

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik - Innenstadt
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Wolf E. Mutschler

**Initiale Analyse der RNA-Expression
spezifischer Mediatoren nach
erfolgreicher kardiopulmonaler
Reanimation**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Henning Laven

aus
Ibbenbüren

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. P. Biberthaler

Mitberichterstatter: Prof. Dr. N. Nedopil
Prof. Dr. S. Koletzko
PD Dr. G. Rieder

Mitbetreuung durch den
Promovierten Mitarbeiter: Dr. J. Landes

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 23.07.2009

für Noah und Jona

Inhalt:

1.	Einleitung	1
1.1	Postresuscitation Syndrome, SIRS und Sepsis und deren Immunmodulation	3
1.2	Unspezifische und spezifische Mechanismen des Immunsystems	6
1.3	Humorale Mechanismen	7
1.4	Zelluläre Mechanismen	8
1.5	Zytokine	11
1.5.1	Tumornekrosefaktor alpha (TNF-)	13
1.5.2	Interleukin 10 (IL-10)	14
1.5.3	Interleukin 1-Rezeptorantagonist (IL1-ra)	15
1.5.4	Interleukin 8 (IL-8)	16
1.5.5	Poly-Morpho-Nukleäre-Elastase (PMN-Elastase)	18
1.6	Methodische Aspekte	19
2.	Fragestellung	21
3.	Material und Methoden	23
3.1	Phase 1 – Validierung des experimentellen Protokolls	24
3.1.1	Probanden	24
3.1.2.	Intrazelluläre Zytokinexpression	25
3.1.2.A.I	Zellseparationen und Leukozytenisolation aus EDTA-Vollblut	25
3.1.2.A.II	RNA - Isolation aus Monozyten und Granulozyten	28
3.1.2.B	Vollblutmedium (PAXgene [®]) und dessen RNA - Isolation	30
3.1.2.C	cDNA-Synthese und reverse Transkription	32
3.1.2.D	Detektion mittels quantitativer qRT-PCR	35
3.1.2.E	Elektrophorese auf Agarosegel- basis	40
3.1.2.F	Stimulationsbedingungen	43
3.1.2.G	Gen of interest (Auswahl geeigneter Messparameter)	45
3.1.2.H	Housekeeping- Gene als interne, intrazelluläre Normierungsgrößen	46
3.1.3	Systemische Zytokinkonzentrationen (ELISA)	46

3.2	Phase 2 – Klinisch experimenteller Teil	50
3.2.1	Patienten	51
3.2.2	Probengewinnung	51
3.2.3	Intrazelluläre Zytokinexpression mittels Vollblutmedium (PAXgene®)	52
3.2.3.A	Weiterverarbeitung der Proben	52
3.2.3.B	Protokollmodifikation (shredder)	52
3.2.4	Systemische Zytokinkonzentration mittels ELISA	53
3.2.5	Statistische Auswertung	53
4.	Ergebnisse	54
4.1	Phase 1 – Validierung des experimentellen Protokolls	54
4.1.1	Probanden	54
4.1.2	Intrazelluläre Zytokinexpression	54
	A Zellseparation vs. Vollblutmedium	54
	B Stimulationsbedingungen	55
	C Normierungsmethoden / Housekeeping-Gene	59
4.1.3	ELISA	61
4.2	Phase 2 – Klinisch-experimenteller Teil	62
4.2.1	Patienten	62
4.2.2	Intrazelluläre Zytokinexpression und systemische Zytokinkonzentration	64
	A Tumornekrosefaktor alpha (TNF-)	64
	B Interleukin 10 (IL-10)	67
	C Interleukin 1-Rezeptorantagonist (IL1-ra)	70
	D Interleukin 8 (IL-8)	73
	E Poly-Morpho-Nukleäre-Elastase (PMN-Elastase)	76

5.	Diskussion	79
5.1	Phase 1 – Validierung des experimentellen Protokolls	79
5.1.1	Zellseparation vs. Vollblutmedium	79
5.1.2	Stimulationsbedingungen	81
5.1.3	Normierungsmethoden / Housekeeping – Gene	82
5.1.4	Systemische Zytokinkonzentrationen / ELISA	84
5.2	Phase 2 – Klinisch-experimenteller Teil	85
5.2.1	Patienten	85
5.2.2	Bewertung des Tumornekrosefaktor alpha (TNF-)	87
5.2.3	Bewertung von Interleukin 10 (IL-10)	88
5.2.4	Bewertung von Interleukin 1- Rezeptorantagonist (IL1-ra)	89
5.2.5	Bewertung von Interleukin 8 (IL-8)	91
5.2.6	Bewertung von Poly-Morpho-Nukleäre-Elastase (PMN-Elastase)	93
6.	Zusammenfassung	94
7.	Literatur	98
8.	Glossar	110
9.	Chemikalien und Reagenzien	112
10.	Curriculum vitae	113
11.	Schlussbemerkung und Danksagung	115

1 Einleitung

Herz-Kreislaufferkrankungen führen in ihrer Kausalität die deutsche Todesursachenstatistik weiterhin maßgeblich an und bedingen europaweit jährlich bei etwa 375.000 Menschen einen Herz-Kreislaufstillstand [20;182]. Ein Herz-Kreislaufstillstand mit der Notwendigkeit sofortiger kardio-pulmonaler Wiederbelebnungsmaßnahmen (*CPR*) stellt die Maximalvariante eines unmittelbar lebensbedrohlichen Zustands eines Krankheitsbildes dar und kann als Extremlastung des Organismus interpretiert werden. In den westlichen Industrienationen sind die Ursachen für einen präklinischen Herz-Kreislaufstillstand charakterisierend abgebildet: So werden mit über 82 % Herzinfarkte und maligne Herzrhythmusstörungen, gefolgt von Lungen- und Gehirnerkrankungen (9 %) sowie äußere Einwirkungen wie Unfall, Erstickten, Vergiftung, Ertrinken, Suizid und weitere Erkrankungen als Kausalität für einen Kreislaufstillstand angegeben [160].

Die als *Outcome* bezeichneten Überlebensraten werden von vielen Faktoren beeinflusst: Neben der zugrunde liegenden Ursache des Kreislaufversagens scheinen das Patientenalter, präexistente Vorerkrankungen sowie die zeitliche Koordination und Qualität der lebenserhaltenden Reanimation selbst einen entscheidenden Einfluss auf den unmittelbar primären Erfolg eines als *return of spontaneous circulation – ROSC* bezeichneten Spontankreislaufs zu haben [149].

Obwohl sich zahlreiche Arbeiten und Organisationen dieser Thematik mit dem Ziel annehmen, dem dramatischen, akut lebensbedrohlichen Krankheitsbild ein besseres Verständnis und somit Therapiemöglichkeit anzubieten, bleibt die Prognose ernst. Sowohl die Langzeitüberlebensraten als auch die Überlebensqualität sind ernüchternd.

Einigkeit besteht in der Einschätzung der Wichtigkeit der unmittelbar nach erfolgreicher Wiederbelebung einsetzenden Postreanimationsphase *post-resuscitation care*. Sie beinhaltet die weitere Kreislaufstabilisierung sowie die intensivmedizinische Behandlung und

Überwachung zur Abwendung nachfolgender, zum Teil persistierender Schädigungen und Schädigungsmechanismen. Die in dieser Phase dominierenden Maßnahmen beeinflussen die Prognose signifikant [115;148]. Insbesondere die komplizierende pathophysiologische Wirkung von einer notwendigen Reperfusion nach Ganzkörperhypoxie und die sich möglicherweise dadurch ausbildende „systemische“ Inflammation mit konsekutiver Organdysfunktion bis zum Multiorganversagen wird in der Literatur unter dem Begriff „*Postresuscitation Syndrome*“ subsumiert [32;143;175]. Die Ausprägung dieser speziellen Form der Inflammation in der frühen Phase nach kardiopulmonaler Reanimation hat einen deutlichen Einfluss auf die Mortalität und Morbidität des Patienten [62]. Dennoch ist bis heute die Ursache für die Entstehung und Unterhaltung einer den gesamten Organismus betreffenden postanoxämischen systemischen Inflammation nach Kreislaufstillstand unvollständig geklärt. Erste Serumanalysen an reanimierten Patienten in der unmittelbaren Phase nach ROSC konnten spezielle, zellulär sezernierte Proteine, sogenannte Zytokine, welche Mediatorfunktion auf ein pro- oder antiinflammatorisches Verhalten des körpereigenen Immunsystems zeigen, in diesem Zusammenhang identifizieren [60;66;181]. Insbesondere kann ein Ungleichgewicht der pro- und antiinflammatorischen Mediatoren zu überschießenden Abwehrmechanismen mit potenziell fatalen Störungen an Organsystemen und Geweben führen, welche das schädigende Primärereignis in der pathophysiologischen Konsequenz fortsetzen oder sogar übertreffen.

Zustände nach einer kardiopulmonalen Reanimation können eine systemische Inflammation auslösen und den Tod der primär erfolgreich wiederbelebten Person zur Folge haben [64;143].

Die Hintergründe sollen im Folgenden näher beleuchtet werden.

1.1 *Postresuscitation Syndrome, SIRS* und Sepsis und deren Immunmodulation

Unter dem bereits in den 1960er Jahren geprägten Symptomenkomplex *Postresuscitation Syndrome* werden pathologische Zustände nach einem überlebten Herzstillstand beschrieben, welche im weiteren zeitlichen Zusammenhang zur Ischämie und Hypoxie stehen [142]. Somit kann das *Postresuscitation Syndrome* als spezielle Form eines *Systemic Inflammatory Response Syndrome – SIRS* verstanden werden [16;143;144]. Hierunter subsumiert man ein generalisiertes Entzündungsgeschehen, welches durch die Ausschüttung von zunächst hauptsächlich pro- inflammatorischen Zytokinen und anderen Entzündungsmediatoren charakterisiert ist. Die Entwicklung eines SIRS kann als Folge einer erheblichen Schädigung des Organismus gedeutet werden. Seit 1991 wurde eine einheitliche Definition des Begriffes SIRS durch die amerikanischen Gesellschaften *American College of Chest Physicians - ACCP* und der *Society of Critical Care Medicine - SCCM* eingeführt. Demnach imponieren hierbei klinisch mindestens zwei der folgenden Faktoren [17]:

1. Körpertemperatur $\geq 38\text{ °C}$ oder $\leq 36\text{ °C}$
2. Tachykardie ≥ 90 Herzschläge pro Minute
3. Tachypnoe mit Atemfrequenzen ≥ 20 pro Minute oder $\text{paCO}_2 \leq 32\text{ mmHg}$
4. Leukozytose oder Leukopenie mit $\geq 12,0$ oder $\leq 4,0$ Leukozyten/nl

oder Nachweis von mehr als 10% unreifer (stabkerniger) neutrophiler Granulozyten.

Demgegenüber wird der Begriff *Sepsis* als SIRS infolge einer Reaktion auf pathogene Keime und deren Produkte aus einem Infektionsherd betrachtet. Diese gelangen in den Blutstrom und aktivieren die großen biologischen Kaskaden- und Zellsysteme zur Bildung und Freisetzung humoraler und zellulärer Mediatoren [120].

Mehrere Ursachen scheinen für die Ausbildung eines *Postresuscitation Syndrome* verantwortlich zu sein: Neben der generalisierten Hypoxie gibt es Hinweise, dass ebenso die

notwendigerweise einsetzende Reperfusion und Reoxygenierung sowie Mikroinfarzierungen und neuronale Läsionen schädigend einwirken [21;68;174]. Die Letalität in dieser Phase wird entscheidend von dadurch entstehenden Funktionsstörungen anderer lebenswichtiger Organe mitbestimmt, welche ursprünglich nicht ursächlich für den stattgehabten Kreislaufstillstand verantwortlich waren. Aus klinischer Sicht werden diese Funktionsstörungen als *Multiple Organ Dysfunction Syndrome (MODS)* beschrieben, einem akuten Krankheitszustand, wobei eine Homöostase ohne Intervention nicht aufrecht zu erhalten ist, bis hin zur Maximalvariante des mehrfachen Organ-Versagens oder *Multiple Organ Failure (MOF)* [11;16;29]

Lange Zeit wurde postuliert, dass ein septisches Krankheitsbild durch rein proinflammatorische Ursachen erklärt werden kann. Aktuell gilt es jedoch als ausreichend gesichert, dass eine Sepsis auch von einer antiinflammatorischen Komponente begleitet wird [30;31].

So können zeitabhängig freigesetzte antiinflammatorische Zytokine eine Immunsuppression fördern. Überschießende kompensatorische Reaktionen können zu einer Immundysfunktion im Sinne eines *compensatory anti-inflammatory response syndrome – CARS* führen. Diese Immunparalyse mit resultierender verminderter Resistenz gegenüber viralen, bakteriellen oder fungiformen Infektionen kann wiederum eine begleitende Entzündungsreaktion aggravieren und erneut multiple Organfunktionsstörungen bis hin zum multiplen Organversagen - *MOF* ausbilden.

Aktuell werden zwei Theorien über das zeitliche Aufeinandertreffen von SIRS und CARS diskutiert (siehe **Abbildung 1**): Die *Sepsis Serial Theory* postuliert ein zeitlich versetztes Auftreten von CARS nach SIRS. Somit reagiert der Organismus nach einer systemischen Inflammation auf Fremdorganismen im Sinne einer überschießenden endogenen Abwehrreaktion mit einer anschließend durch die Kompensationsmechanismen geprägten Phase der Immunsuppression [18].

Demgegenüber verdichten sich in jüngerer Zeit Hinweise, das SIRS und CARS annähernd zeitgleich, im Sinne der *Sepsis parallel theory*, zur entsprechenden Ausprägung kommen können. *Cavaillon et al.* postulieren organabhängige, unterschiedlich ausgeprägte pro- und anti-inflammatorische Situationen in einem Organismus (sog. „Cross-talk“) [29;31;169]. Insbesondere das Zusammenspiel der Wirkung von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen wird bei beiden Theorien als ursächlich betrachtet. Ferner erscheint es in diesem Zusammenhang von essentieller klinischer Bedeutung, die vorliegende Inflammationssituation zeitnah diagnostisch zu erfassen.

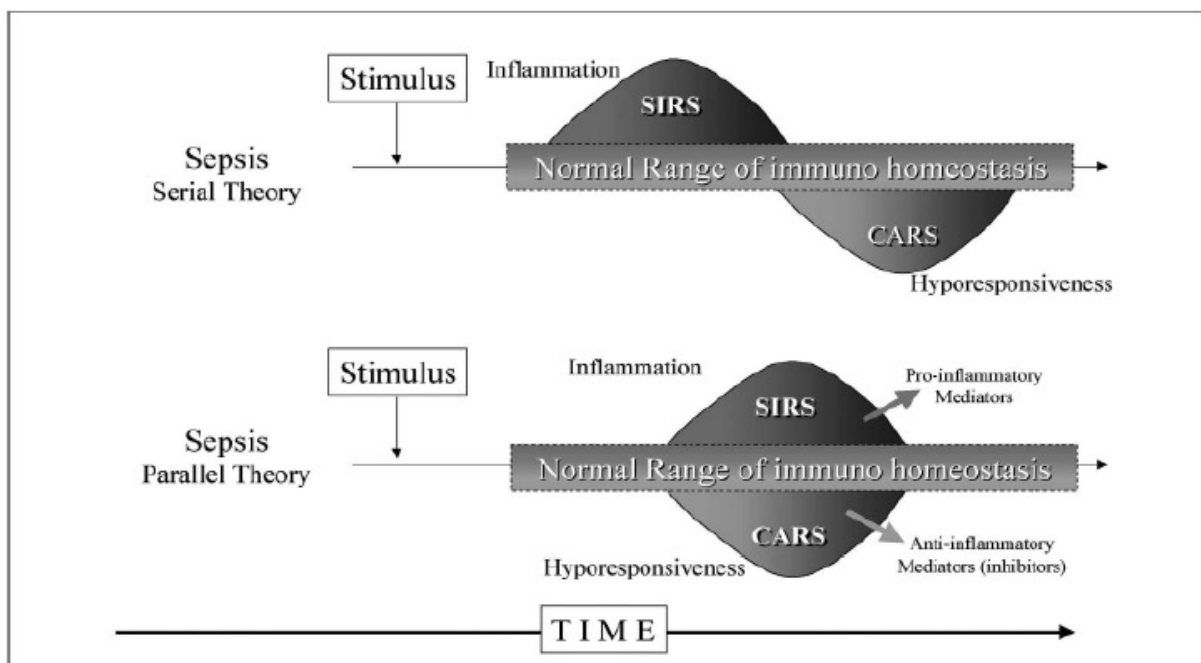


Abbildung 1 Sepsis/SIRS/CARS Modell: sequentielles Auftreten von SIRS gefolgt von CARS bei der seriellen Theorie, bzw. zeitgleiches Vorliegen von SIRS und CARS im Sinne der parallelen Theorie.

Nach: Ronco et al. 2004 [171]

1.2 Unspezifische und spezifische Mechanismen des Immunsystems

Zu dem *unspezifischen Immunsystem*, welches phylogenetisch dem spezifischen Immunsystem vorausgeht, werden physiologische Barrieren wie Epithelien, Schleimhaut, zur Phagozytose befähigte Zellen wie Monozyten und Makrophagen, neutrophile Granulozyten (PMN), dendritische Zellen, natürliche Killer-Zellen (*NK-Cells* aus T-Lymphozytenvorläufern) sowie unspezifische, humorale Faktoren wie zum Beispiel das auf dem alternativen Weg aktivierte Komplementsystem gezählt. Diese sind ausschlaggebend für eine suffiziente, nicht-adaptative, immunologische Erstantwort auf krankheitserregende Pathogene.

Das phylogenetisch jüngere, *spezifische Immunsystem* hat die adaptative Eliminierung körperfremder Moleküle und Molekülaggregate zur Aufgabe, welche als Antigene bezeichnet werden. Es ist imstande, diese Fähigkeit zu erlernen, was es möglich macht, auch neue chemische Verbindungen als Antigene zu erkennen und dagegen hochspezifische Antikörper zu bilden. So sind neben Antigen-präsentierenden Zellen (*APC*) im wesentlichen B- und T-Lymphozyten durch klonale Selektion bei Erstkontakt mit einem Antigen in der Lage, lebenslange Immunität zu gewährleisten.

Nur durch ein gut koordiniertes Zusammenspiel der unspezifischen und spezifisch-adaptativen Immunabwehr wird die komplexe Immunreaktion des Organismus ermöglicht [19].

Aus früherer Literatur geht hervor, dass sich ein SIRS zeitlich an der Aktivierung des unspezifischen Immunsystems [107;190] und CARS dem des spezifischen Immunsystems [54;196] zuordnen ließe. Arbeiten aus jüngerer Zeit liefern jedoch Hinweise, dass durch die enge Interaktion beide Abwehrsysteme zur entsprechenden Immunmodulation befähigt sind [106].

1.3 Humorale Mechanismen

Über eine Freisetzung immunologisch aktivierender Metabolite wie Sauerstoffspezies, Stickstoffmonoxid und Eikosanoide kommt der Komplementaktivierung über den klassischen und alternativen Weg eine entscheidende Rolle als Initiator einer Entzündungsreaktion beim Gewebeuntergang nach Ischämie und Reperfusion zu [76;99;117;123;199]. Zu den physiologischen Auswirkungen der Komplement-Aktivierung zählen Opsonierung, Aktivierung von Leukozyten, Zytolyse und anaphylaktische Aktivität. Findet jedoch eine überschießende Komplement-Aktivierung durch nachhaltigen Zellstress statt, so kann durch Deplettierung der Komplementfaktoren ein Zusammenbruch der initialen Abwehrkette des Individuums verursacht werden [42]. Nach Reperfusion erfolgt eine Aktivierung der pro-inflammatorischen Peptide C3a und C5a. Diese sog. Anaphylatoxine führen zum Zellschaden über die Komplementkaskade C5b - C9 mit Ausbildung des Membranangriffskomplexes (*MAC*), welcher über Konvertasen den klassischen und alternativen Weg der Komplement-Aktivierung abschließt [194]. C3a wirkt direkt über G-Protein gekoppelte Rezeptoren, wie sie an Granulozyten, Monozyten und Mastzellen sowie auf aktivierten Lymphozyten und neuralem Gewebe zu finden sind.

Die in diesem System entstehenden Anaphylatoxine sind unmittelbar verknüpft mit der Hochregulation inflammatorischer Zytokine und weiteren Entzündungs-unterhaltenden Mechanismen [133].

Auch der gemeinsam generierte Membranangriffskomplex (*MAC*) ist in der Lage, bei überschießender Immunaktivierung stimulatorisch auf Neutrophile, Makrophagen, Thrombozyten, Endothelzellen und andere Zellen zur Bildung von Leukotrienen und Prostaglandinen einzuwirken.

Eine Insertion des MAC mit Leukozyten und Thrombozyten kann ebenso zu einer vermehrten Liberation von reaktiven Sauerstoff-Metaboliten (ROI - *reactive oxygen intermediates*) und Zytokinen führen [75;176].

Im Sinne eines Feedbacks kann dies wiederum eine durch Zytokine getriggerte erhöhte Komplementsynthese auslösen [133].

Durch endotheliale Translokation und sowie durch Expression von Hypoxie-sensitiven Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B oder HIF werden Adhäsionsmoleküle wie p-Selektin und interzelluläres Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1) freigesetzt, was eine Leukozytenaktivierung auf der endothelialen Oberfläche bewirkt [124;198]. Begleitend werden durch neutrophile Granulozyten toxische reaktive Sauerstoffmetabolite (ROI) freigesetzt. Aktivierte Leukozyten liberieren pro- und antiinflammatorische Zytokine und sind zur Diapedese befähigt [192]. Durch diesen Prozess verändert sich die Gefäßpermeabilität. Auch werden Koagulationsprozesse und Plättchenaggregation, mit nachhaltigem Effekt auf mehrere Organsysteme, aktiviert [88;109;192].

Vorausgegangene Studien anderer Autoren konnten eindeutig belegen, dass unter ischämischen Bedingungen die systemische Konzentration von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen verändert ist [3;5;108]. Im Gesunden scheint ein Äquilibrium zwischen Mediatoren der Immunologischen Abwehr und deren Inhibitoren vorzuherrschen. Dennoch ist in der Gesamtheit das überaus komplexe Wechselspiel der am postischämischen Inflammationsgeschehen beteiligten Faktoren unzureichend charakterisiert.

1.4 Zelluläre Mechanismen

Grundlage der beschriebenen morphologischen und funktionellen Veränderungen bilden Interaktionen zwischen aktivierten polymorphkernigen, neutrophilen Granulozyten (PMN, Neutrophile) und aktivierten Endothelzellen, sowie die programmierte Expression von

Adhäsionsmolekule als Grundlage einer Sequenz molekularer Interaktionen, die zur Aktivierung, Adhäsion und transendothelialer Migration zirkulierender Leukozyten ins Gewebe führen [65]. Ferner beeinflusst diese unspezifische Entzündungsreaktion auch die mit einer gewissen Latenz auftretende, über Th1 / Th2 Lymphozyten vermittelte, adaptive Immunabwehr.

Im Vordergrund steht hierbei die Interaktion zwischen dem Monozyten / Makrophagen-System und dem T- / B- Zell-Lymphozytensystem: durch Internalisieren von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) wird das intrazellulär proteolytisierte Antigen fragmentiert und mittels des *Major Histocompatibility Complex (MHC)* der Klasse II auf der Zelloberfläche präsentiert. Die somit über den T-Zellrezeptor aktivierten T-Lymphozyten lösen eine Sekretion spezieller Zytokine aus, welche zur weiteren Proliferation der T-Zellpopulation und Stimulation der APC's befähigen. Ferner führt diese Aktivierung zur Differenzierung zytotoxischer CD₈-Lymphozyten zu einer Signaltransduktion und somit differenzierten Genexpression mit Synthese von Membranporen-bildenden Perforinen und Proteasen. Weiterhin erfolgt eine Differenzierung zu CD₄-T-Helferzellen und inflammatorischen CD₄-T-Lymphozyten (Th1 / Th2) welche wiederum zur Produktion spezifischer Zytokine befähigt sind. Nach dem sogenannten Th1 / Th2 Paradigma steuern Th1-Zellen die Immunantwort in eine zellulär betonte Richtung, während Th2-Zellen die Immunantwort in eine humoral betonte Richtung dirigieren [10;113]. Durch Antigenkontakt am B-Zellrezeptor kann sich die B-Zellpopulation in komplexen Reaktionswegen zu hoch-spezifischen, Antikörper-produzierenden Plasmazellen entwickeln.

Aufgrund der beschriebenen, vorausgesetzten Anwesenheit von Antigenen wurde eine bakterielle Beteiligung an der Ausbildung eines SIRS lange kontrovers diskutiert. Ausreichend erklärt ist inzwischen eine Darm-assoziierte, bakterielle sowie pro-inflammatorische Beteiligung, welche im ischämischen, hypoperfundierten Zustand in der Lage ist, Endotoxine und Bakterien mit deletären Folgen über den Lymphstrom systemisch zu

translozieren [41;43;78]. Demgegenüber vertritt man mit zunehmender Kenntnis über die spezifischen Abläufe ein differenzierteres immunologisches Kompartimentmodell des Organismus mit Augenmerk auf die Wechselwirkung der pro- und antiinflammatorisch zuzuordnenden Gewebe (*cross-talk*) [31]. Auf zellulärer Ebene betrachtet, soll eine zytokinvermittelte Verlagerung des Th1 zum Th2 dominierenden Profils auf einen adäquaten Antigen-Stimulus Ursache sein. Ein Unvermögen dieser Th1 / Th2 -Balance wird durch den Begriff der *Anergy* subsumiert [169], welche im klinischen Verlauf mit infektiologischer Entwicklung eines MOF und schlechtem *Outcome* identifiziert wurde [83].

Ein wesentlicher Bestandteil des postischämischen Reperfusionssyndroms (*I/R*S) und der durch den entstehenden Gewebeschaden verbundenen inflammatorischen Antwort ist die Leukozyten-Endothelinteraktion (*LEI*). Mit Hilfe der Intravitalmikroskopie ist es gelungen, mikrozirkulatorische Parameter wie Gefäßbreite, Kapillardichte, Blutfluß sowie das interaktive Wechselspiel zwischen Leukozyten und Endothel in Echtzeit zu visualisieren:

Bei einer Entzündungsreaktion wird die Expression von Adhäsionsmolekülen durch vermehrt freigesetzte Chemokine, Zytokine, Endotheline und anderen Mediatoren [103] gesteigert. Eine dadurch hervorgerufene stabile Adhäsion ermöglicht die Extravasation der Leukozyten und Migration mit konsekutiver zellulärer Entzündungsreaktion und verstärkter Radikalenproduktion im infiltrierten Gewebe.

Hierbei spielen vor allem die Neutrophilen in der überlebensnotwendigen Reperusionsphase nach Ischämie im postkapillären, venulären Stromgebiet eine entscheidende Rolle (sogenanntes „*reflow-paradoxon*“) [130]: Verschiedene Familien der CAM's (*Cell Adhesion Molecules*) bedingen eine Akkumulation am Entzündungsort [26;94]. Dabei mediiieren P- und E- Selektine den ersten Schritt der Leukozytenadhäsion [79]. P-Selektin triggert das „*slow-rolling*“ und somit die zunächst reversible Adhäsion der neutrophilen Granulozyten. Eine selektininduzierte Synthese von IL-8 bewirkt eine Aktivierung von α -Integrinen auf den Neutrophilen. Durch Hochregulation der Expression von Immunglobulin-ähnlichen

Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1 und weitere) sowie Integrinen auf Endothelzellen, wird eine beständige Liberation von Leukozyten und Extravasation mit Gewebeeinfiltration induziert. Adhärenente Leukozyten sind in der Lage, eine Vielzahl von Zytokinen freizusetzen [89]. Diese können ein Entzündungsgeschehen entscheidend mediieren, chemotaktisch wirken und somit zu einer weiteren Leukozytenmigration und Freisetzung von Adhäsionsmolekülen beitragen [191].

Die verantwortlichen intrazellulären Initialmechanismen, welche die Steuerung postischämischer Abwehrfunktionen auf zellulärer Ebene induzieren, sind bislang unzureichend charakterisiert. Es existieren Hinweise, dass die Bildung von immunmodulatorisch wirksamen Effektorproteinen (Zytokine/Chemokine, Zell-Oberflächenmoleküle, Proteasen, Inhibitoren etc.) über spezielle Signaltransduktionskaskaden gesteuert wird. Dieser Anhalt lässt sich durch eine verändert messbare Aktivität von Transkriptionsfaktoren (z.B. NF- κ B, AP-1, AP-2, STAT-family, SOCS etc.) untermauern, wodurch das mRNA-Expressionsprofil zahlreicher Gene nachhaltig beeinflusst wird [33;112;197].

Es scheint plausibel, dass im Rahmen einer den ganzen Organismus betreffenden Ischämie - wie bei reanimationspflichtigem Kreislaufversagen - pro- und antiinflammatorische Zytokine das im Detail unzureichend charakterisierte Wechselspiel der zellulären und humoralen Entzündungsmechanismen entscheidend beeinflussen. Daher wurde in der vorliegenden Studie überprüft, ob sich ausgesuchte Surrogatparameter sowohl intrazellulär auf mRNA- Ebene, als auch auf der systemisch messbaren Proteinebene zur ultrafrühen Detektion von Inflammationsmustern eignen.

1.5 Zytokine

Unter Zytokinen versteht man hormonähnliche, zellregulatorische Proteine oder Glycoproteine von relativ geringer Molekülmasse (< 60 kDa), welche von verschiedenartigen

Zellen, vornehmlich T-Lymphozyten und Makrophagen, gebildet werden. Die Bezeichnung implementiert bereits, dass nahezu alle kernhaltigen Zellen zur Zytokinsynthese befähigt sind, welche essentielle biologischen Leistungen wie Zellwachstum, Zelldifferenzierung und – Aktivierung, Entzündung, Immunität, Gewebsreparation, Fibrose, Angiogenese und Morphogenese reguliert. Dieser von hochaffinen Rezeptoren abhängige, multifunktionale Wirkungsgrad wird auch als „Pleiotropie“ bezeichnet.

Ihre Wirkung kann sich parakrin bzw. juxtakrin (in räumlicher Nähe zum Produktionsort), autokrin (auf die produzierende Zelle selbst) oder endokrin via Blutstrom *alio loco* systemisch entfalten. Trotz Ihrer geringen Halbwertszeit zwischen Sekunden und Minuten besitzen Zytokine einen überaus hohen Wirkungsgrad auch in sehr geringen, femtomolaren (10^{-15}) Konzentrationen und werden auf jeden Stimulus hin neu synthetisiert [59]. Da formal verschiedene Zytokine einen vergleichbaren Effekt hervorrufen können, wird ihre Wirkung als redundant beschrieben. Somit erklärt es sich, dass für biologische Effekte oftmals mehrere Zytokinkaskaden verantwortlich sind, bei denen die Hauptwirkung von einem nachgelagerten Zytokin verursacht wird. Die Fähigkeit, auf die Expression anderer Signalmoleküle einzuwirken, ist ein wichtiger regulativer Bestandteil bei immunologischen Prozessen. Natürlich liegt es außerhalb der Möglichkeiten dieser Arbeit, alle bis dato identifizierten Zytokine zu charakterisieren, dennoch versucht man heute Zytokine anhand ihrer i) Funktionalität, ii) ihrer molekularbiologischen Struktur, oder iii) ihrer Zuordnung zu den korrespondierenden Zytokinrezeptoren zu klassifizieren.

Von der Bezeichnung nach Ihrem zellulären Ursprung wie vom Monozyten- / Makrophagensystem produzierte *Monokine*, oder von Lymphozyten gebildete *Lymphokine* wurde in jüngerer Zeit Abstand genommen [47].

Eine klinisch gebräuchliche Einteilung anhand ihrer pro- und/oder antiinflammatorischen Mediatorfunktion im Rahmen von Entzündungsgeschehen hat sich bewährt.

Hinsichtlich ihrer Funktionalität oder Herkunft lassen sich Zytokine in entsprechende Subgruppen unterscheiden:

Übersicht funktioneller Zytokinfamilien (aus: Loppnow, H. 2001 [122]):

- Interferone (IFN)
- Interleukine (IL)
- Tumornekrosefaktoren (TNF)
- Koloniestimulierende Faktoren (CSF)
- weitere Zytokinklassifikationen, wie:
 - o hämatopoetische Wachstumsfaktoren
 - o chemotaktische Chemokine
 - o „Virukine“

Über die Kinetik relevanter, sowohl intrazellulär als auch systemisch nachweisbarer „whole-body“ -ischämie-sensitiver pro- und antiinflammatorischer Zytokine ist bisher jedoch sehr wenig bekannt. Anhand erster Microarray- Untersuchungen konnten semiquantitativ einige vielversprechende Faktoren dargestellt werden, welche in dieser Analyse Eingang fanden und im Folgenden dargestellt werden sollen.

1.5.1 Tumornekrosefaktor alpha (TNF-)

Es ist davon auszugehen, dass erste Wirkungsbeschreibungen des Tumornekrosefaktors (TNF) wahrscheinlich schon im 19. Jahrhundert niedergelegt wurden [122]. 1975 konnte nach Endotoxininjektion bei *Bacillus Calmette Guérin* (BCG) -infizierten Mäusen ein Serumfaktor beschrieben und isoliert werden, welcher eine Nekrose von Tumorzellen induzieren kann [28]. Hauptvertreter dieser Zytokinfamilie stellt der pro- inflammatorische TNF- dar, welcher vor allem vom Monozyten/Makrophagen System, NK-Zellen, und CD₄⁺-T-Lymphozyten gebildet und häufig mit IL-1 und anderen Zytokinen sezerniert werden kann.

Aber auch periphere PMN, glatte Muskelzellen, Fibroblasten und weitere sind zur TNF - Produktion befähigt, welches als Reaktion auf einen infektiösen Stimulus zu bewerten ist. Insbesondere Lipopolysaccharide (LPS; enthalten in der äußeren Membran gram-negativer Bakterien) sowie auch gram-positive Bakterien, Pilze, Mycoplasmen, Tumorzellen, Zytokine, Mitogene, Proteinkinase C-Aktivatoren, Bradykinin, Immunkomplexe, Substance P, Inhibitoren der Cyclooxygenase und PAF (*platelet activating factor*) stimulieren die Synthese [82]. TNF- zeigt ein extrem breites biologisches Wirkspektrum und gilt als Hauptmediator bei toxischem Schock und gram-negativer Sepsis. Daneben führt TNF- zu vielfältigen Endothelveränderungen *in vivo* mit prokoagulatorischen Effekten und wird mit pathologischen Ereignissen wie disseminierter intravasaler Gerinnung, Vaskulitis, Phlebothrombose und Arteriosklerose in Verbindung gebracht. TNF- ist unter physiologischen Bedingungen für eine adäquate Immunantwort nötig und wirkt auf Neutrophile chemotaktisch, jedoch führt eine überschießende Expression zu pathogenen bis letalen Zuständen [15;24].

