

Aus der Klinik für Allgemeine, Unfall-, Hand- und Plastische Chirurgie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Wolf E. Mutschler

**Perioperative Analyse initialer intra- und extrazellulärer
Aktivierungsfaktoren bei Patienten mit kolorektalem
Adenokarzinom**

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

vorgelegt von
Dirk Rumpff
aus
Dortmund
2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. T. Mussack

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Christina Rieger
Priv. Doz. Dr. Andreas Jung

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. C. Gippner-Steppert
PD Dr. D. Nägler
Dr. med. R. Ladurner

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

Tag der mündlichen Prüfung: 31.01.2013

INHALTSVERZEICHNIS

A ZUSAMMENFASSUNG	5
B EINLEITUNG	6
B 1 Kolorektales Karzinom	6
B 1.1 Klinik / Krankheitsbild	6
B 1.2 Prävention versus Manifestation	6
B 1.3 Epidemiologie	7
B 1.4 Diagnostik	8
B 1.5 Ätiopathogenese und Klassifikation	9
B 1.6 Therapie	16
B 1.7 Prognose und Komplikationen	20
B 2 Induktion der Immunreaktion nach Trauma	21
B 3 Inflammatorische Prozesse	23
B 4 Immunkompetente Zellen	25
B 4.1 Neutrophile Granulozyten	25
B 4.2 Monozyten / Makrophagen	26
B 5 Mediatoren	27
B 5.1 Pro-inflammatorische Zytokine	27
<i>B 5.1.1 Tumor-Nekrose-Faktor α</i>	27
<i>B 5.1.2 Interleukin 8</i>	29
B 5.2 Anti-inflammatorische Zytokine	30
<i>B 5.2.1 Interleukin 10</i>	30
B 5.3 weitere Mediatoren	31
<i>B 5.3.1 PMN-Elastase</i>	32
<i>B 5.3.2 Cathepsin X</i>	33
C ZIELSETZUNG UND FRAGESTELLUNG	34
D STUDIENDESIGN	37
D 1 Ein- und Ausschlusskriterien	37
D 2 Studienpopulation	37
D 3 Messzeitpunkte	37
E MATERIAL UND METHODEN	
E 1 Kits und Chemikalien	39
E 2 Geräte	42
E 3 Methoden	42
E 3.1 Blutentnahmen	42
E 3.2 Differentialblutbild	43
E 3.3 Separation von mononukleären Zellen	43
E 3.4 Isolierung von Monozyten und Granulozyten	43
E 3.5 Isolierung von Gesamt RNA aus PAXgene Tubes	45
E 3.6 Isolierung von total RNA aus Monozyten und Granulozyten	46
E 3.7 cDNA Synthese / Reverse Transkription	46
E 3.8 Auswahl des <i>house-keeping-genes</i>	47
E 3.9 RT-PCR / LightCycler	47

E 3.10	Agarose-Gelelektrophorese	50
E 3.11	Enzymimmunoassays	50
E 3.11.1	<i>Interleukin 8</i>	50
E 3.11.2	<i>Interleukin 10</i>	50
E 3.11.3	<i>Tumor-Nekrose-Faktor α</i>	51
E 3.11.4	<i>PMN-Elastase</i>	51
E 3.11.5	<i>Cathepsin X</i>	51
E 4	Auswertung	52
E 4.1	Klinische Auswertung	52
E 4.2	Statistische Auswertung	52
F	ERGEBNISSE	53
F 1	Operatives Vorgehen	53
F 2	Histopathologische Untersuchung der Resektate	54
F 3	Differentialblutbild	54
F 4	Messungen der Expressionsprofile	57
F 4.1	Vorbemerkungen	57
F 4.2	Validität und Spezifität der PCR	58
F 4.3	Gelelektrophorese	60
F 4.4	Vergleich der Zellseparation mit dem PAXgene-Abnahmesystem anhand der Expression von GAPDH und Tumor-Nekrose-Faktor α	61
F 4.5	Vergleich der Expression von Interleukin 8 und Interleukin 10 in Granulozyten und Monozyten	70
F 4.6	Expression von PMN-Elastase in Granulozyten	73
F 4.7	Expression von Cathepsin X in Monozyten	74
F 4.8	Normierung auf GAPDH	75
F 5	ELISA-Messungen	77
F 5.1	Tumor-Nekrose-Faktor α und Interleukin 8	77
F 5.2	Interleukin 10	78
F 5.3	Cathepsin X und PMN-Elastase	79
G	DISKUSSION	80
G 1	Studiendesign	80
G 2	Methoden	82
G 3	Vergleich der Studienergebnisse mit Daten aus der Literatur	88
G 3.1	Vergleich PAXgene versus Zellseparation	88
G 3.2	Vergleich der Ergebnisse der RT-PCR- und ELISA- Messungen	89
G 3.3	Pro-versus antiinflammatorische Zytokine	90
G 3.4	Cathepsin X und PMN-Elastase	94
G 4	Schwächen und Fehlerquellen des Studiendesigns	95
G 5	Schlußfolgerung und Ausblick	97
H	LITERATURVERZEICHNIS	99
I	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	109
K	CURRICULUM VITAE	111
L	DANKSAGUNG	113

A Zusammenfassung

Bei großen chirurgischen Eingriffen, wie bei der Resektion eines kolorektalen Karzinoms, wird sehr schnell eine hyperinflammatorische Immunantwort induziert, die von der Freisetzung der pro-inflammatorischer Zytokine $\text{TNF}\alpha$ und IL-8 sowie der Aktivierung der neutrophilen Granulozyten und Makrophagen charakterisiert ist. Diese Freisetzung führt zu einer Akute-Phase-Reaktion, die ebenfalls eine Hochregulation vieler anti-inflammatorischer Mediatoren, unter anderem von IL-10 zur Folge hat. Bei allen Studien-Patienten konnten diese pro- und antiinflammatorische Reaktionen schon wenige Stunden nach erfolgter kolorektaler Operation beobachtet werden. Die Auswertungen der Proteinanalysen zeigten ebenfalls, dass diese Reaktionen – ähnlich wie bei polytraumatisierten Patienten – in kurzem Abstand zur Operation induziert werden. So erreicht das Protein-Expressionsniveau von IL-8 bereits nach 6 Stunden, von IL-10 nach 12 Stunden, von PMN-Elastase nach 24 Stunden und von $\text{TNF}\alpha$ und Cathepsin X nach 48 Stunden ein Maximum. Interessanterweise ergab der Vergleich der etablierten Zellseparation mit dem PAXgene-Abnahmesystem zur Erfassung der mRNA mittels RT-PCR einen deutlichen Informationsverlust bei der RNA-Isolierung aus PAXgene.

Die mRNA-Profile der einzelnen Parameter zeigten tendenziell zunächst eine Abnahme der Kopienzahlen zum 6 Stunden-Wert hin. Erst danach war ein Anstieg der mRNA-Expression zu detektieren. Die fehlende Vergleichbarkeit der Expressionsprofile auf mRNA- und Proteinebene legen als eine denkbare Möglichkeit die Vermutung nahe, dass nach Aktivierung der Zellen durch den operativen Eingriff bereits präformierte Proteine freigesetzt werden. Im Bezug auf die Zytokin-Biologie ergeben sich für den quantitativen Nachweis von mRNA im Gegensatz zum Nachweis auf Proteinebene folgende Vorteile: Die meisten Zytokine werden in sehr geringen Mengen produziert, besitzen eine niedrige Halbwertszeit und nach ihrer Freisetzung erfolgt eine schnelle Utilisation nach autokriner oder parakriner Übertragung bei Zell-zu-Zell-Kontakt.

B Einleitung

B 1 Das kolorektale Karzinom

B 1.1 Klinik / Krankheitsbild

Beim Kolonkarzinom handelt es sich um einen maligne entarteten Tumor des Dickdarms. Auch heute noch gelingt die frühzeitige Erkennung eines Kolonkarzinoms nur in einem Teil der Fälle. Kolonkarzinome können relativ lange ohne klinische Symptome bleiben. Besonders in den oral gelegenen Kolonanteilen führen auch größere Tumoren wegen der weichen Stuhlbeschaffenheit weder zu Schmerzen noch zu Blutungen. Im Vordergrund stehen Änderungen der Stuhlgewohnheiten, Obstipation, zum Teil abwechselnd mit Durchfall, Blutabgänge und Gewichtsverlust. Spätsymptome stellen Anämie, Schmerzen bei ausgedehntem Primärtumor sowie ein Ileus dar. Entsprechende Symptome, vor allem Blutbeimengungen oder ein positiver Hämokkult-Test sind immer eine Indikation für die diagnostische Abklärung des gesamten Dickdarmes, auch bei bekannten Hämorrhoiden. Ist mittels der Koloskopie eine komplette Abklärung nicht möglich, so sollte das Kolon durch eine Röntgenuntersuchung im Doppelkontrastverfahren abgeklärt werden. Die weitere präoperative Diagnostik verfolgt neben der allgemeinen klinischen Untersuchung die Beantwortung der Frage nach lokaler Tumorausbreitung, Fernmetastasierung und allgemeiner Operabilität. Nach den Empfehlungen der WHO darf die Diagnose eines Kolonkarzinoms nur gestellt werden, wenn der Tumor die Muskularis mukosae überschritten hat, da vorher nicht mit einer Metastasierung zu rechnen ist [Schmiegel et al., 2004].

B 1.2 Prävention versus Manifestation

Kein anderer Tumor weist eine so langsame Entwicklung über Vorstadien in Form von Polypen und Dysplasien auf und gibt soviel Zeit zum Handeln. Mit dem tastenden Finger und dem Proktoskop müssten eigentlich mehr als die Hälfte aller Rektumkarzinome (Abb. B-1) erreicht werden können. Trotzdem werden nur etwa 30% im prognostisch günstigen Stadium I entdeckt und operiert. 90 % aller malignen Dickdarntumore entstehen aus Polypen, die endoskopisch abgetragen werden könnten. [Siebeck et al., 2001]. In den vergangenen Jahren hat die Früherkennung von malignen Entartungen zugenommen, da deutlich häufiger eine präventive Diagnostik durchgeführt wird. Die Ätiologie des kolorektalen Karzinoms ist unbekannt. Während bei 25-30% der erkrankten Patienten eine familiäre Häufung beobachtet werden kann, so ist in nur 3% dieser Fälle ein wissenschaftlicher Zusammenhang nachweisbar [Kirchhoff et al., 2006].

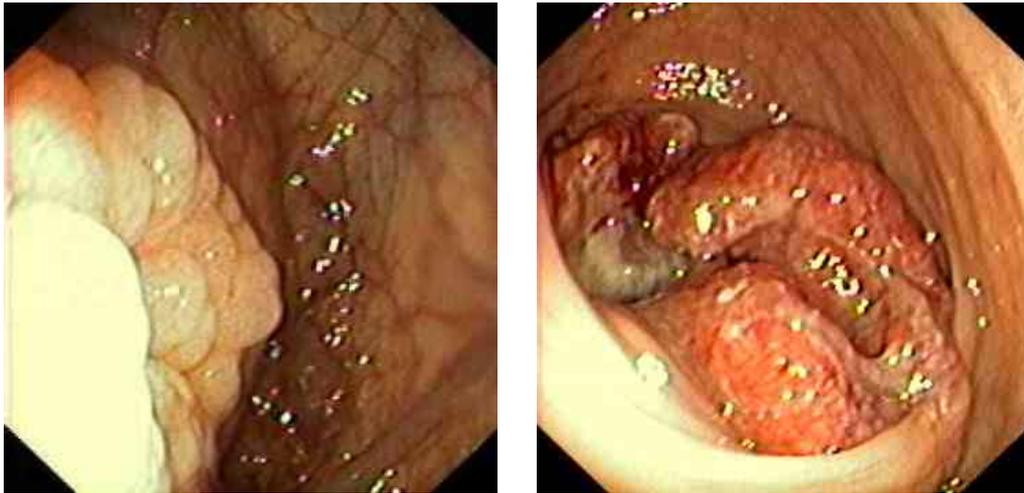


Abbildung B-1: Rektumadenom (links) und Rektumkarzinom (rechts) koloskopisch dargestellt [Das Photo wurde freundlicherweise von Prof. Dr. T. Mussack (Chirurgische Klinik und Poliklinik- Innenstadt, Klinikum der Universität München) zur Verfügung gestellt.]

Besondere Risikofaktoren für die Entstehung sind zum einen Adenome des Kolons (Abb. B-1) und entzündliche Darmerkrankungen wie Colitis Ulcerosa oder Morbus Crohn, zum anderen Adipositas, zu fetthaltige Kost, fehlende körperliche Aktivität, eine positive Familienanamnese sowie diverse andere entzündliche Erkrankungen wie Ruhr oder eine intestinale Schistosomiasis. Das hereditäre nicht-polypöse Kolorektalkarzinom bzw. Lynch oder auch familiäres Krebsyndrom wird autosomal dominant auf Chromosom 2, 3 oder 7 mit einem Karzinomrisiko von 70-80% vererbt [Herold et al., 2004].

B 1.3 Epidemiologie

Das kolorektale Karzinom, das bisher bevorzugt im höheren Lebensalter aufgetreten war, gehört zu den Malignomen mit der höchsten Erkrankungshäufigkeit pro Jahr und zeigt sich zunehmend auch bei unter Fünfzigjährigen. Etwa 10% sind hereditär bedingt, 5% entwickeln sich nach entzündlichen Darmerkrankungen, die Mehrzahl von 80–85% entsteht hingegen sporadisch durch eine mögliche Adenom-Karzinom-Sequenz [Boese-Landgraf et al., 1998]. Mit einer Inzidenz von 50 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner im Jahr für Kolon- und Rektumkarzinome zusammen, lässt sich seit Mitte der 80iger Jahre eine steigende Tendenz erkennen. Lange Zeit war man der Meinung, dass diese hohe Zunahme lediglich auf eine bessere Diagnostik und die höhere Lebenserwartung zurückzuführen sei [Kahi et al., 2009]. Unter anderem ursächlich zeigt sich eine zu „gute“, ballaststoffarme Ernährung.

Das derzeitige „Life-time-risk“ an einem Kolonkarzinom zu erkranken, ausgenommen der Risikofaktor einer familiären Belastung, beträgt für jeden Bundesbürger 4-6% [Kahi et al., 2009]. Es gilt heute als gesichert, dass die endoskopische Polypektomie das Risiko der Entstehung eines Kolonkarzinoms in den folgenden 6 Jahren um 50% senkt [Schalhorn et al., 2001].

B 1.4 Diagnostik

Der Hämokkult-Test (Abb. B-2) zum Nachweis von okkultem Blut im Stuhl wird als Screening in der Vorsorgeuntersuchung auf Kolon- und Rektumkarzinome eingesetzt. Beim bisher üblichen Testsystem handelt es sich um den so genannten „Guajak-Test“, einem chemischen Nachweisverfahren von nicht sichtbarem Blut im Stuhl. Ein moderneres Testverfahren (z.B. „X-Care Stuhltest“ oder „gabOkkult“) basiert auf einem immunologischen Nachweis von nicht sichtbarem Blut im Stuhl. Es detektiert über eine spezifische Antikörperreaktion ausschließlich humanes Hämoglobin und ist damit unabhängig von der Nahrungsaufnahme (Fleisch und Vitamin C als Nahrungsbestandteile haben die herkömmlichen Testergebnisse beeinflusst) und sehr viel sensitiver als der bisherige Guajak Test [Launoy et al., 2005].



Abbildung B-2: Hämokkult-Test zum Nachweis von okkultem Blut im Stuhl

[Firma Beckmann-Coulter]

Die komplette Koloskopie stellt das Standardverfahren zur Detektion kolorektaler Karzinome und Polypen dar [Mesihovic et al., 2008]. Sie besitzt die höchste Sensitivität und Spezifität für das Auffinden von kolorektalen Karzinomen und Polypen. Bei Personen mit durchschnittlichem Karzinomrisiko nimmt die Inzidenz von Rektumkarzinomen vom 40. bis zum 50. Lebensjahr

deutlich zu. Als Vorsorge sollte bei Frauen und Männern ab dem 40. Lebensjahr jährlich eine digital-rektale Untersuchung stattfinden [Schmiegel et al. 2004]. Einige Arbeitsgruppen empfehlen auch eine zumindest einmalige totale Koloskopie im Alter von 50 bis 65 Jahren als Screening [Bond et al 2001; Inadomi et al., 2000; Lieberman et al., 2000]. Obwohl das kolorektale Karzinom die zweithäufigste Todesursache in Deutschland ist, werden die angebotenen Früherkennungsuntersuchungen, wie z.B. der transrektale Ultraschall (Abb. B-3) bislang viel zu wenig in Anspruch genommen [Rex et al., 2009].

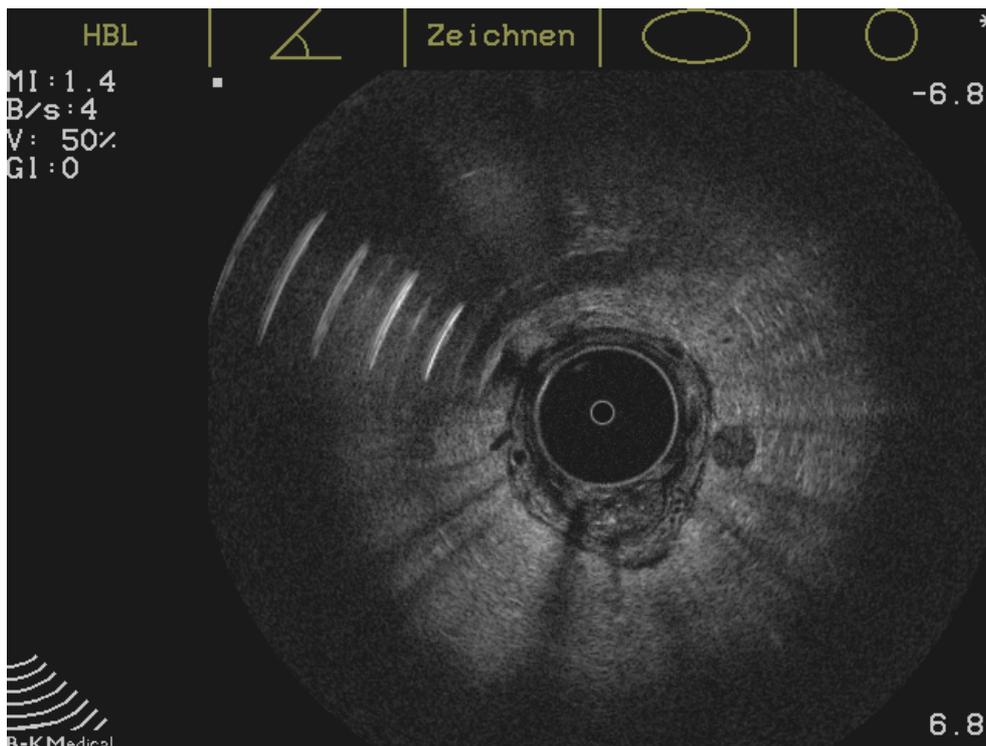


Abbildung B-3: Rektales Karzinom im transrektalen Ultraschall

[Das Photo wurde freundlicherweise von Prof. Dr. T. Mussack zur Verfügung gestellt.]

B 1.5 Ätiopathogenese und Klassifikation

Knapp 55% aller kolorektalen Karzinome sind im Rektum lokalisiert. Von den restlichen Kolonkarzinomen finden sich 5% im Colon ascendens, 15% im Colon transversum und 25% im Colon descendens (Abb. B-4). Mehrfachkarzinome finden sich bei 2–3% der Patienten. Nach dem internationalen Dokumentationssystem gelten als Rektumkarzinome Tumore, deren aboraler Rand bei der Messung mit dem starren Rektoskop 16 cm oder weniger von der Anokutanlinie entfernt ist. Nach der UICC 2002 werden die Rektumkarzinome entsprechend ihrem Abstand von der Anokutanlinie in Karzinome des oberen Rektumdrittels (12 bis 16 cm), des mittleren

Rektumdrittels (6 bis <12 cm) und des unteren Rektumdrittels (< 6 cm) unterteilt (Abb. B-4). Adenokarzinome werden entsprechend ihrem Differenzierungsgrad (Grading) in G1–G4 unterteilt [Nicholls et al., 1982].

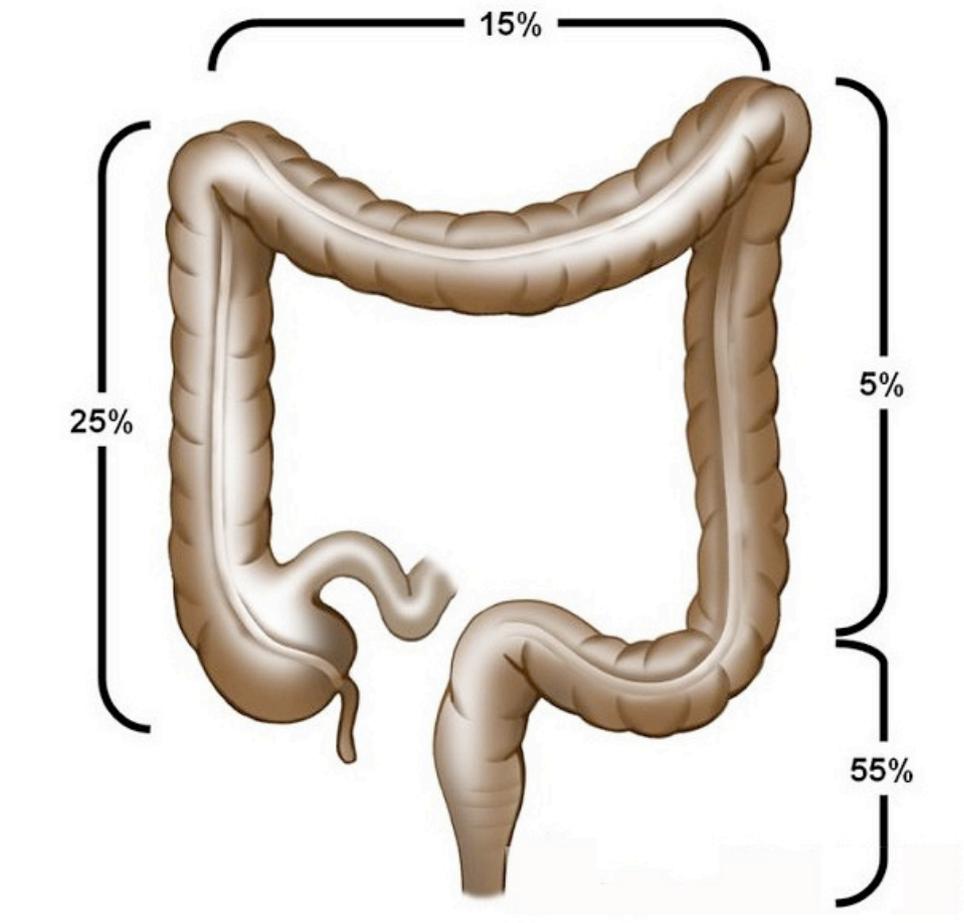


Abbildung B-4: Häufigkeiten der Karzinom-Lokalisationen in den verschiedenen Abschnitten des Kolons [Bhargava et al., 2005]

Die Lage und die Höhe des Rektumkarzinoms werden mit dem starren Rektoskop festgestellt. Dabei muss der dorsale Kurvenverlauf des Rektums berücksichtigt werden. Gemessen wird der Abstand von der Linea dentata zum Unterrand des Karzinoms. Entscheidend für die Resektabilität ist allerdings der Abstand des Tumors zur Analmuskulatur. Das klinische Stadium kann ebenfalls durch den tastenden Finger festgestellt werden. Bei der digitalen Untersuchung erfolgt auch die Beurteilung der Sphinkterfunktion, welche bei geplanter tiefer Resektion auch durch Sphinktermanometrie und Elektromyographie ergänzt werden kann [Schmiegel et al., 2004].

Es werden folgende histologische Karzinomtypen unterschieden:

- Adenokarzinom (85–90%)
- Muzinöses Adenokarzinom (5–10%)
- Siegelringzellkarzinom (1%)
- Adenosquamöses Karzinom
- Kleinzelliges Karzinom (Haferzellkarzinom)
- Undifferenziertes Karzinom (1%)

Zu den seltenen Karzinomtypen zählen:

- Karzinoide
- Lymphome
- maligne und benigne Bindegewebstumoren

Die Ausbreitung eines Rektumkarzinoms geschieht über eine lymphogene und später auch hämatogene Metastasierung sowie über Tumorzellnester im perirektalen Fett.

[Schalhorn et al., 2001].

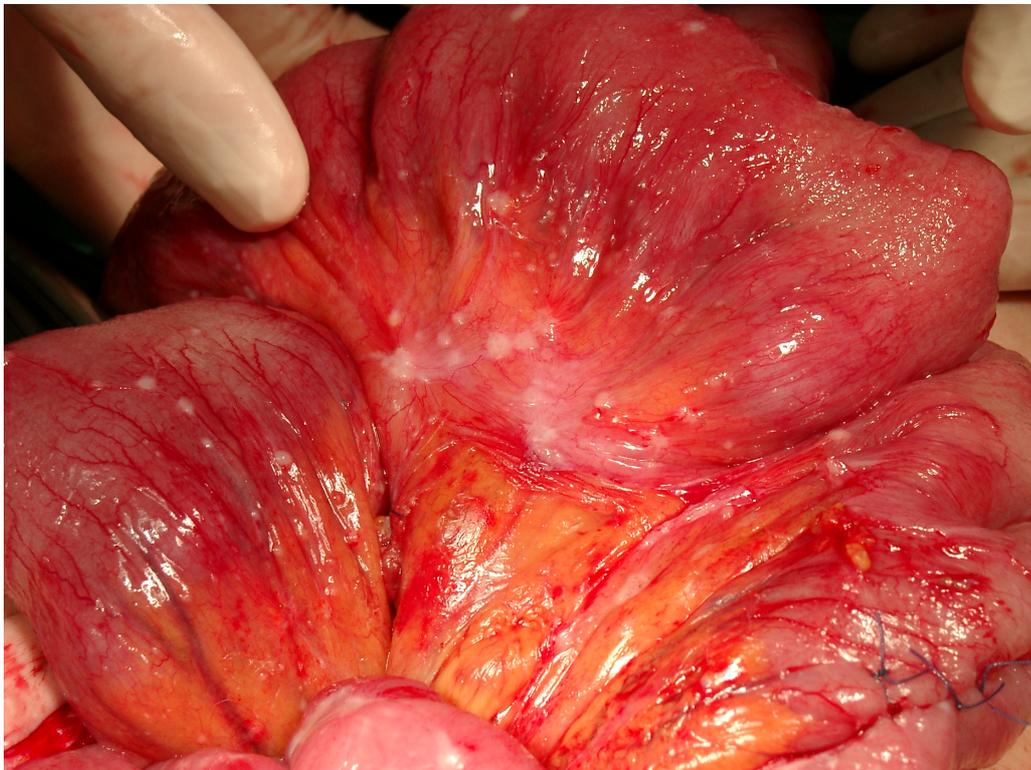


Abbildung B-5: intraperitoneale Metastasierung

[Das Photo wurde von Prof. Dr. T. Mussack zur Verfügung gestellt.]

Die früher übliche Einteilung nach Dukes mit der Modifikation von Astler-Coller sollte nicht mehr benutzt werden, sondern die UICC-Klassifikation in ihrer letzten Version von 2002 [UICC 2002] mit der TNM-Einteilung [Sobin et al., 1988] und den entsprechenden Stadiengruppierungen. Das TNM- System basiert auf der Festlegung folgender drei Komponenten:

- a) Ausdehnung des Primärtumors (T) (Tabelle B-1)
- b) Fehlen oder Vorhandensein und Ausdehnung von regionären Lymphknotenmetastasen (N) (Tabelle B-2)
- c) Fehlen oder Vorhandensein von Fernmetastasen (M) (Tabelle B-3)

Zusätzlich zum TNM-System wird mittels der G-Kategorie der Differenzierungsgrad des Tumors in Form des Gratings (G) beschrieben (Tabelle B-4).

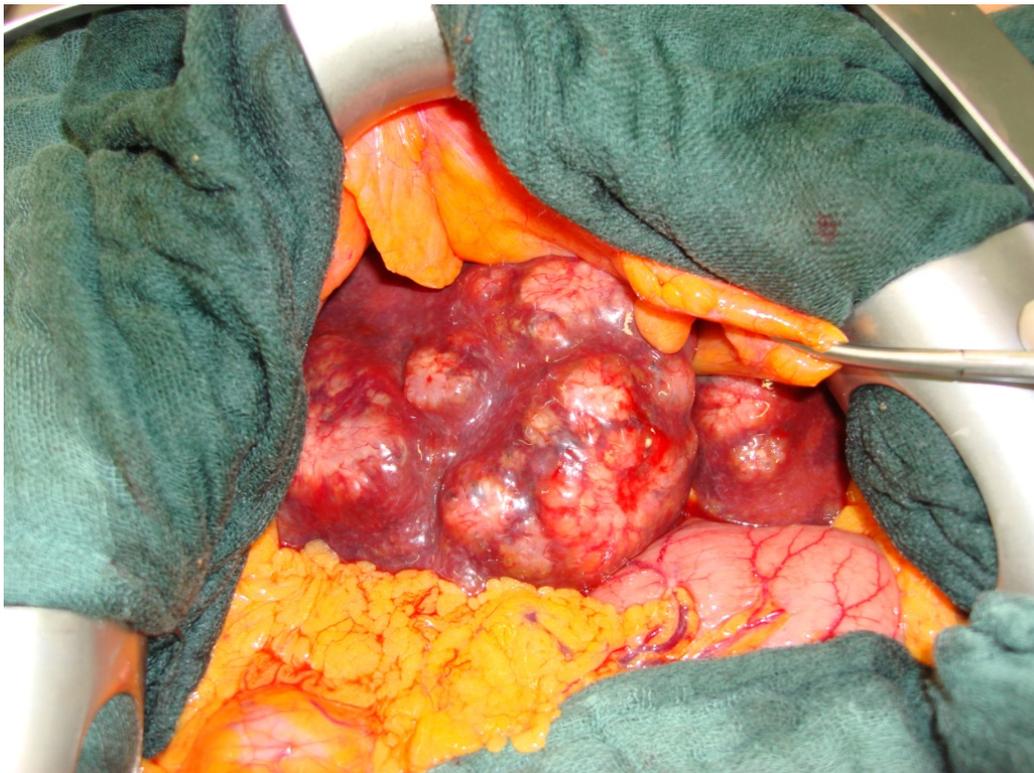


Abbildung B-6: Lebermetastasen eines kolorektalen Karzinoms

[Das Photo wurde von PD Dr. T. Mussack zur Verfügung gestellt.]

TNM-Einteilung kolorektaler Karzinome [nach UICC-Klassifikation 2002]:

Tabelle B-1: Tumoreinteilung nach UICC 2002

T	Primärtumor
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ ¹
T1	Tumor infiltriert Submukosa
T2	Tumor infiltriert Muscularis propria
T3	Tumor infiltriert durch die Muscularis propria in die Subserosa oder in nicht peritonealisiertes perikolisches oder perirektales Gewebe
T4	Tumor infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen ^{2,3} und/oder perforiert das viszerale Peritoneum

Anmerkungen:

¹ Tis liegt vor, wenn Tumorzellen innerhalb der Basalmembran der Drüsen (intraepithelial) oder in der Lamina propria (intramukös) nachweisbar sind, ohne dass eine Ausbreitung durch die Muscularis mucosae in die Submukosa feststellbar ist.

² Direkte Ausbreitung in T4 schließt auch die Infiltration anderer Segmente des Kolorektums auf dem Weg über die Serosa ein, z. B. die Infiltration des Sigmas durch ein Zoekalkarzinom.

³ Ein Tumor, der makroskopisch an anderen Organen oder Strukturen adhärent ist, wird als T4 klassifiziert. Ist bei der histologischen Untersuchung in den Adhäsionen kein Tumorgewebe nachweisbar, soll der Tumor als pT3 klassifiziert werden, dabei steht das p symbolisch für postoperativ.

Tabelle B-2: Lymphknoteneinteilung nach UICC 2002

N	Regionäre Lymphknotenmetastasen
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in 1–3 regionären Lymphknoten
N2	Metastasen in 4 oder mehr regionären Lymphknoten

Tabelle B-3: Metastaseneinteilung nach UICC 2002

M	Fernmetastasen
MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen vorhanden (Abb. B-9)

Tabelle B-4: Tumorgrading nach UICC 2002

G	Grading
GX	Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt werden
G1	hochdifferenziertes Gewebe geringer Malignität
G2	mitteldifferenziertes Gewebe mäßiger Malignität
G3	niedrigdifferenziertes Gewebe hoher Malignität
G4	undifferenziertes Gewebe sehr hoher Malignität

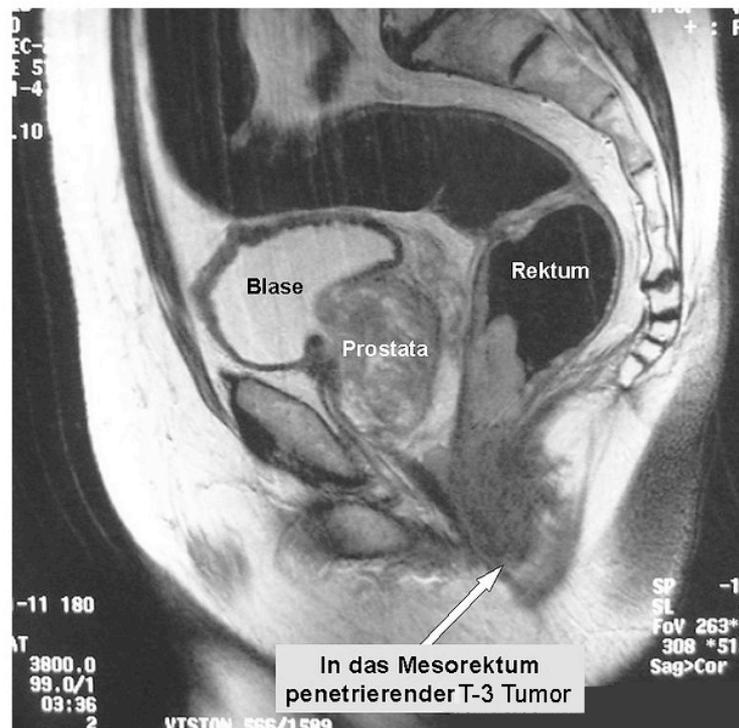


Abbildung B-7: In das Mesorektum penetrierender T-3 Tumor [Bhargava et al, 2005]

Die Ausdehnung über den Primarius hinaus erfolgt durch kontinuierliche lymphonodale und hämatogene Metastasierung. Zur Prognoseabschätzung und Planung der weiteren Therapiemodalitäten ist die genaue Klassifizierung des Lymphknotenstatus erforderlich. [Siebeck et al., 2001]. Die Metastasen des kolorektalen Karzinoms haben eine Prädilektion für Leber (Abb. B-6) und Lunge, seltener Skelett und Gehirn. Bei manchen Patienten finden sich über längere Zeit ausschließlich Lebermetastasen. Bei dieser biologischen Variante liegt ein prognostisch etwas günstigerer Verlauf vor im Vergleich zu Patienten mit zusätzlichen oder ausschließlich extra-hepatischen Metastasen.

Entsprechend dem Metastasierungsweg finden sich beim Kolonkarzinom eher Lymphknoten-, Leber-, Lungen- und Skelettmetastasen, in Spätstadien auch Hirnmetastasen. Beim Rektumkarzinom tritt vor allem das lokoregionäre Rezidiv mit Peritonealkarzinose und Kreuzbeininfiltation auf, gefolgt von Leber- und Lungenmetastasen. Beim Tumorsitz im mehr proximalen Kolon bis einschließlich Transversum finden sich in 75-80% der Fälle Lebermetastasen und in 20-30% Lungenmetastasen, beim Rektumkarzinom in 45-50% Lungenmetastasen und in 50-60% Lebermetastasen [Berghella et al., 1996]. An einem kolorektalen Karzinom erkrankte Patienten haben heute bei frühzeitiger Diagnosestellung durch eine chirurgische Behandlung gute Chancen auf Heilung. Bei dem Resektionsausmaß werden onkologische Radikalitätskriterien als angemessen betrachtet.

Nach radikaler Tumorresektion sind für die weitere Therapieplanung Aussagen über die lokoregionäre Vollständigkeit der Tumorentfernung (R-Klassifikation), die Invasionstiefe des Tumors (pT-Klassifikation) und den Lymphknotenstatus (pN-Klassifikation) notwendig, wobei sich hieraus u.U. die Indikation zur Nachbehandlung mit einer Chemo- bzw. Radiochemotherapie ergibt. Erforderlich ist eine Aussage über die Anzahl untersuchter und befallener Lymphknoten. Mindestens 12 Lymphknoten sollten nach Möglichkeit untersucht werden [Siebeck et al., 2001].

Eine histopathologischen Resektat-Befundung sollte im Wesentlichen folgende Punkte beinhalten:

1. Anzahl der Karzinome im Präparat
2. Resektatlänge
3. Aboraler und ggf. radiärer minimaler Sicherheitsabstand
4. Größter Tumordurchmesser
5. Typisierung des Tumors (Adeno-Ca, Plattenepithel-Ca etc.)
6. Grading des Tumors
7. Dissoziation der Tumorzellen im Bereich der Invasionsfront
8. Invasionstiefe des Tumors (pT-Kategorie)
9. Invasion von Nachbarstrukturen
10. Zahl der untersuchten und befallenen Lymphknoten
11. pN-Kategorie
12. M-Kategorie
13. Histologie der Resektionslinien
14. R-Klassifikation
15. Qualitätserfassung der Totalen Mesorektalen Exzisions (TME) (bei Rektum-Ca)
16. Tumorstadium

B 1.6 Therapie

Je nach Ausmaß und Lokalisation des Tumors sind eine operative Therapie, eine Strahlen-, Chemo- und eine neoadjuvante Radiotherapie denkbar. Bei den Kolonkarzinomen wird operativ zur Entfernung des Tumors eine en-bloc-Resektion des tumortragenden Anteils mit seinem Lymphabflussgebiet im gesunden Gewebe angestrebt. Das Ausmaß der Resektion wird von den zu unterbindenden Gefäßen bestimmt, die den Darmabschnitt versorgen. Es ergeben sich daraus verschiedene Standardresektionen:

Hemikolektomie rechts, Kolon Transversum-Resektion, Hemikolektomie links (Abb. B-8) und Sigmaresektion. Bei prädisponierten Patienten oder bei operativen Grenzfällen kann eine prophylaktische (sub-) totale Kolektomie eine erneute Erkrankung verhindern, ihr Einsatz ist aber umstritten [Rodriguez-Bigas et al., 1996]. Liegen resektable Lebermetastasen vor, so werden diese zum selben oder späteren Zeitpunkt entfernt (sogenanntes „ein-“ oder „zweizeitiges“ Vorgehen).

