996; Lee J et al., 1992). Die unterschiedlichen Chemokinaktivitäten können u.a. anhand von Calcium-Spiegel-Messungen bestimmt werden, da eine Rezeptorbindung die Mobilisierung von Calcium aus intrazellulären Speichern und den damit verbundenen schnellen transienten Spiegelanstieg induziert (Murphy PM & Tiffany HL, 1991). Der CXCR2 bindet IL-8 im Vergleich zum CXCR1 mit geringerer Affinität und weist zum im Folgenden beschriebenen fMet-Leu-Phe- (fMLP-) Rezeptor eine 29 % ige Homologie der Aminosäuresequenz auf (Holmes WE et al., 1991).

fMLP-Rezeptor:

N-formyl Peptide, wie beispielsweise fMet-Leu-Phe, sind eine der chemotaktisch aktivsten Substanzen für phagozytierende Leukozyten. Die Interaktion der N-formyl Peptide mit ihren spezifischen Zelloberflächenrezeptoren wurde aufs Eingehendste untersucht und stellt heute ein Modellsystem für die Charakterisierung der G-Protein gekoppelten Signaltransduktion in Phagozyten dar. Der fMLP-Rezeptor hat die Eigenschaft bereits bei äußerst geringen

Ligandenkonzentrationen (10^{-10} bis 10^{-8} M) gerichtete Bewegung auszulösen, wohingegen bei höherer Ligandenkonzentration (10^{-7} bis 10^{-6} M) eine Hemmung der Zellbewegung und der Aktivierung sekretorischer Prozesse eintritt (Lew PD, 1990). Untersuchungen mittels fMLP-Bindungsstudien wiesen das Vorhandensein von ca. 55.000 Rezeptoren für diese chemotaktisch aktive Substanz pro Granulozyt und eine durchschnittliche Bindungskonstante (K_d) von 20nM nach. Die Phagozytenstimulation durch chemotaktisch aktive Substanzen wie fMLP führt also zu einer G-Protein gekoppelten Aktivierung membranständiger Phospholipasen, wobei bzgl. der Aktivierung Neutrophiler drei Arten, die Phospholipase C, A2 und D beschrieben worden sind. Diese spalten Phosphatidyl-Inositol-(4,5)Bisphosphat in Diacylglycerol (DG) und Inositol(1,4,5)Trisphosphat, die ihrerseits als second messenger fungieren. IP3 führt durch Bindung an spezifische Calciumkanäle zur Calciumausschüttung aus intrazellulären Speichern (Berridge, 1993) und dem damit verbundenen charakteristischen transienten Anstiegs des Zytosol-Calcium-Spiegels. DG aktiviert in Verbindung mit dem ausgeschütteten Calcium die Proteinkinase C (PKC). PKC- β ist das in Neutrophilen am meisten vorkommende PKC Isoenzym, das auf die Stimulation der Zelle durch fMLP und die direkte Rezeptorstimulation durch Phorbolster mit einer Translokation vom Zytosol in die Membran reagiert (Majumdar et al., 1991). Eine fMLP-Stimulation aktiviert auch Calcium-unabhängige, Phosphatidylserine und DG-abhängige PKC Isoenzyme, deren Funktion in der Regulation der Neutrophilenaktivierung allerdings noch nicht ausreichend geklärt ist (Stasia et al., 1990; Majumdar et al., 1991). Außerdem führt die PKC-Aktivierung zu einer schnellen und transienten Phosphorylierung eines spezifischen Zielobjekts, des myristoylated Alaninreichen C Kinase Substrates (Thelen et al., 1990, 1991). Diese Funktion könnte für die Regulierung der reversiblen Anbindung der Aktinfilamente an die Plasmamembran wichtig sein (Thelen et al., 1991; Hartwig et al., 1992). In Neutrophilen wurden neben der PKC auch eine fMLP induzierte Tyrosin-Phosphorylierung und die Aktivierung zweier unterschiedlicher mitogen-aktivierter Protein- (MAP-) Kinasen entdeckt (Grinszein S and Furuya W, 1992). Dieser MAP-Kinase Signaltransduktionsweg scheint auch von IL-8 und Ca²⁺ stimuliert zu werden (Buhl et al., 1995; Knall et al., 1996).

1.4. Hypothermie

Unter Hypothermie versteht man per definitionem das Abkühlen der Körperkerntemperatur unter 36°C. Abzugrenzen von der perioperativen Hypothermie, die das Kernthema dieser Dissertation darstellt, sind die akzidentielle Hypothermie in der Notfallmedizin, die Hypothermie während extrakorporalem Bypass bei herzchirurgischen Operationen und die moderate Hypothermie als Therapiekonzept in der Behandlung der zerebralen Ischämie und des Schädel-Hirn-Traumas.

1.4.1. Akzidentielle Hypothermie

Eine akzidentielle Hypothermie kann als unbeabsichtigtes Absinken der Körperkerntemperatur unter 35°C bei einer Kälteexposition von Personen ohne intrinsische Störung der Wärmeregulation definiert werden. Sie gilt als prognostisch ungünstiges Zeichen für das Überleben. Eine Wiedererwärmung ist so bald wie möglich einzuleiten (Segers MJM et al., 1998).

1.4.2. Hypothermie während extrakorporalem Bypass

Eine Untersuchung an 20 Patienten ergab, daß die in der Jugularvene gemessene Sauerstoffsättigung in der normotherm gehaltenen Gruppe in der 20.Minute auf 41,5+/-2,4% und auf 43,8+/-2,8% in der 40.Minute verglichen mit der Kontrollgruppe (53,9+/-5,4%, P<0,05) nach Einsatz der Herz-Lungen-Maschine abfiel. In der auf ca. 32°C gehaltenen Gruppe war kein Abfall zu verzeichnen. Somit ist die Sauerstoffversorgung des Gehirns während milder Hypothermie besser als unter normothermem kardiopulmonalem Bypass (Okano N et al., 2000).

1.4.3. Moderate Hypothermie als Therapiekonzept in der Behandlung der zerebralen Ischämie und des Schädel-Hirn-Traumas

Aus tierexperimentellen Untersuchungen in fokalen und globalen Ischämiemodellen ist bekannt, daß durch milde (34-36°C) und moderate (30-33°C) Hypothermie sekundäre ischämische Schädigungen verhindert, die Infarktgröße reduziert und auch die neurologische Rehabilitation verbessert werden (Busto R et al., 1989; Coimbra C et al., 1996; Coimbra C, Wieloch T, 1994; Karibe H et al., 1994). Erste neurochirurgische Studien zeigten einen günstigen Effekt von milder und moderater Hypothermie nach Schädel-Hirn-Trauma (Marion DW et al., 1997). Ebenso scheint sich die Hypothermiebehandlung günstig auf den klinischen Verlauf von Schlaganfallpatienten auszuwirken, da moderate Hypothermie einen erhöhten intrakraniellen Druck (ICP) zu reduzieren (Marion DW et al., 1997; Shiozaki T et al., 1993) und somit den sonst unkontrollierbar ansteigenden ICP, der die Haupttodesursache nach

ausgedehnter zerebraler Ischämie darstellt (Bounds JV et al., 1981; Hacke W et al., 1996) abzuwenden vermag.

Ein bisher jedoch ungelöstes Problem in der Hypothermiebehandlung ist die Wiedererwärmung. Es besteht ein erhöhtes Risiko für eine zusätzliche Hirnschädigung, da der zerebrale Metabolismus die Sauerstoffversorgung bei unterschiedlichen Temperaturen übertreffen kann (Ausman JI et al., 1993). Zudem kann eine plötzliche Vasodilatation zu einem sog. Wiedererwärmungsschock führen, der bei Schädel-Hirn-traumatisierten Patienten auch von einem ICP-Anstieg begleitet sein kann (Hayashi N et al., 1994; Shiozaki T et al., 1993). Dieses „Rebound“-Phänomen nach Wiedererwärmung deutet darauf hin, daß Hypothermie die sekundären ischämischen Schädigungen nur verzögert, aber zu keiner substantiellen Verbesserung führen könnte. Busto und Mitarbeiter zeigten in einem globalen Ischämiemodell der Ratte, daß das Kühlen des Gehirns innerhalb von 5 min nach Ischämie über 3h den Neuronenverlust der CA1-Region des Hippocampus nach 3 Tagen um 50% gegenüber normotherm behandelten Tieren senkt (Busto R et al., 1989). In der Folge zeigte sich jedoch, daß diese Neuroprotektion nicht dauerhaft ist; zwei Monate nach Ischämie ließ sich nämlich keine signifikante Reduktion der hippokampalen Schädigung nachweisen (Dietrich WD et al., 1993). Diese Beobachtung wurde auf einen verzögerten Untergang der Neuronen zurückgeführt, der durch sekundäre inflammatorische Prozesse und apoptotische Vorgänge erklärt wurde. In einer Untersuchung von Schwab und Mitarbeiter zeigte allerdings die Mehrheit der Patienten niedrigere ICP-Werte als zu Beginn der Therapie, eine Tatsache, die gegen eine bloße Verzögerung der dann doch eintretenden sekundären Schädigung spricht, die wahrscheinlich durch einen hypermetabolen Zustand nach induzierter Hypothermie zu erklären ist (Schwab S et al., 1998). Ein ähnliches Phänomen wurde auch schon bei Patienten nach Eingriffen an der Herz-Lungen-Maschine beschrieben (Chiara O et al., 1987).

1.4.4. Perioperative Hypothermie

Perioperative Hypothermie, das Kernthema dieser Arbeit, ist ein bei längeren Eingriffen häufig anzutreffendes Phänomen. Das im Wachzustand vorhandene Fließgleichgewicht wird in Narkose von zwei Mechanismen beeinflusst. Eine um ca. 30% verminderte Wärmeproduktion (ca. 60 kcal/h) und eine vermehrte Wärmeabgabe (ca. 210 kcal/h) bedingen eine negative Wärmebilanz und damit den intraoperativen Wärmeverlust.

Die Körperkerntemperatur nimmt während einer Narkose einen typischen Verlauf. In der ersten Stunde nach Narkosebeginn fällt sie um ca. 1,6°C ab. Ursache ist zu 80% die Umverteilung der Körperwärme in die vasodilierte Körperperipherie (Matsukawa T et al., 1995). Diese Vasodilatation ist Folge der Einflußnahme von Anästhetika auf den Vasotonus und die Thermoregulation. Anschließend fällt die Körperkerntemperatur nur noch um ca.

1,1°C pro Stunde ab, bis sich wieder nahezu ein Gleichgewicht zwischen Wärmeproduktion und -verlust auf erniedrigtem Niveau einstellt.

Perioperative Hypothermie wird sowohl unter Allgemeinanästhesie als auch unter rückenmarksnaher Anästhesie beobachtet, obgleich sie bei letzterer mit einer Schwellenreduktion für Vasokonstriktion und Kältezittern (über dem Blockniveau) um etwa 0,6°C geringer ausgeprägt ist (Annadata RS et al., 1995; Kurz A. et al., 1993; Ozaki M. et al., 1994).

Unter Allgemeinanästhesie verursachen sowohl intravenös zu applizierende als auch volatile Anästhetika eine gesetzmäßige Störung der Thermoregulation nach einem reproduzierbaren Muster: Die Schwellentemperatur für Schwitzen und Vasodilatation werden erhöht, während diejenige für Vasokonstriktion und Kältezittern gesenkt werden (Annadat RS et al., 1995; Kurz et al., 1995; Matsukawa T. et al., 1995; Washington D et al., 1993; Xiong J. et al., 1996). Diese Veränderungen resultieren in einer Erweiterung des Zwischenschwellenbereichs um das 5-20fache (1-4°C), in Abhängigkeit von der Dosierung des Anästhetikums.

Die volatilen Anästhetika Iso-, Sevo- und Desfluran erhöhen die Schwelle für Schwitzen linear und senken die Schwelle für Vasokonstriktion und Kältezittern auf nicht lineare Weise um 2-4°C in Abhängigkeit der Dosierung. Das neue Anästhetikum Xenon reduziert die Schwellen für Vasokonstriktion und Kältezittern noch mehr als die oben genannten volatilen Anästhetika (Annadat RS et al., 1995; Ozaki M et al., 1995; Xiong J et al., 1996).

Auch i.v.-Anästhetika und Opioide wie z.B. Propofol oder Alfentanil erhöhen die Schwelle für das Auftreten von Schwitzen linear zur Dosis. Anders als volatile senken intravenöse Anästhetika die Schwelle für Vasokonstriktion und Kältezittern linear zur Dosis (Kurz A et al., 1995; Matsukawa T. et al., 1995). Ein einzigartiges Verhalten unter den bisher getesteten Substanzen zeigt Midazolam, das nur einen geringen Effekt auf die Thermoregulation ausübt (Kurz A. et al., 1995).

Die Kombination von Allgemein- und rückenmarksnaher Anästhesie führt zur Addition der jeweiligen Wärmeverluste. Bei einer Allgemeinanästhesie stagniert nach einer gewissen Zeit der Wärmeverlust und eine Plateauphase wird erreicht, während im Falle einer Kombinationsanästhesie der Temperaturabfall kontinuierlich anhält, da die sympathikolytisch induzierte Vasodilatation bestehen bleibt (Joris J. et al., 1994).

1.4.5. Auswirkungen von Hypothermia auf Organfunktionen

Kardiovaskuläres System

Das kardiovaskuläre System scheint schon auf geringe Abfälle der Körperkerntemperatur empfindlich zu sein. Bei Patienten mit hohem kardialen Risiko ist eine Reduktion der Körpertemperatur auf unter 35°C mit einem zwei- bis dreifach erhöhtem Risiko einer frühen postoperativen Myokardischämie assoziiert (Frank et al., 1993).

In einer nachfolgenden, prospektiv randomisierten Studie konnte gezeigt werden, daß milde Hypothermie zu einer signifikant höheren Inzidenz an Myokardischämien, instabiler Angina pectoris, Myokardinfarkten und ventrikulären Tachykardien führt. Die normotherm gehaltene Kontrollgruppe zeigte dabei ein um 55% niedrigeres Risiko der genannten kardialen Ereignisse (Frank et al., 1997). Frank und Mitarbeiter sehen diese Beobachtungen in direktem Zusammenhang mit den signifikant erhöhten Norepinephrinspiegeln. Dementsprechend lag auch der Blutdruck der Hypothermiepatienten signifikant über dem der gewärmten Gruppe. Das Kältezittern und der dadurch verursachte Anstieg des Sauerstoffverbrauchs stellt eine zusätzliche Belastung dar, die aber nicht ganz so bedeutsam war wie man bisher annahm. Nach der Wiedererwärmung zeigt sich eine weitere Problematik: ist der Sollwert der Kerntemperatur wieder erreicht, vermindert sich die periphere Vasokonstriktion. Die damit verbundene erneute Volumenumverteilung führt zur Demaskierung einer relativen Hypovolämie, was eine beträchtliche Volumenzufuhr in der postoperativen Phase erforderlich macht, um hypotensive Phasen zu vermeiden.

Vorhofflimmern mit Spontanumkehr zum Sinusrhythmus nach Erreichen der Normothermie werden erst für Temperaturen unter 32°C, ventrikuläre ektope Rhythmen und Kammerflimmern erst für Temperaturen unter 30°C beschrieben (Safar P. et al., 1996).