TNF- stimuliert die Proliferation von T-Zellen in Anwesenheit von IL-2. In Abwesenheit von IL-2 kann es die Proliferation und Differenzierung von B-Zellen veranlassen. Ferner wird eine Expressionsteigerung von MHC- Klasse I und II - Antigenen, Adhäsionsmolekülen und Endothelzellen beschrieben [47].

1.5.2 Interleukin 10 (IL-10)

IL-10 besteht aus 178 Aminosäuren und besitzt als Monomer ein Molekulargewicht von 18 kDa. Potente Expressionsstimuli stellen Endotoxine und TNF- dar. Ursprünglich wurde das anti-inflammatorisch wirksame IL-10 als Produkt von Th2-Lymphozyten identifiziert, welches die Produktion von Th1-Zellen hemmt [57]. Später konnte ebenso eine Suppression der Th2-Antwort herausgearbeitet werden [44]. Neben Th2-Zellen sind auch Th1-

Lymphozyten [44], Monozyten / Makrophagen [40], Keratinozyten [53] und Epstein-Barr-Virus (EBV) - infizierte B-Lymphozyten [22] zur Produktion von IL-10 befähigt. Hierbei werden Spitzenkonzentrationen nach Stimulation im Vergleich zu anderen Zytokinen erst nach 24-48 h erreicht [40]. IL-10 hat zahlreiche regulatorische Wirkungen auf das Immunsystem: Zusammen mit TGF- β repräsentiert IL-10 eines der wichtigsten anti-inflammatorischen Zytokine zum Erwerb einer Immuntoleranz und wirkt somit protektiv vor überschießenden Immunreaktionen [72]. So hemmt IL-10 die lymphozytäre Th1-Immunantwort und unterstützt somit die Th2-Reaktion durch Suppression der Zytokinsynthese von NK-Zellen [135]. Ebenso wie andere Th2-Zytokine stellt IL-10 einen potenten aktivierenden Wachstumsfaktor für B-Lymphozyten dar [172]. Erste Analysen legten nahe, dass IL-10 -abhängige, inhibierende Zytokinsyntheseeffekte durch eine verminderte Kapazität der Antigenpräsentation von Makrophagen und dendritischen Zellen hervorgerufen werden [58]. Inzwischen existieren Hinweise, dass IL-10 auch einen direkt inhibierenden Einfluss auf eine pro-inflammatorische Zytokinproduktion besitzt und modulierend auf Transkriptionsfaktoren wie NF κ B und dem JAK-STAT-Signalweg einwirkt [72]. Ferner induziert IL-10 das synergistisch wirksame, anti-inflammatorische Zytokin IL-1ra und inhibiert die Expression von Adhäsionsmolekülen [98;137].

1.5.3 Interleukin 1-Rezeptorantagonist (IL1-ra)

IL1-ra ist der natürliche Antagonist der IL-1 Familie und konnte in Überständen kultivierter Monozyten zunächst als „IL-1 Inhibitor“ identifiziert werden [8]. Das nach Glycosylierung 22-25 kDa große Protein mit einer 26 prozentigen Strukturhomologie zur IL-1 Familie ist in der Lage, am IL-1 Rezeptor mit vergleichbarer Affinität im Sinne eines kompetitiven Inhibitors zu binden, jedoch ohne der Zelle ein Signal zu überbringen [74]. Die inhibierende biologische Wirkung ist also im Zusammenhang mit den korrespondierenden Agonisten IL1-

alpha und IL1-beta an den membranständigen oder löslich-extrazellulären IL-1 Rezeptoren (RI oder RII) zu verstehen: Auch diese Mediatoren werden mit einer Vielzahl an pro-inflammatorischen Wirkungen in Zusammenhang gebracht. Durch Modulation anderer Zytokine wie Interleukine, Tumor Nekrose Faktor und Kolonie-stimulierender Faktor (CSF) wird durch ihr frühes Erscheinen im Rahmen von chronischen Entzündungserkrankungen, Sepsis und hämatopoetischen Defekten ihre Schlüsselrolle deutlich [46]. Für deren physiologischen Antagonisten (IL1-ra) existieren eine intrazelluläre Variante mit zwei Isoformen (icIL1-ra1 und icIL1-ra2), sowie eine sekretorische Variante ([soluble] sIL1-ra). Die intrazelluläre Variante kann in Ermangelung eines Signalpeptids nicht wie die sIL1-ra sezerniert werden [46]. Neben Monozyten sind bekanntlich Gewebsmakrophagen, polymorphonukleare Neutrophile, Hepatozyten, Fibroblasten, Chondrozyten und Keratinozyten in der Lage, sekretorisches IL1-ra zu synthetisieren. Zu den bisher charakterisierten adäquaten Stimuli für die IL1-ra Synthese zählen LPS, IL1-alpha und beta, IL-3, GM-CSF und Transforming Growth factor-beta (TGF- β), sowie die als anti-inflammatorisch geltenden Zytokine IL-4, IL-10, und IL-13 [7;97;173].

1.5.4 Interleukin 8 (IL-8)

IL-8 zählt aufgrund seiner chemo-attraktiven Eigenschaft zu den pro-inflammatorischen Chemokinen. Nicht glykosyliert besitzt es ein Molekulargewicht von 8,3 kDa und zählt strukturell aufgrund seiner Cystein-Aminosäure Konfiguration zu den C-C- Chemokinen [9;128]. Wegen seiner herausragend mediiierend- stimulierenden Eigenschaft auf neutrophile Granulozyten trug IL-8 nach seiner Erstbeschreibung 1987 Namen wie *Neutrophil Activating Factor* (NAF) oder *Neutrophil Activating Protein 1* (NAP-1) und weitere, welche nomenklatorisch auf die biochemische Funktion oder den Ursprung der Isolation schließen ließen [55;177]. Ursprünglich wurden Monozyten als Hauptentität der IL-8 Produktion

angenommen. Mittlerweile ließen sich nach adäquater Stimulation mittels IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, TNF, GM-CSF oder Lipopolysacchariden auch Endothelzellen, Hepatozyten, T-Zellen, Keratinozyten, Fibroblasten, Endothelzellen und Makrophagen als Produktionsort für IL-8 nachweisen [61;184;189]. IL-8 wirkt chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten und verstärkt den „*respiratory burst*“ dieser Zellen, einer Stoffwechselsteigerung mit Bildung von Peroxid- Radikalen zur Erregerbeseitigung und Liberation von Proteasen, Superoxiden und weiteren inflammationstypischen Substanzen [127]. Des weiteren wirkt IL-8 chemotaktisch und stimulierend auf Lymphozyten [71] und zusammen mit TNF- α , IL-1 und IL-6 regulierend auf das Expressionsverhalten von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen [136]. IL-8 ist im Vergleich zu anderen Zytokinen relativ milieustabil im Bezug auf pH- Wert und Temperatur. Nach Injektion von Lipopolysaccharid (LPS) sind bereits nach 2h Serumkonzentrationsanstiege zu verzeichnen, welche nach 12h wieder Ausgangskonzentrationsniveaus erreichen [126]. Neben IL-8 Rezeptoren auf den oben genannten Entitäten besitzen Erythrozyten und Endothelzellen einen Duffy-Blutgruppenrezeptor (Fy a+b)- ähnlichen unspezifischen Rezeptor (*Duffy antigen / receptor for chemokines*, DARC) mit hochaffiner, langanhaltender Bindungskapazität für IL-8 [38;159]. An DARC- ligiertes IL-8 verhält sich biologisch wirkneutral und stellt einen Pool für IL-8 dar, da es wieder ins zirkulierende Plasma liberiert werden kann [166].

Klinisch wird in der aktuellen Literatur zunehmend auf die Bedeutung von IL-8 aufgrund seiner biologischen Eigenschaften hingewiesen: So findet in Studien IL-8 zunehmend interdisziplinäre Beachtung bei entzündlichen Erkrankungen der Atemwege [92], Tumoren [36], strukturellen Herzerkrankungen wie Myokardinfarkt [52] und - allen voran - septischen Krankheitsbildern [84]. Oftmals wird aufgrund der Kinetik der Serumkonzentration auf die Schwere eines entsprechenden Krankheitsverlaufs geschlossen [91;179].

1.5.5 Poly-Morpho-Nukleäre-Elastase (PMN-Elastase)

Elastase aus polymorph- kernigen Granulozyten (PMN-Elastase) zählt zu den Serinproteasen und liegt in hoher Konzentration ($3\text{-}5\mu\text{g}/10^6$ Zellen) in den azurophilen Granula als Glycoprotein mit einer Molekülmasse von ungefähr 33 bis 36 kDa vor [45;152]. Bekanntermaßen kommt neutrophilen Granulozyten als primären Abwehrzellen im Entzündungsgeschehen eine besondere Rolle zu: Das proteolytische Enzym weist bei neutralem pH-Wert sein Aktivitätsmaximum auf und ist mit geringer Substratspezifität in der Lage, Fibrinogen, Fibronectin, Kollagen, Elastin, Plasminogen und Immunglobuline (IgG, IgM) in lösliche Fragmente aufzuschließen. Zu den humoralen Proteinsubstraten zählen ferner die Komplementfaktoren (C1-C5, C9), Gerinnungs- und Fibrinolysefaktoren (II, V, VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII), Proteinaseinhibitoren (α_2 -Makroglobulin, Antithrombin III, α_2 -Plasmininhibitor, α_1 -Antichymotrypsin, C1-Inaktivator, Trypsininhibitor) sowie weitere Proteine. Ferner konnte experimentell die Proteolyse von Zellen wie Thrombozyten, Epithel- und Endothelzellen, B-Lymphozyten und Monozyten beobachtet werden [85;100]. Physiologischerweise induziert Elastase den intrazellulär-phagolysosomalen Abbau von phagozytiertem Material. Eine überschießende Reaktion kann jedoch zur Liberation von Elastase und weiteren proteolytischen Faktoren im Extrazellularraum mit deletären Folgen wie Matrixschäden am Lungengewebe, angiogener Basalmembran oder Kollagen führen [45]. Die extrazelluläre Aktivität der Elastase wird durch den physiologischen, in hoher systemischer Konzentration vorliegenden Gegenspieler Alpha-1-Antitrypsin/Proteinaseinhibitor (α_1 -PI) reguliert, welcher die systemische Wirkung von Elastase durch irreversible Komplexbildung innerhalb von Millisekunden inhibieren kann [25]. Einen weiteren, wenn auch weniger potenten Inhibitor stellt α_2 -Mikroglobulin (α_2 M) dar. Durch die im Vergleich zu α_1 -PI 10fach geringere Anzahl an Elastase-bindenden Gruppen, reduzierte Plasmakonzentration und Substrataffinität wird der substanzielle Wirkungsgrad

von 1-PI deutlich [25;151]. Unzureichend wirksame Alpha 1-Antitrypsin/Proteinaseinhibitor- Konzentrationen, zum Beispiel durch Inhibition mittels Oxidantien im Rahmen von „respiratory burst“, oder Freisetzung von lysosomalen Cysteinproteinasen Cathepsin B und K, können zu einer unkontrollierten Elastase-Aktivität führen. Ein Mangel an Alpha 1-Antitrypsin/Proteinaseinhibitor konnte bereits als Risikofaktor für strukturelle Gewebestörungen, zum Beispiel Lungenemphysem identifiziert werden [25]. Darüber hinaus konnte in weiterführenden Studien die proinflammatorisch, proteolytische Einfluß der PMN-Elastase bei Sepsis und SIRS erhärtet werden [139;188]. Ferner prädisponieren erhöhte PMN-Elastase Konzentrationen prädiktiv bei SIRS zu respiratorischen Komplikationen [111;185].

Die Konzentration des PMN-Elastase/Inhibitor- Komplexes korreliert mit der Menge an freigesetzter PMN-Elastase und ist somit ein Maß für die Aktivität der Granulozyten im Entzündungsgeschehen.

1.6 Methodische Aspekte

Die geschilderten Zusammenhänge lassen erkennen, dass pro- und antiinflammatorisch wirksamen Zytokinen eine entscheidende Bedeutung bei der Entstehung und Regulation einer immunologischen Abwehrreaktion nach reanimationspflichtigem Kreislaufversagen und Ganzkörper-Ischämie zukommt. Studien, welche isolierte Zellentitäten als Hauptaugenmerk der Zytokinsynthese betrachten, lassen offen, ob weitere Zellverbände nicht einen mitentscheidenden Einfluss auf das immunologische Wechselspiel des Organismus haben. Da nahezu alle kernhaltigen Zellen zur Zytokinsynthese befähigt sind, liegt die Vermutung einer Mitbeteiligung mehrerer Organe oder Zellsysteme an der Zytokinsynthese nahe.

Studienhafte, systemische Analysen der Mediatoren konnten auf Proteinebene bereits einige herausragende, substanzielle Parameter identifizieren. Dabei blieb jedoch völlig unklar, ob

eine jeweilige Konzentrationsänderung des betrachteten Mediators als Auslöser eines immunologischen Geschehens gedeutet werden kann, oder es sich vielmehr um reaktive Prozesse des Zelluntergangs zum Beispiel aktivierter Endothelzellen nach Ischämie mit Zytokinliberation handelt.

Als hilfreich kann somit die intrazelluläre Analyse auf RNA-Ebene betrachtet werden. Eine zelluläre Folgereaktion auf den klinischen Zustand „Ischämie und Hypoperfusion“ mit Veränderung regulatoriver Funktionen wird nach molekularbiologischen Kenntnissen ausschließlich über die mRNA gesteuert, welche in der Lage ist, genetische Informationen aus dem Zellkern zum Zytoplasma zu überbringen [105]. Somit kann die mRNA als Bindeglied zwischen kodierter Information des Zellkerns und synthetisiertem Protein betrachtet werden.

Über serielle, zeitlich-dynamische Zusammenhänge intrazellulärer Expressionsmuster ausgesuchter pro- und antiinflammatorischer Zytokine im humanen Vollblut und deren korrespondierenden systemisch messbaren Proteinen nach überlebtem, reanimationspflichtigem Kreislaufversagen mit konsekutiver Ganzkörper-Ischämie und Reperfusion ist bislang nichts bekannt.

Durch Nutzung eines innovativen, RNA-stabilisierenden Vollblutmediums (PAXgene[®] Blood RNA Tube) steht nun erstmals eine auch präklinisch anwendbare Methode zur Verfügung, welche geeignet erscheint, diese Lücke zu schließen. Mittels früher serieller Analysen soll unter Berücksichtigung klinischer Einflussgrößen der Verlauf differentieller Zytokinexpression verfolgt und im Folgenden näher skizziert werden.

2. Fragestellung

Umfangreiche Forschungen der jüngeren Vergangenheit konnten klar zeigen, dass Zustände nach generalisierter Ischämie und Reperfusion eng mit einem Dysäquilibrium physiologisch notwendiger, als auch pathophysiologisch veränderter Funktionen immunkompetenter Zellen verknüpft sind. Zytokine, welche als regulative Botenstoffe der beteiligten Zellentitäten identifiziert wurden, kommt hierbei eine substantielle Bedeutung zu.

In diesem Zusammenhang erscheinen insbesondere initiale intrazelluläre Steuerungsmechanismen aufklärenswert, da Veränderungen dieser Schlüsselreaktionen zeitlich vor klinisch manifesten inflammatorischen Zuständen auftreten. Durch diesen potentiell temporären Detektionsvorteil könnte Raum für therapeutische Interventionsmöglichkeiten geschaffen werden, um einer Dynamik mit der Maximalvariante eines lebensbedrohlichen Multiorganversagens entgegenzuwirken. Dennoch ist dieser viel versprechende Ansatz im Hinblick auf ischämiespezifische Inflammationsmarker bislang unzureichend charakterisiert. Diese Tatsache ist mitunter darin begründet, dass eine bereits in der präklinischen Anwendung verfügbare valide RNA-Versuchsanalytik, welche den Ansprüchen eines kritisch erkrankten Patienten gerecht wird, eine logistische Herausforderung darstellt und bislang nicht verfügbar war. Um dieser Aufklärung Vorschub zu leisten und die initialen pathophysiologischen Mechanismen in Qualität und Quantität besser zu verstehen, entwickelten sich folgende Ziele:

- i) Liefert ein innovatives, RNA-stabilisierendes Vollblutmedium (PAXgene® Blood RNA Tube) auch im präklinischen Einsatz unter Verwendung eines reduzierten Vollblutvolumens valide Ergebnisse im Vergleich zu alternativen, etablierten messanalytischen Methoden?
- ii) Lassen sich Inflammations-bedeutsame Zytokine im initialen Zeitraum bis 72h nach erfolgreicher kardiopulmonaler Reanimation als Ausdruck einer sämtliche Organsysteme betreffenden Ischämie quantitativ intrazellulär auf mRNA-Ebene nachweisen?
- iii) Gibt es einen Zusammenhang zwischen intrazellulär generierten Zytokinexpressionsmustern und zeitgleich bestimmten systemisch korrespondierenden Zytokinkonzentrationen aus Vollblut kardiopulmonal reanimierten Patienten?
- iiii) Existieren hinsichtlich der gewonnenen Ergebnisse Gruppenunterschiede zwischen den klinischen Verlaufsmerkmalen „Überleben“ oder „Tod“?

3. Material und Methoden

Um diese Fragestellungen beantworten zu können, wurde folgendes Studienprotokoll zu Grunde gelegt:

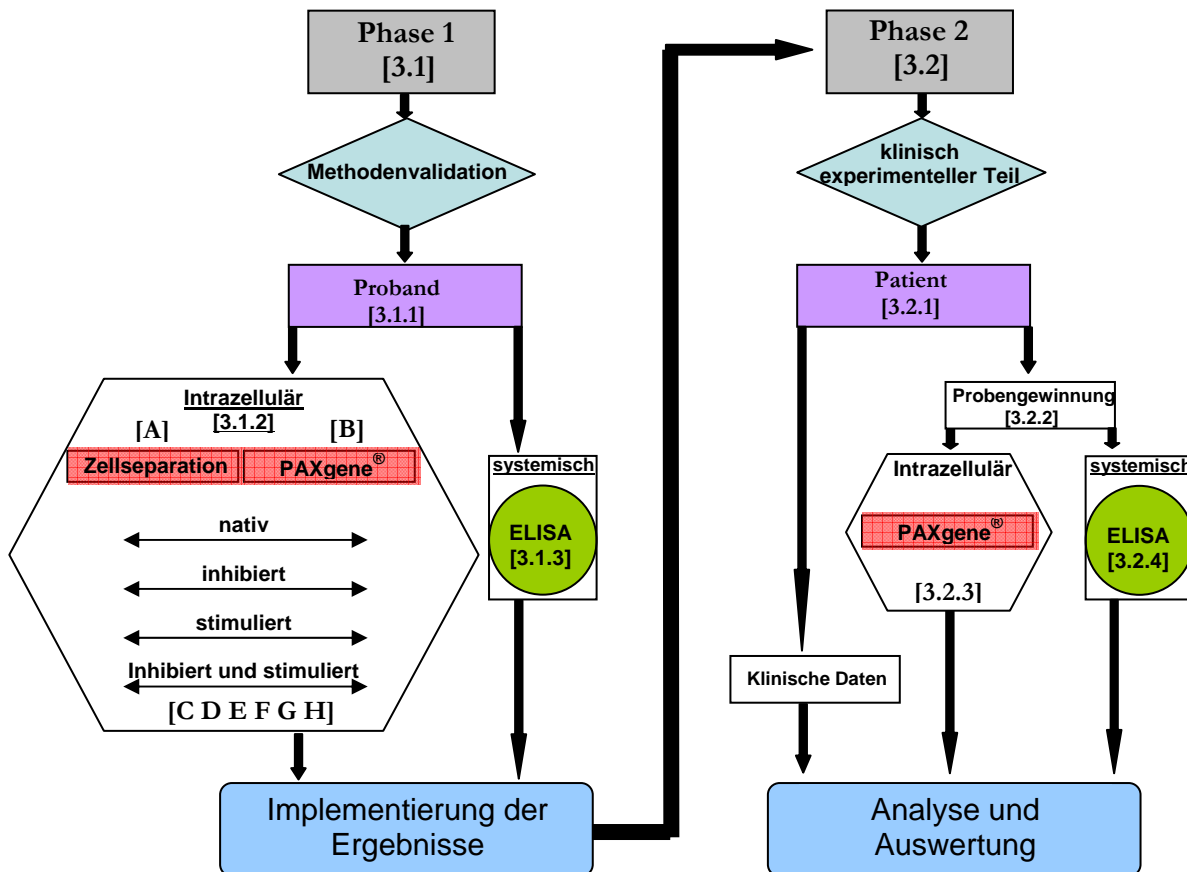


Abbildung 2 Synopsis der Studie: Bestandteil der ersten Phase war die Validation der Detektionsmethoden intrazellulärer Zytokinexpression mittels qRT-PCR und systemischer Zytokinkonzentrationen mittels ELISA am gesunden Probanden. Die Reliabilität des innovativen PAXgene® Systems im humanen Vollblut wurde auch unter Stimulationsbedingungen gegenüber einem bewährten Zellisoliationsverfahren geprüft. Nach Abschluss der Phase 1 wurde die Analytik in der Folgephase 2 am Patienten angewandt.

Zunächst war das Ziel der Vorversuche ein innovatives RNA-stabilisierendes Vollblutentnahmesystem (PAXgene®) mit einem anerkannten, etablierten Modell zur RNA-Extraktion [131;164] am Probanden zu vergleichen. Das im Vergleich zum etablierten Modell benötigte, reduzierte Vollblutvolumen sowie die im Blutröhrchen enthaltene „*stabilizing solution*“ versprachen in Bezug auf die Anwendbarkeit und prozedurale Artefaktminimierung deutliche Vorteile, insbesondere in der präklinischen experimentellen Diagnostik am Patienten. Im Hinblick auf Reproduzierbarkeit, Reliabilität und Validität der zielführenden intrazellulären Detektionsmethoden auch unter Stimulationsbedingungen wurde ein Protokoll gewählt, dessen Ergebnisse als Grundlage in die eigentliche Studie am reanimierten Patienten (Phase 2) einfließen sollten.

3.1 Phase 1 – Validierung des experimentellen Protokolls

3.1.1 Probanden

Für die vorbereitende Untersuchungsreihe wurden insgesamt 18 klinisch und anamnestisch gesunde freiwillige Probanden rekrutiert. Ein jeweils orientierend mitbestimmtes peripheres Differential-Blutbild ergab keinen Hinweis auf präexistente, relevante Blutbildveränderungen. Durch standardisierte aseptische Punktion einer Kubitalvene wurde zum Ausschluss eventuell vorhandener zirkadianer Unterschiede jeweils morgens und abends im Abstand von zwölf Stunden je Proband einmal Vollblut entnommen. Für *eine* methodenvergleichende intrazelluläre Analyse wurde jeweils 3 x 10 ml EDTA-Blut (zur Zellseparation), sowie 2 x (Doppelbestimmung) jeweils 2,5 ml Vollblut für ein PAXgene Blood RNA Tube® (PreAnalytiX, Hombrechtikon, Schweiz) benötigt. Zur systemischen Analyse wurden zeitgleich 1 x 4 ml EDTA-Blut für das Differential-Blutbild entnommen. Zusätzlich wurden 1x 3 ml Blut in Lithium Heparinat, 1x 4 ml Blut in Natrium Citrat, 1 x 3 ml Serumblut für

das Festphasenassay (jeweils entsprechende Vacutainer®) gezogen, bei 3000g für 5 min. zentrifugiert, der Überstand aliquotiert und zur weiteren Analyse durch ELISA im Kühlschrank bei -80 °C eingefroren.

3.1.2 intrazelluläre Zytokinexpression

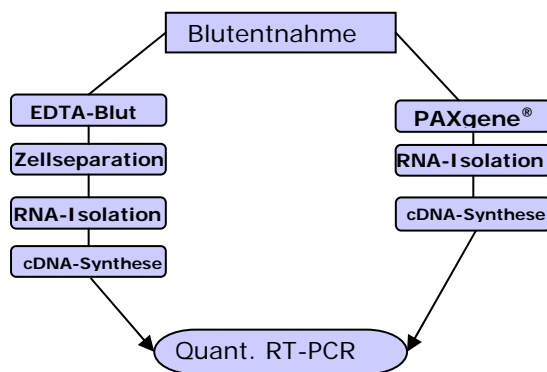


Abbildung 3 Schematische Darstellung des Methodenvergleichs: Nach standardisierter Blutentnahme am Probanden erfolgten mehrere, zum Teil unmittelbar nacheinander geschaltete laborpräparatorische Prozeduren zum Nachweis ausgesuchter intrazellulärer Genexpressionsmuster.

3.1.2.A.I Zellseparation und Leukozytenisolation aus EDTA-Vollblut

Ziel dieser anerkannten Präparation ist die Isolation von immunkompetenten Zellen der weißen Blutreihe (Monozyten und Granulozyten) aus dem gewonnenen EDTA-Vollblut [73;200].

Die Präparation erfolgte streng nach Protokollempfehlung des Herstellers und der Literaturreferenz. Hierzu wurde das frisch entnommene EDTA-Vollblut eines Probanden in Falcons überführt, mit Erythrozyten-Lysepuffer (siehe 9.) aufgefüllt und 10 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zentrifugation des optisch aufgeklärten Lysats (10 min., 450g, 20 °C; Zentrifuge CT 4 22 Fa. Juan, Unterhaching) und Ausbildung eines zellulären

Bodensatz (Pellet) wurde die Lösung dekantiert, das Falcon mittels frischem Erythrozyten-Lysepuffer durch Benetzen der Innenwand ausgespült und nochmals unter Zugabe von Erythrozyten-Lysepuffer nach Resuspendieren des Pellets zentrifugiert. Nach erneutem Dekantieren des Überstandes erfolgte eine Resuspension der Pellets mit 500µl Phosphat-buffered-saline (PBS)-Pufferlösung (siehe 9.). Diese Zellsuspension wurde mithilfe geeigneter Präzisionspipetten (jeweils: Fa. Eppendorf, Hamburg) in ein neues Falcon versetzt. Das Gesamtvolumen der Zellsuspension ließ sich nun mittels geeichter Pipette durch Kolbenaufzug bestimmen. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauer-Zählkammer vorbereitet. Die Auszählung der in der Suspension enthaltenen Zellen erfolgte mit einer Dilutionsreihe (1:10 und 1:100 in PBS-Pufferlösung). Für die zur Zellzahlbestimmung notwendige Probedilution wurde 10 µl dieser Zellsuspension in die vorbereitete 1:10 PBS-Pufferlösung pipettiert und mittels mehrfachen Kolbenaufzug der Pipette und anschließendem maschinellen Aufschütteln (sog. „vortexen“, Schüttler VM 4, Fa. Cat, Deutschland) homogenisiert. 10 µl dieser diluierten Zellsuspension wurden in die vorbereitete 1:100 PBS-Pufferlösung gegeben und nach gleicher Prozedur homogenisiert. Auf die vorbereitete Neubauer-Zählkammer wurden 10 µl der jetzt tausendfach diluierten Zelllösung aufgetragen und die Zellzahl lichtmikroskopisch mittels 10 x 10 facher Vergrößerung optisch ausgezählt. Berechnung: Ausgezählte Zellzahl multipliziert mit materialspezifischen Faktor der Neubauer-Zählkammer multipliziert mit Verdünnungsfaktor multipliziert mit Gesamtvolumen der Suspensionsmenge ergeben die Gesamtzellzahl der Suspension nach Erythrozytenlyse. Die Isolation der immunkompetenten Zellentitäten (Monozyten und Granulozyten) erfolgte mittels *magnetic beads cell sorting* (MACS). Monozyten exprimieren auf ihrer intakten Zelloberfläche das Oberflächenantigen CD₁₄ (*Cluster of differentiation*), wohingegen intakte Granulozyten das Oberflächenantigen CD₁₅ exprimieren. Diese Leukozytensubpopulationen wurden durch Anwendung der positiv magnetisch aktivierten Zellsortierung (MACS) isoliert [131;164].

Kernidee ist hierbei die Zugabe von konjugierten, monoklonalen Antikörpern der Maus (Isotyp: IgM). Diese sind spezifisch gegen die (humanen) CD₁₅⁻ und CD₁₄⁻ Oberflächenantigene gerichtet und besitzen an ihrem F_c Fragment ferromagnetische Partikel von weniger als 100 nm Durchmesser. Zur Isolierung der gewünschten Zelltypen -Monozyten und Granulozyten- ist eine Verwendung von 1 x 10⁸ Zellen systemspezifisch optimal. Hierfür wurden dann 200 µl magnetischer Antikörper benötigt. Betrug die Gesamtzellzahl weniger als 1 x 10⁸ Zellen, so wurden konzentrationsgleich weniger magnetische Antikörper zur Zellsuspension hinzugefügt. Somit wurden entsprechende Mengen der magnetischen Antikörper zu entsprechenden Mengen (in der Regel 1 x 10⁸ Zellen) Zellsuspension in einem neuen Falcon zupipettiert und anschließend bei +4 °C für 15 min. inkubiert. Zunächst erfolgte die Isolation von Monozyten (CD₁₄ positive Zellen) wie folgt: Das Volumen, welches 1 x 10⁸ Zellen entspricht wurde in ein neues Falcon überführt, anschließend wurden 200 µl anti-CD₁₄⁻ Antikörper der Maus (MACS CD₁₄ MicroBeads, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach), hinzugefügt und mit PBS-Puffer auf insgesamt 1 ml aufgefüllt. Die Probe wurde bei +4 °C inkubiert und im Anschluß mit PBS-Puffer aufgefüllt. Nach erfolgter Zentrifugation für 10 min. bei 450 g und 20 °C konnte der Überstand abgegossen und das erhaltene Pellet in 500 µl PBS-Puffer gelöst werden. Die verwendete sterile Mini-MACS- Säule (MACS MS Separation Columns, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) wurde in ein Permanentmagnetfeld eingehängt und mit PBS-Puffer vorgespült. Nun erfolgte ein Auftragen der Zellsuspension auf die Säule. Der Durchlauf wurde bis zum Auftreten des ersten trüben Tropfens verworfen und anschließend in einem neuen Falcon aufgefangen. Die Säule wurde insgesamt 3 malig mit frischem PBS-Puffer nachgespült, der Durchlauf konnte verworfen werden. Zur Extraktion der Monozyten wurde die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und in ein 15 ml Falcon eingesetzt. Mittels Zugabe von 1 ml PBS-Puffer auf die Säule erfolgte die Elution. Zum zuvor aufgefangenen trüben Durchlauf wurde nun das entsprechende Volumen der anti-CD₁₅⁻ Antikörper (MACS CD₁₅ MicroBeads, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) hinzugegeben.

Wiederum wurde die Probe mit PBS-Puffer aufgefüllt und für 15 min. bei +4 °C inkubiert. Nach Auffüllen mit PBS-Puffer erfolgte eine Zentrifugation mit anschließendem Dekantieren des Überstands und Lösen des Pellets mit 500 µl PBS-Puffer. Die jetzt verwendete Midi-MACS-Säule (MACS LS Separation Columns, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) wurde in das Permanentmagnetfeld eingesetzt und in gleicher Weise mit PBS-Puffer vorgespült. Nach Auftragen der Zellsuspension auf die Säule erfolgte eine dreimalige Spülung mit PBS-Puffer. Der Durchlauf konnte diesmal komplett verworfen werden. Die Säule wurde aus dem Magnetfeld entfernt. Die Elution der Granulozyten erfolgte durch Zugabe von 5 ml PBS-Puffer. In (hier nicht weiter beschriebenen) Vorversuchsreihen konnte eine Zellvitalität nach Separation (Anteil lebender Zellen zur Gesamtzahl der Zellen; ermittelt über Anfärbenachweis einer intakten Zellmembranintegrität) von über 93 % gezeigt werden. Die Konservierung und Resuspension der gewonnenen Zellen - Monozyten und Granulozyten - erfolgte durch Abzentrifugieren für 10 min. bei 450 g und 20 °C, Dekantieren des Überstandes und anschließendem Lysieren der Pellets in jeweils 2 ml RLT-Puffer mit 2-Mercapto-Ethanol (siehe 9.). -Mercaptoethanol dient der RNA-Stabilisation durch Proteindenaturierung mittels Disulfidbrückenaufbruch. Bis zur Weiterverarbeitung innerhalb sieben Tagen wurden die Proben im Kühlschrank bei -80 °C gelagert.

3.1.2.A.II RNA-Isolation aus Monozyten und Granulozyten

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus zuvor separierten Monozyten und Granulozyten wurde das RNeasy MIDI Kit (Qiagen[®], Hilden, Deutschland) verwendet.

Bei diesem von bereits mehreren Autoren beschriebenen Verfahren werden die selektive Bindungseigenschaft einer Silicagel-Membran und die Mikrosäulenzentrifugationstechnik in Kombination ausgenutzt [23;202]. Hierzu ließen sich die Proben im Wasserbad bei 37 °C für

10 min. auftauen und anschließend mit 2 ml RLT-Puffer mit 2-Mercapto-Ethanol (siehe 9.) suspendieren.

Mittels steriler, kanülierter Spritze (20 G, 9 mm Ø) wurde die Zellsuspension bis zum Erhalt eines homogenen Lysats durch Kolbenaufzug durchmischt und anschließend in ein neues Falcon überführt. Es erfolgte die Zugabe von 4 ml 70 % absolutem Ethanol in Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Wasser mit sorgfältigem Durchmischen mittels Pipette und maschinellm Aufschütteln.

Die im Kit enthaltene Elutionssäule (*spin column tube*) beinhaltet eine Silicagel benetzte Matrix an der die RNA durch Ethanolzugabe über Ausbildung von Wasserstoffbrücken selektiv binden kann. Das Lysat wurde auf die Säule aufgetragen und diese 5 min. unter 5000 g zentrifugiert, der Durchsatz wurde entsprechend verworfen und entsorgt. Die Säule wurde mit 4 ml Wasch-Puffer RW1 versetzt und erneut 5 min. unter 5000 g zentrifugiert. Das Zentrifugat konnte verworfen werden. Anschließend wurde die Säule mit 2,5 ml Puffer RPE beladen und 2 min zentrifugiert. Nach erneuter Zugabe von 2,5 ml Puffer RPE wurde wiederum 5 min. bei 5000 g zentrifugiert und der Durchsatz komplett verworfen. Es folgte eine Trockenzentrifugation für 3 min. bei 5000 g. Nach Überführen der Säule in ein neues, steriles Falcon erfolgte die RNA-Elution in zwei Elutionsschritten mittels zielgenauem Aufpipettieren von 200 µl RNase freiem Wasser. Nach einer Minute Inkubationszeit schloss sich nach 3 min Zentrifugation bei 5000 g ein erneutes (gleiches) Eluieren mit 200 µl RNase freiem Wasser an. Das Total-RNA-Eluat aus den zuvor isolierten CD₁₄-positiven Monozyten bzw. CD₁₅- positiven Granulozyten wurde unverzüglich zum Schutz vor Degradation auf Eis gekühlt und zur Konzentrationsbestimmung qualitativ und quantitativ photometriert.