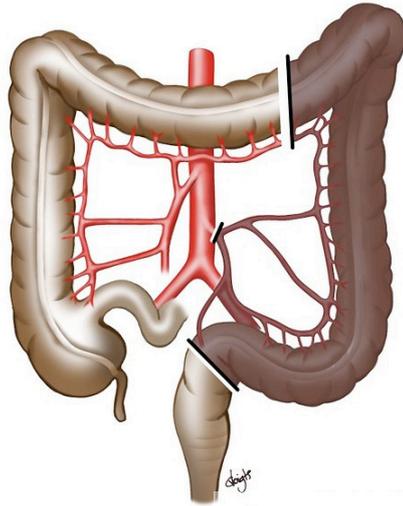


Abbildung B-8: Schematische Darstellung des operativen Ausmaßes der linken Hemikolektomie [Bhargava et al., 2005]

Bei allen lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinomen ist eine präoperative Radiotherapie indiziert. Adjuvant werden postoperativ in bestimmten Stadien Radio-Chemotherapien empfohlen [Masi et al., 2009].

operative Therapie

Adenome mit schweren Dysplasien und invasive Adenokarzinome von guter bis mäßiger Differenzierung, die keine Gefäßeinbrüche von Tumorzellen aufweisen und mindestens 1–2 mm im Gesunden abtragbar sind, können auf endoskopischem Wege mittels Schlinge kurativ entfernt werden. Eine chirurgische Nachresektion ist nur beim Vorliegen eines ungünstigen prognostischen Faktors (z.B. geringe Differenzierung bzw. entdifferenziertes Karzinom, Siegelringkarzinom, Gefäßeinbrüche von Tumorzellen, keine sichere Abtragung im Gesunden) angezeigt [O'Brien et al., 1990]. Die kurative Operation zielt auf Entfernung des tumortragenden Darmabschnittes mit seinem Lymphabflussgebiet hin. Durch die allgemeine Operationsvorbereitung mit orthograder Darmspülung, perioperativer Antibiotika- und Thromboembolieprophylaxe sowie durch die Frühmobilisation werden heute Operationsletalitäten unter 3% und niedrige Komplikationsraten erzielt [Masi et al., 2009]. Prinzipiell ist es technisch möglich, die radikale Tumoroperation beim Kolonkarzinom auf laparoskopischem Wege durchzuführen (Abb. B-9). Bei der Operation erfolgt zunächst das intraoperative Staging mit Klärung der lokalen Operabilität [Buchmann et al., 2003]. Bevor auch nur geringe Manipulationen am tumortragenden Darm (Abb. B-10) stattfinden, erfolgt die präliminäre Ligatur der zu- und abführenden Gefäße, um eine Tumorzellaussaat zu verhindern.



Abbildung B-9: Laparoskopische Resektion eines kolorektalen Karzinoms

[Bhargava et al., 2005]

Der Darm wird auf Höhe der späteren Resektion oral und aboral ligiert (Abb. B-10). Die Technik der Anastomosierung hat keinen Einfluss auf Früh- und Langzeitergebnisse [Schmiegel et al., 2004].

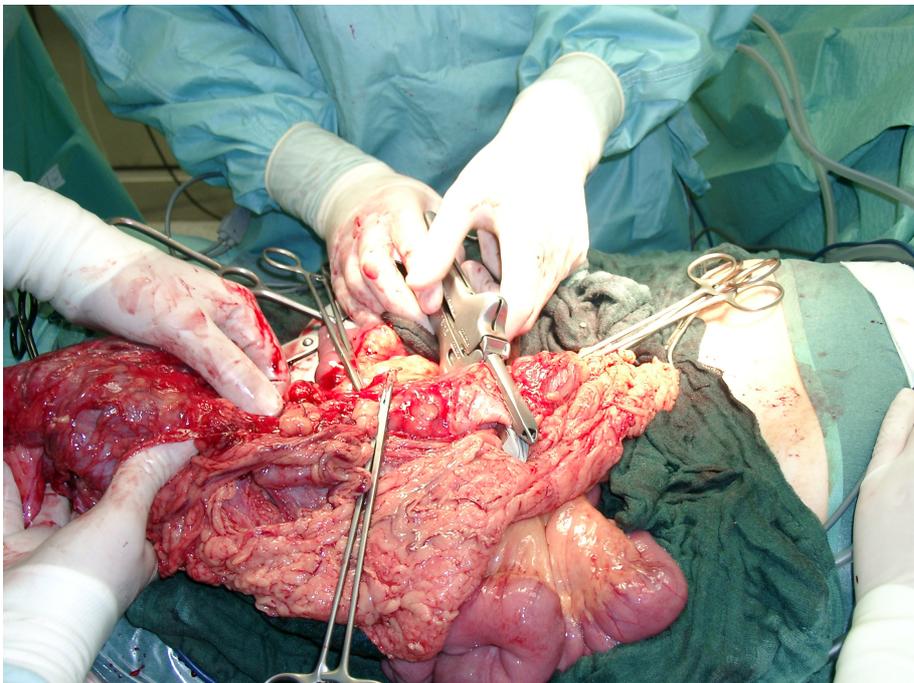


Abbildung B-10: Offene Hemikolektomie [Photo: Prof. Dr. T. Mussack]

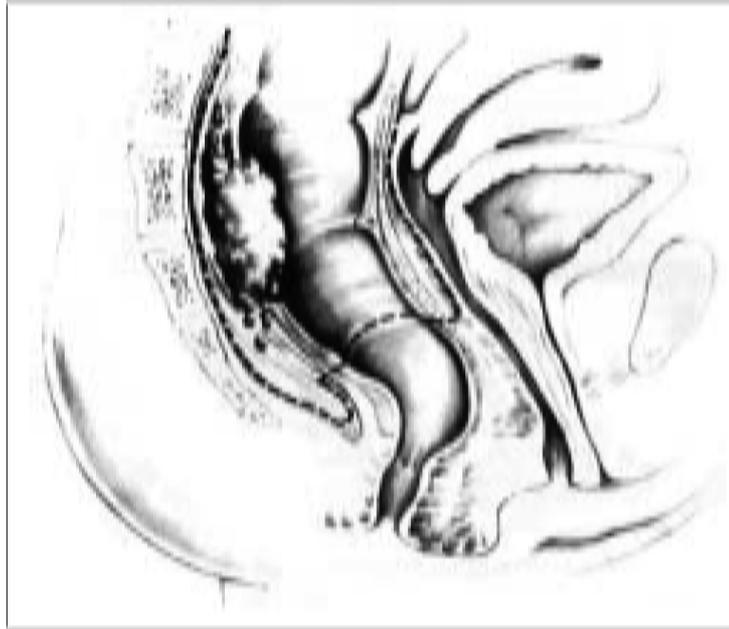


Abbildung B-11: Resektionsausmaß bei der tiefen anterioren Rektumresektion mit totaler Mesorektumexzision [Heald et al.,1994]



Abbildung B-12: reseziertes Rektumkarzinom [Photo: Prof. Dr. T. Mussack]

Strahlentherapie

Die Strahlentherapie ist für das Kolonkarzinom eher bedeutungslos und selten indiziert, da eine Strahlenbelastung des empfindlichen Dünndarms hierbei unvermeidlich ist. Im Gegensatz dazu wird das Rektumkarzinom in bestimmten Stadien adjuvant präoperativ zum Down-Staging [Mendenhall et al., 1992] oder adjuvant postoperativ bestrahlt. Sehr selten kann eine intraoperative Bestrahlung zum Einsatz kommen [Sadahiro et al., 2001]. Als Nebenwirkungen können Durchfälle (20% der Patienten), seltener Übelkeit oder Obstruktionen auftreten.

Chemotherapie / Immuntherapie

Vorangestellt sei, dass es eine optimale adjuvante Therapie, besonders für fortgeschrittene Stadien nicht gibt. Empfehlungen zu systemisch durchgeführten Chemotherapien unterscheiden sich je nach Stadium des kolorektalen Karzinoms [Ruf et al., 2000]: Das gängigste Chemotherapeutikum ist 5-Fluorouracil (5-FU). Ein sehr fortgeschrittenes lokales Tumorstadium ohne Fernmetastasierung kann präoperativ, auch mit Radiotherapie, chemotherapeutisch behandelt werden und zu einem sogenannten Down-Staging führen. [Schwartzberg et al., 2001; Haller et al., 1997].

B 1.7 Prognose und Komplikationen

Die Prognose des Kolonkarzinoms hängt entscheidend vom primären Tumorstadium und der Radikalität der Operation ab. Als weitere prognostische Kriterien werden Zytokeratin-positive Zellen im Knochenmark sowie Einbruch von Tumorzellen in Lymph- und Blutgefäße diskutiert. Sehr ungünstige prognostische Zeichen sind die spontane Tumorperforation sowie die intraoperative Ruptur des Tumors, die beide zur Klassifikation in die pT4- Kategorie führen. Nach Hermanek ist auch der Chirurg bzw. die Erfahrung der behandelnden Klinik ein wichtiger Prognosefaktor. Durch den Einzug der laparoskopischen Chirurgie konnte die Rate an postoperativen Infektionen im Vergleich zur offenen kolorektalen Resektion als eine mögliche Komplikation reduziert werden [Balague Ponz et al., 2001]. Weitere Komplikationen stellen die Anastomoseninsuffizienz (2%), Blutungen (1%), ein postoperativer Ileus (2%) und Verletzungen von Ureter oder Duodenum (1%) dar. Eine adjuvante Chemotherapie kann aufgrund der Schwächung des Immunsystems das Infektionsrisiko erhöhen und dadurch im Extremfall das Auftreten einer Sepsis begünstigen [Buunen et al., 2004].

B2 Induktion der Immunreaktionen nach Trauma

Trotz verbesserter anästhesiologischer Verfahren und schonender Präparationstechniken stellen Traumata, wie Operationen ausgedehnter viszeraler maligner Tumoren eine erhebliche Belastung für den Patienten dar. Für die Ausbildung und Ausprägung posttraumatischer Folgereaktionen scheint das Immunsystem und vor allem seine Antwort auf das Trauma eine entscheidende Determinante zu sein. Initial kommt es zu einer lokalen Aktivierung mit der Induktion physiologischer Reparaturmechanismen, die zur Heilung der Verletzung wie auch zur Abwehr von Fremdorganismen dient. Ziel dabei ist die Begrenzung des Schadens für den gesamten Organismus.

Inflammatorischen Phänomene bei polytraumatisierten Patienten werden aufgrund der multiplen Verletzungen als eine Art „Überreaktion“ des Organismus gedeutet, welche die immunologische Aktivierung lokaler Reparaturmechanismen über deren Grenzen hinweg auch in andere, zunächst nicht involvierte Gewebeareale oder Organe tragen kann [Bogner et al., 2007; Marano et al., 1990]. Ein gefürchtetes Problem ist dabei das postoperative Multiorganversagen (MOV) mit Sepsis und hoher Letalität [Hietbrink et al., 2006]. Allgemein gültige Scoring-Systeme wie der ASA (American Society of Anesthesiology) können das Risiko eines postoperativen MOV nur unzureichend einschätzen. In verschiedenen Arbeiten wurde indes gezeigt, dass das menschliche Immunsystem an dieser Induktion des postoperativen MOV entscheidend beteiligt ist [Bogner et al., 2007; Jochum et al., 1999].

Als sogenanntes Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) bezeichnet man ein generalisiertes Entzündungsgeschehen, das sich durch proinflammatorische Zytokine und andere Entzündungsmediatoren auszeichnet. Die Entstehung von SIRS kann auf verschiedene Ätiologien zurückgeführt werden (große chirurgische Eingriffe, Polytrauma, Verbrennung) und unterliegt oft einer unterschiedlichen Symptomatik. Aufgrund dieser Tatsache existierten bis in die 80er Jahre unterschiedliche Definitionen. Nach den amerikanischen Gesellschaften American College of Chest Physicians (ACCP) und Society of Critical Care Medicine (SCCM) wurde 1992 eine einheitliche Definition etabliert.

Trotz intensiver Forschung und Fortschritte in der Medizin stellt das Krankheitsbild der Sepsis und die mit ihr einhergehenden Komplikationen weiterhin eine besondere Herausforderung im medizinischen Alltag bei der Versorgung von Patienten dar. Somit bleibt das inflammatorisch getriggerte Einzel- und Multiorganversagen mit dem Systemic Inflammatory Response Syndrome

und der Sepsis nach schwerem Trauma ein ungelöstes Problem. Die Gesamtleblichkeit der Sepsispatienten konnte gesenkt werden, im Gegenzug dazu wird jedoch eine Inzidenzerhöhung registriert.

Weiterhin ist unklar, ob die fortgeschrittene Tumorkrankheit mit regionaler oder systemischer Metastasierung selbst oder erst die ausgedehnte Operation mit Schaffung großer Wundflächen zum SIRS mit Überstimulation des Immunsystems führt, was letztendlich im MOV enden kann [Baigrie et al., 1992]. Sepsis und SIRS stellen trotz großer Fortschritte in der intensivmedizinischen Behandlung schwerkranker Patienten die Hauptursachen für die Entwicklung multipler und häufig letal verlaufender Organfunktionsschäden im postoperativen Krankheitsgeschehen dar. Mit der Anzahl und Ausprägung präoperativer Risikofaktoren steigt darüber hinaus die Gefahr perioperativer Komplikationen deutlich an [Gurlich et al., 2005].

Die genauen Mechanismen dieser Immunmodulation im Rahmen von Operationen bei lokal fortgeschrittener Tumorkrankheit sind bisher nicht bekannt. Kenntnisse dieser initialen, intrazellulären Steuerungsmechanismen immunkompetenter Zellen stellen jedoch die Grundlage dar, um innovative therapeutische Konzepte zur Reduktion der Morbidität und Mortalität nach Tumoroperationen entwickeln zu können [Sager et al., 1991]. Antiinflammatorische Monotherapien mit Antikörpern gegen Endotoxin und Zytokine, Zytokinrezeptorblockaden oder Thrombininhibitoren haben sich in klinischen Studien bisher nicht als multivalent erwiesen, um das komplizierte Netzwerk interagierender humoraler und zellulärer Entzündungsfaktoren effektiv zu beeinflussen. Bekannt ist bisher, dass ein Operationstrauma in Form eines Signals an einen extrazellulären Rezeptor (z.B. den Toll-Like- Rezeptor (TLR)) bindet. Über verschiedene Kinasen und Transkriptionsfaktoren gelangt das Signal in den Nukleus, um dort die Gen-Expression zu beeinflussen (Abb. B-13).

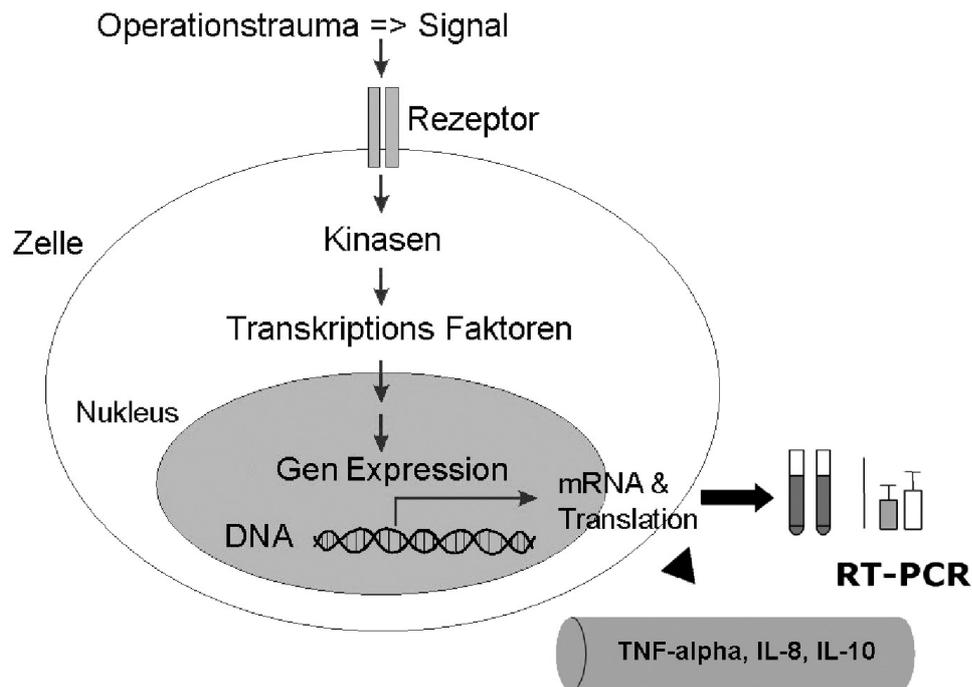


Abbildung B-13: Schematische Darstellung der intra- und extrazellulären Signaltransduktion nach Operationstrauma.

B 3 Inflammatorische Prozesse

Die sogenannte Two-Hit Theorie scheint eine bedeutende Rolle beim pathophysiologischen Verständnis hinsichtlich der Entstehung von posttraumatischer Inflammation (SIRS) und kompensatorischer Gegenregulation und deren Komplikationen wie Sepsis und MOF zu spielen.

Als Initiator (First hit) wird das primäre Trauma angesehen, welches die Zerstörung der zellulären Integrität der Gewebe und die Aktivierung immunologischer Kaskaden bedingt. Die Reaktion der proinflammatorischen Zytokinausschüttung bleibt unter normalen Bedingungen lokal begrenzt, bei schwerer Traumatisierung kommt es zu einer unkontrollierten überschießenden Ausschüttung. Folglich setzt eine autodestruktive Schädigung körpereigener Systeme ein. Das Abwehrsystem ist überfordert mit dem Ergebnis einer generalisierten Entzündungsreaktion, SIRS [Novotny et al., 2012]

Als Gegenregulation werden antiinflammatorische Botenstoffe freigesetzt, das sogenannte CARS (Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome). Diese Regulation bedingt eine Immunsuppression, wodurch eine erleichterte Invasion und Translokation der Mikroorganismen

stattfindet. Die Imbalance zwischen SIRS und CARS scheint verantwortlich zu sein für die Infektanfälligkeit und Manifestation in MOF. Ein Second hit, z.B. durch ausgedehnte chirurgische Eingriffe oder Hypoxie kann ebenfalls die oben beschriebenen Mechanismen verursachen. Vor diesem Hintergrund stellt die quantitative Erfassung der posttraumatischen Inflammation die Grundlage zur Vermeidung von Sekundärschäden und die Auswahl des geeigneten Zeitpunkts für weiterführende operative Interventionen dar [Lewis et al., 2012]

Der Gastrointestinaltrakt reagiert dabei besonders empfindlich auf Schockexposition. Persistierende gastrointestinale Perfusionsstörungen auch bei suffizienter Schocktherapie sind maßgeblich an den Mukosaschäden des Darmes beteiligt [Pape et al., 2001]. Daraus folgen klinisch oft kaum nachweisbare Translokationen von Bakterien und Endotoxin zum einen über mesenteriale Lymphknoten und -bahnen in die systemische Zirkulation. Zum anderen erreichen solche Translokationen über das Pfortadersystem die Leber, in der ortsständige Lebermakrophagen -durch die vorangegangene Schockphase aktiviert- bei Endotoxinkontakt erhebliche Mengen an Mediatoren freisetzen [Seibel et al., 1985]. Die hyperinflammatorische Immunantwort ist von der Freisetzung der pro-inflammatorischen Zytokine $\text{TNF}\alpha$, IL-1 und IL-6 sowie der Aktivierung der neutrophilen Granulozyten und Makrophagen charakterisiert. Diese Freisetzung führt zu einer Akute-Phase-Reaktion, die ebenfalls eine Hochregulation vieler anti-inflammatorischer Mediatoren, unter anderem von IL-10 und diversen Prostaglandinen zur Folge hat. Das Resultat ist eine chirurgisch- bzw. Trauma-induzierte Immunsuppression mit einer Deaktivierung der Monozyten gefolgt von einer Minderproduktion von $\text{TNF}\alpha$ und einer Umverteilung der T1/T2-Helfer Zellen (HZ) zugunsten einer T2-HZ dominierten Zytokinstruktur. Das Ungleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen und immunkompetenten Zellen determiniert den Phänotyp der Krankheit und sollte den Arzt dahingehend beeinflussen, seine therapeutische Strategie entsprechend anzupassen. In der Tat zeigen aktuelle Studien, dass beides, die initiale unkontrollierte Hyperinflammation und die kontinuierliche zellgesteuerte Immunsuppression primäre Ziele bei der Intervention einer post-operativen Immundysfunktion darstellen [Menger et al., 2004]. Die meisten prognostischen Indices für traumatisierte bzw. post-operative Patienten basieren bislang auf Vitalparametern und anatomischen Befunden. Posttraumatische Organversagen werden jedoch initial meist von einer inflammatorischen Reaktion getriggert [Nast-Kolb et al. 1997].

B 4 Immunkompetente Zellen

Die pathophysiologischen Mechanismen, die sich im Interstitium der unterschiedlichen Gewebe abspielen, wenn sich diese in einem akuten post-traumatischen Inflammationsstadium befinden, sind sehr komplex. Durch Ödeme und Ischämie bedingte Re-vascularisationen erleichtern die Versorgung des geschädigten Gewebes mittels Diffusion. Während die Funktion der immunkompetenten Zellen einsetzt, wird das Gewebe von den Leukozyten durch Symbiose mit Bakterien ernährt. In dieser Phase der Immunreaktion wird die Erweiterung der Lymphgefäße von verschiedenen Zytokinen, Leukotrienen und Prostaglandinen gesteuert, die im geschädigten Gewebe von aktivierten Leukozyten produziert werden [Aller et al., 2006]. Als Basis der systemischen Immunreaktion nach einem chirurgischen Eingriff in Form einer kolorektalen Resektion dient die Aktivierung der Zytokinkaskade, begleitet von der Freisetzung der entsprechenden Rezeptoren. Die Hauptachse der Zytokinreaktion stimuliert die Sezernierung von Akute-Phase-Proteinen (APP) in der Leber und moduliert diverse metabolische Vorgänge sowie hormonale Antworten [Maruna et al., 2002]. Die verschiedenen Zellen und Mediatoren, die vermutlich eine entscheidende Rolle an der posttraumatischen Immunreaktion spielen, werden im Folgenden näher beleuchtet.

B 4.1 Neutrophile Granulozyten

Die neutrophilen Granulozyten, auch kurz Neutrophile genannt, gehören mit einem Anteil von 50 - 65% zu den häufigsten weißen Blutkörperchen (Leukozyten). Als Phagozyten sind sie Teil der angeborenen Immunabwehr und dienen der Identifizierung und Zerstörung von Mikroorganismen. Neutrophile sind kugelförmige Zellen mit einem Durchmesser von 12 bis 15 µm (Mikrometer). Charakteristisch für ausgereifte Neutrophile ist der aus drei bis fünf Segmenten bestehende Kern. Das Cytoplasma von Neutrophilen enthält zwei Arten von Granula: Am Häufigsten sind „spezifische“ Granula, die Enzyme wie Lysozym, Kollagenase, Elastase, Plasminogenaktivatoren, Neuramidase und Cathepsin G enthalten [Oh et al., 2008]. Diese Granula lassen sich nicht mit basischen und sauren Farbstoffen färben, was sie ebenfalls in namensgebender Weise von Basophilen und Eosinophilen unterscheidet. Das Lysosom entspricht den sogenannten „azurophilen“ Granula und enthält neben den typischen Bestandteilen wie saure Hydrolasen und antimikrobielle Enzyme Substanzen wie Defensine, Myeloperoxidase, Cathelicidine und Lactoferrin. Ein erwachsener Mensch bildet im Knochenmark täglich über 10^{11} Neutrophile pro Tag. Die jungen Neutrophilen haben im Gegensatz zu den Ausgereiften noch keinen vielfach segmentierten Kern, weshalb sie als sog. „Stabkernig“ beschrieben werden.

Sollten Neutrophile nicht innerhalb von 6 Stunden nach Neubildung in Kontakt mit einem Infektionsherd und/oder einer Entzündungsreaktionen kommen, erfahren sie den programmierten Zelltod (Apoptose) und werden durch Makrophagen in Leber oder Milz abgebaut. Selbst bei Kontakt mit Infektionen haben Neutrophile nur eine um wenige Stunden verlängerte Lebensdauer. Neutrophile Granulozyten zirkulieren im Blut und wandern im Falle einer Infektion zum Ort des Geschehens. Dort nehmen sie die infektionsauslösenden Mikroben auf und verdauen sie. Um infiziertes und/oder entzündetes Gewebe zu erreichen, verlassen beide in einem durch Adhäsionsmoleküle und Chemokine vermittelten mehrstufigen Prozess den Blutstrom und dessen Gefäße [Adib-Conquy et al., 2009]. Dabei wandern sie in postkapillaren Venolen durch die Interzellular-Räume der endothelialen Zellen [Abbas et al., 2007].

B 4.2 Monozyten / Makrophagen

Monozyten sind wie die neutrophilen Granulozyten im Blut zirkulierende Zellen des Immunsystems und die Vorläufer der u.a. in den Geweben lokalisierten Makrophagen. Ihre Aufgabe ist die Zerstörung körperfremder Strukturen durch Phagozytose und die Aktivierung der erworbenen Immunabwehr mittels Antigenpräsentation. Mit einem Durchmesser von 20-40µm gehören Monozyten zu den größten Leukozyten und machen ca. 3-8 % ihrer Population aus.

Sie besitzen einen charakteristischen großen, häufig gelappten oder eingebuchteten Kern von meist bohnenartiger Form, jedoch verhältnismäßig wenig Zytoplasma, welches blaugrau und durch winzige Granulationen unruhig erscheint. Im Knochenmark befindliche hämatopoetische Stammzellen können sich unter Einfluss bestimmter Wachstumsfaktoren wie Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) und Monozyten Kolonie-stimulierender Faktor (M-CSF) in sogenannte Monoblasten entwickeln. Aus ihnen wiederum differenzieren sich Monozyten, die dabei das Knochenmark verlassen und in den Blutkreislauf übergehen, wo sie für 1-3 Tage zirkulieren [Williams et al., 1999]. Innerhalb dieses Zeitraums wandern sie bei Kontakt mit Infektionsherden in das betroffene Gewebe ein. Diese Fähigkeit haben Monozyten mit neutrophilen Granulozyten gemein, treffen jedoch zeitlich versetzt (bis zu einigen Tagen nach den Granulozyten) am Infektionsort ein. Während der Einwanderung in das Gewebe differenzieren sich Monozyten in Makrophagen. Auch vor der Differenzierung in Makrophagen sind Monozyten in der Lage, körperfremde Strukturen wie Mikroorganismen intrazellulär aufzunehmen und zu zerstören. Dadurch sind Monozyten zur Antigenpräsentation befähigt und initiieren auf diese Weise die erworbene Immunabwehr [Hildebrand et al., 2005].

B 5 Mediatoren

Ein Großteil der Funktionen der oben aufgeführten Zellen für die Immunabwehr wird über die Sezernierung löslicher Mediatoren gesteuert. Diese heterogene Gruppe unterschiedlicher Peptide und Proteine besteht sowohl aus stimulierenden als auch aus hemmenden Botenstoffen, zu denen entzündlich wirkende Zytokine ebenso wie regenerative Wachstumsfaktoren zählen [Cerami, 1992]. Die Freisetzung der Zytokine kann durch verschiedene Faktoren, wie Infektionen, Traumata und Entzündungen initiiert werden. Mit einem Molekulargewicht von 8-50.000 Dalton stellen sie dabei verhältnismäßig kleine Proteine dar. In der erstmaligen Beschreibungen wurden diese Mediatoren als „Lymphokine“ oder auch als „Monokine“ beschrieben, was auf ihrem zellulären Ursprung basierte. Die Tatsache, dass sie jedoch von fast jeder kernhaltigen Zelle produziert werden können und zudem mehrere Wirkungsorte sowie Wirkungsmechanismen kennen, führte zu dem aktuell benutzten Namen „Zytokine“. Eine gebräuchliche Einteilung dieser Mediatoren in pro- und antiinflammatorische Zytokine anhand ihrer Rolle im Rahmen von Entzündungsreaktionen ist im folgenden aufgezeigt. Eine starre Einteilung hat sich hierbei allerdings nicht als sinnvoll erwiesen, da einige Zytokine sowohl pro- als auch antiinflammatorische Wirkungsmechanismen aufweisen [Hildebrand et al., 2005].

B 5.1 Pro-inflammatorische Zytokine

B 5.1.1 Tumor-Nekrose-Faktor α

Unter denaturierenden Bedingungen ist Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α) ein nicht glykosyliertes Protein mit einem Molekulargewicht von 17 kDa. Die biologisch aktive Form ist ein Trimer. Neben der löslichen Form von TNF α kann eine membranständige Form, die ein Molekulargewicht von 28 kDa aufweist, auf der Oberfläche von TNF α -produzierenden Zellen nachgewiesen werden. Möglicherweise dient diese Form als Pool für lösliches TNF α nach proteolytischer Spaltung [Belardelli et al., 1995]. TNF α kann in verschiedenen Zellen und Zelllinien produziert werden, z.B. in Monozyten, Makrophagen, CD4⁺-T Zellen und NK-Zellen nach Stimulation mit Lipopolysacchariden. Außerdem können glatte Muskelzellen, polymorphonukleäre Neutrophile, Astrozyten und verschiedene Tumorzelllinien TNF α synthetisieren. TNF α bindet auf der Oberfläche seiner Effektorzellen an zwei verschiedene Rezeptoren, den TNF-Rezeptor I und den TNF-Rezeptor II. Diese Rezeptoren können auf nahezu allen Zellen, außer Erythrozyten, exprimiert werden.

Anteile der zellgebundenen TNF-Rezeptoren können sich von der Zelloberfläche ablösen. Diese löslichen TNF-Rezeptoren sind ebenfalls zur Bindung von TNF α befähigt und treten um dessen Bindung mit den zellgebundenen in Konkurrenz [Cavaillon et al., 1995]. Da TNF α auf viele verschiedene Zelltypen wirkt, zeigt es ein weites Spektrum biologischer Funktionen. Unter anderem wird die endotheliale Genregulation, Leukozytenadhärenz und Aktivierung der Fibroblasten durch TNF α induziert. Es hat dabei zytolytische und zytostatische Effekte auf verschiedene Zellen und wirkt u.a. auf Neutrophile chemotaktisch.

Über eine Unterhaltung und Aktivierung weiterer Entzündungsmediatoren zählt es zu den „Early Response Cytokines“, die an der frühen Phase der inflammatorischen Kaskade beteiligt sind. Fieber, Appetitlosigkeit und eine erhöhte Herzfrequenz als systemische Effekte einer Entzündungsreaktion gehen ebenfalls mit erhöhten Serumspiegeln von TNF α einher. Diese primäre Immunantwort wird durch das Freisetzen einer Vielzahl von sekundären Mediatoren weiter verstärkt. Allerdings kommt es neben der Hyperinflammation auch zu einer antiinflammatorischen Reaktion.

Darüber hinaus hat TNF α einen entscheidenden Anteil an der Entwicklung schwerer Komplikationen, wie die eines septischen Schocks und des Multiorganversagens nach Entwicklung einer Sepsis. Die Assoziation eines erhöhten TNF α Spiegels mit einer höheren Mortalitätsrate wurde in zahlreichen Studien beschrieben [Abraham et al., 1997; Baud et al., 1990]. Auch bei verschiedenen Karzinomen ist TNF α neben anderen Mediatoren durch die Steuerung des programmierten Zelltods, Apoptose, am Verlauf eines Karzinoms beteiligt. TNF α ist außerdem ein Wachstumsfaktor für Fibroblasten und stimuliert die Synthese von Kollagenase und Prostaglandin E₂.

Weiterhin kann TNF α die Knochenresorption durch Aktivierung der Osteoklasten induzieren [Faist et al., 1994] und die Proliferation von T-Zellen nach Stimulation mit Interleukin-2 (IL-2) induzieren. In Abwesenheit von IL-2 kann es die Proliferation und Differenzierung von B-Zellen veranlassen. Erhöhte Serum- oder Plasmaspiegel von TNF α können bei diversen Erkrankungen wie z.B. Sepsis, Autoimmunerkrankungen, verschiedenen Infektionskrankheiten und nach Transplantationen auftreten [Biberthaler et al., 2004].

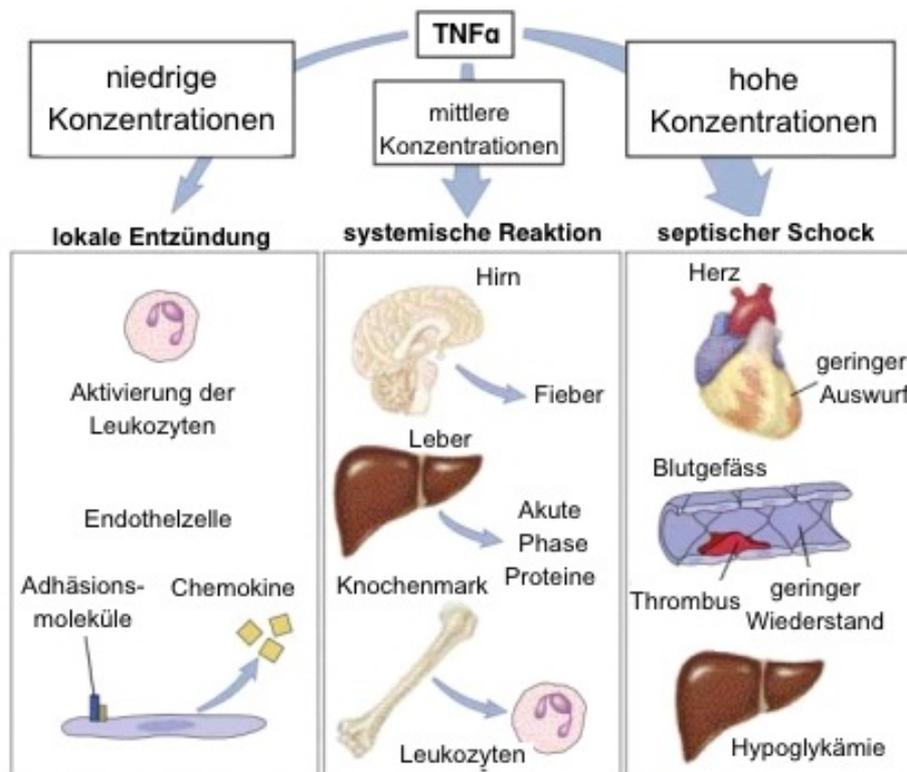


Abbildung B-14: Schematische Darstellung der Effekte von TNF α

B 5.1.2 Interleukin-8

Interleukin-8 (IL-8) ist ein nicht glykosyliertes Protein mit einem Molekulargewicht von 8kDa. Eines seiner wichtigsten Eigenschaften ist die chemotaktische Wirkung auf Neutrophile. Dementsprechend findet man IL-8 in der Literatur unter zahlreichen Synonymen wie NAP-1 (neutrophil activating peptide), NAF (neutrophil activating factor) und MDNCF (monocyte-derived neutrophil chemotactic factor) [Baggiolini et al., 1989]. Ursprünglich ist IL-8 aus Überständen von Monozyten/Makrophagen isoliert worden und somit wurden diese Zellen als hauptsächliche Produzenten für IL-8 angesehen [Strieter et al., 1994]. Im Laufe der Zeit konnte jedoch gezeigt werden, dass zahlreiche andere Zellen ebenfalls IL-8 synthetisieren können, darunter Endothelzellen, Epithelzellen, Hepatozyten, Fibroblasten und Chondrozyten [Menger et al., 2004]. Die Freisetzung von IL-8 aus diesen Zellen kann durch LPS, IL-1, TNF α und Viren veranlasst werden. IL-8 gehört zur Familie der Chemokine, 8-10 kDa großen Proteinen, die zu den pro-inflammatorischen Zytokinen gehören. Alle Chemokine wirken chemotaktisch und zeigen untereinander eine Strukturhomologie von 20-50 % auf der Ebene ihrer

Aminosäuresequenz inklusive 4 konservierter Cysteinreste. Aufgrund seiner biologischen Eigenschaften spielt IL-8 eine bedeutende Rolle bei entzündlichen Prozessen. Gerade im Zusammenhang mit Sepsis und SIRS wird IL-8 durch die vermehrte Freisetzung von Neutrophilen, der Leukozytenaktivierung und Chemotaxis eine besondere Bedeutung zugesprochen. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass Patienten im septischen Schock signifikant erhöhte Konzentrationen von IL-8 aufweisen und diese Konzentrationen in engem Zusammenhang mit dem klinischen Outcome stehen [Hack et al., 1992]. Diverse Studien haben außerdem massiv erhöhte IL-8-Spiegel bei Sepsis, Peritonitis, Psoriasis, rheumatoider Arthritis und cystischer Fibrose beschrieben [Sticherling et al., 1991; Peichl et al., Zügel et al., 2002].

B 5.2 Anti-inflammatorische Zytokine

B 5.2.1 Interleukin-10

Interleukin-10 (IL-10) als antiinflammatorisches Zytokin wurde erstmals 1989 beschrieben [Ishida et al, 1994]. Es ist ein 35-40 kD großes Protein und besteht aus 160 Aminosäuren. Neben Monozyten/Makrophagen und B-Lymphozyten sind vor allem T-Helfer-Zellen in der Lage, IL-10 zu bilden [Dummer et al., 1995]. Diese können anhand ihres Zytokin-Musters in verschiedene Unterformen unterteilt werden. Th0 und Th2-Zellen sind dabei in erster Linie für die IL-10 Produktion verantwortlich [Belardelli et al., 1995]. Es hat sich gezeigt, dass IL-10 die Zytokin-Synthese von Th1-Zellen und Th2- Zellen inhibiert. Diese Th1- und Th2 -Zellen aktivieren insbesondere Monozyten/ Makrophagen und reagieren auf das von den Makrophagen präsentierte Antigen. IL-10 inhibiert diese Stimulation der Th1-Zellen durch Monozyten/Makrophagen [Gomez-Jimenez et al., 1995]. IL-10 hat außerdem noch eine Vielzahl von anderen Effekten auf das Monozyten/Makrophagen-System. Es supprimiert die Bildung der sogenannten inflammatorischen Zytokine wie IL-1 α , IL-6, IL-8 und GM-CSF [Doherty et al., 1995]. Endogenes IL-10 inhibiert zudem im Rahmen eines negativen Feedback-Mechanismus die Synthese von IL-10 aus Monozyten/Makrophagen. Neben den erwähnten inhibitorischen Effekten wirkt IL-10 aber auch stimulierend.

Es stimuliert die Bildung von IL-1RA, einem weiteren anti-inflammatorischen Protein. In Gegenwart von IL-3 und IL-4 wird außerdem das Wachstum von Mastzellen und deren Vorläufer-Zellen stimuliert. Zudem steuert IL-10 auch die Proliferation und Differenzierung von B-Lymphozyten in Antikörper-produzierenden Zellen [Maruna, P. et al., 2002].

Aufgrund der Inhibition der Bildung von inflammatorischen Zytokinen und der gleichzeitigen Hochregulierung von anti-inflammatorischen Proteinen wie z.B. IL-1RA, spielt IL-10 eine wichtige Rolle bei der Regulation einer Reihe verschiedener entzündlicher Erkrankungen, insbesondere des SIRS, des Postaggressionssyndrom, der bakteriellen Sepsis, der rheumatoiden Arthritis und der Psoriasis [Stasi et al., 1995; Cush et al., 1995].