Bei einer Hypothermie von 29°C wurde bei Affen der cerebrale Blutfluß (CBF) auf 60-70 % reduziert, der auch nach Rückführung auf normotherme Werte nur noch auf 50 % oder weniger der Ausgangswerte anstieg. Es wurde spekuliert, ob über die durch Hypothermie (29°C) erhöhte Blutviskosität Kollateralkreisläufe komprimiert würden (Michenfelder JD, Milde JH, 1977).

Eine Gruppe um Mizushima konnte in tierexperimentellen Reanimationsversuchen nach Traumen und Blutungen unter hypothermen Bedingungen herabgesetzte linksventrikuläre Parameter, ein verringertes Herz-Minuten-Volumen (HMV) und verminderten regionalen Blutfluß in verschiedenen Organen nachweisen. Ein Wiedererwärmen steigerte die Herzleistung signifikant, das HMV stieg von 16,2 +/-1,4 mL/min unter Hypothermie auf 22,3 +/-1,4 mL/min per 100 gKG und der absolute Leberblutfluß stieg von 117,5 +/-5,3 auf 166,0 +/-9,3 mL/min per 100 g Gewebe (Mizushima Y. et al., 2000).

Gerinnungssystem

In vitro-Studien haben gezeigt, daß perioperative Hypothermie intra- und postoperative Blutungen verstärken kann. Beschrieben wurden eine herabgesetzte Thrombozytenfunktion (Michelson AD. et al., 1994), eine reduzierte Aktivität der Gerinnungskaskade (Reed L. et al., 1992) und eine Verlängerung der Prothrombinzeit und der partiellen Thromboplastinzeit (pTT) (Rohrer M. et al., 1992). Die Störung der Thrombozytenfunktion wird auf eine defekte Ausschüttung von Thromboxan und eine Veränderung der für die Adhäsion der Thrombozyten wichtigen Oberflächenproteine zurückgeführt (Michelson AD et al., 1994). Die Beeinträchtigung des intrinsischen und extrinsischen Gerinnungssystems bei Patienten mit Hypothermie unterschiedlicher Genese wird laborchemisch in den Standardtest kaum nachgewiesen, da diese bei einer Standardtemperatur von 37°C durchgeführt werden und das Plasma unterkühlter Patienten somit aufgewärmt wird. Die Kapazität der Gerinnungsfaktoren ist jedoch nach Michaelis-Menten temperaturabhängig. Werden dieselben Tests mit niedrigeren Temperaturen durchgeführt, treten pathologische Werte auf. Normalwerte täuschen eine falsche Situation vor und werden der klinischen Situation nicht gerecht. Sie sagen nur aus, daß die plasmatische Gerinnung intakt ist, wenn der Patient normotherm wäre (Rohrer MJ. et al., 1992) .

In vivo-Studien zeigen bei einer Reduktion der Körperkerntemperatur um weniger als 2°C eine Erhöhung des Blutverlustes um etwa 500ml (Schmied H. et al., 1996). Selbst ein minimaler Temperaturabfall auf 36,1°C erhöht den perioperativen Blutverlust um 200 ml bei orthopädischen Patienten (Winkler M et al, 1997). Resnick und Mitarbeiter fanden bei 19% (Resnick DK. et al., 1994), Schwab und Mitarbeiter bei 23% (Schwab S. et al., 1998) der hypotherm behandelte Schädel-Hirn-Trauma Patienten einen Thrombozytenabfall unter 100000 Zellen/ μ l.

Nieren- und Pankreasfunktion, Serumenzyme und -elektrolyte

Schwab und Mitarbeiter fanden eine unbeeinflusste Nierenfunktion, aber signifikant erhöhte Serumamylase (von 200+-80 U/l auf 1100+-250 U/l) und -Lipase (von 140 +-45 U/l auf 600+-80 U/l) (Schwab S. et al., 1998). Der Zusammenhang zwischen der Entwicklung einer Pankreatitis und Hypothermie ist noch ungeklärt. In verschiedenen Fallberichten werden akute Pankreatitiden nach akzidentieller Hypothermie beschrieben (Duguid H. et al., 1996; Foulis AK., 1982). Durch Oberflächenkühlung des Pankreas von Versuchstieren konnte sowohl enzymatisch wie histologisch nachgewiesen eine Pankreatitis erzeugt werden (Hirano T. et al., 1992). Einen reversiblen und klinisch asymptomatischen Anstieg der Pankreasenzyme beschreiben auch Metz und Mitarbeiter unter Hypothermie nach Schädel-Hirn-Trauma (Metz C. et al., 1996).

Die Serumelektrolyte bleiben, abgesehen von einer Abnahme des Serumkaliumwerts, unter Hypothermie unverändert. Schon Carli und Mitarbeiter haben 1989 die Veränderungen des Gesamtkaliums als Ausdruck der Körpermasse gemessen. Das Gesamtkörperkalium wurde gemessen als γ -Strahlung des spontan radioaktiven ^{40}K , welches etwa 0,012% der stabilen Isotopen ^{38}K und ^{41}K darstellt. Demnach nahm bei hypothermen Patienten der Gesamtkörperkaliumgehalt am 4. und 7. postoperativen Tag deutlicher ab verglichen mit normothermen Patienten. Wenn dies als Maß der postoperativen Katabolie gewertet werden darf, so war diese bei Normothermie deutlich geringer ausgeprägt (Carli F et al., 1989).

Metabolismus von Anästhetika und Muskelrelaxanzien

Heier und Mitarbeiter konnten 1991 zeigen, daß eine Hypothermie von $34,3^{\circ}\text{C}$ die Wirkzeit von Vecuronium um mehr als das doppelte, die Erholungszeit von 11 auf 23 min verlängert. Im Rahmen der gleichen Untersuchung konnten Leslie und Mitarbeiter 1994 zeigen, daß eine Dosis Propofol von 1mg/kg als Bolus plus 5mg/kg/h als Infusion bei Testpersonen in milder Hypothermie zu 28% höheren Spiegeln führte als bei normothermen Vergleichspersonen. Ursächlich hierfür führen die Autoren einen um ca. 29% reduzierten Leber-Blutfluß an.

Diese wenigen Beispiele zeigen, daß auch bei nur mild hypothermen Patienten mit einer verstärkten und verlängerten Wirkung der Anästhetika und Adjuvanzen gerechnet werden muß.

Immunsystem

Im Rahmen der Untersuchung der Wirksamkeit moderater Hypothermie nach ausgedehnter zerebraler Ischämie durch Schwab und Mitarbeiter trat bei 40% der Patienten eine schwere Pneumonie auf. Hinweise auf eine generalisierte Entzündungsreaktion mit Anstieg des CRP (von initial $2,5 \pm 0,9\text{mg/l}$ auf $17,4 \pm 8,3\text{mg/l}$), der Leukozyten (im Mittel von $6500 \pm 2300/\mu\text{l}$ auf $15000 \pm 6500/\mu\text{l}$) und des Fibrinogens (von initial $2,4 \pm 0,8\text{g/l}$ auf $4,6 \pm 2,3\text{g/l}$) fanden sich bei 56% der Patienten (Schwab S et al., 1998).

Perioperative Hypothermie wird mit einem erhöhten Proteinverlust (Carli F et al., 1989) und mit einer reduzierten Kollagensynthese (Kurz A et al., 1996) in Zusammenhang gebracht. Die Phagozytosekapazität neutrophiler Granulozyten sinkt ebenso ab wie die Produktion reaktiver Sauerstoffmetaboliten (ein Maß für zelluläre Immunabwehr) (Wenisch C et al., 1996). Die durch Hypothermie verursachte thermoregulatorische Vasokonstriktion vermindert die Sauerstoffspannung in subkutanen Geweben (Sheffield CW et al., 1997).

Diese Effekte werden als Ursachen für eine herabgesetzte Wundheilungsrate und vermehrte postoperative Wundinfektionen angesehen. Tatsächlich erhöht milde perioperative Hypothermie die Inzidenz postoperativer chirurgischer Wundinfektionen um das 3-fache und

führt darüber hinaus zu einer Verlängerung des Klinikaufenthaltes (Hynson J, Sessler DI, 1992).

In einer von Kurz A und Mitarbeitern 1996 durchgeführten prospektiven, randomisierten klinischen Untersuchung bei 200 Patienten, die sich einer Kolonresektion unterziehen mußten, wurde bei 104 Patienten intraoperativ die Normothermie mittels Warmluftdecken aufrecht erhalten. Diese Patienten zeigten eine signifikant niedrigere Rate postoperativer Infektionen, sie konnten eher oral ernährt und die Wundnähte früher entfernt werden, was den Krankenhausaufenthalt um ca. 3 Tage verkürzte verglichen mit Patienten, die perioperativ eine Hypothermie erlitten haben. Es wird vermutet, daß die temperaturabhängig verminderte Kapazität der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten, Bakterien durch reaktive Sauerstoffradikale abzutöten, die Ursache für die größere Infektanfälligkeit der hypothermen Patienten ist. Narz und Mitarbeiter haben bei den schon oben erwähnten kolonchirurgischen Eingriffen die Phagozytoseaktivität und die oxidative Kapazität der Neutrophilen mittels Dihydrorhodaminkonversionstest gemessen. Dabei konnte eine lineare Abhängigkeit zwischen der oxidativen Kapazität und der Körpertemperatur nachgewiesen werden (Narz E et al., 1995).

Schon Biggar und Mitarbeiter konnten 1984 in Tierexperimenten einen signifikanten Neutrophilenabfall von 6500 Zellen/ μ l bei 37°C auf 2300 Zellen/ μ l bei 29°C und eine ebenso signifikante Migrationshemmung von 7,1 cm unter 45facher Vergrößerung $+1,1$ bei 37°C auf $2,7 \pm 0,6$ nachweisen. Vergleichbare Ergebnisse fand die Gruppe um Issekutz bereits 1977. Clardy und Mitarbeiter fanden 1985 in hypothermen Kindern eine deutlich herabgesetzte Neutrophilenmigrationfähigkeit gegenüber einem chemotaktischen Stimulus (45 \pm 10% Hemmung), eine geringere Staphylokokkeningestion (22 \pm 5% Hemmung) und eine Verringerung der metabolischen Aktivität neutrophiler Granulozyten gemessen anhand der Superoxidproduktion (35 \pm 10% Hemmung) oder anhand der Chemilumineszenz (18 \pm 8% Abfall).

Im Rahmen einer Untersuchung von 60 abdominalchirurgischen Patienten konnte in der hypothermen Gruppe eine supprimierte mitogen-induzierte Leukozytenaktivierung und verringerte IL-1 β und IL-2-Spiegel beobachtet werden. Bzgl. IL-6 und TNF α - Spiegel hatten beide Gruppen einen postoperativen Anstieg zu verzeichnen (Beilin B. et al., 1998).

Einen signifikanten Anstieg des IL-6-Spiegels mit Maximalwerten nach Wiedererwärmung fand auch die Gruppe um Hansen im Rahmen einer Melanomresektion am Auge bei auf 32°C gekühlten Patienten (Hansen D et al., 1999).

Betrachtet man in der Untersuchung von Kurz und Mitarbeiter 1996 ausschließlich die nichtinfizierten Patienten, so läßt sich auch hier ein signifikanter Unterschied bzgl. Zeitpunkt der Nahrungsaufnahme, der Fädenentfernung und der Krankenhausentlassung nachweisen.

Diese prospektive Untersuchung bestätigt in vollem Umfang die Ergebnisse einer früheren, retrospektiven Untersuchung von Bush und Mitarbeiter 1995, die bei 262 elektiv operierten Bauchaortenaneurysmen eine Gruppe von 66 hypothermen Patienten definieren konnten, die signifikant mehr Transfusionen, Vasopressoren benötigten, die vier Tage länger auf der Intensivstation lagen und insgesamt einen um neun Tage längeren Krankenhausaufenthalt hatten als die normothermen Patienten (Bush HL et al., 1995).

Tab.1: Übersicht über die Nebenwirkungen milder perioperativer Hypothermie anhand von klinischen Studien

Studie	Normothermie	Hypothermie	P-Wert	Autor
Myokard	1 % Inzidenz	6 % Inzidenz	< 0,05	Frank et al.,1997
Ischämien, ventrikuläre Tachykardien	2 % Inzidenz	8 % Inzidenz	< 0,05	
Chirurgische Wundinfektionen	6 % Inzidenz	19 % Inzidenz	< 0,01	Kurz et al., 1996
Peripoerativer Blutverlust	1,7±0,3 Liter	2,2±0,5 Liter	< 0,001	Schmied et al.,1996
Aufenthaltsdauer im Aufwachraum	53±36 min	94±65 min	< 0,001	Lenhardt et al.,1997
Postoperatives Kältezittern	141±24 ml/min/m ² #	269±159 ml/min/m ² #	< 0,05	Just et al.,1992
Thermales Unbehagen	50±10 mm (VAS)##	18±9 mm (VAS)##	< 0,001	Kurz et al.,1995

Sauerstoffverbrauch angegeben in ml/min/m

VAS bedeutet Visuelle Analog Skala und ist ein Maß für die Wärmeempfindung und damit für den thermalen Komfort eines Patienten. Diese Skala mißt von 0-100 mm, wobei 0 unerträglich kalt, 100 unerträglich heiß und 50 angenehm warm bedeutet.

2. Hypothesen und Aufgabenstellungen

2.1. Hypothesen

In vitro Studien zeigen, daß Hypothermie zahlreiche Immunkfunktionen direkt beeinträchtigt (Van Oss CJ et al., 1980). Dennoch sind die in vivo Effekte auf die Neutrophilenmigration bislang ungeklärt. Kurz und Mitarbeiter konnten 1996 im Rahmen einer groß angelegten klinischen Studie bzgl. perioperativer Hypothermie deutlich herabgesetzte Wundheilungsraten, vermehrte postoperative Wundinfektionen und verlängerte Klinikaufenthalte nachgewiesen. Diesen Beobachtungen könnten modifizierende Effekte der entsprechenden Plasmen (hypo- versus normotherm) auf die Migrationsfähigkeit der neutrophilen Granulozyten zu Grunde liegen. Demnach sollte dieses in vivo beobachtete Phänomen unter normothermen Bedingungen in vitro reproduzierbar sein.

2.2. Aufgabenstellung

Das Ziel der vorliegenden Dissertation ist es herauszufinden, ob perioperative Hypothermie einen nachgewiesenen Einfluß auf die Migrationsfähigkeit neutrophiler Granulozyten und die Ausschüttung pro- und antiinflammatorischer Zytokine hat und in welchem Ausmaß dies geschieht.

Dazu sollen folgende Versuche durchgeführt werden:

Chemotaxis: Neutrophile Granulozyten einer heterogenen gesunden Population (Blutbank der Universitätsklinik Innsbruck) werden mit den entsprechenden hypo- und normothermen Probandenplasmen inkubiert und dann in modifizierten 48-well Boyden-Kammern auf ihre spontane, also unstimulierte und ihre vorliegend durch IL-8 stimulierte Migration untersucht. Die Ergebnisse sollten Rückschlüsse auf die Eigenschaften der Plasmen zulassen.

ELISA: Bestimmung der Plasmaspiegel von IL-6, -8, -10 und TNF α in hypo- und normothermen Patientenplasmen.

3. Material und Methodik

3.1. Studiendesign

Im Rahmen einer neurochirurgischen Resektion eines Epilepsieherdes (selektive Amygdalo-Hypocampektomie) in Allgemeinanästhesie wurden 30 Patienten zwischen 20 und 55 Jahre alt zu vorgegebenen Meßzeitpunkten Blut abgenommen und anhand im folgenden erläuterten Methoden aufgearbeitet. Es wurden neurochirurgische Patienten ausgewählt, da sie eine Patientengruppe darstellen, bei denen Hypothermie immer noch indiziert und möglicherweise sogar von Vorteil ist.