Photometrische RNA-Konzentrationsbestimmung:

Zur photometrischen Bestimmung von Konzentration und Qualität der extrahierten RNA wurden je 60 µl der Proben-RNA entnommen und in einer sterilen UVette gegen RNase-freiem Wasser als Leerwert gemessen (BioPhotometer 6131, Fa. Eppendorf, Hamburg). Hierzu ließ sich die optische Dichte (OD) der jeweiligen Probe bei einer Wellenlänge = 260 nm und = 280 nm ermitteln. Die Probenkonzentration errechnete sich wie folgt:

$$C_{[\text{RNA}]} (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \text{OD}_{(260\text{ nm})} \times 40 \times \text{Verdünnung} / 1000$$

Hierbei stellt der Faktor 40 einen RNA-spezifischen Faktor dar, der einer wässrigen Lösung mit optischer Dichte von 1 entspricht, welche eine Konzentration von 40 ng/µl RNA enthält.

Zusätzlich wurde zur Bestimmung der Reinheit der RNA-Probe die Ratio OD (= 260 nm) / OD (= 280 nm) ermittelt.

Der Quotient aus der optischen Dichte bei = 260 nm (RNA) und = 280 nm (Proteine) ist ein Maß für Verunreinigungen durch Proteine, genomischer DNA bzw. aromatischer Substanzen und sollte größer als 1,8 sein. Reine RNA in Lösung besitzt eine Ratio von 1,8-2,1. Messwerte über 1,85 wurden akzeptiert und fanden Eingang in die weitere RNA-Präparation.

Alle Total-RNA-Proben wurden bei -80 °C gelagert und binnen 7 Tagen der weiteren Analytik zugeführt.

3.1.2.B Vollblutmedium (PAXgene[®]) und dessen RNA Isolation

Das PAXgene[®] Blood RNA System (Fa. PreAnalytix, Hombrechtikon, Schweiz) vereint in der Anwendung die zuvor in der Alternativmethode dargestellten präparatorischen Schritte der Blutentnahme, Stabilisation und RNA-Extraktion. Durch die beigefügten Chemikalien und Reagenzien kann eine standardisierte Aufarbeitung der akquirierten Vollblutproben erfolgen. Nach einer notwendigen Inkubationszeit von mindestens 2h wurden die Proben in

der Regel am Folgetag weiterverarbeitet. Die PAXgene® blood RNA tubes wurden hierzu zunächst für 10 min. bei 4260 g und 20 °C zentrifugiert, der Überstand abgegossen und zur Aufreinigung das Pellet in 5 ml RNase-freiem Wasser durch maschinellem Aufschütteln gelöst. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand dekantiert, das Röhrchen getrocknet und das Pellet in 360 µl Puffer BR 1 gelöst und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Aufreinigung der Probe erfolgte nach Zugabe von 300 µl Puffer BR 2 ein Proteinverdau mit 40 µl Proteinase K. Proteinase K ist eine Proteinase, die zur Familie der Subtilisin-ähnlichen Serinproteasen gehört. Sie besitzt endo- und exoproteolytische Aktivität. Proteinase K wird für den Abbau von Proteinen in Zelllysaten und zur Freisetzung von Nukleinsäuren verwendet. Die Probe wurde maschinell aufgeschüttelt und für 10 min. im Wasserbad (WNE 14, Fa. Memmert, Schwabach) bei 55 °C inkubiert, um optimale Bedingungen für die Proteinase zu schaffen. Zur Entfernung der Proteinreste, welche sich noch in der Probe befanden, wurde diese für 3 min. bei 16000 g in einer Tischzentrifuge zentrifugiert (Heraeus Biofuge pico, Fa. Kendro, Hanau), der Überstand, welcher die RNA enthielt, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, das Pellet aus Protein- und Zellresten wurde verworfen. Um die RNA an die verwendete Säule binden zu können, wurde 350 µl absolutem Ethanol zupipettiert, die Probe maschinell aufgeschüttelt und kurz zentrifugiert. Anschließend erfolgte eine Beladung der Säule mit 700 µl Probe und eine Zentrifugation für 1 min. bei 16000 g. Die RNA war nun an die Säulenmembran gebunden, der Durchlauf wurde verworfen und die Säule in ein neues Reaktionsgefäß eingehängt. In einem zweiten Durchgang wurde die restliche Probe an die Säule gebunden, diese wieder zentrifugiert und in ein neues Reaktionsgefäß eingehängt. Zur weiteren Aufreinigung der RNA wurden 700 µl Puffer BR 3 auf die Säule pipettiert, zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Anschließend konnte die Probe in zwei weiteren Schritten durch Zugabe von jeweils 500 µl Puffer BR 4 auf die Säule und anschließender Zentrifugation (1 min., 16000 g) weiter aufgereinigt werden. Der Puffer BR 4 wurde vor dem ersten Gebrauch durch Zugabe von 44 ml absolutem Ethanol

gemäß Herstellerprotokoll vorbereitet. Der Durchlauf konnte verworfen werden. Nun erfolgte eine Trockenzentrifugation der Säule, da Reste von Puffer BR 4 die weiteren Analysen behindern könnten. Hierzu wurde die Säule für 3 min. bei 16000 g zentrifugiert und anschließend in das *Elutionscup* eingehängt. Die Elution der RNA erfolgte in zwei Schritten durch Zugabe von jeweils 40 µl Puffer BR 5 und anschließender Zentrifugation für eine Minute bei 16000 g. Da sich die RNA prozedural in ihrer Sekundärstruktur verändert haben konnte (zum Beispiel Doppelstrangbildung), musste eine Denaturierung für 5 min. im Wasserbad bei 65 °C und anschließender Kühlung auf Eis durchgeführt werden. Bevor die Probe bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C im Gefrierschrank gelagert wurde, erfolgte noch eine photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA (siehe Punkt 3.1.2.A.II).

3.1.2.C. cDNA Synthese / reverse Transkription

Für die quantitativen RT-PCR-Analysen war es notwendig, die Total-RNA in DNA umzuschreiben. Hierzu wurde das *1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR* (AMV, Fa. Roche, Penzberg) verwendet.

Aus mRNA wird dabei selektiv im Rahmen einer reversen Transkription mit Hilfe der Avian-Myeloblastosis-Virus-Reversen-Transkriptase (AMV-rt) komplementäre Erststrang cDNA als so genanntes „template“ für die RT-PCR geschrieben.

Diese spezifische, RNA-abhängige DNA-Polymerase benötigt wie andere Polymerasen einen Primer (einen kurzen, komplementären DNA-Abschnitt) zur Synthese, welcher an die RNA bindet. Hierzu wurde ein Oligo-dT-Primer (15 Thyminbasen) gewählt, welcher komplementär zum 3' Ende des Poly-A-Schwanz der eukaryontischen mRNA bindet. Für eine Reaktion wird 1 µg Gesamt RNA benötigt. Für einen Ansatz muss die eingesetzte RNA-Menge in 8,2 µl Volumen vorliegen, um einen Reaktionsansatz von 20,0 µl zu erhalten.

Hierzu war es oftmals notwendig, das vorliegende Volumen, welches 1 µg Total-RNA entsprach, mittels Vakuumverdampfer (Zentrifuge RC 10.10 + ATMA-Kompressor, Fa. Juan, Unterhaching) in sterilen Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei 45 °C auf ein Zielvolumen von 8,2 µl zu reduzieren. Eine Volumenkontrolle erfolgte mittels geeichter Präzisionspipette. Nach erreichtem Zielvolumen wurde die Total-RNA für die weiteren Reaktionen in ein steriles 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß (Fa. Eppendorf, Hamburg) überführt und auf Eis gelagert. Das Ansetzen des Mastermix für die reverse Transkription erfolgte streng nach Herstellerangaben.

Reagenz	Reagenzien Nummer	Volumen für eine Reaktion	Endkonzentration für eine Reaktion
10x Reaction Buffer	1	2,0 µl	1x (einfach)
25mM MgCl ₂	2	4,0 µl	5 mM
Deoxynucleotide Mix (dATP,dCTP,dTTP,dGTP)je 10mM	3	2,0 µl	1 mM
Oligo-p(dT) ₁₅ Primer	5	2,0 µl	0,04 A ₂₆₀ units (1,6 µg)
Rnase Inhibitor (50 units/µl)	7	1,0 µl	50 units
AMV reverse transcriptase	8	0,8 µl	20 units
RNA sample (bereits im PCR-Tube)		8,2 µl	1 µg

Tabelle 1 Mastermix für reverse Transkription: Überblick der Reagenzien für einen Reaktionsansatz.

Nach Zugabe von 11,2 µl des Reaktions-Mastermix wurde der Ansatz abzentrifugiert und im Thermalblock (PTC-200, Fa. MJ Research, Watham, USA) unter folgenden Bedingungen inkubiert: 10 min. bei 25 °C zur Primerhybridisierung, 60 min. bei 42 °C zur reversen Transkription, 5 min. bei 99 °C zur Inaktivierung der Enzyme mit anschließendem sofortigen Abkühlen auf 4 °C Nach der Reaktion wurden die somit gewonnenen cDNA Ansätze bei -20 °C für die Folgereaktionen aufbewahrt.

Temperatur	Zeit	Vorgang
25 °C	10 Min.	Annealing (Binden der Oligonukleotide an die RNA)
42 °C	60 Min.	Transkription (Überschreiben der RNA in cDNA)
99 °C	5 Min.	Denaturierung des AMV Enzyms (Inaktivierung der Reversen Transkriptase)
4 °C	5 Min	Abkühlen (Reaktionsende)
4 °C		1-2 Stunden oder gleich -20 °C

Tabelle 2 Inkubationsbedingungen für reverse Transkription: Im Thermalblock wird der Reaktionsansatz zeit- und temperaturabhängig für die angegebenen Reaktionsschritte inkubiert. Als Produkt entsteht aus der messenger-RNA (mRNA), eine primerabhängige, hochspezifische komplementäre cDNA, welche als Matrize Eingang in die weiterführende, quantitative RT-PCR der intrazellulären Diagnostik findet.

3.1.2. D. Detektion mittels quantitativer real-time-PCR

Die quantitative Analyse der Zielgene erfolgte mittels real-time-PCR im LightCycler® (Fa. Roche, Mannheim, Deutschland). Die qRT-PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruht, und zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung bietet. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen am Ende bzw. während eines PCR-Zyklus (daher der Name "*real time*") durchgeführt und unterscheidet sich somit von anderen quantitativen PCR-Methoden (qPCR), die erst nach Ablauf der PCR quantitativ ausgewertet werden (z.B. Kompetitive PCR). Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu, was eine Quantifizierung möglich macht. Eine gelelektrophoretische Auftrennung der Fragmente ist hierzu nicht nötig, die Daten sind sofort verfügbar und das Kontaminationsrisiko ist präparationsabhängig gering. Zur Quantifizierung der PCR-Produkte wurde der Reaktionsansatz *LightCycler FastStart DNA Master SYBR® Green I* (Fa. Roche, Penzberg, Deutschland) benutzt, welcher auch die Taq DNA- Polymerase enthält. Diese thermostabile Polymerase wird erst nach der ersten Denaturierung aktiviert und minimiert somit das Risiko einer polymerasespezifischen intrinsischen RT-Aktivität, welche zu falsch-positiven Ergebnissen führen könnte.

Der beinhaltete spezifische Farbstoff interkaliert während der Amplifikation in das doppelsträngige PCR-Produkt und wirkt als Fluorophor. SYBR Green I ist ein asymmetrischer Cyanin-Farbstoff. Voraussetzung für die Amplifikation ist die Auswahl von spezifischen Primern, welche die zu amplifizierende Region auf der cDNA flankieren (*Sense* und *Antisense Primer*) und sich dort anlagern können (*Annealing*). Eine Zunahme der *Target-DNA* korreliert dann mit der Zunahme der Fluoreszenz von Zyklus zu Zyklus, nämlich am Ende der Elongationsphase und vor dem nächsten Denaturierungsschritt. Der daraus resultierende DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex absorbiert blaues Licht bei einer

Wellenlänge $\lambda_{\max} = 498 \text{ nm}$ und emittiert grünes Licht bei $\lambda_{\max} = 522 \text{ nm}$. Weitere, wenn auch deutlich schwächere, Absorptionsmaxima liegen im UV-Bereich bei etwa 300 nm und 370 nm. Die Bestimmung des *Crossing-Points* (CP) an dem die detektierte Fluoreszenz die Hintergrund-Fluoreszenz überschreitet, wurde mit der *second Derivative Maximum Method* der LightCycler Software LC-Run, Version 5.32 (Fa. Roche) durchgeführt. Diese Methode zeigt Effizienzen von 1,65 bis 1,90 und im Vergleich mit anderen Effizienz Berechnungsmodellen die geringste Varianz und höchste Genauigkeit [187]. Der CP kann als relatives Maß für die DNA-Konzentration in der Ausgangsprobe betrachtet werden.

Hierzu wurde zunächst die benötigte Anzahl von Kapillaren im $+4^\circ \text{ C}$. vorgekühltem Kapillarblock bereitgestellt, sowie die bei -20° C gelagerten Proben im Eisblock aufgetaut. Zusätzlich zu den zu analysierenden Proben wurde je eine Positiv- sowie eine Negativkontrolle und 5 Standards in einer Verdünnungsreihe von 1:1 bis 1:10000 (unverdünnt, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000) vorbereitet.

Vorbereitung der Standardverdünnung:

In vier 200 μl Reaktionsgefäßen wurde jeweils 10,8 μl Standard-Stabilizer pipettiert, anschließend wurde in das erste Gefäß 1,2 μl des Standards einer bekannten Konzentration mit definierter Kopienzahl zupipettiert. Nach dem Homogenisieren durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wurden 1,2 μl der nun 1:10 verdünnten Lösung in das nächste Cup pipettiert und wiederum gemischt. Somit entstand eine logarithmische Dilutionsreihe bis zu 1:10000.

In jeder Kapillare, in welche zu untersuchende Patientenproben pipettiert werden sollte, musste zunächst 9 μl RNase- freies Wasser vorgelegt werden. Hierbei wurde eine Kapillare mit 10 μl als Negativkontrolle befüllt. In 5 weitere Kapillaren wurden jeweils 10 μl Standards in absteigender Konzentration zupipettiert, in eine weitere Kapillare wurde die

Positivkontrolle zugegeben. Anschließend konnte in jedes der Probenkapillaren, welche mit 9 µl Wasser befüllt waren, jeweils 1 µl cDNA der Patientenproben zugegeben werden.

Nun wurde der LC-PCR-Mix vorbereitet. Dieses Enzym-Primer-Gemisch beinhaltete je Probe 6 µl RNase freies Wasser, 2 µl LC Primer Set und 2 µl Master SYBR Green I Premix (mitsamt Reaktionspuffer, dNTP-Gemisch, Fast-Start-Taq-DNA-Polymerase und SYBR-Green I; siehe **Tabelle 3.**).

Bei 31 Proben zum Beispiel bedeutete dies einen Ansatz für 32 Proben (1x Sicherheitsreserve bei eventuellen Pipettierfehlern) mit 192 µl Wasser, 64 µl Primer und 64 µl SYBR Green Premix.

Mastermix [Inhalt]	1 Probe	31 + 1 Probe []
RNase-freies Wasser	6 µl	192 µl
LC-Primer Set	2 µl	64 µl
Master SYBR Green I Premix	2 µl	64 µl

Tabelle 3 Lightcycler qRT-PCR Mastermix: Der Ansatz enthält ein definiertes Volumen eines Primers (nach entsprechendem „*Gen of interest*“) sowie den interkalierenden Flurezensfarbstoff SYBR-Green mitsamt Reaktionssubstraten.

Anschließend wurde somit in jede Kapillare 10 µl LC-PCR-Mix zupipettiert und die Kapillare verschlossen. Alle Kapillaren wurden nun für 4 min. bei 600 rpm und 4 °C zentrifugiert (Zentrifuge BR 4, Fa. Juan, Unterhaching) und in das LightCycler-Karussell positioniert.

Für 24 zu untersuchende Patientenproben sah der Ansatz wie folgt aus:

Kapillare	Material	Wasser	Probe	LC-PCR-Mix
1 - 24	cDNA Probe	9 µl	1 µl cDNA	10 µl
25	Positivkontrolle		10 µl Kontroll-cDNA	10 µl
26	Standard unverd.		10 µl Standard	10 µl
27	Standard 1:10		10 µl Standard 1:10	10 µl
28	Standard 1:100		10 µl Standard 1:100	10 µl
29	Standard 1:1000		10 µl Standard 1:1000	10 µl
30	Standard 1:10000		10 µl Standard 1:10000	10 µl
31	Negativkontrolle	10 µl		10 µl

Tabelle 4 Probenanalyse im Lightcycler: Jede Kapillare enthält 20 µl Probenvolumen. Neben 24 cDNA Analysen nach reverser Transkription (vom Probanden oder Patienten) findet eine Positiv- und Negativkontrolle sowie ein definierter Standard zur Quantifizierung Eingang in die qRT-PCR.

Zur quantitativen Analyse der Genexpression der ausgesuchten Zielgene wurde nun die qRT-PCR gemäß folgendem Schema im LightCycler durchgeführt:

Schritt	Zweck	Temperatur	Zeit
1	Denaturierung und Aktivierung der Polymerase	95 °C	10 min.
2	Amplifikation des Zielgens	95°/68°/72° C	Siehe unten
3	Schmelzkurvenanalyse	95°/58°/95° C	Siehe unten
4	Kühlung von Rotor und Kammer	40 °C	30 sec.

Tabelle 5 Reaktionsablauf der qRT-PCR: Überblick der Reaktionsschritte mitsamt zeit- und temperaturabhängigen Inkubationsbedingungen. Die Amplifikation des Zielgens erfolgt in Zyklen, welche nachfolgend gesondert beschrieben werden. Zur Quantifizierung wird eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt und an späterer Stelle erläutert.

Die Amplifikation des Zielgens erfolgte in 45 Zyklen in einer „Touch-down“ PCR mit folgenden Reaktionsbestandteilen:

Schritt	Zweck	Temperatur	Zeit	Kommentar
1	Denaturierung	95 °C	10 sec.	
2	Annealing	68 – 58 °C	10 sec.	1.Zyklus 68 °C, dann Abnahme um 0,5 °C je Zyklus auf 58 °C
3	Elongation	72 °C	16 sec.	

Tabelle 6 Amplifikation: Während der Denaturierung liegen einzelsträngige Nukleinsäuren mit aufgelösten Sekundärstrukturen vor. Beim Annealing lagert sich der Primer Schmelztemperaturabhängig an den komplementären DNA-Strang an, wohingegen während der Elongation die Verdoppelung der DNA-Stränge erfolgt.

Die sogenannte „Touch down“-PCR bietet den Vorteil, dass zunächst bei wenig DNA-Material eine spezifische Amplifikation durchgeführt wird. Mit zunehmender Anzahl von Probensträngen kann die Annealing-Temperatur abgesenkt werden. Dadurch bindet der Primer etwas unspezifischer an die nun in großer Zahl vorhandenen DNA-Stränge. Somit erhält man eine gute Amplifikation bei hoher Spezifität der Produkte.

Zur Qualitätskontrolle der erhaltenen qRT-PCR-Produkte wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Dies ermöglicht eine gute Aussage über die Spezifität der PCR-Produkte. Die Schmelzkurvenanalyse lief in folgenden Schritten ab:

Schritt	Zweck	Temperatur	Zeit	Kommentar
1	Denaturierung	95 °C	1 sec.	
2	Abkühlung	58 °C	10 sec.	
3	Aufschmelzung	58 – 95 °C	1 sec.	Steigerung um 0,1 °C/sec.

Tabelle 7 Schmelzkurvenanalyse: Das qRT-PCR-Produkt wird zur Qualitätsbeurteilung Zeit- und Temperaturabhängig zur Einzelstrangformation aufgeschmolzen.

Ab einer spezifischen Temperatur (*Melting point*) erfolgt die Auftrennung des als Doppelstrang vorliegenden qRT-PCR-Produkts zu Einzelsträngen. Diese wird aufgrund des abnehmenden Fluoreszenzsignals als Schmelzkurve graphisch aufgetragen und erlaubt eine abschließende Bewertung zwischen gesuchtem PCR-Produkt und unspezifischen, falschen Produkten.

Bei einem Hinweis auf unspezifische Produkte beziehungsweise Primer-Dimeren in der Schmelzkurvenanalyse wurden die Proben im Anschluss Agarose-Gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid-Färbung nachgewiesen. Hierzu konnten die Kapillaren aus dem Karussell entnommen und der Probeninhalt in einem sterilen 2 ml Reaktionsgefäß bei 600 rpm mittels Tischzentrifuge herauszentrifugiert und im Kühlschrank bei -20 °C zwischengelagert werden.

Zeigte sich in der Schmelzkurvenanalyse nur ein spezifisches Genprodukt, so wurden die Proben akzeptiert und auf eine Folgeanalytik verzichtet.

Als weitere Maßnahme zur Sicherstellung der Ergebnistreue wurden in jedem Ansatz definierte Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt. Das Assay wurde stets als Doppelbestimmung schon ab dem Zeitpunkt der RNA-Präparation geführt.

3.1.2.E Elektrophorese auf Agarosegel-Basis

Zunächst erfolgte die Herstellung des 1,5 % igen Agarosegels. Hierfür wurde 1,8 g Agarose (Seacom LE agarose[®], FMC Bioproducts, Rockland, ME, USA) in 120 ml TAE-Puffer (siehe 9.) in der Mikrowelle bei 1000 W für 90 sec. aufgekocht und somit gelöst. Zur Vermeidung des Siedeverzugs wurde die Flasche kurz geschüttelt und für weitere 60 sec. aufgekocht. Die Lösung wurde etwas abgekühlt und 6 µl 1 % ige Ethidiumbromid-Lösung (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) zupipettiert und durch Aufschütteln homogenisiert. Ethidiumbromid

wird in der Molekularbiologie zum Anfärben von Nukleinsäuren bei der Gelelektrophorese verwendet. Einzelne Ethidiumbromid-Moleküle interkalieren dabei zwischen den Basen der DNA bzw. RNA (bis zu 3 Moleküle je 10 Basen), wodurch sich das Anregungsspektrum von Ethidiumbromid verändert und so die Fluoreszenz der Substanz bei Anregung mit ultraviolettem Licht stark erhöht wird. Auf diese Weise leuchten im Agarosegel Areale, an denen sich Nukleinsäuren befinden, hell auf, während Stellen ohne Nukleinsäuren dunkel erscheinen. Das Gel wurde im Abzug in eine Gelkammer eingefüllt und nach Aushärten mit TAE-Puffer aufgefüllt.

Die zu untersuchenden cDNA-Proben wurden aufgetaut und jeweils 2 µl Farbmarker (10 x Bluejuice, Fa. Invitrogen[®], Karlsruhe) zupipettiert. Zur Bestimmung der Fragmentgröße verwendeten wir zwei verschiedene DNA-Leitern mit einer Konzentration von je 1 µg/µl und Markierungen im Abstand von 100 bp und 250 bp (Fa. Invitrogen[®], Karlsruhe). Hierzu wurden je 1 µl DNA-Leiter mit 19 µl Wasser verdünnt und jeweils 2 µl Farbmarker hinzupipettiert.

Der Probenauftrag erfolgte wie folgt:

Obere Hälfte

Spur 1	Spur 2- 19	Spur 20
100 bp Leiter	Proben 1-18	250 bp Leiter

Untere Hälfte

Spur 1	Spur 2- 14	Spur 15
100 bp Leiter	Proben 19-31	250 bp Leiter

Zur Elektrophorese erfolgte mittels elektrischer Spannung von 100 Volt und einer Stromstärke von etwa 80 Milliampere. Da DNA negativ geladen ist, läuft sie von der Anode

3.1.2.F. Stimulationsbedingungen

Um die zu erwartende Genexpression der einzelnen Zielgene am Patienten auch im Hinblick auf die prozedurale Validität besser abschätzen zu können, wurden zusätzliche Stimulationsuntersuchungen am gesunden Kontrollprobanden durchgeführt. Hierzu wurde wiederum periphervenöses Blut in standardisierter Technik entnommen und 2 PAXgene[®]-Röhrchen befüllt. Ferner konnten in gleicher Sitzung weitere 110 ml EDTA-Blut zur Expressionsdetektion unter Stimulationsbedingungen und 4,5 ml EDTA-Blut zur Differentialblutbild-bestimmung gewonnen werden. Drei der etablierten 10 ml EDTA-Röhrchen wurden mit dem Zusatz „nativ“ beschriftet, 4 weitere mit dem Zusatz „+ LPS“ und die restlichen 4 mit dem Zusatz „+ LPS + AD“. Die beiden befüllten PAXgene[®]-Röhrchen wurden ebenfalls mit dem Zusatz „nativ“ gekennzeichnet, 2 weitere noch unbefüllte Röhrchen ebenfalls mit dem Zusatz „+ LPS“ und zwei weitere mit dem Zusatz „+ LPS + AD“ (siehe **Abbildung 5**).

Zunächst wurden die benötigten Reagenzien vorbereitet. Das verwendete lyophilisierte Lipopolysaccharid aus *E. coli* (026:B6, Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim) wurde in sterilem Wasser aufgelöst, die erhaltene Konzentration betrug 1 mg/ml. Lipopolysaccharide (LPS) sind relativ thermostabile Verbindungen aus fett- und zuckerähnlichen Bestandteilen. Diese sind in der äußeren Membran gram-negativer Bakterien enthalten. Sie wirken als hochpyrogene Antigene und dienen der serologischen Charakterisierung und Identifizierung der Bakterien. Beim Zellzerfall werden Teile davon frei und wirken toxisch. Diese Fragmente werden als Endotoxine bezeichnet, weil sie von intakten Bakterien nicht freigesetzt werden. Actinomycin D (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim) wurde ebenfalls in sterilem, injektionsfähigem Wasser in einer Konzentration von 0,5 mg/ml gelöst. Actinomycin D, aus der Gruppe der Actinomycine, ist ein Peptid-Antibiotikum aus dem Bakterium *Streptomyces parvulus*. Es besteht aus zwei zyklischen Peptiden, die über eine Phenoxazin-Einheit

miteinander verbunden sind. Actinomycin D wirkt als Interkalator der DNA. In niedrigen Dosierungen hemmt Actinomycin D die DNA-abhängige RNA-Synthese durch Interkalation der Guanin-Nukleotide der DNA. Für die Anlagerung von Actinomycin D an die DNA spielt das asymmetrische Phenoxazon eine wichtige Rolle, weil dieser Bestandteil sich spezifisch an die an Guanin- und Cytosin-Nukleotid reichen (GC-rich) Stellen der DNA bindet. Durch die Bindung an die DNA wird die DNA-abhängige RNA-Polymerase blockiert; die Bildung von mRNA unterbleibt und die Proteinproduktion sinkt ab. Bei höherer Dosierung wird durch Actinomycin D auch die DNA-Replikation gehemmt. Hierbei wird die DNA-Polymerase in ihrer Aktivität blockiert.

Beide Lösungen wurden separat gemischt und sorgfältig homogenisiert.

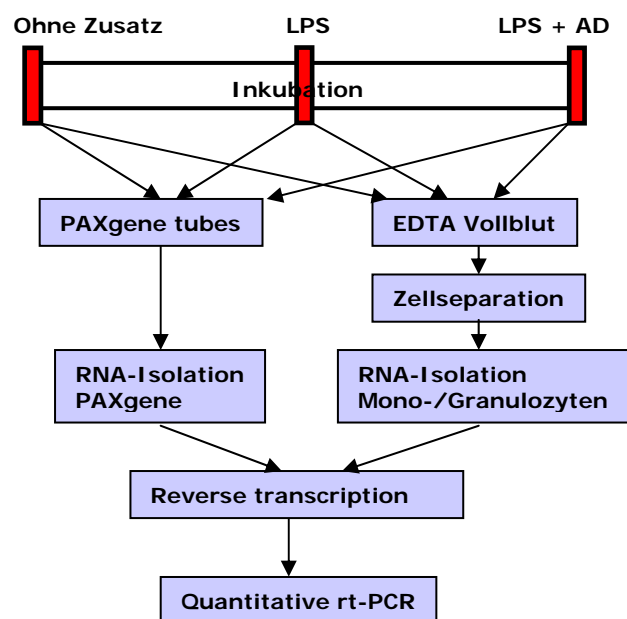


Abbildung 5 schematische Darstellung des Versuchsansatzes: Nach standardisierter peripherenöser Blutentnahme erfolgte eine unverzügliche Aufarbeitung der nativ gewonnenen EDTA-Proben während die nativ bestimmten PAXgene[®] Tubes nach Herstellerangaben 24 Stunden im Medium ruhten. In vitro stimulierte beziehungsweise zuvor inhibierte und anschließend stimulierte EDTA-Proben inkubierten 150 Minuten unter beschriebener Atmosphäre. Nach Inkubation der „vorbehandelten“ EDTA-Proben wurden Teilmengen (je 2,5 ml, Doppelbestimmung) in neue PAXgene[®] Medien überführt und nach Inkubation (24 h) protokollgerecht (vergleichend der wiederum sofort durchgeführten Zellseparation) aufgearbeitet.

Während die „nativ“ befüllten PAXgene[®]-Röhrchen bei Raumtemperatur für 24 Stunden inkubierten, wurde das „native“ 30 ml EDTA-Blut sofort gemäß Protokoll Zellseparation aufgearbeitet (siehe 3.1). Die acht weiteren befüllten EDTA-Vacutainer[®] wurden vorsichtig geöffnet und mit jeweils 100 µg (=100 µl) LPS-Lösung befüllt. Somit wurde eine LPS/Blut Konzentration im Blut von 10 µg/ml generiert. Zu den 4 Röhrchen mit Zusatz „+ LPS + AD“ wurde zusätzlich 1 mg (= 2 ml) Actinomycin D-Lösung zupipettiert. Hier betrug die Actinomycin/Blut-Konzentration 100 µg/ml. Alle Röhrchen wurden wieder sorgfältig verschlossen und gemischt. Anschließend wurden die 8 EDTA-Röhrchen mit geöffnetem Deckel im Brutschrank unter einer Atmosphäre von 37 °C und 5 % CO₂ für 2½ h inkubiert. Danach wurden aus einem Röhrchen „+ LPS“ 5 ml Blut entnommen und in 2 PAXgene[®]-Röhrchen (Kennzeichnung „+ LPS“, je 2,5 ml) umgefüllt. Selbiges wurde für die Proben mit der Beschriftung „+ LPS + AD“ durchgeführt. Alle PAXgene[®]-Röhrchen wurden für 24 Stunden inkubiert und der weiteren seriellen Analyse zugeführt, während die EDTA-Blutproben gemäß des Protokolls der Zellseparation (siehe 3.1) unverzüglich aufgearbeitet wurden.

3.1.2.G Gen of interest (Auswahl geeigneter Messparameter)

Für unsere Untersuchungen verwendeten wir kommerziell erhältliche Primer der Firma Search-LC (Heidelberg). Die Auswahl der untersuchten Parameter erfolgte im Hinblick auf die erwartete klinische Relevanz im Sinne der Fragestellung und wurde bereits in der Einleitung (siehe Punkt 1.5) erläutert. In allen Studienabschnitten untersuchten wir die Zytokinexpression von TNF- und IL-10. Bei intrazellulären Analysen am Patienten verwendeten wir neben den oben genannten Zytokinen noch IL1-ra, IL-8 und PMN-Elastase. Zur Adjustierung des Messsystems sowie weiterführenden Analysen und Fragestellungen

fanden ebenso (in dieser Übersichtsarbeit nicht gezeigte) Parameter wie CD25, TEK-PTK, und IL-6 Eingang.

3.1.2.H Housekeeping-Gene als interne, intrazelluläre Normierungsgrößen

Zum Ausgleich intra- und interindividueller Messabweichungen erfordert die qRT-PCR Normierungsmethoden des gemessenen Zielgen-Signals.

Housekeeping-Gene sind Gene, welche optimalerweise nicht durch externe Einflüsse reguliert und in allen Zellen konstant exprimiert werden. Sie kodieren für gewöhnlich essentielle Proteine für eine intakte Homöostase, beispielsweise für den Zellstoffwechsel, Proteine des Zytoskeletts, ribosomaler RNA und Histone. *Housekeeping*-Gene wie Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT), Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), Porphobilinogen-Desaminase (PBGD), Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G-6-PDH), sowie β -Actin werden aufgrund Ihrer konstitutiven Expression hierfür als interner Standard in Bezug zum *Target*-Gen verwendet. Viele Untersuchungen konnten jedoch zeigen, dass *Housekeeping* Gene unter verschiedenen Bedingungen wie Hypoxie und Zellproliferation reguliert werden können. Bei einer deskriptiven Quantifizierung auf qRT-PCR-Basis ist es daher notwendig, ein für die spezifischen experimentellen Bedingungen geeignetes Kontrollgen zu finden. Hierzu kamen kommerziell erhältliche Primer-Sets für die oben genannten *Housekeeping*-Gene der Firma Search-LC (Heidelberg) zum Einsatz.

3.1.3 Systemische Zytokinkonzentration (ELISA)

Es wurde ein Nicht-kompetitives ELISA zur Quantifizierung der Zytokinkonzentrationen in Serum/Plasmaproben gewählt.

Prinzip:

Das Enzym-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) gehört zu der Gruppe der Immunassay-Verfahren und basiert auf einer enzymatischen Farbumschlagreaktion. Hierbei macht man sich die Eigenschaft spezifischer Antikörper zu Nutze, die an dem nachzuweisenden Stoff (Antigen) binden. Die somit enzymkatalysierte Reaktion dient als Nachweis für das Vorhandensein des Antigens. Mit Hilfe der so genannten *Double-Antibody-Sandwich-ELISA*-Methode können Zytokine sowie lösliche Zytokin-Rezeptoren mit hoher Spezifität und Sensitivität quantitativ nachgewiesen werden. In diesem Assay kommen zwei Antikörper (Ak) zur Wirkung, welche an unterschiedlichen Stellen an das Antigen binden: Der erste Ak (*coating*-Antikörper) ist an einer festen Phase gebunden (96 Well-Mikrotiterplatte). Die Probe mit dem nachzuweisenden Antigen (Ag) wird dann in Wells gegeben und bindet während der Inkubationszeit an den *coating*-Ak. Im Rahmen eines Waschschriffs werden die ungebundenen Bestandteile entfernt und es verbleibt das *coating*-Ak-gebundene Antigen. Im Folgeschritt wird ein polyklonaler Detektions-Antikörper zugegeben, an dessen Ende ein Enzym (Meerrettichperoxidase) gebunden ist. Dieser bindet an einem weiteren Epitop des Antigens und es entsteht ein Antikörper-Antigen-Antikörper Komplex („*Sandwich*“). In einem Folgeschritt wird der überschüssige zweite Antikörper ausgewaschen und eine chromogene Substratlösung (Tetramethylbenzidin in Peroxid-lösung, TMB) aufgebracht. Beendet wird die Farbreaktion zeitabhängig mit Zugabe einer Stopplösung (Salzsäure bzw. Schwefelsäure). Es erfolgt ein am Photometer messbarer, gelber Farbumschlag, welcher proportional zum Ag-Ak-Ag- Komplex und somit auch zur Konzentration des Probenantigens (hier: Zytokin) ist. Nach Erstellen einer Standardkurve und Vergleich photometrisch bestimmter Rohwerte mit den Standardwerten kann die Konzentration ermittelt werden. Um Messungenauigkeiten vorzubeugen, wurden sämtliche Proben doppelt bestimmt und der Konzentrationsmittelwert als Ergebnis verwendet. Doppelt bestimmte Ergebnisdifferenzen unter 5 % fanden als Mittelwertdarstellung Eingang in den Ergebnisteil.