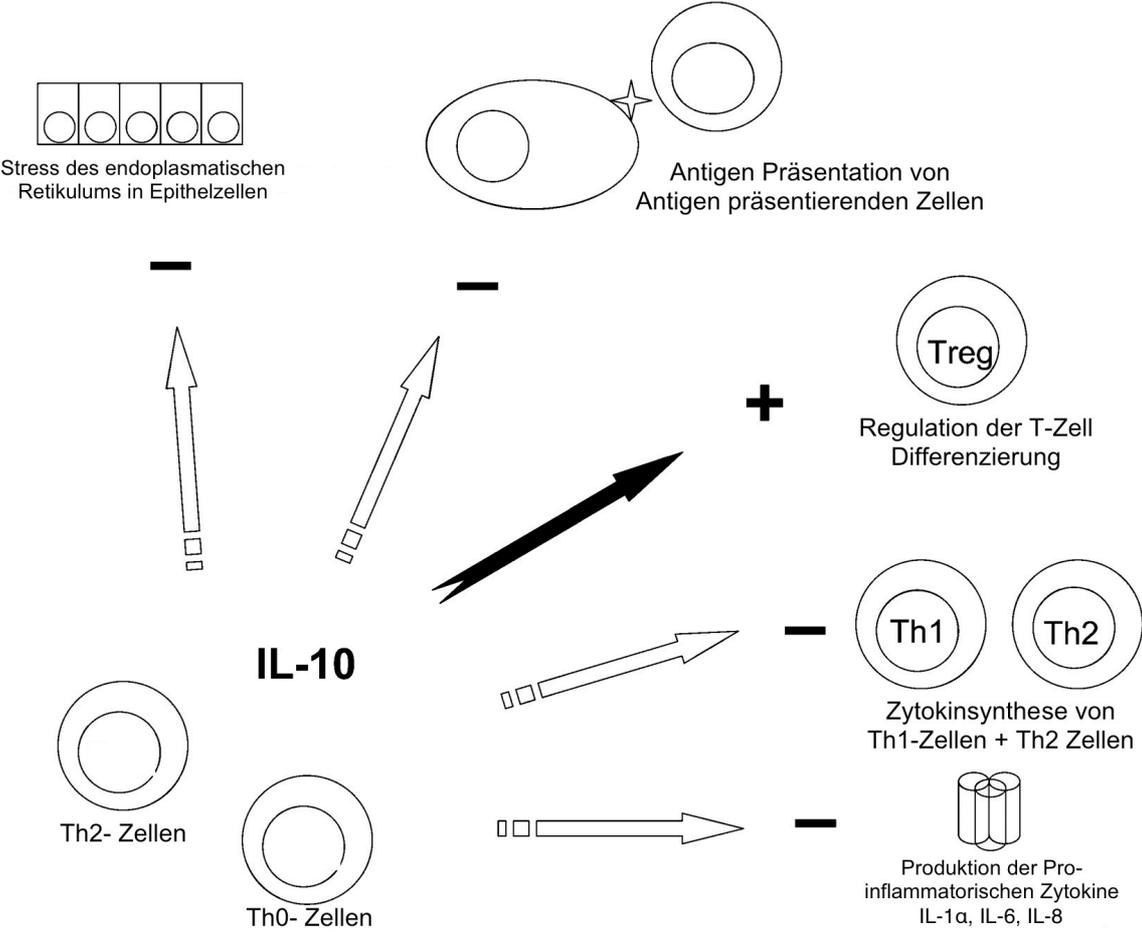


Abbildung B-15: Schematische Darstellung der Effekte von IL-10

B 5.3 weitere Mediatoren

B 5.3.1 PMN-Elastase

Neutrophile Granulozyten benutzen Proteinasen, um körperfremde Stoffe oder Gewebetrümmern zu verdauen. Eine dieser Proteinasen ist die PMN-Elastase, die in den azurophilen Granula der polymorphkernigen (PMN-) Granulozyten lokalisiert ist. Während dieses Verdauungsvorganges werden die Enzyme auch teilweise extrazellulär sezerniert. Die Serinprotease Elastase stellt ein sehr basisches, einkettiges Glykoprotein mit einer Molekülmasse von ca. 29-31 kDa dar.

Die intragranuläre Menge von Elastase beträgt im Durchschnitt ca. $3-5 \mu\text{g}/10^6$ Granulozyten. Die PMN-Elastase reagiert relativ unspezifisch mit Aminosäuren von Peptidbindungen, die ungeladene, aliphatische Seitengruppen (z.B. Valin, Alanin, Leucin, Isoleucin, Serin, Threonin und Methionin) aufweisen. Der proteolytische Abbau zahlreicher struktureller und humoraler Faktoren wird durch die geringe Substratspezifität dieses Enzyms ermöglicht. Ein Wirkungsoptimum im physiologischen pH-Bereich (ca. pH 7,5), hohe intrazelluläre Konzentrationen und die geringe Substratspezifität prädestinieren daher die PMN-Elastase vor allen anderen Proteinasen für einen destruktiven Einfluss auf das extrazelluläre Milieu, wenn sie durch massive Phagozytose oder bei Zelluntergang freigesetzt wird und durch ihren Hauptinhibitor, den α_1 -Proteinase-Inhibitor ($\alpha_1\text{PI}$), nicht mehr ausreichend gehemmt werden kann [Friedmann et al., 1997]. So wird die extrazelluläre Aktivität der PMN-Elastase nur teilweise durch Inhibitoren wie $\alpha_1\text{PI}$ reguliert [Jochum et al., 1994]. Bei sehr starker Stimulation der Granulozyten und einer damit verbundenen übermäßigen Freisetzung der Elastase kann das Hemmpotential des $\alpha_1\text{PI}$ überschritten werden. Die nicht-inhibierte PMN-Elastase löst dann zusammen mit den gleichzeitig gebildeten Oxidantien (O_2 -Radikale, H_2O_2 , OH-Radikale etc.) Gewebeschäden aus. Da jedoch über das Blut und die Lymphgefäße $\alpha_1\text{PI}$, wenn auch zeitversetzt, nachgeliefert werden kann, so wird in der Zirkulation schließlich freie, nicht komplexierte Elastase gebunden. 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. Der Nachweis der PMN-Elastase findet seinen Einsatz somit hauptsächlich zur Verlaufsbeurteilung bei Trauma, Schock und Sepsis [Nast-Kolb et al., 1992; Nast-Kolb et al., 1997]. Weitere Indikationsgebiete stellen die Bereiche Hämodialyse, Infektionen bei Geburtshilfe, Darmerkrankungen, Pankreatitis, zystische Fibrose und Adnexaffektionen des Mannes dar [Reinhardt et al., 1996].

B 5.3.2 Cathepsin X

Der Begriff „Cathepsin“ steht für „lysosomales proteolytisches Enzym“ unabhängig von der Enzymklasse. Cathepsin X als humane lysosomale Carboxypeptidase vom Cystein-Typ wird hauptsächlich in Monozyten und Makrophagen produziert und wird vermutlich durch einen regulierten Impuls von aktivierten Immunzellen in die Zirkulation entlassen. Damit spielen sie nicht nur bei regulären, physiologischen Prozessen eine Rolle, sondern vermutlich auch bei pathologischen Krankheitszuständen [Nägler et al., 2004]. Die ausgeschütteten Enzyme sind oftmals Teil einer proteolytischen Aktivierungskaskade und damit vermutlich an der Degradierung der extrazellulären Matrix beteiligt. Dies mag einer der Gründe sein, weshalb Cysteinproteasen derzeit als Angriffspunkt neuer medikamentöser Therapien für verschiedene Erkrankungen wie Osteoporose, rheumatoide Arthritis, Autoimmunerkrankungen und verschiedene maligne Erkrankungen gesehen werden [Nägler et al., 2006].

C Zielsetzung und Fragestellung

Neben lokal wirksamen humoralen Mechanismen werden im Rahmen einer posttraumatischen Immunreaktion Mediatoren freigesetzt, die eine systemische Wirkung entfalten. So geht das posttraumatische SIRS mit einer erhöhten Produktion und Ausschüttung sowohl von pro- als auch antiinflammatorischen Faktoren (z.B. Zytokine, Proteasen, Inhibitoren) einher [Ertel et al., 1998]. Diverse Arbeiten konnten belegen, dass die Konzentrationen sowohl von pro- als auch anti-inflammatorisch wirksamen Zytokinen in der systemischen Zirkulation von traumatisierten Patienten gleichsinnig verändert sind. Von den bislang mehr als 30 beschriebenen Zytokinen zählen vor allem TNF α , Il-6 und Il-8 zu den primär pro-inflammatorisch wirksamen Faktoren, während den vorrangig antiinflammatorisch reagierenden Vertretern hauptsächlich Il-10, TGF- β und Il-1ra zugeordnet werden [Gebhard et al., 2000; Faist et al., 1998; Nast-Kolb et al., 1997]. Gemeinsam ist all diesen Mediatoren, dass sie in der initialen posttraumatischen Phase einen von der Traumaschwere abhängigen Konzentrationsanstieg in der systemischen Zirkulation von Patienten aufweisen, der dann innerhalb einiger Tage kontinuierlich fällt. Eine Verschlechterung der klinischen Situation ist meist mit ihrem Wiederanstieg verbunden. Obwohl bislang nicht endgültig geklärt ist, aus welchen Zellen die oben genannten Mediatoren primär sezerniert werden, ist jedoch unbestritten, dass deren Konzentrationsanstieg eine Veränderung des zellulären Immunsystems bewirken.

Eine zentrale Rolle in der initialen posttraumatischen Phase kommt vor allem der Aktivierung des unspezifischen zellulären Immunsystems (PMN-Granulozyten, Monozyten/Makrophagen) als Vermittler und Verstärker der immunologischen Antwort zu. [Faist et al., 1996]. Zahlreiche experimentelle Arbeiten bestärken die Hypothese, dass vor allem monozytäre Funktionsalterationen das Ausmaß posttraumatischer Inflammation und deren Konsequenzen substantiell beeinflussen [Kampalath et al., 2003]. Eine signifikante Änderung der Monozytenmorphologie ist bei schwer traumatisierten Patienten mit der posttraumatischen Funktionsstörung des Immunsystems assoziiert. Diese herausragende Bedeutung von Monozyten für die initiale Steuerung posttraumatischer Immunfunktionsstörungen wurde anhand zahlreicher weiterer Arbeiten bestätigt [Carrillo et al., 2001]. Darüber hinaus konnte jedoch auch nachgewiesen werden, dass die unspezifische Entzündungsreaktion auch die mit einer gewissen Latenz auftretende Modifikation des spezifischen Immunsystems (Th1/Th2-Lymphozyten) vermittelt [Lederer et al., 1999].

Bei polytraumatisierten Patienten wird das gastrointestinale Versorgungsgebiet häufig von passagerer Ischämie (bedingt durch direktes Trauma, z.B. bei Zerreißung mesenterialer Arterien) oder indirekt als Folge der Zentralisation im hämorrhagischem Schock betroffen [Deitch et al., 1996]. Dadurch kommt es nach Reperfusion zu den oben erwähnten lokalen SIRS Phänomenen mit Einschwemmung von pro- und antiinflammatorischen Mediatoren und Translokation pathogener Keime aus dem Pool der Darmbakterien. Allerdings findet sich das posttraumatische SIRS auch bei Patienten ohne gastrointestinale Perfusionsstörung, das dann am wahrscheinlichsten durch SIRS-Phänomene in der Peripherie induziert wurde und zu systemischen Reaktionen führt. Wie oben ausgeführt, ist die Verbindung zum spezifischen Immunsystem in diesem Zusammenhang bislang nur unzureichend charakterisiert.

Unklar sind bislang auch die verantwortlichen intrazellulären Initialmechanismen, welche die Steuerung der posttraumatischen Abwehrfunktion von Monozyten/Makrophagen und Granulozyten induzieren. Neuere Veröffentlichungen weisen darauf hin, dass die Bildung von immunmodulatorisch wirksamen Effektor-Proteinen (Zytokine/Chemokine, Zell-Oberflächenmoleküle, Proteasen, Inhibitoren etc.) über spezielle intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden gesteuert wird. Dies zeigt sich vornehmlich in einer veränderten Aktivität von Transkriptionsfaktoren [z.B. NF- κ B, AP-1, AP-2 etc.], wodurch das mRNA-Expressionsprofil zahlreicher Gene nachhaltig beeinflusst wird [Matsukawa et al., 2001; Hauser et al., 1995]. Entsprechend dem molekularbiologischen Dogma kann die Information über die Antwort der Zelle auf einen Reiz von außen nach intrazellulärer Signaltransduktion weitgehend nur über die mRNA vom Zellkern und damit dem zentralen Datenspeicher, zu den peripheren Effektor-Organellen, den Ribosomen und dem Golgi-Apparat, transferiert werden.

Die einer gesteigerten transkriptionalen Aktivität folgende Änderung des intrazellulären mRNA-Expressionsmusters ist bei polytraumatisierten Patienten analysiert worden [Bogner et al., 2007], bei Patienten nach großen abdominalen Eingriffen jedoch weitestgehend unbekannt. Ein Ziel dieser Pilotstudie war es, die inflammatorische Reaktion von polytraumatisierten Patienten mit der von Patienten unmittelbar nach der Resektion eines kolorektalen Karzinoms zu vergleichen. Vorteil dieser Pilotstudie war die Möglichkeit einer initialen Blutabnahme präoperativ, d.h. vor dem iatrogen gesetzten Trauma. Dadurch bestand die Chance, die postoperativ erhobenen Messwerte mit einem Ausgangswert zu vergleichen.

Um dies evaluieren zu können, war das Ziel, die mRNA-Expression der pro- und antiinflammatorischen Zytokine mit Hilfe der Real-Time-quantitative-PCR (RTq-PCR) zu quantifizieren. Die RT-PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruht und zusätzlich die Quantifizierung der gewonnenen DNA ermöglicht. Ziel dieser Pilotstudie war die Messung der initialen, intrazellulären mRNA-Expression von Schlüsselzellen (Monozyten, Granulozyten) des unspezifischen Immunsystems, die vermutlich für die Entwicklung eines MOV nach lokal fortgeschrittener Tumorkrankheit verantwortlich sind.

Als pro-inflammatorische Zytokine wurden TNF α und IL-8 gewählt, als anti-inflammatorisches IL-10. Da Cathepsin X als humane lysosomale Carboxypeptidase vom Cystein-Typ ebenfalls hauptsächlich in Monozyten und Makrophagen produziert und vermutlich durch einen regulierten Impuls von aktivierten Immunzellen in die Zirkulation entlassen wird, spielen sie nicht nur bei regulären, physiologischen Prozessen eine Rolle, sondern vermutlich auch bei pathologischen Krankheitszuständen. Interessant war es daher zu sehen, wie sich das mRNA Expressionsprofil von Cathepsin X bei traumatisierten Patienten verhält. Als Maß für die Aktivität der Granulozyten im Entzündungsgeschehen sollte die mRNA-Expression von PMN-Elastase gemessen werden. Darüber hinaus sollte das sogenannte PAXgene-Abnahmesystem (Fa. Qiagen, Hilden, Deutschland) auf seine Tauglichkeit für den klinischen Alltag und Verlässlichkeit der Ergebnisse im Vergleich zur Zellseparation getestet werden. Beim PAXgene-System handelt es sich um ein Abnahmesystem, welches sich im klinischen Alltag zur mRNA-Messung prinzipiell besser eignen würde, da es eine Abnahme ohne unmittelbare Separation der immunkompetenten Zellen ermöglicht und damit den Vorteil der zeitliche Unabhängigkeit bieten würde. Um zu erörtern, wie viel der transkribierten mRNA tatsächlich in systemisch zirkulierende Proteine translatiert werden, erfolgte eine Messung dieser Zytokine mittels ELISA.

D Studiendesign

D 1 Ein- und Ausschlusskriterien

In einer prospektiven Pilotstudie wurden zwischen Oktober 2002 und Februar 2004 insgesamt 11 Patienten mit einem lokal fortgeschrittenen kolorektalen Adenokarzinom perioperativ hinsichtlich ihrer intra- und extrazellulären Aktivierungsfaktoren untersucht. Alle in diese Pilotstudie aufgenommenen Patienten unterzogen sich einer geplanten Tumorresektion entweder am Kolon oder Rektum. Hierbei handelte es sich bei allen Patienten um den jeweils ersten operativen Eingriff in Bezug auf ihre Tumorerkrankung und nicht um einen Rezidiveingriff. Voraussetzung zur Aufnahme in diese Pilotstudie war eine anhand klinischer, endoskopischer, radiologischer und histologischer Kriterien gesicherte Diagnose eines kolorektalen Adenokarzinoms. Als Ausschlusskriterien galten chronische Infektionskrankheiten wie Colitis ulcerosa, Hepatitis oder andere Immunschwächen.

Eine langfristige Immunsuppression oder weitere immunmodulierende Therapien führten ebenfalls zum Ausschluss aus der Pilotstudie. Als Probenmaterial diente arteriell bzw. venös entnommenes Vollblut, EDTA- und Heparinplasma sowie Serum.

D 2 Studienpopulation

Alle untersuchten Patienten der Studienpopulation (n = 11) nahmen freiwillig an der Pilotstudie teil, wurden vollständig über Inhalt und Ziele der Untersuchungen aufgeklärt und gaben ihre schriftliche Einwilligung zur Aufnahme in die Studie. Die Patienten befanden sich alle in stationärer Behandlung in der Chirurgischen Klinik und Poliklinik des Klinikums der Ludwig-Maximilian-Universität München, Innenstadt. Alle Studienpatienten waren kaukasischer Herkunft. Die Basisdaten der Studienpopulation sowie die klinischen Parameter sind in Tabelle D-1 aufgelistet. Patient TP02 verstarb nach der 12h-Abnahme, so dass die Ergebnisse seiner Messungen nicht in die Auswertung der Gesamtergebnisse mit eingeflossen sind.

D 3 Messzeitpunkte

Blutentnahmen zur Gewinnung von EDTA- und Heparinplasma sowie Serum für die verschiedenen Laboruntersuchungen erfolgten nach einem definierten Zeitraster. Die insgesamt 6 Messzeitpunkte je Patient wurden zu folgenden Zeitpunkten gewonnen:

Die erste Blutentnahme wurde unmittelbar vor Operationsbeginn durchgeführt, nachdem den analgesierten, sedierten und intubierten Patienten ein arterieller Zugang in die A. radialis gelegt worden war. Auf diese initiale Abnahme, die im Folgenden als 0h-Abnahme bezeichnet wird, folgten fünf weitere Blutentnahmen im Abstand von 6h, 12h, 24h, 48h und 72h postoperativ aus der A. radialis oder dem zentralen Venenkatheter (ZVK) bzw. anderen venösen Zugängen.

Tabelle D-1: Studienpopulation und klinische Parameter

Patientenzahl	n = 11
Zahl der verstorbenen Patienten	1 (TP02 nach der 12h-Abnahme)
Geschlecht	6 Männer / 5 Frauen
Altersverteilung [Jahre]	51-92
Tage stationär [MW/SD]	20,4 / ± 9,1
OP-Dauer (in Std.) [MW/SD]	3,1 / ± 1,0
Kolon- / Rektumkarzinom	4 / 7
Mäßig / schlecht differenziertes Adenokarzinom o. n. A.	7 / 4
Antibiotikatherapie	Rocephin & Metronidazol
Plasmaexpander	HAES 6% bzw. 10%
Analgesie	Fentanyl, Sufentanyl, Dipidolor, Metamizol, Fentanyl, Naropin
Sedierung	Propofol, Sevofluran
Katecholamine	Noradrenalin, Arterenol
sonstige Medikamente	Uradipil, Clonidin, Dopamin, Tracrium

In Bezug auf die Medikation gab es bei den Studienpatienten keine relevanten Unterschiede.

E Material und Methoden

E 1 Kits und Chemikalien

Zur Durchführung der Versuche wurden folgende Chemikalien und Materialien (Tabellen E-1, E-2, E-7, E-8 und E-9) sowie zusätzlich kommerzielle Komplettsysteme (Tabellen E-3, E-4, E-5 und E-6) verwendet.

Tabelle E-1: Materialien zur Blutentnahme

Material	Firma
Citratplasma Monovette	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
EDTA Monovette	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Serum Monovette	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Vacutainer Multiadapter	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
PAXgene Vacutainer	Qiagen, Hilden, Deutschland

Tabelle E-2: Chemikalien und Lösungsmittel zur Zellisolation

Chemikalie	Firma
EDTA : Titriplex III [®]	Apotheke Klinikum Innenstadt, LMU
PBS- (phosphate buffered saline-) Puffer	Apotheke Klinikum Innenstadt, LMU
Erythrozyten-Lyse-Puffer (pH 7,2):	MERCK, Darmstadt, Deutschland
- 155mM NH ₄ Cl	
- 1mM EDTA	
- 10mM KHCO ₃	
CD-14 Magnetic Beads	Milenia Biotec, Bad Nauheim, Deutschland
CD-15 Magnetic Beads	

Tabelle E-3: Komplettsystem zur RNA-Isolierung aus Granulozyten und Monozyten und PAXgene

System	Inhalt	Firma
RNeasy® Mini /Midi Kit	RNeasy (mini) spin column RLT Puffer RW1 Puffer RPE Puffer	Qiagen, Hilden, Deutschland
PAXgene® Blood RNA Kit	RNase freies Wasser BR1 Resuspensionspuffer BR2 Bindungspuffer BR3 Waschpuffer BR4 Waschpuffer BR5 Elutionspuffer	Qiagen, Hilden, Deutschland / PreAnalytiX™- Schweiz

Tabelle E-4: Komplettsystem zur PCR-Vorbereitung und Primer für RT-PCR

System	Inhalt	Firma
LightCycler FastStart DNA Master SYBR- Green I Primer für Light Cycler	FastStart Taq DNA Polymerase GAPDH, IL-10, IL-8, TNF α , PMN-Elastase Cathepsin X	Roche, Mannheim, Deutschland Search LC, Heidelberg, Deutschland

Tabelle E-5: Komplettsystem zur cDNA-Synthese

System	Firma
1st Strand cDNA Sythesis Kit for RT-PCR	Roche, Mannheim, Deutschland

Tabelle E-6: Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von IL-8, IL-10, TNF α , PMN-Elastase und Cathepsin X

System	Bestimmung von	Firma
Enzymimmunoassay	IL-8, IL-10, TNF α , PMN-Elastase, Cathepsin X	Milenia Biotec, Bad Nauheim, Deutschland

Tabelle E-7: Sonstige Labormaterialien

Material	Firma
Eppendorf UVette®	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
LC Centrifuge Adapters	Roche, Mannheim, Deutschland
Leucosep tubes®	MERCK, Darmstadt, Deutschland
LightCycler Capillaries	Roche, Mannheim, Deutschland
LightCycler Sample Carousel	Roche, Mannheim, Deutschland

Tabelle E-8: sonstige Chemikalien

Material	Firma
70% Ethanol	Apotheke Klinikum Innenstadt, LMU
100% Ethanol	Apotheke Klinikum Innenstadt, LMU
0,1% Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Apotheke Klinikum Innenstadt, LMU
100bp DNA Ladder	Invitrogen, USA
250bp DNA Ladder	Invitrogen, USA
RNAse freies Wasser	Qiagen, Hilden, Deutschland

E 2 Geräte

Tabelle E-9: Geräte

Gerät	Hersteller
Abzug	Köttermann, Uetze/Hänigsen, Deutschland
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kühlschrank 4°C	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
Gefriertruhe (-20°C)	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
Tiefkühltruhe (-80°C)	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
LightCycler Instrument	Roche, Mannheim, Deutschland
MiniMACS Magnet	Milteny Biotech, Bad Nauheim, Deutschland
MiniMACS Separator	Milteny Biotech, Bad Nauheim, Deutschland
Peltier Thermal Cycler PTC-200	Biozyme, Blaenavon, Großbritannien
Pipetten (10, 60, 200, 1000µl)	Gilson, Middleton, USA
Tischzentrifuge	Axon/Molecular Devices, Ismaning, Deutschland
Vortex-Schüttler	CAT, Steinfurt, Deutschland
Zentrifuge mit Kühlung	Jouan, Fernwald, Deutschland
Zentrifuge und Eindampfer	Jouan, Fernwald, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Labor Optik GmbH, Friedrichsdorf, Deutschland

E 3 Methoden

E 3.1 Blutentnahmen

Für die geplanten Untersuchungen in seriell gewonnenen Blutproben wurden je Patient 6 Messzeitpunkte festgelegt: 0h (unmittelbar präoperativ), 6h, 12h, 24h, 48h und 72h (siehe D3). Bei jeder Abnahme wurden 4 x 10ml Blut im Ethylendiamintetraessigsäure- (EDTA-) Vacutainer für die Zellseparation entnommen. Zusätzlich wurden pro Blutentnahme 1 x 2,5ml Citratplasma zur Bestimmung der Gerinnungsfaktoren und 1 x 2,5ml EDTA-Blut zur Erstellung des Differentialblutbildes abgenommen. Zudem wurden 1 x 2,5ml Serum für die ELISA-Messungen und 2 x 2,5ml Blut im PAXgene Vacutainer entnommen, in denen die mRNA nach Herstellerangaben unmittelbar nach der Abnahme stabilisiert wurde (24h Lagerung bei Raumtemperatur). Letztere wurde im Laufe von fünf Tagen aufbereitet.

E 3.2 Differentialblutbild

Parallel zu den festgelegten Blutabnahmezeitpunkten (s. E 3.1) wurde im Zentrallabor der Chirurgischen Klinik und Poliklinik des Klinikums der Universität München Innenstadt jeweils ein Differentialblutbild am Automaten angefertigt.

E 3.3 Separation von mononukleären Zellen

Die Separation und Isolierung der mononukleären Zellen erfolgte unmittelbar nach jeder Blutentnahme, um keine Variabilität der Messergebnisse aufgrund der unterschiedlichen Halbwertszeiten der mRNA und Proteine zu erzeugen. Im Rahmen der Zellisolierung wurde 1 Volumenteil Vollblut mit 4 Volumenteil Erythrozyten-Lyse-Puffer (155mM NH₄Cl; 10mM KHCO₃; 1mM EDTA; pH 7,2) verdünnt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abzentrifugieren der Leukozyten (10min, 450g, 20°C) und Verwerfung des Überstands wurde das Leukozytenpellet in zwei weiteren Waschschrritten mit je einem Volumenteil Erythrozyten-Lyse-Puffer resuspendiert, erneut zentrifugiert (10min, 450g, 20°C) und anschließend der Überstand wiederum verworfen. Die Pellets wurden mit 2ml PBS (2,7mM KCl; 137mM NaCl; 10mM KH₂PO₄; 2mM EDTA; pH 7,4) resuspendiert, die Leukozytenzahl der Suspension mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer ermittelt und ein Suspensionsvolumen von ca. 1×10^8 Zellen hergestellt.

E 3.4 Isolierung von Monozyten und Granulozyten

Das Suspensionsvolumen von 1×10^8 Zellen wurde mit 200µl CD14 Micro-Beads (lösliche super-paramagnetische Micro-Beads konjugiert mit monoklonalen Maus Anti-Human-CD14-Antikörpern, Isotyp: Maus IgG2a) 15min bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Suspension in einem Waschschrtritt mit 10-20 Volumenteil PBS/EDTA verdünnt, zentrifugiert (10min, 450g, 20°C) und der Überstand verworfen. Nach der Resuspension des Pellets mit 500µl PBS/EDTA wurde die Suspension auf eine befeuchtete, in einem MiniMACS-Magneten hängende MS+ Separationssäule übertragen, die Säule in drei Schritten mit jeweils 500µl PBS gewaschen und der Durchlauf für die Granulozytenisolierung (siehe unten) gesammelt. Bei Passage der Säule wurden nur die mit CD14-Micro-Beads markierten Monozyten im magnetischen Feld fixiert und somit positiv separiert. Nach Entfernung der Säule aus dem Magneten wurde diese erneut mit 1ml PBS/EDTA beladen, die Monozyten mit Hilfe eines Stempels (Plunger) ausgespült, das

Eluat zentrifugiert (10min, 450g, 20°C) und der Überstand verworfen. Das Monozytenpellet wurde in 2ml RLT-Puffer mit 0,1 (v/v) β -Mercaptoethanol lysiert und bei -80°C gelagert.

Parallel erfolgte die Separation der Granulozyten aus dem gesammelten Durchlauf der Monozytenisolierung. Dieser wurde erneut mit 200 μl CD15 Micro-Beads (lösliche super-paramagnetische Micro-Beads konjugiert mit monoklonalen Maus Anti-Human-CD15- Antikörpern, Isotyp: Maus IgM) 15min bei 4°C inkubiert. Nach dem Waschschrift mit 10-20 Volumenteilen PBS/EDTA wurde die Suspension wiederum auf eine befeuchtete, in einem Midi-MACS-Magneten hängende LS+ Separationssäule übertragen, die Säule in drei Schritten mit jeweils 3ml PBS/EDTA gewaschen und die Granulozyten im magnetischen Feld fixiert und somit positiv separiert. Anschließend wurden sie mit 5ml PBS/EDTA eluiert, zentrifugiert (10min, 450g, 20°C), der Überstand verworfen und das Granulozytenpellet auf gleiche Weise wie das Monozytenpellet für die Lagerung bei -80°C lysiert.

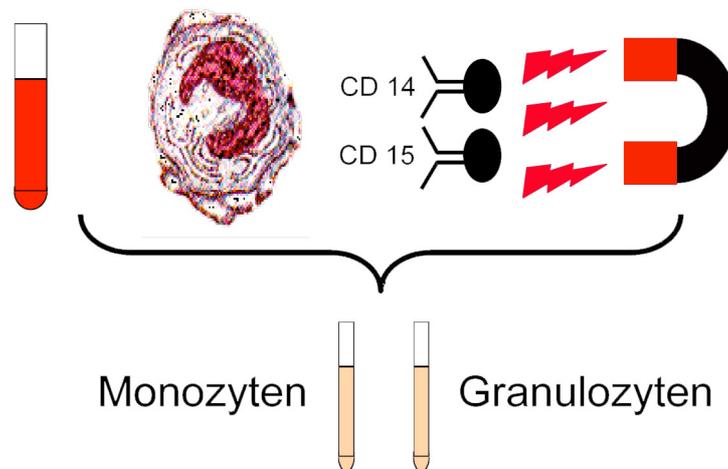


Abbildung E-1: Schematische Darstellung der Isolierung von Monozyten und Granulozyten mit Hilfe von Micro-Beads

E 3.5 Isolierung von Gesamt-RNA aus PAXgene Tubes

Die PAXgene Tubes wurden synchron mit den Abnahmen für die Zellseparation mit Patientenblut gefüllt. Die Tubes wurden zunächst für 24 Stunden bei Raumtemperatur (18°C-28°C) inkubiert, um die Lyse aller Blutzellen sicherzustellen. Anschließend wurden die Tubes bei 8°C gelagert und innerhalb von 5 Tagen für die RNA-Isolation aufbereitet.

Zuerst erfolgte die Zentrifugation (10min, 5000g, 20°C), anschließend wurde der Überstand zu verwerfen. Nach Hinzufügen von 4ml RNAase-freiem Wasser, Vortexen und Auflösen des Pellets sowie Verschluss der Tubes mit einem neuen Hemogard Deckel wurde erneut zentrifugiert (10min, 5000g, 20°C). Der Überstand wurde wiederum verworfen und das Pellet mit 350µl Puffer BR1 resuspendiert und in ein 1,5ml Eppendorf-Gefäß pipettiert. Nach Hinzufügen von 300µl Bindungs-Puffer BR2 und 40µl Proteinase K wurde die Resuspension für 5 Sekunden gevortext und anschließend für 10 Minuten bei 55°C im Schüttel-Inkubator bei 400-1400rpm inkubiert. Nach Hinzufügen von 350µl Ethanol (96-100% Reinheit) wurde der Ansatz erneut gevortext und kurz zentrifugiert (1-2 Sek. bei 500-1000g). Die Probe wurde nun in zwei Schritten auf die PAXgene RNA-Säule übertragen, die sich in einem 2ml Eppendorf-Gefäß befand und zentrifugiert (1min, 8000g).

Als nächstes wurden 350µl des Waschpuffers BR3 auf die PAXgene RNA-Säule aufgetragen, zentrifugiert (1min, 8000g) und die Säule in ein neues 1,5ml Eppendorf-Gefäß überführt. Das alte Auffanggefäß wurde verworfen. Nach der Wiederholung dieses Schrittes wurden 500µl Waschpuffer 2 (BR4) auf die PAXgene RNA-Säule pipettiert und in einem neuen Eppendorf-Gefäß zentrifugiert (1min, 8000g). Nachdem auch dieser Schritt wiederholt wurde, zentrifugierte man die Säule einmal trocken (1min, 8000g) und übertrug sie anschließend in ein neues 1,5ml Eppendorf-Gefäß. Im letzten Schritt wurde in zwei Schritten jeweils 40µl Elutionspuffer (BR5) auf die Säule pipettiert und diese im Anschluss zentrifugiert (1min, 8000g), um die RNA zu eluieren. Abschließend wurde das Eluat für 5 Minuten bei 65°C im Wasserbad inkubiert und danach sofort auf Eis gelegt bzw. bei -80°C gelagert.

E 3.6 Isolierung von Gesamt-RNA aus Monozyten und Granulozyten

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte mit Hilfe eines kommerziellen Kits (RNeasy[®] Midi Kit, Qiagen). Die Monozyten- bzw. Granulozyten-Lysate (siehe E 3.4) wurden bei 20°C im Wasserbad aufgetaut. Nach Zugabe von 2ml RLT-Puffer erfolgte die Homogenisierung der Suspension mit Hilfe einer sterilen 10ml-Plastikspritze und einer sterilen 21g Kanüle. Durch die Zugabe von 4ml 70%igem Ethanol, verdünnt mit 0,1% Diethylpyrocarbonat- (DEPC-) Wasser, konnte die positiv geladene RNA an die negativ geladene Silica-Gel-Matrix der RNA-Isolierungssäule binden. Nachdem die Säule mit dem Homogenat beladen worden war, erfolgte die Zentrifugation (5min, 5000g, 20°C). Im Anschluss wurde der Durchlauf verworfen, die Säule mit 4 ml RW 1 Waschpuffer beladen und erneut zentrifugiert (5 min, 5000g, 20°C). Nach zweimaligem Waschen mit je 2,5ml RPE-Puffer und Trocken-zentrifugation (5min, 5000g, 20°C) wurde die total RNA zwei Mal mit je 200µl RNase freiem Wasser eluiert. Nach der Bestimmung des Eluatvolumens wurde die Gesamt RNA Konzentration photometrisch bei einer Wellenlänge von 260nm bestimmt sowie die Reinheit der RNA-Präparation anhand des Verhältnisses E_{260}/E_{280} überprüft.

E 3.7 cDNA-Synthese / Reverse Transkription

Das Suspensionsvolumen, in dem 100ng Gesamt-RNA gelöst waren, wurde mit Hilfe der Photometerdaten ermittelt und einheitlich auf ein Volumen von 8,2µl in einer Zentrifuge mit Vakuumpumpe bei 46°C eingedampft. Die darauf folgende 15-minütige Denaturierung bei 65°C diente dazu, die intramolekularen RNA-Strukturen (*stem-loops*) durch die irreversible Denaturierung der RNA-stabilisierenden Proteine, RNasen und anderer Störfaktoren für die reverse Transkription vorzubereiten. Die reverse Transkription erfolgte mit Hilfe eines kommerziellen Kits (1st Strand cDNA Sythesis Kit for RT-PCR, s. Tabelle E-5). Um den Einzelstrangcharakter der RNA zu sichern, wurde die Suspension unmittelbar nach der Denaturierung für ca. 5 Minuten auf Eis gekühlt. Danach wurde zu der auf 8,2µl eingedampften Gesamt-RNA-Suspension folgender Reaktionsmix zugegeben:

2µl 10 x Reaction Buffer	2µl Oligo-p(dT) ₁₅ Primer (0,82µg/µl)
4µl 25mM Magnesiumchlorid	1µl RNase-Inhibitor
2µl 10mM Deoxynucleotid Mix	0,8µl reverse Transkriptase

Die reverse Transkription erfolgte im Peltier Thermal Cycler (Biozyme) nach folgendem Protokoll: Die zehnmünütige Annealing-Phase (25°C) diente dazu, den Oligo-p(dT)₁₅ Primer spezifisch an den poly-A-tail der humanen messenger RNA (mRNA) binden lassen zu können. Die Transkription erfolgte 60 Minuten lang bei 42°C durch die AMV reverse Transkriptase. Um Artefakte bei folgenden Schritten zu vermeiden, wurde die AMV reverse Transkriptase 5 Minuten bei 99°C denaturiert. Nach einer Abkühlung auf 4°C konnten die Proben bei -20°C gelagert werden.

E 3.8 Auswahl des *house-keeping-genes*

Zur Normierung der mRNA-Expression der Zytokine TNF α , IL-10 und IL-8 sowie von Cathepsin X und PMN-Elastase war ein geeignetes *house-keeping-gene* nötig. Voraussetzung für die Auswahl eines solchen Gens ist die von äußeren Einflüssen weitgehend unbeeinflusste Expression [Said et al., 2007]. So kann es für die Normierung der cDNA-Synthese des *genes of interest* dienen. Aufgrund ihrer weitgehend gleichbleibenden Expression eignen sich dazu insbesondere Gene des Stoffwechsels und des Zytoskeletts [Juusola & Ballantyne, 2007]. In der vorliegenden Pilotstudie wurde die Expression des *house-keeping-genes* GAPDH bei Monozyten und Granulozyten sowie im Paxgene-System bestimmt und miteinander verglichen.

E 3.9 RT-PCR / LightCycler

Die Real-Time-quantitative-PCR (RTq-PCR) ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruht und zusätzlich die Quantifizierung der gewonnenen DNA ermöglicht. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen durchgeführt, die während eines PCR-Zyklus erfasst werden. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Am Ende eines Laufs, der aus mehreren Zyklen besteht, wird anhand von erhaltenen Fluoreszenzsignalen die Quantifizierung in der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen. Nur in der exponentiellen Phase der PCR, die wenige Zyklen in einem Lauf dauert, ist die korrekte Quantifizierung möglich, da während dieser Phase die optimalen Reaktionsbedingungen herrschen [Holzapfel & Wickert, 2007].

Folgende Gene der aus humaner mRNA synthetisierten cDNA wurden mittels PCR quantifiziert:

genes of interest: IL-10, IL-8, TNF α , Cathepsin X, PMN-Elastase

house-keeping-gene: GAPDH

Die mRNA-Quantifizierung eines Gens mittels RT-PCR erfolgte je Analysenlauf für maximal 25 Proben, 5 Standards, eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle in einem mit 32 Positionen besetzten *LightCycler (LC) Sample Carousel*. Die verschiedenen Ansätze wurden in *LC Capillaries* pipettiert, die in *LC Centrifuge Adapters* auf 4°C vorgekühlt wurden. Nach Zentrifugation (4min, 400g, 4°C) wurden die Kapillaren in einem *LC Sample Carousel* im *LightCycler Instrument* (Abbildung E-2) platziert.



Abbildung E-2: LightCycler Instrument der Firma Roche, Mannheim, Deutschland

[www.roche.de]

Standardkurve

Anhand einer Standardkurve (Abbildung F-2), die mit Hilfe einer Verdünnungsreihe aus fünf bekannten mRNA-Standardkonzentrationen (unverdünnt, 1:10-, 1:100-, 1:1000-, 1:10000-verdünnt) des jeweiligen Gens erstellt wurde, konnte die exakte Menge des mRNA-Äquivalents bestimmt und in Kopien angegeben werden. Die spezifische Bindung von *SYBR Green I* an Doppelstrang-DNA bewirkt eine starke Fluoreszenzerhöhung, so dass die Menge der PCR-Produkte über die Fluoreszenz messbar ist. Die Reaktionen für die fünf genannten Standardkonzentrationen wurden jeweils wie folgt angesetzt:

- 10µl Standardlösung
- 2µl genspezifischer Primer (Search-LC)
- 2µl SYBR Green I Mix (Roche)
- 6µl steriles Wasser

Positivkontrolle

Die Positivkontrolle diente dazu, die Qualität der gemessenen Reaktionsansätze sowie der Durchführung der PCR selber zu überprüfen. Reaktionsansatz:

- 10µl bekannte cDNA-Kopienzahl des untersuchten Gens
- 2µl genspezifischer Primer (LC-Search)
- 2µl SYBR Green I Mix (Roche)
- 6µl steriles Wasser

Negativkontrolle

Zur Überprüfung einer eventuellen Kontamination der Reaktionsansätze mit einem unerwünschten Gen wurde jeweils eine Negativkontrolle mit sterilem Wasser durchgeführt:

- 10µl Wasser
- 2µl genspezifischer Primer (LC-Search)
- 2µl SYBR Green I Mix (Roche)
- 6µl Wasser

Proben

- 1µl cDNA
- 2µl genspezifischer Primer (Search-LC)
- 2µl SYBR Green I Mix (Roche)
- 15µl steriles Wasser

Die “*Hot Start*” *Real-Time Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) wurde im *LightCycler Instrument* (Abbildung E-2) nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- Denaturierung (95°C, 10min): Aktivierung der FastStart Taq DNA Polymerase (Roche), die eine modifizierte Form der thermostabilen rekombinanten Taq DNA Polymerase darstellt (*hot start*).
- 45 Zyklen Amplifikation: je 10sec bei 95°C, 10sec bei 68°C und 16sec bei 72°C.
- Schmelzkurvenanalyse zur Überprüfung der Spezifität: Erhitzung auf 95°C, Abkühlung auf 58°C und schließlich langsame (0,1°C/min) Erhitzung auf 95°C (Abbildung F-3).