Ausschlußkriterien waren bekannte immunologische Fehlfunktionen, Kortikosteroid- oder andere immunsuppressive Medikation, Fieber oder Infektion und maligne Erkrankungen.

Die Patienten wurden in zwei Gruppen randomisiert: einer hypothermen, die intraoperativ bis auf eine Körperkerntemperatur von 34°C abgekühlt wurde, und einer normothermen, die auf über 36°C warm gehalten wurde. Die Zieltemperatur wird während der Operation entweder durch Oberflächenerwärmung oder -abkühlung über die zirkulierende Flüssigkeit oder Druckluft aufrechterhalten. Die Patienten der Gruppe 1 werden aktiv (Polar Bear, Oberflächendruckluftkühlung) bis zum Erreichen der Zieltemperatur abgekühlt. Postoperativ werden die Patienten auf die Intensivstation gebracht und extubiert (die Gruppe 1 nach aktiver Erwärmung auf eine Kerntemperatur über 36°C).

Folgendes standardisiertes Narkoseverfahren (reine intravenöse Anästhesie) wurde bei beiden Gruppen angewendet: Nach einer Narkoseeinleitung mit Midazolam (0.05 mg/kg), Propofol (2 mg/kg), Fentanyl (3mcg/kg) und Vecuronium (0.1 mg/kg) werden die Patienten orotracheal intubiert und mechanisch beatmet. Narkose und Muskelrelaxation werden anhand einer Dauerinfusion von Fentanyl, Propofol (Computer-kontrolliert) und Vecuronium aufrechterhalten, um die Plasmaspiegel konstant zu halten. Die Plasmakonzentrationen von Propofol und Fentanyl steigen rückblickend um ungefähr 10%/°C und 4%/°C unter Hypothermie. Deshalb wird der Plasmazielspiegel um 5%/0.5°C Kerntemperaturrückgang reduziert, um in beiden Gruppen gleiche Plasmaspiegel zu gewährleisten. Um eine konstante Narkosetiefe zu sichern, wird eine genaue Angleichung von Propofol- und Fentanylinfusionsraten anhand des bispektralen Indexes des EEG (BIS) mit einem Ziel-BIS von 50 geführt. Die voraussichtliche Operationsdauer liegt bei acht Stunden. Die Flüssigkeitszufuhr ist standardisiert und ausgewogen. Postoperativ werden die Patienten sediert und intubiert auf die neurochirurgische Intensivstation gebracht, wenn nötig wiedererwärmt und dann extubiert.

Das Monitoring umfaßt SpO₂, EKG (5 Kanal), arterial blood pressure (ABP der Radialarterie), die Körperkerntemperatur (Harnblasen- und tympanale Membrantemperatur), den Bispectral Index (BIS) (Aspect A1000, Aspect Medical Systems, Natwik, MA, USA), Herzfrequenz, Pulsoximetrie, Temperatur (Hewlett Packard – Component Monitoring System), CO₂- und Isofluran-Ausfuhr (Cicero, Drager, Germany).

Um EEG Messungen zu erhalten werden Elektroden (Self-Prep) auf Fronto-Parietal (FP) 1 und FP2 positioniert mit der Referenzelektrode auf der Nase und der Erdungselektrode hinter dem rechten Ohr.

Blutproben (antikoaguliert mit EDTA) werden in beiden Gruppen zu fünf verschiedenen Zeitpunkten abgenommen (t1: vor Narkoseeinleitung und beide Gruppen auf 37°C, t2: bei 36°C bzw. >36°C zu jeweils korrespondierendem Zeitpunkt in der normothermen Gruppe, t3: bei 35°C bzw. >36°C, t4: bei 34°C bzw. >36°C, t5: bei OP-Ende). Eine Gesamtmenge von ca. 70ml Blut wird jedem Patienten entnommen. Das Plasma wird separiert und nach einer Aufbewahrung unter -20°C werden die im Folgenden beschriebenen immunologische Tests durchgeführt.

3.2. Granulozytenpräparation

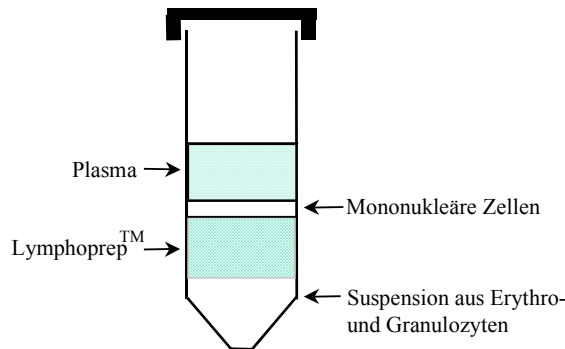
Neutrophile Granulozyten wurden für jeden Versuch aus EDTA-antikoaguliertem Vollblut frisch präpariert. Die Blutproben stammten von gesunden freiwilligen Spendern und wurden von der Blutbank der Universitätsklinik Innsbruck zur Verfügung gestellt.

Die Präparation bei Raumtemperatur beginnt damit, daß 15ml Lymphoprep[™] Dichtegradient [Nycomed[®], Oslo, Norwegen] in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen [Conical Tube[™], Falcon[®]] pipettiert werden. Darüber werden vorsichtig 20 ml EDTA Vollblut geschichtet und anschließend für 20 Minuten bei 1500 U/min (600 g) zentrifugiert [Zentrifuge GPR[™], Beckman[®]] (Wiedermann C.J. et al., 1992).

Dabei bildet sich eine Flüssigkeitssäule mit vier Schichten, die ihrer Dichte und ihrem spezifischen Gewicht nach folgendermaßen angeordnet sind:

- Oberste Schicht: Plasma
- Zweite Schicht: Mononukleäre Zellen (Lymphozyten/Monozyten)
- Dritte Schicht: Lymphoprep
- Unterste Schicht: Suspension aus Erythrozyten und Granulozyten

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Auftrennung von Vollblut nach Zentrifugation über LymphoprepTM in einem Zentrifugenröhrchen



Die Schichten eins bis drei werden mit einer Pasteurpipette abgehoben und verworfen. Die verbleibende unterste Schicht (Erythrozyten-Granulozyten-Suspension) wird mit 45ml NaCl 0,9% und 5ml Dextran 10% (MW 580.000) (Sigma[®], St.Louis, MO), aufgefüllt, geschüttelt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Während dieser Zeit bindet das Dextran an die Erythrozyten und diese sedimentieren. Im Überstand verbleiben die Granulozyten. Der Überstand wird nun in ein neues Zentrifugenröhrchen pipettiert und für 10 Minuten bei 2000 U/min zentrifugiert. Das Sediment enthält Granulozyten vermischt mit restlichen Erythrozyten. Um diese gänzlich zu entfernen, wird das Verfahren der hypoosmolaren Lyse angewandt:

Da die osmotische Resistenz der Erythrozyten geringer ist als die der Granulozyten, werden diese nach Zugabe einer hypoosmolaren Lösung rascher lysiert als die Granulozyten. Als hypoosmolare Lösung wird Aqua bidestilata (Leopold, Graz, Austria) verwendet. Die Erythrozyten werden mit 27 ml Aqua bidest. für 30 Sekunden lysiert. Danach gibt man sofort 9 ml KCl (0,6 M) zur Wiederherstellung der Isotonie zu, um die sonst ebenfalls einsetzende Lyse der Granulozyten zu vermeiden. Anschließend wird die Suspension für 10 Minuten bei 2000 U/min zentrifugiert. Man erhält ein Pellet bestehend aus fast ausschließlich Granulozyten und einem geringen Überstand mit lysierten Erythrozyten. Dieses Pellet wird nun nochmals mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen: Der Überstand wird dekantiert, das Pellet in 5ml NaCl 0,9 % resuspendiert und anschließend abzentrifugiert. Das verbleibende Granulozytenpellet wird nun in 5 ml Medium RPMI 1640/BSA 0,5% (Medium RPMI 1640 von Biological Industries[®], Israel; Bovines Serumalbumin „BSA“, lyophilisiert, von Fa. Behring[®], Marburg, BRD) aufgeschwemmt, wodurch die Ausgangskonzentration für die Zellzahlbestimmung gegeben ist.

Zellzahlbestimmung

Die exakte Bestimmung der Granulozytenzellzahl ist für sämtliche Experimente unerlässlich, da die Interpretation der Ergebnisse entscheidend davon abhängt.

Türk'sche Lösung

Zur Zellzählung werden die Granulozyten mit „Türk'scher Lösung“ gefärbt. Diese wird wie folgt hergestellt:

0,15 g Gentianaviolett (Merck[®], Crystal Violet, Nr. 1042) werden in wenig H₂O aufgeschwemmt. Dann pipettiert man 15 ml konzentrierte Essigsäure dazu und den Rest auf 1000 ml mit Aqua bidestilata auf und rührt mit einem Magnetrührer.

Durchführung

Die Färbung der Granulozyten mit „Türk'scher Lösung“ erfolgt im Verhältnis 1:20. Deshalb werden zu 190 µl Türk'scher Lösung 10 µl Granulozytensuspension pipettiert. Um es gut zu mischen wird das Ganze mehrmals resuspendiert. Von dieser Granulozytensuspension werden dann 10 µl in eine „Neubauer improved“TM Zählkammer pipettiert.

Ausgezählt werden 64 Felder, die auf 4 Quadrate zu je 16 Feldern verteilt sind. Dabei ist besonders zu beachten, daß sich auf den Feldgrenzen bzw. -rändern befindende Zellen nicht doppelt gezählt werden. Schließlich errechnet man die Gesamtzahl der gewonnenen Granulozyten nach folgender Formel:

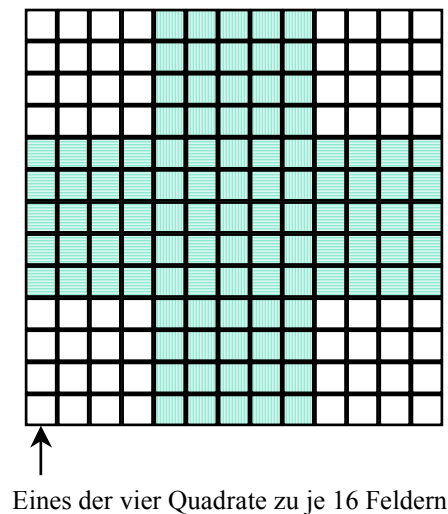
$$\Sigma = \frac{\text{Gezählte Zellen}}{4} \times 10000 \times 20 / \text{ml}$$

In der Formel bedeutet:

- Die Zahl 10000 ein zählkammerspezifischer Wert.
- „20“ der Verdünnungsfaktor der „Türk'schen Lösung“ mit der Granulozytensuspension.
- Im Nenner die Zahl 4, daß alle 64 vorhandenen Felder ausgezählt werden und nicht nur 16.

Die Granulozytensuspension wird nach dem Zählen und dem Berechnen der Gesamtzellzahl durch Zugabe der entsprechenden Menge an Medium RPMI 1640/BSA 0,5% auf die für den Versuchsansatz nötige Konzentration (hier 2 Million/ml) eingestellt.

Abbildung 2: Mikroskopische Ansicht der Felder einer Neubauer improved™ Zählkammer



3.3. CHEMOTAXIS

Als Chemotaxis bezeichnet man die gerichtete Bewegung von Zellen entlang eines Gradienten von Chemotaxinen zum Ort deren höchster Konzentration hin. Dieser Vorgang ist vor allem bei der Entzündung elementar, da die Leukozyten so aus dem Blutstrom zum Ort des Geschehens gelockt werden.

Wie bereits beschrieben besitzen Leukozyten Rezeptoren für soluble Liganden. Durch Bindung kommt es G-Protein vermittelt zur Aktivierung der Phospholipase C, was zur Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in Inositol-1,4,5-triphosphate (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) führt. IP₃ bewirkt eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumspiegel, was über Mobilisierung der kontraktilen Proteine die amöboiden Bewegungen der Zelle mit Pseudopodienbildung ermöglicht (Robins et al., 1994).

Für diese Experimente wurde eine modifizierte Form des von S. Boyden 1962 erstmals verwendeten Assays herangezogen.

3.3.1. Chemotaxiskammer, Versuchsansatz

Die modifizierte Boyden-Kammer (Neuroprobe[®], Bethesda, MD) besteht aus 3 Komponenten: dem Boden, der 48 Vertiefungen in 12 mal 4 Reihen angeordnet aufweist, einer Gummidichtung und einer Deckplatte. Gummidichtung und Deckplatte zeigen analog dem Boden 48 durchgehende Aussparungen.

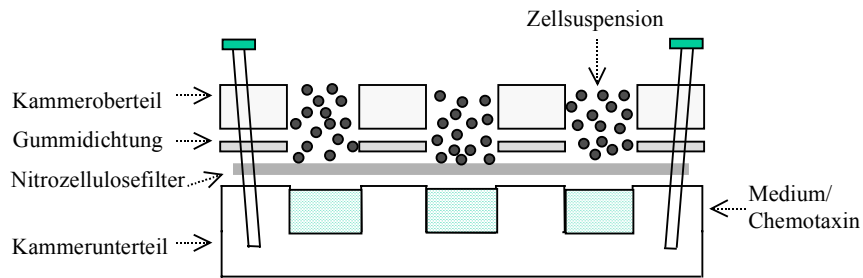
Zwischen Boden und Gummidichtung liegt ein Nitrocellulosefilter (Sartorius[®], Göttingen, BRD), der 150 µm dick ist und 5 µm große Poren aufweist, die den Leukozyten das Durchwandern ermöglichen. Dieser Filter separiert das Kammerober- vom -unterteil.

Zuerst werden die ersten sechs Reihen der Bodenplatte als Kontrolle mit 30µl Medium RPMI 1640/BSA 0,5%/Chemotaxin pro Vertiefung und die letzten sechs mit 30 µl IL8 [10^{-9} M] befüllt, dann werden Filter, Gummidichtung und Kunststoffplatte aufgelegt und anschließend wird die Kammer mit 6 Schrauben fest verschlossen. Nun müssen noch die vorbereiteten neutrophilen Granulozyten so in die Aussparungen der Kunststoffplatte pipettiert werden, daß in der ersten und der siebten Reihe solche, die in von gesunden Spendern gepooltem, also nicht mit dem der Granulozyten homologen Plasma, in der zweiten und achten Reihe solche, die in dem Plasma des Patienten 1, abgenommen zum Zeitpunkt 1, in der dritten und neunten Reihe solche, die in dem Plasma des Patienten 1, abgenommen zum Zeitpunkt 2 usw. inkubiert worden sind. Vorbereitet bedeutet hier die neutrophilen Granulozyten in 250 µl RPMI 1640/0,5% BSA auf 2 Millionen/ml zu suspendieren und für 30 min zusammen mit 50 µl Patientenplasma und 200 µl RPMI 1640/0,5% BSA bei 37°C zu inkubieren und anschließend bei 1800U/min für 10 min zu zentrifugieren, den Überstand abzuschütten, die am Boden anhaftenden PMN in 1ml HBSS zu resuspendieren; dieses Waschen wird insgesamt zweimal durchgeführt. Abschließend werden die gewaschenen Neutrophilen in 500 µl RPMI 1640/0,5% BSA resuspendiert. Nach dem Befüllen wird die Kammer für die Dauer der Migration (neutrophile Granulozyten 30 min) bei 37°C in einer 5% CO₂ enthaltenden Wasserdampf-atmosphäre inkubiert. In dieser Zeit wandern die Zellen vom oberen Kompartiment entlang des Chemotaxisgradienten in den Nitrocellulosefilter hinein.