Durchführung:

Zur Quantifizierung ausgesuchter humaner Zytokinkonzentrationen kamen im Experiment mediatorabhängig verschiedene kommerziell erhältliche ELISA-Kits der Firmen Milenia Biotec (Bad Nauheim) und R&D Systems (Wiesbaden, Nordenstadt) zum Einsatz.

Die verwendeten Testbestecke unterlagen der gleichen Methodik, variierten jedoch geringfügig hinsichtlich der vom Hersteller optimierten und empfohlenen Proben- und Reagenzienvolumina. **Tabelle 8** gibt einen Überblick über die abweichenden Präparationschritte.

	PMN-Elastase	TNFα	IL-8	IL-10	IL-1ra
Hersteller	Milenia Biotec	Milenia Biotec	Milenia Biotec	Milenia Biotec	R&D Systems
Probenvolumen	10 μ l	100 μ l	25 μ l	100 μ l	200 μ l
Material	Li-Hep	Li-Hep	Li-Hep	Li-Hep	Li-Hep
Dilution	990 μ l	150 μ l	100 μ l	50 μ l	50 μ l
Dilutionsverhältnis	1:100	1:1,5	1:4	2:1	4:1
Assay - volumen	100 μ l	250 μ l	125 μ l	150 μ l	250 μ l
1. Inkubation	60 min.	120 min.	120 min.	120 min.	120 min.
Waschen	4 x 300 μ l	4 x 300 μ l	4 x 300 μ l	4 x 300 μ l	4 x 400 μ l
Enzym - Konjugat	150 μ l	200 μ l	150 μ l + 50	100 μ l	200 μ l
2. Inkubation	60 min.	120 min.	120 min.	120 min.	120 min.
Waschen	4 x 300 μ l	4 x 300 μ l	4 x 300 μ l	4 x 300 μ l	4 x 400 μ l
Substrat	200 μ l TMB	200 μ l TMB	200 μ l TMB	100 μ l TMB	200 μ l TMB
3. Inkubation	20 min.	30 min.	30 min.	30 min.	20 min.
Stopplösung	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l
Extinktion	450/620 nm	450/620 nm	450/620 nm	450/620 nm	450/550 nm
Testempfindlichkeit	3,0 ng/ml	6,0 pg/ml	3,5 pg/ml	3,0 pg/ml	22 pg/ml

Tabelle 8 ELISA-Protokoll: Dargestellt sind die Assay-spezifischen Unterschiede in der Versuchsdurchführung des ELISA.

Nach Auflösen der Standards in lyophilisiertem Standard/Probenpuffer wurden ein unter 3.1.1 bzw. 3.2.2 gewonnenes Aliquots der Plasmaprobe unter Raumtemperatur aufgetaut und gemäß Herstellerangaben in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit einem Standard/Probenpuffer diluiert (zum Beispiel: Dilutionsgrad 1:100 entsprechend 10µl Plasmaprobe in 990 µl vorgelegtem Puffer) und sorgfältig maschinell gemischt. Zuerst wurden Standards, Leerwert und die Proben in die Kavitäten pipettiert. Nach einer ersten Inkubation auf dem Schüttelinkubator bei 400 rpm erfolgten mehrere Waschschriffe, um die nicht gebundenen Substanzen zu entfernen. Nun wurde ein an die Peroxidase gebundener polyklonaler Antikörper gegen das zu bestimmende Zytokin zugegeben. Im Anschluss einer weiteren Inkubation auf dem Schüttler wurde das nicht gebundene Antikörper-Enzym-Reagenz durch wiederholte Waschschriffe entfernt. Als Substratlösung wurde eine Peroxid-gepufferte Lösung mit dem gebundenen Farbstoff Tetramethylbenzidin hinzugegeben. Das Substrat wurde von der Peroxidase umgesetzt und bewirkte einen Farbumschlag. Die Farbreaktion wurde mit 2-molarer Salzsäure (bzw. 2-molarer Schwefelsäure bei IL1-ra) gestoppt und die Farbintensität photometrisch bestimmt. Dabei wurde versuchsbesteck-abhängig die optische Dichte (OD) bei $\lambda = 450$ nm bichromatisch am *Microplate Reader* (DigiScan, Fa. Asys Hitech, Eugendorf, Österreich) mit einer Referenzfilterwellenlänge von $\lambda = 650$ nm innerhalb von 10 min. bestimmt.

Mit der Computer-Software MikroWin 2000 Version 4.07 wurde anhand der Standardwerte eine Standardkurve mit in der Regel 5 log- Einheiten der Dilutionsreihe generiert, welche der doppelbestimmten Probenauswertung diene.

3.2 Phase 2 - Klinisch experimenteller Teil

3.2.1 Patienten

Nach Genehmigung der lokalen Ethikkommission (AZ: 282/01) wurde diese Studie von 12/2001 bis 06/2004 an der Chirurgischen Klinik und Poliklinik-Innenstadt, Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München, durchgeführt. Es wurden im Rahmen dieser prospektiven Arbeit alle Patienten eingeschlossen, welche initial vom Notarzt der Besatzung „Florian 1/70/1“ München behandelt wurden und folgende Kriterien erfüllten:

Einschlusskriterien:

- Präklinisches Vorliegen eines funktionellen Herz- Kreislaufstillstands mit Notwendigkeit einer kardiopulmonalen Reanimation und primärem Wiedererlangen eines Spontankreislaufs (*return of spontaneous circulation* – ROSC)
- Gewinnung der ersten Blutprobe nach ROSC 30 Minuten.
- Alter: 18 Jahre

Ausschlusskriterien:

- Strafgefangene, Schwangere und Patienten mit bekannter gesetzlicher Betreuung
- Schwere traumatische Mehrfachverletzungen im Sinne eines „Polytrauma“
- Patienten, welche innerhalb der ersten 48 h nach ROSC an Ihrer Grund- bzw. Folgeerkrankung verstarben
- Ablehnung der Studienteilnahme durch den Patienten oder deren Angehörige

Von allen Patienten wurde nach mündlicher und schriftlicher Aufklärung möglichst noch während der Beobachtungsdauer eine niedergelegte Einverständniserklärung eingeholt. Da aufgrund der klinischen Situation (Bewusstlosigkeit, Intubation, Schmerzmittel etc.) das Einverständnis oftmals nicht initial erteilt werden konnte, wurde die Zustimmung des Patienten zeitnah nach Wiedererlangen der kognitiven und selbstbestimmenden Fähigkeiten eingeholt. Falls dies nicht möglich war, konnte das Einverständnis der unmittelbaren Angehörigen nach Aufklärung erwirkt werden.

Die Dokumentation des klinischen Verlaufs, der laborchemischen Parameter, sowie des therapeutischen Regimes erfolgte täglich fortlaufend über die gesamte Beobachtungsphase. Um das postinterventionelle Organversagen quantitativ erfassen zu können, wurden zu jedem Blutabnahmezeitpunkt zusätzliche Parameter zur Berechnung des MOF-Scores nach Goris in der Modifikation nach Lefering dokumentiert [118].

3.2.2 Probengewinnung

Die Blutentnahmen erfolgten direkt nach Wiedererlangen eines Spontankreislaufs über einen zu initial therapeutischen Zwecken peripher etablierten Venenzugang durch den erstversorgenden Notarzt (wenn medizinisch vertretbar, jedoch max. 30 min. nach ROSC), sowie anschließend seriell nach 6h, 12h, 24h, 48h und 72h aus einem arteriellen oder zentralvenösen Zugang auf der behandelnden Intensivtherapiestation. Bei jeder Blutentnahme wurden je 2 x 2,5 ml in PAXgene[®] blood RNA tubes, 2 x 4 ml in Natrium-Citrat-Vacutainern[®] sowie 1 x 4 ml im EDTA-Vacutainer[®] Blut entnommen.

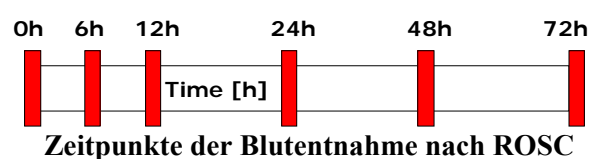


Abbildung 6 Zeitachse der seriellen Blutabnahmen

3.2.3 Intrazelluläre Zytokinexpression mittels Vollblutmedium (PAXgene®)

A Weiterverarbeitung der Proben

Die gewonnenen Blutproben wurden in identischem Modus wie bei der Kontrollgruppe prozessiert und unmittelbar im Anschluss weiterverarbeitet. Das entnommene EDTA-Blut wurde umgehend zur Bestimmung eines Differentialblutbildes dem Labor zugeführt.

B Protokollmodifikation (shredder)

Da die methodische Umsetzung aus der Expertise am klinisch- und laborchemisch gesunden Probanden erfolgte, wurde erst bei den ersten Patientenproben ein prozedurales Problem offenbar: Bei vorliegender Leukozytose ($16 \times 10^3/\text{ml}$ im EDTA-Blut) konnte nach Proteinverdau kein geeigneter (RNA-haltiger) Präzipitations-Überstand aufgrund einer generalisierten, das gesamte Volumen ausfüllenden Pelletbildung generiert werden (siehe 3.1.2.B.).

Nach direkter Rücksprache mit dem Hersteller wurde das QIAshredder® Set zur mechanischen Pelletzerkleinerung mit anschließendem DNA-Verdau (RNase-free DNase Set, beides Fa. Qiagen, Hilden) zum Ausschluss genomischer DNA-Kontamination bei sämtlichen Patientenproben streng nach Herstellerangaben implementiert.

3.2.4 Systemische Zytokinkonzentration (ELISA) aus Patientenproben

Nach Zentrifugation der Natrium-Citrat Röhrchen (Analog der Kontrollgruppe, siehe 3.1.1) wurde der Serumüberstand abpipettiert, aliquotiert und umgehend bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur Messung gelagert. Die Analyse gestaltete sich identisch zur Kontrollgruppe am Probanden (siehe 3.1.3).

3.2.5 Statistische Auswertung

Die ermittelten Messwerte der qRT-PCR wurden als „Kopienzahl / μl cDNA“ (entsprechend 50 ng umgeschriebener mRNA) als Mittelwert aus der durchgeführten Doppelbestimmung als Rohdaten erfasst. Patientendaten wurden auf die jeweilige zeitgleich vorliegende Expression des *Housekeeping*-Gens HPRT, beziehungsweise GAPDH als dimensionslose Ratio normiert. Zum gleichen Blutentnahmezeitpunkt mitbestimmte Serum-Zytokin-Konzentrationen wurden als Mittelwert der durchgeführten Doppelbestimmung in ng / ml beziehungsweise pg / ml als Rohdaten erfasst. Beide Rohdaten wurden pro Beobachtungszeitpunkt für die Patienten gemittelt und als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes graphisch aufgetragen. Um Gruppenunterschiede zu detektieren, wurden die Daten mittels ANOVA (*Analysis of Variance*) *on ranks* für nicht-verbundene Stichproben nach Kruskal-Wallis, gefolgt von Dunn's test als post-hoc Verfahren analysiert. Zur Analyse eines eventuell signifikanten, zeitlichen Verlaufs wurde eine Varianzanalyse für verbundene Stichproben (ANOVA), gefolgt von der *Student-Neumann Keuls* Testmethode gewählt. Das Signifikanzniveau wurde mit $p < 0,05$ festgesetzt um somit Gruppen- oder Verlaufsunterschiede als signifikant zu bezeichnen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit (p) weniger als 5 % beträgt.

Als statistische Software wurde Sigma Stat 2.0 (SPSS Inc., USA) verwendet.

4. Ergebnisse

4.1 Phase 1 - Validierung des experimentellen Protokolls

4.1.1 Probanden

Es konnten für die jeweiligen Fragestellungen und Teil-Fragestellungen insgesamt 18 gesunde Probanden (8 Frauen, 10 Männer) mit einem durchschnittlichen Alter von 30 ± 4 Jahren rekrutiert werden, welche sich nach Aufklärung und Einwilligung für eine freiwillige Blutentnahme im Hinblick auf die Validationsexperimente zur Verfügung stellten.

4.1.2 Intrazelluläre Zytokinexpression

A Zellseparation vs. Vollblutmedium

Zunächst wurden Kontrollexperimente an 6 Probanden zum Methodenvergleich zwischen dem PAXgene[®]-Vollblutmedium und immunkompetenten, zuvor separierten Monozyten und Granulozyten durchgeführt. Zur Detektion der zu erwartenden Expressionsunterschiede mit eventuell vorhandenen tageszeitlichen Schwankungen wurde ein direkter Vergleich zwischen den Analysaten gewählt. **Abbildung 7** zeigt am Beispiel des *Housekeeping*-Gens HPRT eine vermehrt morgendliche, stabile Expression, welche sich sowohl im Vollblutmedium, als auch in den Zellentitäten reproduzierbar nachweisen läßt. Das Expressionsniveau ist hierbei für beide Zeitpunkte in CD₁₄-positiven Monozyten deutlich höher (4356 vs. 3663 Kopien \pm SEM) als in CD₁₅-positiven Granulozyten (1972 vs. 1262 Kopien \pm SEM) und überwiegt somit relativ dem Vollblutmedium (940 vs. 702 Kopien \pm SEM).

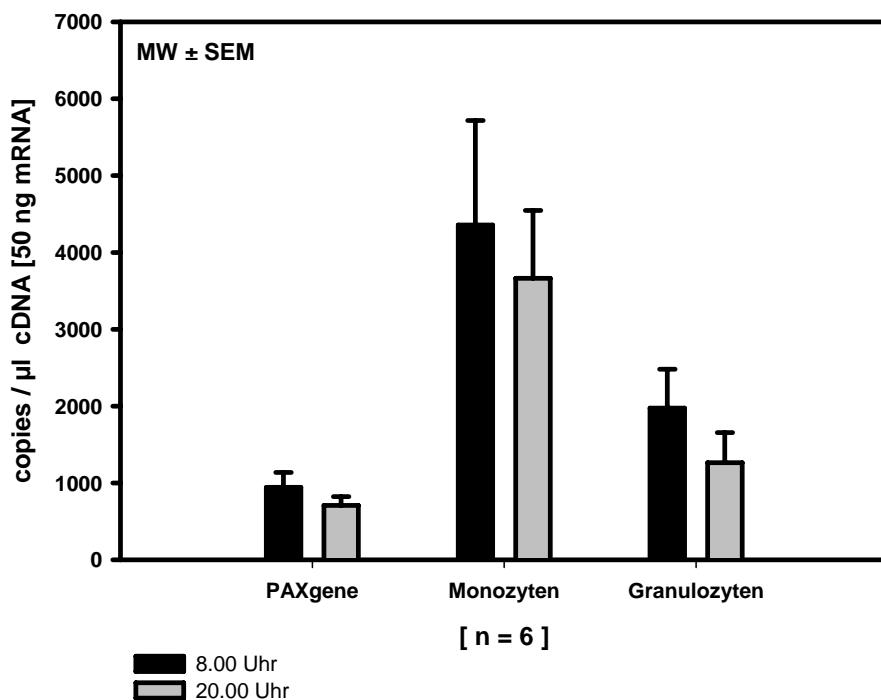


Abbildung 7: Intrazelluläre Expression von HPRT: Auf der Y-Achse aufgetragen die ermittelten Kopienzahlen des exemplarisch dargestellten Housekeeping-Gens HPRT in Relation zur eingesetzten Menge cDNA, bezogen auf das Analysat (PAXgene®-Vollblutmedium, bzw. isolierte, immunkompetente Leukozyten-Subpopulationen), jeweils in der morgendlichen bzw. abendlichen Blutentnahme.

B Stimulationsbedingungen

Um die Reliabilität beider Meßsysteme zu überprüfen, liegt es auf der Hand, auch unter *in-vitro* Stimulations- und Inhibitionsbedingungen systematische Analysen durchzuführen und prozedurale Grenzbereiche auszuloten. Dazu wurden die Messmedien mitsamt Probanden-Blutproben hinsichtlich ihres Expressionsverhaltens unter internen (Stimulation) und externen (übliche Präparation) Störgrößen mittels des interkalierenden Inhibitors Actinomycin D und Lipopolysaccharid gegeneinander aufgetragen.

Abbildung 8 zeigt die Expressionsniveaus von TNF- α aus separierten, CD₁₄-positiven Monozyten. Zu erkennen ist im Vergleich zu Nativproben ein reduziertes Niveau nach sofortiger Actinomycin D- Zugabe ($866 \pm \text{SEM}$ vs. $255 \pm \text{SEM}$ Kopien/ μl cDNA), wohingegen nach LPS-Stimulation ein deutlich erhöhtes Niveau zu erkennen ist ($22240 \pm \text{SEM}$ Kopien/ μl cDNA). Nach initialer Zugabe von Actinomycin D kann ein derartiges Niveau durch LPS-Stimulation nicht mehr erreicht werden ($855 \pm \text{SEM}$ Kopien/ μl cDNA). Ein qualitativ gleiches Phänomen bei isolierten CD₁₅-positiven Granulozyten illustriert **Abbildung 9**: Nach initialer Hemmung durch Actinomycin D läßt sich ebenso ein geringeres intrazelluläres Niveau des proinflammatorischen TNF- α erzielen, als in Nativproben (586 vs. 2204 Kopien/ μl cDNA \pm SEM). Auch hier stellt LPS einen starken Stimulus dar, welcher sich durch Vorbehandlung mit Actinomycin D stark unterdrücken läßt (36087 vs. 6982 Kopien/ μl cDNA \pm SEM).

Intrazelluläre TNF- α Expression in Monozyten unter Stimulationsbedingungen

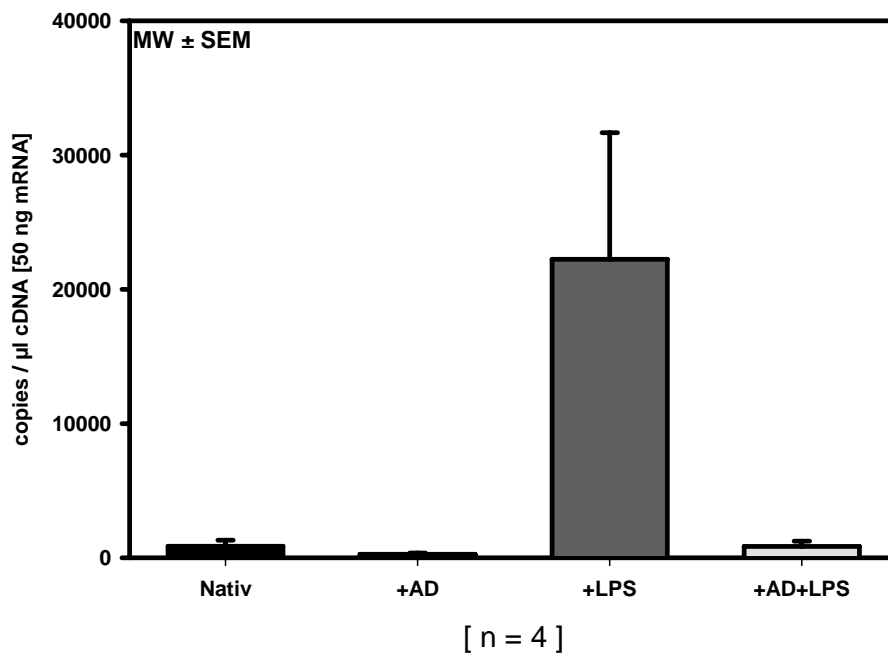
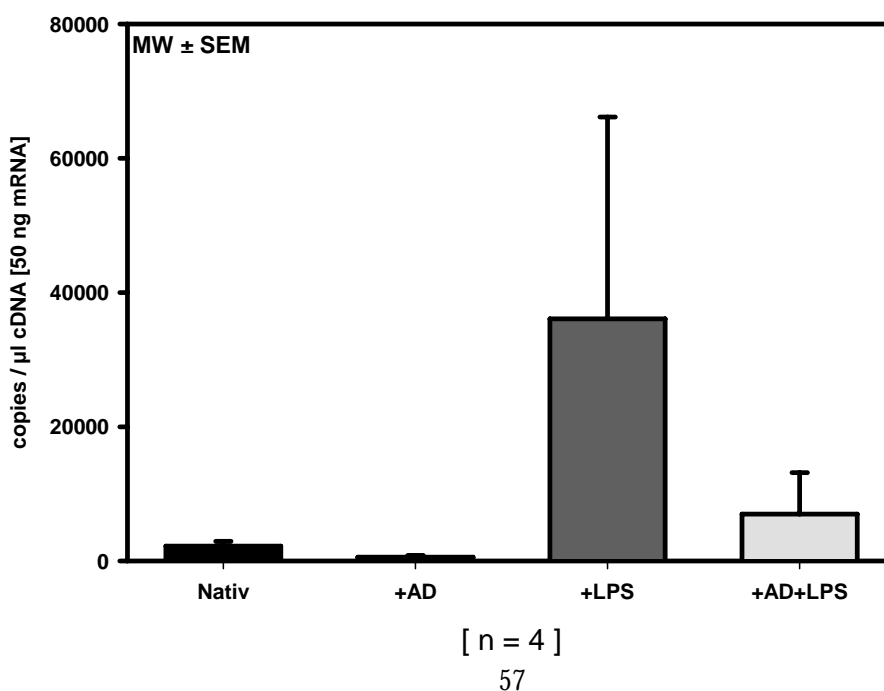


Abbildung 8 und 9: Intrazelluläre Expression in Monozyten unter Stimulationsbedingungen: Auf der Y-Achse aufgetragen die ermittelten Kopienzahlen vom exemplarisch dargestellten proinflammatorischen TNF- in Relation zur eingesetzten Menge cDNA, bezogen auf das Stimulationsmodell. **Abbildung 8 (oben)** zeigt intrazellulären Expressionsniveaus aus separierten CD₁₄-positiven Monozyten, **Abbildung 9 (unten)** illustriert das Verhalten aus separierten CD₁₅-positiven Granulozyten.

Intrazelluläre TNF- α Expression in Granulozyten unter Stimulationsbedingungen



Auch im PAXgene®-Vollblutmedium ist der Einfluß einer in-vitro Stimulation mittels LPS nachvollziehbar: **Abbildung 10** zeigt im gleichen Modell eine Zunahme der TNF-Expression im Vergleich zum unbehandelten (nativen) Probandenblut (55 vs. 3908 Kopien/ μ l cDNA \pm SEM).

Initial mit Actinomycin D inhibiertes EDTA-Vollblut weist nach LPS-Inkubation ein deutlich geringeres Niveau auf (127 Kopien/ μ l cDNA \pm SEM).

Intrazelluläre TNF- α Expression im PAXgene- Medium unter Stimulationsbedingungen

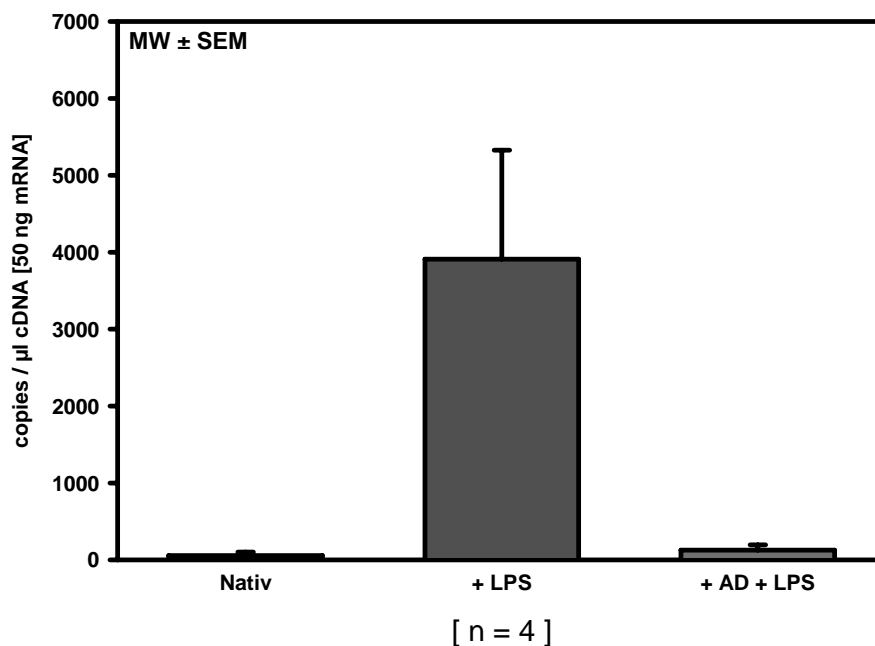


Abbildung 10: Intrazelluläre Expression im PAXgene® Vollblutmedium unter Stimulationsbedingungen: Auf der Y-Achse aufgetragen die ermittelten Kopienzahlen vom exemplarisch dargestellten proinflammatorischen TNF- in Relation zur eingesetzten Menge cDNA, bezogen auf das Stimulationsmodell. Stimuliertes EDTA-Vollblut wurde nach Inkubation zugespritzt und als PAXgene® Medium weiterprozessiert.

C Normierungsmethoden / Housekeeping-Gene

Zur Interpretation des intrazellulär bestimmten Zielgen-Signals wurden zur notwendigen Normierung die *Housekeeping*-Gene Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT), Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), Porphobilinogen-Desaminase (PBGD), Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G-6 PDH), sowie β -Actin auch unter Stimulationsbedingungen mitbestimmt. Optimalerweise sollten sie konstante, durch exogene Einflüsse nicht beeinflussbare Expressionsmuster aufzeigen. Auch hierbei erschien der etablierte, zuvor beschriebene Stimulationsversuch als Auswahlkriterium zielführend. Abweichend vom obigen Modell wurde im Hinblick auf die klinische Phase ausschließlich das Expressionsverhalten im Vollblut-PAXgene[®] Medium evaluiert. (**Abbildung 11**)

HPRT zeigte hierbei unter LPS-Stress einen Niveauabfall, welcher sich durch vorherige Actinomycin D Inhibition relativieren ließ (173 vs. 85 vs. 119 Kopien / μ l cDNA \pm SEM). Bei G-6 PDH stellen wir qualitativ ein ähnliches Verhalten fest, wenn auch mit größerem Standardfehler vom Mittelwert und insgesamt größeren Kopienzahlen (903 vs. 643 vs. 867 Kopien / μ l cDNA \pm SEM). PBGD wies einen Niveauabfall unter LPS-Stress auf, welcher sich unter Actinomycin D Inhibition noch verstärkte (249 vs. 135 vs. 70 Kopien / μ l cDNA \pm SEM).

Demgegenüber zeigte GAPDH sowie β -Actin einen sehr viel höheren Wertebereich des erzielten Zielgen-Signals, weshalb sie in einem gesonderten Ordinatensystem (**Abbildung 12**) quantitativ dargestellt werden sollen: Abweichend vom Vergleich mit anderen *Housekeeping*-Genen zeigt sich bei GAPDH unter LPS-Stress eine Erhöhung des Niveaus, welches sich durch Actinomycin D unterhalb des Ausgangswerts relativieren läßt (25511 vs. 28252 vs. 14748 Kopien / μ l cDNA \pm SEM). β -Actin weist den mit Abstand größten Wertebereich auf und zeigt unter LPS-Stress einen Niveauabfall, welcher nach vorheriger Actinomycin D-Blockade in seiner Ausprägung zunimmt (96383 vs. 88987 vs. 62807 Kopien / μ l cDNA \pm SEM).

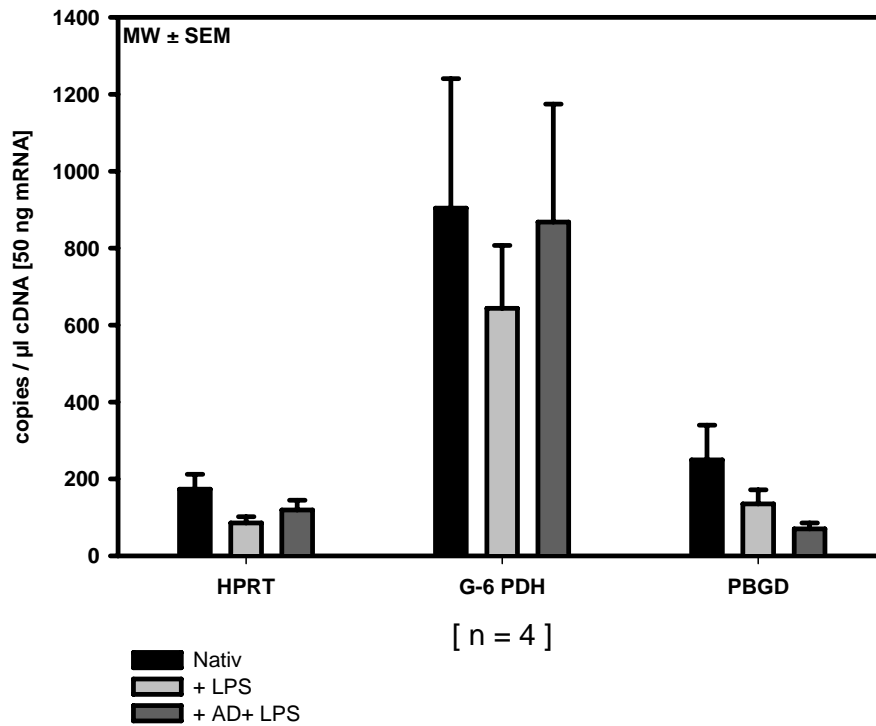
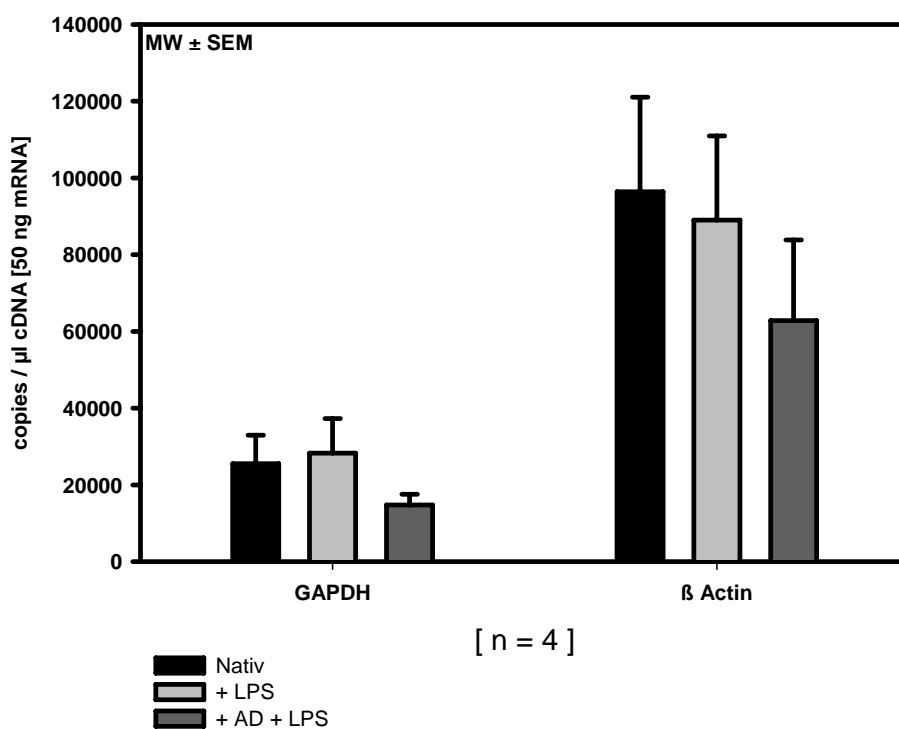


Abbildung 11 und 12: Intrazelluläre Expression ausgesuchter Housekeeping-Gene im PAXgene® Vollblutmedium unter Stimulationsbedingungen: (Abb. 11 OBEN: Parameter HPRT, G-6 PDH, PBGD; Abb. 12 UNTEN: Parameter GAPDH und β -Actin; getrennte Darstellung um dem Parameter-individuellen Wertebereich gerecht zu werden). Auf der Y-Achse aufgetragen die ermittelten Kopienzahlen der dargestellten *Housekeeping*-Gene in Relation zur eingesetzten Menge cDNA, bezogen auf das Stimulationsmodell. Stimuliertes bzw. zuvor inhibiertes und anschließend stimuliertes ETDA-Vollblut (siehe 3.1.2.F) wurde nach Inkubation dem PAXgene® Medium zugespritzt und nach 3.1.2.B weiterprozessiert.



4.1.3 ELISA

Am Kontrollkollektiv (n = 6) wurden Serumproben für die Etablierung des Experiments mittels ELISA zum Nachweis zirkulierender Zytokine auch im Hinblick auf die Anwendbarkeit in der klinischen Phase durchgeführt. **Abbildung 13** zeigt die ermittelten Konzentrationen für TNF- α , PMN-Elastase, IL-8, IL-10 und IL1-ra, welche als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts auch als Kontrolle zu den ermittelten Serumkonzentrationen am Patienten Eingang finden. Die in der Doppelbestimmung generierten Ergebnisse (siehe 3.1.3) decken sich dabei mit den von den Herstellern der Testbestecke angegebenen, zu erwartenden Konzentrationen an externen Kontrollprobanden. Somit kann auch in diesem etablierten *Set-up* von einer ausreichenden Paralleltest-Reliabilität ausgegangen werden.

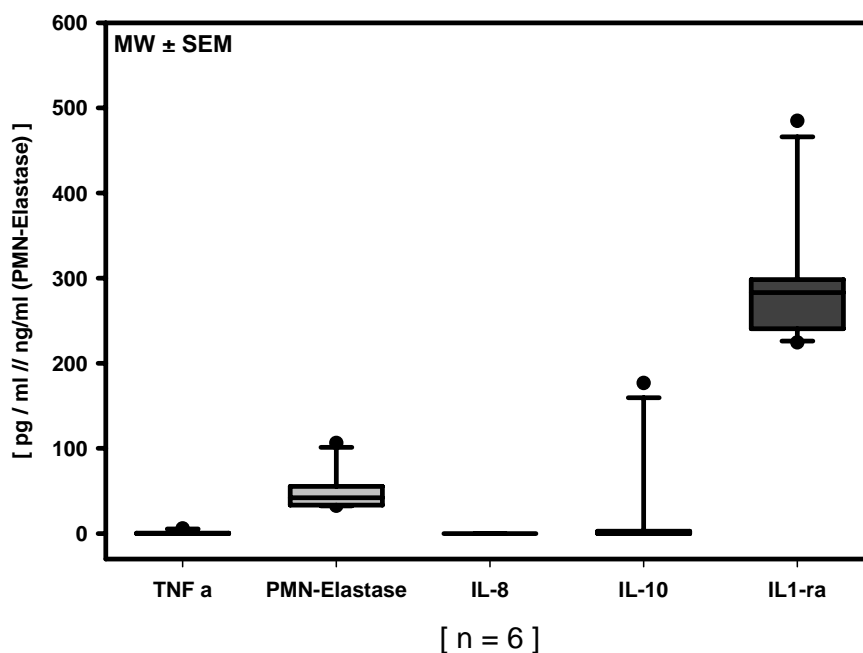


Abbildung 13: Systemische Zytokin-Konzentrationen in Serumproben gesunder Probanden: auf der Y-Achse aufgetragen ist die Konzentration der analysierten pro- und antiinflammatorischen Zytokine in pg/ml, [lediglich für PMN-Elastase gilt die Messgröße: ng/ml]. Die Analyte wurden für jeden gesunden Probanden an einem Abnahmezeitpunkt (jeweils morgens 8.00 Uhr) generiert und die Ergebnisse als Mittelwert einer Doppelbestimmung (siehe 3.1.3) in der Box-Plot-Darstellung zusammengefasst.