E 3.10 Agarose-Gelelektrophorese

Zusätzlich zur Schmelzkurvenanalyse wurden die PCR-Produkte in einem 1,5%-igen Agarosegel mit 6 µl 1%-iger Ethidiumbromidlösung auf ihre Spezifität sowie auf den Gehalt genomischer DNA überprüft. Zur Charakterisierung der PCR-Produkte wurden 100 und 250bp DNA Ladder (Invitrogen) verwendet.

E 3.11 Enzymimmunoassays

Die laborchemischen Bestimmungen der Parameter IL-8, IL-10, TNF α , PMN-Elastase und Cathepsin X mittels Sandwich-ELISA wurden in der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie in der Chirurgischen Klinik Innenstadt der Ludwig-Maximilian-Universität München unter der Leitung von Frau Prof. Dr. M. Jochum durchgeführt.

E 3.11.1 Interleukin 8

IL-8 wurde mit Hilfe eines Sandwich-ELISAs der Firma milenia biotec (Milenia Interleukin-8, MKL8 1) nach Herstellerangaben quantitativ bestimmt (Referenzbereich: 0-31pg/ml, Median: 3,8pg/ml, n=39).

E 3.11.2 Interleukin 10

IL-10 wurde ebenfalls mittels eines Sandwich-ELISAs der Firma milenia biotec (Milenia Interleukin-10, MKL10 1) nach Herstellerangaben quantifiziert (Referenzbereich: 2-24pg/ml, Median: 8,9pg/ml, n= 39).

E 3.11.3 Tumor-Nekrose-Faktor α

TNF α wurde in gleicher Weise mit einem Sandwich-ELISA der Firma milenia biotec (Milenia Interleukin 8, MKTN 1) exakt nach Vorschrift des Herstellers quantitativ gemessen (Referenzbereich: 0-39pg/ml, Median: 7,5pg/ml, n=88).

E 3.11.4 PMN-Elastase

Zur quantitativen Bestimmung der PMN-Elastase in den gewonnenen Proben kam ein "two-site"-Sandwich-ELISA der Firma milenia biotec (Milenia PMN-Elastase, MKEL) zum Einsatz (Referenzbereich: 19-78ng/ml, Median: 35ng/ml, n= 57). Die in der Probe enthaltene Elastase liegt aufgrund des hohen α_1 PI-Gehaltes fast ausschließlich als Komplex mit α_1 PI vor. Dieser Komplex wurde im ersten Inkubationsschritt mit dem PMN-Elastase-Teil an polyklonale, aviäre, an eine Festphase gekoppelte spezifische Antikörper gegen PMN-Elastase gebunden. Im zweiten Inkubationsschritt banden mit Peroxidase markierte Kaninchen-Antikörper gegen α_1 PI an den α_1 PI-Anteil des Komplexes. Anschließend wurde im dritten Inkubationsschritt die Aktivität der Peroxidase mit Hilfe des Substrats TMB (3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin) photometrisch bei 450 nm bestimmt. Die Menge des gebildeten Farbstoffes war dabei der Konzentration der PMN-Elastase direkt proportional. Anhand einer entsprechenden Standardkurve konnten die exakten PMN-Elastase- α_1 PI-Konzentrationen ermittelt werden.

E 3.11.5 Cathepsin X

Die Messungen von Cathepsin X erfolgten mit Hilfe eines Sandwich-ELISAs, der von Dr. D. Nögler in der in der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie in der Chirurgischen Klinik Innenstadt der Ludwig-Maximilian-Universität München entwickelt worden ist [Nögler et al., 2006]. Mit Hilfe dieses Immunoassays war die intra- und extrazelluläre Detektion und Quantifikation von Cathepsin X möglich. Die in das Testsystem eingesetzten polyklonalen Antikörper erkennen beides, sowohl die Proform als auch die prozessierte, aktive Form von Cathepsin X. Das Testprinzip beruht darauf, dass das Cathepsin X in der Citratplasmaprobe zunächst an die Festphasen-gebundenen Kaninchen-IgG gegen humanes Procathepsin X bindet. In einem zweiten Schritt erfolgt die Bindung von Cathepsin X an Procathepsin X-Antikörper aus Schaf. Die Detektion erfolgte daraufhin mit Meerrettichperoxidase-konjugierten Ziege/Schaf-IgGs und anschließender Substratreaktion. Der Referenzbereich, gemessen in Citratplasmaproben von 43 gesunden Probanden, beträgt 31-165ng/ml, der Median liegt bei 70ng/ml.

E 4 Auswertung

E 4.1 Klinische Auswertung

Zu den festgelegten Blutabnahmezeitpunkten wurden beim Patientenkollektiv auch die möglichen Einflussfaktoren auf die mikrobiologischen Ergebnisse sowie das klinische Bild der einzelnen Patienten erfasst. Das Differentialblutbild diente der Einstufung eines eventuellen entzündlichen Geschehens im untersuchten Zeitintervall. Mit Hilfe des histopathologischen Befundes ließen sich die Patienten in Bezug auf die Art und Ausbreitung des Karzinoms einordnen. Die vor und während der Operation verabreichten Sedativa, Analgetika, Infusionen und Blutprodukte spielten als Einflussfaktoren für die Evaluierung der Ergebnisse eine zusätzliche Rolle. Die OP-Dauer, Schnittführung sowie die Notwendigkeit einer operativen Revision wurde den jeweiligen OP-Protokollen entnommen.

E 4.2 Statistische Auswertung

Zur Datenerfassung wurde das Programm EXCEL Version 11.3.7 (Microsoft), zur statistischen Auswertung das Programm SigmaStat 3.5 (SYSTAT) und zur graphischen Darstellung das Programm SigmaPlot 8.0 (SYSTAT) verwendet.

F Ergebnisse

F1 Operatives Vorgehen

Diagnose, Alter und Tumorgrading der einzelnen Patienten können der folgenden Tabelle F-1 entnommen werden

Tabelle F-1: Geschlecht, Alter, Diagnosen und Besonderheiten der Studienpatienten

Patienten-Nr.	Geschlecht [M/W]	Alter	Diagnose	Besonderheiten	Grading (G)
TP01	M	74	Kolon-Ca		G2
TP02	M	68	Rektum-Ca	Nach 12h-Abnahme verstorben	G3
TP03	W	82	Rektum-Ca oberes 1/3	Cholezystitis	G2
TP04	W	66	Rektum-Ca mit Lebermetastasen		G2
TP05	W	84	Blutendes Rektum-Ca mit Sphinkter und Vaginalinfiltration	Revision aufgrund von Nachblutung	G3
TP06	W	92	Kolon-Ca proximales Colon descendens	Intraoperative Gabe von 3 EK	G2
TP07	M	67	Adeno-Ca des Rektums, der Beckenwand und Os-sacrum- Infiltration	Intraoperative Gabe von 4 EK und 3 FFP	G2
TP08	M	51	Rektum-Ca, 10cm ab ano		G2
TP09	W	66	Nicht stenosierendes Karzinom im distalen Colon ascendens		G3
TP10	M	75	Adeno-Ca Rektum stenosierend mittleres/unteres 1/3	zusätzlicher Skrotal- und Hodenabszess links; Gabe von 1 EK	G2
TP11	M	51	Adeno-Ca Colon Transversum mit fortgeschrittener Lebermetastasierung	Revision aufgrund von postoperativem Bauchdeckenhämatom	G3

Bei fünf Patienten (TP01, TP02, TP03, TP04, TP09, TP11) wurde ein Operationsverfahren zur Tumorresektion angewendet, bei vier Patienten (TP05, TP06, TP07, TP08) erfolgte eine Kombination aus zwei Verfahren und bei zwei Studienteilnehmern (TP03, TP10) kamen drei verschiedene Operationsverfahren zum Einsatz.

Ausgenommen bleiben hier die jeweils den Eingriff begleitenden operativen Verfahren wie Stomaanlagen (Deszendo- (TP05 und TP07) bzw. Ileo-stoma (TP02 und TP03), Lymphknotendissektionen (TP04, TP09 und TP11), Probeexcisionen der Leber (TP04 und TP11), Portimplantationen (TP04, TP07 und TP11) sowie abdominelle Omentumplastiken (TP03, TP06 und TP07).

F 2 Histopathologische Untersuchung der Resektate

Die intra- bzw. postoperative histopathologische Untersuchung der Resektate ergab nach der TNM-Klassifikation [UICC, 2002] bei zwei Patienten eine Tumorausdehnung (T) gemäß Kategorie 2, bei sieben Patienten nach Kategorie 3 und bei weiteren zwei gemäß Kategorie 4. In Bezug auf den Lymphknotenbefall (N) konnte bei zwei Patienten ein Befall gemäß Kategorie 1 und bei einem ein Befall nach Kategorie 2 gefunden werden. Bei den restlichen Patienten wurde kein Lymphknotenbefall festgestellt. Bei drei von elf Patienten konnte eine Fernmetastasierung (M) nachgewiesen werden. Bezüglich des Differenzierungsgrades der kolorektalen Adenokarzinome wurden 7 Patienten in die Grading-Kategorie G2 und 4 Patienten in G3 eingeordnet.

F 3 Differentialblutbild

Synchron zu den festgelegten Blutentnahmen für die Zellseparation wurde jeweils ein Differentialblutbild der Patienten ausgewertet. Innerhalb der ersten sechs Stunden post operativ ist eine - wenn auch innerhalb des Referenzbereichs - deutliche Zunahme der Gesamtleukozytenzahl zu erkennen, die bis zum 48h-Wert auf einem konstant hohen Niveau (MW 9300/ μ l) blieb. Ein Abfall der Gesamtleukozytenzahl auf MW 8200/ μ l konnte erst zum Abnahmezeitpunkt 72h beobachtet werden (Abb. F-1).

Eine Übersicht über die Ergebnisse des großen Blutbildes zum Zeitpunkt der ersten Blutabnahme (0h) liefert Tabelle F-2. Hämoglobin war zum Zeitpunkt unmittelbar vor der Operation (0h-Abnahme) bei zehn Patienten und Hämatokrit bei sieben von insgesamt 11 Patienten erniedrigt. Die Zahl der Lymphozyten zeigte sich erniedrigt und die der Neutrophilen grenzwertig erhöht. Die Leukozytenzahl war lediglich bei zwei Patienten unterhalb des Referenzbereiches und ansonsten unauffällig, so dass ein akut entzündliches Geschehen anhand des Blutbildes als unwahrscheinlich angesehen werden konnte.

Tabelle F-2: Großes Blutbild zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme (0h)

(↑ erhöht; ↓ erniedrigt)

Initiale Blutuntersuchung bei 0h-Abnahme	Studienpatienten [MW/SD] (n=10)	Referenzbereiche lt. Zentrallabor Klinikum Uni München (m / w)
Hb	11,7 (↓) / 1,7 g/dl	14-17,5 / 12-15,7 g/dl
Hk	33,1 (↓) / 4,5 l/l	0,4-0,52 / 0,35-0,47 l/l
Erythrozyten	3,8 (↓) / 0,5 x 10 ⁶ /μl	3,9-5,4 / 4,6-6,2 x 10 ⁶ /μl
Thrombozyten	247,33 / 96,44 x 10 ³ /μl	150-400 x 10 ³ /μl
Lymphozyten	16,32 (↓) / 5,82 %	25-40 %
Leukozyten	6,12 / 2,29 x 10 ³ /μl	4,0-11,3 x 10 ³ /μl
Neutrophile	73,17 (↑) / 7,57 %	50-70 %
Eosinophile	1,73 / 1,04 %	<4 %
Basophile	0,48 / 0,61 %	(<1 %)
Monozyten	8,14 / 2,83 %	(<15 %)

Der prozentuale Anteil der Granulozyten an der Gesamtleukozytenzahl stieg innerhalb der ersten 12h nach Trauma von 71% auf 89% kontinuierlich an und fiel dann vom 12h- bis zum 72h-Wert wieder auf 79% ab. Die Anzahl der Monozyten nahm innerhalb der ersten sechs Stunden von 8% auf 5% stark ab, um im Verlauf der folgenden 18h in ihrer prozentualen Beteiligung an der Gesamtleukozytenzahl wieder fast bis auf den Ausgangswert zuzunehmen, auf dessen Niveau sie sich bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes in etwa konstant hielten (Abbildung F-1). Eine gesonderte Unterteilung der Granulozyten in Segmentkernige und Stabkernige erfolgte im standardmäßig durchgeführten Differentialblutbild am Automaten nicht.

Differentialblutbild

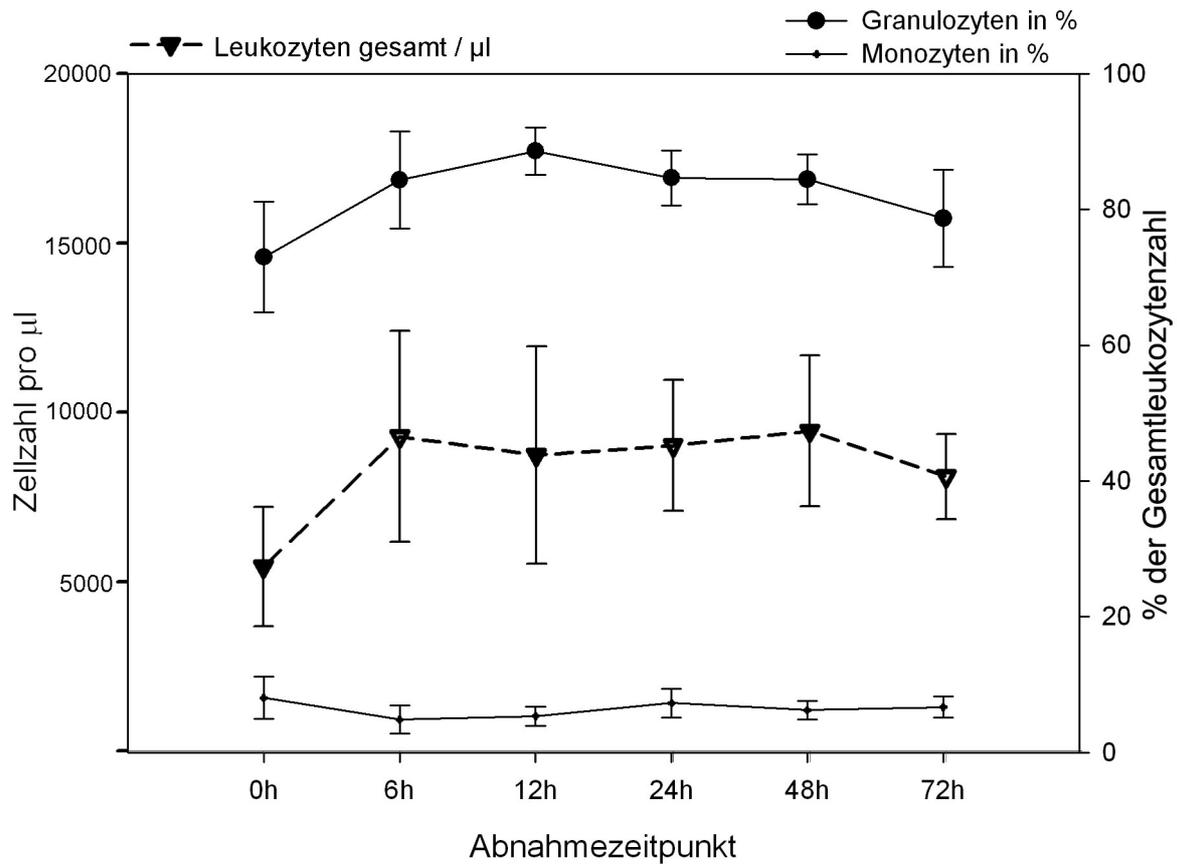


Abbildung F-1: Differentialblutbild. Auf der linken Ordinate ist die Gesamtzellzahl der Leukozyten pro μl [MW \pm SD], auf der rechten Ordinate der prozentuelle Anteil der Granulozyten und Monozyten an der Gesamtleukozytenzahl [MW \pm SD] zu den jeweiligen Abnahmezeitpunkten auf der Abszisse dargestellt.

F 4 Messungen der Expressionsprofile

F 4.1 Vorbemerkungen

Die Validierung des Versuchsaufbaus für die Messung des mRNA-Expressionsniveaus aus PAXgene Tubes erfolgte durch die Arbeitsgruppe von Dr. J. Landes mit Hilfe von H. Laven und C. Schütz im Forschungslabor der Chirurgischen Klinik im Klinikum Innenstadt der LMU München [Landes et al., 2007]. Dieses System verhindert die RNA-Degradation mit Hilfe von unmittelbarer Zelllyse nach der Blutabnahme [Bieli et al., 2008]. An 4 gesunden Probanden (2 weibliche und 2 männliche Probanden im Alter von 23–33 Jahren) wurde die bislang etablierte Zellseparation von immunkompetenten Zellen mit der „Snapshot“-Analyse der gesamten RNA mittels PAXgene RNA System verglichen. Dazu wurden bei jeder Blutabnahme (0h, 6h, 12h, 24h und 72h) zwei identische EDTA Vacutainer mit Vollblut gefüllt. Eine Probe blieb als Negativkontrolle unversehrt, die andere wurde mit 10 mL einer 100 ng/mL Lipopolysaccharid- (LPS-) Lösung (Sigma-Aldrich, Munich, Germany) stimuliert und für 4h bei 37,8°C inkubiert. Im Anschluss wurden diese Proben in PAXgene Tubes überführt. In der Kontrollgruppe wurden 2 x 2,5ml Vollblut in PAXgene RNA Tubes gefüllt und anschließend mindestens 2h bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie entsprechend dem Protokoll des Herstellers mit dem PAXgene blood RNA-Kit (PreAnalytiX, Hombrechtikon, Schweiz) aufbereitet (siehe E 3.5) [Haertel et al., 2001] und anschließend mit Hilfe der RT-PCR quantifiziert wurden (siehe E 3.9). Die mRNA-Expression von TNF α zeigte sich mit 257 ± 53 Kopien/50ng mRNA in den nativen PAXgene Tubes signifikant geringer ($p < 0,05$) im Vergleich zu 3567 ± 763 Kopien/50ng mRNA nach Stimulation mit LPS (Abbildung F-2) [Schroeder et al., 1989; Landes et al., 2007].

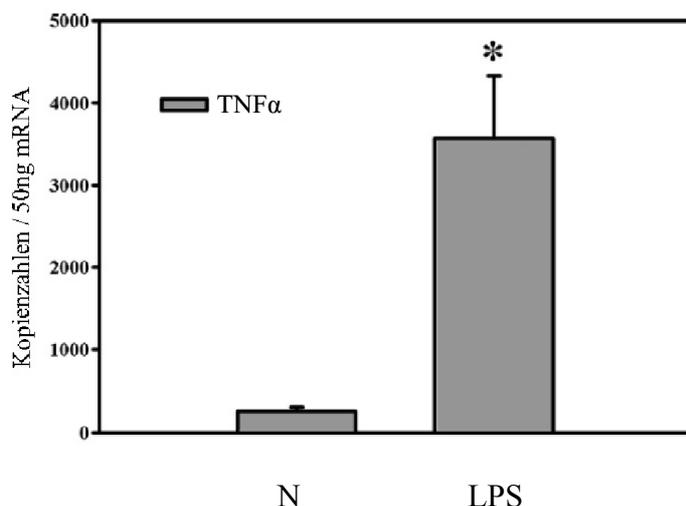


Abbildung F-2:

mRNA-Expression von TNF α in der Kontrollgruppe (4 gesunde Probanden) nativ (N) und nach LPS-Stimulation [MW \pm SD] * $p < 0,05$ im Mann-Whitney U-Test versus Kontrollgruppe [Landes et al., 2007]

Für diese Pilotstudie wurden die PAXgene Tubes synchron mit den Abnahmen für die Zellseparation mit Patientenblut gefüllt und zunächst für 24 Stunden bei Raumtemperatur (18°C-28°C) inkubiert, um die Lyse aller Blutzellen sicherzustellen. Anschließend wurden die Tubes bei 8°C gelagert und innerhalb von 5 Tagen für die RNA-Isolation aufbereitet.

F 4.2 Validität und Spezifität der PCR

Die PCR-Effizienz und Berechnung der mRNA-Äquivalente lässt sich durch verschiedenste Methoden bestimmen. Am häufigsten wird eine Standardkurve (Abbildung. F-3) aus unterschiedlichen Verdünnungsstufen erstellt, aus deren Steigung die Real-Time PCR (RT-PCR) bestimmt werden kann. Die eingesetzte Menge an cDNA (mRNA) wird in einer logarithmischen Funktion gegen die Zyklenzahl dem Crossing Point (CP) dargestellt. Die Effizienz berechnet sich nach der Formel: $E = 10[-1/\text{Steigung}]$.

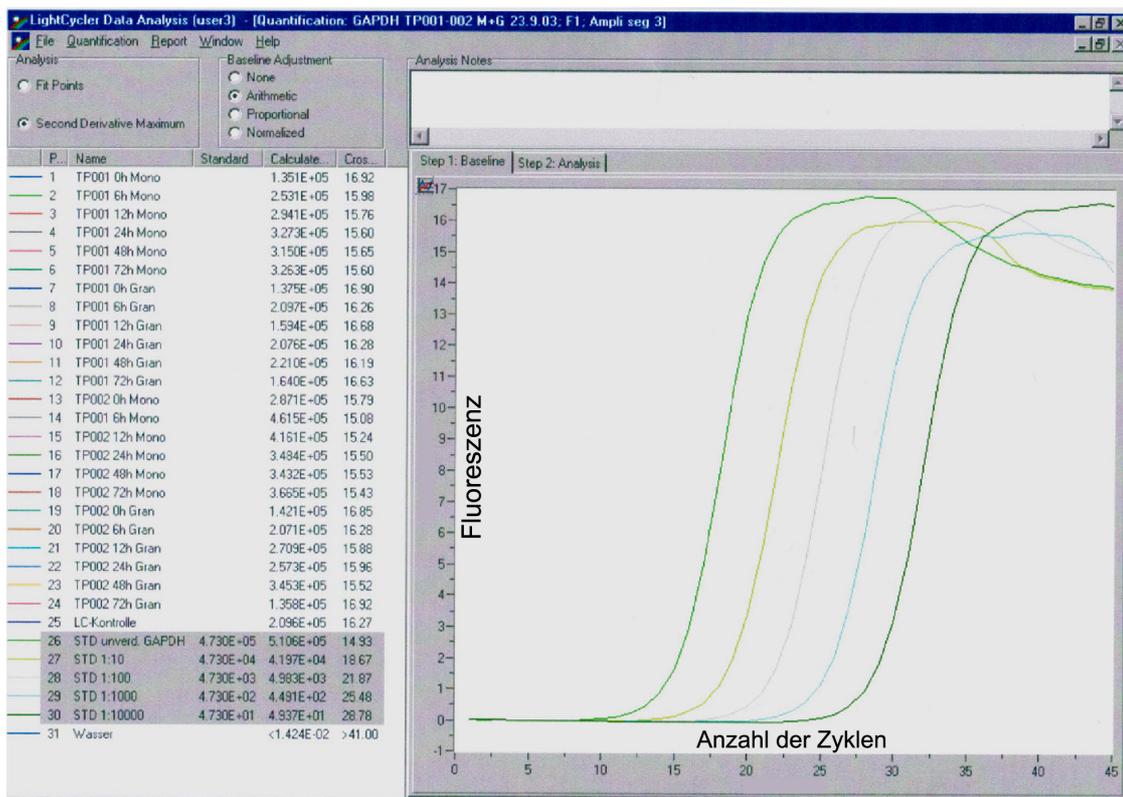


Abbildung F-3: Beispiel für eine Standardkurve (GAPDH in Monozyten TP01/TP02)

In der Real-Time PCR wird heute nicht mehr primär in DNA-Produktmengen oder Konzentrationen gerechnet, sondern als Maß für die Quantifizierung der Startmenge werden die CP-Werte herangezogen.

Sie entsprechen der Anzahl der PCR-Zyklen, die nötig sind um ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau zu erreichen [Holzapfel et al., 2007]. Am CP befindet sich in allen Reaktionsgefäßen die gleiche Menge an neu synthetisierter DNA. Im Falle einer 100%-Effizienz der PCR verdoppelt sich mit jedem Zyklus die DNA-Produktmenge und analog dazu das Fluoreszenzsignal. Ein um eine Einheit geringerer CP entspricht der doppelten Menge an eingesetzter cDNA -respektive mRNA-Startmenge. Es besteht eine lineare, umgekehrt proportionale Beziehung zwischen dem Logarithmus der eingesetzten Menge und dem CP [Pfaffl et al., 2001]. Ist die Ausgangsmenge bekannt, kann eine Standardkurve durch Auftragen des Logarithmus der Ausgangsmenge gegen den CP konstruiert werden [Livak et al., 2001]. Alle Proben werden normiert, indem die errechnete Kopienzahl des Targetgens durch die Kopienzahl der internen Referenz geteilt wird: $\text{Gen (normiert)} = \text{Kopienzahl Target} / \text{Kopienzahl Referenz}$. Mit der $\Delta\Delta C_p$ Methodik kann keine absolute, sondern nur eine relative Quantifizierung durchgeführt werden. Bei den Amplikons der Firma Search LC wird ein Standard mit einer genau definierten Kopienzahl mitgeliefert, daher besteht die Möglichkeit, die Transkripte absolut quantifizieren. Aus diesem Grund ist hier eine relative Quantifizierung nicht indiziert. Die unterschiedliche Expression zweier Proben relativ zueinander lässt sich als Quotient darstellen und ergibt eine n-fache Expression:

$\text{Gen (normalisiert) (Gruppe A)} / \text{Gen (normalisiert) (Gruppe B)} = n\text{-fache Expression Gruppe A zu Gruppe B}$

Zur Überprüfung der Spezifität der gemessenen mRNA-Gene diente eine Schmelzkurve, die eine Auftrennung aller Doppelstrang-Edukte zur gleichen Temperatur zeigte. Bei einer Schmelzkurvenanalyse wird die DNA aufgeschmolzen, indem die Temperatur langsam kontinuierlich erhöht wird ($50\text{ }^{\circ}\text{C} \rightarrow 95\text{ }^{\circ}\text{C}$). Bei einer für das Fragment spezifischen Schmelztemperatur denaturiert der Doppelstrang zu zwei einzelsträngigen Molekülen. Dabei wird der Fluoreszenzfarbstoff (z. B. SYBR Green, Roche) freigesetzt, und es wird eine Fluoreszenzabnahme registriert. Da die doppelsträngige DNA von spezifischen PCR-Produkten einen höheren Schmelzpunkt hat als unspezifisch entstehende Primerdimere, ist eine Unterscheidung möglich. Die Höhe des Peaks der Schmelzkurve gibt annähernd Auskunft über die Menge des gebildeten Fragments. Im aufgeführten Fall lag die Schmelztemperatur bei $90,11\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Abbildung F-4).

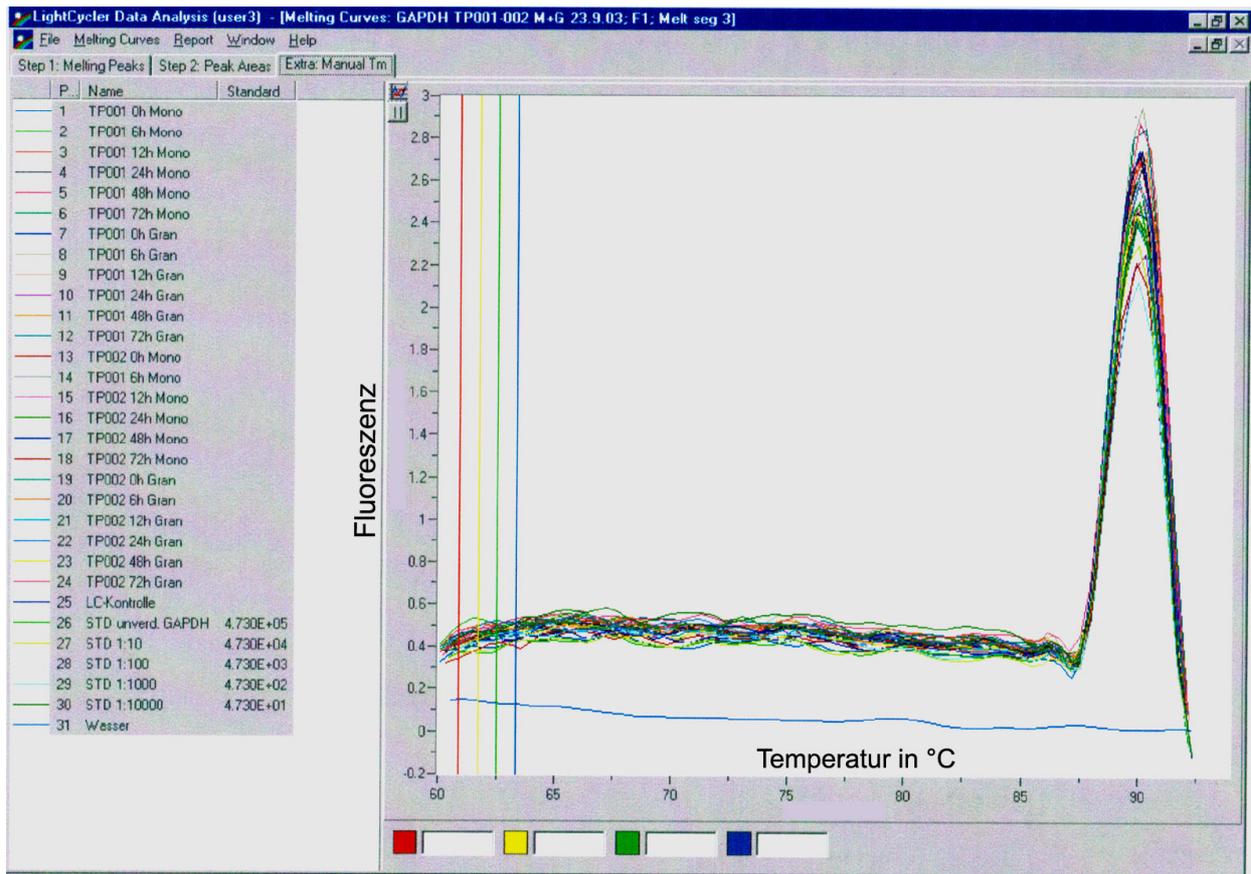


Abbildung F-4: Beispiel für eine Schmelzkurve von GAPDH in Granulozyten (TP01 und TP02)
Schmelztemperatur bei 90,11° C

F 4.3 Gelelektrophorese

Die RT-PCR-Produkte aller Patientenproben wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, wodurch die Spezifität der nachgewiesenen Gene bestätigt werden konnte. Abbildung F-4 zeigt die Gelelektrophorese der Cathepsin X-PCR-Produkte der Patienten TP01, TP03, TP04 und TP05 sowie die Standardverdünnungsreihe von Cathepsin X. Dabei war bei allen Cathepsin X-Produkten bei einem Molekulargewicht von etwa 270 bp eine deutliche Bande sichtbar. Durch das Vorliegen von nur einer Hauptbande (270 bp) bei allen durchgeführten Elektrophorese-Läufen konnte so die Spezifität des jeweils bestimmten Gens nachgewiesen werden (Abbildung F-5).

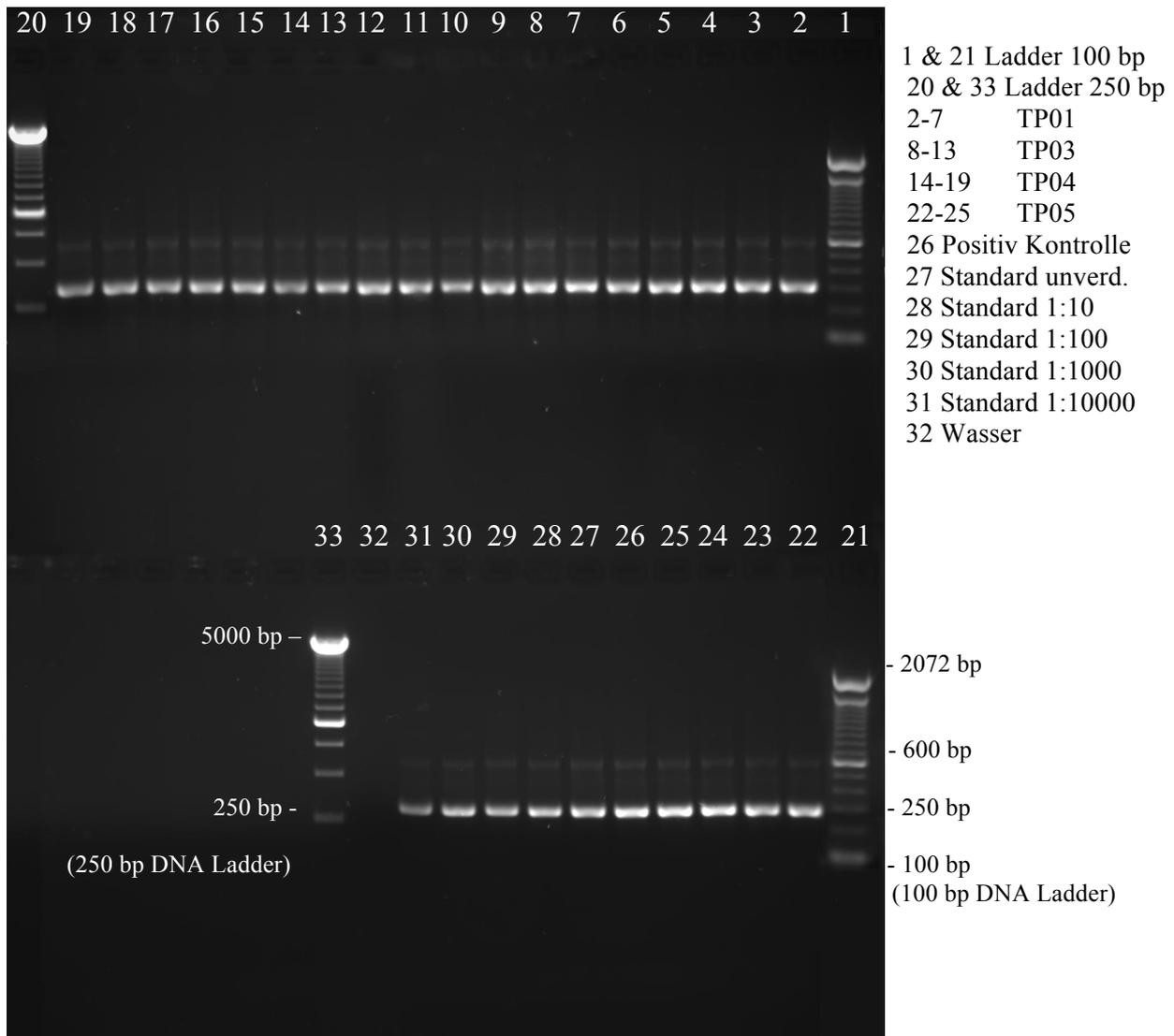


Abbildung F-5: Gelelektrophorese der Cathepsin X-PCR-Produkte
 (Patienten TP01, TP03, TP04 und TP05)

F 4.4 Vergleich der Zellseparation mit dem PAXgene-Abnahmesystem anhand der Expression von GAPDH und TNF α

Die Ergebnisse der Zellseparation von Monozyten und Granulozyten sowie des *PAXgene*-Abnahmesystems sollen in den Abbildungen F-6 bis F-10 verdeutlicht werden. Die Expression des *house-keeping-genes* GAPDH in Granulozyten zeigt Abbildung F-6.

GAPDH-Kopienzahlen in Granulozyten

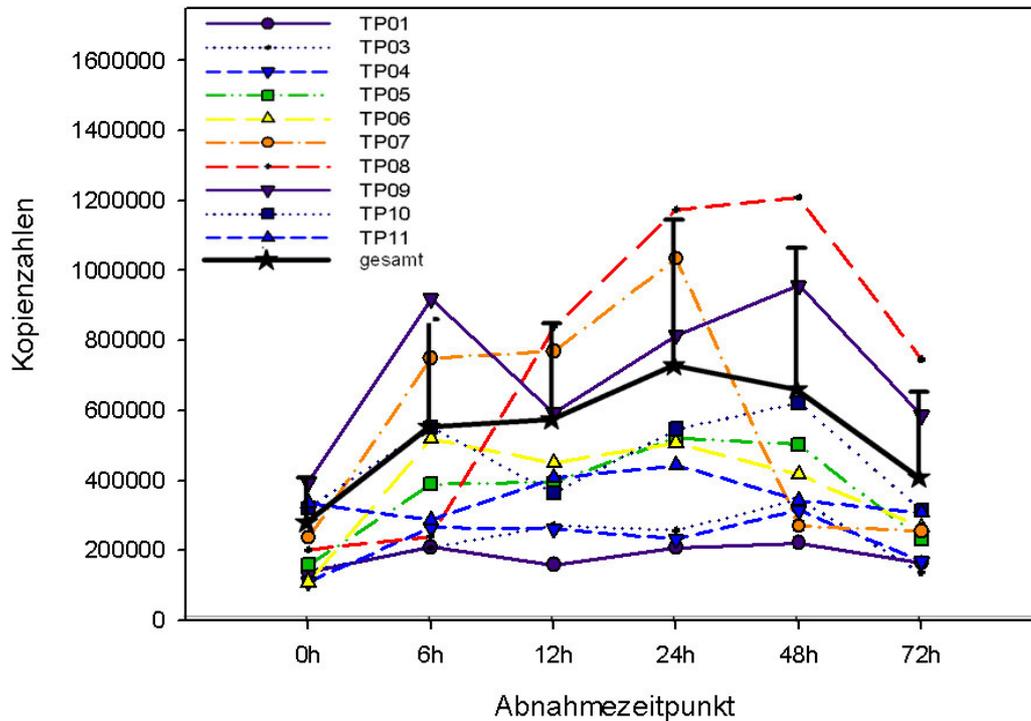


Abbildung F-6: Expressionsprofil des *house-keeping-genes* GAPDH in Granulozyten.
cDNA Kopienzahlen [MW±SD]

Aufgrund der geringen Studienpopulation sind die Standardabweichungen in der Darstellung der Mittelwerte sehr groß, weshalb eine Auswertung auf jeden einzelnen Patienten bezogen sinnvoller erscheint. Statistisch sind die Ergebnisse aufgrund der hohen Standardabweichung durch das geringe Patientenkollektiv und die interindividuellen Schwankungen nicht signifikant, daher können nur Tendenzen beschrieben werden. Der Kurvenverlauf der GAPDH cDNA-Expression der Tumorpatienten TP01, TP03 und TP04 unterliegt über den Untersuchungszeitraum von 72 Stunden nur sehr geringen Schwankungen. Bei den Patienten TP05 bis TP10 ist innerhalb der ersten 6 Stunden eine deutliche Zunahme der Kopienzahlen zu erkennen, bei TP11 hingegen eine Abnahme. Bei der 12h-Messung zeigt sich bei TP06, TP09, TP10 eine Abnahme der cDNA-Kopienzahlen im Vergleich zum 6h-Wert. Die cDNA-Kopienzahlen von TP07 und TP11 nehmen bis zur 12h-Abnahme leicht, die von TP08 stark zu. Die größte Zunahme erfahren TP07, TP08 und TP09 zwischen 12 und 24 Stunden post operativ, was sich in der höchsten Expression beim 24h-Messwert bemerkbar macht. Bei TP04, TP08, TP09 und TP10 zeigt sich auch nach der 24h-Messung noch eine Zunahme der GAPDH cDNA-Kopienzahlen in den Granulozyten, wobei beim Rest der Studienpopulation die Zahl abnimmt.