3.3.2. Fixieren und Färben des Nitrocellulosefilters

Nach Ablauf der Inkubationszeit wird die Kammer aus dem Inkubator geholt, geöffnet und der Filter entnommen. Er wird jetzt in einer aufsteigenden Alkoholkonzentrationsreihe dehydriert und daraufhin die im Filter enthaltenen Zellen mit Hämatoxylin-Eosin (Merck[®], Darmstadt, BRD) gefärbt.

Abbildung 3: schematische Darstellung einer Chemotaxiskammer



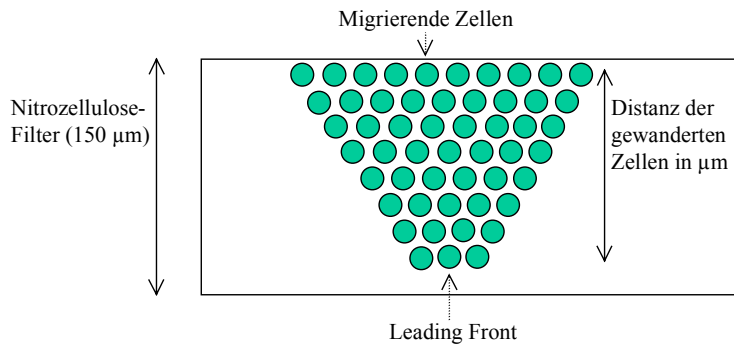
3.3.3. Auswertung

Der, wie oben beschrieben, präparierte Filter wird auf einen Objektträger transferiert und mikroskopisch ausgewertet (z.B. mit Olympus BH 2-RFCA). Bei 400facher Vergrößerung ermittelt man die Distanz in μm zwischen den Zellen an der Filteroberfläche und der sogenannten „leading front“, der führenden Ebene in der sich mindestens 3 Zellen befinden sollten. Nun wird der Mittelwert aus den 4 in einer Reihe liegenden Feldern, die dasselbe Chemotaxin in gleicher Konzentration und dieselben Zellen enthalten, ermittelt.

Um die erhaltenen Werte vergleichen zu können, wird der Chemotaxisindex berechnet. Dieser ergibt sich aus dem Quotienten der Distanz der Zellen, die gegen IL-8 wandern und der Zellen, deren Migration gegen das Medium RPMI 1640/BSA 0,5% gemessen wird.

$$\text{Chemotaxisindex (CI): } \frac{\text{Distanz der gegen IL-8 gewanderten Zellen}}{\text{Distanz der gegen Medium gewanderten Zellen}}$$

Abbildung 4: schematische Darstellung eines Nitrozellulosefilters mit darin enthaltenen Zellen



3.4. Bestimmungen von Zytokin-Plasmaspiegeln

Die Enzyme-linked-immuno-sorbent assays (ELISA) wurden im Hauptlabor der Univ. Klinik für Innere Medizin durchgeführt. Es wurden Test-Kits der Firma R&D Systems[®], MN und der Firma Boehringer Mannheim, BRD, verwendet.

3.4.1. Grundprinzip des Enzym-linked-immunosorbent Assays (ELISA)

Er ist eine Weiterentwicklung der Radioimmunoassays, wobei anstatt eines Radionuklides Enzyme als Markierungssystem verwendet werden. Bei ELISAs muß der immunologischen Reaktion eine Indikatorreaktion folgen, um die im Antigen-Antikörper (AG-AK) Komplex gebundenen Enzymaktivität photometrisch bestimmen zu können. Die für den Nachweis notwendige Sensitivität wird durch die hohe Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion erreicht, was einen außerordentlichen Verstärkungseffekt bedeutet. Dadurch werden auch geringste Substanzmengen zuverlässig erfaßt. Häufig verwendete Markerenzyme sind die Peroxidase, die alkalische Phosphatase und die β -Galaktose.

Sandwich ELISA:

PrimärAK wird an die Platte gekoppelt. Dieser fängt nun das AG ein. Das gebundene AG wird mit einem anderen, gegen das Ag gerichteten, enzymgekoppelten AK markiert. Durch Zugabe von Substrat und Chromogen erhält man die Indikatorreaktion, die direkt proportional ist.

3.4.2. Praktische Durchführung eines Sandwich-ELISAs

Vor Beginn der Messung wird die benötigte Anzahl an Microplates-Streifen in den vorgegebenen Rahmen eingespannt. In diesen befindet sich am Boden der für das zu messende Interleukin spezifische monoklonale Antikörper. Zunächst wird in jedes Well 50 µl einer gepufferten Proteinlösung pipettiert und anschließend 200 µl der zu messenden Proben bzw. eines Standards zugegeben. In den Standardproben befindet sich eine Verdünnungsreihe bekannter Mengen von dem zu messenden Interleukin, mit deren Hilfe am Ende eine Kalibrierungskurve zu Interleukinmengenbestimmung der Plasmaproben erstellt werden kann.

Während der Inkubationszeit von zwei Stunden bei Raumtemperatur bindet der Antikörper in den Wells nun das gesamte zu messende Interleukin. Dann werden alle ungebundenen Substanzen mit Hilfe eines Waschpuffers (dreimaliges Reinigen mit je 400 µl des Waschpuffers mit anschließendem Absaugen mit einem Vakuumsauger) abgewaschen und 200 µl eines mit einer Peroxidase verknüpften polyklonalen Antikörpers gegen das zu messende Interleukin dazu pipettiert. Wie schon zuvor, wird die Meßplatte zwei Stunden inkubiert und wieder gewaschen, um die nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Anschließend werden in jedes Well 200 µl Peroxidase-spezifisches Substrat pipettiert, wobei je nach Interleukin-Menge und somit veränderter AK-Konzentration ein unterschiedlich intensiver Farbumschlag entsteht. Nach 20 Minuten wird diese Reaktion mit Hilfe von 50 µl einer Stöplösung beendet.

Zur Berechnung des Interleukin-Gehaltes der Proben werden in einem Spektrometer [Multiscan® BIOCHROMATIC; Labsystems® Helsinki, Finnland] bei 450 und 570 nm Wellenlänge die Extinktionen aller Proben gemessen. Mit Hilfe der bekannten Interleukin Standardkurven kann somit der Gehalt des entsprechenden Interleukins in den Plasmaproben berechnet werden.

4. Ergebnisse

4.1. Ergebnisse der Migration neutrophiler Granulozyten

Für die Chemotaxisversuche wurden frisch präparierte neutrophile Granulozyten aus peripherem Blut gesunder Spender verwendet. Die Zellen wurden nach bereits beschriebenem Verfahren mit Kontrollplasmen oder mit den entsprechenden Patientenplasmen für 30 min inkubiert und anschließend zweimal mit HBSS gewaschen. Danach wurde deren Migration gegen Medium und IL-8 getestet. Als Negativkontrolle verwendete man in Poolplasma inkubierte Zellen, die gegen Medium wandern. Die Distanz, die diese Zellen zurücklegen, entspricht der Spontanmigration und dient zur Berechnung des Chemotaxisindex. Als Positivkontrolle werden Neutrophile, die in Poolplasma inkubiert werden und gegen IL-8 migrierten, verwendet.

Sämtliche Ergebnisse sind in Form des Chemotaxisindex dargestellt. Dadurch werden einzelne Versuchsansätze unabhängig von Zell-bedingten Variationen unterschiedlicher Präparationen.

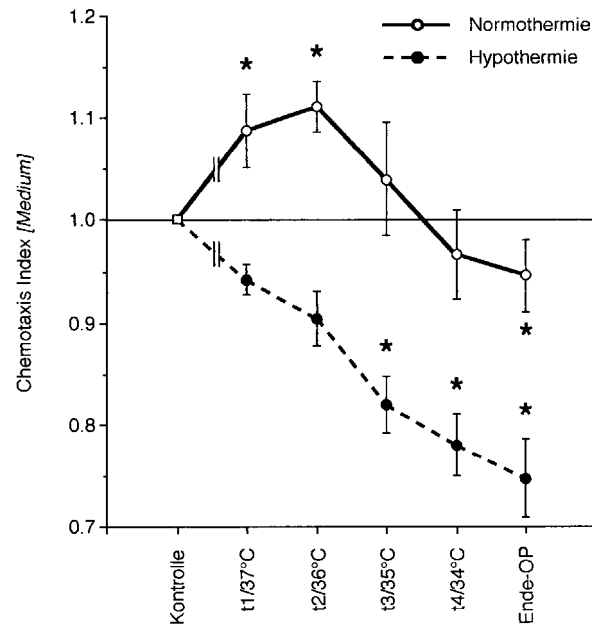
4.1.1. Migration neutrophiler Granulozyten gegen Medium

Die Migration der neutrophilen Granulozyten gegen das Medium RPMI 1640/ 0,5% BSA zeigte signifikante Unterschiede, abhängig davon, ob die Granulozyten in hypo- oder normothermen Patientenplasmen inkubiert waren.

1. Die in Plasmen normothermer Patienten zu Beginn der Operation inkubierten neutrophilen Granulozyten zeigten signifikant erhöhte Migration. Diese Steigerung verschwand jedoch, wenn Plasmen von fortgeschrittenen Zeitpunkten der OP verwendet wurden und ging mit Hautschnittplasmen sogar in eine Hemmung über.
2. Die in Plasmen hypothermer Patienten inkubierten neutrophilen Granulozyten wiesen keinerlei verstärkte, sondern vielmehr eine sich über den gesamten Abnahmezeitraum erstreckende Migrationshemmung auf. Die Zeit-Temperatur Antwortkurve fällt während der gesamten Operation konstant ab und endet in einer ungefähr 30 % igen Migrationshemmung nach Hautschnitt.

3. Der Vergleich der Chemotaxisindizes (normo- versus hypotherm) zeigt einen bis auf den letzten Abnahmezeitpunkt (Hautschnitt) signifikanten Unterschied in der Migrationsbeeinflussung neutrophiler Granulozyten.

Abb.5: Migration gegen Medium



Die **Abb.5** zeigt die Effekte der normo- bzw. hypothermen Patientenplasmen auf die Migration der in diesen inkubierten neutrophilen Granulozyten. Die Migration der frisch präparierten neutrophilen Granulozyten wurde nach 30 min bei 37 °C gestoppt. Die Migration der in “neutralem” Poolplasma inkubierten neutrophilen Granulozyten wurde zur Bestimmung der Basismigration verwendet. Die Chemotaxis wurde mittels Mikroskop gemessen. Die Werte zeigen die Mittelwerte +/- Standardfehler des Chemotaxisindex, der aus dem Quotienten der Chemotaxis der Testsubstanz durch die Basismigration errechnet wurde. Statistische Analyse: Mann-Whitney-U-Test: * p<0,05;

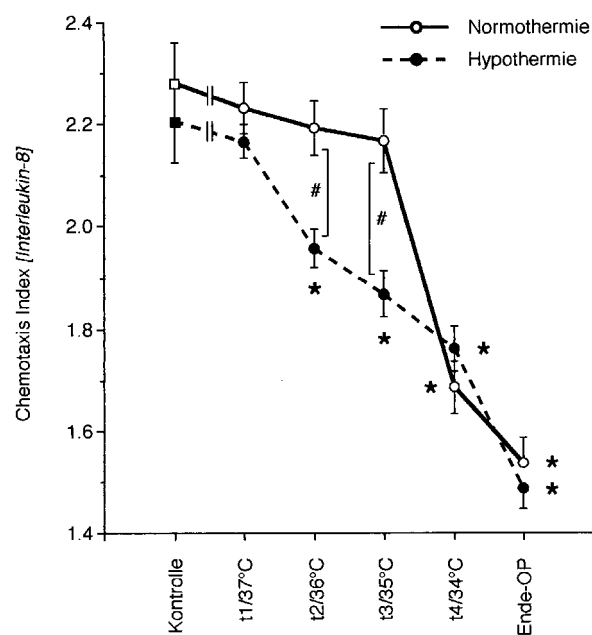
4.1.2. Migration neutrophiler Granulozyten gegen IL-8

Dasselbe Phänomen zeigt sich bei der IL-8 stimulierten Migration.

1. Das von hypothermen Patienten stammende Plasma setzt die Temperatur-abhängige gegen IL-8 gerichtete Migration herab. Eine gegenüber der in gepooltem Plasma inkubierten neutrophilen Granulozyten statistisch signifikante Migrationshemmung (p<0,05) ist zu den Zeitpunkten t3, t4 und Hautschnitt zu beobachten.

2. Ein vergleichbarer Migrationshemmeffekt tritt bei in normothermen Plasmen inkubierten Neutrophilen nur zu den letzten beiden Abnahmezeitpunkten auf. Zunächst bleibt die Neutrophilenmigration gegen IL-8 bei den normotherm gehaltenen Patienten also intakt.
3. Der Vergleich der Chemotaxisindizes (normo- versus hypotherm) zeigt bei den Abnahmezeitpunkt t2 und t3 einen signifikanten Unterschied in der Migrationsbeeinflussung neutrophiler Granulozyten. Der bei der spontanen Neutrophilenmigration so stark ausgeprägte "Plasmaeffekt" zwischen der normo- und der hypothermen Patientengruppe ist bei IL-8 stimulierter Chemotaxis in dieser Deutlichkeit nicht mehr nachweisbar.

Abb.6: Migration gegen IL-8



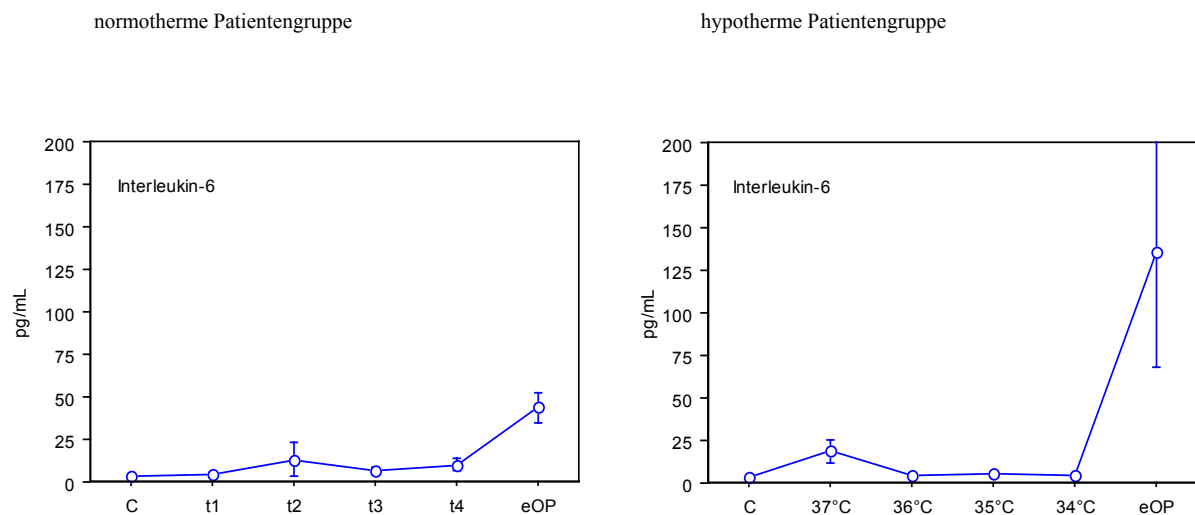
Die **Abb.6** zeigt die Effekte der normo- bzw. hypothermen Patientenplasmen auf die Migration der in diesen inkubierten neutrophilen Granulozyten. Die Migration der frisch präparierten neutrophilen Granulozyten wurde nach 30 min bei 37 °C gestoppt. Die Migration der in "neutralem" Poolplasma inkubierten neutrophilen Granulozyten wurde zur Bestimmung der Basismigration verwendet. Die Chemotaxis wurde mittels Mikroskop bestimmt. Die Werte zeigen die Mittelwerte +/- Standardfehler des Chemotaxisindex, der aus dem Quotienten der Chemotaxis der Testsubstanz durch die Basismigration errechnet wurde. Statistische Analyse: Mann-Whitney-U-Test: * p<0,05 gegen Kontrolle; # p<0,05 hypo- versus normotherm. n=3 (fünf normo- und neun hypotherme Patienten)

4.2. Ergebnisse der Zytokinspiegel-Messungen

Die Plasmaspiegel von IL-6, -8, -10 und TNF α sämtlicher zu den verschiedenen Zeitpunkten abgenommener Proben hypo- und normothermer Patienten wurden mittels ELISAs bestimmt.