4.2 Phase 2 - Klinisch experimenteller Teil

4.2.1 Patienten

Es wurden 15 Patienten (13 männliche, 2 weibliche) gemäß der definierten Einschlusskriterien eingeschlossen. Das mittlere Alter aller Patienten betrug 61 Jahre (\pm SD = 16 Jahre). Die Reanimationsdauer variierte zwischen 5 und 40 Minuten (16 ± 9 min.). 9 Patienten überlebten den Beobachtungszeitraum (Krankenhausaufenthalt bis zur Verlegung oder Entlassung), wohingegen 6 Patienten im klinischen Verlauf verstarben. In **Tabelle 9** sind die zugrunde liegenden Erkrankungen der kardiopulmonal reanimationspflichtigen Patienten sowie den übrigen epidemiologischen Daten zusammengefasst.

Tabelle 9: Patientenkollektiv: n = 15, Männlich: 13, Weiblich: 2

Pat. ID	Initialen	Initiale Grunderkrankung	Alter	Geschlecht	Outcome	CPR-Dauer
I	H.,E.	Alkoholabusus, respiratorische Insuffizienz bei Hypothermie und Hyperkapnie, Asystolie	62	m	Überlebt, Selbstentlassung aus Klinik	5 Min.
II	B.,H.	Kammerflimmern bei Myokardinfarkt	75	m	Überlebt	5 Min.
III	B.,A.	Asystolie bei infektazerbierter COPD und respiratorischer Insuffizienz Hypoxie	63	m	Verstorben am 4. Behandlungstag	25 Min.
IV	D.,T.	i.v. Drogenmischintoxikation Aspiration, Brady-Asystolie	32	m	Verstorben, Hirntod	10 Min.
V	F.,T.	Schweres isoliertes Thorax-Einklemm-Trauma, Hypoxie, Asystolie	34	m	Überlebt, in Rehabilitation	15 Min.
VI	G.,K.	Myokardinfarkt Kammerflimmern	61	m	Überlebt, in Rehabilitation	10 Min.
VII	M.,H.	Asystolie bei Myokardinfarkt	86	m	vor 3. Behandlungstag verstorben	17 Min.
VIII	G.,N.	Kammerflimmern, Hinterwandinfarkt	56	m	Überlebt in Rehabilitation	25 Min.
IX	K.,G.	Kammerflimmern, Myokardinfarkt	45	m	Überlebt, in Rehabilitation	2 x 10 Min.
X	B.,D.	Asystolie bei Myokardinfarkt	44	m	Überlebt, in Rehabilitation	10 Min.
XI	V.,L.	Bekannte Kardiomyopathie Kammerflimmern	70	m	Verstorben nach 3. Behandlungstag	10 Min.
XII	H.,W.	Vorbekannte KHK, Z.n. Myokardinfarkt, Re- Infarkt, Asystolie	76	m	Verstorben nach 3. Behandlungstag	20 Min.
XIII	K.,C.	Myokardinfarkt, Kammerflimmern	76	w	Überlebt, cerebrale Hypoxie	20 Min.
XIV	S.,A.	Asystolie bei Myokardinfarkt	66	m	Überlebt, in Rehabilitation	10 Min.
XV	B.,M.	Asystolie, fulminante Lungenembolie	72	w	Verstorben nach 72 h	40 Min.

4.2.2 Intrazelluläre Zytokinexpression und systemische Zytokinkonzentration

A Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)

Die intrazelluläre Expression von TNF- α normiert auf HPRT im Messzeitraum zeigt einen biphasischen Verlauf mit einem Maximum zwischen 6h und 12h nach kardiopulmonaler Reanimation. Dies wird insbesondere für die verstorbene Subgruppe deutlich (**Abbildung 14**).

TNF- α Zytokinexpression normiert auf HPRT

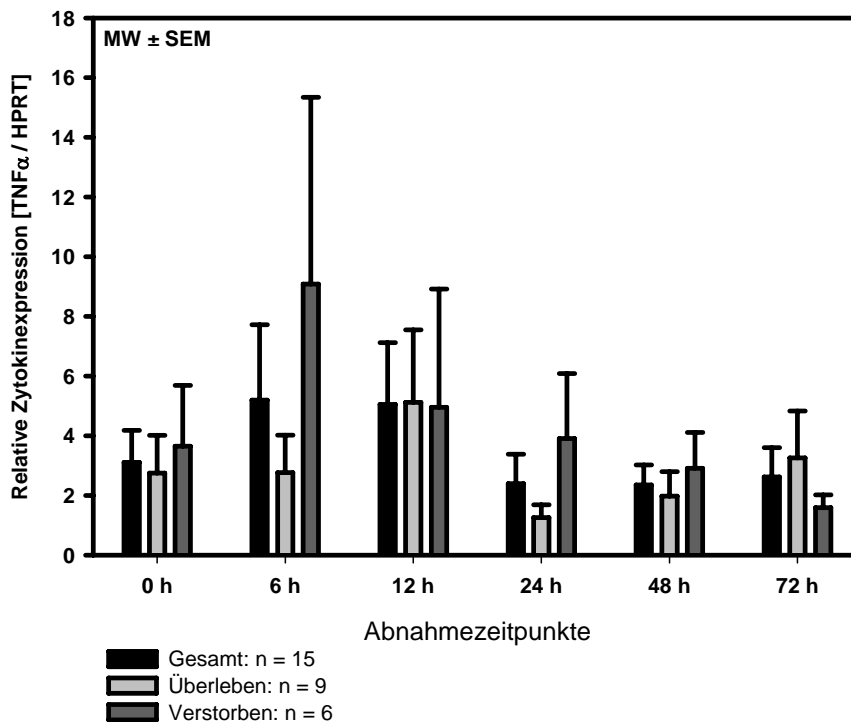


Abbildung 14: Relative intrazelluläre Expression von TNF- α gegen HPRT: Auf der Y-Achse aufgetragen die relative, dimensionslose Zytokinexpression von TNF- α in Abhängigkeit zu den Abnahmezeitpunkten. Aufgetragen ist die Gesamtpatientenpopulation (n = 15), sowie die darin enthaltenden Subgruppen der überlebenden (n = 9) und verstorbenen Patienten (n = 6) als Mittelwertdarstellung mit Standardfehler vom Mittelwert (MW \pm SEM).

Normiert auf GAPDH hingegen (**Abbildung 15**) fällt das relative Niveau zum 6h Wert ab und steigt dann im übrigen Messzeitraum sowohl für die Gesamtgruppe, als auch für die beiden Subgruppen, leicht an. Beide normierten Verläufe verhalten sich jedoch lediglich deskriptiv ohne Signifikanz.

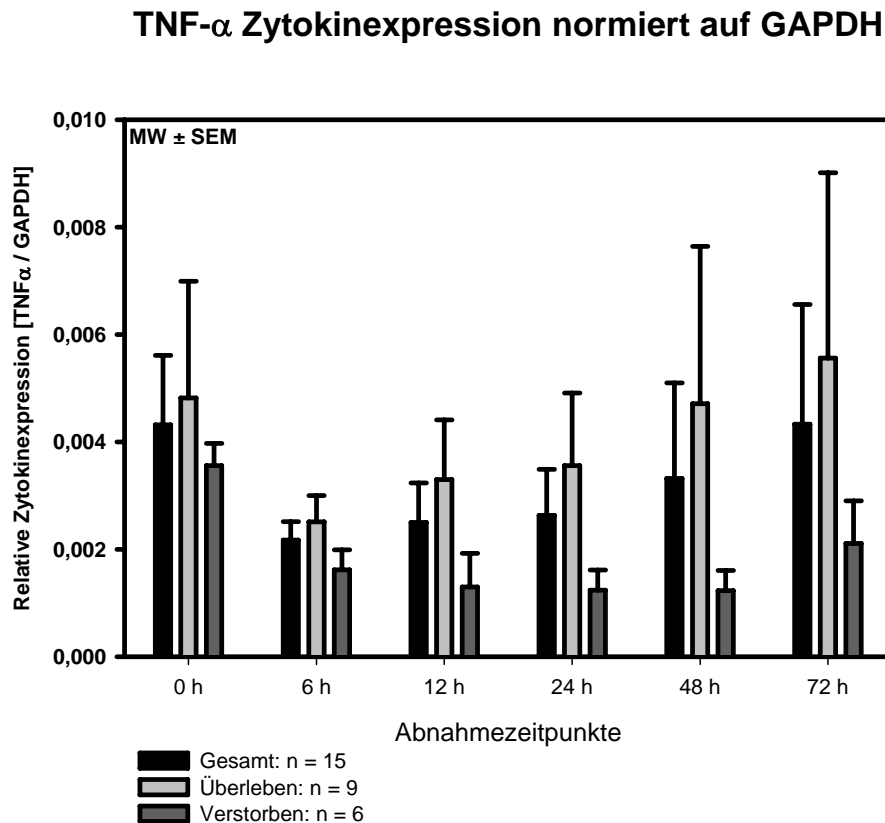


Abbildung 15: Relative intrazelluläre Expression von TNF- α gegen GAPDH: Auf der Y-Achse aufgetragen die relative, dimensionslose Zytokinexpression von TNF- α in Abhängigkeit zu den Abnahmezeitpunkten. Aufgetragen ist die Gesamtpatientenpopulation (n = 15), sowie die darin enthaltenden Subgruppen der überlebenden (n = 9) und verstorbenen Patienten (n = 6) als Mittelwertdarstellung mit Standardfehler vom Mittelwert (MW \pm SEM).

Im Vergleich der intrazellulären Daten mit den Serumkonzentrationen (ELISA, **Abbildung 16**) erhält man einen auf HPRT-normiert vergleichbaren Eindruck, mit Konzentrationsmaxima um 6h nach Ereignis. Auch hierbei handelt es sich sowohl im Beobachtungszeitraum, wie auch im direkten Vergleich mit der Kontrollgruppe um eine deskriptive Beobachtung ohne statistische Signifikanz.

TNF- α Serumkonzentrationen

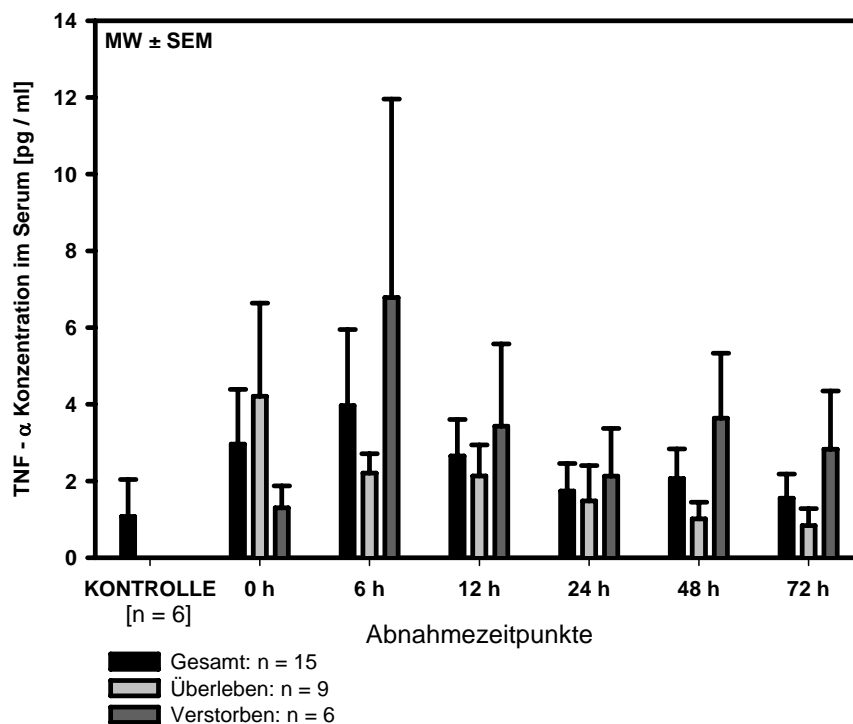


Abbildung 16: Systemische Zytokin-Konzentrationen von TNF- α : auf der Y-Achse aufgetragen ist die Konzentration des analysierten pro-inflammatorischen Zytokins in pg/ml in Abhängigkeit zu den Abnahmezeitpunkten. Ordinatenachse ist zum Vergleich die Kontrollgruppe aufgeführt (n = 6). Analog zum Vergleich mit den intrazellulären Daten ist folgend sowohl das Gesamtpatientenkollektiv (n = 15) wie auch die Subgruppen überlebenden Patienten (n = 9) und der verstorbenen Patienten (n = 6) aufgetragen. Ergebnisse als Mittelwert der Doppelbestimmungen je Messzeitpunkt \pm SEM. Der Verlauf ist qualitativ vergleichbar mit den intrazellulären Daten normiert auf HPRT (**Abbildung 14**).

B Interleukin 10 (IL-10)

Auf HPRT intern normiert zeigt sich bei IL-10 ein vom Initialwert (0h) ausgehender Anstieg der relativen Zytokinexpression für das gesamte Patientenkollektiv und die überlebende Subgruppe bis 12h nach Ereignis, gefolgt von einer relativen Niveauabnahme. Interessanterweise wird dieser Niveauanstieg von der verstorbenen Subgruppe erst zum 24h Zeitpunkt im Maximum erreicht (siehe **Abbildung 17**).

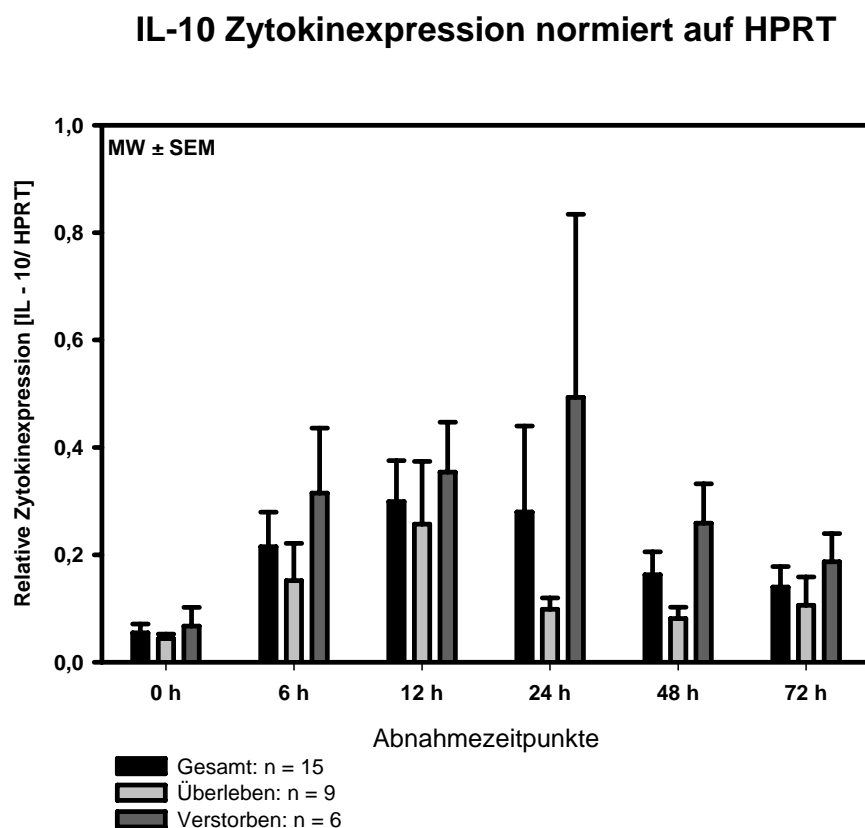


Abbildung 17: Relative intrazelluläre Expression von IL-10 gegen HPRT: Auf der Y-Achse aufgetragen die relative, dimensionslose Zytokinexpression von IL-10 in Abhängigkeit zu den Abnahmezeitpunkten. Aufgetragen ist die Gesamtpatientenpopulation (n = 15), sowie die darin enthaltenden Subgruppen der überlebenden (n = 9) und verstorbenen Patienten (n = 6) als Mittelwertdarstellung mit Standardfehler vom Mittelwert (MW ± SEM).

Eine Normierung von IL-10 auf GAPDH (**Abbildung 18**) zeigt im Vergleich zu den auf HPRT normierten Werten einen Anstieg der dimensionslosen Ratio bis einem Maximalwert bei 24h nach Ereignis, um so ausgeprägter für die überlebende Subgruppe. Bemerkenswert erscheint hierbei auch der mathematisch geringe Wertebereich ($X \times 10^{-4}$) für die ermittelten Ratios, bedingt durch relativ geringe absolute Kopienzahlen für IL-10 und relativ hohe Kopienzahlen für GAPDH.

IL-10 Zytokinexpression normiert auf GAPDH

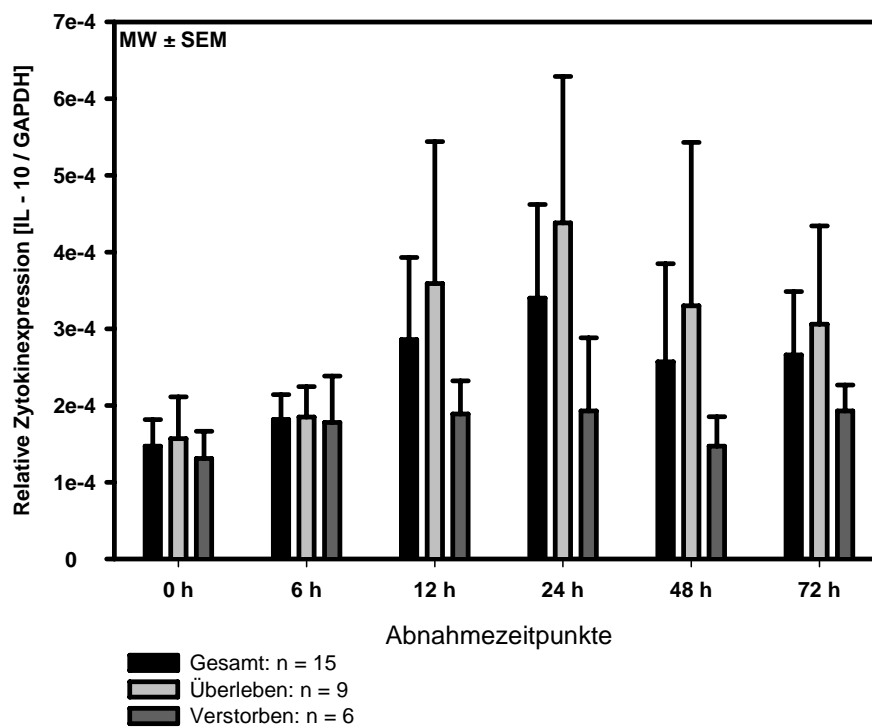


Abbildung 18: Relative intrazelluläre Expression von IL-10 gegen GAPDH: Auf der Y-Achse aufgetragen die relative, dimensionslose Zytokinexpression von IL-10 in Abhängigkeit zu den Abnahmezeitpunkten. Aufgetragen ist die Gesamtpatientenpopulation (n = 15), sowie die darin enthaltenden Subgruppen der überlebenden (n = 9) und verstorbenen Patienten (n = 6) als Mittelwertdarstellung mit Standardfehler vom Mittelwert (MW ± SEM).

Die Serumanalyse für IL-10 zeigt ein Konzentrationsmaximum im Initialwert (0h), sowohl für das gesamte Patientenkollektiv ($226 \text{ pg / ml} \pm \text{SEM}$), als auch für die überlebende Subgruppe ($345 \text{ pg / ml} \pm \text{SEM}$) (**Abbildung 19**).

Von der verstorbenen Subgruppe wird ein Konzentrationsmaximum ($468 \text{ pg / ml} \pm \text{SEM}$) erst nach 6h erreicht, gefolgt von einer kontinuierlich fortschreitenden Konzentrationsabnahme über den gesamten Messzeitraum. Weder für die intrazellulären Daten (normiert auf HPRT oder GAPDH), als auch für die Serumkonzentrationen (ELISA) besteht keine statistische Signifikanz. Ein deskriptiver Zusammenhang der normierten intrazellulären Expressionsmuster und den zirkulierenden Serumkonzentrationen lässt sich nicht erkennen.

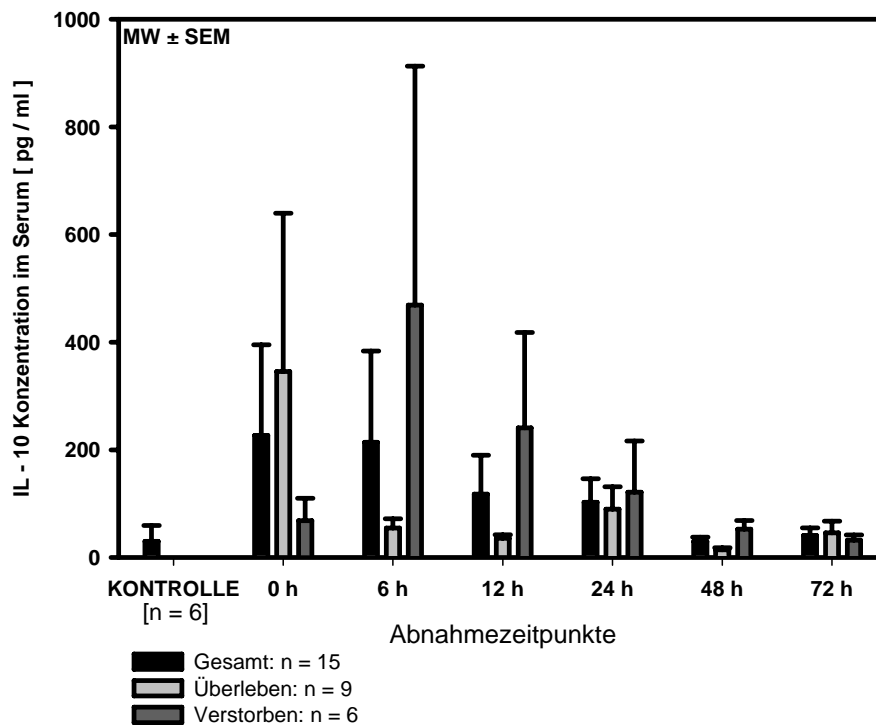


Abbildung 19: Systemische Zytokin-Konzentrationen von IL-10: auf der Y-Achse aufgetragen ist die Konzentration des analysierten anti-inflammatorischen Zytokins in pg/ml in Abhängigkeit zu den Abnahmezeitpunkten. Ordinatenachse ist zum Vergleich die Kontrollgruppe aufgeführt (n = 6). Analog zum Vergleich mit den intrazellulären Daten ist folgend sowohl das Gesamtpatientenkollektiv (n = 15) wie auch die Subgruppen der überlebenden Patienten (n = 9) und der verstorbenen Patienten (n = 6) aufgetragen. Ergebnisse als Mittelwert der Doppelbestimmungen je Messzeitpunkt \pm SEM.

C Interleukin 1 Rezeptorantagonist (IL1-ra)

Bezüglich der auf HPRT normierten Zytokinexpression (**Abbildung 20**) von IL1-ra zeigt sich 6h und 12h nach Ereignis ein zum Ausgangswert (0h) signifikant erhöhtes Niveau in der Gesamtpatientengruppe (Ratio IL1-ra/ HPRT: 194 und 204 vs. $30 \pm \text{SEM}$). Ein weiterer, ebenfalls zum Ausgangswert signifikanter, relativer Expressionsanstieg besteht nach 48h (Ratio IL1-ra/ HPRT: $197 \pm \text{SEM}$). Einen qualitativ gleichen, wenn auch nicht signifikanten Verlauf zeigt die überlebende Subgruppe. Das relative Expressionsmaximum für die verstorbene Subgruppe wird erst nach 24h erreicht.

IL1-ra Zytokinexpression normiert auf HPRT

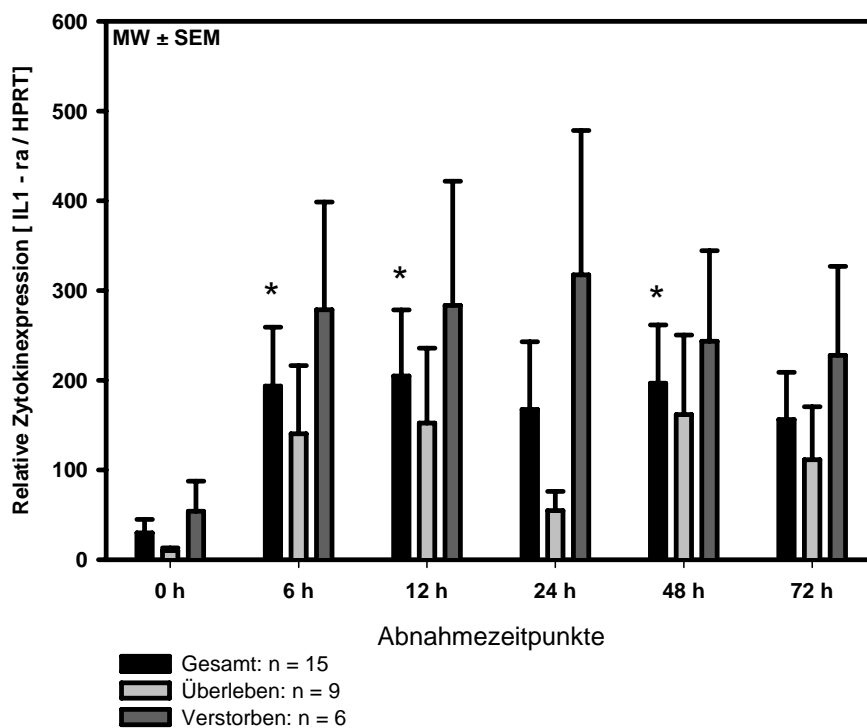


Abbildung 20: Relative intrazelluläre Expression von IL1-ra gegen HPRT: Auf der Y-Achse aufgetragen die relative, dimensionslose Zytokinexpression von IL1-ra in Abhängigkeit zu den Abnahmezeitpunkten. Aufgetragen ist die Gesamtpatientenpopulation (n = 15), sowie die darin enthaltenden Subgruppen der überlebenden (n = 9) und verstorbenen Patienten (n = 6) als Mittelwertdarstellung mit Standardfehler vom Mittelwert (MW \pm SEM). 6, 12 und 48 h ist das relative Expressionsniveau signifikant gegenüber dem Ausgangswert erhöht. * = $p < 0,05$

IL1-ra normiertes, intrazelluläres Expressionsverhalten auf GAPDH zeigt dagegen ein vom Ausgangswert (0h) bis 24h nach Ereignis ansteigendes relatives Verhalten (**Abbildung 21**). Lediglich zwischen den beiden Subgruppen zeigt der Vergleich eine ab des 24h Wertes deutliche, jedoch nicht statistisch signifikante Mehrexpression der Ratio des verstorbenen Kollektivs bis zum 72h Wert (Ratio IL1-ra/ GAPDH: 0,05 vs. $0,2 \pm \text{SEM}$).

IL1-ra Zytokinexpression normiert auf GAPDH

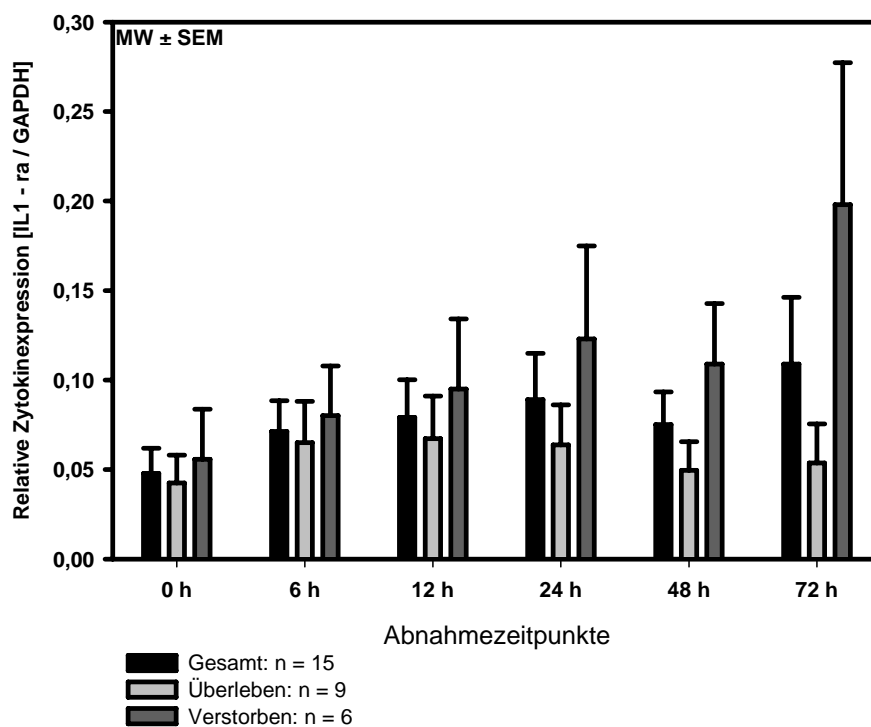


Abbildung 21: Relative intrazelluläre Expression von IL1-ra gegen GAPDH: Auf der Y-Achse aufgetragen die relative, dimensionslose Zytokinexpression von IL1-ra in Abhängigkeit zu den Abnahmezeitpunkten. Aufgetragen ist die Gesamtpatientenpopulation (n = 15), sowie die darin enthaltenden Subgruppen der überlebenden (n = 9) und verstorbenen Patienten (n = 6) als Mittelwertdarstellung mit Standardfehler vom Mittelwert ($\text{MW} \pm \text{SEM}$). Divergierende relative Expression zwischen überlebender und versterbender Subgruppe im zeitlichen Verlauf bis 72h.

Vergleichend mit der Serumanalyse für IL1-ra (**Abbildung 22**) wird ein zur Kontrollgruppe statistisch signifikanter Konzentrationsanstieg mit Maximalwerten 6h nach Ereignis deutlich (6224 vs. 302 pg / ml \pm SEM), welcher im Beobachtungszeitraum stetig abnimmt, jedoch nach 72h immer noch vergleichend mit der Kontrollgruppe signifikant erhöht ist (1965 pg / ml \pm SEM).

IL1-ra Serumkonzentrationen

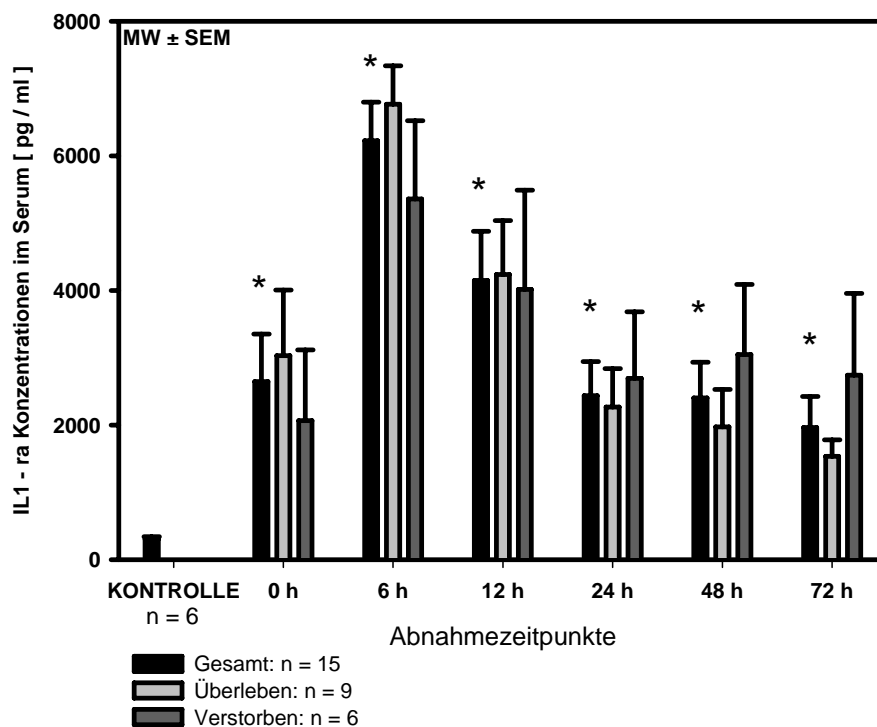


Abbildung 22: Systemische Zytokin-Konzentrationen von IL1-ra; auf der Y-Achse aufgetragen ist die Konzentration des analysierten anti-inflammatorischen Zytokins in pg/ml in Abhängigkeit zu den Abnahmezeitpunkten. Ordinatenachse ist zum Vergleich die Kontrollgruppe aufgeführt (n = 6). Analog zum Vergleich mit den intrazellulären Daten ist folgend sowohl das Gesamtpatientenkollektiv (n = 15) wie auch die Subgruppen der überlebenden (n = 9) und der verstorbenen Patienten (n = 6) aufgetragen. Ergebnisse als Mittelwert der Doppelbestimmungen je Messzeitpunkt \pm SEM. Signifikante Konzentrationserhöhung im Vergleich zur Kontrolle. * = p<0,05

D Interleukin-8 (IL-8)

Die auf HPRT normierte intrazelluläre Zytokinexpression von IL-8 zeigt eine vom Ausgangswert (0h) bis 6h leicht ansteigende Tendenz (**Abbildung 23**). Jenseits des 12h-Wertes sinkt das relative Niveau verglichen mit dem 0h Wert bis zur 72 Beobachtungsstunde (signifikant bei 48h und 72h, Ratio IL-8 / HPRT: 0,28 und 0,13 vs. $2,34 \pm \text{SEM}$). Werteminima werden von der überlebenden Subgruppe bereits 24h nach Ereignis erreicht, wohingegen die verstorbene Subgruppe ihr Werteminimum erst nach 72h erreicht.