72h nach der Operation zeigt sich bei allen Patienten eine Abnahme der Kopienzahl im Vergleich zum 48h-Wert. Die höchste Expression zeigt TP08 48h nach dem operativen Eingriff (Abbildung F-6). Das Expressionsprofil von GAPDH in Monozyten zeigt Abbildung F-7. Innerhalb der ersten 6h ist mit Ausnahme von TP07 bei allen Patienten eine Zunahme der cDNA-Kopienzahlen zu erkennen, die bis zum 12h-Abnahmezeitpunkt bei allen Studienteilnehmern bis auf TP03 und TP09 weiter zunimmt. Die höchsten Kopienzahlen zeigen TP07 und TP10 bei der 12h-Abnahme. Bis zur 24h-Blutabnahme zeigt sich bei TP01, TP04, TP05, TP07 und TP09 eine weitere Zunahme der Kopienzahlen, bei den übrigen Patienten eine Abnahme. Die größten Schwankungen zwischen Zu- und Abnahme der GAPDH cDNA-Kopienzahlen sind zwischen der 24h- und der 48h-Abnahme zu erkennen. Bei TP08 zeigt sich bei 48h eine deutliche Zunahme der Kopien, ansonsten bei den anderen Patienten bis auf TP06 und TP10 eine Abnahme. Bis zum Ende des Untersuchungsintervalls sind in der Mittelwertskurve weniger Unterschiede erkennbar, die Kopienzahlen schwanken nur noch geringfügig obwohl sich die individuellen Kopienzahlen teilweise deutlich unterscheiden (Abbildung F-7).

GAPDH-Kopienzahlen in Monozyten

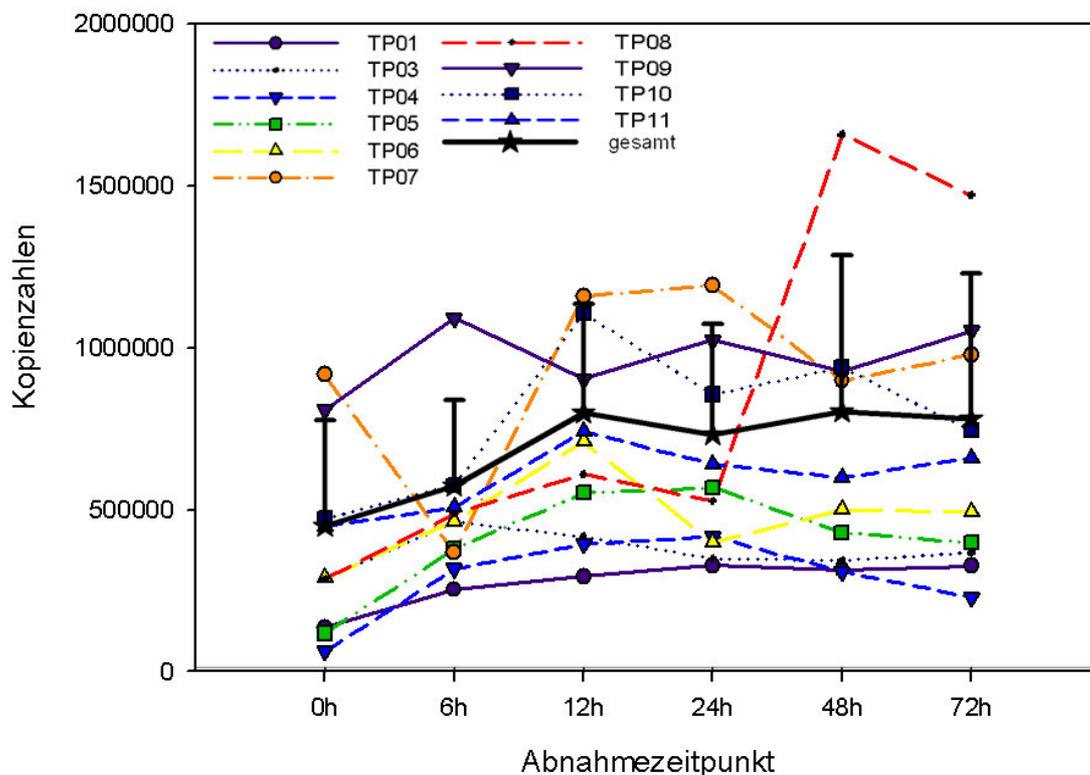


Abbildung F-7: Expressionsprofil des *house-keeping-genes* GAPDH in Monozyten
cDNA-Kopienzahlen [MW±SD]

Synchron zu den vorhergehenden Abbildungen zeigt Abbildung F-8 das Expressionsprofil des *house-keeping-genes* GAPDH im PAXgene-System. Auffällig sind hier die im Vergleich zur Separation insgesamt viel geringeren Kopienzahlen. Außer bei TP06 ist bei allen Patienten innerhalb der ersten 6h eine deutliche Zunahme der GAPDH-Kopienzahlen zu erkennen. Die stärkste Expression von GAPDH-cDNA konnte bei TP09 am 6h-Messwert detektiert werden. Aus der Darstellung der Mittelwerte ist zu erkennen, dass das Expressionsprofil zwischen dem 6h- und 48h-Messzeitpunkt auf einem annähernd gleichen Niveau bleibt. Die größten Ausnahmen bilden TP09, TP10 und TP11, die einen Peak in der GAPDH Expression bei 6h, 12h bzw. 24h zeigen. Bei TP10 ist nach dem hohen 24h-Wert eine stetige Abnahme der Expression bis zum Ende des Untersuchungsintervalls bei 72h zu erkennen. Insgesamt ist das Expressionsprofil von GAPDH in PAXgene am ehesten mit dem in Granulozyten zu vergleichen.

GAPDH-Kopienzahlen in PAXgene

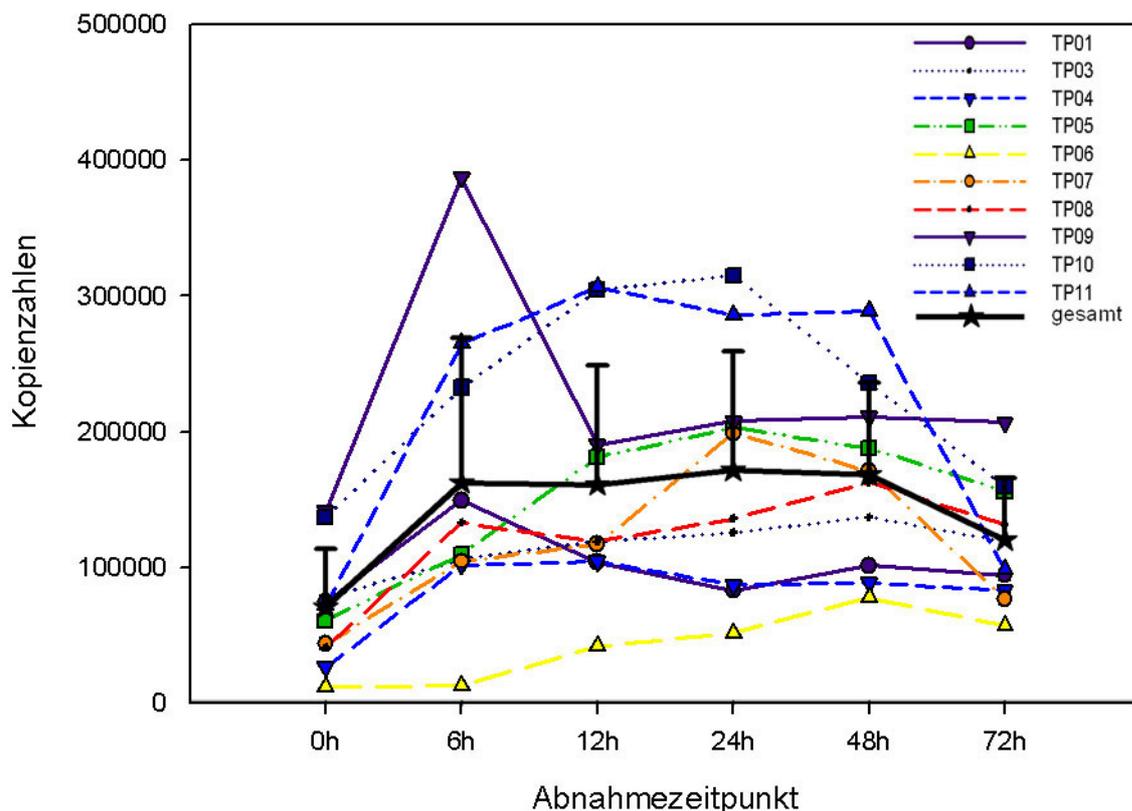


Abbildung F-8: Expressionsprofil des *house-keeping-genes* GAPDH im PAXgene-System. cDNA Kopienzahlen [MW±SD]

Ganz anders verhält sich das Expressionsprofil von TNF α in Granulozyten (Abbildung F-9). Neben extremen Schwankungen in den Kopienzahlen ist eine Abnahme der TNF α -Expression bei allen Patienten zwischen dem 0h- und 6h-Abnahmezeitpunkt deutlich zu erkennen. Den höchsten Ausgangswert stellt TP07 dar. Zwischen der 6h-Abnahme und dem Ende des Untersuchungsintervalls bei 72h ist eine kontinuierliche Zunahme der TNF α -Kopienzahlen bis über die Höhe des jeweiligen Ausgangswertes bei TP03 und TP06 festzustellen. Bei TP01, TP07 und TP08 zeigt sich beim 48h-Messzeitpunkt eine kurzfristige Abnahme der exprimierten Kopienzahlen. Bei TP04 fallen die Kopienzahlen nach dem 24h-Messzeitpunkt, bei TP05 nach der 48h-Abnahme stetig ab. TP11 zeigt im gesamten Verlauf aufgrund der extrem geringen Kopienzahlen nur geringfügige Veränderungen.

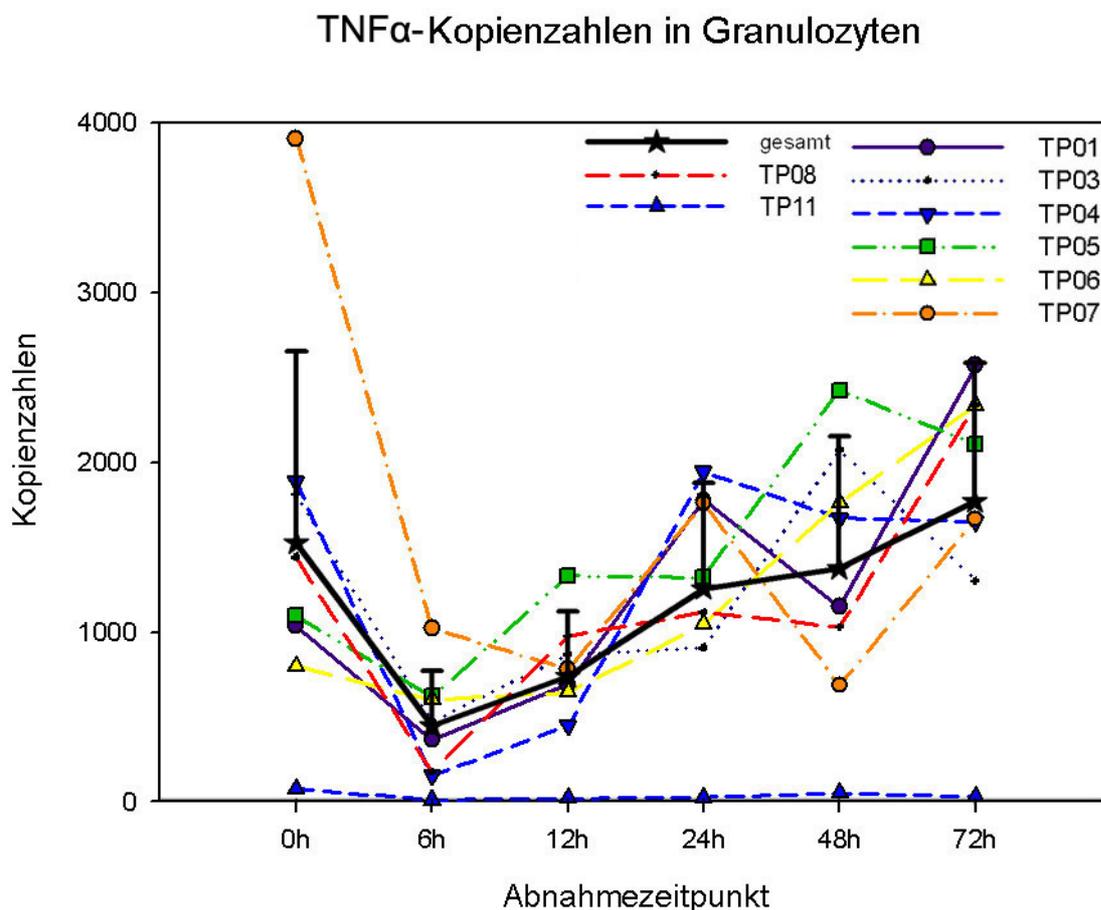


Abbildung F-9: Expressionsprofil von TNF α in Granulozyten. TP09 und TP10 werden aufgrund von deutlich höheren Kopienzahlen isoliert in Abbildung F-10 aufgeführt. cDNA-Kopienzahlen [MW \pm SD]

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass bei allen Patienten die TNF α -Expression bei der 6h-Abnahme auf einen Tiefstwert abfällt, weshalb bei diesem Messzeitpunkt auch die Standardabweichung am geringsten ist. TP09 und TP10 wurden aufgrund von deutlich erhöhten Kopienzahlen gegenüber den anderen Patienten in Abbildung F-10 getrennt dargestellt. Da ihr Expressionsprofil nur bei TNF α in Monozyten und Granulozyten deutlich von den Kopienzahlen der anderen Patienten abweicht, ist nicht von einer Kontamination oder einer zu hohen Menge an eingesetzter c-DNA auszugehen, sondern von einer individuellen Abweichung im Expressionsprofil von TNF α (Abbildung F-10). Bei TP09 zeigt sich zudem zur 12h-Abnahme ein deutlicher Peak in der Kopienzahl von TNF α .

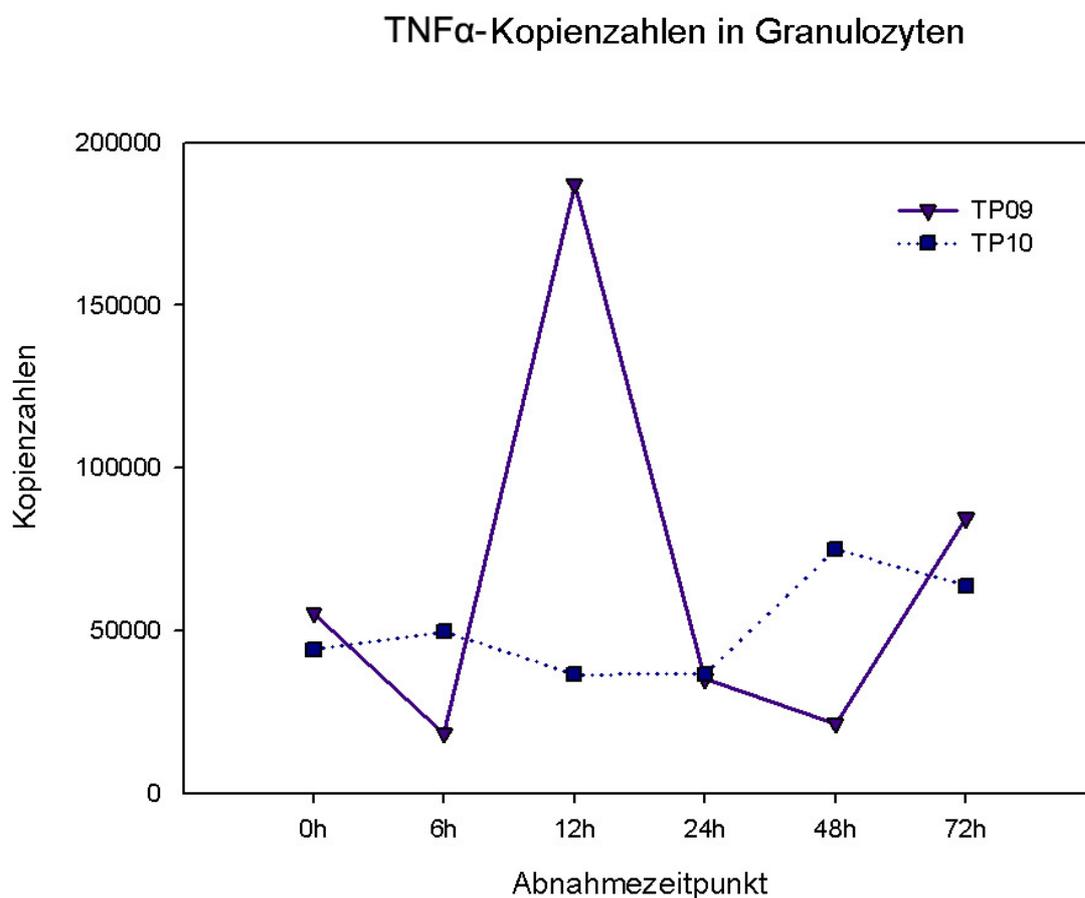


Abbildung F-10: Expressionsprofil von TNF α in Granulozyten bei TP09 und TP10.
cDNA-Kopienzahlen [MW \pm SD]

Ganz anders als in Granulozyten verhält sie sich die TNF α -Expression in Monozyten (Abbildung F-11), unabhängig von den insgesamt wenig geringeren Kopienzahlen. In der Auswertung aller Patienten lässt sich nur eine geringe Schwankung mit einem Höchstwert für die

gemittelte Kopienzahlen beim 24h-Abnahmezeitpunkt erkennen, der durch die erhöhte Expression von TP05 zu diesem Zeitpunkt bedingt ist. Durch den individuell stark abweichenden Kurvenverlauf der einzelnen Patienten weist das Gesamtkollektiv eine hohe Standardabweichung auf. TP01 zeigt eine stetige Zunahme des Expressionsprofils vom 0h- bis zum 72h- Messzeitpunkt, wohingegen TP11 wie auch schon in den Granulozyten (Abbildung F-9) über den gesamten Messzeitraum nur äußerst geringe Kopienzahlen aufweist. Mit Ausnahme von TP03 und TP08, die die höchsten Ausgangswerte bei der 0h-Abnahme aufweisen und dann bis zur 6h-Abnahme in den Kopienzahlen stark abfallen, zeigen alle Patienten eine stete Zunahme der Kopienzahlen in den ersten 12 Stunden des Untersuchungsintervalls (Abb. F-11).

TNF α -Kopienzahlen in Monozyten

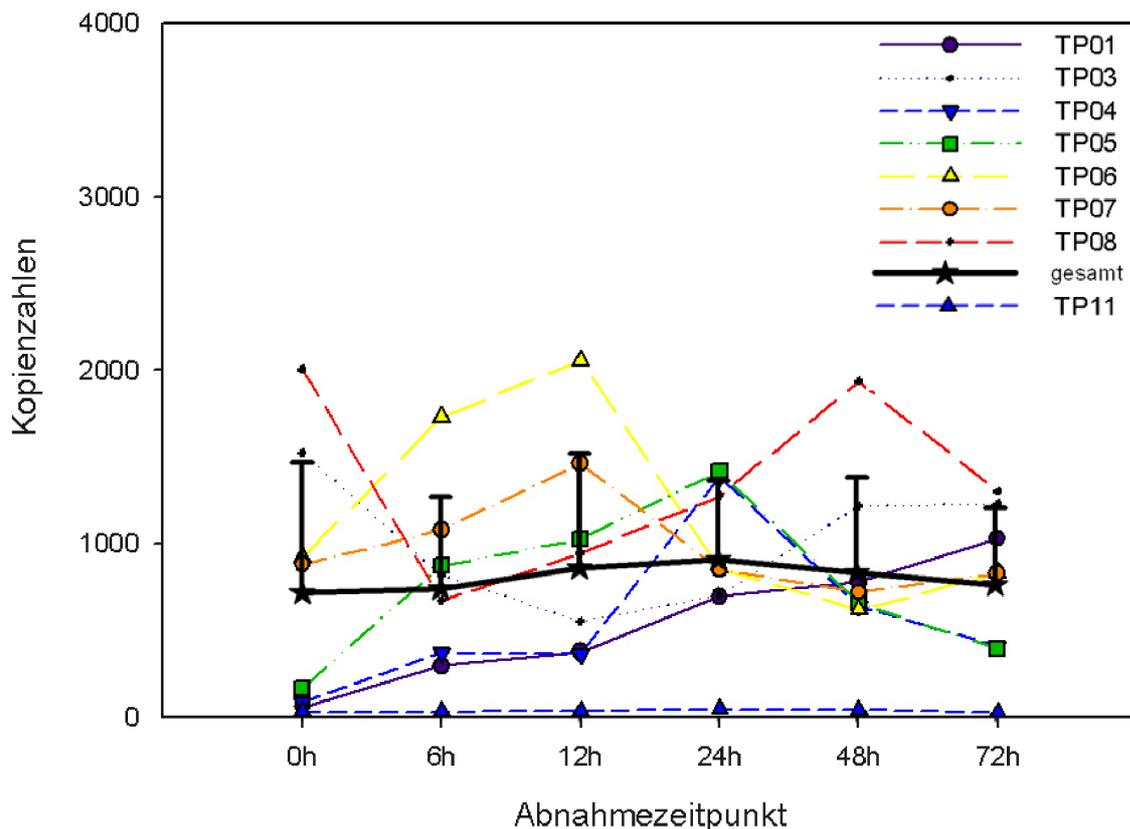


Abbildung F-11: Expressionsprofil von TNF α in Monozyten. TP09 und TP10 werden aufgrund von deutlich höheren Kopienzahlen isoliert in Abb. F-12 aufgeführt
cDNA Kopienzahlen [MW \pm SD]

Bei TP06 und TP07 kann ab dem 12h-Messzeitpunkt eine Abnahme des Expressionsprofils detektiert werden, wobei der Rest der Patienten bis zur 24h-Abnahme weiterhin eine Zunahme

aufweist. Nach einem Rückgang der Kopienzahlen zwischen der 24h- und 48h-Abnahme bei TP04, TP05, TP06 und TP07, zeigt auch TP08 ab der 48h-Abnahme einen Abfall des Expressionsprofils. Nur bei TP03, TP06 und TP07 erhöhte sich die Anzahl der Kopien zum letzten Abnahmezeitpunkt erneut ein wenig. Durch die stärkere Abnahme im Expressionsprofil von TP04, TP05 und TP08 zeigt sich jedoch insgesamt eine Abnahme der Gesamtkopienzahl.

Auch in den Monozyten variierte die Expression von TNF α bei TP09 und TP10 erheblich vom Rest der untersuchten Patienten, weshalb sie in Abbildung F-12 dargestellt werden.

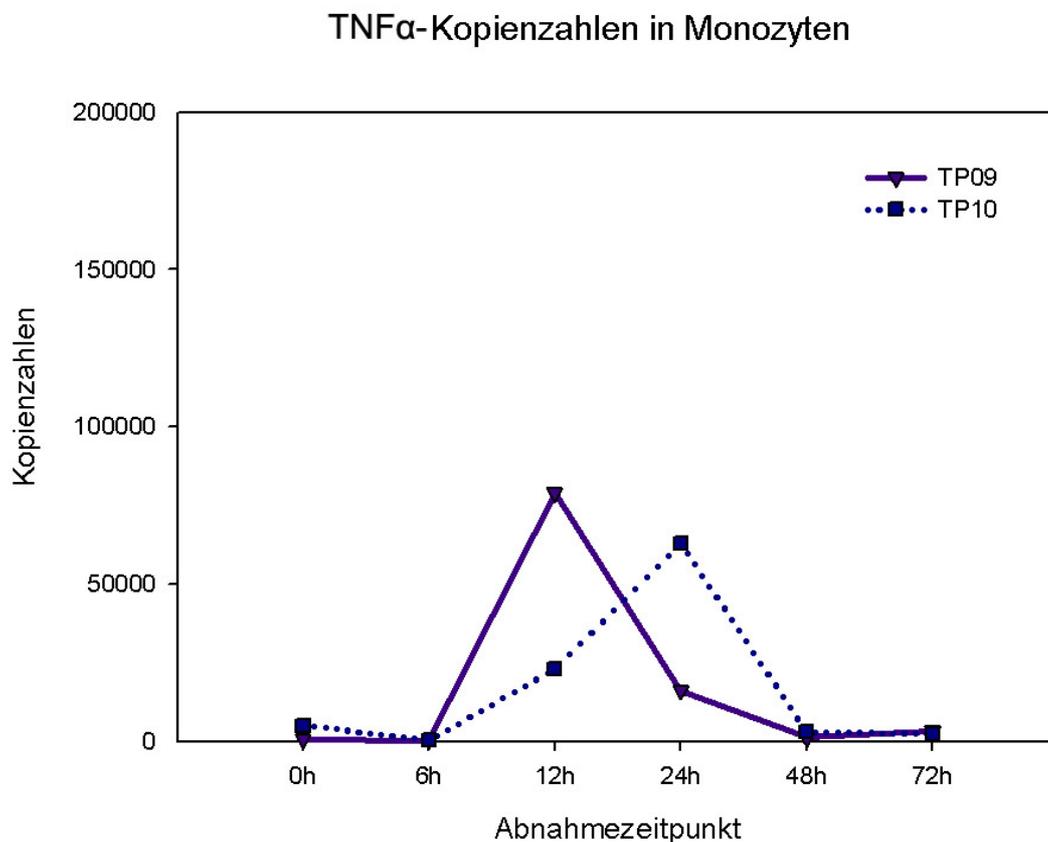


Abbildung F-12: Expressionsprofil von TNF α in Monozyten bei TP09 und TP10
cDNA-Kopienzahlen [MW \pm SD]

Die TNF α - Expression, die mit Hilfe der PAXgene-Tubes gemessen wurde, zeigt noch größere Schwankungen als die in Monozyten und Granulozyten. Zudem wurden im PAXgene-System erheblich geringere Kopienzahlen detektiert (Abbildung F-13). Zu den Patientenproben TP01, TP03, TP04 und TP06 lässt sich keine Aussage über den Expressionsverlauf machen, da die Kopienzahlen viel zu gering waren. Ebenso schwierig gestaltet sich eine Aussage über TP05,

auch wenn hier nur geringe Schwankungen mit Höhepunkten in der cDNA-Expression beim 24h-Wert zu erkennen sind. TP10 zeigt mit einer ebenfalls geringen Kopienzahl beim 6h- und 48h-Wert jeweils ein Expressionsmaximum. Im Gegensatz dazu ist bei TP07, TP08 und TP09 eine deutliche Zunahme der TNF α - Expression bis zum 24h-, bei TP11 sogar bis zum 48h- Abnahmezeitpunkt zu erkennen. Von der 48h-Abnahme bis zum letzten Messzeitpunkt bei 72h zeigt sich bei TP07, TP10 und TP11 eine massive Abnahme, bei TP08 hingegen eine deutliche und bei TP09 nur eine geringe Zunahme der Expression. Die hohen Kopienzahlen bei TP07 und TP08 im Vergleich zu den restlichen Patienten sind ausschlaggebend für die sehr großen Standardabweichungen in der Darstellung der Gesamtkopienzahlen.

Beim Vergleich der drei Expressionsprofile von GAPDH in Granulozyten, Monozyten und PAXgene ist der Kurvenverlauf der PAXgene-Messungen am ehesten mit dem der Messungen in den Granulozyten zu vergleichen. Beim Vergleich der TNF α - Expressionsprofile sind hingegen Gemeinsamkeiten im Kurvenverlauf von PAXgene und Monozyten zu entdecken, auch wenn die Kopienzahlen insgesamt bei der Messung aus PAXgene am geringsten ausfallen.

TNF α -Kopienzahlen in PAXgene

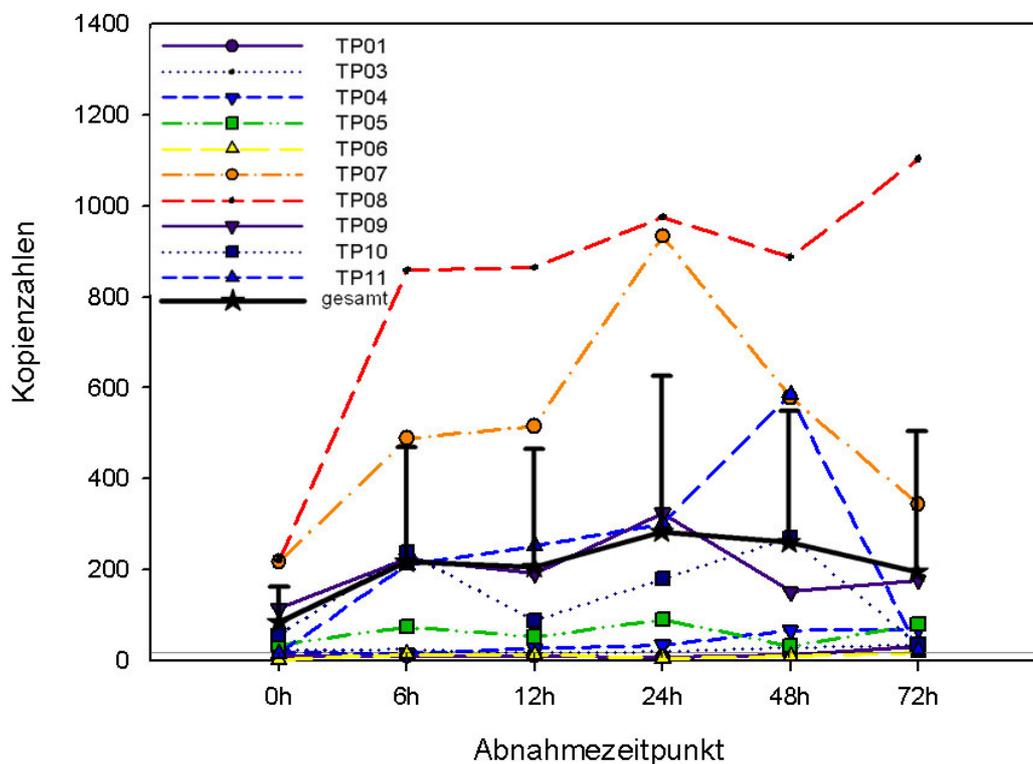


Abbildung F-13: Expressionsprofil von TNF α in PAXgene.

cDNA-Kopienzahlen [MW \pm SD]

F 4.5 Vergleich der Expression von Interleukin 8 und Interleukin 10 in Granulozyten und Monozyten

In der folgenden Abbildung F-14 wird die Interleukin 8- (IL-8)-Expression in Granulozyten aufgezeigt. Hervorzuheben sind die im Vergleich zur TNF α -Expression insgesamt weit höheren Kopienzahlen. Insgesamt ist bei allen Patienten eine deutliche Abnahme der Expression innerhalb der ersten 12h zu erkennen. Bei TP01 folgt nach dem 12h-Messzeitpunkt eine kontinuierliche Zunahme der Kopienzahlen bis zum Ende des Untersuchungsintervalls bei 72h, bei TP04 nur bis zum 48h-Wert, danach fällt die Kopienzahl wieder ab. Bei TP08 und TP10 sind aufgrund der geringen Kopienzahlen im Vergleich zum restlichen Patientenkollektiv nur geringe Schwankungen erkennbar, dennoch ist eine Abnahme der cDNA-Expression bis zum 48h-Messzeitpunkt zu beobachten. Außer bei TP01 und TP04, bei denen die Kopienzahlen bei 72h bzw. 48h ein weiteres Maximum erreichen, bleibt beim Rest des Patientenkollektivs das IL-8-Expressionsprofil auf einem konstant niedrigen Niveau nach der 12h-Abnahme.

IL-8-Kopienzahlen in Granulozyten

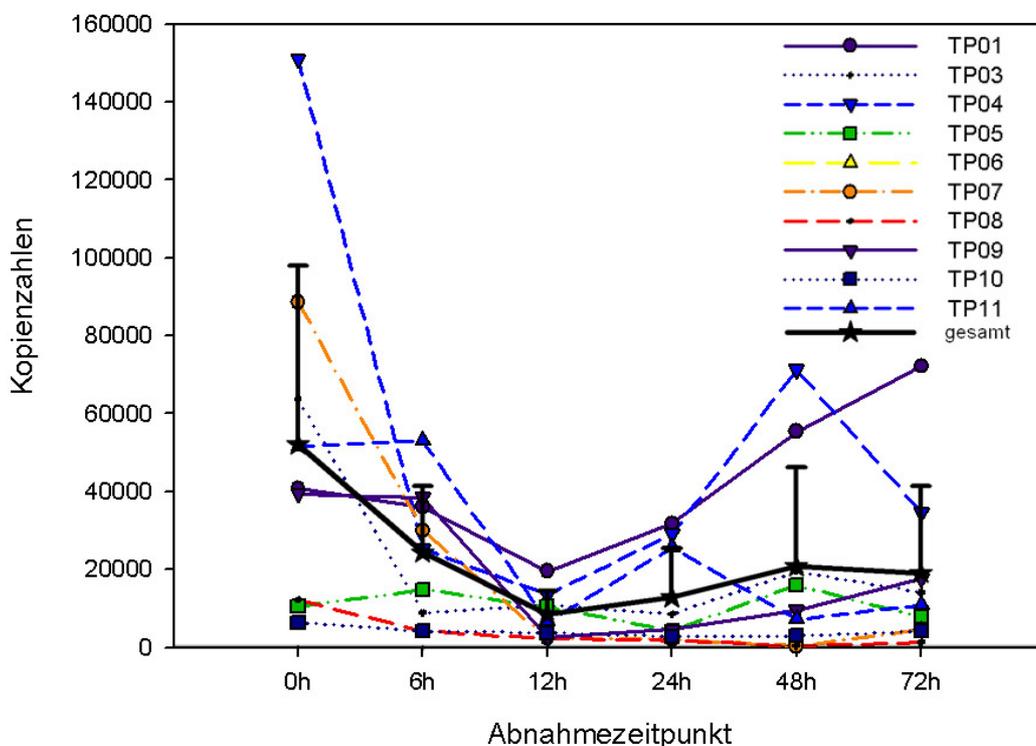


Abbildung F-14: Expressionsprofil von IL-8 in Granulozyten.
cDNA-Kopienzahlen [MW \pm SD]

Analog zum Expressionsprofil von IL-8 in Granulozyten zeigt Abbildung F-15 den Expressionsverlauf von IL-8 in Monozyten. Auffallend sind die um das zehnfache geringeren Kopienzahlen sowie die Expressionsmaxima von TP10 bei 6h und TP04 bei 12h. Letztere verursachen die große Standardabweichung in der Darstellung der Gesamtkopienzahlen beim 6h- und 12h-Messzeitpunkt. Die IL-8-Expression beider Patienten nimmt nach ihren jeweiligen Peaks bei 6h bzw. 12h kontinuierlich ab. TP01 zeigt zwei kleinere Peaks im Expressionsniveau bei 6h und 24h sowie ein Maximum bei 72h. Bei den übrigen Patienten (TP03, TP05, TP07, TP08, TP09 und TP11) ist eine kontinuierliche Abnahme vom 12h- zum 72h-Wert festzustellen.

IL-8-Kopienzahlen in Monozyten

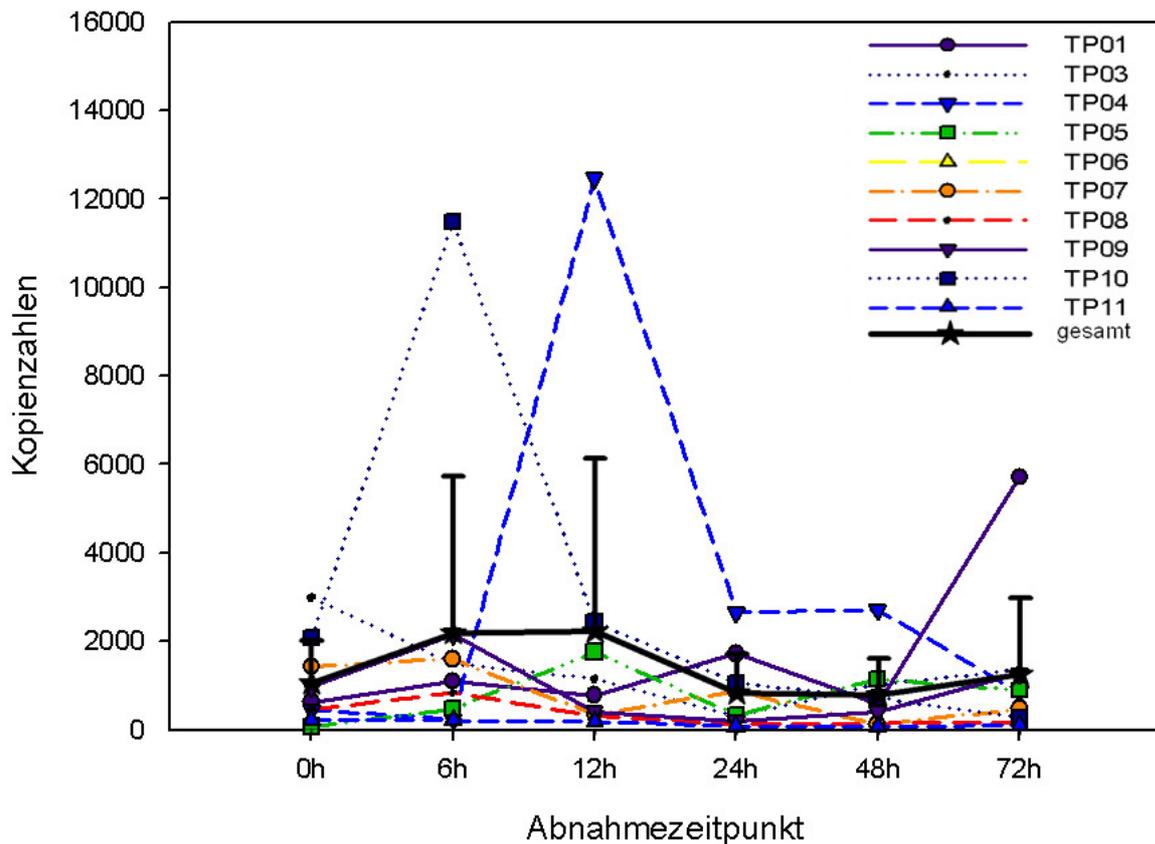


Abbildung F-15: Expressionsprofil von IL-8 in Monozyten.
cDNA-Kopienzahlen [MW±SD]

Die Kopienzahlen von Interleukin 10 (IL-10) in Granulozyten befanden sich über den gesamten Messzeitraum nur knapp über der Nachweisgrenze. Daher wurde auf eine graphische Darstellung hier verzichtet. Die Kopienzahlen von IL-10 in Monozyten (Abb. F-16) sind im Vergleich zu denen von IL-8 (Abb. F-15) um eine Zehnerpotenz kleiner. Dafür kann man hier deutliche Maxima der Kopienzahlen bei 12h (TP06, TP10 und TP11) und 24h (TP04, TP05, TP07 und TP09) erkennen. Nur TP03 zeigt die größte Expression bei 6h und TP08 bei 48h. TP01 zeigt einen ähnlichen Verlauf wie TP08, jedoch mit weit geringeren Kopienzahlen je Messzeitpunkt. Die große Standardabweichung in der Darstellung der Gesamtkopienzahlen beim 12h-Wert ist durch die sehr hohe Expression von TP10 zu diesem Zeitpunkt zu erklären.