Die IL-6 Spiegelmessungen zeigen keinen wesentlichen Unterschied zwischen normo- und hypothermer Patientenplasmen, wenngleich auch der Spiegelanstieg bei OP-Ende in der hypothermen Patientengruppe wesentlich stärker (125 pg/mL vs 50 pg/mL) betont ist.

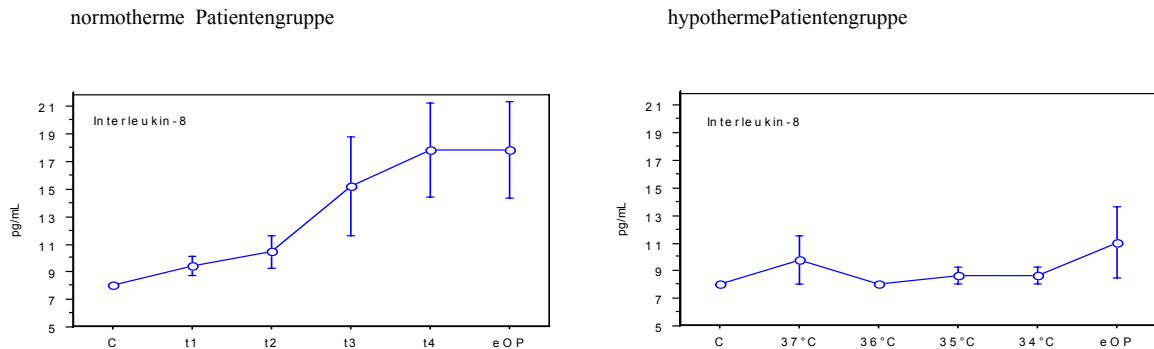
Abb. 7: IL-6 Spiegelbestimmungen



Die **Abb.7** zeigt die IL-6 Spiegelbestimmungen der zu den verschiedenen Zeitpunkten (t1 bzw. 37°C, t2 bzw.36°C usw. bis OP-Ende) abgenommenen normo-(n=5) bzw. hypothermen (n=9) Patientenplasmen mittels Sandwich-ELISA gemessen in pg/mL.

Die IL-8 Spiegelmessungen zeigen in der normothermen Patientengruppe einen (konstanten) Spiegelanstieg im Verlauf der OP, der durch Hypothermie verhindert zu werden scheint.

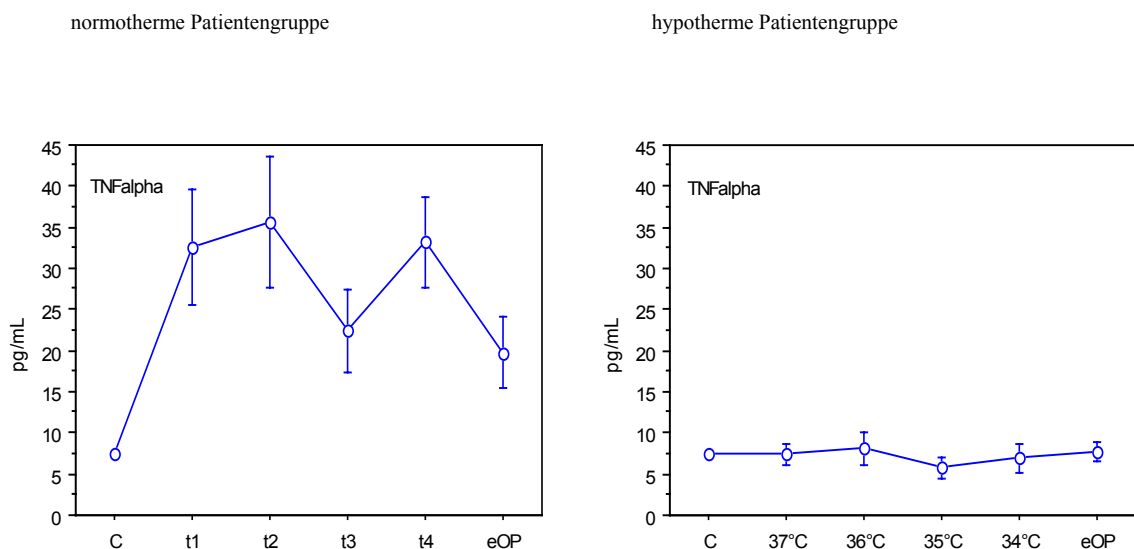
Abb.8: IL-8 Spiegelbestimmungen



Die **Abb.8** zeigt die IL-8 Spiegelmessungen der zu den verschiedenen Zeitpunkten (t1 bzw. 37°C, t2 bzw. 36°C usw. bis OP-Ende) abgenommenen normo-(n=5) bzw hypothermen (n=9) Patientenplasmen mittels Sandwich-ELISA gemessen in pg/mL.

Ein vergleichbarer Effekt wurde bei den TNF α Spiegelmessungen festgestellt. Auch hier ist ein Spiegelanstieg in der normothermen Patientengruppe im Verlauf der OP zu verzeichnen, der wiederum durch Hypothermie verhindert zu werden scheint.

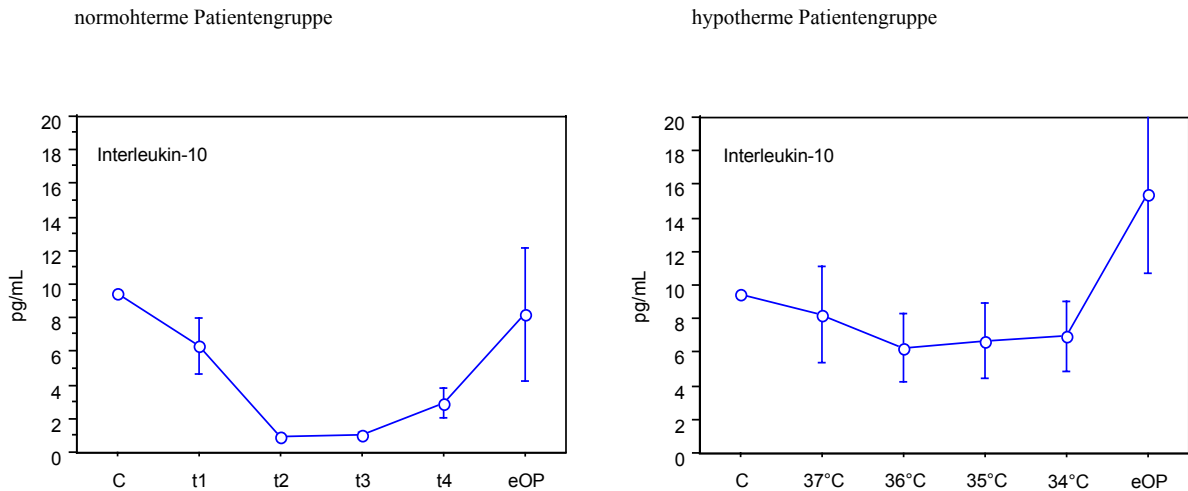
Abb.9: TNF alpha Spiegelbestimmungen



Die **Abb.9** zeigt die TNFalpha Spiegelmessungen der zu den verschiedenen Zeitpunkten (t1 bzw. 37°C, t2 bzw. 36°C usw. bis OP-Ende) abgenommenen normo- (n=5) bzw. hypothermen (n=9) Patientenplasmen mittels Sandwich-ELISA gemessen in pg/mL.

Der Abfall der IL-10 Plasmaspiegel während normthermer Operationen wurde bei Operationen unter hypothermen Bedingungen aufgehoben.

Abb. 10: IL-10 Spiegelbestimmungen



Die **Abb.10** zeigt die IL-10 Spiegelbestimmungen der zu den verschiedenen Zeitpunkten (t1 bzw. 37°C, t2 bzw. 36°C usw. bis OP-Ende) abgenommenen normo- (n=5) bzw. hypothermen (n=9) Patientenplasmen mittels Sandwich-ELISA gemessen in pg/mL.

4.3. Interpretation der Ergebnisse

Zusammenfassend kann bzgl. der Neutrophilenmigration gesagt werden, daß der ‘‘Plasmaeffekt’’ hypothermer Patienten in einer Herabsetzung der Neutrophilenmigration besteht. Eine Hemmung der Neutrophilen-Chemotaxis zeigt sich auch in der Spätphase der Operation in normothermen Patienten in der Migration gegen IL-8. Im Gegensatz dazu scheint die Neutrophilenmigration in den frühen Phasen der Operation in normothermen Patienten gesteigert zu sein.

Hypothermie scheint folglich die unkontrollierte Neutrophilenaktivierung zu verhindern und damit die durch Neutrophile verursachte Gewebsschädigung abzuwenden.

Bezüglich der Zytokinspiegel kann zusammenfassend gesagt werden, daß auf das ‘‘Vermittler’’-Zytokin IL-6 kein Einfluß ausgeübt zu werden scheint, während perioperative Hypothermie die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, wie IL-8 und TNF α ,

unterdrückt und das Vorhandensein antiinflammatorischer Zytokine, wie IL-10, aufrechterhält.

Demzufolge könnte Hypothermie den Organismus vor einem proinflammatorischen Zustand zu bewahren.

5. Diskussion und Zusammenfassung

5.1. Diskussion der Methodik

5.1.1. Chemotaxis

Für die Bestimmung der Chemotaxis gibt es verschiedene Methoden, die jeweils unterschiedliche Vor- bzw. Nachteile aufweisen:

1. "Capillary Tubes"
2. Agarose
3. Membranmethoden: a. Polycarbonat-Filter b. Nitrocellulose-Filter

Aufgrund der guten Erfahrungen und zuverlässigen Ergebnisse, die mit dieser allgemein etablierten Methode gewonnen wurden, verwendeten wir Nitrocellulose-Filter. Es handelt sich hierbei um eine sehr exakte und leicht reproduzierbare Methode, da sie nur unwesentlich von der Anzahl der Zellen auf dem Filter abhängt. Ein weiterer Vorteil besteht darin, daß durch "Checkerboard Studien" zwischen Chemotaxis und Chemokinese unterschieden werden kann.

Nachteile ergeben sich, wie auch bei anderen "Leading Front Assays" daraus, daß die Morphologie der Zellen nicht beurteilt werden kann und die Zellen an der Leading Front möglicherweise nur einen kleinen, nicht repräsentativen Teil der Gesamtpopulation darstellen (Dunzendorfer S et al., 2000). Durch die Messung mittels Mikroskop könnte es weiters zu einer Beeinflussung der Ergebnisse durch den Untersucher kommen.

Da bei dieser Dissertation die Migration einer reinen Zellpopulation gemessen wurde, war die Methode der Nitrocellulose-Chemotaxis für diese Aufgabe am besten geeignet. Die Verwendung einer hoch reinen neutrophilen Granulozytenpopulation bringt auch den Vorteil mit sich, daß eine gegenseitige Beeinflussung unterschiedlicher Zellarten durch Zytokine ausgeschlossen werden kann.

5.1.2. ELISA

Bei den für die Messungen verwendeten ELISAs handelte es sich um eine Methode mit sehr hoher Sensitivität bei einem Detektionslimit für Interleukin 6 von 3pg/ml, für IL-8 von 8pg/ml, für IL-10 von 0.8pg/ml und TNF α von 3pg/ml. Die zugesetzten Antikörper sind spezifisch für die jeweiligen zu messenden Substanzen. Die Bestimmung des Standards war in allen Ansätzen möglich und führte zu einer Regressionsgeraden, die zur Berechnung der Ergebnisse der jeweiligen Zytokinspiegel in den Proben diente. Daraus kann geschlossen werden, daß diese Assays für die Bestimmung der vorliegend zu untersuchenden Zytokine geeignet ist.

5.2. Diskussion der Ergebnisse

Hypothermie scheint für veränderte Immunreaktionen bei Mensch und Tier verantwortlich zu sein. Dies konnte in Studien über nicht OP-bedingte Hypothermie nachgewiesen werden. Verschiedenste Komponenten des Immunsystems werden durch Kälteexposition beeinflusst, wie herabgesetzte Zell-vermittelte Immunität (Muller HK et al., 1995) und NK-Zellaktivität (Cheng GH et al., 1990), herabgesetzter Anzahl an Thymozyten, Splenozyten, und CD4+ Zellen, Suppression von B-Lymphozyten, und eine fehlerhafte T-Lymphozytenfunktion (Cheng GH et al., 1990; Klein TW, 1993; Goundasheva D et al., 1994). Hypothermie wurde auch mit supprimierter Phagozytosefähigkeit, einschließlich herabgesetzter Migration polymorphkerniger Zellen, verringerter Sauerstoffradikalbildung und herabgesetzter Bakterienabtötung (Clardy CW et al., 1985; Sung Y et al., 1985) in Zusammenhang gebracht.

Es ist daher auch möglich, daß Hypothermie zu den postoperativ zu beobachtenden Immunveränderungen beiträgt. Wie schon erwähnt, wurde in einer 1996 groß angelegten klinischen Studie nachgewiesen, daß perioperative Hypothermie zu im Vergleich zu normotherm gehaltenen Patienten dreifach erhöhten Wundinfektionsraten und zu um 20% verlängerten Krankenhausaufenthalten führt (Kurz A et al., 1996). Diese Folgen könnten in Zusammenhang mit einer initial herabgesetzter Lokalreaktion stehen, die durch perioperative Hypothermie, einschließlich thermoregulatorischer Vasokonstriktion, herabgesetzter Sauerstoffversorgung des geschädigten Gewebes (Boutten A et al., 1996), Hemmung der oxidativen Abtötung durch Neutrophile (Wenisch C et al., 1996) und verringerter Kollagenablagerung (Kurz A et al., 1996) bedingt zu sein scheinen. Diese Ergebnisse weisen

darauf hin, daß Hypothermie zu der systemischen Immunsuppression in der perioperativen Zeitspanne beiträgt.

In der vorliegenden Arbeit versuchten wir die diesen Beobachtungen möglicherweise zugrundeliegenden modifizierenden Effekte normo- bzw. hypothermer Probandeplasmen auf die Migrationsfähigkeit neutrophiler Granulozyten und auf die jeweiligen IL-6, -8, -10 und TNF α - Spiegel nachzuweisen.