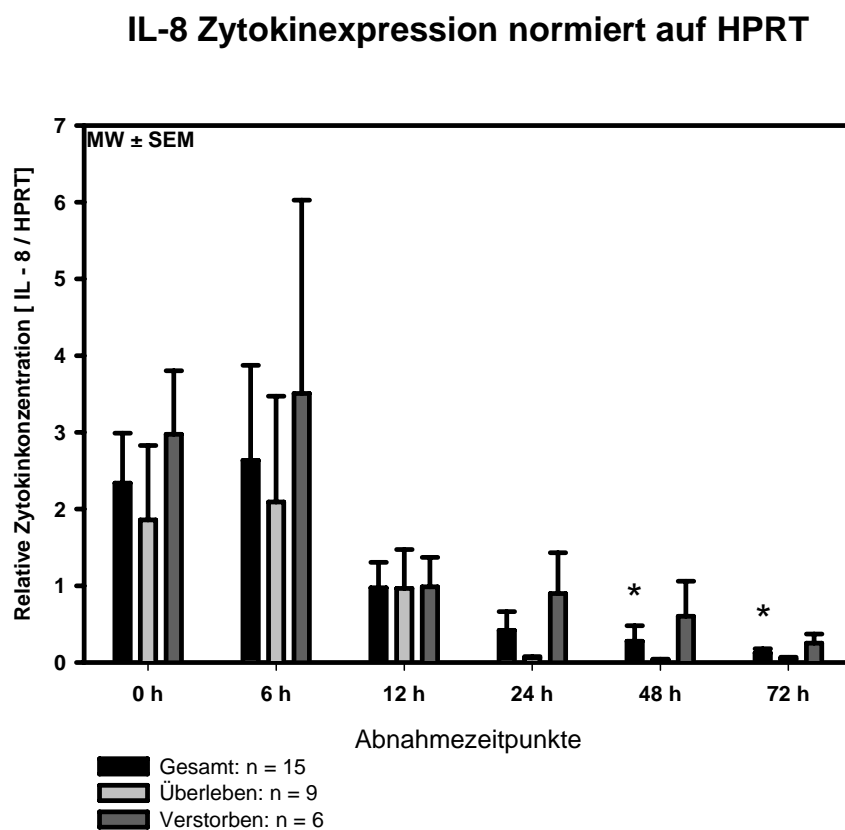


Abbildung 23: Relative intrazelluläre Expression von IL-8 gegen HPRT: Auf der Y-Achse aufgetragen die relative, dimensionslose Zytokinexpression von IL-8 in Abhängigkeit zu den Abnahmezeitpunkten. Aufgetragen ist die Gesamtpatientenpopulation (n = 15), sowie die darin enthaltenden Subgruppen der überlebenden (n = 9) und verstorbenen Patienten (n = 6) als Mittelwertdarstellung mit Standardfehler vom Mittelwert (MW \pm SEM). 48 h und 72 h ist das relative Expressionsniveau signifikant gegenüber dem Ausgangswert erniedrigt. * = $p < 0,05$

Auch die auf GAPDH normierte intrazelluläre Zytokinexpression von IL-8 zeigt ein vom Ausgangswert (0h) stetig abnehmendes Niveau über den gesamten Beobachtungszeitraum bis 72h (**Abbildung 24**). Statistisch signifikant erniedrigte Korrelationen im Vergleich zum Ausgangswert werden ab der 24. Beobachtungsstunde erreicht (Ratio IL-8 / GAPDH: $2,7 \times 10^{-4}$; $1,8 \times 10^{-4}$; $1,2 \times 10^{-4}$ vs. $1,0 \times 10^{-2} \pm \text{SEM}$).

IL-8 Zytokinexpression normiert auf GAPDH

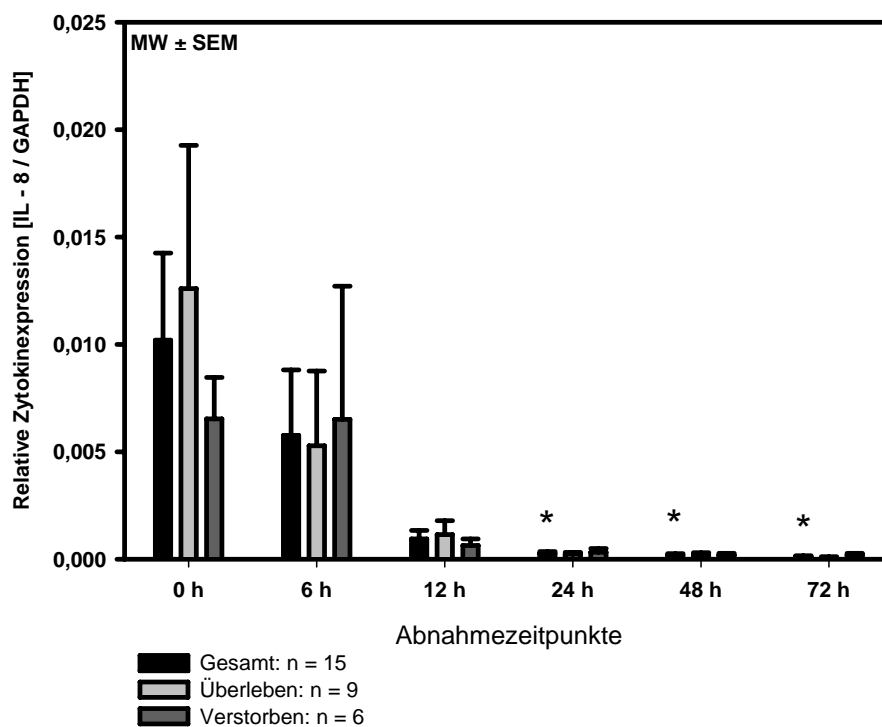


Abbildung 24: Relative intrazelluläre Expression von IL-8 gegen GAPDH: Auf der Y-Achse aufgetragen die relative, dimensionslose Zytokinexpression von IL-8 in Abhängigkeit zu den Abnahmezeitpunkten. Aufgetragen ist die Gesamtpatientenpopulation (n = 15), sowie die darin enthaltenden Subgruppen der überlebenden (n = 9) und verstorbenen Patienten (n = 6) als Mittelwertdarstellung mit Standardfehler vom Mittelwert (MW ± SEM). 24, 48 und 72h ist das relative Expressionsniveau signifikant gegenüber dem Ausgangswert erniedrigt. * = p<0,05

Die Serumanalyse von IL-8 zeigt eine bis zum 6h- Messwert ansteigende Konzentration für das Gesamtkollektiv, wie auch für die überlebende oder verstorbene Subgruppe, gefolgt von einer Konzentrationsabnahme ab der 12. Behandlungsstunde nach Ereignis (**Abbildung 25**). Die ermittelten Konzentrationen erweisen sich signifikant erhöht gegenüber der Kontrollgruppe bis zur 24. Beobachtungsstunde (54; 1080; 193; 64 vs. 0 pg / ml \pm SEM).

IL-8 Serumkonzentrationen

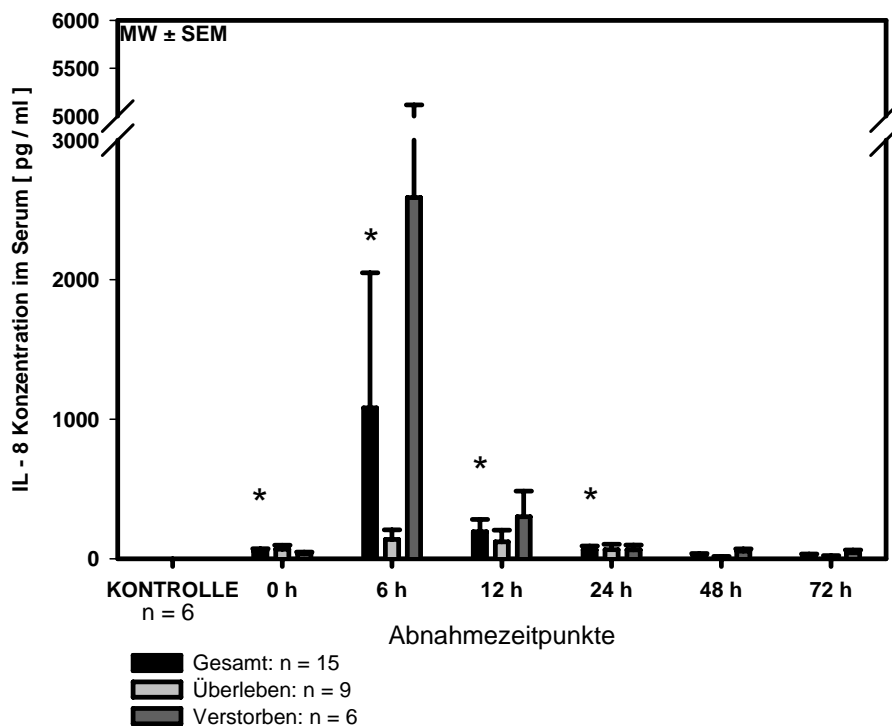


Abbildung 25: Systemische Zytokin-Konzentrationen von IL-8: auf der Y-Achse aufgetragen ist die Konzentration des analysierten pro- inflammatorischen Zytokins in pg/ml in Abhängigkeit zu den Abnahmezeitpunkten. Ordinatenachse ist zum Vergleich die Kontrollgruppe aufgeführt (n = 6). Analog zum Vergleich mit den intrazellulären Daten ist folgend sowohl das Gesamtpatientenkollektiv (n = 15), wie auch die Subgruppen der überlebenden (n = 9) und der verstorbenen Patienten (n = 6) aufgetragen. Ergebnisse als Mittelwert der Doppelbestimmungen je Messzeitpunkt \pm SEM. Signifikante Konzentrationserhöhung im Vergleich zur Kontrolle bei 0h, 6h, 12h und 24h. * = p < 0,05

E Poly-Morpho-Nukleäre-Elastase (PMN-Elastase)

Normiert auf HPRT (**Abbildung 26**) zeigt die intrazelluläre Zytokinexpression von PMN-Elastase einen ab dem Ausgangswert (0h) signifikanten Abfall des relativen Niveaus bis zum 24h Messzeitpunkt (signifikant für 6h, 12h und 24h, Ratio PMN-Elastase / HPRT: 2,0; 1,27 und 0,49 vs. $9,46 \pm \text{SEM}$), um dann in der Folge bis zum Ende des Beobachtungszeitraum (72h) leicht anzusteigen. Sowohl die gesamte Patientenpopulation wie auch die überlebende oder verstorbene Subgruppe zeigen diese Entwicklung, wenn auch mit größerer Ausprägung für die verstorbene Subgruppe.

PMN-Elastase Zytokinexpression normiert auf HPRT

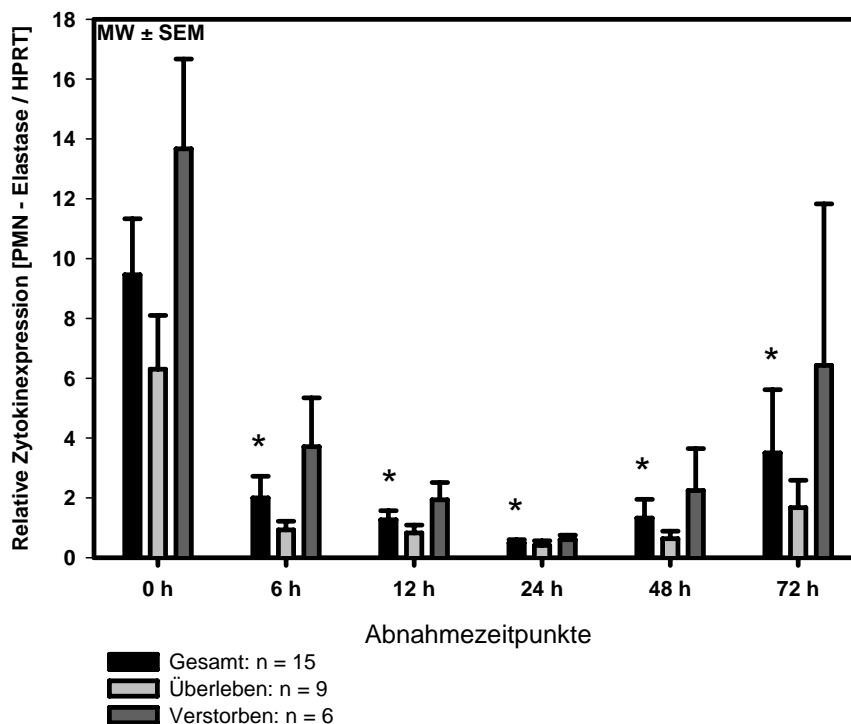


Abbildung 26: Relative intrazelluläre Expression von PMN-Elastase gegen HPRT: Auf der Y-Achse aufgetragen die relative, dimensionslose Zytokinexpression von PMN-Elastase in Abhängigkeit zu den Abnahmezeitpunkten. Aufgetragen ist die Gesamtpatientenpopulation (n = 15), sowie die darin enthaltenden Subgruppen der überlebenden (n = 9) und verstorbenen Patienten (n = 6) als Mittelwertdarstellung mit Standardfehler vom Mittelwert (MW ± SEM). Vom Ausgangswert (0h) signifikant fallende relative Expressionsniveaus bis 24h. * = $p < 0,05$

Auch die auf GAPDH korrelierte intrazelluläre PMN-Elastase Expression zeigt qualitativ einen gleichen relativen Niveauverlauf über die Zeit (**Abbildung 27**, vgl. **Abbildung 26**).

Die vom Ausgangswert (0h) in der zeitlichen Folge bestimmten relativen Niveaus nehmen deskriptiv bis 24h nach Ereignis ab, um nach 48h leicht anzusteigen.

PMN-Elastase Zytokinexpression normiert auf GAPDH

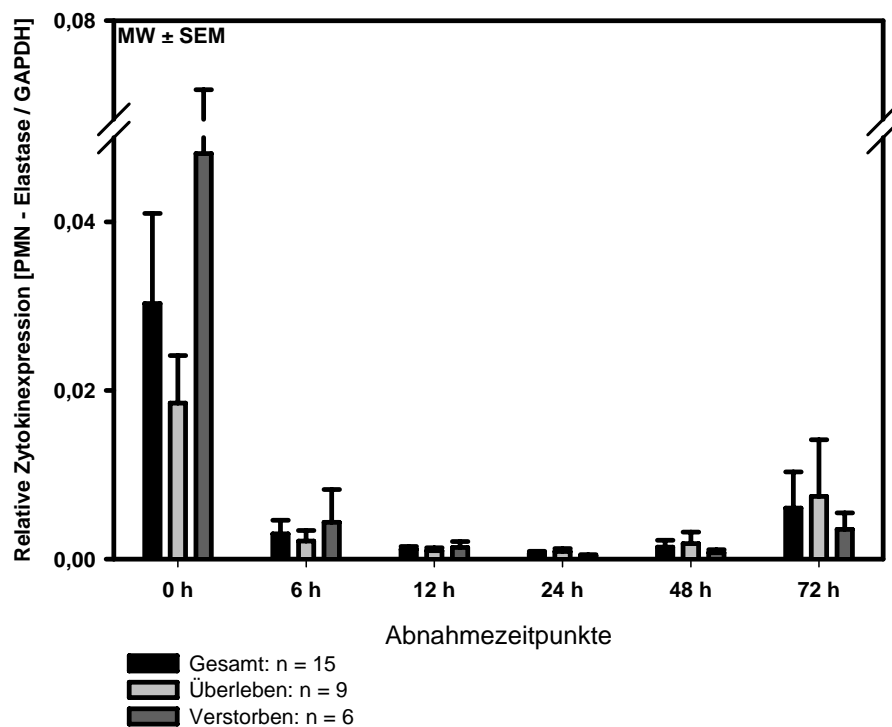


Abbildung 27: Relative intrazelluläre Expression von PMN-Elastase gegen GAPDH: Auf der Y-Achse aufgetragen die relative, dimensionslose Zytokinexpression von PMN-Elastase in Abhängigkeit zu den Abnahmezeitpunkten. Aufgetragen ist die Gesamtpatientenpopulation (n = 15), sowie die darin enthaltenden Subgruppen der überlebenden (n = 9) und verstorbenen Patienten (n = 6) als Mittelwertdarstellung mit Standardfehler vom Mittelwert (MW ± SEM). Deskriptiv vom Ausgangsmesswert (0h) fallende relative Expressionsniveaus bis 24h.

Die Serumanalyse von PMN-Elastase zeigt qualitativ einen mit den intrazellulären Daten vergleichbaren Verlauf (**Abbildung 28**): Vom Ausgangswert (0h) fällt die Serumkonzentration nach Ereignis bis zum 24h Messzeitpunkt ab, um in der Folge erneut leicht anzusteigen. Die ermittelten Konzentrationen sind jedoch fortlaufend im Vergleich zur Kontrolle erhöht (signifikant für 0, 6, 24, 48 und 72h).

PMN-Elastase Serumkonzentrationen

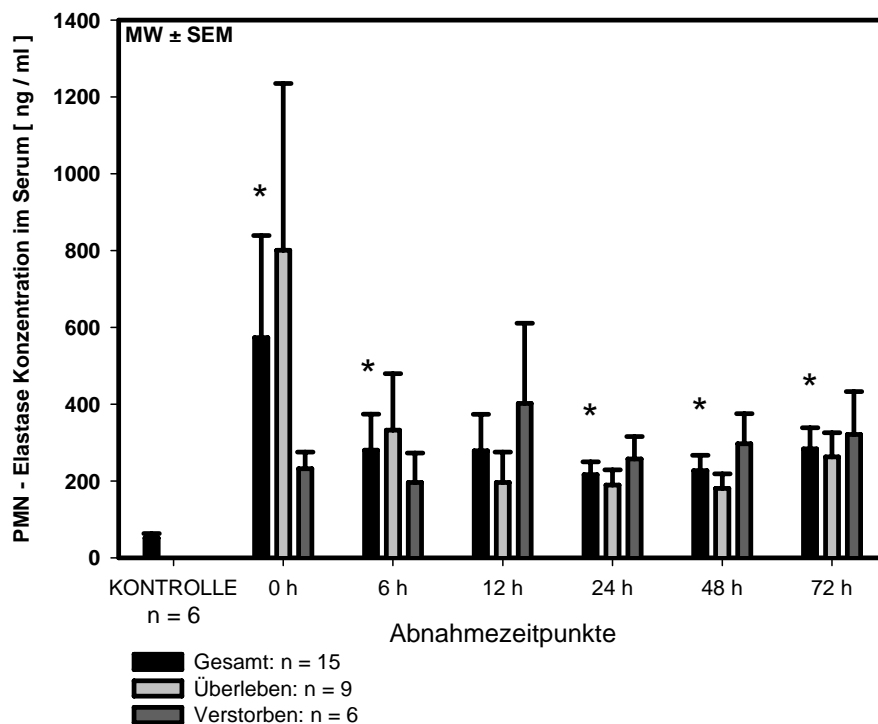


Abbildung 28: Systemische Zytokin-Konzentrationen von PMN-Elastase: auf der Y-Achse aufgetragen ist die Konzentration des analysierten pro- inflammatorischen Zytokins in ng/ml in Abhängigkeit zu den Abnahmezeitpunkten. Ordinatenachse ist zum Vergleich die Kontrollgruppe aufgeführt (n = 6). Analog zum Vergleich mit den intrazellulären Daten ist folgend sowohl das Gesamtpatientenkollektiv (n = 15), wie auch die Subgruppen der überlebenden (n = 9) und der verstorbenen Patienten (n = 6) aufgetragen. Ergebnisse als Mittelwert der Doppelbestimmungen je Messzeitpunkt \pm SEM. Signifikante Konzentrationserhöhung im Vergleich zur Kontrolle bei 0h, 6h, 24h, 48h und 72h. * = $p < 0,05$

5. Diskussion

Erstmalig konnte im Rahmen dieser Studie gezeigt werden, dass sequenzielle intrazelluläre Analysen auch bei kritisch erkrankten Patienten nach kardiopulmonaler Reanimation bereits durch präklinisch asservierte Vollblutproben möglich sind. Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Detektion ausgesuchter pro- und anti-inflammatorischer intrazellulärer, zytokinvermittelter Immunmodulation nach generalisierter Zellhypoxie, wie sie bei reanimationspflichtigem Kreislaufversagen auftritt und dem direkten Vergleich mit den Serumkonzentrationen. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich nach dem Ereignis ausgesuchte Genexpressionsprofile zum Teil signifikant regulieren und deskriptive Gruppenunterschiede zwischen der überlebenden und der verstorbenen Patientensubgruppe bestehen.

5.1 Phase 1 - Validierung des experimentellen Protokolls

5.1.1 Zellseparation vs. Vollblutmedium

Humanes Vollblut stellt eine vitale, schnell verfügbare Quelle für grundlegende RNA-Analysen dar. Vollblut RNA-Isolationsstrategien zielen also darauf ab, präparatorische *ex vivo* Einflüsse auf die fragile RNA im Hinblick auf valide Ergebnisse zu minimieren.

Um für die experimentellen Folgeschritte repräsentative Vertreter der zellulären Immunmodulation gewinnen zu können, bedienen wir uns einer etablierten immunomagnetisch aktivierten Zellsortierung (MACS), welche Monozyten und Granulozyten aus einem EDTA-Vollblutvolumen mittels Oberflächen-Antikörper beschichteten, ferromagnetischen Partikeln in einem Permanentmagnetfeld zu separieren vermag.

Beschrieben ist in diesem Zusammenhang eine prozedural bedingte *in-vitro*-Aktivierung der Immunzellen [200]. Eine interessante Alternative zu weiteren zellseparierenden Verfahren bietet das PAXgene® Blood RNA-System im Hinblick auf RNA-basierende Vollblutanalysen: Zum Einen verspricht es durch standardisierte Reagenzien und minimiertes prozedurales Aufarbeiten eine Artefaktminimierung der Ergebnisse [201].

Ein weiterer, entscheidender Vorteil des PAXgene®-Vollblutmediums liegt vergleichend zu traditionellen, zellseparierenden Vollblut-Analysen im Gebrauch eines reduzierten Blutvolumens für eine ausreichende Menge benötigter mRNA [27]. Dieser bei der Blutentnahme auch zeitaufwendigere Volumenmehrbedarf ist bei der kritischen klinischen Situation der Patienten problematisch. Auch gestaltet sich die analytische Aufbereitung im PAXgene®-Vollblutmedium hinsichtlich Lagerungsmöglichkeit und Schutz vor RNA-Degradation, bedingt durch die beinhaltete *stabilizing solution*, präanalytisch realitätsgerecht [154;165] und eröffnet auch logistisch neue klinische und präklinische Einsatzmöglichkeiten. Erste Vorbehalte bezüglich der RNA-stabilisierenden Eigenschaften aus jüngerer Zeit beziehen sich auf die Nutzung und Expertise des Mediums im Zusammenhang mit Knochenmark und können unsererseits zum gegenwärtigen Zeitpunkt bei Vollblutproben nicht nachvollzogen werden [102].

Somit lag im Vorfeld unserer klinischen Expertise eine der Zellseparation gegenüberstellende Validation des PAXgene®-Systems am gesunden Probanden auf der Hand:

Wie aus unseren vergleichenden Daten ersichtlich wird, werden je nach Zellentität auch bei *Housekeeping*- Genen unterschiedliche Expressionswerte generiert. Dieses Verhalten konnte bereits bei ähnlichen Analysen gezeigt werden [116]. Eine in unseren Daten erkennbare tageszeitliche Regulation ausgesuchter Zielgene, welche sowohl im Vollblutmedium, als auch in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) deutlich wird (**Abbildung 7**), widerspricht nicht den Erfahrungen anderer Autoren und unterstreicht die Validität dieser vergleichenden Messungen [104]. Vorteilhaft erscheint es, bei Untersuchungen aus PBMC's

die Provenienz der untersuchten Ausprägung bestimmt vorherzusagen. Demgegenüber kann es gerade bei Erstanalysen sinnvoll sein, ein übergeordnetes Abbild der Inflammationssituation zu erhalten, wie sie im zirkulierenden Vollblut durch Miterfassung mehrerer Zellentitäten mit Immunkompetenz, wie etwa T-Lymphozyten, B-Zellen, *Natural-Killer*-(NK)-Zellen und weiteren abgebildet wird.

5.1.2 Stimulationsbedingungen

Um die funktionale Charakteristik des Versuchsaufbaus auch in regulatorischen Grenzbereichen besser abschätzen zu können, wurden beide Systeme unter Stimulationsbedingungen gegeneinander verglichen (siehe **Abbildungen 8, 9, 10**). Anlehnend an methodisch vergleichbare Untersuchungen wurde ein Model zur Stimulation mittels Lipopolysaccharid (LPS) und Inhibition mittels Actinomycin D gewählt [86;87;183]. LPS ist in der Lage am Serumprotein *Lipoprotein-binding-protein* (LPB) einen Komplex zu bilden und bei Kontakt am CD₁₄-Rezeptor eine Zytokinliberation zu initiieren [168]. Es konnte gezeigt werden, dass die intrazelluläre Expression von TNF- unter Kulturbedingungen induzierbar ist und der Nachweis sowohl bei separierten CD₁₄- oder CD₁₅-positiven PBMC's, als auch im Vollblutmedium nachweisbar ist. In der gewählten Actinomycin D-Konzentration wurde ebenso effektiv durch Interkalation die DNA-abhängige RNA-Synthese gehemmt, sodass trotz LPS-Induktion eine Mehrexpression von TNF- unterblieb. Interessanterweise zeigte sich bei sofortiger Actinomycin D- Zugabe eine Expressionsabnahme in Monozyten und Granulozyten im Vergleich zu unmittelbar prozessierten Nativproben, als Hinweis für eine möglicherweise stattgehabte, prozedurbedingte Regulation. Die prozedurbedingte Artefaktanfälligkeit bei RNA-Präparationen wurde in der Literatur bereits erwähnt [155] und verdeutlicht den Vorteil der Nutzung des Vollblutmediums mit der enthaltenden *stabilizing-solution*.

5.1.3 Normierungsmethoden / Housekeeping-Gene

Quantitative RT-PCR Analysen sind in der Lage reproduzierbar, hoch-sensitive Zielgen-Expressionen auch bei sehr niedrigen Ausgangs mRNA-Konzentrationen zu detektieren und werden bezüglich dieser Fragestellungen auch als „Goldstandard“ bezeichnet [4;178]. Problematisch ist jedoch die Interpretation der ermittelten absoluten Kopienzahl aufgrund der Zielgen-abhängigen, hohen inter-individuellen Variabilität. Voraussetzung für einen zuverlässigen quantitativen Nachweis ist eine funktionierende mRNA-Analytik, welche exakte mRNA-Quantifizierungsergebnisse bei ausreichender Genauigkeit und hoher Wiederholbarkeit liefert [23]. Gegenüber einer absoluten Quantifizierung, welche anhand einer gegebenen Kalibrierkurve basierend auf Dilutionsreihen von qRT-PCR Produkten beruht, bietet eine relative Quantifizierung, bei der die Zielgen-Expression auf ein nicht reguliertes Haushaltsgen normiert wird, mehrere Vorzüge. Die Vorteile einer solchen Normalisierung liegen in der Reduzierung der Varianz der Expressionsergebnisse, da Gewebe- und Matrixeffekte, unterschiedliche RNA-Extraktionseffizienzen sowie Fehler bei der reversen Transkription innerhalb einer experimentellen Probe gleichermaßen das Zielgen und das Haushaltsgen betreffen. In der anschließenden Berechnung heben sich diese individuellen Probeneffekte wieder auf. Eine Normierung der Rohwerte auf eine interne Kontrolle erscheint in diesem Hinblick unumgänglich [90]. Die Korrelation auf ein mitbestimmtes, konstant exprimiertes Haushaltsgen zur Normalisierung der Ergebnisse unter den angewandten Versuchsbedingungen ist hierzu ein gemeinhin akzeptiertes Verfahren. Daher bezeichnen einige Autoren dieses Verfahren auch als „Methode der Wahl“ [186]. Über die Auswahl eines solchen konstitutiven Gens herrscht in der Literatur jedoch Uneinigkeit. Da ein ubiquitäres, sowohl in gesunden und pathologisch veränderten Geweben gleichermaßen konstant exprimiertes Gen für universelle Fragestellungen nicht existent ist, wird empfohlen, für jede Untersuchung ein dafür stabiles Gen zu etablieren [186]. Eine weitere Möglichkeit zur

Normalisierung der Daten ist, die mRNA-Expression mehrerer *Housekeeping*-Gene zu messen, um dann mit deren Mittelwert den Normalisierungsabgleich durchzuführen. Bei dieser Methode wird jedoch empfohlen, *Housekeeping*-Gene unterschiedlicher biochemischer Funktionen heranzuziehen [39]. Für eine sinnvolle, relative Quantifizierung liegt es auf der Hand, sich für Gene zu entscheiden, welche gleichartige Expressionslevel wie das untersuchte Zielgen aufweisen. Da in dieser Studie im Hinblick auf die Fragestellung mehrere Zielgene analysiert wurden, bot sich die Auswahl auf ein jeweils starkes und weniger stark transkribiertes *Housekeeping*-Gen an. Alle untersuchten Haushaltsgene imponieren jedoch durch mehr oder minder ausgeprägte Unterschiede Ihres Expressionsniveaus im Stimulationsmodell. Eine möglicherweise durch die Inkubationszeit im unstabilierten EDTA-Blut verursachte RNA-Degradation oder -Aktivierung kann hierfür als Erklärung dienen. Zur relativen Quantifizierung wählten wir Hypoxanthin Phosphoribosyltransferase (HPRT), sowie Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH). Die ermittelten Expressionslevel (siehe 4.1.2. C) widersprachen nicht der in den Literatur erwähnten Daten [39;96;121;129]. Beide Gene zeigen in unserer validierenden Analyse eine konstante Expression mit akzeptabler Stabilität auch unter LPS-Stimulation.

Dennoch entspricht unser Stimulationsmodell nicht den hypoxämischen Bedingungen des Patientenkollektivs. Entsprechend der Originalität dieser Arbeit existieren in der Literatur kaum Vergleichsdaten bezüglich einer optimalen Justierung auf ein geeignetes *Housekeeping*-Gen für die gewählte Fragestellung in humanen, seriellen Vollblutproben. Erste Vorbehalte gegenüber GAPDH, welches sich in lediglich einer in vitro Studie als weniger geeignet im Hypoxiemodell erwies [70], konnten durch die folgende klinische Expertise erhärtet werden und werden an entsprechender Stelle diskutiert.

5.1.4 Systemische Zytokinkonzentrationen / ELISA

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand in dem Vergleich der ermittelten intrazellulären Daten mit den quantitativen, systemisch messbaren Serumkonzentrationen der Zytokine im ELISA. Dazu sollte die exakte Proteinkonzentration des ermittelten Zytokins mit dem intrazellulären Expressionslevel verglichen werden. Nach dem heute akzeptierten, modifizierten *zentralen Dogma der Molekularbiologie* [134] wäre ein abgeleiteter Zusammenhang zwischen transkriptionalen Daten und daraus resultierenden zirkulatorischen Konzentrationsnachweis im Hinblick auf einen detektiven Zeitvorteil interessant.

Während bei der durchgeführten qRT-PCR ein zuverlässiges Werkzeug zur Detektion der quantitativen Neusynthese als Ausdruck einer absoluten Kopienzahl des Genorts, normiert auf ein konstitutives Haushaltsgen, zur Verfügung steht, verfügt das angewandte *Sandwich-ELISA* über einen hochsensitiven, zirkulatorischen Konzentrationsnachweis des analysierten Zytokins in Serumüberständen des peripheren Bluts. Die vorliegenden Ergebnisse verdeutlichen die Leistungsfähigkeit beider Methoden. Je nach Messbesteck konnten Zytokin-Serumkonzentrationen im Pikogrammbereich mittels Doppelbestimmung reproduzierbar analysiert werden. Dennoch werden Zytokine lokal sezerniert und an fixe oder lösliche Rezeptoren gebunden, schnell von umgebenden Zellen aufgenommen und verstoffwechselt und verfügen somit über eine mitunter sehr kurze Halbwertszeit. Außerdem verändern sich Zytokinkonzentrationen interindividuell, in Abhängigkeit von Alter, körperlicher Konstitution und weiteren externen Einflüssen, je nach gebildeter Menge, Halbwertszeit und der Fähigkeit in die Zirkulation zu gelangen [95].

Dieser Zusammenhang soll an der folgenden klinischen Expertise diskutiert werden.

5.2 Phase 2 - Klinisch experimenteller Teil

5.2.1 Patienten

Gemäß den Einschlusskriterien fanden 15 Patienten Eingang in diese Studie. Symptomatisch erlitten alle Patienten einen prähospitalen Kreislaufstillstand. Interessanterweise lässt sich das Patientenkollektiv mit demografischen Angaben größerer Kollektive deskriptiver *Outcome*-Analysen beim *out of hospital cardiac arrest* (OHCA) durchaus vergleichen [3]:

In einer Studie von *Adrie* wurden innerhalb eines Zeitraums von 4 Jahren $n = 130$ Patienten nach OHCA bezüglich Ihres Überlebens verglichen. Die Studie basierte auf einem männlichen Kohortenanteil von 72%, wohingegen in dieser Studie der Anteil männlicher Patienten 86% betrug. Die Überlebenschancen hing hierbei mitentscheidend von der *no-flow* Anoxie-Zeit, also vom Erkennen eines Kreislaufstillstands bis zur Durchführung von Basis-Wiederbelebungsmaßnahmen und der hypoxischen *low-flow* Zeit, also der mechanischen Wiederbelebungszeit, bis zur Rückkehr eines Spontankreislaufs *ROSC* ab. Das *no-flow*-Intervall liegt in der zitierten Studie bei 6 min., einer Zeit, die der Einsatzzeit vom Absetzen eines Notrufs bis zum Eintreffen des kooperierenden Rettungsmittels der Stadt München entspricht. Das *low-flow*-Intervall wird im Gesamtkollektiv mit durchschnittlich 15 min. beziffert, wohingegen in dieser Studie die Patienten eine 16 min. andauernde mechanische Kreislaufunterstützung erfuhren. Dahingehend kann das Patientenkollektiv dieser Studie als repräsentativ angesehen werden.

Die Dokumentation der präklinischen und klinischen Daten orientierte sich analog den Empfehlungen des Nationalen Reanimationsregister, Modul *Erstversorgung* und *Klinische Weiterversorgung* der deutschen Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin sowie des Utstein-Style-Protokolls [37;69].

Der Großteil der erhobenen klinischen Parameter, welche ergänzend herangezogen werden könnten, hat kontinuierliche Datenqualität, wie zum Beispiel innerklinisch erhobene Laborparameter, Vitalparameter, invasiv abgeleitetes Monitoring, Art und Umfang therapeutischer Maßnahmen etc..

Das Zeitintervall der erhobenen Messungen dieser Studie (siehe **3.2.2**) orientiert sich an dem kritischen Zeitfenster im Hinblick auf ein zu erwartendes Organdysfunktions-Syndrom bezüglich eines Überlebens nach kardiopulmonaler Reanimation, welches in der Literatur als *Post-resuscitation-Syndrom* bezeichnet wird [101;141;144]. Demnach sind inflammatorische Reaktionen mit deren pathophysiologischen Konsequenzen innerhalb 72h nach ROSC maßgeblich für ein Überleben determinierend [119]. Es lag also auf der Hand, innerhalb der ersten 24h ein engmaschigeres Analyseintervall zu wählen. Dennoch besteht erstrangig die Verpflichtung, dem hämodynamisch instabilen Patienten durch angemessen gering-volumige Blutentnahmen, keinen weiteren gesundheitlichen Schaden zuzufügen. Aus diesem Grund konnten die komplexen, zeitabhängigen Phasen der immunologischen Antwort in kontinuierlicher, wünschenswerter Weise nicht komplett abgebildet werden. Eine Nutzung des ausgewählten Zeitfensters und des Blutvolumen-reduzierten Vollblutmediums bieten hierbei einen sinnvollen Kompromiss, welcher es gestattete, erstmalig in der frühen initialen Phase unter logistischen Herausforderungen serielle Analysen direkt nach ROSC durchzuführen.