IL-10-Kopienzahlen in Monozyten

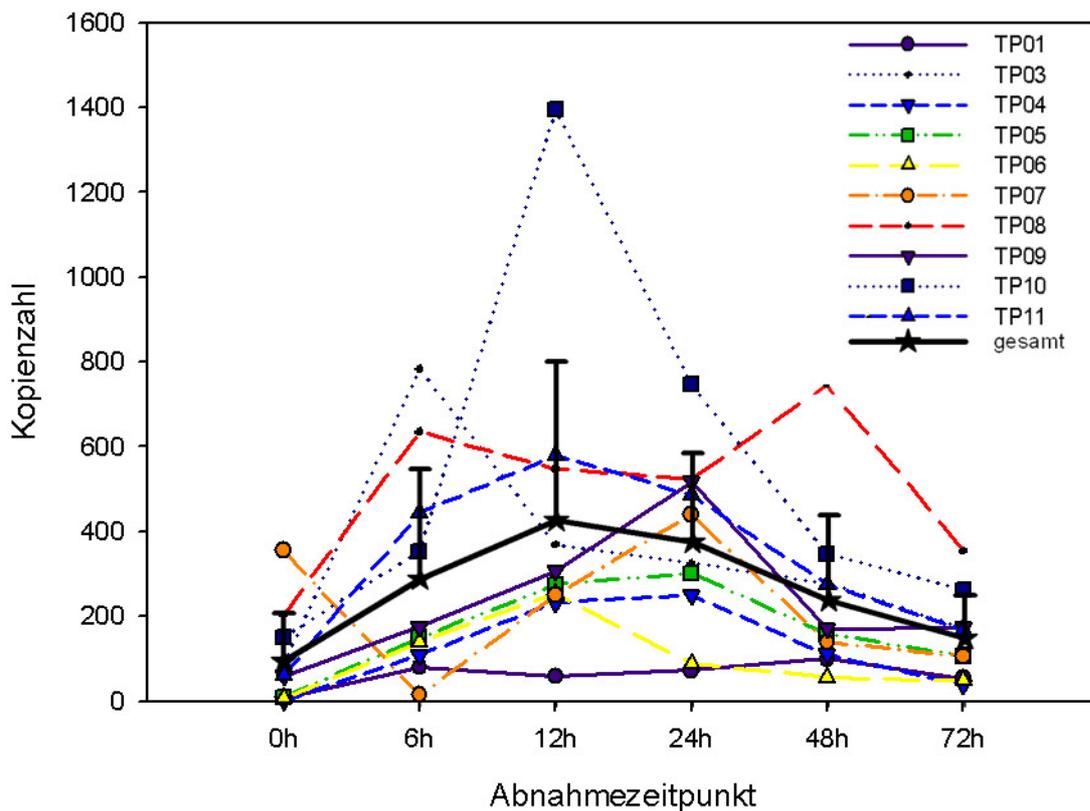


Abbildung F-16: Expressionsprofil von IL-10 in Monozyten.
cDNA-Kopienzahlen in [MW±SD]

F 4.6 Expression von PMN-Elastase in Granulozyten

Das Expressionsprofil der PMN-Elastase in Granulozyten wird in Abbildung F-17 aufgezeigt. Im Gegensatz zu den vorher gezeigten Expressionsprofilen ist bei der PMN-Elastase vom 0h- zum 6h-Messzeitpunkt eine deutliche Abnahme der Kopienzahlen bei allen Patienten zu detektieren. Die Kopienzahlen bei der 6h-Abnahme befinden sich bei allen Patienten nur knapp über der Nachweisgrenze. Im Zeitraum zwischen der 6h- und der 48h-Abnahme ist mit Ausnahme von TP01, TP08 und TP09 keine signifikante Zunahme der cDNA-Expression zu erkennen. In den letzten 24h bis 48h des Untersuchungsintervalls zeigt sich besonders bei TP01, TP06, TP09 und TP10 eine Zunahme der Kopienzahlen. Hierbei zeigen TP01 und TP09 jeweils bei 72h ein Expressionsmaximum. Bei TP04 und TP05 sind bis auf einen leicht erhöhten Ausgangswert bei 0h nach dem Abfall bis unter die Nachweisgrenze bei der 6h-Abnahme keine signifikanten Anstiege des Expressionsniveaus mehr messbar. Das Expressionsprofil von PMN-Elastase in Monozyten wurde nicht analysiert, da diese Serinprotease vornehmlich in polymorphkernigen Granulozyten zu finden ist [Hintz et al., 1987].

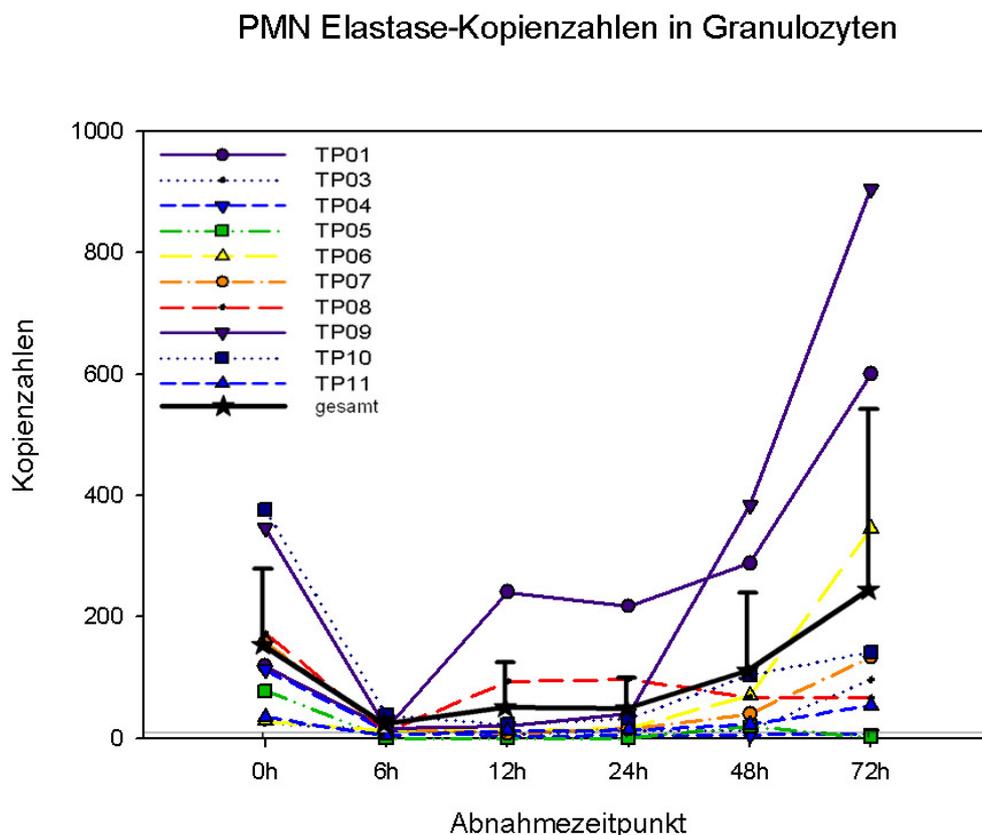


Abbildung F-17: Expressionsprofil von PMN-Elastase in Granulozyten.
cDNA-Kopienzahlen [MW±SD]

F 4.7 Expression von Cathepsin X in Monozyten

Bei der Darstellung der Expression von Cathepsin X in Monozyten (Abbildung F-18) ist mit Ausnahme von TP10 und TP11 auf den ersten Blick ein ausgewogenes Expressionsprofil mit nur geringen Schwankungen zu erkennen. Für die hohen Standardabweichungen in der Darstellung der Gesamtkopienzahlen sind die im Vergleich zum restlichen Patientenkollektiv hohen Kopienzahlen von TP10 und TP11 verantwortlich. Beide Patienten zeigen einen deutlichen Abfall der Kopienzahlen nach der initialen Abnahme, der sich in einen Anstieg zur 12h-Abnahme umkehrt. TP03 und TP07 zeigen ebenfalls Ähnlichkeiten im Expressionsprofil von Cathepsin X mit einer Abnahme der Kopienzahlen innerhalb der ersten 6 Stunden gefolgt von einer Zunahme bis zum 24h-Messzeitpunkt. TP01 weist eine geringe, aber stetige Zunahme der Expression während des gesamten Untersuchungsintervalls auf. Da die lysosomale Carboxypeptidase Cathepsin X hauptsächlich in Monozyten und Makrophagen exprimiert wird, wurde eine Analyse der Kopienzahlen in Granulozyten nicht durchgeführt [Nägler et al., 2006].

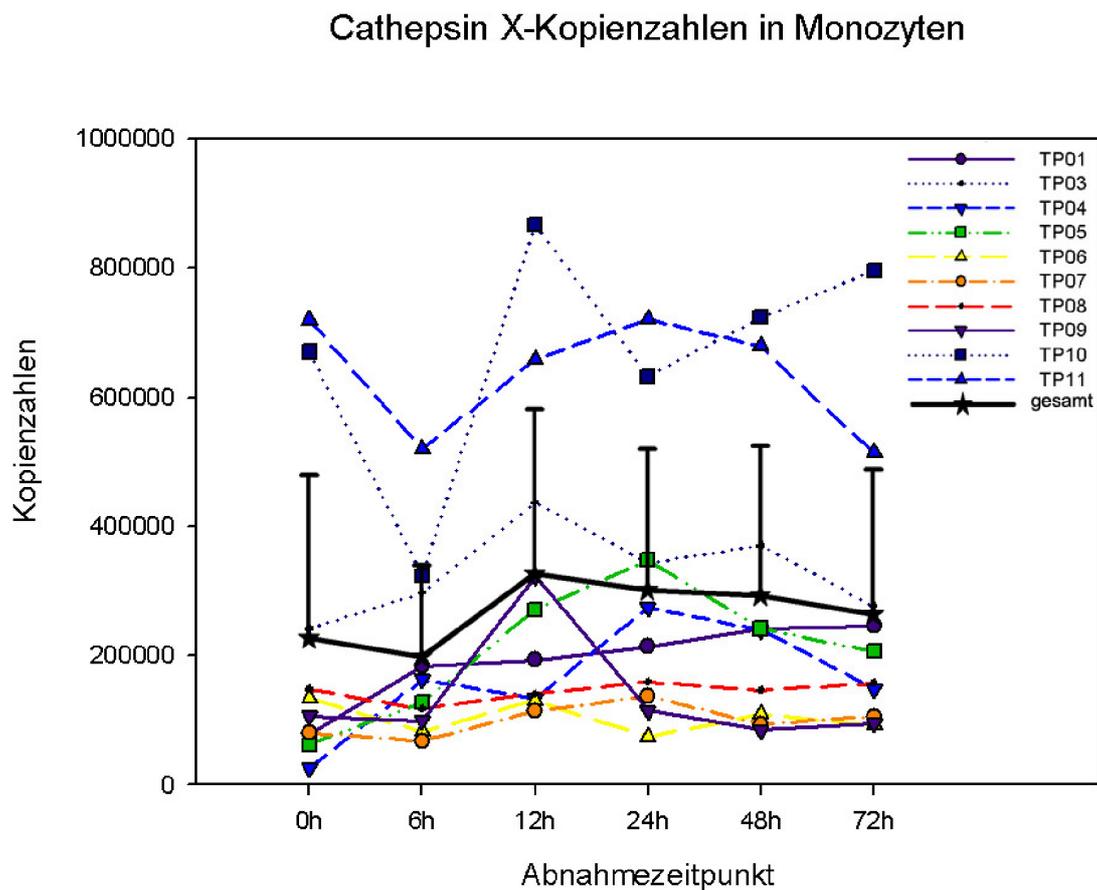


Abbildung F-18: Expressionsprofil von Cathepsin X in Monozyten.

cDNA- Kopienzahlen [MW±SD]

F 4.8 Normierung auf GAPDH

Wie bei der Analyse der Rohdaten beschränkt sich die Auswertung der Normierung auf GAPDH aufgrund hoher Standardabweichungen, die wiederum auf das kleine Patientenkollektiv und interindividuelle Unterschiede in der cDNA Expression zurückzuführen sind, auf der Beschreibung von Tendenzen. In der folgenden Abbildung F-19 ist das Expressionsprofil von IL-10 in Monozyten auf das von GAPDH normiert. Trotz der hohen Standardabweichung ist zu erkennen, dass bereits 6 Stunden nach der 0h-Abnahme tendenziell ein Anstieg der IL-10-Expression stattfindet, der im Verlauf des Untersuchungszeitraumes wieder rückläufig ist.

Kopienzahlen von IL-10 in Monozyten normiert auf GAPDH

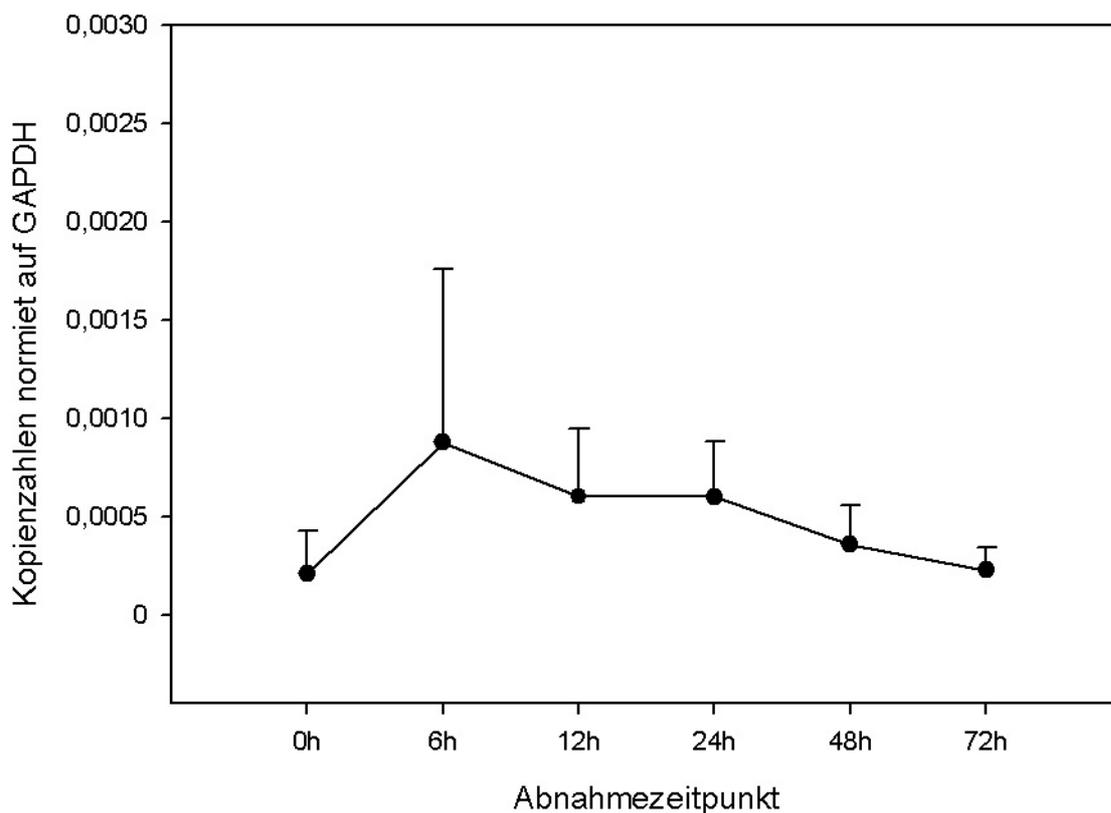


Abbildung F-19: cDNA Kopienzahlen von IL-10 normiert auf GAPDH in Monozyten [MW±SD].

Bei der Normierung der Kopienzahlen von IL-8 in Granulozyten auf GAPDH (Abb. F-20) fällt im Unterschied zur Normierung von IL-10 in Monozyten auf GAPDH ein deutlicher Abfall des Expressionsniveaus innerhalb der ersten 24h nach der Operation auf. Trotz großer Varianzen im Ausgangswert, was vermutlich zu der großen Standardabweichung führt, ist eine deutliche Tendenz bezüglich der Reduktion der IL-8-Expression bereits 12h nach dem ursprünglichen Trauma zu erkennen (Abb. F-20).

Kopienzahlen von IL-8 in Granulozyten normiert auf GAPDH

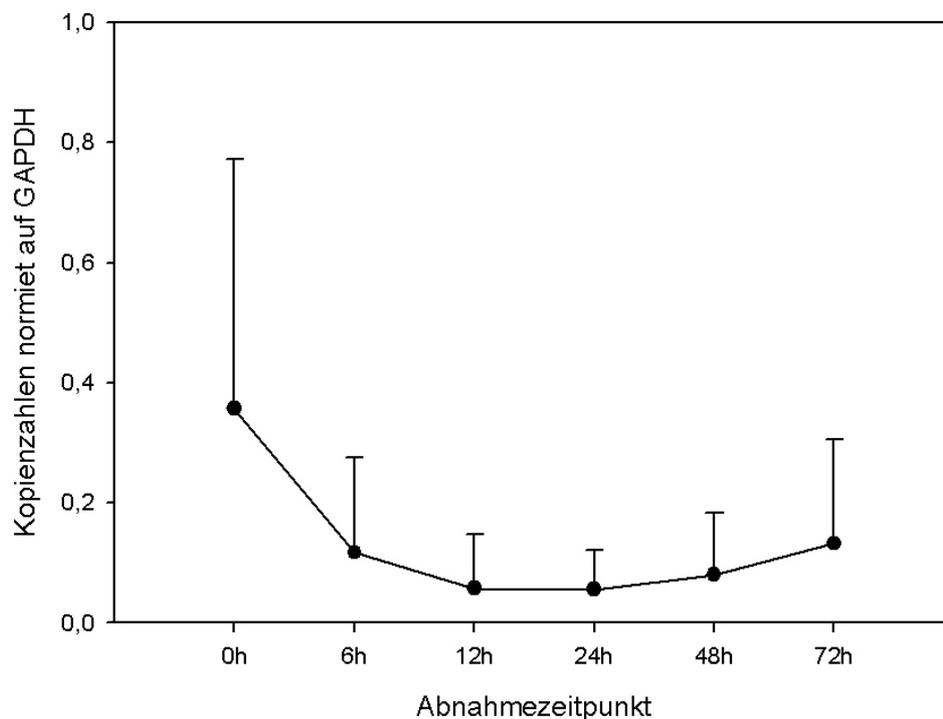


Abbildung F-20: Kopienzahlen von IL-8 normiert auf GAPDH in Granulozyten [MW±SD].

Die Normierungen der Kopienzahlen der anderen Cytokine auf GAPDH zeigten nur geringe Tendenzen bei hohen Standardabweichungen und werden daher nicht mit aufgeführt.

F 5 ELISA- Messungen

F 5.1 TNF α und Interleukin 8

TNF α und IL-8 wurden im Serum mittels Sandwich-ELISA quantifiziert (siehe E.3.11.3 und E.3.11.1). Die IL-8-Konzentrationen waren insgesamt deutlich höher als die TNF α -Konzentration (Abbildung F-21), bewegten sich bei IL-8 jedoch nur beim 6h-Wert außerhalb des Referenzbereiches (0-31pg/ml) und zeigten bei TNF α zu jedem Abnahmezeitpunkt Werte innerhalb des Referenzbereiches (0-39pg/ml). Von der 0h-Abnahme steigt die IL-8-Konzentration bis zum 6h-Wert auf ein Maximum an und fällt dann kontinuierlich bis zum 48h-Wert ab. TNF α steigt bis 48h nach der Operation langsam an und zeigt beim 72h-Messwert erneut einen Abfall. Die hohen Standardabweichungen bei den gemittelten TNF α -Konzentrationen sind auf die großen interindividuellen Schwankungen und das geringe Patientenkollektiv zurückzuführen.

ELISA-Messung von TNF α und IL-8

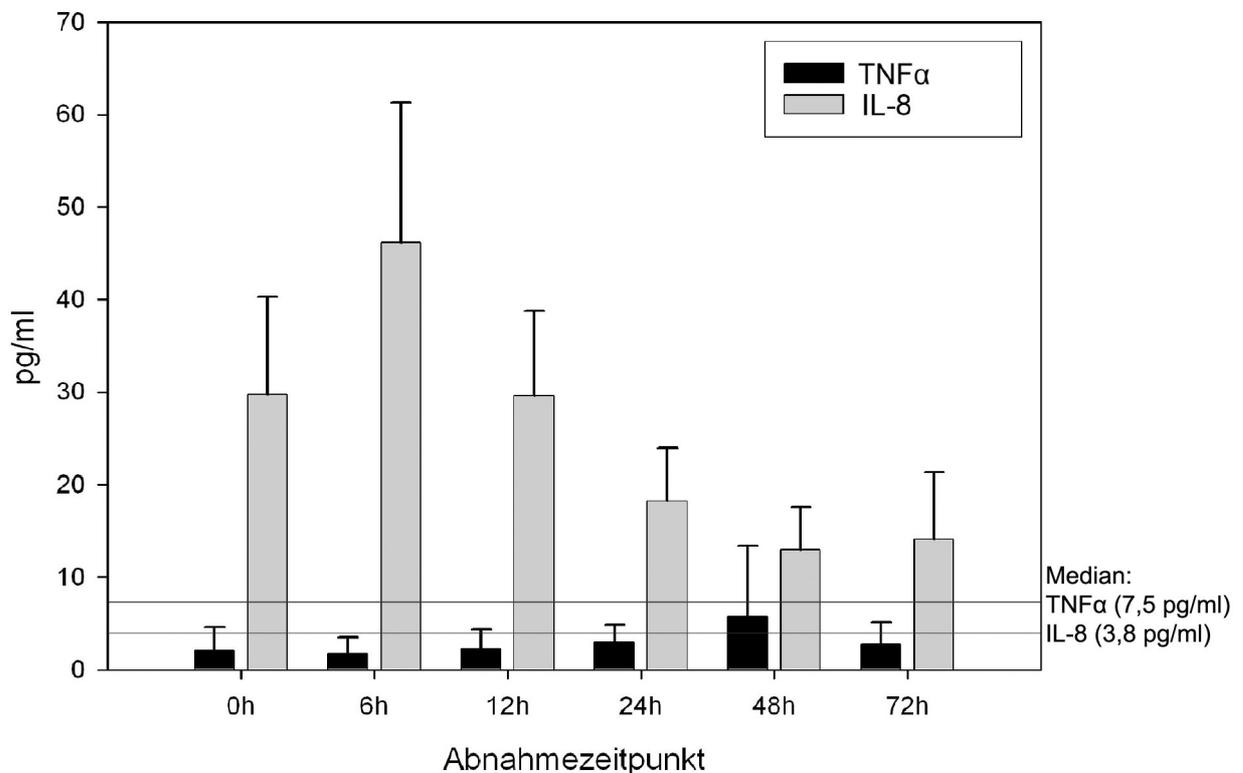


Abbildung F-21: ELISA-Messung von TNF α und IL-8 (pg/ml) im Serum [n=10; MW \pm SD]

F 5.2 Interleukin 10

Die Messergebnisse der Quantifizierung des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 im Serum mit Hilfe eines Sandwich-ELISAs (siehe E 3.11.2) sind in Abbildung F-22 aufgezeigt. Die Proben von TP09 waren hämolytisch und konnten nicht in die Auswertung mit einfließen. Die IL-10-Konzentrationen waren insgesamt sehr niedrig und lagen nur beim 6h- und 12h-Wert über dem Referenzbereich (2-24pg/ml). Dennoch ist insgesamt eine deutliche Zunahme der IL-10 Konzentration vom 0h- zum 6h- und weiter zum 12h-Wert zu erkennen. Daran schließt sich eine kontinuierliche Abnahme der IL-10-Konzentration zum letzten Messzeitpunkt bei 72h an.

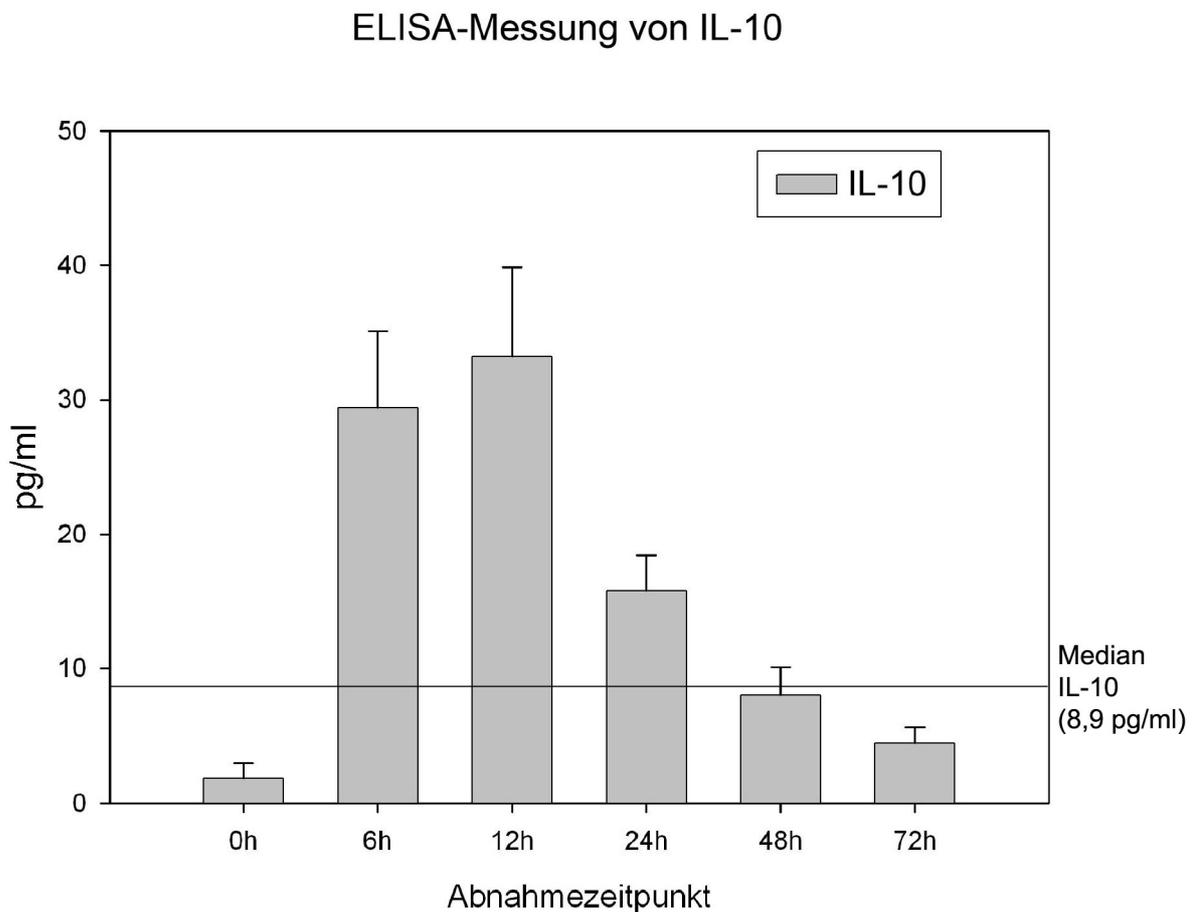


Abbildung F-22: ELISA-Messung von IL-10 (pg/ml) im Serum [n=10; MW±SD]

F 5.3 Cathepsin X und PMN-Elastase

Die systemische Messung von Cathepsin X und PMN-Elastase erfolgte mittels Sandwich-ELISA (s. E 3.11.4 und E 3.11.5) im Citratplasma (Abbildung F-23). Die Konzentration von Cathepsin X nimmt innerhalb der ersten 48h stetig zu, bevor sie zum 72h-Wert hin wieder leicht abnimmt. Der Referenzbereich von 31-165ng/ml wird dabei nie überschritten. Die Standardabweichungen der Cathepsin X-Mittelwerte sind dabei im Vergleich zu denen der PMN-Elastase geringer. Bei der PMN-Elastase zeigt sich ein Konzentrationspeak beim 24h-Messzeitpunkt, danach fällt die PMN-Elastase-Konzentration bis zum Ende des Untersuchungsintervalls nur geringfügig ab. Der Referenzbereich von 19-78ng/ml wird hier vom 24h- bis zum 72h- Wert überschritten.

ELISA-Messung von Cathepsin X und PMN-Elastase

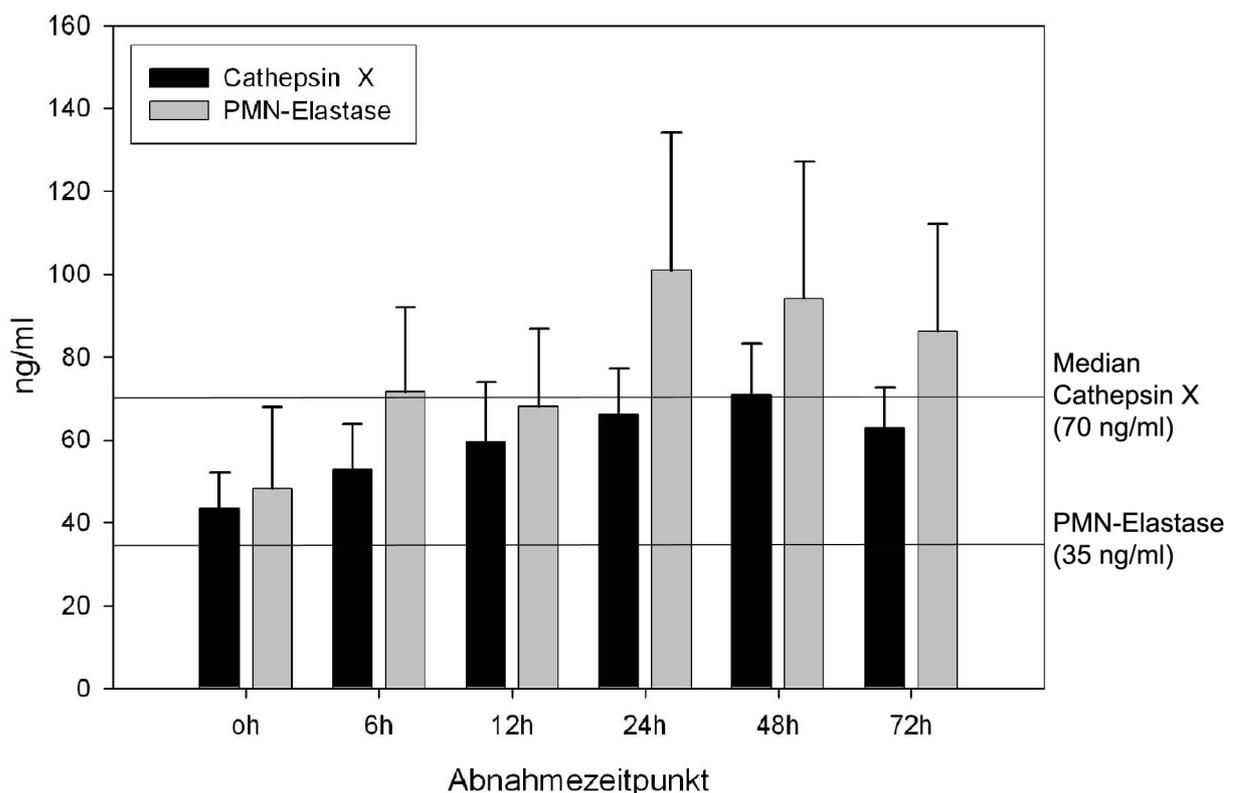


Abbildung F-23: ELISA-Messung von Cathepsin X und PMN-Elastase (ng/ml) in Citratplasma [n=10; MW±SD]

G Diskussion

Bei der vorliegenden prospektiven Pilotstudie wurde zum ersten Mal bei insgesamt 10 Patienten, die aufgrund eines Adenokarzinoms kolorektal reseziert wurden, das peri- und postoperative Expressionsprofil verschiedener Entzündungsmediatoren mittels RT-PCR und ELISA evaluiert. Verschiedene klinische Studien haben bereits das Expressionsprofil im posttraumatischen Verlauf analysiert, um prädiktiv relevante Marker für das Patientenoutcome zu finden. Dabei wurden diverse Interaktionen des Immunsystems in Zusammenhang mit der Entstehung von Komplikationen gebracht [Hildebrand et al., 2005]. Ein besseres Verständnis dieser Mechanismen könnte in Zukunft zur Einführung von präventiven und therapeutischen Strategien im klinischen Alltag führen. Im Folgenden werden nun die Ergebnisse dieser Pilotstudie im Vergleich zu den Resultaten aus der Fachliteratur bewertet. Darüber hinaus werden Fehlermöglichkeiten und Schwächen der eingesetzten Methodik kritisch beleuchtet.

G 1 Studiendesign

Entzündliche Stimuli, wie invasive Mikroben und Endotoxine bei Sepsis oder Gewebeerstörung nach großen invasiven Eingriffen führen zur Aktivierung der humoralen (Komplement- und Gerinnungssystem) und zellulären Abwehrsysteme (Endothelzellen, neutrophile Granulozyten, Makrophagen) des Organismus. Damit geht die Synthese, Expression und Freisetzung inflammatorischer Mediatoren einher [Hensler et al., 1997]. Ein Beispiel für große und invasive Eingriffe stellen die in der vorliegenden prospektiven *ex vivo*-Pilotstudie durchgeführten Tumoroperationen aufgrund kolorektaler Adenokarzinome dar. Die Relationen der Stimulatoren, Mediatoren, Effektoren und Inhibitoren untereinander und zueinander bestimmen schließlich, ob es zu reparativen Heilungsprozessen oder zur Perpetuierung der Entzündung kommt [Waydhas et al., 1992]. Vorteile dieses Studiendesigns waren neben einer genauen Planbarkeit die Nähe der Studienbedingung zur physiologischen Situation. Im Vergleich zu anderen Studien, die sich bisher mit der Immunreaktion nach Polytrauma befassten, war ein entscheidender Vorteil der vorliegenden Pilotstudie, einen präoperativen Ausgangswert (0h- Messzeitpunkt) bestimmen zu können. In vergleichbaren Studien erfolgte die erste Blutabnahme immer erst unmittelbar nach dem traumatischen Ereignis, so dass die jeweils initial gemessene Parameterkonzentration kein vom Trauma unbeeinflussten Messwert darstellt [Bogner et al., 2007].

Studienpopulation

In der vorliegenden Pilotstudie handelt es sich um eine sehr kleine Patientenpopulation, so dass zwar keine signifikanten, jedoch tendenzielle Unterschiede erwartet werden konnten. Aufgrund der ausgewählten Einschlusskriterien war die Möglichkeit gegeben, ein relativ homogenes Patientenkollektiv zu gewinnen, welches dennoch in Bezug auf OP-Dauer und Medikation (Tabelle D-1), operative Verfahrenstechnik (Tabelle F-1) und Tumorausdehnung variierte. Weitere Differenzen ergaben sich aufgrund unveränderlicher Einflussgrößen wie das Alter und Geschlecht der Patienten sowie deren bekannten Vorerkrankungen. Genauer zu evaluieren wäre darüber hinaus, ob eine chronische Tumorerkrankung bereits zu einer Aktivierung des Immunsystems führt und in wie weit diese durch ein Trauma beeinflusst wurde. Diesbezüglich wäre ein Vergleich mit einem gesunden Patientenkollektiv denkbar. Es wurden weitere Patienten mit metastasiertem Ovarialkarzinom nach gleichem Schema untersucht, schlussendlich aber zeigte sich die Patientenaquise deutlich erschwert, so dass nach 3 eingeschlossenen Patienten keine weitere Analyse stattfinden konnte. Die synchron zu der Analyse der in dieser Pilotstudie eingeschlossenen Patienten erhobenen Daten, wurden nicht weiter ausgewertet.

Mit Hilfe einer Power-Analyse kann berechnet werden, wie viele Patienten für eine prospektive Studie benötigt werden, um signifikante Messwerte zu erhalten. Bei einer Signifikanz (alpha Fehler) von 0,05 und einer gewünschten Power von 0,8 wurden mit Hilfe des Programms G*Power und Statpages einige beispielhafte Berechnungen durchgeführt. Für den Vergleich zweier Patientenkollektive oder Datensätze kann dabei mit konstanten Variablen (z.B. Power 0,8 und einem alpha Fehler von 0,05) die jeweils benötigte Gruppengröße berechnet werden. Dabei lässt sich schnell detektieren, dass die Zahl der benötigten Patienten stark variiert. Scheint lt. Berechnung bei der Analyse des Expressionsprofils von $TNF\alpha$ in Granulozyten ein $N=9$ auszureichen, so wird bei der gleichen Darstellung in Monozyten ein $N=8037$ benötigt. Da bei dieser explorativen Pilotstudie die Veranschaulichung von Tendenzen im Vordergrund stand, wurde auch aufgrund der geringen Zahl an eingeschlossenen Patienten auf die Berechnung von statistisch signifikanten Unterschieden verzichtet.

Eine Limitation dieser Pilotstudie war die Schwierigkeit, geeignete Patienten zu akquirieren, die die vorgegebenen Einschlusskriterien erfüllten. Die mittels Power Analyse ermittelte Patientenzahl hätte darüber hinaus im Rahmen dieser Arbeit aufgrund von limitierten finanziellen und personellen Ressourcen nicht eingeschlossen werden können.

In anderen Studien konnten Scoring Systeme (z.B. MOV-, ISS-Score) zur Klassifikation der Patienten und anschließender Gruppenbildung bei der Auswertung der Ergebnisse genutzt werden. Diese Klassifikation bot sich bei der hier eingeschlossenen Studienpopulation leider nicht an.

G 2 Methoden

Quantitative Genexpressionsanalysen in Geweben und vor allem im Blut werden zunehmend zur Bestimmung der Immunantwort auf traumatische Ereignisse durchgeführt. Obwohl diese Analysen nur mit hohem logistischem und personellem Aufwand und den damit verbundenen Kosten durchgeführt werden können, besteht die Chance, mit diesem Verfahren auf prädiktive Faktoren zu stoßen, die den klinischen Verlauf der Patienten beeinflussen [Biberthaler et al., 2004]. Auf der Suche nach einem geeigneten Abnahmesystem für den Einsatz im klinischen Alltag wurden die mittels PAXgene Abnahmesystem generierten Messwerte in dieser Pilotstudie mit denen der Zellseparation verglichen. Die Limitationen werden im Folgenden erläutert.

Zellseparation und Monozytenisolation

Die Auswahl der geeigneten Isolationsmethode war zum Erreichen einer guten Reinheit der Monozyten und zum Vermeiden einer unspezifischen Stimulation der Monozyten von essentieller Bedeutung. Bei den vor Studienbeginn getesteten verschiedenen Methoden war die Reinheit der Monozyten bei indirekter Zellisolation mittels Magnetic Labelled Bead Cell Separation (MACS) mit etwa 85 % im Gegensatz zu den Verfahren mittels Adhärenzmethode und Percoll-Dichtezentrifugation am Besten. In anderen Arbeiten wird sich der Dichtegradienten-Zentrifugation [Angele et al., 2002] mittels Ficoll oder Percoll bedient. Es gibt jedoch Hinweise, dass diese Methode durch den mechanischen Stress der Zentrifugation und den Kontakt mit hochmolekularen Zuckerverbindungen eine Aktivierung der Immunzellen hervorruft [Zahler et al., 1997].

Als Alternative wird von einigen Autoren die negative immunomagnetische Zellseparation propagiert [Cotter et al., 2001]. Diese Technik vereint die Vorteile der hochselektiven Zellseparation mit einer verhältnismäßig geringen Aktivierung der isolierten Zellpopulationen.