Die unter hypothermen Bedingungen zu beobachtende Plasmaaktivität einer signifikanten Migrationshemmung bestärkt unsere Annahme. Sowohl bei Verletzungen als auch bei Infektionen sind die neutrophilen Granulozyten die als erste in Erscheinung tretende Zellen. Ihre Migration wird u.a. durch IL-8 und TNF α induziert (Sampson AP, 2000), so daß die in der Hypothermiegruppe zu verzeichnenden niedrigen bzw. nicht wie bei den Normothermen ansteigenden Spiegel, eben diese herabgesetzte Migration bzw. Migrationshemmung und die dadurch erhöhte Wundinfektionsrate einerseits, aber auch die dadurch verhinderte Neutrophilen-induzierte Gewebeschädigung, erklären.

Für die höheren Wundinfektionsraten der hypothermen Patientengruppe könnten natürlich auch andere Faktoren, wie die arterielle Hypoxämie, die Hypovolämie, die Konzentration der eingesetzten Anästhetika und die durch Zigarettenrauch oder schmerzinduzierten Stress ausgelöste Vasokonstriktion verantwortlich sein (Knighton DR et al, 1984; Moudgil GC et al, 1981).

Diese Faktoren konnten jedoch nachweislich von Kurz und Mitarbeiter als unwahrscheinlich gewertet werden, da die Gabe von Sauerstoff, die Sauerstoffhämoglobinsättigung, die Flüssigkeitsbalance, die hämodynamischen Reaktionen, die Ausfuhrkonzentrationen der Anästhetika, der Schmerzscore und die Opioidmengen in beiden Gruppen ähnlich war (Kurz A et al., 1996). Ebenso unwahrscheinlich ist es, daß das verstärkte Bakterienwachstum die Infektionen in der hypothermen Gruppe verschlimmert, da geringe Temperaturabnahmen eigentlich das Wachstum in vitro herabsetzen (Mackowiak PA, 1981).

Bzgl. der Zytokinspiegel kann der bei IL-6 und TNF α in der hypothermen Gruppe ausgebliebene Spiegelanstieg die herabgesetzte Wundheilung erklären (Jyung RW et al., 1993), da die neutrophile Granulozyten als die als erste an die Wundstelle migrierenden Zellen gelten.

TNF α kann die Produktion von Gewebefaktor auslösen und dadurch die Hämostasebalance zugunsten der Gerinnung verschieben (Esmon C, 1994). Dies könnte den unter Hypothermie ausbleibenden TNF α Spiegelanstieg und den dadurch klinisch beobachteten erhöhten Blutverlust begründen. Außerdem wirkt TNF α hauptsächlich auf Endothelzellen und erhöht deren prokoagulatorische Aktivität. Aktivierte Endothelzellen exprimieren ebenfalls eine Anzahl molekularer Adhäsionsmoleküle, was die Leukozytenadhäsion an Endothelium erleichtert. Die Anhäufung inflammatorischer Zellen trägt zusätzlich zur Gewebsschädigung bei (Strieter RM et al., 1993).

Milde Hypothermie soll den operationsbedingten Blutverlust und den damit den Bedarf an Bluttransfusionen erhöhen (Schmied H et al., 1996). In vitro Studien ließen vermuten, daß perioperative Hypothermie OP-bedingte Blutungen verstärken, indem sie die Funktion der Blutplättchen und die Aktivität der Gerinnungsfaktoren beeinträchtigt (Michelson AD et al., 1994; Rohrer MJ et al., 1992). Bluttransfusionen scheinen ihrerseits wiederum die Empfänglichkeit für Wundinfektionen erhöhen, indem sie die Immunfunktion beeinflussen (Jensen LS et al., 1992).

Gegen diese Hypothese sprechen die Ergebnisse von Kurz und Mitarbeitern, die zwar einen signifikant erhöhten Bedarf an allogenen Blutkonserven in der Hypothermiegruppe bestätigten, dies allerdings in keinem Zusammenhang mit den erhöhten Wundinfektionen sahen (Kurz A et al., 1996).

Die unter Hypothermie zu beobachtende Aufrechterhaltung der IL-10 Spiegel als ein antiinflammatorisches Zytokin korreliert ebenfalls mit den klinischen Beobachtungen.

5.3. Zusammenfassung und Schlußfolgerungen

Die in einer groß angelegten klinischen Studie nachgewiesene deutlich herabgesetzte Wundheilungsrate, vermehrten postoperativen Wundinfektionen und verlängerten Klinikaufhalten infolge perioperativer Hypothermie (Kurz A et al., 1996) wurden in der vorliegenden Arbeit auf Zellebene untersucht. Es galt herauszufinden, ob perioperative Hypothermie einen nachgewiesenen Einfluß auf die Migrationsfähigkeit neutrophiler Granulozyten und die Ausschüttung pro- und antiinflammatorischer Zytokine hat und in welchem Ausmaß dies geschieht.

Die dazu durchgeführten Migrations- und Chemotaxisversuche mit in hypo- und normothermen Probandenplasmen inkubierten neutrophilen Granulozyten wiesen einen Migrationshemmeffekt in der hypothermen verglichen mit der normothermen Gruppe auf, in welcher sogar eine Migrationssteigerung zu beobachten war. Hypothermie scheint folglich einerseits für die erhöhte Infektionsanfälligkeit, andererseits aber auch für die Verhinderung unkontrollierter Neutrophilenaktivierung und damit abgewandter Gewebsschädigung von Bedeutung zu sein.

Außerdem konnte nachgewiesen werden, daß perioperative Hypothermie die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie IL-8 und TNF α unterdrückt und das Vorhandensein antiinflammatorischer Zytokine wie IL-10 aufrecht erhält. Ob deren Summeneffekt insgesamt auch für die Migrationseffekte der neutrophilen Granulozyten verantwortlich ist, kann zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht eindeutig beantwortet werden. Eine Hemmung der Ausschüttung proinflammatorischer und eine Aufrechterhaltung antiinflammatorischer Zytokinspiegel würde aber gut in dieses Konzept passen.

Demzufolge kann abschließend gesagt werden, daß perioperative Hypothermie einerseits den Organismus vor einem proinflammatorischen Zustand zu bewahren scheint, andererseits aber auch für erhöhte Wundinfektionsraten, verlangsamte Wundheilung und dadurch verlängerte Klinikaufhalte mitverantwortlich sein könnte. Eine Risiko-Nutzen-Abwägung muß demnach individuell erfolgen.

Die aus unseren Untersuchungen ableitbaren therapeutischen Konsequenzen könnten eine gezielte neutrophilen Granulozyten-Stimulation sowie eine entsprechende Infektprophylaxe

nach Hypothermie bedeuten. Zur Klärung dieser Fragen sind jedoch weiterführende Studien nötig.

Literaturverzeichnis

A

Alam R

A brief review of the immune system.

Prim Care 25 (1998) 727-38

Allen RC, Stevens DL

The circulating phagocyte reflects the in vivo state of immune defense.

Curr Opin Infect Dis 5 (1992) 389-398

Annadata RS, Sessler DI, Tayefeh F, Kurz A, Dechert M

Desflurane slightly increases the sweating threshold, but produces marked, non-linear decreases in the vasoconstriction and shivering thresholds.

Anesthesiology 83 (1995) 1205-11

Aoyagi M, Flasterstein AH, Barnette J

Cerebral effects of profound hypothermia (18°C) and circulatory.

Circulation 52 (1975) 52-60

Arai KI, Lee F, Miyajima A, Miyatake S, Arai N, Yokota T.

Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses.

AnnuRevBiochem.1990;59:783-836.

Asano S, Okano A, Ozawa K, Nakahata T, Ishibashi T, Koike K, Kimura H, Tanioka Y, Shibuya A, Hirano T

In vivo effects of recombinant human IL-6 in primates: stimulated production of platelets.

Blood 75 (1990) 1602-5

Atreya R, Mudter J, Finotto S, Mullberg J, Jostok T, Wirtz S, Schutz M, Bartsch B, Holtmann M, Becker C, Strand D, Czaja J, Schlaak JF, Lehr HA, Autschbach F, Schurmann G, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T, Galle PR, Rose-John S, Neurath MF

Blockade of IL-6 tran signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in chron disease and experimental colitis in vivo.

Nat Med 6 (2000) 583-8

Ausman JI, McCormick PW, Stewart M, Lewis G, Dujovny M, Balakrishnan G, Malik GM, Ghaly RF

Cerebral oxygen metabolism during hypothermic circulatory arrest in humans.

J Neurosurg 79 (1993) 810-815

B

Beilin B, Shavit Y, Razumovsky J, Wolloch Y, Zeidel A, Bessler H

Effect of mild perioperative hypothermia on cellular immune response.

Anesthesiology 89 (1998) 1133-40

Benjamin D, Knobloch TJ, Dayton MA

Human B cell interleukin-10:B-cell lines derived from patients with acquired immunodeficiency syndrome and Burkitt's lymphoma constitutively secrete large quantities of interleukin-10.

Blood 80 (1992) 1289-98

Beutler BA

The role of tumor necrosis factor in health and disease.

JRheumatology 1999 May; 26 Suppl 57: 16-21

Berridge MJ

Cell signalling. A tale of two messengers

Nature 1993 Sep 30;365(6445):388-9

Biggar WD, Bohn DJ, Kent G, Barker C, and Hamilton G

Neutrophil migration in vitro and in vivo during hypothermia.

Inf and Immun 46 (1984) 857-859

Blackwell TS, Christman JW

Sepsis and cytokines: current status.

Br J Anaesth 77 (1996) 110-7

J Exp Med 1991 Dec 1;174(6):1549-55

Bogdan C, Vodovotz Y, Nathan C.

Macrophage deactivation by interleukin 10.

J Exp Med 174 (1991) 549-555

Bonavida B

Immunomodulatory effect of tumor necrosis factor.

Biotherapy 3 (1991) 127-33

Borden EC and Chin Ph

Interleukin-6: A cytokine with potential diagnostic and therapeutic roles.

J Lab Clin Med 123 (1994) 824-9

Bounds JV, Wiebers DO, Whisnant JP, Okazaki H

Mechanisms and timing of deaths from cerebral infarction.

Stroke 12 (1981) 474-477

Boutten A, Dehoux MS, Seta N, Ostinelli J, Venembre P, Crestani B, Dombret MC, Durand G, Aubier M

Compartmentalized IL-8 and elastase release within the human lung in unilateral pneumonia.

Am J Respir Crit Care Med. 1996 Jan;153(1):336-42.

Boylan AM, Hebert CA, Sadick M, Wong WL, Chuntharapai A, Hoeffel JM, Hartiala KT,

Interleukin-8 is a major component of pleural liquid chemotactic activity in a rabbit model of endotoxin pleurisy.

Am J Physiol 1994 Aug;267(2 Pt 1):L137-44

Bozik CR, Gerald NP, Gerard C.

Receptor binding specificity and pulmonary gene expression of the neutrophil-activating peptide ENA-78.

Am J Respir Cell Mol Biol. 1996 Mar;14(3):302-8.

Brach MA, Herrmann F

Interleukin 6: presence and future.

Int J Clin Lab Res. 1992;22(3):143-51.

Broaddus VC, Boylan AM, Hoeffel JM, Kim KJ, Sadick M, Chuntharapai A, Hebert CA.

Neutralization of IL-8 inhibits neutrophil influx in a rabbit model of endotoxin-induced pleurisy.

J Immunol 1994 Mar 15;152(6):2960-7

Broukaert P, Libert C, Everaerd B, Takahasi N, Cauwels A, Fiers W

Tumor necrosis factor, its receptors and the connection with interleukin 1 and interleukin 6.

Immunobiol 187 (1993) 317-319

Buhl WJ, Yu B, Gering U

Signal transduction pathways leading to arachidonic acid release from neutrophilic HL-60 cells. The involvement of G protein kinase C and phospholipase A2.

Cell Sign. 1995 May; 7 (4): 351-64.

Bush HL, Hydo JL, Fisher E, Fantini GA, Silane MF, Barie PS

Hypothermia during elective abdominal aortic aneurism repair: The high price of avoidable morbidity.

J Vasc Surg 21 (1995) 392-400

Busto R, Dietrich WD, Globus MY-T, Ginsberg MD

Postischemic moderate hypothermia inhibits CA1 hippocampal ischemic neuronal injury.

Neurosc Lett 101 (1989) 299-304

C

Capsoni F, Minonzio F, Ongari AM, Carbonelli V, Galli A, Zanussi C

Interleukin 10 down-regulates oxidative metabolism and antibody-dependent cellular cytotoxicity of human neutrophils.

Scan J Immunol 45 (1997) 269-75

Carli F, Emery PW, Freemantle CAJ

Effect of perioperative normothermia on postoperative protein metabolism in elderly patients undergoing hip arthroplasty.

Br J Anaesth 63 (1989) 276-282

Carroll MC

The role of complement and the complement receptors in induction and regulation of immunity.

Annu Rev Immunol 16 (1998) 545-68

Chen CC, Manning AM.

TGF-beta 1, IL-10 and IL-4 differentially modulate the cytokine-induced expression of IL-6 and IL-8 in human endothelial cells.

Cytokine. 1996 Jan;8(1):58-65.

Chen WF and Zlotnik A

IL 10: a novel cytotoxic T cell differentiation factor.

Journal of Immunology 147 (1991) 528-34

Cheng GH, Morrow-Tesch JL, Beller DI, Levy EM, Black PH

Immunosuppression in mice induced by cold water stress.

Brain Behav Immun 4 (1990) 278-91

Chiara O, Giomarelli P, Biagioli B, Gattinoni L

Hypermetabolic response after hypothermic cardiopulmonary bypass.

Crit Care Med 15 (1987) 995-999

Chomater P, Rosson MC, Banchereau J, Miossec P

Interferon gamma inhibits interleukin 10 production by monocytes.

Journal of Experimental Medicine 177 (1993) 523-7

Clardy CW, Edwards KM, Gay JC

Increased susceptibility to infection in hypothermic children: possible role of acquired neutrophil dysfunction.

Pediatr Infect Dis 4 (1985) 379-382

Clifton GL, Allen S, Barrodale P, Plenger P, Berry J, Koch S, Fletcher J, Haayes R, Choi SC
A Phase II study of moderate hypothermia in severe brain injury.

J Neurotrauma 10 (1993) 263-271

Coimbra C, Wieloch T

Moderate hypothermia mitigates neuronal damage in the rat brain when initiated several hours following transient cerebral ischemia.

Acta Neuropathol 87 (1994) 325-331

Coimbra C, Drake M, Boris-Möller F, Wieloch T

Long-lasting neuroprotective effect of postischemic hypothermia and treatment with antiinflammatory/antipyretic drug.

Stroke 27 (1996) 1578-1585

D

D'Andrea A, Aste-Amezaga M, Valiante NM, Ma X, Kubin M, Trinchieri G

Interleukin 10 (IL10) inhibits human lymphocyte interferon γ production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL12 synthesis in accessory cells.

Journal of Experimental Medicine 178 (1993) 1041-8

Derkx B, Taminiou J, Radena S, Stronkhorst A, Wertel C, Tytgat G, van Deventer S

Tumor necrosis factor antibody treatment in Chron's disease.

Lancet 342 (1993) 173-4

Dietrich WD, Busto R, Alonso O, Globus MY, Ginsberg MD

Intraischemic but not postischemic brain hypothermia protects chronically following global forebrain ischemia in rats.