5.2.2 Bewertung des Tumornekrosefaktor- (TNF-)

Es existiert eine Vielzahl von Studien, welche TNF- eine übergeordnete Funktion in multiplen immunmodulierenden Schritten zuschreiben. Die Literatur liefert dazu aktuell über 70000 wissenschaftliche Stellungnahmen und unterstreicht somit die vermeintliche Schlüsselrolle des proinflammatorischen Zytokins im Hinblick auf das gewählte Studienmodell [12-14;48;170;180]. Das überaus komplexe Wechselspiel des pleiotropen und redundanten Vertreters der Tumornekrosefaktor-Liganden-Superfamilie ist jedoch bis heute nicht abschließend verstanden. In Bezug auf das *post-resuscitation Syndrome* existiert eine überschaubare Anzahl an Literaturverweisen, welche sich im wesentlichen auf Serumanalysen im Zusammenhang mit Ischämie-Reperusionsstrategien beim kardiochirurgisch-extrakorporalen Kreislauf oder auf traumatisch induzierte hämorrhagische Schockformen konzentrieren.

Dennoch gibt es klare Hinweise, dass erhöhte TNF- Konzentrationen neben ihrer proinflammatorischen Komponente einen erheblichen Anteil an einer myokardialen Dysfunktion nach erfolgreich terminiertem kardialem Arrest haben [80;146].

In dieser Analyse konnte ein deskriptiver Anstieg der TNF- Serumkonzentration 6h nach Etablieren eines Spontankreislaufs beobachtet werden, gefolgt von einem biphasischen Konzentrationsabfall über den Messzeitraum. Dieses Phänomen steht im Einklang zu einer vergleichbaren Studie an 28 präklinisch reanimierten Patienten [93]. Die auf HPRT normierten, intrazellulären Daten zeigen einen zur Serumanalyse qualitativ vergleichbar deskriptiven Verlauf. Obwohl andere Autoren in differnten Studien auch erfolgreich die TNF- Expression auf GAPDH normalisieren konnten [34], ist in diesem Hypoxiemodell das Ergebnis mit der Serumanalyse und mit den auf HPRT normierten Daten nicht in Einklang zu bringen. Ein detektiver Zeitvorteil der qRT-PCR im Vergleich zu den generierten ELISA Daten ist leider nicht abzuleiten. Möglicherweise erfolgt eine sekretorische oder

regulatorische Adaptation auf einen Kreislaufstillstand schneller als erwartet. Diese Hypothese wird durch eine aktuelle Arbeit am Tiermodell an domestizierten Schweinen gestützt, welche TNF- im Serum initial nach ROSC, sowie 15 min. und nachfolgend nach 30 min. Intervallen analysiert hat [147]. Ebenso existieren Arbeiten, welche die Serum-Halbwertszeit von TNF- literatur- und studienabhängig zwischen 15 und 80 min. beziffern [203].

5.2.3 Bewertung von Interleukin 10 (IL-10)

Mit zunehmendem Verständnis von pro- und antiinflammatorischen Prozessen gewinnt auch IL-10 an klinischer Relevanz. So konnte IL-10 als bedeutsamer Vertreter der von Monozyten und Makrophagen, B-Zellen und vor allem Th2 und T0 Zellen sezernierten Zytokine als Gegenspieler der Entzündungsinitiatoren identifiziert werden [49;67;157].

Intrazelluläre, auf HPRT normierte Expressionsmuster zeigen eine Hochregulation bis 12h nach ROSC mit ausgeprägter Qualität bei der verstorbenen Subpopulation und einem früheren Niveauabfall in der überlebenden Subpopulation, wohingegen auf GAPDH normierte Muster bis 24h nach ROSC ansteigen, mit nahezu konstanter Regulation bei Patienten mit schlechtem Outcome.

Adrie konnte in einer Studie an 61 Patienten nach erfolgreich terminiertem, präklinischen Herzstillstand ebenfalls über signifikant erhöhte IL-10 Plasmakonzentrationen in der Subgruppe schlechten Outcomes berichten [2]. Diese Beobachtung deckt sich mit dem Ergebnis unserer Serumanalyse und dem Vergleich der auf HPRT normalisierten intrazellulären Daten. Allerdings existiert eine Vielzahl von Einflußgrößen, welche bei der Bewertung nicht unberücksichtigt bleiben dürfen: So ist bekannt, dass ein ausgeprägter, medikamentöser Vasopressorenbedarf zu einer IL-10 Freisetzung führen kann [162;167].

Es existieren ferner Hinweise, dass unter Hypoxämie Plasma IL-10 Konzentrationen geschlechtsabhängig in besonderem Maße von Männern liberiert werden können [110].

Interleukin-10 hat eine Plasmahalbwertszeit von weniger als 60 min. und lässt sich auf Transkriptionsebene durch Anwesenheit von proinflammatorischen Stimuli, wie zum Beispiel TNF- α , induzieren [193]. Insbesondere bei Vorliegen einer manifesten Entzündungsreaktion erscheint es angemessen, IL-10 Konzentrationen mit anderen Inflammationsmarkern bewertend in Einklang zu bringen. Während mehrere Autoren erhöhte IL-10 Serumkonzentrationen als bedeutenden Marker für günstiges Outcome und reduziertes Risiko bei instabilen, septischen Ereignissen identifiziert haben [5;56;81], konnte bei polytraumatisierten Patienten neben einer Korrelation mit der Verletzungsschwere auch eine schlechte Prognose bei initial höheren IL-10 Konzentrationen ermittelt werden [145;158]. Dies unterstreicht die Wichtigkeit der Balance zwischen krankheitspezifischen pro- und antiinflammatorischen Mechanismen [51].

5.2.4 Bewertung von Interleukin 1-Rezeptorantagonist (IL1-ra)

Dem antiinflammatorisch wirksamen Interleukin 1-Rezeptorantagonisten (IL1-ra) kommt als Gegenspieler der Entzündungsreaktion aktivierenden- und unterhaltenden Interleukin 1-Subgruppe IL-1 β und IL-1 α durch Konkurrenz am IL-1 Rezeptor eine besondere Bedeutung zu. Im Hinblick auf eine mögliche hypoxische Induktion konnte gezeigt werden, dass eine milde Hypoxämie bei Aufenthalt in großer Höhe unter hypobarer Atmosphäre die IL1-ra Liberation induzieren kann [77]. In Serumanalysen konnte nach 2- bzw. 4-tägiger Akklimatisierung gesunder Probanden eine signifikant erhöhte IL1-ra Konzentrationen im Zusammenhang mit einer klinisch nachweisbaren moderaten systemischen Inflammation (SIRS) festgestellt werden, gefolgt von einem Konzentrationsabfall über den Meßzeitraum, welcher einer konventionell angewandten Entzündungsdiagnostik mittels C-reaktiven Protein zeitlich überlegen war. Die ermittelten Konzentrationen bei milder bis moderater hypobarer Hypoxämie lagen erwartungsgemäß deutlich unter den in unserer Studie demonstrierten

Serumergebnissen. Eine weiterführende Studie konnte an lediglich zwei Meßzeitpunkten im in-vitro Modell in starker kulturell- hypoxischer Atmosphäre sowohl auf intrazellulärer Ebene, wie auch im ELISA bei mononukleären Zellen peripheren Vollbluts zeigen, dass nach 16h zunächst eine Expressions- und damit auch Proteinkonzentrationszunahme von IL1-ra erfolgt, jedoch eine deutlichen Abnahme der IL1-ra mRNA und ihres zirkulatorischen Proteins nach 40h Inkubation der PBMC zu verzeichnen war [140]. Interessanterweise unterlagen die zeitgleich mitbestimmten, korrespondierenden proinflammatorischen Zytokine IL-1 und IL-1 einer qualitativ gleichartigen Expressionsrhythmik, quantitativ jedoch zugunsten einer relativen Mehrsynthese nach 40h, im Sinne eines proinflammatorischen Dysäquilibriums. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen erstmalig einen signifikanten seriellen Anstieg der auf HPRT normierten intrazellulären Daten von IL1-ra in der frühen Phase 6h nach ROSC mit nachvollziehbaren, ebenfalls signifikant erhöhten Serumkonzentrationen (siehe **Abbildungen 20 und 22**).

Mehrere Studien betonen die besondere klinische Relevanz: So konnte *Abraham* im Tierexperiment an Ratten zeigen, dass die Applikation von rekombinatem IL1-ra nach hämorrhagischen Schock die mRNA Expression von IL-1 und darüber hinaus von IL-6 und TNF- reduziert [1]. Ebenso existieren klare tierexperimentelle Hinweise, dass eine hochregulierte IL1-ra Expression mit neuroprotektiven Effekten nach Hypoxie assoziiert ist [156;161]. Der antiinflammatorische Nutzen von IL1-ra ist in vielen weiteren Studien abgebildet, so dass seit jüngerer Zeit rekombinanter IL1-ra als zugelassenes, adjuvantes Agens zur immunmodulierenden Therapie bei entzündlichen Erkrankungen nach strenger Indikationsstellung eingesetzt wird [35]. Dennoch scheint bei der Bewertung das Aquilibrium zwischen pro- und antiinflammatorischen Hinweisen im Vordergrund zu stehen [153], da ebenso eine Vielzahl von Literaturstellen existiert, welche erhöhte IL1-ra Konzentrationen in Anwesenheit von proinflammatorischen Mediatoren als frühen Marker für eine entstehende

Sepsis mit schlechter Prognose deuten [114;132]. Ein Screening mit der in dieser Studie demonstrierten Analyse kann für eine solche Beurteilung hilfreich sein.

5.2.5 Bewertung von Interleukin 8 (IL-8)

Unsere intrazellulären Ergebnisse zeigen auf HPRT normiert eine Abnahme der Expression von IL-8 ab dem Spitzenwert 6h nach ROSC mit einem signifikant reduzierten Muster nach 48h im Messzeitraum. Dieses Ergebnis ist ebenfalls in der Serumanalyse nachvollziehbar. In beiden Messmethoden zeigen sich in der Subgruppe mit schlechtem Outcome höhere IL-8 Nachweise. Insbesondere imponiert der Subgruppenvergleich der Serumanalyse. Auf GAPDH normalisierte, intrazelluläre Daten zeigen zwar kontinuierlich abnehmende Muster mit Signifikanz zum Ausgangswert ab 24h, jedoch ohne imponierenden Subgruppenunterschied. Erste frühe Serumanalysen für IL-8 am reanimierten Patienten konnten bereits 1997 durch *Shyu* an 19 erfolgreich reanimierten Patienten im Vergleich zu 20 direkt nach CPR verstorbenen Patienten durchgeführt werden [181]. Hierbei konnte demonstriert werden, dass in der initial verstorbenen Patientengruppe IL-8 als Serummarker kaum nachweisbar war, wohingegen primär erfolgreich reanimierte Patienten eine hohe IL-8 Serumkonzentration aufwiesen. Somit wurde IL-8 als Marker für erfolgreiche Ischämie- induzierte Gewebe-Reperfusion gedeutet. In einer 2000 erschienenen, prospektiven Pilotstudie konnte bei erhöhten IL-8 Serumspiegeln ein Zusammenhang zwischen kardiopulmonal reanimierten Patienten und Schädelhirn- traumatisierten Patienten im Sinne von Reperfusionseignissen beider Patientengruppen geknüpft werden [138]. Unabhängig davon wurde kurz darauf eine in Teilen vergleichbare Studie an 28 Patienten nach CPR und ROSC veröffentlicht, welche erhöhte Serum IL-8 Serumspitzenspiegel 12h nach ROSC und persistierend erhöhte Konzentrationen bei früh verstorbenen oder in der Folge hirntoten Patienten identifizierte [93]. Die Ergebnisse dieser Studie wiesen hingegen bereits nach 6h eine von dort folgende

IL-8 Spitzenkonzentration auf. Anders als bei unserem Patientenkollektiv wurde bei einem Teil der primär nicht traumatisierten Patienten in der *open chest* Technik bei offenem Thorax kardiokomprimiert. Abweichend von den Messergebnissen unserer Studie konnte auch eine 2002 erschienene, in Teilen vergleichbare Arbeit bei nur 24 stündigen Messintervallen in einem 7-tägigen Zeitraum einen Spitzenspiegel bei 24h herausarbeiten [2]. In einer aktuell erschienenen Literaturarbeit werden IL-8 sogar gemeinsam mit Serummarkern wie neuronenspezifischer Enolase, *NSE* und *S-100 Protein* prädiktive Eigenschaften zur frühen neurologischen Prognose nach CPR und ROSC eingeräumt [50]. Dennoch besteht hinsichtlich eines Referenzwerts Uneinigkeit. Der Umgang mit dem Serummarker IL-8 und seiner Interpretation im klinischen Kontext erscheint anspruchsvoll. In Bezug auf den prädiktiven Wert im Zusammenhang mit bakteriellen Infektion gilt IL-8 als zuverlässiger und schneller, sensitiver und spezifischer Infektionsparameter, insbesondere beim pädiatrischen Intensivpatienten, was zu einer Einführung in die evidenzbasierten Leitlinien der Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin geführt hat [6;163]. Dennoch ist bei Serumanalysen bekannt, dass IL-8 an Erythrozyten binden kann und hämolytische Proben daher nicht verwertet werden können. Auch eine Lagerung im Abnahmemedium kann eine Monozytäre in-vitro Liberation des Zytokins bewirken, weshalb nur eine unverzügliche Prozessierung falsch-hohe Serumkonzentrationen vermeiden kann [125]. Dieser Tatsache wurde in dieser Studie Rechnung getragen. Der Abbau des Zytokins in Serumproben erfolgt innerhalb 4 Stunden, die biologische Halbwertszeit wird mit 1 Stunde beziffert. Aus diesem Grunde erscheint auch eine intrazelluläre Analyse sinnvoll, wie sie diese Studie erstmalig in der ultrafrühen Phase nach ROSC zeigen konnte.

5.2.6 Bewertung von Poly-Morpho-Nucleärer Elastase (PMN-Elastase)

Die Serumanalyse von PMN-Elastase zeigt, ausgehend von ROSC im Vergleich zur Kontrollgruppe, signifikant erhöhte Konzentrationen über den gesamten Meßzeitraum, welche nach einem Minimalwert nach 24h sekundär leicht ansteigt. Damit decken sich die Ergebnisse mit bereits veröffentlichten Literaturangaben: *Gando* konnte in einer Erstanalyse an 40 präklinisch reanimierten Patienten herausarbeiten, dass initial hohe PMN-Elastase-Konzentrationen mit einer geringeren Überlebenswahrscheinlichkeit assoziiert sind. Ein erfolgreiches Unterdrücken der PMN-Elastase Liberation in der späteren Reperfusionphase mittels Urinastatin erbrachte jedoch keinen Überlebensvorteil [63]. Eine Folgestudie untermauerte diesen Zusammenhang [62]: Nach bis zu 30 minütiger, frustraner Herz-Lungen-Wiederbelebung zeigten die Patienten signifikant erhöhte Serumkonzentrationen von PMN-Elastase vergleichend zu erfolgreich reanimierten Patienten. Da in dieser Studie ausschließlich primär erfolgreich wiederbelebte Patienten Eingang fanden, ist es bezüglich der Serumanalyse erstaunlich, warum bei einer relativ kurzen Halbwertszeit von 60 Minuten [150] nahezu bei allen Messzeitpunkten signifikant erhöhte Konzentrationen im Vergleich zur Kontrollgruppe ermittelt wurden. So könnte nach Adhäsion der chemotaxierten neutrophilen Granulozyten am Endothel eine fortwährende PMN-Elastase-Liberation für eine proteolytische Zerstörung der endothelialen Zellen vitaler Organe verantwortlich sein [100;195]. Dieser Zusammenhang lässt sich durch eine mit unserer Studie vergleichbare Arbeit von *Böttinger* erhärten [21]. Die auf HPRT normierten intrazellulären Daten lassen sich durchaus vom qualitativen Verlauf mit den zirkulatorischen Konzentrationen vergleichen (**Abbildung 26 und 28**). Auch hier ist ein vom Initialwert signifikanter Expressionsabfall zu erkennen, gefolgt von einem sekundären Anstieg nach 24h vor allem in der früh verstorbenen Subgruppe. Auf GAPDH normalisierte, intrazelluläre Muster zeigen ein vergleichbares, wenn auch nicht signifikantes Profil.

6. Zusammenfassung

Ein Herz-Kreislaufversagen stellt einen lebensbedrohlichen, kardiopulmonal reanimationspflichtigen Zustand dar, welcher im Zuge der stattgehabten Ischämie-Reperfusionseignisse zu systemischen Entzündungserkrankungen (*systemic inflammatory response Syndrome, SIRS*) prädisponiert und das Überleben des Patienten auch im weiteren klinischen Verlauf determinieren kann. Daraus entstehende, potenziell letal verlaufende Folgezustände sind unter dem Begriff *post-resuscitation Syndrome* subsumiert und stellen für den behandelnden Arzt schon von Beginn an eine therapeutische Herausforderung dar.

Zahlreiche Untersuchungen aus jüngerer Zeit konnten in dieser Hinsicht den zellulären Komponenten des Immunsystems eine Schlüsselrolle zuschreiben. Die genaueren molekularbiologischen Mechanismen, welche das integrative Zusammenspiel der beteiligten Zelllinien auf den Reiz „Ischämie“ erklären, sind jedoch bislang nicht hinreichend aufgeklärt. Es hat sich jedoch herausgestellt, dass relevante Botenstoffe, so genannte Zytokine, eine entscheidende Einflussgröße auf die Entstehung und Ausprägung der Immunantwort besitzen und ihnen als Mediator eine zentrale Rolle im Entzündungsgeschehen zukommt. Insbesondere sind die für die Zytokinsynthese verantwortlichen intrazellulären Steuerungsmechanismen unzureichend charakterisiert.

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es daher:

- i) Ein innovatives, RNA-stabilisierendes Vollblutmedium (PAXgene® Blood RNA Tube) auf seine Anwendbarkeit auch im präklinischen Gebrauch vergleichend zu einer alternativ messanalytisch etablierten Methode zu überprüfen
- ii) Inflammations-bedeutsame Zytokine im initialen Zeitraum bis 72h nach erfolgreichem Durchbrechen eines Herz-Kreislaufstillstands intrazellulär auf mRNA-Ebene zu quantifizieren
- iii) Zu analysieren, ob es einen Zusammenhang zwischen den ermittelten intrazellulären Daten und Veränderungen der korrespondierenden, systemisch messbaren Proteinkonzentrationen gibt
- iiii) Die gewonnenen Ergebnisse auf Übertragbarkeit des klinischen Verlaufs wie „Überleben“ oder „Tod“ zu prüfen.

Da im Sinne der Fragestellung bislang keine vergleichbaren Studien vorlagen, wurde in einer ersten Phase der vorliegenden Arbeit das beschriebene Vollblutmedium, welches hinsichtlich seiner Anwendercharakteristik für die zweite Phase am Patienten geeignet erschien, mit intrazellulären Expressionsergebnissen aus isolierten Monozyten und Granulozyten auch unter Stimulations- und Inhibitionsbedingungen verglichen. Es zeigte sich, dass das RNA-stabilisierende Vollblutmedium auch unter Stimulationsbedingungen prozedural in der Lage ist, valide und reproduzierbare Total-RNA für die Folgeanalysen aus Vollblutproben an 18 gesunden Probanden zu generieren und somit bei reduzierten Blutvolumen (2,5 ml vs. 30 ml) für die Anwendbarkeit am kritisch erkrankten Patienten geeignet erschien. In der

anschließenden zweiten Untersuchungsphase wurde erstmalig mittels intrazellulärer Analyse auf mRNA-Ebene aus Vollblutproben die Expression pro- und antiinflammatorischer Zytokine (TNF- α , IL-10, IL-1-ra, IL-8 und PMN-Elastase) bei Patienten nach erfolgreich terminierten Herz-Kreislaufstillstand mit kardiopulmonaler Reanimationspflicht untersucht. Auf dem Boden eines seriellen Protokolls wurde zu den Zeitpunkten „Wiederkehr eines Spontankreislaufs“, sowie nach 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden nach Ereignis bei 15 Patienten (13 männlich, 2 weiblich) die intrazelluläre Zytokinexpression analysiert. Die ermittelten Rohwerte als Ausdruck einer Kopienzahl des betrachteten Gens pro eingesetzte Menge mRNA wurden auf zwei zur Normierung zeitgleich herangezogenen, konstant exprimierten Haushaltsgene (HPRT und GAPDH) als dimensionslose Zahl normiert.

Dabei konnte für TNF- α ein deskriptiver Expressionsanstieg 6 Stunden nach Ereignis ermittelt werden. IL-10 zeigt einen deskriptiven Expressionsanstieg bis 24 Stunden nach Ereignis. Für IL-1-ra konnten signifikant erhöhte Expressionsprofile bis 48 Stunden nach Rückkehr eines Spontankreislaufs detektiert werden, wohingegen IL-8 eine im Vergleich zum Ausgangswert signifikante Expressionsreduktion nach 48 bzw. 72 Stunden erfährt. Bezüglich der PMN-Elastase konnten signifikant zum Initialwert reduzierte Expressionsprofile im Beobachtungszeitraum festgestellt werden.

Bezogen auf die zeitgleich mitbestimmten, korrespondierenden zirkulatorischen Proteinkonzentrationen konnte demonstriert werden, dass auf HPRT normierte intrazelluläre Expressionsmuster eine qualitativ vergleichbare Dynamik zeigten. Auch hierbei konnten im Vergleich zu gesunden Probanden signifikant erhöhte Konzentrationen für IL-1-ra, IL-8 und PMN-Elastase ermittelt werden. Die an die hochsensitive intrazelluläre Analyse geknüpfte Erwartung eines zeitlich dynamischen Detektionsvorteils gegenüber der angewandten Serum-Protein Nachweismethode mittels ELISA konnte sich in diesem Beobachtungsfenster leider nicht bestätigen.

Bezüglich des Einflusses des klinischen Verlaufs im Sinne eines Überlebens oder Versterbens innerhalb des innerklinischen Beobachtungszeitraums ließ sich feststellen, dass deskriptiv im Vergleich zum überlebenden Kollektiv verlaufsbezogene erhöhte intrazelluläre Expressionsprofile sowie Konzentrationserhöhungen des korrespondierenden Proteins für TNF- α , IL-10, IL-1 α , IL-8 und PMN-Elastase für die verstorbene Subgruppe festzustellen waren.

Die vorliegende Arbeit erhärtet somit den Verdacht, dass pro- und antiinflammatorischen Zytokinen Schlüsselfunktionen in der Entstehung von immunologisch geprägten Folgezuständen nach reanimationspflichtigem Kreislaufversagen und stattgehabter Ischämie und Reperfusion zuzuschreiben sind. Aufgrund der bisherigen geringen Patientenzahl ist jedoch die Aussagekraft der Ergebnisse durch weitere Analysen zu erhärten. Dennoch legt der beschriebene Versuchsansatz die Messlatte für scheinbar erschwerte intrazelluläre immunologische Bestimmungen insbesondere im präklinischen Einsatz bei kritisch erkrankten Patienten auf ein neues Niveau und bietet somit die Möglichkeit, durch weiterführende Studien, intrazelluläre Veränderungen und deren Bewertung besser verstehen zu können.

7. Literatur

1. Abraham E, Allbee J. Effects of therapy with interleukin-1 receptor antagonist on pulmonary cytokine expression following hemorrhage and resuscitation. *Lymphokine Cytokine Res.* 1994; **13**: 343-7.
2. Adrie C, Adib-Conquy M, Laurent I *et al.* Successful cardiopulmonary resuscitation after cardiac arrest as a "sepsis-like" syndrome. *Circulation* 2002; **106**: 562-8.
3. Adrie C, Cariou A, Mourvillier B *et al.* Predicting survival with good neurological recovery at hospital admission after successful resuscitation of out-of-hospital cardiac arrest: the OHCA score. *Eur.Heart J.* 2006; **27**: 2840-5.
4. Aerts JL, Gonzales MI, Topalian SL. Selection of appropriate control genes to assess expression of tumor antigens using real-time RT-PCR. *Biotechniques* 2004; **36**: 84-1.
5. Anguera I, Miranda-Guardiola F, Bosch X *et al.* Elevation of serum levels of the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 and decreased risk of coronary events in patients with unstable angina. *Am.Heart J.* 2002; **144**: 811-7.
6. Arbeitsgemeinschaft der wissenschaftlichen medizinischen Fachgesellschaften. Bakterielle Infektionen bei Neugeborenen. <http://www.uni-duesseldorf.de/awmf/ll/024-008.htm> . 22-2-2006. AWMF online. Leitlinien der Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin.
7. Arend WP. Interleukin-1 receptor antagonist. *Adv.Immunol.* 1993; **54**: 167-227.
8. Arend WP, Joslin FG, Massoni RJ. Characteristics of chondrocyte responses to a human interleukin 1-like factor. *Clin.Immunol.Immunopathol.* 1985; **36**: 358-70.
9. Baggiolini M, Dahinden CA. CC chemokines in allergic inflammation. *Immunol.Today* 1994; **15**: 127-33.
10. Bashyam H. Th1/Th2 cross-regulation and the discovery of IL-10. *J.Exp.Med.* 2007; **204**: 237.
11. Baue AE, Durham R, Faist E. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS), multiple organ dysfunction syndrome (MODS), multiple organ failure (MOF): are we winning the battle? *Shock* 1998; **10**: 79-89.
12. Beutler B, Cerami A. Cachectin: more than a tumor necrosis factor. *N.Engl.J.Med.* 1987; **316**: 379-85.
13. Beutler B, Cerami A. The endogenous mediator of endotoxic shock. *Clin.Res.* 1987; **35**: 192-7.
14. Beutler B, Cerami A. Tumor necrosis, cachexia, shock, and inflammation: a common mediator. *Annu.Rev.Biochem.* 1988; **57**: 505-18.
15. Bonavida B. Immunomodulatory effect of tumor necrosis factor. *Biotherapy* 1991; **3**: 127-33.
16. Bone RC. Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS). *Ann.Intern.Med.* 1996; **125**: 680-7.
17. Bone RC, Balk RA, Cerra FB *et al.* Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 1992; **101**: 1644-55.

18. Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest* 1997; **112**: 235-43.
19. Borghans JA, Noest AJ, De Boer RJ. How specific should immunological memory be? *J.Immunol.* 1999; **163**: 569-75.
20. Bottiger BW, Grabner C, Bauer H *et al.* Long term outcome after out-of-hospital cardiac arrest with physician staffed emergency medical services: the Utstein style applied to a midsized urban/suburban area. *Heart* 1999; **82**: 674-9.
21. Bottiger BW, Motsch J, Braun V, Martin E, Kirschfink M. Marked activation of complement and leukocytes and an increase in the concentrations of soluble endothelial adhesion molecules during cardiopulmonary resuscitation and early reperfusion after cardiac arrest in humans. *Crit Care Med.* 2002; **30**: 2473-80.
22. Burdin N, Peronne C, Banchereau J, Rousset F. Epstein-Barr virus transformation induces B lymphocytes to produce human interleukin 10. *J.Exp.Med.* 1993; **177**: 295-304.
23. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J.Mol.Endocrinol.* 2000; **25**: 169-93.
24. Cairns CB, Panacek EA, Harken AH, Banerjee A. Bench to bedside: tumor necrosis factor-alpha: from inflammation to resuscitation. *Acad.Emerg.Med.* 2000; **7**: 930-41.
25. Campbell EJ, Campbell MA, Boukedes SS, Owen CA. Quantum proteolysis by neutrophils: implications for pulmonary emphysema in alpha 1-antitrypsin deficiency. *J.Clin.Invest* 1999; **104**: 337-44.
26. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J.Pathol.* 2000; **190**: 255-66.
27. Carrol ED, Salway F, Pepper SD *et al.* Successful downstream application of the Paxgene Blood RNA system from small blood samples in paediatric patients for quantitative PCR analysis. *BMC.Immunol.* 2007; **8**: 20.
28. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1975; **72**: 3666-70.
29. Cavaillon JM, Adib-Conquy M, Cloez-Tayarani I, Fitting C. Immunodepression in sepsis and SIRS assessed by ex vivo cytokine production is not a generalized phenomenon: a review. *J.Endotoxin.Res.* 2001; **7**: 85-93.
30. Cavaillon JM, Adib-Conquy M, Fitting C, Adrie C, Payen D. Cytokine cascade in sepsis. *Scand.J.Infect.Dis.* 2003; **35**: 535-44.
31. Cavaillon JM, Annane D. Compartmentalization of the inflammatory response in sepsis and SIRS. *J.Endotoxin.Res.* 2006; **12**: 151-70.
32. Cerchiari EL. The postresuscitation syndrome. Role of extracerebral organ derangements in cerebral recovery. *Minerva Anesthesiol.* 1994; **60**: 563-6.
33. Cheadle C, Fan J, Cho-Chung YS *et al.* Control of gene expression during T cell activation: alternate regulation of mRNA transcription and mRNA stability. *BMC.Genomics* 2005; **6**: 75.
34. Chen ZK, Lv HS. [Quantification of expression of leukotriene B4 inducing tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta at mRNA level in synovial membrane cells of rheumatoid arthritis by real-time quantitative PCR]. *Beijing Da.Xue.Xue.Bao.* 2006; **38**: 533-6.

35. Cohen S, Hurd E, Cush J *et al.* Treatment of rheumatoid arthritis with anakinra, a recombinant human interleukin-1 receptor antagonist, in combination with methotrexate: results of a twenty-four-week, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum.* 2002; **46**: 614-24.
36. Crawford S, Belajic D, Wei J *et al.* A novel B-RAF inhibitor blocks interleukin-8 (IL-8) synthesis in human melanoma xenografts, revealing IL-8 as a potential pharmacodynamic biomarker. *Mol.Cancer Ther.* 2008; **7**: 492-9.
37. Cummins RO, Chamberlain D, Hazinski MF *et al.* Recommended guidelines for reviewing, reporting, and conducting research on in-hospital resuscitation: the in-hospital "Utstein style". American Heart Association. *Ann.Emerg.Med.* 1997; **29**: 650-79.
38. Darbonne WC, Rice GC, Mohler MA *et al.* Red blood cells are a sink for interleukin 8, a leukocyte chemotaxin. *J.Clin.Invest* 1991; **88**: 1362-9.
39. de Kok JB, Roelofs RW, Giesendorf BA *et al.* Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes. *Lab Invest* 2005; **85**: 154-9.
40. de Waal MR, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J.Exp.Med.* 1991; **174**: 1209-20.
41. Deitch EA, Lu Q, Feketeova E, Hauser CJ, Xu DZ. Intestinal bacterial overgrowth induces the production of biologically active intestinal lymph. *J.Trauma* 2004; **56**: 105-10.
42. Deitch EA, Mancini MC. Complement receptors in shock and transplantation. *Arch.Surg.* 1993; **128**: 1222-6.
43. Deitch EA, Xu D, Kaise VL. Role of the gut in the development of injury- and shock induced SIRS and MODS: the gut-lymph hypothesis, a review. *Front Biosci.* 2006; **11**: 520-8.
44. Del Prete G, De Carli M, Almerigogna F, Giudizi MG, Biagiotti R, Romagnani S. Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *J.Immunol.* 1993; **150**: 353-60.
45. Dewald B, Rindler-Ludwig R, Bretz U, Baggiolini M. Subcellular localization and heterogeneity of neutral proteases in neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. *J.Exp.Med.* 1975; **141**: 709-23.
46. Dinarello CA. Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. *Int.Rev.Immunol.* 1998; **16**: 457-99.
47. Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest* 2000; **118**: 503-8.
48. Dofferhoff AS, Vellenga E, Limburg PC, van Zanten A, Mulder PO, Weits J. Tumour necrosis factor (cachectin) and other cytokines in septic shock: a review of the literature. *Neth.J.Med.* 1991; **39**: 45-62.
49. Doherty TM. T-cell regulation of macrophage function. *Curr.Opin.Immunol.* 1995; **7**: 400-4.
50. Ekmektzoglou KA, Xanthos T, Papadimitriou L. Biochemical markers (NSE, S-100, IL-8) as predictors of neurological outcome in patients after cardiac arrest and return of spontaneous circulation. *Resuscitation* 2007; **75**: 219-28.
51. Elenkov IJ, Chrousos GP, Wilder RL. Neuroendocrine regulation of IL-12 and TNF-alpha/IL-10 balance. Clinical implications. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 2000; **917**: 94-105.

52. Elmas E, Lang S, Dempfle CE *et al.* High plasma levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) and interleukin-8 (IL-8) characterize patients prone to ventricular fibrillation complicating myocardial infarction. *Clin.Chem.Lab Med.* 2007; **45**: 1360-5.
53. Enk AH, Katz SI. Identification and induction of keratinocyte-derived IL-10. *J.Immunol.* 1992; **149**: 92-5.
54. Faist E, Kupper TS, Baker CC, Chaudry IH, Dwyer J, Baue AE. Depression of cellular immunity after major injury. Its association with posttraumatic complications and its reversal with immunomodulation. *Arch.Surg.* 1986; **121**: 1000-5.
55. Farber JM. A macrophage mRNA selectively induced by gamma-interferon encodes a member of the platelet factor 4 family of cytokines. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1990; **87**: 5238-42.
56. Fichtlscherer S, Breuer S, Heeschen C, Dimmeler S, Zeiher AM. Interleukin-10 serum levels and systemic endothelial vasoreactivity in patients with coronary artery disease. *J.Am.Coll.Cardiol.* 2004; **44**: 44-9.
57. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J.Exp.Med.* 1989; **170**: 2081-95.
58. Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J.Immunol.* 1991; **147**: 3815-22.
59. Fitzgerald KA, O'Neill LAJ, Gearing AJH, Callard RE. Introduction. In: *The Cytokine FactsBook and Webfacts (Second Edition)*. London: Academic Press, 2001; 2-7.
60. Foex BA, Shelly MP. The cytokine response to critical illness. *J.Accid.Emerg.Med.* 1996; **13**: 154-62.
61. Furuta R, Yamagishi J, Kotani H *et al.* Production and characterization of recombinant human neutrophil chemotactic factor. *J.Biochem.* 1989; **106**: 436-41.
62. Gando S, Nanzaki S, Morimoto Y, Kobayashi S, Kemmotsu O. Out-of-hospital cardiac arrest increases soluble vascular endothelial adhesion molecules and neutrophil elastase associated with endothelial injury. *Intensive Care Med.* 2000; **26**: 38-44.
63. Gando S, Tede I. Increased neutrophil elastase release in patients with cardiopulmonary arrest: role of elastase inhibitor. *Intensive Care Med.* 1995; **21**: 636-40.
64. Geppert A, Zorn G, Karth GD *et al.* Soluble selectins and the systemic inflammatory response syndrome after successful cardiopulmonary resuscitation. *Crit Care Med.* 2000; **28**: 2360-5.
65. Girn HR, Ahilathirunayagam S, Mavor AI, Homer-Vanniasinkam S. Reperfusion syndrome: cellular mechanisms of microvascular dysfunction and potential therapeutic strategies. *Vasc.Endovascular.Surg.* 2007; **41**: 277-93.
66. Goldstein DJ, Moazami N, Seldomridge JA *et al.* Circulatory resuscitation with left ventricular assist device support reduces interleukins 6 and 8 levels. *Ann.Thorac.Surg.* 1997; **63**: 971-4.
67. Gomez-Jimenez J, Martin MC, Sauri R *et al.* Interleukin-10 and the monocyte/macrophage-induced inflammatory response in septic shock. *J.Infect.Dis.* 1995; **171**: 472-5.
68. Granger DN, Kvietys PR, Perry MA. Leukocyte-endothelial cell adhesion induced by ischemia and reperfusion. *Can.J.Physiol Pharmacol.* 1993; **71**: 67-75.