Nachteil ist die Menge an separierten Zellen pro entnommenem Patientenblut mit diesem System, die wesentlich geringer ausfällt im Vergleich zur Ausbeute mit den positiven MACS. Dies bedeutet, dass ein wesentlich größeres Blutvolumen notwendig ist, um eine vergleichbare Menge an Immunzellen zu separieren. Die Entscheidung fiel in der vorliegenden Studie für das positive MACS System, da es für unsere spezifische Situation und Fragestellung die optimale Kombination aus Vorteilen (hoch selektive Isolation, geringer ausgeprägte immunologische Aktivierung) und Nachteilen (verbleibende Restaktivierung, hohe Kosten) geboten hat.

Die Vorteile der Monozytenisolation mittels MACS lagen außerdem in einer schnellen und sehr spezifischen Separation. Von einer geringeren Aktivierung von Immunzellen bei Isolation mittels MACS im Vergleich zur Isolation durch Dichtezentrifugation wurde schon früher berichtet [Zahler et al., 1997]. Die Erfahrungswerte der Arbeitsgruppen von Dr. J. Landes (Validierung des PAXgene Abnahmesystems im Vergleich zur Zellseparation) und Prof. Dr. Biberthaler (Immunmodulation bei polytraumatisierten Patienten) halfen bei der Auswahl der hier angewandten Methodik. Unklar bleibt bei vielen vergleichbaren Studien, in wieweit nach einem standardisierten Aufbereitungsprotokoll agiert wurde, um die unterschiedlichen Halbwertszeiten der mRNA und Proteine mit einem erheblichen Einfluss auf die Messergebnisse als möglichen Störfaktor, auszuschliessen. Um diese mögliche Fehlerquelle bei der vorliegenden Pilotstudie auszuklammern, wurde nach einem streng standardisierten Abnahme- und Aufbereitungsprotokoll mit festgelegten Zeitintervallen agiert.

Ein weiterer möglicher kritischer Punkt vergleichbarer Studien stellt bei der Untersuchung von polytraumatisierten Patienten die Applikation von Blutprodukten dar. Es wäre theoretisch denkbar, dass im Anschluss an die therapeutisch notwendige Maßnahme die aus der systemischen Zirkulation des Patienten isolierten Monozyten teilweise aus dem Immunzellenpool der Blutspender stammen könnten. Die Standard Erythrozyten Konzentrate sind Leukozyten filtriert, aber nicht bestrahlt und enthalten damit eine Rest Population von Leukozyten. Bei einer normalen Leukozytenverteilung im menschlichen Blut des Patienten von 5.000/ μl finden sich bei ebenfalls 10% Monozyten im Differentialblutbild ca. 500/ μl . Die theoretische zugeführte Menge an fremden Zellen liegt damit bei ca. 1,6 ‰ der zirkulierenden Monozyten [Bogner et al., 2008]. Bei der vorliegenden Pilotstudie erhielten insgesamt nur 3 Patienten Erythrozytenkonzentrate, so dass diese Fehlerquelle weitestgehend zu vernachlässigen ist.

Ein entscheidender Vorteil der in der vorliegenden Studie angewandten negativen Zelldifferenzierung sind die unbesetzten CD14-Rezeptoren der Monozyten mit weitgehender Vermeidung einer durch die Antikörper-Bindung verursachten intrazellulären Aktivierung, was bei einer mittels CD14-positiven Zelldifferenzierung weniger der Fall ist [Cotter et al., 2001]. Dies ist insbesondere für funktionelle Studien und bei Antigen-Aufnahme durch die Monozyten, wie das bei der vorliegenden Pilotstudie der Fall war, von entscheidender Bedeutung. Nachteile gegenüber anderen Methoden sind magnetische Interaktionen, die zu Kreuzreaktionen der Antikörper mit den Monozyten führen und sich daher störend auf die Separation auswirken können. Außerdem ist die Zellzahl aufgrund der Kapazität der Röhren begrenzt [Miltenyi et al., 1990]. Insgesamt scheint die etwas aufwändigere negative Zelldifferenzierung jedoch die bislang vorteilhafteste Methode für funktionelle Studien zu sein.

RNA-Isolierung

Das Arbeiten mit RNA stellt auch heute noch eine Herausforderung dar, da stets die Gefahr des RNA-Verbaus durch die allgegenwärtigen RNasen besteht. Um dies zu vermeiden wurde, strikt unter sterilen Bedingungen gearbeitet und die Proben wurden bis kurz vor Durchführung der Versuche bei -80°C und während der Versuche auf Eis gelagert. Hier bietet die RNA-Isolierung nach der Qiagen-Methode [RNeasy® Mini/Midi Kit, Fa. Qiagen, Hilden, s. Tabelle E-3] einen entscheidenden Vorteil, da der stark denaturierende RLT-Puffer die RNasen sofort inaktiviert und damit eine Isolation intakter total RNA sicherstellt. Eine Limitierung dieser Methode stellt die begrenzte Bindungskapazität dar, die maximal 1×10^7 Zellen bzw. $100\mu\text{g}$ RNA beträgt. Wird diese Kapazität überschritten, ist der Ertrag der total RNA nicht konsistent, und es kann sein, dass weniger als $100\mu\text{g}$ total RNA gewonnen werden.

Im Fall einer inkompletten Lyse der Monozyten kann die Ausbeute der total RNA geringer als erwartet sein, auch wenn die Bindungskapazität nicht überschritten wurde [Biberthaler et al., 2003; Bogner et al., 2007]. Verschiedene RNA-Isolationsverfahren bergen zusätzlich die Gefahr, das Expressionsprofil unterschiedlich beeinflussen zu können, besonders, wenn die Unterschiede in der Kopienzahl am Ende nur sehr gering sind [Asare et al., 2008].

cDNA-Synthese/house-keeping-genes

Zur Validierung und Standardisierung der cDNA-Synthese mit nachfolgender RT-PCR werden üblicherweise *house-keeping-genes* verwendet. Optimalerweise sind dies Gene, die nicht durch äußere Faktoren beeinflusst werden und deshalb als Normwert der Genexpression der Zelle dienen können. Eine falsche Wahl des *house-keeping-genes* kann zu Interpretationsfehlern der experimentellen Ergebnisse und der damit verbundenen Evaluierung und Quantifizierung von pathologischen Genexpressionen führen [Said et al., 2007]. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die Expression von Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) auch in hypoxischen Zuständen nicht beeinflusst wird und es sich daher als zuverlässiges *house-keeping-gene* erweist. Bei GAPDH handelt es sich um ein Enzym der Glykolyse, welches für alle Lebewesen unentbehrlich ist und unabhängig von Zelltyp, Zellstadium und äußeren Einflüssen exprimiert wird.

Für die vorliegende Pilotstudie wurde vermutet, dass sich GAPDH aufgrund der geringen Schwankungen im Vergleich zu Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) und beta-Actin besonders geeignet ist. Durch Bestimmung der Expression des *house-keeping-genes* konnte in der vorliegenden Studie das Überleben der Zellen bewiesen werden. Bei erniedrigter oder fehlender mRNA-Expression der „*genes of interests*“ schloss eine gleich bleibend hohe Expression des *house-keeping-gene* den Tod der Zelle aus.

GAPDH konnte in allen Patienten in hohen Konzentrationen gemessen werden. Das mRNA-Expressionsprofil der Patienten zeigte in Monozyten (Abb. F-7) einen Anstieg im Verlauf des Untersuchungszeitraumes. In Granulozyten (Abb. F-6) konnte ein Anstieg der Kopienzahlen bis zum 24h-Messzeitpunkt detektiert werden, der sich im Verlauf bis zum Ende des Messintervalls bei 72h rückläufig zeigte. Aufgrund des kleinen Patientenkollektivs ergaben sich große Standardabweichungen. Bei den Normierungen der mRNA-Expressionsprofile von $\text{TNF}\alpha$, PMN-Elastase und Cathepsin X auf GAPDH fielen noch größere Standardabweichung auf, was die Interpretation der Ergebnisse zusätzlich erschwerte. Bei der Normierung der Kopienzahlen von IL-10 auf GAPDH (Abb. F-19) fiel ein Anstieg des Expressionsniveaus innerhalb der ersten 6 Stunden nach der Operation auf, gefolgt von einer kontinuierlichen Abnahme bis zum 72h-Messzeitpunkt. Das Expressionsniveau von IL-8 in Granulozyten zeigte bei der Normierung auf GAPDH (Abb. F-20) hingegen vom 0h-Ausgangswert trotz hoher Standardabweichung bis zum 24h-Wert einen Abfall.

Danach war bis zum 72h-Wert wieder eine aufsteigende Tendenz zu beobachten. In Monozyten (Abb. F-16) war ein entgegengesetzter Verlauf mit einem Anstieg der Expression innerhalb der ersten 12 Stunden nach dem operativen Eingriff zu erkennen. Auch hier zeigten sich deutlich interindividuelle Unterschiede, die zu einer hohen Standardabweichung und daher nicht signifikanten Ergebnissen führten.

Ein Vergleich mit HPRT und β -Actin hätte verdeutlicht, ob es in anderen house-keeping-genes entgegen den Erwartungen ebenfalls zu einer Hochregulation gekommen wäre.

Bei einem konstanten Expressionsprofil hätten sich diese *house-keeping-genes* eventuell besser für eine Normierung geeignet als in unserem Fall GAPDH. Die Effizienz der cDNA-Synthese müsste in diesem Fall natürlich ebenfalls kritisch betrachtet werden.

RT-PCR

Für die quantitative Bestimmung spezifischer Zytokin-Expressionsprofile muss mit den Proben möglichst steril und unter DNase-freien Bedingungen umgegangen werden, um DNA-Kontaminationen oder andere beeinflussende Faktoren ausschließen zu können [Chai et al., 2005]. Die Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) mittels LightCycler stellt dabei eine moderne Methode zur exakten Quantifizierung spezifischer mRNA dar. Voraussetzung für einen zuverlässigen quantitativen Nachweis ist eine funktionierende mRNA-Analytik, die exakte mRNA-Quantifizierungsergebnisse bei ausreichender Genauigkeit und hoher Wiederholbarkeit liefert. Eine gute Reproduzierbarkeit mit hoher Sensitivität und Spezifität konnte für die quantitative RT-PCR mittels LightCycler auch im Vergleich zu anderen RT-PCR-Verfahren nachgewiesen werden [Swatoch et al., 2005].

Die einfachste Möglichkeit zur Quantifizierung der PCR-Produkte ist dabei die Nutzung von DNA-Farbstoffen (z. B. Ethidiumbromid oder SYBR Green I). Diese Fluoreszenzfarbstoffe lagern sich in die DNA ein und interkalieren bzw. binden an die doppelsträngige DNA, wodurch die Fluoreszenz dieser Farbstoffe ansteigt. Die Zunahme der Target-DNA korreliert daher mit der Zunahme der Fluoreszenz von Zyklus zu Zyklus. Die Messung findet am Ende der Elongation in jedem Zyklus statt. Ein Nachteil dieses Verfahrens ist die geringe Spezifität, da zwischen verschiedenen PCR-Produkten nicht unterschieden werden kann. Außerdem können keine Multiplex-Messungen durchgeführt werden. Den ersten Nachteil kann man ausgleichen, indem man - wie bei der vorliegenden Pilotstudie - nach abgelaufener PCR eine

Schmelzkurvenanalyse (Abb. F-3) durchführt, anhand derer die Fragmentlängen und dadurch die Spezifität bestimmt werden kann [Holzapfel et al., 2007].

Da die doppelsträngige DNA von spezifischen PCR-Produkten einen höheren Schmelzpunkt hat als unspezifisch entstehende Primerdimere, ist eine Unterscheidung möglich. Die Höhe des Peaks der Schmelzkurve gibt annähernd Auskunft über die Menge des gebildeten Fragments. Bei der Interpretation der Ergebnisse wurde berücksichtigt, dass die Zytokin-mRNA-Expression nicht immer mit der Menge an Protein korreliert [Romagnani et al., 2000]. Eine mögliche Diskrepanz zwischen gemessener mRNA-Expression und sezerniertem Protein könnte durch verschiedene post-transkriptionelle und post-translationelle Faktoren beeinflusst sein [Overbergh et al., 2003]. Verschiedene Publikationen haben jedoch auch gute Korrelationen von über RT-PCR gemessenen Kopienzahlen an Zytokin-mRNA mit den mittels ELISA determinierten Proteinmengen gezeigt [Hein et al., 2001; Török et al., 2004; Weghofer et al., 2001].

Teilweise große interindividuelle Unterschiede werden nicht nur im Verlauf des Untersuchungszeitraumes, sondern bereits bei den Ergebnissen der initialen Blutabnahmesichtbar. Besonders die Kopienzahlen von PMN-Elastase in Granulozyten sind im Verlauf so gering, dass sie kaum zu werten sind. Bei großen Diskrepanzen wurden RT-PCR-Läufe wiederholt, um die Ergebnisse zu verifizieren. Da die Aufbereitung und Isolierung der eingesetzten DNA viele unterschiedliche Schritte beinhaltet, die selbst bei genauestem Arbeiten zu Fehlern führen kann, ist dies möglicherweise ein weiterer Grund für die teilweise sehr unterschiedlichen Kopienzahlen. Cytokine wie GAPDH, Cathepsin X, IL-8 und TNF α zeigen reproduzierbar hohe Kopienzahlen, sowie Schmelzkurven, die eine Kontamination weitestgehend ausschliessen.

G 3 Vergleich der Studienergebnisse mit Daten aus der Literatur

G 3.1 Vergleich PAXgene versus Zellseparation

Obwohl Studien, die sich mit der biologischen Aktivität von Mediatoren auf Transkriptionsebene befassen, schon viele Informationen über die Hintergründe des posttraumatischen Multiorganversagens liefern, scheinen Änderungen der RNA-Expression vor dieser systemischen Mediatorenausschüttung stattzufinden [Landes et al., 2007]. Um diese Veränderungen unmittelbar detektieren zu können, bedarf es eines Analyseverfahrens, welches Informationen über die Immunreaktion bzw. die Dynamik der Schlüsselmediatoren auf intrazellulärer RNA-Ebene liefert.

Diverse Studien belegen, dass PAXgene sich im klinischen Alltag praktikabler für die Gewinnung von mRNA aus Vollblut darstellt als die herkömmliche Zellseparation [Feezor et al., 2004]. Alle Zellen im Blut werden unmittelbar nach Abnahme lysiert und die RNA stabilisiert. Dies ermöglicht eine „Snapshot“-Analyse der intrazellulären RNA-Expression unter experimentellen Bedingungen [Rainen et al., 2002; Stordeur et al., 2003]. Damit besteht die Möglichkeit auf potentielle Mechanismen zu stoßen, die für die Modulation des Immunsystems verantwortlich sind, aber nicht in isolierten Zellen stattfinden. Während der Isolierung von immunkompetenten Zellen kann es zu weiteren Aktivierungsvorgängen kommen, die *in vivo* nicht stattgefunden hätten [Haertel et al., 2001]. Die Isolierung der RNA muss nicht unmittelbar nach Blutabnahme erfolgen, wie das bei der Separation von Monozyten und Granulozyten der Fall ist, sondern kann auch erst Tage nach der Abnahme erfolgen, so lange die PAXgene Tubes fachgerecht gelagert werden. Ein weiterer Vorteil stellt die im klinischen Alltag mit weniger labortechnischem Aufwand durchführbare Analyse der Vollblut-RNA-Expression dar [Rainen et al., 2002]. Die Menge an benötigtem Vollblut (für die Doppelbestimmung 2 x 2,5ml) ist neben den logistischen Kosten ebenfalls deutlich geringer als bei der Zellseparation (4 x 10ml).

Ob die Anwendung des PAXgene-Systems zu validen und reproduzierbaren Ergebnissen in der Veränderung des Expressionsprofils bestimmter Zytokine im Vollblut frisch operierter Patienten führt, sollte in dieser Pilotstudie evaluiert werden. Dazu wurden die Expressionsprofile von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen, sowie von GAPDH aus PAXgene bestimmt und mit den Ergebnissen der Zellseparation verglichen. Beim Vergleich der drei Expressionsprofile von GAPDH in Granulozyten (Abb. F-6), Monozyten (Abb. F-7) und PAXgene (Abb. F-8) ist der Kurvenverlauf der PAXgene-Messungen am ehesten mit dem der Messungen in Granulozyten

zu vergleichen. Beim Vergleich der Graphen für die TNF α -mRNA-Expressionsprofile sind Gemeinsamkeiten im Kurvenverlauf von PAXgene und Monozyten zu entdecken, auch wenn die Kopienzahlen bei der Messung aus PAXgene deutlich geringer ausfallen. Aufgrund des kleinen Patientenkollektives kam es jedoch auch hier zu starken interindividuellen Schwankungen, die für die großen Standardabweichungen und damit nicht signifikanten Ergebnisse verantwortlich sind. Jedes Analyseverfahren, ob nun Unterschiede in der Abnahmeprozedur oder in der Quantifizierung der RNA auftreten, muss bei der Evaluierung der Ergebnisse kritisch beleuchtet werden [Asare et al., 2008]. Da es sich bei PAXgene um ein neues Verfahren handelt, ist die Verfügbarkeit von vergleichbaren Daten in der Literatur bislang noch begrenzt. Asare et al. verglich den RNA-Isolations-Kit von Tempus mit dem von PAXgene und kam zu dem ähnlichen Ergebnis, dass unterschiedliche Isolationsmethoden das Expressionsprofil deutlich beeinflussen können, besonders, wenn die Unterschiede in der Kopienzahl am Ende nur sehr gering sind [Asare et al., 2008]. Dieser Informationsverlust bei PAXgene im Vergleich zur Zellseparation wurde auch im Rahmen der vorliegenden Pilotstudie deutlich.

G 3.2 Vergleich der Ergebnisse der RT-PCR- und ELISA- Messungen

In dieser Pilotstudie waren bei 10 Studien-Patienten pro- und antiinflammatorische Reaktionen schon wenige Stunden nach erfolgter kolorektaler Operation messbar. Die Auswertungen der Proteinanalysen zeigten ebenfalls, dass diese Reaktionen – ähnlich wie bei polytraumatisierten Patienten – in kurzem Abstand zur Operation induziert werden [Biberthaler et al., 2004]. Die Ergebnisse der mRNA-Quantifizierung mittels RT-PCR korrelierten jedoch nur bedingt mit der Messung derselben Zytokine auf Transkriptionsebene. Auf der Proteinebene waren jedoch ebenfalls Tendenzen zu pro- und antiinflammatorischen Reaktionen unmittelbar nach Trauma erkennbar. So erreicht das Protein-Expressionsniveau (s. ELISA-Messungen F 4.10) von IL-8 bereits nach 6 Stunden (Abb. F-21), von IL-10 (Abb. F-22) nach 12 Stunden, von PMN-Elastase (Abb. F-23) nach 24 Stunden und von TNF α (Abb. F-21) und Cathepsin X (Abb. F-23) nach 48 Stunden ein Maximum. Aufgrund des kleinen Patientenkollektivs und der großen interindividuellen Schwankungen kam es bei der Auswertung der mRNA-Expressionsprofile zu großen Standardabweichungen, die nur eine Beschreibung von Tendenzen erlauben. Darüber hinaus waren die absoluten Kopienzahlen von IL-10 in Monozyten (Abb. F-16) und PMN-Elastase in Granulozyten (Abb. F-17) sehr gering.

Die fehlende Vergleichbarkeit der Expressionsprofile von mRNA- und Proteinebene in dieser Pilotstudie legen die Vermutung nahe, dass nach Aktivierung der Zellen durch den operativen Eingriff bereits präformierte Proteine freigesetzt werden. Im Bezug auf die Zytokin-Biologie ergeben sich für den quantitativen Nachweis von mRNA im Gegensatz zum Nachweis auf Proteinebene folgende Vorteile: Die meisten Zytokine werden in sehr geringen Mengen produziert, besitzen eine niedrige Halbwertszeit und nach ihrer Freisetzung erfolgt eine schnelle Utilisation nach autokriner oder parakriner Übertragung bei Zell-zu-Zell-Kontakt [Romagnani et al., 2000].

G 3.3 Pro- versus anti-inflammatorische Zytokine

Die pathophysiologischen Mechanismen, die sich im Interstitium von Zellverbänden abspielen, während eine posttraumatische Entzündungsreaktion stattfindet, sind sehr komplex. Es kommt nach der Ischämie zu Revaskularisierungsprozessen und Ausprägungen von Ödemen, die eine Versorgung des traumatisierten Gewebes mittels Diffusion ermöglichen [Aller et al., 2006]. Während sich die Epithelzellen durch das interstitielle Ödem zunehmend von den Kapillaren entfernen, kommt es in dieser Phase der inflammatorischen Antwort zu einer Induktion der lymphatischen Zirkulation. Ihr wird eine entscheidende Rolle zugeordnet, da sie mit Hilfe der Leukozyten in Symbiose mit verschiedenen Bakterien die Versorgung des Gewebes aufrechterhält. Die immunologische Reaktion korreliert dabei zum einen mit dem Grad der Gewebeschädigung, zum anderen mit dem Ausmaß der Hämorrhagie und Ischämie [Hildebrand et al., 2005]. Die Dilatation der lymphatischen Gefäße wird durch verschiedene Zytokine, Leukotriene und Prostaglandine getriggert, die von aktivierten Zellen im geschädigten Gewebe freigesetzt werden. Sepsis und SIRS werden mit einer exzessiven Produktion von pro- und antiinflammatorischen Mediatoren assoziiert, die ebenfalls im Gewebe produziert werden [Cavaillon et al., 1995].

Obwohl es sich um einen systemischen Prozess handelt, unterscheiden sich die pathophysiologischen Ausprägungen von Organ zu Organ. Die Ursache der Schädigung (z.B. Verbrennung, Hämorrhagie, Trauma, Peritonitis), der zelluläre Aufbau des Kompartimentes (z.B. Art der Phagozyten oder Endothelzellen), die direkte Umgebung (z.B. lokales Vorkommen von Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierendem Faktor (GM-CSF) in der Lunge, niedrige Argininspiegel in der Leber, Ausschüttung von Endotoxinen im Magen) und die Produktion von Leukozyten haben einen großen Einfluss auf die lokale Entzündungsreaktion und Art der Gewebeschädigung [Cavaillon et al., 2006].

Hohe Spiegel an pro-inflammatorischen Mediatoren (z.B. $\text{TNF}\alpha$, IL-8), die lokal produziert werden und in den Blutstrom gelangen, führen zu Organverletzungen als Konsequenz eines „cross-talks“ zwischen verschiedenen Organen. Die inflammatorische Reaktion innerhalb des Gewebes wird dabei stark von Neuromediatoren beeinflusst, die über cholinerge und sympathische Neuronen an den Ort des Geschehens gelangen. Acetylcholin und Epinephrin führen zusammen mit IL-10 und anderen Mediatoren zu einer anti-inflammatorischen Kompensationsreaktion, um den Entzündungsprozess einzuschränken. Während diese Mediatoren hauptsächlich in der Blutbahn zu finden sind, wo sie das Aufflammen neuer entzündlicher Foci verhindern, reicht die Konzentration der anti-inflammatorischen Mediatoren in den Geweben nicht immer aus, um die Initiation eines entzündlichen Prozesses suffizient zu unterbinden [Cavaillon et al., 2006]. Die lokale Freisetzung von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen nach traumatischen Ereignissen ist ein Hinweis für ihr Potential, systemische Immunreaktionen zu modulieren. Es erscheint, als würde das Gleichgewicht oder Ungleichgewicht dieser verschiedenen Zytokine zum Teil den klinischen Verlauf dieser Patienten beeinflussen. Überproduktion von entweder pro- oder antiinflammatorischen Mediatoren könnte zu einer Organdysfunktion führen. Wo eine Dominanz der proinflammatorischen Zytokine zu einem SIRS führen könnte, wäre die aus einer antiinflammatorischen Reaktion resultierende Immunsuppression mit einem erhöhten Risiko für infektiöse Komplikationen verbunden. Dabei spielen sowohl die systemische Entzündung als auch die Immunsuppression eine entscheidende Rolle in der Entwicklung eines MOV.

$\text{TNF}\alpha$, Interleukin-1beta, IL-6 und IL-8 sind die wichtigsten proinflammatorischen Zytokine, die in eine Immunreaktion nach Trauma oder einem operativen Eingriff involviert sind. Diese Zytokine werden hauptsächlich in Monozyten und Makrophagen produziert und induzieren eine Vielzahl an überlappenden Effekten, die auch additiv wirken können. $\text{TNF}\alpha$ ist als sehr potentes proinflammatorisches Zytokin für die Regulation der frühen Immunreaktion verantwortlich und induziert die Freisetzung der sekundären Zytokine IL-6 und IL-8. Es erhöht sowohl die Permeabilität als auch die prokoagulatorische Aktivität des Endothels [Brett et al., 1989; Nawroth et al., 1989] und bewirkt eine vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen [Redl et al., 1993]. In experimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass $\text{TNF}\alpha$ in der Pathogenese der inflammatorischen Reaktionen nach Trauma und Infektion eine essenzielle Rolle einnimmt. Da $\text{TNF}\alpha$ auf viele verschiedene Zelltypen wirkt, zeigt es ein weites Spektrum biologischer Funktionen. Es hat zytolytische und zytostatische Effekte auf Tumorzellen und wirkt auf Neutrophile chemotaktisch. $\text{TNF}\alpha$ ist ein Wachstumsfaktor für Fibroblasten

und stimuliert die Synthese von Kollagenase und Prostaglandin E2 [Faist et al., 1994]. Neben der löslichen Form von TNF α kann eine membranständige Form auf der Oberfläche von TNF α -produzierenden Zellen nachgewiesen werden. Möglicherweise dient diese Form als Pool für lösliches TNF α nach proteolytischer Spaltung [Belardelli et al., 1995].

Bei der Analyse des postoperativen mRNA-Expressionsprofils von TNF α fiel eine abnehmende Tendenz der Kopienzahlen in Granulozyten innerhalb der ersten 6 Stunden nach dem Eingriff auf. Auf diese Abnahme folgte eine Zunahme des Expressionsprofils bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes auf Werte, welche die initialen Kopienzahlen übertrafen. In den Monozyten blieb das mRNA-Expressionsprofil von TNF α mit Ausnahme von TP09 und TP10 konstant. Bei der Normierung der Ergebnisse auf GAPDH fiel ein Peak bei der 12h- Abnahme auf, der jedoch von einer hohen Standardabweichung gekennzeichnet ist und daher nicht als signifikant zu werten ist. Auf Proteinebene ist nur ein geringer Anstieg der TNF α -Spiegel im Serum zu erkennen, der eventuell auf die kurze Halbwertszeit von TNF α (14-18min) zurückzuführen ist [Opal et al., 2000].

IL-10 übt als antiinflammatorisches Zytokin eine inhibierende Wirkung auf die Synthese von proinflammatorischen Zytokinen durch mononukleäre Zellen aus, in dem es die Gentranskription proinflammatorischer Zytokine reduziert und den Abbau der mRNA dieser entzündungsfördernden Mediatoren induziert [Fiorentino et al., 1989; Opal et al., 2000]. Erhöhte IL-10-Plasmakonzentrationen konnten beim polytraumatisierten Patienten beobachtet werden. Sowohl die Verletzungsschwere als auch die Entwicklung post traumatischer Komplikationen wie Sepsis oder ARDS korrelieren dabei mit den IL-10-Plasmaspiegeln [Neidhardt et al., 1997].

Patienten mit bereits bestehendem Acute Respiratory Distress Syndrom (ARDS), die im klinischen Verlauf verstarben, wiesen dabei die höchsten systemischen IL-10-Werte auf [Parsons et al., 2005]. Die immunsuppressiven Eigenschaften des IL-10 könnten hier für als wesentliche Ursache angesehen werden [Smith et al., 2000]. Aber auch eine inadäquate antiinflammatorische Immunantwort kann das Outcome von Patienten negativ beeinflussen. So waren niedrige IL-10-Konzentrationen im Rahmen einer akut auftretenden Beeinträchtigung der Lungenfunktion („acute lung injury“) mit einer Progression der Erkrankung zum ARDS assoziiert [Pallister et al., 2005].

Nach operativen Eingriffen konnten jedoch auch Anstiege der systemischen Konzentrationen antiinflammatorischer Mediatoren nachgewiesen werden [Naldini et al., 1998; Seekamp et al., 1998; Smith et al., 2000]. So konnten erhöhte IL-10-Konzentrationen mit einem verlängerten Aufenthalt auf der Intensivstation, einer längeren Gesamtliegedauer im Krankenhaus und der Entwicklung schwerer Infektionen assoziiert werden [Bown et al., 2004]. Auch bei septischen Patienten waren die IL-10-Plasmaspiegel signifikant erhöht. Die IL-10-Konzentrationen korrelierten dabei mit der Erkrankungsschwere, da Patienten im septischen Schock im Vergleich zu septischen Patienten ohne Schocksymptomatik deutlich höhere Werte aufwiesen [Martin et al., 1997]. Übereinstimmend wird berichtet, dass Patienten mit hohen IL-10-Konzentrationen im Rahmen von Infektionen ein größeres Risiko aufwiesen, an dieser Erkrankung zu versterben [Opal et al., 2000]. Gogos et al. [Gogos et al., 2000] schlussfolgerte, dass signifikant erhöhte IL-10-Plasmakonzentrationen bei Sepsis den besten Marker für die Erkrankungsschwere und das Outcome darstellen. Allerdings muss beachtet werden, dass auch bei infektiösen Komplikationen Basiskonzentrationen von IL-10 nötig sind, um eine überschießende Inflammation mit Fieber, proinflammatorischer Zytokinproduktion und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten zu verhindern [Gogos et al., 2000].

Studien haben gezeigt, dass Patienten mit einer metastasierten Tumorerkrankung bereits einer signifikanten inflammatorischen Immunreaktion ausgesetzt sind, in der supprimierte TNF α - und erhöhte IL-10-Spiegel detektiert werden konnten. Dies kann unter Umständen die Tumorprogression und Bildung von Metastasen beeinflussen [Kelly et al., 2006]. Eine zukünftige Therapiestrategie liegt möglicherweise in der Antagonisierung der IL-10-induzierten Immunsuppression. Da bei drei der in die Pilotstudie eingeschlossenen Patienten (TP01, TP04, TP11) Metastasen zu finden waren, ist nicht auszuschließen, ob hier bereits präoperativ eine systemische Immunreaktion stattgefunden hat.

Die Operationstechnik und die Art der Analgesie haben möglicherweise ebenfalls Auswirkungen auf die systemische inflammatorische Immunreaktion. So zeigt die laparoskopische im Vergleich zur offenen mesorektalen Resektion in erster Linie messbare klinische Vorteile beim intraoperativen Blutverlust, einen niedrigeren Analgetika- und Narkotikaverbrauch, einer schnelleren Rückkehr zu einer normalen Ernährung sowie einer geringer ausgeprägten Immunreaktion. Kein Unterschied zeigte sich jedoch in der Rezidivrate, Mortalität, Morbidität und dem Auftreten einer Anastomoseninsuffizienz [Breukink et al., 2006]. Die heute gerade bei abdominalen Eingriffen immer häufiger durchgeführte „Fast-track“-Behandlung kombiniert ein minimalinva-

sives operatives Verfahren mit Periduralkatheteranalgesie sowie schneller postoperativer Nahrungsaufnahme und Mobilisation. Dieses neue, multimodale Konzept bietet Patienten mit kolorektaler Erkrankung eine komfortable perioperative Behandlung ohne Erhöhung der perioperativen Morbidität [Widmaier et al., 2007]. Inwieweit die Zytokinfreisetzung während der inflammatorischen Immunreaktion von dieser Methodik beeinflusst wird, ist bislang noch nicht erforscht.

G 3.4 Cathepsin X und PMN-Elastase

Das typischerweise nach traumatischen Eingriffen auftretende SIRS [Baue et al., 2000; Mannick et al., 2001] induziert sowohl die Aktivierung wie auch die Inhibierung der humoralen als auch der zellulären Immunantwort. In diesem Kontext spielen zirkulierende Monozyten neben Neutrophilen eine bedeutende Rolle bei der Ausprägung eines Multiorganversagens [Oberholzer et al., 2005]. Die lysosomale Carboxypeptidase Cathepsin X ist hauptsächlich in Monozyten und Makrophagen gespeichert und wird von aktivierten Immunzellen in die Zirkulation ausgeschüttet. Um das diagnostische Potential von Cathepsin X als Entzündungsmarker zu definieren, wurde von Nägler et al. [Nägler et al., 2006] zur intra- und extrazellulären Detektion und Quantifizierung ein hochsensitiver und spezifischer Immunoassay (ELISA) vom Sandwich-Typ entwickelt, welches auch in dieser Pilotstudie angewendet wurde.

In aktuellen Studien konnte nachgewiesen werden, dass innerhalb der ersten 72 Stunden nach Trauma die Plasmaspiegel von Cathepsin X deutlich erhöht waren, besonders bei Patienten, die innerhalb des postoperativen Verlaufs verstorben waren [Nägler et al., 2006]. Im Vergleich zum Entzündungsmarker PMN-Elastase zeigte sich Cathepsin X als zuverlässigerer Prädiktor mit einer höheren Signifikanz für das Überleben der Patienten in der späten posttraumatischen Phase.

Als eine für die Aufrechterhaltung eines Entzündungsprozesses besonders wichtige Proteinase aus den PMN-Granulozyten hat sich die Serinproteinase Elastase (PMN-Elastase) erwiesen. Dabei handelt es sich um ein im neutralen pH-Bereich wirksames Enzym, welches in der Lage ist, alle löslichen und strukturgebundenen Proteine abzubauen, solange es nicht durch seinen Hauptantagonisten, den α_1 -Proteinase-Inhibitor (α_1 PI), inhibiert wird. Ein massiver Anstieg der PMN-Elastase-Konzentration konnte bereits in der Vergangenheit bei polytraumatisierten Patienten im Krankheitsverlauf gemessen werden [Jochum et al., 1994]. In der vorliegenden Pilotstudie zeigte das mRNA-Expressionsprofil von PMN-Elastase in Granulozyten (Abb. F-17) zunächst einen Abfall der Kopienzahl vom 0h- zum 6h-Messzeitpunkt.

Auch wenn die Kopienzahlen insgesamt sehr gering waren, konnte anschließend vom 6h- zum 72h-Messwert eine Zunahme der Expressionsleistung detektiert werden. Obwohl auch in der Zirkulation die Elastase-Spiegel der einzelnen Patienten stark differierten, ist ein erster Peak unmittelbar 6 Stunden nach der initialen Abnahme zu erkennen, was für eine Ausschüttung von gespeicherter Elastase aus aktivierten Granulozyten sprechen würde. Ein zweiter Peak fiel am 24h-Messzeitpunkt auf, was eventuell mit einer Hochregulation der mRNA korrelieren könnte (Abb. F-23).

Die mangelnde direkte Korrelation zwischen den Spiegeln von Cathepsin X und PMN-Elastase könnte damit zusammenhängen, dass PMN-Elastase exklusiv von neutrophilen Granulozyten (den primären Entzündungszellen) in der frühen posttraumatischen Phase ausgeschüttet wird, Cathepsin X hingegen hauptsächlich von Monozyten und Makrophagen, die erst zu einer späteren Phase im Entzündungsprozess aktiviert werden. Das mRNA-Expressionsniveau von Cathepsin X in Monozyten (Abb. F-18) zeigte sich in der vorliegenden Pilotstudie sowohl in den absoluten Kopienzahlen, als auch in der Normierung auf das *house-keeping-gen* GAPDH im Verlauf des Untersuchungszeitraumes relativ konstant. Eine diskrete Zunahme der Kopienzahlen ist vom 6h- zum 12h-Wert hin zu erkennen, jedoch bei der hohen Standardabweichung nur als Tendenz zu werten. Diese wird vermutlich durch die stark abweichenden Kopienzahlen der beiden Patienten TP10 und TP11 vom Rest des Patientenkollektivs begründet. Bei der Messung von Cathepsin X auf Translationsebene kann man hingegen eine stetige Zunahme der in der Zirkulation gemessenen Spiegel bis zum 48h-Wert erkennen, die bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes (72h) wieder leicht fallen. Die Zahl der Monozyten im Differentialblutbild zeigte sich im Verlauf des Untersuchungszeitraumes konstant, die der Granulozyten wiesen einen diskreten Anstieg auf, was aber dennoch darauf schließen lässt, dass eine Zunahme der PMN-Elastase und Cathepsin X-Spiegel nicht mit der Leukozytenzahl korreliert. Vielmehr scheint die Aktivierung der entsprechenden Zellen zu erhöhten Konzentrationen in der Blutbahn zu führen.

G 4 Schwächen und Fehlerquellen des Studiendesigns

Offensichtlich ist für die Erzielung statistisch signifikanter Ergebnisse vor allem die geringe Patientenzahl ein wesentliches Problem in Pilotstudien dieser Art. Große Patientenkollektive können jedoch nur durch einen deutlich höheren finanziellen, personellen und zeitlichen Aufwand erfasst werden, wobei die Durchführung als Multi-Center-Studie zur Verkürzung der

Datenerfassungszeit eine wesentliche Bedingung darstellt. Obwohl kolorektale Karzinome durchaus ein häufiges Krankheitsbild darstellen, ist die operative Therapie mit anschließendem stationärem Aufenthalt entsprechend dem jeweiligen Patientengut und der Tumorart sowie – ausdehnung sehr unterschiedlich. Die Größe und Ausbreitung des Tumors kann unter Umständen zu einer bereits länger bestehenden Immunreaktion führen, die post-operative inflammatorische Prozesse beeinflussen könnte. Zusätzlich handelt es sich bei den in Frage kommenden Patienten meist um ältere Personen mit verschiedenen Co-Morbiditäten, die aufgrund der gesundheitlichen Ausgangssituation die Vergleichbarkeit und Vereinheitlichung der Studienpatienten erschweren.

Eine ausführliche Aufklärung der Patienten über die Art und Durchführung der Studie mit entsprechender Einwilligung zeigt sich ebenfalls als diffizil, da die Patienten zusätzliche Blutabnahmen scheuen und in der Vorbereitung auf die anstehende Operation bereits psychisch belastet sind. Mehrfache Blutabnahmen zu exakten Messzeitpunkten über einen größeren Zeitraum – wie in der vorliegenden Pilotstudie praktiziert – sind oftmals durch den hohen personellen Aufwand und die Anwesenheitspflicht zu den vorgegebenen Zeitpunkten, die meist auch nachts stattfinden mussten, nicht durchführbar. Die Proben müssen sofort nach der Abnahme aufbereitet werden, was mit einem hohen zeitlichen Aufwand verbunden ist. Die weitere Isolierung, Separation und Bearbeitung des Probenmaterials ist darüber nur mit hohem personellem Aufwand möglich. Im Rahmen meiner medizinischen Doktorarbeit war daher sowohl aus zeitlichen als auch finanziellen Gründen die Begrenzung der Patientenzahl unvermeidlich. Des Weiteren erscheint nach Auswertung der Messdaten der prospektiv definierte Beobachtungszeitraum von immerhin 72 Stunden doch zu kurz angesetzt, um ein eventuelles Abklingen der operativ induzierten Entzündungsreaktion nachweisen zu können. Bei einem längeren Beobachtungszeitraum wären präzisere Angaben über den Verlauf der Immunreaktion möglich gewesen.

Als weitere Konsequenz für eine umfangreichere Studie wäre eine stärkere Fokussierung auf einzelne Parameter und damit ggf. eine Reduktion der abzunehmenden Menge an Blut möglich. Außerdem wäre im Rahmen einer Multicenter Studie der Einschluss größerer Patientenkollektive denkbar, um signifikante Ergebnisse zu erzielen.