J Cereb Blood Flow Metab 13 (1993) 541-549

Dinarello CA

Proinflammatory cytokines.

Chest 118 (2000) 503-8

Duguid H, Simpson RG, Stowers JM

Accidental hypothermia.

Lancet 2 (1996) 1213-1219

Dunzendorfer S, Kaser A, Meierhofer C, Tilg H, Wiedermann CJ

Dendritic cell migration in different micropore filter assays.

Immunol Lett 71 (2000) 5-11

E

Esmon C

Possible involvement of cytokines in diffuse intravascular coagulation and thrombosis.

Baillieres Clin Haematol. 1994 Sep;7(3):453-68

F

Fater-Schröder M

Tumor necrosis factor type a, a potent inhibitor of endothelial cell growth in vitro is angiogenic in vivo.

Proceedings of the National Academy of Science (USA) 84 (1987) 5277-81

Fearon DT

The complement system and adaptive immunity.

Semin Immun 10 (1998) 355-61

Foulis AK

Morphological study of the relation between accidental hypothermia and acute pancreatitis.

J Clin Pathol 35 (1982) 1244-48

Frank SM, Fleisher LA, Breslow MJ, Higgins MS, Olson KF, Kelly S, Beattie C

Peroperative maintenance of normothermia reduces the incidence of morbid cardiac events: A randomized clinical trial.

JAMA 277 (1997) 1127-1134

Frank SM, Beattie C, Christopherson R, Norris EJ, Perler BA, Williams GM, Gottlieb SO.

Unintentional hypothermia is associated with postoperative myocardial ischemia. The Perioperative Ischemia Randomized Anesthesia Trial Study Group.

Anesthesiology 1993 Mar, 78 (3): 468-76

Fuchs AC, Granowitz EV, Shapiro L, Vannier E, Lonnemann G, Angel JB, Kennedy JS,

Rabson AR, Radwanski E, Affrime MB, Cutler DL, Grint PC, Dinarello CA.

Clinical, hematologic, and immunologic effects of interleukin-10 in humans.

J Clin Immunol. 1996 Sep;16(5):291-303.

Fugger R, Hamilton G, Steininger R, Mirza D, Schulz F, Muhlbacher F.

Intraoperative estimation of endotoxin, TNF alpha, and IL-6 in orthotopic liver transplantation and their relation to rejection and postoperative infection.

Transplantation 1991 Aug;52(2):302-6

Fujimoto M, Uemura M, Nakatani Y, Tsujita S, Hoppo K, Tamagawa T, Kitano H, Kikukawa

M, Ann T, Ishii Y, Kojima H, Sakurai S, Tanaka R, Namisaki T, Noguchi R, Higashino T,

Kikuchi E, Nishimura K, Takaya A, Fukui H.

Plasma endotoxin and serum cytokine levels in patients with alcoholic hepatitis: relation to severity of liver disturbance.

Alcohol Clin Exp Res. 2000 Apr;24(4 Suppl):48S-54S.

G

Gillitzer R, Berger R, Mielke V, Muller C, Wolff K, Stingl G

Upper keratinocytes of psoriatic skin lesions express high levels of NAP mRNA in situ.
J Invest Dermatol 97 (1991) 73-9

Gleich GJ

Eosinophils, basophils and mast cells.

J Allergy Clin Immunol 84 (1989) 1024

Gnant EF, Turner EM, Alexander HR Jr

Effects of hyperthermia and tumour necrosis factor on inflammatory cytokine secretion and procoagulant activity in endothelial cells.

Cytokine. 2000 Apr;12(4):339-47.

Goundasheva D, Andonova M, Ivanov V

Changes in some parameters of the immune response in rats after cold stress.

Zentralbl Veterinarmed 41 (1994) 670-74

H

Hack EC, Aarden LA, and Thijs LG

Role of cytokines in sepsis.

Adv Immunol 66 (1997) 101-195

Hacke W, Schwab S, Horn M, Sprabger M, De Georgia M, v. Kummer R

Malignant middle cerebral artery territory infarction: clinical course and prognostic signs.

Arch Neurol 53 (1996) 309-315

Hansen D, Bogatzki S, Syben R, Bechrakis NE, Dopjans D, Spies C, Welte M, Schaffartzik W.

Effect of profound normovolemic hypotension and moderate hypothermia on circulating cytokines and adhesion molecules.

Shock 1999 Nov;12(5):335-9

Hartwig JH, Thelen M, Rosen A, Janmey PA, Nairn AC, Aderem A.
MARCKS is an actin filament crosslinking protein regulated by protein kinase C and

calcium-calmodulin.

Nature 1992 Apr 16;356(6370):618-22

Hatherill M, Tibby SM, Turner C, Ratnavel N, Murdoch IA.

Procalcitonin and cytokine levels: relationship to organ failure and mortality in pediatric septic shock.

Crit Care Med. 2000 Jul;28(7):2591-4.

Hayashi N, Hirayama T, Udagawaw A, Diamon W, Ohata M

Systemic management of cerebral edema based on a new concept in severe head injury patients.

Acta Neurochir 60 (1994) 541-543

Haynes BF, Denning SM

Lymphopoiesis

In: "The Molecular Basis of Blood Diseases"

G Stamatoyannopoulos et al (eds), Philadelphia, Saunders, 1993, 2d ed, pp 425-462

Haziot A, Chen S, Ferrero E, Low MG, Silber R, and Goyert SM

The monocyte differentiation antigen, CD14, is anchored to the cell membrane by a phosphatidylinositol linkage.

J Immunol 141 (1988) 547

Haziot A, Tsuberi B, and Goyert SM

Neutrophil CD14: biochemical properties and role in the secretion of TNF- α in response to LPS.

J Immunol 150 (1993) 5556

Haziot A, Ferrero E, Koentgen F, Hijinya N, Yamamoto S, Silver J, Stewart CL, and Goyert SM

Resistance to endotoxin shock and reduced dissemination of Gram-negative bacteria in CD14-deficient mice.

Immunity 4 (1996) 407

Haziot A, Hijiya N, Gangloff SC, Silver J, and Goyert SM
Induction of a novel mechanism of accelerated bacterial clearance by lipopolysaccharide in CD-14-deficient and Toll-like receptor deficient mice.
J Immunol 166 (2001) 1075-78

Hechtman DH, Cybulsky MI, Fuchs HJ, Baker JB, Gimbrone MA Jr.
Intravascular IL-8. Inhibitor of polymorphonuclear leukocyte accumulation at sites of acute inflammation.
J Immunol 1991 Aug 1;147(3):883-92

Heinrich PC, Castell JV, Andus T
Interleukin-6 and the acute phase response.
Biochem J. 1990 Feb 1;265(3):621-36.

Helle M, Brackenhoff JP, De Groot ER, Aarden LA
Interleukin 6 is involved in interleukin 1-induced activities.
Eur J Immunol. 1988 Jun;18(6):957-9.

Herman A, Kappler JW, Marrack P, Pullen AM
Superantigens: Mechanism of T-cell stimulation and the role in immune response.
Annu Rev Immunol 9 (1991) 745

Holmes WE, Lee J, Kuang WJ, Rice GC, Wood WI.
Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor.
Science. 1991 Sep 13;253(5025):1278-80.

Huber AR, Kunkel SL, Todd RF 3rd, Weiss SJ.
Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8.
Science 1991 Oct 4;254(5028):99-102

Hynson J, Sessler DI
Intraoperative warming therapies: A comparison of three devices.
J Clin Anesth 4 (1992) 194-199

I

Issekutz AC, Biggar WD

Influence of serumderived chemotactic factors and bacterial products on human neutrophil chemotaxis.

Infect Immun 15 (1977) 212-220

J

Jensen LS, Andersen AJ, Christiansen PM, et al.

Postoperative infection and natural killer cell function following blood transfusion in patients undergoing elective colorectal surgery.

Br J Surg 79 (1992) 513-6

Jinquan T, Larsen CG, Gesser B, Matsushima K, Thestrup-Pedersen K

Human IL 10 is a chemoattractant for CD8+T lymphocytes and an inhibitor of IL-9 induced CD4+ T lymphocyte migration.

J Immun 51:4545-51 (1993).

Jonsson K, Jensen JA, Goodson WH III, West JM, Hunt TK

Assessment of perfusion in postoperative patients using tissue oxygen measurements.

Br J Surg 74 (1987) 263-7

Joris J, Ozaki M, Sessler DI, Hardy AF, Lamy M, McGuire J, Blanchard D, Schroeder M, Moayeri A.

Epidural anesthesia impairs both central and peripheral thermoregulatory control during general anesthesia.

Anesthesiology 1994 Feb;80(2):268-77

Joris J, Ozaki M, Sessler DI, Hardy AF, Lamy M, McGuire J, Blanchard D, Schroeder M, Moayeri A.

Epidural anesthesia impairs both central and peripheral thermoregulatory control during general anesthesia.

Anesthesiology. 1994 Feb;80(2):268-77.

K

Karibe H, Chen J, Zarow GJ, Graham SH, Weinstein PR

Delayed induction of mild hypothermia to reduce infarct volume after temporary middle cerebral artery occlusion in rats.

J Neurosurg 80 (1994) 112-119

Kasai T, Inada K, Takakuwa T, Yamada Y, Inoue Y, Shimamura T, Taniguchi S, Sato S, Wakabayashi G, Endo S.

Anti-inflammatory cytokine levels in patients with septic shock.

Res Commun Mol Pathol Pharmacol. 1997 Oct;98(1):34-42.

Keel M, Ungethum U, Steckholzer U, Niederer E, Hartung T, Trentz O, Ertel W.

Interleukin-10 counterregulates proinflammatory cytokine-induced inhibition of neutrophil apoptosis during severe sepsis.

Blood. 1997 Nov 1;90(9):3356-63.

Klein TW

Stress and infections.

J Fla Med Assoc 80 (1993) 409-11

Knighton DR, Halliday B, Hunt TK

Oxygen as an antibiotic: the effect of inspired oxygen on infection.

Arch Surg 119 (1984) 199-204

Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, Elner VM, Elner SG, Strieter RM.

Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis.

Science 1992 Dec 11;258(5089):1798-801

Koch AE, Kunkel SL, Burrows JC, Evanoff HL, Haines GK, Pope RM, Strieter RM.

Synovial tissue macrophage as a source of the chemotactic cytokine IL-8.

J Immunol 1991 Oct 1;147(7):2187-95

Kos FJ

Regulation of adaptive immunity by natural killer cells.

Immunol Res 17 (1998) 303-12

Kunkel SL, Standiford T, Kasahara K, Strieter RM.

Interleukin-8 (IL-8): the major neutrophil chemotactic factor in the lung.

Exp Lung Res 1991 Jan-Feb;17(1):17-23

Kuna P, Reddigari SR, Kornfeld D, Kaplan AP.

IL-8 inhibits histamine release from human basophils induced by histamine-releasing factors, connective tissue activating peptide III, and IL-3.

J Immunol 1991 Sep 15;147(6):1920-4

Kurz A, Plattner O, Sessler DI, Huemer G, Redl G, Lackner F

The threshold of regulatory vasoconstriction during nitrous oxide/isoflurane anesthesia is lower in elderly than in young patients.

Anesthesiology 79 (1993) 465-9

Kurz A, Go JC, Sessler DI, Kaer K, Larson M, Bjorksten AR

Alfentanil slightly increases the sweating threshold and markedly reduces the vasoconstriction and shivering thresholds.

Anesthesiology 83 (1995) 293-99

Kurz A, Sessler DI, Annadata R, Dechert M, Christenson R

Midazolam minimally impairs thermoregulatory control.

Anesth Analg 81 (1995) 393-98

Kurz A, Sessler DI, Narzt E, Bekar A, Lenhardt R, Huemer G

Postoperative hemodynamic and thermoregulatory consequences of intraoperative core hypothermia.

J Clin Anesth 7 (1995) 359-366

Kurz A, Sessler DI, Lenhardt R

Perioperative normothermia to reduce the incidence of surgical wound infection and shorten hospitalization.

N Engl J Med 334 (1996) 1209-1215

L

Larson RS, Springer TA.

Structure and function of leukocyte integrins.

Immunol Rev 1990 Apr;114:181-217

Lin KJ, Lin J, Hanasawa K, Tani T, Kodama M

Interleukin 8 as a predictor of the severity of bacteremia and infectious disease.

Shock 14 (2000) 95-100

Lee F

Interleukin 6: a multifunctional regulator of growth and differentiation.

Annals of the New York Academy of Science 557 (1989) 215-29

Lee J, Horuk R, Rice GC, Bennett GL, Camerato T, Wood WI.

Characterization of two high affinity human interleukin-8 receptors.

J Biol Chem 1992 Aug 15; 267 (23):16283-7

Lew PD.

Receptors and intracellular signaling in human neutrophils.

Am Rev Respir Dis 1990 Mar;141(3 Pt 2):S127-31

M

Mackowiak PA

Direct effects of hyperthermia on pathogenic microorganisms:teleologic implications with regard on fever.

Rev Infect Dis 3 (1981)508-20

Maini RN, Breedveld FC, Kalden JR.

Therapeutic efficacy of multiple intravenous infusions of anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody combined with low-dose weekly methotrexate in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 41 (1998) 1552-63

Majumdar S, Rossi MW, Fujiki T, Phillips WA, Disa S, Queen CF, Johnston RB Jr, Rosen OM, Corkey BE, Korchak HM.

Protein kinase C isotypes and signaling in neutrophils. Differential substrate specificities of a translocatable calcium- and phospholipid-dependent beta-protein kinase C and a phospholipid-dependent protein kinase which is inhibited by long chain fatty acyl coenzyme A.

J Biol Chem 1991 May 15;266(14):9285-94

Marion DW, Penrod LE, Kelsey SF, Obrist WD, Kochanek PM, Palmer AM, Wisniewski Sr, DeKosky ST

Treatment of traumatic brain injury with moderate hypothermia. *N Engl J Med* 336 (1997) 540-546

Martinez-Maza O and Berek J

IL-6 and cancer treatment.

In vivo 5 (1991) 583-8

Matsukawa T, Sessler DI, Sessler AM, Schroeder M, Ozaki M, Kurz A, Cheng C

Heat flow and distribution during induction of general anesthesia.

Anesthesiology 82 (1995) 662-73

Matsukawa T, Kurz A, Sessler DI, Bjorksten AR, Merrifield B, Cheng C

Propofol linearly reduces the vasoconstriction and shivering thresholds.

Anesthesiology 82 (1995) 1169-80

Matsushima K, Oppenheim JJ.

Interleukin 8 and MCAF: novel inflammatory cytokines inducible by IL 1 and TNF.

Cytokine. 1989 Nov;1(1):2-13.

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr.

A human homologue of the Drosophila Tollprotein signals activation of adaptive immunity.

Nature 338 (1997) 394-7

Medzhitov R, Janeway CA Jr.

Innate Immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition.

Cell 91 (1997) 295-8

Innate Immunity: impact on the adaptive immune response.

Curr Opin Immunol 9 (1997) 4-9

Innate immune recognition and control of adaptive immune responses.

Semin Immunol. 10 (1998) 351-3

Innate Immunity

JMed.2000Aug3;343(5):338-44.

Metz C, Holzschuh M, Bein T, Woertgen C, Frey I, Taeger K, Brwanski A

Moderate hypothermia in patients with severe head injury: cerebral and extracerebral effects.