69. Gräsner J-T, Fischer M, Altemeyer KH, et al. German National Resuscitation Registry - standardized data acquisition with DGAI resuscitation data collection set "primary care". *Notfall & Rettungsmedizin* 2005; **2005**: 112-5.
70. Graven KK, McDonald RJ, Farber HW. Hypoxic regulation of endothelial glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Am.J.Physiol* 1998; **274**: C347-C355.
71. Gregory H, Young J, Schroder JM, Mrowietz U, Christophers E. Structure determination of a human lymphocyte derived neutrophil activating peptide (LYNAP). *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1988; **151**: 883-90.
72. Grutz G. New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. *J.Leukoc.Biol.* 2005; **77**: 3-15.
73. Guha M, Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal.* 2001; **13**: 85-94.
74. Hannum CH, Wilcox CJ, Arend WP *et al.* Interleukin-1 receptor antagonist activity of a human interleukin-1 inhibitor. *Nature* 1990; **343**: 336-40.
75. Hansch GM, Schieren G, Wagner C, Schonermark M. Immune damage to the mesangium: antibody- and complement-mediated stimulation and destruction of mesangial cells. *J.Am.Soc.Nephrol.* 1992; **2**: S139-S143.
76. Hartl R, Schurer L, Schmid-Schonbein GW, del Zoppo GJ. Experimental antileukocyte interventions in cerebral ischemia. *J.Cereb.Blood Flow Metab* 1996; **16**: 1108-19.
77. Hartmann G, Tschop M, Fischer R *et al.* High altitude increases circulating interleukin-6, interleukin-1 receptor antagonist and C-reactive protein. *Cytokine* 2000; **12**: 246-52.
78. Hassoun HT, Kone BC, Mercer DW, Moody FG, Weisbrodt NW, Moore FA. Post-injury multiple organ failure: the role of the gut. *Shock* 2001; **15**: 1-10.
79. Hayashi S, Takamiya R, Yamaguchi T *et al.* Induction of heme oxygenase-1 suppresses venular leukocyte adhesion elicited by oxidative stress: role of bilirubin generated by the enzyme. *Circ.Res.* 1999; **85**: 663-71.
80. Heard SO, Perkins MW, Fink MP. Tumor necrosis factor-alpha causes myocardial depression in guinea pigs. *Crit Care Med.* 1992; **20**: 523-7.
81. Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW *et al.* Serum level of the antiinflammatory cytokine interleukin-10 is an important prognostic determinant in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2003; **107**: 2109-14.
82. Hehlhans T, Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 2005; **115**: 1-20.
83. Heidecke CD, Weighardt H, Hensler T, Bartels H, Holzmann B. [Immune paralysis of T-lymphocytes and monocytes in postoperative abdominal sepsis. Correlation of immune function with survival]. *Chirurg* 2000; **71**: 159-65.
84. Herzum I, Renz H. Inflammatory markers in SIRS, sepsis and septic shock. *Curr.Med.Chem.* 2008; **15**: 581-7.
85. Higuchi DA, Wun TC, Likert KM, Broze GJ, Jr. The effect of leukocyte elastase on tissue factor pathway inhibitor. *Blood* 1992; **79**: 1712-9.

86. Hinz B, Brune K, Pahl A. Cyclooxygenase-2 expression in lipopolysaccharide-stimulated human monocytes is modulated by cyclic AMP, prostaglandin E(2), and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2000; **278**: 790-6.
87. Hinz B, Brune K, Pahl A. 15-Deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J2 inhibits the expression of proinflammatory genes in human blood monocytes via a PPAR-gamma-independent mechanism. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2003; **302**: 415-20.
88. Homeister JW, Lucchesi BR. Complement activation and inhibition in myocardial ischemia and reperfusion injury. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 1994; **34**: 17-40.
89. Huang Y, Rabb H, Womer KL. Ischemia-reperfusion and immediate T cell responses. *Cell Immunol.* 2007; **248**: 4-11.
90. Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun.* 2005; **6**: 279-84.
91. Inoue T, Komoda H, Nonaka M, Kameda M, Uchida T, Node K. Interleukin-8 as an independent predictor of long-term clinical outcome in patients with coronary artery disease. *Int.J.Cardiol.* 2008; **124**: 319-25.
92. Issa R, Sorrentino R, Sukkar MB, Sriskandan S, Chung KF, Mitchell JA. Differential regulation of CCL-11/eotaxin-1 and CXCL-8/IL-8 by gram-positive and gram-negative bacteria in human airway smooth muscle cells. *Respir.Res.* 2008; **9**: 30.
93. Ito T, Saitoh D, Fukuzuka K *et al.* Significance of elevated serum interleukin-8 in patients resuscitated after cardiopulmonary arrest. *Resuscitation* 2001; **51**: 47-53.
94. Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 2003; **284**: G15-G26.
95. Janeway C, Travers P, Walport M, Shlomchik M. *immuno biology: The Immune System In Health And Disease.* 2001.
96. Janssens N, Janicot M, Perera T, Bakker A. Housekeeping genes as internal standards in cancer research. *Mol.Diagn.* 2004; **8**: 107-13.
97. Jenkins JK, Arend WP. Interleukin 1 receptor antagonist production in human monocytes is induced by IL-1 alpha, IL-3, IL-4 and GM-CSF. *Cytokine* 1993; **5**: 407-15.
98. Jenkins JK, Malyak M, Arend WP. The effects of interleukin-10 on interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 beta production in human monocytes and neutrophils. *Lymphokine Cytokine Res.* 1994; **13**: 47-54.
99. Jerome SN, Dore M, Paulson JC, Smith CW, Korthuis RJ. P-selectin and ICAM-1-dependent adherence reactions: role in the genesis of postischemic no-reflow. *Am.J.Physiol* 1994; **266**: H1316-H1321.
100. Jochum M, Gippner-Steppert C, Machleidt W, Fritz H. The role of phagocyte proteinases and proteinase inhibitors in multiple organ failure. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 1994; **150**: S123-S130.
101. Jones AE, Shapiro NI, Kilgannon JH, Trzeciak S. Goal-directed hemodynamic optimization in the post-cardiac arrest syndrome: A systematic review. *Resuscitation* 2008; **77**: 26-9.
102. Kagedal B, Lindqvist M, Farneback M, Lenner L, Peterson C. Failure of the PAXgene Blood RNA System to maintain mRNA stability in whole blood. *Clin.Chem.Lab Med.* 2005; **43**: 1190-2.

103. Kaminski KA, Bonda TA, Korecki J, Musial WJ. Oxidative stress and neutrophil activation--the two keystones of ischemia/reperfusion injury. *Int.J.Cardiol.* 2002; **86**: 41-59.
104. Kamphuis W, Cailotto C, Dijk F, Bergen A, Buijs RM. Circadian expression of clock genes and clock-controlled genes in the rat retina. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 2005; **330**: 18-26.
105. Kanehisa M. Prediction of higher order functional networks from genomic data. *Pharmacogenomics.* 2001; **2**: 373-85.
106. Keel M, Trentz O. Pathophysiology of polytrauma. *Injury* 2005; **36**: 691-709.
107. Kelly JL, O'Sullivan C, O'Riordain M *et al.* Is circulating endotoxin the trigger for the systemic inflammatory response syndrome seen after injury? *Ann.Surg.* 1997; **225**: 530-41.
108. Kern KB, Berg RA, Hilwig RW, Larson DF, Gaballa MA. Myocardial cytokine IL-8 and nitric oxide synthase activity during and after resuscitation: Preliminary observations in regards to post-resuscitation myocardial dysfunction. *Resuscitation* 2008.
109. Khreiss T, Jozsef L, Chan JS, Filep JG. Activation of extracellular signal-regulated kinase couples platelet-activating factor-induced adhesion and delayed apoptosis of human neutrophils. *Cell Signal.* 2004; **16**: 801-10.
110. Knoferl MW, Jarrar D, Schwacha MG *et al.* Severe hypoxemia in the absence of blood loss causes a gender dimorphic immune response. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 2000; **279**: C2004-C2010.
111. Kodama T, Yukioka H, Kato T, Kato N, Hato F, Kitagawa S. Neutrophil elastase as a predicting factor for development of acute lung injury. *Intern.Med.* 2007; **46**: 699-704.
112. Krebs DL, Hilton DJ. SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. *Stem Cells* 2001; **19**: 378-87.
113. Kundendorf U, Tran TH, Bulfone-Paus S. The Th1-Th2 paradigm in 1998: law of nature or rule with exceptions. *Nephrol.Dial.Transplant.* 1998; **13**: 2445-8.
114. Kuster H, Weiss M, Willeitner AE *et al.* Interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-6 for early diagnosis of neonatal sepsis 2 days before clinical manifestation. *Lancet* 1998; **352**: 1271-7.
115. Langhelle A, Nolan J, Herlitz J *et al.* Recommended guidelines for reviewing, reporting, and conducting research on post-resuscitation care: the Utstein style. *Resuscitation* 2005; **66**: 271-83.
116. Lee PD, Sladek R, Greenwood CM, Hudson TJ. Control genes and variability: absence of ubiquitous reference transcripts in diverse mammalian expression studies. *Genome Res.* 2002; **12**: 292-7.
117. Lefer AM, Ma XL. PMN adherence to cat ischemic-reperfused mesenteric vascular endothelium under flow: role of P-selectin. *J.Appl.Physiol* 1994; **76**: 33-8.
118. Lefering R, Goris RJ, van Nieuwenhoven EJ, Neugebauer E. Revision of the multiple organ failure score. *Langenbecks Arch.Surg.* 2002; **387**: 14-20.
119. Lemiale V, Huet O, Vigue B *et al.* Changes in cerebral blood flow and oxygen extraction during post-resuscitation syndrome. *Resuscitation* 2008; **76**: 17-24.
120. Lever A, Mackenzie I. Sepsis: definition, epidemiology, and diagnosis. *BMJ* 2007; **335**: 879-83.
121. Liu DW, Chen ST, Liu HP. Choice of endogenous control for gene expression in nonsmall cell lung cancer. *Eur.Respir.J.* 2005; **26**: 1002-8.

122. Loppnow H. [Cytokines: classification, receptors, mechanisms of action]. *Internist (Berl)* 2001; **42**: 13-27.
123. Lucchesi BR, Tanhehco EJ. Therapeutic potential of complement inhibitors in myocardial ischaemia. *Expert.Opin.Investig.Drugs* 2000; **9**: 975-91.
124. Madjdpour C, Jewell UR, Kneller S *et al.* Decreased alveolar oxygen induces lung inflammation. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 2003; **284**: L360-L367.
125. Marie C, Fitting C, Cheval C *et al.* Presence of high levels of leukocyte-associated interleukin-8 upon cell activation and in patients with sepsis syndrome. *Infect.Immun.* 1997; **65**: 865-71.
126. Martich GD, Danner RL, Ceska M, Suffredini AF. Detection of interleukin 8 and tumor necrosis factor in normal humans after intravenous endotoxin: the effect of antiinflammatory agents. *J.Exp.Med.* 1991; **173**: 1021-4.
127. Marty C, Misset B, Tamion F, Fitting C, Carlet J, Cavaillon JM. Circulating interleukin-8 concentrations in patients with multiple organ failure of septic and nonseptic origin. *Crit Care Med.* 1994; **22**: 673-9.
128. Matsushima K, Oppenheim JJ. Interleukin 8 and MCAF: novel inflammatory cytokines inducible by IL 1 and TNF. *Cytokine* 1989; **1**: 2-13.
129. Meller M, Vadachkoria S, Luthy DA, Williams MA. Evaluation of housekeeping genes in placental comparative expression studies. *Placenta* 2005; **26**: 601-7.
130. Menger MD, Vollmar B. Pathomechanisms of ischemia-reperfusion injury as the basis for novel preventive strategies: is it time for the introduction of pleiotropic compounds? *Transplant.Proc.* 2007; **39**: 485-8.
131. Miltenyi S, Muller W, Weichel W, Radbruch A. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 1990; **11**: 231-8.
132. Mokart D, Capo C, Blache JL *et al.* Early postoperative compensatory anti-inflammatory response syndrome is associated with septic complications after major surgical trauma in patients with cancer. *Br.J.Surg.* 2002; **89**: 1450-6.
133. Mollnes TE, Fosse E. The complement system in trauma-related and ischemic tissue damage: a brief review. *Shock* 1994; **2**: 301-10.
134. Morange M. The protein side of the central dogma: permanence and change. *Hist Philos.Life Sci.* 2006; **28**: 513-24.
135. Mosmann TR. Properties and functions of interleukin-10. *Adv.Immunol.* 1994; **56**: 1-26.
136. Mukaida N. Pathophysiological roles of interleukin-8/CXCL8 in pulmonary diseases. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 2003; **284**: L566-L577.
137. Mulligan MS, Jones ML, Vaporciyan AA, Howard MC, Ward PA. Protective effects of IL-4 and IL-10 against immune complex-induced lung injury. *J.Immunol.* 1993; **151**: 5666-74.
138. Mussack T, Biberthaler P, Gippner-Steppert C *et al.* Early cellular brain damage and systemic inflammatory response after cardiopulmonary resuscitation or isolated severe head trauma: a comparative pilot study on common pathomechanisms. *Resuscitation* 2001; **49**: 193-9.
139. Mussack T, Briegel J, Schelling G, Biberthaler P, Jochum M. Effect of stress doses of hydrocortisone on S-100B vs. interleukin-8 and polymorphonuclear elastase levels in human septic shock. *Clin.Chem.Lab Med.* 2005; **43**: 259-68.

140. Naldini A, Pucci A, Carraro F. Hypoxia induces the expression and release of interleukin 1 receptor antagonist in mitogen-activated mononuclear cells. *Cytokine* 2001; **13**: 334-41.
141. Negovsky VA. Postresuscitation disease. *Crit Care Med.* 1988; **16**: 942-6.
142. Negovsky VA. Postresuscitation disease. *Crit Care Med.* 1988; **16**: 942-6.
143. Negovsky VA, Gurvitch AM. Post-resuscitation disease--a new nosological entity. Its reality and significance. *Resuscitation* 1995; **30**: 23-7.
144. Negovsky VA, Gurvitch AM. Post-resuscitation disease--a new nosological entity. Its reality and significance. *Resuscitation* 1995; **30**: 23-7.
145. Neidhardt R, Keel M, Steckholzer U *et al.* Relationship of interleukin-10 plasma levels to severity of injury and clinical outcome in injured patients. *J.Trauma* 1997; **42**: 863-70.
146. Niemann JT, Garner D, Lewis RJ. Tumor necrosis factor-alpha is associated with early postresuscitation myocardial dysfunction. *Crit Care Med.* 2004; **32**: 1753-8.
147. Niemann JT, Rosborough JP, Youngquist S. Is the tumour necrosis factor-alpha response following resuscitation gender dependent in the swine model? *Resuscitation* 2008; **77**: 258-63.
148. Nolan JP, Deakin CD, Soar J, Bottiger BW, Smith G. European Resuscitation Council guidelines for resuscitation 2005. Section 4. Adult advanced life support. *Resuscitation* 2005; **67 Suppl 1**: S39-S86.
149. Oddo M, Ribordy V, Feihl F *et al.* Early predictors of outcome in comatose survivors of ventricular fibrillation and non-ventricular fibrillation cardiac arrest treated with hypothermia: a prospective study. *Crit Care Med.* 2008; **36**: 2296-301.
150. Ohlsson K, Laurell CB. The disappearance of enzyme-inhibitor complexes from the circulation of man. *Clin.Sci.Mol.Med.* 1976; **51**: 87-92.
151. Ohlsson K, Olsson I. Neutral proteases of human granulocytes. III. Interaction between human granulocyte elastase and plasma protease inhibitors. *Scand.J.Clin.Lab Invest* 1974; **34**: 349-55.
152. Ohlsson K, Olsson I. The neutral proteases of human granulocytes. Isolation and partial characterization of granulocyte elastases. *Eur.J.Biochem.* 1974; **42**: 519-27.
153. Osuchowski MF, Welch K, Siddiqui J, Remick DG. Circulating cytokine/inhibitor profiles reshape the understanding of the SIRS/CARS continuum in sepsis and predict mortality. *J.Immunol.* 2006; **177**: 1967-74.
154. Ovstebo R, Lande K, Kierulf P, Haug KB. Quantification of relative changes in specific mRNAs from frozen whole blood - methodological considerations and clinical implications. *Clin.Chem.Lab Med.* 2007; **45**: 171-6.
155. Pahl A, Brune K. Gene expression changes in blood after phlebotomy: implications for gene expression profiling. *Blood* 2002; **100**: 1094-5.
156. Park EM, Cho BP, Volpe BT, Cruz MO, Joh TH, Cho S. Ibuprofen protects ischemia-induced neuronal injury via up-regulating interleukin-1 receptor antagonist expression. *Neuroscience* 2005; **132**: 625-31.
157. Park YB, Lee SK, Kim DS, Lee J, Lee CH, Song CH. Elevated interleukin-10 levels correlated with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Clin.Exp.Rheumatol.* 1998; **16**: 283-8.

158. Parsons PE, Eisner MD, Thompson BT *et al.* Lower tidal volume ventilation and plasma cytokine markers of inflammation in patients with acute lung injury. *Crit Care Med.* 2005; **33**: 1-6.
159. Peiper SC, Wang ZX, Neote K *et al.* The Duffy antigen/receptor for chemokines (DARC) is expressed in endothelial cells of Duffy negative individuals who lack the erythrocyte receptor. *J.Exp.Med.* 1995; **181**: 1311-7.
160. Pell JP, Sirel JM, Marsden AK, Ford I, Walker NL, Cobbe SM. Presentation, management, and outcome of out of hospital cardiopulmonary arrest: comparison by underlying aetiology. *Heart* 2003; **89**: 839-42.
161. Pinteaux E, Rothwell NJ, Boutin H. Neuroprotective actions of endogenous interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) are mediated by glia. *Glia* 2006; **53**: 551-6.
162. Platzer C, Docke W, Volk H, Prosch S. Catecholamines trigger IL-10 release in acute systemic stress reaction by direct stimulation of its promoter/enhancer activity in monocytic cells. *J.Neuroimmunol.* 2000; **105**: 31-8.
163. Polanska B, Sidor D, Leszczyk-Kapusta I *et al.* Neutrophil elastase and interleukin-8 as inflammatory mediators in mechanically ventilated children. *Med.Sci.Monit.* 2004; **10**: CR463-CR468.
164. Radbruch A, Mechtold B, Thiel A, Miltenyi S, Pfluger E. High-gradient magnetic cell sorting. *Methods Cell Biol.* 1994; **42 Pt B**: 387-403.
165. Rainen L, Oelmueller U, Jurgensen S *et al.* Stabilization of mRNA expression in whole blood samples. *Clin.Chem.* 2002; **48**: 1883-90.
166. Reinsberg J, Dembinski J, Dorn C, Behrendt D, Bartmann P, van D, V. Determination of total interleukin-8 in whole blood after cell lysis. *Clin.Chem.* 2000; **46**: 1387-94.
167. Riese U, Brenner S, Docke WD *et al.* Catecholamines induce IL-10 release in patients suffering from acute myocardial infarction by transactivating its promoter in monocytic but not in T-cells. *Mol.Cell Biochem.* 2000; **212**: 45-50.
168. Rivest S, Lacroix S, Vallieres L, Nadeau S, Zhang J, Laflamme N. How the blood talks to the brain parenchyma and the paraventricular nucleus of the hypothalamus during systemic inflammatory and infectious stimuli. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 2000; **223**: 22-38.
169. Robertson CM, Coopersmith CM. The systemic inflammatory response syndrome. *Microbes.Infect.* 2006; **8**: 1382-9.
170. Rock CS, Lowry SF. Tumor necrosis factor-alpha. *J.Surg.Res.* 1991; **51**: 434-45.
171. Ronco C, Bonello M, Bordoni V *et al.* Extracorporeal therapies in non-renal disease: treatment of sepsis and the peak concentration hypothesis. *Blood Purif.* 2004; **22**: 164-74.
172. Rousset F, Garcia E, Defrance T *et al.* Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1992; **89**: 1890-3.
173. Roux-Lombard P. The interleukin-1 family. *Eur.Cytokine Netw.* 1998; **9**: 565-76.
174. Safar P. Effects of the postresuscitation syndrome on cerebral recovery from cardiac arrest. *Crit Care Med.* 1985; **13**: 932-5.
175. Safar P. Resuscitation from clinical death: pathophysiologic limits and therapeutic potentials. *Crit Care Med.* 1988; **16**: 923-41.

176. Sarma VJ, Huber-Lang M, Ward PA. Complement in lung disease. *Autoimmunity* 2006; **39**: 387-94.
177. Schall TJ, Bacon K, Toy KJ, Goeddel DV. Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature* 1990; **347**: 669-71.
178. Schmittgen TD, Lee EJ, Jiang J *et al.* Real-time PCR quantification of precursor and mature microRNA. *Methods* 2008; **44**: 31-8.
179. Schuetz P, Christ-Crain M, Muller B. Biomarkers to improve diagnostic and prognostic accuracy in systemic infections. *Curr.Opin.Crit Care* 2007; **13**: 578-85.
180. Schutze S, Machleidt T, Kronke M. Mechanisms of tumor necrosis factor action. *Semin.Oncol.* 1992; **19**: 16-24.
181. Shyu KG, Chang H, Lin CC, Huang FY, Hung CR. Concentrations of serum interleukin-8 after successful cardiopulmonary resuscitation in patients with cardiopulmonary arrest. *Am.Heart J.* 1997; **134**: 551-6.
182. Statistisches Bundesamt. Herz-/Kreislaufferkrankungen weiterhin häufigste Todesursache. Pressemitteilung Nr.385 . 21-9-2007.
183. Stoecklin G, Lu M, Rattenbacher B, Moroni C. A constitutive decay element promotes tumor necrosis factor alpha mRNA degradation via an AU-rich element-independent pathway. *Mol.Cell Biol.* 2003; **23**: 3506-15.
184. Strieter RM, Phan SH, Showell HJ *et al.* Monokine-induced neutrophil chemotactic factor gene expression in human fibroblasts. *J.Biol.Chem.* 1989; **264**: 10621-6.
185. Tamakuma S, Ogawa M, Aikawa N *et al.* Relationship between neutrophil elastase and acute lung injury in humans. *Pulm.Pharmacol.Ther.* 2004; **17**: 271-9.
186. Thellin O, Zorzi W, Lakaye B *et al.* Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J.Biotechnol.* 1999; **75**: 291-5.
187. Tichopad A, Dilger M, Schwarz G, Pfaffl MW. Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up. *Nucleic Acids Res.* 2003; **31**: e122.
188. Tsujimoto H, Ono S, Majima T *et al.* Neutrophil elastase, MIP-2, and TLR-4 expression during human and experimental sepsis. *Shock* 2005; **23**: 39-44.
189. Van Damme J. Granulocyte and monocyte chemotactic factors: stimuli and producer cells. *Adv.Exp.Med.Biol.* 1991; **305**: 1-9.
190. van der PT, Marchant A, Buurman WA *et al.* Endogenous IL-10 protects mice from death during septic peritonitis. *J.Immunol.* 1995; **155**: 5397-401.
191. Wang Q, Tang XN, Yenari MA. The inflammatory response in stroke. *J.Neuroimmunol.* 2007; **184**: 53-68.
192. Wang X, Zhao H, Andersson R. Proteomics and leukocytes: an approach to understanding potential molecular mechanisms of inflammatory responses. *J.Proteome.Res.* 2004; **3**: 921-9.
193. Wanidworanun C, Strober W. Predominant role of tumor necrosis factor-alpha in human monocyte IL-10 synthesis. *J.Immunol.* 1993; **151**: 6853-61.
194. Weiser MR, Williams JP, Moore FD, Jr. *et al.* Reperfusion injury of ischemic skeletal muscle is mediated by natural antibody and complement. *J.Exp.Med.* 1996; **183**: 2343-8.

195. Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N.Engl.J.Med.* 1989; **320**: 365-76.
196. Wood JJ, Rodrick ML, O'Mahony JB *et al.* Inadequate interleukin 2 production. A fundamental immunological deficiency in patients with major burns. *Ann.Surg.* 1984; **200**: 311-20.
197. Xiao W. Advances in NF-kappaB signaling transduction and transcription. *Cell Mol.Immunol.* 2004; **1**: 425-35.
198. Yi JH, Park SW, Kapadia R, Vemuganti R. Role of transcription factors in mediating post-ischemic cerebral inflammation and brain damage. *Neurochem.Int.* 2007; **50**: 1014-27.
199. Younger JG, Sasaki N, Delgado J *et al.* Systemic and lung physiological changes in rats after intravascular activation of complement. *J.Appl.Physiol* 2001; **90**: 2289-95.
200. Zahler S, Kowalski C, Brosig A, Kupatt C, Becker BF, Gerlach E. The function of neutrophils isolated by a magnetic antibody cell separation technique is not altered in comparison to a density gradient centrifugation method. *J.Immunol.Methods* 1997; **200**: 173-9.
201. Zheng Z, Luo Y, McMaster GK. Sensitive and quantitative measurement of gene expression directly from a small amount of whole blood. *Clin.Chem.* 2006; **52**: 1294-302.
202. Zong Q, Schummer M, Hood L, Morris DR. Messenger RNA translation state: the second dimension of high-throughput expression screening. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1999; **96**: 10632-6.
203. Zwaveling JH, Maring JK, Clarke FL *et al.* High plasma tumor necrosis factor (TNF)-alpha concentrations and a sepsis-like syndrome in patients undergoing hyperthermic isolated limb perfusion with recombinant TNF-alpha, interferon-gamma, and melphalan. *Crit Care Med.* 1996; **24**: 765-70.

8. Glossar

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ACCP	American College of Chest Physicians
AD	Actinomycin D
Ak	Antikörper
AMV-rt	Avian-Myeloblastosis-Virus rt
ANOVA	Analysis of Variance
AP	Activation Protein
APC	Antigenpräsentierende Zelle
BCG	Bacillus Calmette Guérin
Bp	Basenpaare
CAM	Cell Adhesion Molecules
CARS	compensatory anti-inflammatory response syndrome
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CO ²	Kohlendioxid
CP	crossing point
CPR	Cardiopulmonary Resuscitation
CSF	Koloniestimulierende Faktoren
DARC	Duffy antigen/ receptor for chemokines
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
Fa.	Firma
g	Zentrifugalkraft
G-6 PDH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	Granulozyten/ Makrophagen CSF
h	Stunde
HIF	Hypoxia-inducible factor
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL-10	Interleukin 10
IL-8	Interleukin 8
IL1-ra	Interleukin 1-receptor antagonist
JAK-STAT	Janus-Kinase STAT
kDa	Kilodalton
LEI	Leukozyten-Endothel-Interaktion
LPB	Lipoprotein-binding-protein
LPS	Lipopolysaccharid
MAC	Membranangriffskomplex
MACS	magnetic beads cell sorting
max.	maximal

MHC	Major Histocompatibility Complex
min.	Minute
ml	Milliliter
MODS	Multiple Organ Dysfunction Syndrome
MOF	Multiple Organ Failure
mRNA	messenger RNA
MW	Mittelwert
NAF	Neutrophil Activating Factor
NAP	Neutrophil Activating Protein
NF- B	Nuclear factor kappa B
NK	Natural Killer Cell
NSE	Neuronen-spezifische Enolase
OD	optische Dichte
PAF	Platelet activating Factor
PBGD	Porphobilinogen-Desaminase
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PBS	phosphate buffered saline
PECAM	Platelet/Endothelial cell adhesion molecule
pg	Pikogramm
PMN	Polymorphkerniger Leukozyt
PMN-Elastase	Poly-Morpho-Nukleäre Elastase
qRT-PCR	quantitative <i>Real-Time</i> Polymerase Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	reactive oxygen intermediates
ROSC	return of spontaneous circulation
rpm	Umdrehungen pro Minute
rt	reverse Transkriptase
SCCM	Society of Critical Care Medicine
sec.	Sekunde
SEM	Standard error of the Mean (Standardfehler)
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome
SOCS	Suppressors of cytokine signalling
STAT	Signal Transducers and Activators of transcription
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TGF	Transforming Growth Factor
Th	T-helper Cells
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF-	Tumor Necrosis Factor alpha
UV	Ultraviolett
VCAM	vascular cell adhesion molecule
vs.	versus
1-PI	Alpha 1 Antitrypsin/ Proteaseninhibitor
	Lambda = Wellenlänge

9. Chemikalien und Reagenzien

Folgende zur Versuchsdurchführung verwendete Reagenzien entstammen nicht aus den kommerziell erhältlichen Versuchsbestecken (unter Punkt 3. „Material und Methoden“ erwähnt) und wurden eigenständig hergestellt

Erythrozyten-Lysepuffer (pH 7,2)

	Konzentration	Einwaage/l Puffer
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	155 [mmol/l]	8,29 g
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃)	10 [mmol/l]	1 g
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	0,1 [mmol/l]	0,037 g

Lösung mit Salzsäure (1 mol/l) versetzen, bis pH-Wert 7,2

Phosphatpuffer 0,1 molar (pH 7,4)

800 ml Na₂HPO₄ (0,1 mol/l) + NaH₂PO₄ (0,1 mol/l) bis pH=7,4 (etwa 175 ml)

PBS-Puffer-Phosphate buffered saline (pH 7,4)

	Konzentration	Einwaage/l Puffer
Kaliumchlorid (KCl)	2,7 [mmol/l]	0,2 g
Natriumchlorid (NaCl)	137 [mmol/l]	8,0 g
Phosphatpuffer 0,1 molar; pH 7,4	10 [mmol/l]	100 ml

Lösung mit Salzsäure (1 mol/l) versetzen, bis pH-Wert 7,2

RLT-Puffer mit 2-Mercapto-Ethanol

100 ml RLT-Puffer (aus RNeasy Midi Kit) + 1,0 ml 2-Mercapto-Ethanol

TAE-Puffer – (Tris-Acetat-EDTA-Pufferlösung)

242 g Tris + 57,1 ml Eisessig + 100ml 0,5M EDTA pH 8,0

(mit H₂O bidest auf 1l auffüllen (= 50 fach konzentrierte Lösung)

(Verdünnung 1/50 für einfach konzentrierte Lösung)

10. Curriculum vitae

Henning Laven
Fasanenstrasse 9
82008 Unterhaching

Persönliche Angaben: Geburtsdatum: 06.10.1972

Geburtsort: Ibbenbüren in Westfalen

Konfession: evangelisch

Familienstand: verheiratet mit
Maren Eliane Laven, geb. Berghoff
(Maskenbildnerin), 2 gemeinsame Kinder

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Eltern: Manfred Laven (Krankenpfleger)
Ursula Laven (Industriekauffrau, ppa.)

Schulische Laufbahn: 1992 Allgemeine Hochschulreife
(Graf-Adolf-Gymnasium, 49545 Tecklenburg)

1989 Fachoberschulreife
(Städt. Realschule II, 49525 Lengerich)

Zivildienst: 1992-1993 Kliniken Tecklenburger Land, Tecklenburg

Berufsausbildung: 1993-1996 Ausbildung zum Krankenpfleger, Staatsexamen
(Städtische Kliniken, Osnabrück)

Berufliche Erfahrungen:

1996-2001	Beschäftigung als Krankenpfleger in der Anaesthesie u. operativen Intensivtherapie, Westf. Wilhelms-Universität, Münster
2001-2002	Kinderintensivstation, Deutsches Herzzentrum, München
2002-2005	Anaesthesiologische Intensivtherapiestation, Klinikum der Universität, München-Großhadern

Studium der Medizin:

1998-2001	Westf. Wilhelms-Universität, Münster
Herbst 2000	ärztliche Vorprüfung (Physikum)
Herbst 2001	erstes Staatsexamen
2001-2004	LMU München
Herbst 2003	zweites Staatsexamen
Herbst 2004	drittes Staatsexamen

Ärztlich Klinische Tätigkeit:

März 2005	Approbation
seit April 2005	Assistenzarzt im Klinikum der Universität München, Klinik für Anaesthesiologie, Direktor: Prof. Dr. B. Zwißler

11. Schlussbemerkung und Danksagung

Meinem geschätzten Doktorvater, Herrn PD Dr. Peter Biberthaler, möchte ich für seine immerwährende Motivation und Unterstützung im Rahmen der Arbeitsgruppe „*Trauma and Resuscitation*“, der freundlichen Überlassung des Themas und im Besonderen bei der Fertigstellung dieser Arbeit danken. Seine stets konstruktive Kritik und prägnante Analyse der Studie waren für mich überaus hilfreich.

Mein ausdrücklicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wolf Mutschler, Direktor der Chirurgischen Klinik und Poliklinik des Klinikums der Ludwig Maximilians-Universität München (Innenstadt), für das Bereitstellen der Mittel und der wissenschaftlichen Förderung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Jürgen Landes danke ich sehr für seine ausdauernde und engagierte Betreuung bei der Durchführung dieser Arbeit. Seine unermüdliche wissenschaftliche und freundschaftliche Unterstützung während der gesamten Studie und darüber hinaus haben wesentlich zum Gelingen beigetragen.

Ein herzlicher Dank ist an Frau Prof. Dr. rer. nat. Marianne Jochum, Leiterin der Abteilung für klinische Chemie und Biochemie, sowie den Mitarbeitern des chirurgischen Forschungslabors, insbesondere Herrn Dr. rer. nat. Peter Neth und Frau Dr. rer. nat. Cornelia Gippner-Steppert, für Ihre Hilfsbereitschaft und weiterbringende Kritik während der Laboranalysen gerichtet.

Außerdem gebührt mein Dank den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „Trauma and Resuscitation“ und im Besonderen Herrn Christian Schütz für seine universelle Mithilfe bei der Bewältigung der praktischen Arbeit.

Allen beteiligten Notärzten und dem Rettungsdienstpersonal der NAW-Besatzung „Florian 1-70-1“ der Berufsfeuerwehr München, Standort München-Mitte gilt mein aufrichtiger Dank für die freundliche Kooperation während der präklinischen Durchführung dieser Studie.

Frau Dipl. Soz. Päd. Doris Berghoff möchte ich für Ihre hilfreiche Beratung bei der schriftlichen Niederlegung dieser Arbeit danken.

Meinen Eltern danke ich für Ihre allumfassende Unterstützung während meiner gesamten Studienzeit und darüber hinaus. Ohne Sie wäre mein beruflicher Werdegang unerreicht.

Meine ganz besondere Dankbarkeit gebührt jedoch meiner lieben Ehefrau Maren Laven und meinen Söhnen Noah und Jona, die mir durch Ihren immerwährenden Beistand mittels aufmunternder Worte, Gesten und nicht zuletzt den Verzicht auf viele, sonst gemeinsam verbrachte Stunden erst die Möglichkeit gaben, diese Arbeit erfolgreich durchzuführen. Ohne Ihr liebevolles Dazutun und Verständnis wäre die Vollendung dieser Arbeit sicherlich nicht erfolgreich gewesen.