G 5 Schlussfolgerung und Ausblick

TNF α nimmt im Rahmen der Immunantwort nach Trauma, Sepsis oder großen Operationen zwar eine zentrale Rolle im Rahmen der proinflammatorischen Immunreaktion ein, systemische Konzentrationen dieses Zytokins können jedoch nicht als zuverlässiger diagnostischer Marker für das Outcome gelten. Eine Erklärung hierfür ist in der Pharmakokinetik zu suchen [Lin et al., 2000]. In verschiedenen Studien konnte auch für IL-8 kein signifikanter Zusammenhang mit posttraumatischen Komplikationen nachgewiesen werden [Goodman et al., 1998; Lendemans et al., 2004]. Dies ist allerdings auch nicht überraschend, da durch die Beurteilung der Patienten anhand eines Parameters zum einen nicht der Komplexität der posttraumatischen Entzündungsreaktion Rechnung getragen wird und zum anderen genetische Variationen innerhalb der Zytokine nicht berücksichtigt werden [Watanabe et al., 2005]. Des Weiteren haben epidemiologische Studien gezeigt, dass demographische und sozioökonomische Faktoren wie Alter, Geschlecht, Gewicht, Herkunft, Body Mass Index, Ernährung, Alkoholkonsum und sozioökonomischer Status einen Einfluss auf die Produktion von inflammatorischen Mediatoren haben [Eklund et al., 2009]. Insbesondere müssen geschlechtsspezifische Unterschiede berücksichtigt werden, da in experimentellen Studien gezeigt werden konnte, dass Entzündungsreaktionen durch Sexualhormone signifikant beeinflusst werden können [Yatkin et al., 2009].

Bei den antiinflammatorischen Mediatoren scheint das IL-10 nach den mehrheitlichen Ergebnissen der klinischen Studien im Rahmen eines Polytraumas oder einer Sepsis als prognostischer Mediator Verwendung finden zu können, um die Progredienz der Erkrankungen im späteren klinischen Verlauf zu beurteilen [Hensler et al., 1997; Oberholzer et al., 2005]. Polytraumatisierte Patienten repräsentieren eine sehr heterogene Patientengruppe. Die Patientengruppe in der vorliegenden Pilotsudie ist im Vergleich dazu deutlich homogener, weist aber dennoch deutliche individuelle Unterschiede bei den mRNA-Expressionsprofilen der untersuchten Zytokinen auf. Somit scheint die prognostische Beurteilung des klinischen Verlaufs und Outcomes dieser Patienten anhand dieser Parameter nicht ausreichend sicher zu sein.

Die Relevanz von PMN-Elastase als Prädiktor für das klinische Outcome ist bislang noch nicht endgültig geklärt. Mehrere Studien zeigten, dass eine Korrelation zwischen hohen PMN-Elastase Serumkonzentrationen und schlechtem klinischen Zustand besteht. Als Marker für den bestehenden Zustand des Patienten zeigt es sich daher als nützlich.

Die Rolle als prognostischer Faktor ist jedoch noch nicht abschließend geklärt, da viele Studien keine Differenz zwischen klinischem Krankheitsbild und PMN-Elastase Serumkonzentration im Sinne eines richtungsweisenden Parameters beschreiben konnten [López-Campos Bodineau et al., 2009]. Studien mit größeren Fallzahlen und unterschiedlichen Krankheitsbildern könnten dabei richtungsweisend sein. In wieweit Cathepsin X als Prädiktor für inflammatorische Reaktionen in Frage kommt, müsste an größeren Patientenkollektiven und Krankheitsbildern mit ausgeprägteren Immunreaktionen evaluiert werden. Tendenzen sind bereits in dieser Pilotstudie zu erkennen, aber aufgrund des geringen Patientenkollektives nicht ausreichend aussagekräftig.

Beim PAXgene Abnahmesystem wurden Vorteile im Bezug auf die Praktikabilität im klinischen Alltag detektiert. Der teilweise auftretende Informationsverlust bei der Isolierung der mRNA lässt jedoch an einem flächendeckenden Einsatz in naher Zukunft zweifeln. In Anbetracht dieser Überlegungen erscheint die Korrelation mehrerer inflammatorischer Marker wie z.B. IL-6, IL-10, CRP und Procalcitonin als eine Möglichkeit, den prognostischen Wert der inflammatorischen Parameter zu erhöhen [Loisa et al., 2003, Miyaoka et al., 2005]. Ebenso dürfte die Einbeziehung anderer Laborwerte wie Laktat und Thrombozytenzahl sowie diverser physiologischer Parameter wie Herzfrequenz, Volumenbedarf und Blutdruck sinnvoll zu sein [Nast-Kolb et al., 1997; Pilz et al., 1996]. Ob und wie eine Analyse der pro- und antiinflammatorischen Mediatoren für den Verlauf und die Detektion von Immunschwächen in Frage kommt, ist ebenfalls nur über einen längeren Studienverlauf zu erklären. Interessant wäre darüber hinaus, ob und in welchem Ausmaß es bereits bei kleinen operativen Eingriffen zu einer Induktion einer systemischen Immunreaktion kommt. Ein Vergleich mit Patienten ohne signifikante Vorerkrankungen und damit ggf. vorbestehenden Alterationen der Immunreaktion wäre darüber hinaus vorstellbar.

H Literaturverzeichnis

- Abbas AK, Lohr J, Knoechel B (2007) Balancing autoaggressive and protective T cell responses. *J Autoimmun.* 28(2-3):59-61
- Abraham E, Glauser MP, Butler T, Garbino J, Gelmont D, (1997) p55 Tumor necrosis factor receptor fusion protein in the treatment of patients with severe sepsis and septic shock. A randomized controlled multicenter trial. *JAMA.* 21;277(19):1531-8
- Adib-Conquy M, Cavaillon JM (2009) Compensatory anti-inflammatory response syndrome. *Thromb Haemost.* 101(1):36-47
- Aller MA, Arias JL, Sanchez-Patan F, Arias, J (2006) The inflammatory response: an efficient way of life. *Med Sci Monit* 12(10) RA225-34
- Angele MK, Faist E. Clinical review: immunodepression in the surgical patient and increased susceptibility to infection. *Crit Care* 2002; 6(4):298-305
- Asare AL, Kolchinsky SA, Gao Z, Wang R, Raddassi K, Bourcier K (2008) Differential gene expression profiles are dependent upon method of peripheral blood collection and RNA isolation. *BMC Genomics.* 10;9:474
- Audisio R, Geraghty JG, Longo W (2001) Modern management of cancer of the rectum. Berlin: Springer-Verlag, B/W, pp 234
- Baggiolini M (1989) Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest* 84:1045-7
- Baigrie RJ, Lamont PM, Kwiatkowski D, Dallman MJ, Morris PJ (1992) Systemic cytokine response after major surgery. *Br J Surg* 79(8) 757-760
- Balague Ponz C, Trias M (2001) Laparoscopic surgery and surgical infection. *J Chemother*, 13 Spec No 1(1), 17-22
- Baud L, Cadranel J, Offenstadt G, Luquel L, Guidet B, Amstutz P (1990); Tumor Necrosis Factor and Septic Shock, *Crit Care Med*, 1990, Vol.18, No.3, S.349-350
- Baue AE (2000) A debate on the subject "Are SIRS and MODS important entities in the clinical evaluation of patients?" The con position. *Shock.* 14(6):590-3
- Belardelli F (1995) Role of interferons and other cytokines in the regulation of the immune response *APMIS* 103:161-79
- Berghella AM, Pellegrini P, Del Beato T, Maccarone D, Adorno D, Casciani CU (1996) Prognostic significance of immunological evaluation in colorectal cancer. *Cancer Biother Radiopharm* 11(6), 355-361
- Bhargava S, Stummeyer T, Hotz B, Hines OJ, Reber HA, Buhr HJ (2005). Selective inhibition of endothelin receptor A as an anti-angiogenic and anti-proliferative strategy for human pancreatic cancer. *J Gastrointest Surg.* 9(5):703-9

Biberthaler P, Neth P, Bach B, Mayer V, Mussack T, Mutschler W (2003) Initial RNA expression in human monocytes after multiple injury: a screening pilot study on potentially trauma-sensitive factors by using the microarray-technique. *Eur J Med Res*, 8(11), 473-484

Biberthaler P, Stegmaier J, Mayer V, Kirchhoff C, Neth P, Mussack T (2004) Initial posttraumatic translocation of NF-kappaB and TNF-alpha mRNA expression in peripheral blood monocytes of trauma patients with multiple injuries: a pilot study. *Shock* 22(6), 527-532

Bieli C, Frei R, Schickinger V, Steinle J, Bommer C, Loeliger S (2008) Gene expression measurements in the context of epidemiological studies. *Allergy* 63(12):1633-6

Brett J, Gerlach H, Nawroth P, Steinberg S, Godman G, Stern D (1989) Tumor necrosis factor/cachectin increases permeability of endothelial cell monolayers by a mechanism involving regulatory G proteins. *J Exp Med*. 1;169(6):1977-91

Boese- Landgraf J (1998) Epidemiologie, Vorstufen und Pathogenese des kolorektalen Karzinoms, *Der Onkologe Springer Berlin / Heidelberg*, Volume 4, Supplement 1

Bogner V, Kirchhoff C, Baker HV, Stegmaier JC, Moldawer LL, Mutschler W (2007) Gene expression profiles are influenced by ISS, MOF, and clinical outcome in multiple injured patients: a genome-wide comparative analysis. *Langenbecks Arch Surg* 392(3), 255-265

Bond JH (2001) Colon polyps and cancer. *Gastroenterology Section, Endoscopy* 33(1):46-54

Bown MJ, Horsburgh T, Nicholson ML, Bell PR, Sayers RD (2004) Cytokines, their genetic polymorphisms, and outcome after abdominal aortic aneurysm repair. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 28(3), 274-280

Breukink S, Pierie J, Wiggers T (2006). Laparoscopic versus open total mesorectal excision for rectal cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 18;(4)

Buchmann P (2003) Standard technique of oncologic colorectal surgery. *Swiss Surg*. 9(3):140-4

Buunen M, Gholghesaei M, Veldkamp R, Meijer DW, Bonjer HJ, Bouvy ND (2004). Stress response to laparoscopic surgery: a review. *Surg Endosc*, 18(7), 1022-1028

Carrillo EH, Gordon L, Goode E, Davis E, Polk HC, Jr. Early elevation of soluble CD14 may help identify trauma patients at high risk for infection. *J Trauma* 2001; 50(5):810-816.

Cavaillon JM (1995) Cytokines in inflammation *C R Seances Soc Biol Fil*, 189(4) 531-544

Cerami A (1992) Inflammatory Cytokines. *Clin Immunol Immunopathol*. 62(1 Pt 2):S3-10

Chai JG, Xue SA, Coe D, Addey C, Bartok I, Scott D (2005). Regulatory T cells, derived from naive CD4+CD25- T cells by in vitro Foxp3 gene transfer, can induce transplantation tolerance. *Transplantation*. 27;79(10):1310-6

Cotter MJ, Hellewell PG, Ridger VC (2001) A novel method for isolation of neutrophils from murine blood using negative immunomagnetic separation. *Am J Pathol* 159: p. 473-81

- Cush JJ, Splawski JB, Thomas R (1995) Elevated interleukin-10 levels in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 38:96-104
- Deitch EA, Rutan R, Waymack JP. Trauma, shock, and gut translocation. *New Horiz* 1996; 4(2):289-299.
- Doherty TM (1995) T-cell regulation of macrophage function. *Curr Opin Immunol* 7:400-4
- Dummer W (2005) Elevated serum levels of interleukin-10 in patients with metastatic malignant melanoma. Short Communication: *Melanoma Res* 1995;5:67-8
- Eklund CM (2009) Proinflammatory cytokines in CRP baseline regulation *Adv Clin Chem.* 48:111-36
- Ertel W, Keel M, Marty D, Hoop R, Safret A, Stocker R et al. [Significance of systemic inflammation in 1,278 trauma patients]. *Unfallchirurg* 1998; 101(7):520-526.
- Faist E, Hartl WH, Baue AE (1994) Immune mechanisms of post-traumatic hyperinflammation and sepsis. *Immun Infekt*, 22(6) 203-213
- Feezor RJ, Baker HV, Mindrinos M, Hayden D, Tannahill CL, Brownstein BH (2004) Whole blood and leukocyte RNA isolation for gene expression analyses. *Physiol Genomics*, 19(3), 247-254
- Friedman RB, Young DS (1997) Elastase, Elastase- α 1-Proteinase Inhibitor Complex In: *Effects of Disease on Clinical Laboratory Tests* AACC Press, Washington, 3rd Edition, 3-161
- Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR (1989) Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med*, 170(6), 2081-2095
- Gebhard F, Pfetsch H, Steinbach G, Strecker W, Kinzl L, Bruckner UB. Is interleukin 6 an of injury severity following major trauma in humans? *Arch Surg* 2000; 135(3):291-295.
- Gogos CA, Drosou E, Bassaris HP, Skoutelis A (2000) Pro- versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options. *J Infect Dis*, 181(1), 176-180
- Gomez-Jimenez J, Martin MC, Sauri R (1995) Interleukin-10 and the monocyte/macrophage induced inflammatory response in septic shock. *J Infect Dis* 171, 472-5
- Goodman ER, Kleinstein E, Fusco AM, Quinlan DP, Lavery R, Livingston DH (1998) Role of interleukin 8 in the genesis of acute respiratory distress syndrome through an effect on neutrophil apoptosis. *Arch Surg*, 133(11), 1234-1239
- Gurlich R, Maruna P, Kalvach Z, Peskova M, Cermak J, Frasko R (2005) Colon resection in elderly patients: comparison of data of a single surgical department with collective data from the Czech Republic. *Arch Gerontol Geriatr.* 41(2), 183-190
- Hack C E, Hart M, van Schijndel RJ, Eerenberg AJ, Nuijens JH, Thijs LG, (1992) Interleukin-8 in sepsis: relation to shock and inflammatory mediators. *Infect Immun.* ; 60(7): 2835–2842.

- Haertel C, Bein G, Muller-Steinhardt M, Kluter H (2001) Ex vivo induction of cytokine mRNA expression in human blood samples, *J Immunol Methods* 1; 249(1–2): 63–71
- Haller DG (1997) Trimetrexate: experience with solid tumors. *Semin Oncol.* 24(5 Suppl 18):S18-71-S18-76
- Hein J, Bein G, Hackstein H (2001) Quantification of murine IFN-gamma mRNA and protein expression: impact of real-time kinetic RT-PCR using SYBR green I dye. *Scand J Immunol*, 54: p. 285-91
- Hensler T, Hecker H, Heeg K, Heidecke CD, Bartels H, Barthlen W (1997) Distinct mechanisms of immunosuppression as a consequence of major surgery. *Infect Immun.* 65(6):2283-91
- Herold G (2004), *Kolorektales Karzinom, Innere Medizin*, S. 401
- Hietbrink F, Koenderman L, Rijkers G, Leenen L (2006) Trauma: the role of the innate immune system. *World J Emerg Surg*, 1, 15
- Hildebrand F, Pape HC, Krettek C (2005) The importance of cytokines in the posttraumatic inflammatory reaction, *Unfallchirurg*, 108(10), 793-4, 796-803
- Hintz P, Jochum M, Mossmann H (1987) Neutral proteinase inhibitors in PMN leukocytes. I. Purification and characterization of a neutral proteinase inhibitor from bovine neutrophils. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 368(10), 1333-1342
- Holzappel B, Wickert L (2007) Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). *Biologie in unserer Zeit.* 37(2), 120-126
- Inadomi JM, Sonnenberg A (2000) The impact of colorectal cancer screening on life expectancy. *Gastrointest Endosc.* 51(5):517-23
- Ishida, H. (1994). Clinical implication of IL-10 in patients with immune and inflammatory diseases *Rinsho Byori.* 42(8):843-52
- Jochum M, Gippner-Steppert C, Machleidt W, Fritz H (1994) The role of phagocyte proteinases and proteinase inhibitors in multiple organ failure. *Am J Respir Crit Care Med*, 150(6 Pt 2), 123-30
- Jochum M (1999) Hämostasefaktoren, Zytokine, leukozytäre Proteasen und lösliche Adhäsionsmoleküle bei Sepsis und SIRS, *Anästhesiologie & Intensivmedizin* 1, 44
- Juusola J, Ballantyne J (2007) mRNA Profiling for Body Fluid Identification by Multiplex Quantitative RT-PCR. *J Forensic Sci.* 52(6):1252-62
- Kahi CJ, Imperiale TF, Juliar BE, Rex DK (2009) Effect of Screening Colonoscopy on Colorectal Cancer Incidence and Mortality. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 7:770-5
- Kampalath B, Cleveland RP, Chang CC, Kass L. Monocytes patients. *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127(12):1580-1585.

- Kelly AM, Golden-Mason L, Traynor O, Geoghegan J, McEntee G, Hegarty JE (2006). Changes in hepatic immunoregulatory cytokines in patients with metastatic colorectal carcinoma: implications for hepatic anti-tumour immunity. *Cytokine*, 35 (3-4), 171-179
- Kirchhoff GM, Buhmann S, Kirchhoff C, Mussack T, Ladurner R, Kamal AA (2006) Early diagnosis of colorectal cancer: a preventive task in occupational health. *Eur J Med Res*, 11(7), 279-284
- Landes J, Langer S, Kirchhoff C, Schuetz C, Joneidi-Jafari H, Stegmaier J (2007) Snapshot assessment of RNA-expression in severely burned patients using the PAXgen trade mark Blood RNA System. *Burns* 34(2):197-204
- Launoy G, Berchi C (2005) Advantage of immunochemical fecal occult blood test in screening for colorectal cancer. *Bull Cancer*. 1;92(10):885-90
- Lederer JA, Rodrick ML, Mannick JA. The effects of injury on the adaptive immune response. *Shock* 1999; 11(3):153-159.
- Lendemans S, Kreuzfelder E, Waydhas C, Nast-Kolb D, Flohe S (2004) Clinical course and prognostic significance of immunological and functional parameters after severe trauma. *Unfallchirurg* 107(3):203-10
- Lewis DH, Chan DL, Pinheiro D, Armitage-Chan E, Garden OA (2012) The immuno-pathology of sepsis: pathogen recognition, systemic inflammation, the compensatory anti-inflammatory response, and regulatory T cells. *J Vet Intern Med*. 2012 May-Jun;26(3):457-82
- Lieberman DA, Weiss DG, Bond JH, Ahnen DJ, Garewal H, Chejfec G (2000) Use of colonoscopy to screen asymptomatic adults for colorectal cancer. *N Engl J Med*. 20;343(3)162-8
- Lin E, Calvano SE, Lowry SF (2000) Inflammatory cytokines and cell response in surgery. *Surgery* 127(2):117-26
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR. *Methods*, 25(4): 402-408
- Loisa P, Rinne T, Laine S, Hurme M, Kaukinen S (2003) Anti-inflammatory cytokine response and the development of multiple organ failure in severe sepsis. *Acta Anaesthesiol Scand*. 47(3):319-25
- López-Campos Bodineau JL, Rodríguez Becerra E, Cayuela Domínguez A, Laserna Martínez E, Fernández Vega D, Rodríguez Matute C, Castillo Gómez J (2009) Serum neutrophil elastase levels predict initial clinical condition but do not correlate with the progression of interstitial lung disease *Med Sci Monit*. 9(1):CR1-5
- Mannick JA, Rodrick ML, Lederer JA (2001) The immunologic response to injury. *J Am Coll Surg*, 193(3), 237-244
- Marano MA, Fong Y, Moldawer LL, Wei H, Calvano SE, Tracey KJ, Barie PS, Manogue K, Cerami A, Shires GT, Lowry SF (1990) Serum cachectin/tumor necrosis factor in critically ill patients with burns correlates with infection and mortality. *Surg Gynecol Obstet*, 170:32-8

Martin C, Boisson C, Haccoun M, Thomachot L, Mege JL (1997) Patterns of cytokine evolution (tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6) after septic shock, hemorrhagic shock, and severe trauma. *Crit Care Med.* 25(11):1813-9

Maruna P, Gurlich R, Frasko R, Chachkhiani I, Marunova M, Owen K (2002) Cytokines and soluble cytokine receptors in the perioperative period, *Sb Lek*, 103(2), 273-282

Masi G, Loupakis F, Pollina L, Vasile E, Cupini S, Ricci S (2009) Long-Term Outcome of Initially Unresectable Metastatic Colorectal Cancer Patients Treated with 5-Fluorouracil/Leucovorin, Oxaliplatin, and Irinotecan followed by Radical Surgery of Metastases. *Ann Surg*, 249(3), 420-425

Mason AY, Morson BC, Dixon AK, Fry IK (1982) The clinical staging of rectal cancer. *Br J Surg*, 69(7), 404-409

Matsukawa A, Kaplan MH, Hogaboam CM, Lukacs NW, Kunkel SL. Pivotal role of signal transducer and activator of transcription (Stat)4 and Stat6 in the innate immune response during sepsis. *J Exp Med* 2001; 193(6):679-688.

Mesihovic R, Vanis N, Gribajcevic M (2008) Test for obscure bleeding vs colonoscopy in the prevention of colorectal cancer. *Med Arh*, 62(3), 153-155

Mendenhall WM, Souba WW, Bland KI, Million RR, Copeland EM (1992) Preoperative irradiation and surgery for initially unresectable adenocarcinoma of the rectum. *Am Surg*, 58(7), 423-429

Menger MD, Vollmar B (2004) Surgical trauma: hyperinflammation versus immunosuppression? *Langenbecks Arch Surg*, 389(6), 475-484

Miltenyi S, Weichel W, Radbruch A (1990) High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry*. 11(2):231-8

Miyaoka K, Iwase M, Suzuki R, Kondo G, Watanabe H, Ito D (2005). Clinical evaluation of circulating interleukin-6 and interleukin-10 levels after surgery-induced inflammation. *J Surg Res* 125(2), 144-150

Müller H, Nakchbandi W, Chatzissavvidis I, Valek V (2003) Intra-arterial infusion of 5-fluorouracil plus granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and chemoembolization with melphalan in the treatment of disseminated colorectal liver metastases. *Hepatology* 50(54):1919-26

Nägler DK, Kruger S, Kellner A, Ziomek E, Menard R, Buhtz P (2004) Up-regulation of cathepsin X in prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia. *Prostate*, 60(2), 109-119

Nägler DK, Lechner AM, Oettl A, Kozaczynska K, Scheuber HP, Gippner-Steppert C (2006) An enzyme-linked immunosorbent assay for human cathepsin X, a potential new inflammatory marker. *J Immunol Methods*, 308(1-2), 241-250

Naldini A, Borrelli E, Carraro F, Giomarelli P, Toscano M (1998) Interleukin-10 production in patients undergoing cardiopulmonary surgery. *Cytokine* 18: 74–79

Nast-Kolb D, Waydhas C, Jochum M, Duswald KH, Machleidt W, Spannagl M (1992) Biochemical factors as objective parameters for assessing the prognosis in polytrauma *Unfallchirurg*, 95(2), 59-66

Nast-Kolb D, Waydhas C, Gippner-Steppert C, Schneider I, Trupka A, Ruchholtz S, (1997) Indicators of the posttraumatic inflammatory response correlate with organ failure in patients with multiple injuries. *J Trauma*, 42(3), 446-54; discussion 454-5

Nawroth PO, Bank I, Handley D, Cassimeris J, Chess L, Stern DM (1989) Tumor necrosis factor/ cachectin interacts with endothelial cell receptors to induce release of interleukin-1 *J Exp Med* 163: 1363–1375

Neidhardt R, Keel M, Steckholzer U, Safret A, Ungethuen U, Trentz O (1997) Relationship of interleukin-10 plasma levels to severity of injury and clinical outcome in injured patients *J Trauma*. 42(5):863-70; discussion 870-1

Nicholls RJ, Mason AY, Morson BC, Dixon AK, Fry IK (1982) The clinical staging of rectal cancer. *Br J Surg*, 69(7), 404-409

Novotny AR, Reim D, Assfalg V, Altmayr F, Friess HM, Emmanuel K, Holzmann B (2012) Mixed antagonist response and sepsis severity-dependent dysbalance of pro- and anti-inflammatory responses at the onset of postoperative sepsis. *Immunobiology*. Jun;217(6):616-21

Oberholzer, A., Souza, S. M., Tschoeke, S. K., Oberholzer, C., Abouhamze, A., Pribble, J. P. et al. (2005). Plasma cytokine measurements augment prognostic scores as indicators of outcome in patients with severe sepsis. *Shock*. 23(6):488-93

O'Brien MJ, Winawer SJ, Zauber AG, Gottlieb LS, Sternberg SS, Diaz B (1990) The National Polyp Study. Patient and polyp characteristics associated with high-grade dysplasia in colorectal adenomas. *Gastroenterology* 98(2):371-9

Oh H, Siano B, Diamond S (2008) Neutrophil isolation protocol. *J Vis Exp*. 23;(17). pii: 745. doi: 10.3791/745

Opal SM, Huber CE (2000) The role of interleukin-10 in critical illness. *Curr Opin Infect Dis*, 13(3), 221-226

Overbergh L, Valckx D, Decallonne R, Bouillon R, Mathieu C (2003) The use of real-time reverse transcriptase PCR for the quantification of cytokine gene expression. *J Biol Tech*. 14: 33-43

Pallister I, Empson K (2005) The effects of surgical fracture fixation on the systemic inflammatory response to major trauma. *J Am Acad Orthop Surg*. 13(2):93-100

Pape HC, van Griensven M, Rice J, Gansslen A, Hildebrand F, Zech S et al. Major secondary surgery in blunt trauma patients and perioperative cytokine liberation: determination of the clinical relevance of biochemical markers. *J Trauma* 2001; 50(6):989-1000

Parsons PE, Eisner MD, Thompson BT, Matthay MA, Ancukiewicz M, Bernard GR (2005) Lower tidal volume ventilation and plasma cytokine markers of inflammation in patients with acute lung injury. *Crit Care Med*. 33(1):1-6

- Peichl P, Presence of NAP-1/IL-8 in synovial fluids indicates a possible pathogenic role in rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol* 34: 333-9
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in realtime RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, 29(9): e45
- Pilz G, Fraunberger P, Appel R, Kreuzer E, Werdan K, Walli A (1996) Early prediction of outcome in score-identified, postcardiac surgical patients at high risk for sepsis, using soluble tumor necrosis factor receptor-p55 concentrations. *Crit Care Med.* 24(4):596-600
- Rainen L, Oelmueller U, Jurgensen S, Wyrich R, Ballas C, Schram J (2002) Stabilization of mRNA expression in whole blood samples. *Clin Chem.* 48(11) 1883-1890
- Redl H, Nikolai A, Kneidinger R, Schlag G (1993) Endothelial and leukocyte activation in experimental polytrauma and sepsis. *Behring Inst Mitt.* (92):218-28
- Rex DK, Johnson DA, Anderson JC, Schoenfeld PS, Burke CA, Inadomi JM (2009) American College of Gastroenterology Guidelines for Colorectal Cancer Screening. *Am J Gastroenterol.* 104(3):739-50
- Reinhardt A, Haidl G, Schill WB (1996) Granulocyte elastase indicates silent male genital tract inflammation and appropriate anti-inflammatory treatment. *Andrologia* 29: 187 – 192
- Riethmuller G, Holz E, Schlimok G, Schmiegel W, Raab R, Hoffken K (1998) Monoclonal antibody therapy for resected Dukes' C colorectal cancer: seven-year outcome of a multicenter randomized trial. *J Clin Oncol.*16(5):1788-94
- Rodriguez-Bigas MA (1996) Prophylactic colectomy for gene carriers in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Has the time come? *Cancer*, 78(2), 199-201
- Romagnani S (2000), T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol*, 85: 9-18
- Ruf W, Fischer EG, Huang HY, Miyagi Y, Ott I, Riewald M (2000) Diverse functions of protease receptor tissue factor in inflammation and metastasis. *Immunol Res.* 21(2-3):289-92
- Sadahiro S, Suzuki T, Ishikawa K, Yasuda S, Tajima T, Makuuchi H (2001) Intraoperative radiation therapy for curatively resected rectal cancer. *Dis Colon Rectum*, 44(11), 1689-1695
- Sager R, Haskill S, Anisowicz A, Trask D, Pike MC (1991) GRO: a novel chemotactic cytokine. *Adv Exp Med Biol.* 305:73-7
- Said HM, Hagemann C, Stojic J, Schoemig B, Vince GH, Flentje M (2007) GAPDH is not regulated in human glioblastoma under hypoxic conditions. *BMC Mol Biol*, 8, 55
- Schalhorn A, Siebeck M, Bumm R, Gross B (2001) Kolonkarzinome, *Manual Tumorregister*, 6. Aufl. p215
- Schmiegel W, Adler G, Frühmorgen P, Layer P, Petrasch S, Porschen R, Pox Chr, Sauerbruch T, Schmoll H-J, Zeitz M (Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten/ Arbeitsgemeinschaft für Gastroenterologische Onkologie) (2004) Kolorektales Karzinom: Prävention und Früherkennung in der asymptomatischen Bevölkerung

- Schroeder JM, Christophers E (1989) Secretion of novel and homologous neutrophil-activating peptides by LPS-stimulated human endothelial cells. *J Immunol* 142:244-51
- Schwartzberg LS (2001) Clinical experience with edrecolomab: a monoclonal antibody therapy for colorectal carcinoma. *Crit Rev Oncol Hematol.* 40(1):17-24
- Seekamp, A., Jochum, M., Ziegler, M., van Griensven, M., Martin, M., & Regel, G. (1998) Cytokines and adhesion molecules in elective and accidental trauma-related ischemia/reperfusion. *J Trauma.* 44(5):874-82
- Seibel R, LaDuca J, Hassett JM, Babikian G, Mills B, Border DO et al. Blunt multiple trauma (ISS 36), femur traction, and the pulmonary failure-septic state. *Ann Surg* 1985; 202(3):283-295
- Siebeck M, Gross M, Lau-Werner U, Lersch CH (2001) Rektumkarzinome, Manual Tumorregister 6. Aufl. p.244
- Smith RM, Giannoudis PV, Bellamy MC, Perry SL, Dickson RA, Guillou PJ (2000) Interleukin-10 release and monocyte human leukocyte antigen-DR expression during femoral nailing. *Clin Orthop Relat Res.* (373):233-40
- Sobin LH, Hermanek P, Hutter RV (1988) TNM classification of malignant tumors. A comparison between the new and the old editions. *Cancer*, 61(11) 2310-2314
- Stasi R, Zinzani L, Galieni P (1995) Clinical implications of cytokine and soluble receptor measurements in patients with newly-diagnosed aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Eur J Haematol* 54:9-17
- Sticherling M (1991) Localization of neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8-immunoreactivity in normal and psoriatic skin. *J Invest Dermatol* 96:26-30
- Stordeur P, Zhou L, Byl B, Brohet F, Burny W, de Groote D (2003) Immune monitoring in whole blood using real-time PCR. *J Immunol Methods* 276 (1-2), 69-77
- Strieter RM (1994) The immunopathology of chemotactic cytokines: the role of interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1. *J Lab Clin Med* 123:183-97
- Swatoch P (2005) Etablierung und Evaluierung einer Real-Time-PCR zur quantitativen Analyse der Genexpression von 7 humanen Zytokinen. Dissertation Eberhard Karls Universität Tübingen
- Török HP, Schaaf A, Wagner S, Ochsenkühn T, Lohse P, Mussack T, Folwaczny C (2004) TNF α and IL-10 Release According to the CARD15/NOD2 Genotype in Peripheral Blood Monocytes from Patients with Crohn's Disease. *Supp to Gastroenterology* 126: p. A104
- UICC (2002) TNM Klassifikation maligner Tumoren, Springer, Berlin Heidelberg New York 6.Aufl.
- Watanabe E, Hirasawa H, Oda S, Matsuda K, Hatano M, Tokuhisa T (2005) Extremely high interleukin-6 blood levels and outcome in the critically ill are associated with tumor necrosis factor- and interleukin-1-related gene polymorphisms. *Crit Care Med.* 33(1):89-97; discussion 242-3

Waydhas C, Nast-Kolb D, Jochum M, Trupka A, Lenk S, Fritz H (1992) Inflammatory mediators, infection, sepsis, and multiple organ failure after severe trauma. *Arch Surg*, 127(4), 460-467

Weghofer M, Haslberger A (2001) Quantitative analysis of immune-mediated stimulation of tumor necrosis factor-alpha in macrophages measured at the level of mRNA and protein synthesis. *Ann Hematol*, 80: p. 733-6

Widmaier U, Karrer M, Schoenberg MH (2007) "Fast-track" and elective, laparoscopic colorectal surgery. *Zentralbl Chir*. 132(4):342-8; discussion 348-9

Williams MA, Rhoades CJ, Newland AC, Kelsey SM (1999) The potential for monocyte-mediated immunotherapy during infection and malignancy - Part II: in vivo activation by exogenous cytokines and clinical applications. *Leuk Lymphoma* 34(3-4):207-30

Yatkin E, Bernoulli J, Talvitie EM, Santti R, Inflammation and epithelial alterations in rat prostate: impact of the androgen to oestrogen ratio *Int J Androl*. 32(4):399-410

Zahler S, Brosig A, Kupatt C, Becker BF, Gerlach E (1997) 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*, 200: p. 173-9

Zaloudik J, Lauerova L, Janakova L, Talac R, Simickova M, Nekulova M (1999) Significance of pre-treatment immunological parameters in colorectal cancer patients with unresectable metastases to the liver. *Hepatogastroenterology* 46(25) 220-227

Zügel N, Siebeck M, Geissler B, Lichtwark-Aschoff M, Gippner-Steppert C, Witte J (2002) Circulating mediators and organ function in patients undergoing planned relaparotomy vs conventional surgical therapy in severe secondary peritonitis. *Arch Surg*. 137(5):590-9

I Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
α_1 PI	α_1 -Proteinase-Inhibitor
APP	Akute-Phase-Proteine
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrom
ASA	American Society of Anaesthesiology
BSA	Bovine Serum Albumin
Ca.	Karzinom
CRP	C-Reaktives Protein
CP	Crossing Point
DNA	Desoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EK	Erythrozytenkonzentrate
ELISA	Enzyme linked immuno sorbent assay
Et al.	et alii
FFP	Fresh frozen plasma
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
IL-8	Interleukin 8
IL-10	Interleukin 10
KRK	Kolorektales Karzinom
MACS	Magnetic Labelled Bead Cell Separation
M-CSF	Monozyten Kolonie-stimulierender Faktor
MHC	Major histocompatibility complex
MOV	Multiorganversagen
MW	Mittelwert
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
NF- κ B	Nuclear factor κ B
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PGN	Peptidoglycan

PMN	Polymorphkernige Granulozyten
RICK	Regulatory Protein Kinase
RLT	RNA Lyse total RNA
RNA	Ribonucleic Acid
RT-PCR	Real time polymerase chain reaction
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
SD	Standardabweichung
TLR	Toll Like Receptor
TMB	3,3', 5,5'Tetramethylbenzidin
TME	Total Mesorectal Excision
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor α
TNM	Tumorklassifikation
UICC	Union internationale contre le cancer
ZVK	Zentraler Venenkatheter

K Curriculum Vitae

Name: **Dirk Rumpff**
Geburtsdatum: 12.10.1977
Geburtsort: Dortmund

Schule

1984-1988 Winfried Grundschule Dortmund
1988-1997 Mallinckrodt Gymnasium Dortmund
1994-1995 US Abitur an der Centennial High School, Boise USA
1997 Abitur

Zivildienst

1997-1999 Behandlungszentrum Vogtareuth
(Abteilung für rekonstruktive Plastische- & Handchirurgie)

Studium

1999 - 2001 Studium der Humanmedizin, Philipps Universität Marburg
2001 - 2006 Ludwig- Maximilians- Universität München

Frühjahr 2001 Ärztliche Vorprüfung
Frühjahr 2003 1. Teil der Ärztlichen Prüfung
Herbst 2004 2. Teil der Ärztlichen Prüfung
Frühjahr 2006 3. Teil der Ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr (Frühjahr 2005-2006)

1. Tertial Chirurgie, Klinikum Innenstadt München
2. Tertial

- Innere Medizin, Klinikum Schwabing Hämatonkologie
- Innere Medizin, Neurologie Nepean Hospital Sydney Australia

3. Tertial

- Anästhesie Wellington Hospital, Wellington Neuseeland
- Anästhesie Klinikum Innenstadt München

Praxiserfahrung

1998 Krankenpflegepraktikum, Plastische Chirurgie, Behandlungszentrum Vogtareuth
1999 Hospitation Handchirurgie BHZ Vogtareuth
1999-2001 Pflegediensttätigkeit auf der Intensivstation des Klinikums der Philipps Universität Marburg
2001 studentische Hilfskraft im Kurs für makroskopische Anatomie an der Philipps Universität Marburg
2002-2005 Famulaturen:

- Abdominalchirurgie Klinikum Innenstadt München
- Psychiatrie Klinikum Innenstadt München
- Plastische Chirurgie Asklepios Klinik Birkenwerder
- Klinische Chemie Klinikum Innenstadt München

seit März 2007

Assistenzarzt in der Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin der Charité Berlin, Campus Mitte

Kongressteilnahmen

2004 6th World Congress on Trauma, Inflammation and Sepsis-Pathophysiology in München (Poster und Vortrag)
2010 ESICM in Barcelona (Postgraduate Course)
2011 ESA in Amsterdam (Postgraduate Course)

Zusatzqualifikationen

- Kurs „Sportmedizin“
- Kurs „Geschichte der Medizin“
- div. Fortbildungen und Kurse im Rahmen der Dissertation
- Absolvierung des 80-Stunden Notarztkurses
- Teilnahme und Organisation diverser Simulationsworkshops
- Zusatzbezeichnung Ärztliches Qualitätsmanagement
- Zusatzbezeichnung Notfallmedizin
- Fachkunde Rettungsdienst

EDV-Kenntnisse

MS-Office, OS X, SPSS, div. HTML Editoren, Sigma Stat/-Plot, div. Musik Soft- & Hardware, SAP, COPRA

Fremdsprachen

Deutsch und Englisch fließend in Wort und Schrift,
Französisch, Latein

L Danksagung

Die vorliegende Dissertation ist durch die Mithilfe zahlreicher Personen entstanden, denen ich für ihre engagierte Unterstützung danken möchte.

Meinem Doktorvater Professor Dr. med. Thomas Mussack danke ich für die Ermöglichung dieser Doktorarbeit, die fachliche Betreuung sowie die stete Gesprächsbereitschaft, Motivation und Geduld.

Mein besonderer Dank gilt Frau Professor Dr. rer. nat. Dr. med. Marianne Jochum und speziell Frau Dr. rer. nat. Cornelia Gippner-Steppert und Frau PD Dr. D. Nägler, die mir bei vielen Fragen geduldig ihr Ohr schenkten und mir bei alltäglichen Problemen der praktischen Arbeit mit Rat und Tat freundschaftlich zur Seite standen.

Für die Unterstützung bei der Suche nach geeigneten Patienten sowie die Bereitstellung der Räumlichkeiten und des notwendigen Materials danke ich Herrn Professor Dr. med. Wolf Mutschler.

Mein besonderer Dank gilt allen Patienten und Probanden für die Bereitschaft, an dieser Studie teilzunehmen. Auch danke ich sehr herzlich allen Mitarbeitern, Doktoranden und dem ehemaligen Leiter des Chirurgischen Forschungslabors, Dr. Peter Neth, die alle zusammen durch anregenden und kompetenten Austausch dazu beigetragen haben, dass ich diese Studie mit Freude bearbeiten konnte.

Meiner Familie, Atilano González-Pérez und meinen Freunden danke ich für Ihre liebevolle Unterstützung und Ermutigung. Ganz besonders möchte ich meinen Eltern danken, die mir mein Studium ermöglicht und mich bisher bei allen Zielen unterstützt haben.