J Neurosurg 85 (1996) 533-41

Michenfelder JD, Milde JH

Failure of prolonged hypocapnia, hypothermia, or hypertension to favourably alter acute stroke in primates.

Stroke 8 (1977) 87-91

Michelson AD, Mac Gregor H, Barnard MR,

Reversible inhibition of human platelet activation by hypothermia in vivo and in vitro.

Thromb Haemost 71 (1994) 633-40

Mitsushima K, Oppenheim JJ

Interleukin 8 and MCAF: a novel inflammatory cytokines inducible by IL-1 and TNF.

Cytokine 1 (1989) 2-13

Mizushima Y, Wang P, Cioffi WG, Bland KI, Chaudry IH.

Restoration of body temperature to normothermia during resuscitation following trauma-hemorrhage improves the depressed cardiovascular and hepatocellular functions.

Arch Surg 2000 Feb;135(2):175-81

Moudgil GC, Pandya AR, Ludlow DJ
Influence of anaesthesia and surgery on neutrophil chemotaxis.
Can Anaesth Soc J 28 (1981) 232-8

Mule JJ, Marcus SG, Yang JC, Weber JS, Rosenberg SA.
Clinical application of IL-6 in cancer therapy.
Research Immunology 143 (1992) 777-9

Muller HK, Lugg DJ, Quinn D
Cell mediated immunity in Antarctic wintering personnel: 1984-1992.
Immunol Cell Biol 73 (1995) 316-20

Murphy PM, Tiffany HL.
Cloning of complementary DNA encoding a functional human interleukin-8 receptor.
Science. 1991 Sep 13;253(5025):1280-3.

N

Nacy CA, Meierovics AI, Belosevic M, Green SJ
Tumor necrosis factor-alpha: Central regulatory cytokine in the induction of macrophage antimicrobial activities.
Pathobiology 59 (1991) 182-4

Narz E, Wenisch C, Lenhardt R, Paraschalk B
Mild perioperative hypothermia reduces production of reactive oxygen intermediates by polymorphnuclear leucocytes,
Anesthesiology 83 (1995) A226

Norzila MZ, Fakes K, Henry RL, Simpson J, Gibson PG.
Interleukin-8 secretion and neutrophil recruitment accompanies induced sputum eosinophil activation in children with acute asthma.

Am J Respir Crit Care Med. 2000 Mar;161(3 Pt 1):769-74.

O

O'Garra A, Chang R, Go N, Hastings R, Haughton H, Howard M
Ly-1 B (B-1) cells are the main source of B cell-derived interleukin 10.
European Journal of Immunology 22 (1992) 711-7

Ohzato H, Yoshizaki K, Nishimoto N, Ogata A, Tagoh H, Monden M, Gotoh M, Kishimoto T, Mori T
IL-6 as a new indicator of inflammatory status: detection of serum levels of IL-6 and C-reactive protein after surgery.
Surgery 111 (1992) 201-9

Okano N, Owada R, Fujita N, Kadoi Y, Goto F
Cerebral oxygenation is better during mild hypothermic than normothermic cardiopulmonary bypass.
Can J Anaesth 47 (2000) 131-6

Orosz P, Echtenacher B, Falk W, Ruschoff J, Weber D, Mannel DN
Enhancement of experimental metastasis by tumor necrosis factor.
Journal of Experimental Medicine 177 (1993) 1391-8

Ozaki M, Kurz A, Sessler DI, Lenhardt R, Schroeder M, Moayeri A, Noyes KM, Rotheneder E
Thermoregulatory thresholds during epidural and spinal anesthesia.
Anesthesiology 81 (1994) 282-288

Ozaki M, Sessler DI, Suzuki H, Ozaki K, Tsunoda C, Atarashi K
Nitrous oxide decreases the threshold for vasoconstriction less than sevoflurane or isoflurane.
Anesth Analg 80 (1995) 1212-1216

P

Paul WE (ed)

Fundamental Immunology, 2d ed. New York, Raven, 1989.

Presneill JJ, Waring PM, Layton JE, Maher DW, Cebon J, Harley NS, Wilson JW, Cade JE
Plasma granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor levels in critical illness including sepsis and septic shock: relation to disease severity, multiple organ dysfunction, and mortality.
Crit Care Med. 2000 Jul;28(7):2344-54.

Q

R

Rabinowich H, Sedlmayr P, Herberman RB, Whiteside TL

Response of human NK cells to IL-6 alterations of the cell surface phenotype, adhesion to fibronectin and laminin, and tumor necrosis factor-alpha/beta secretion.

J Immunol. 1993 Jun 1;150(11):4844-55.

Reed L, Johnson TD, Hudson JD, Fisher RP

The disparity between hypothermic coagulopathy and clotting studies.

J Trauma 33 (1992) 465-470

Resnick DK, Marion DW, Darby JM

The effect of hypothermia on the incidence of delayed traumatic intracerebral hemorrhage.

Neurosurgery 34 (1994) 252-255

Robey E, Allison JP

T-cell activation: Integration of signals from the antigen receptor and costimulatory molecules.

Immunol Today 16 (1993) 306

Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF
A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll.
Proc Natl Acad Sci USA 95 (1998) 588-93

Rohrer MJ, Natale A
Effect of hypothermia on the coagulation cascade.
Crit Care Med 20 (1992) 1402-1405

Ruscetti FW, Keller JR, Longo DL
Hämatpoese (Kapitel 105)
In: „Harrisons Innere Medizin“,
Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, Wilson JD, Martin JB, Kasper DL, Hauser SL,
Longo DL (Hrsg.), McGraw-Hill International (UK) Ltd.,
London u.a., 1999, 14. Auflage, 759-765

S

Safar P, Klain M, Tisherman S
Selective brain cooling after cardiac arrest.
Crit Care Med 24 (1996) 911-14

Sakamoto K, Masuda T, Mita S, Ishiko T, Nakashima Y, Arakawa H, Egami H, Harada S,
Matsushima K, Ogawa M.
Interleukin-8 is constitutively and commonly produced by various human carcinoma cell
lines.
Int J Clin Lab Res 1992;22(4):216-9

Sampson AP
The role of eosinophils and neutrophils in inflammation
Clin Exp Allergy 30 (2000) 22-7

Schiller JH, Bittner G, Spriggs DR
Tumor necrosis factor, but not other hematopoietic growth factors, prolongs the survival of
hairy cell leukemia cells.

Leukocyte Research 16 (1992) 337-46

Schmied H, Kurz A, Sessler DI, Kozek S, Reiter A

Mild hypothermia increases blood loss and transfusion requirements during total hip arthroplasty.

Lancet 347 (1996) 289-292

Schuster JM, Nelson PS

Toll receptors: an expanding role in our understanding of human disease.

J Leukoc Biol. 67 (2000) 767-73

Schwab S, Schwarz S, Spranger M, Keller E, Betram M, Hacke W

Moderate hypothermia in the treatment of patients with severe middle cerebral artery infarction.

Stroke 29 (1998) 2461-6

Segers MJM, Diephuis JC, van Kesteren RG, van der Werken C

Hypothermie bei Traumapatienten

Der Unfallchirurg 10 (1998) 742-9

Seki T, Joh K, Oh-ishi T.

Augmented production of interleukin-8 in cerebrospinal fluid in bacterial meningitis.

Immunology 1993 Oct;80(2):333-5

Simonet WS, Hughes TM, Nguyen HQ, Trebasky LD, Danilenko DM, Medlock ES.

Long-term impaired neutrophil migration in mice overexpressing human interleukin-8.

J Clin Invest. 1994 Sep;94(3):1310-9.

Sheffield CW, Sessler DI, Hopf HW, Schroeder M, Moayeri A, Hunt TK, West JM

Centrally and locally mediated thermoregulatory responses alter subcutaneous oxygen tension.

Wound Rep Reg 4 (1997) 339-45

Shiozaki T, Sugimoto H, Taneda M, Yoshida H, Sugimoto T
Effect of mild hypothermia on uncontrolled intracranial hypertension after severe head injury.
J Neurosurg 79 (1993) 363-368

Simonet WS, Hughes TM, Nguyen HQ, Trebasky LD, Danilenko DM, Medlock ES.
Long-term impaired neutrophil migration in mice overexpressing human
interleukin-8.
J Clin Invest 1994 Sep;94(3):1310-9

Stasia MJ, Strulovici B, Daniel-Issakani S, Pelosin JM, Dianoux AC, Chambaz E, Vignais
PV.
Immunocharacterization of beta- and zeta-subspecies of protein kinase C in bovine
neutrophils.
FEBS Lett 1990 Nov 12;274(1-2):61-4

Stravena JE, van Besien KW, Derigs G, Hoffman R
Is IL-6 the physiological regulator of thrombopoiesis?
Experimental Hematology 20 (1992) 47-50

Strieter RM, Kunkel SL, Bone RC
Role of tumor necrosis factor-alpha in disease states and inflammation.
Crit. Care Med. 21 (1993) 447-63

Strieter RM, Kasahara K, Allen RM, Standiford TJ, Rolfe MW, Becker FS, Chensue SW,
Kunkel SL.
Cytokine-induced neutrophil-derived interleukin-8.
Am J Pathol. 1992 Aug;141(2):397-407

Sung Y, Akrotis V, Barker C, Calderwood S, Biggar WD
Susceptibility of human and porcine neutrophils to hypothermia in vitro.
Pediatr Res 19 (1985) 1044-47

T

Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T.

Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components.

Immunity 11 (1999) 433-51

Thelen M, Baggiolini M.

Reconstitution of cell-free NADPH-oxidase from human monocytes and comparison with neutrophils.

Blood 1990 Jun 1;75(11):2223-8

Thelen M, Rosen A, Nairn AC, Aderem A.

Regulation by phosphorylation of reversible association of a myristoylated protein kinase C substrate with the plasma membrane.

Nature 1991 May 23;351(6324):320-2

Thivierge M, Parent JL, Stankova J, Rola-Pleszczynski M

Modulation of formyl peptide receptor expression by IL-10 in human monocytes and neutrophils.

J Immunol 162 (1999) 3590-5

Thompson-Snipes L, Dhar V, Bond MW, Mosmann TR, Moore KW, Rennick DM

Interleukin 10: a novel stimulatory factor for mast cells and their progenitors.

Journal of Experimental Medicine 173 (1991) 507-10

Tracey KJ and Cerami A

Tumor necrosis factor : an updated review of its biology.

Crit. Care Med 21 (1993) 415-22

U

V

van Oss CJ, Absolom DR, Moore LL, Park BH, Humbert JR.

Effect of temperature on the chemotaxis, phagocytic engulfment, digestion and O₂ consumption of human polymorphonuclear leukocytes.

J Reticuloendothelial Soc 1980 Jun; 27 (6): 561-5

W

Warren DJ, Slordal L, Moore MA

Tumor necrosis factor induces cell cycle arrest in multipotential hematopoietic stem cells: a possible radioprotective mechanism.

European Journal of Haematology 45 (1990) 158-63

Washington D, Sessler DI, Moayeri A, Merrifield B, Prager M, McGuire J, Belani K, Hudson S, Schroder M

Thermoregulatory responses to hypothermia during isoflurane anesthesia in humans.

J Appl Physiol 74 (1993) 82-87

Wenisch C, Narzt E, Sessler DI, Parschalk B, Lenhardt R, Kurz A, Graninger W

Mild intraoperative hypothermia reduces production of reactive oxygen intermediates by polymorphonuclear leukocytes.

Anesth Analg 82 (1996) 810-16

Wiedermann CJ, Niedermuhlbichler M, Wiedermann CJ

Priming of polymorphonuclear neutrophils by atrial natriuretic peptide in vitro.

J Clin Invest 1992 (89) 1580-1586

Winkler M, Stanek E, Sator S, Greher M, Steininger S.

Improved perioperative care in major orthopaedic surgery: preoperative, intraoperative and

postoperative contributions.

Acta Anaesthesiol Scand Suppl 1997; 111: 202-5

Wogensen L, Huang X, Sarvetnick N.

Leukocyte extravasation into the pancreatic tissue in transgenic mice expressing interleukin 10 in the islets of Langerhans.

J Exp Med. 1993 Jul 1;178(1):175-85.

Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, and Mathison JC

CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein.

Science 249 (1990) 1431

X

Xiong J, Kurz A, Sessler DI, Plattner O, Christensen R, Dechert M, Ikeda T

Isoflurane produces marked and non-linear decreases in vasoconstriction and shivering thresholds.

Anesthesiology 85 (1996) 240-45

Y

Yssel H, De Waal Malefyt R, Roncarolo MG, Abrams JS, Lahesmaa R, Spits H, de Vries JE.

IL-10 is produced by subsets of human CD4⁺ T cell clones and peripheral blood T cells.

J Immunol 1992 Oct 1;149(7):2378-84

Z

Zlotnik A and Moore KW

Interleukin 10.

Cytokines 3 (1991) 366-71

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der Auftrennung von Vollblut nach Zentrifugation über über LymphoprepTM in einem Zentrifugenröhrchen

Abb.2: Mikroskopische Ansicht der Felder einer Neubauer improvedTM Zählkammer

Abb.3: Schematische Darstellung einer Chemotaxiskammer

Abb.4: Schematische Darstellung eines Nitrozellulosefilters mit darin enthaltenen Zellen

Abb.5: Migration gegen Medium

Abb.6: Migration gegen IL-8

Abb.7: IL-6 Spiegel

Abb.8: IL-8 Spiegel

Abb.9: IL-10 Spiegel

Abb.10: TNF α Spiegel

Tabellenverzeichnis

Tab.1: Granula neutrophiler Granulozyten

Tab.2: Rezeptoren für gebundene Liganden

Tab.3: Rezeptoren für soluble Liganden

Tab.4: Übersicht über die Nebenwirkungen milder perioperativer Hypothermie anhand von klinischen Studien

Danksagung

Die vorliegende Dissertation entstand in der Zeit von Oktober 1999 bis Januar 2001 an der Universitätsklinik für Innere Medizin der Leopold-Franzens-Universität Innsbruck in Zusammenarbeit mit Herrn Univ. Prof. Christian Peschel, Direktor der Medizinischen Klinik III der Universitätsklinik für Innere Medizin der Technischen Universität München. Während dieser Zeit arbeitete ich im Intensivmedizinischen-Labor unter der Leitung von Herrn Univ. Prof. Christian J. Wiedermann an der experimentellen Dissertation. Für die Einräumung der mir dadurch entstandenen Möglichkeit zur wissenschaftlichen Arbeit und den geführten Diskussionen sowie für die Hilfe bei der Erstellung der Arbeit möchte ich ihm ganz herzlich danken.

Herrn Univ. Assistent Dr. Stefan Dunzendorfer danke ich für die intensive Betreuung des Projekts. Von dem mit ihm geführten Diskussionen gingen wertvolle Impulse aus.

Desweiteren möchte ich mich ganz herzlich bedanken bei Dr. Nicole Kaneider, Dr. Christina Reinisch, Dr. Angela Djanani, Mag. Petra Egger und OA Dr. Christian Kähler, die nicht nur für ein gutes Arbeitsklima sorgten, sondern auch für alle größeren und kleineren Problemen ein offenes Ohr hatten.

Zuletzt gilt mein herzlichster Dank meinem Mann Herrn Univ. Assistent Dr. Romed Meirer, meinen Eltern und meinen engsten Freunden, allen voran cand.med. Änni Schumacher und cand. med. Kristin Weißenbacher, die mich durch alle Höhen und Tiefen der letzten Jahre liebevoll begleitet haben.

Innsbruck, Januar 2001
